



EGE ÜNİVERSİTESİ

DOKTORA TEZİ

**HETEROTROFİK OLARAK ÜRETİLEN
MİKROALGLERLE UZUN ZİNCİRLİ ω -3 YAĞ
ASİTLERİ ÜRETİM PROSESİNİN
OPTİMİZASYONU**

Müge İŞLETEN HOŞOĞLU

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat ELİBOL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 612.01.00

Sunuş Tarihi : 08.03.2013

E. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bornova-İZMİR

2013

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**HETEROTROFİK OLARAK ÜRETİLEN
MİKROALGLERLE UZUN
ZİNCİRLİ ω -3 YAĞ ASİTLERİ ÜRETİM
PROSESİNİN OPTİMİZASYONU**

Müge İŞLETEN HOŞOĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 612.01.00

Sunuş Tarihi: 08 Mart 2013

Bornova-İZMİR

2013

Müge İŞLETEN HOŞOĞLU tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Heterotrofik Olarak Üretilen Mikroalglerle Uzun Zincirli ω -3 YağAsitleri Üretim Prosesinin Optimizasyonu” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönergesi ‘nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08.Mart.2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof.Dr.Murat ELİBOL



Raportör Üye : Prof.Dr. Meltem CONK DALAY



Üye : Prof.Dr.Güven ÖZDEMİR



Üye : Doç.Dr. Yonca YÜCEER



Üye : Yrd.Doç.Dr.Sayıt SARGIN



ÖZET**HETEROTROFİK OLARAK ÜRETİLEN MİKROALGLERLE UZUN
ZİNCİRLİ ω -3 YAĞ ASİTLERİ ÜRETİM PROSESİNİN
OPTİMİZASYONU**

İŞLETEN-HOŞOĞLU, Müge

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Mart 2013, 168 Sayfa

Bu çalışmada öncelikle, kültür koleksiyonlarından temin edilen bazı mikroalg türlerinin fototrofik kültürlenmeye alternatif olan heterotrofik büyüme potansiyelleri ortaya konmuştur. Söz konusu türlerden en iyi büyüme potansiyeline sahip olan *Chlorella saccharophila* ve *Cryptocodinium cohnii* ile ortam ve çeşitli çevresel faktörlerin, hücre gelişimi, toplam yağ ve ω -3 yağ asitleri üretimi açısından erlen ve biyoreaktör üretimleriyle optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. *Chlorella saccharophila* ile, kültür ortamı optimizasyonları sonrasında gerçekleştirilen 2 l'lik biyoreaktör üretimlerinde fototrofik koşullara göre 7,7 kat daha fazla biyokütle verimliliği ve 3 kat daha fazla yağ içeriği elde edilmiştir. *Cryptocodinium cohnii* ile yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda ise karbon kaynağı olarak gliserol kullanılarak, temel kültür ortamı, deniz tuzu 16 g/l, maya ekstraktı 1,7-1,88 g/l, glutamik asit 0,1 g/l, sodyum β -gliserofosfatın ise 0,15 g/l olacak şekilde modifiye edilmiştir. Çevre koşullarının optimizasyonu için 2 l'lik karıştırmalı biyoreaktörde yapılan kesikli üretimler sonucunda, optimum karıştırma hızı 150 rpm, üretim pH'sının 7,0, inkübasyon sıcaklığının ise 24 °C olduğu saptanmış ve ölçek büyütme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *C. cohnii* ile gerçekleştirilen sürekli sistem üretimlerinde seyrelme hızının, hücrelerin gelişimi, toplam yağ ve dokozahegzanoik asit (DHA) üretimi üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Her iki mikroalg türü için geliştirilen nil kırmızıyla floresan ölçümüne dayalı yağ tayini ile üretim boyunca, hücrelerde yağ üretimi takip edilmiştir. Ayrıca, *C. cohnii* kültürasyonu için, peyniraltı suyu ve mısır ıslatma şurubunun birlikte kullanıldığı kültür ortamı optimize edilmiş ve 2 l'lik biyoreaktörde üretim gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Mikroalg, heterotrofik kültür, yağ, ω -3 yağ asidi, optimizasyon, biyoreaktör

ABSTRACT**OPTIMIZATION OF LONG CHAIN ω -3 FATTY ACID PRODUCTION
BY MICROALGAE CULTURED HETEROTROPHICALLY**

İŞLETEN-HOŞOĞLU, Müge

Ph. D. in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Murat ELİBOL

March 2013, 168 Pages

In this study, primarily, heterotrophic growing potential, which is an alternative to autotrophic culturing, of the microalgae species obtained from culture collections were presented. Among the said species, optimization studies of *Chlorella saccharophila* and *Cryptocodinium cohnii* which showed the best growing potential heterotrophically considering medium and various environmental factors were performed through Erlenmeyer and bioreactor productions in terms of cell growing, total lipid and ω -3 fatty acid productions.

In the 2 l bioreactor productions performed after medium optimization with *Chlorella saccharophila* showed 7.7 times higher biomass productivity and 3 times more total lipid content comparing to autotrophic conditions. At the end of the optimization studies performed with *Cryptocodinium cohnii*, main culture medium was modified as sea salt 16 g/l, yeast extract 1.7-1.88 g/l, glutamic acid 0.1 g/l, sodium β -glycerophosphate 0.15 g/l with the glycerol as a carbon source. Optimization of environmental conditions performed in a 2 l batch bioreactor revealed that the optimum operating conditions were found as 150 rpm agitation rate, production pH 7.0 and incubation temperature 24 °C. Scaling-up studies were then carried out considering these conditions. In the continuous system productions performed with *C. cohnii*, it was determined that dilution rate was more effective on cell growing and total lipid and DHA content. Lipid production in cells was monitored during the production based on fluorescence measurement by Nile red developed for both microalgae species. Moreover, for *C. cohnii* cultivation, a culture medium wherein whey and corn steep liquor were used together was optimized and production was performed in a 2 l bioreactor.

Keywords: Microalgae, heterotrophic culture, lipid, ω -3 fatty acid, optimization, bioreactor

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında, akademik yönlendirmeleri, pozitif enerjisiyle bana her zaman destek olan, bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan kaçınmayan, tez öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok değerli hocam Prof. Dr. Murat Elibol'a teşekkürlerimi sunarım.

Akademik hayata atıldığım ilk günden itibaren, gelişim sürecime çok önemli katkı sağlayan, ihtiyaç duyduğumda tavsiyeleri ile varlığını her zaman hissettiren hocam Doç. Dr. Yonca Karagül Yüceer'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince yorumlarını ve desteklerini esirgemeyerek önemli katkılarda bulunan tez izleme komitemde yer alan hocalarım Prof. Dr. Güven Özdemir, Doç Dr. Canan Tarı, Yrd. Doç. Dr. Sayıt Sargın'a; ihtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Meltem Conk Dalay, Yrd. Doç. Dr. Suphi Öncel, Ar. Gör. Dr. Şevket Karaçancı'ya çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım Ar. Gör. Işık Çoban, Ar. Gör. Duygu Ayyıldız Tamiş, Ar. Gör. Tuğba Keskin, Ar. Gör. Mehmet Özgün Özen, Ar. Gör. Dr. Gökhan Zengin, Ar. Gör. Dr. Candaş Adıgüzel Zengin, Ar. Gör. Dr. Emek Aslan, Ar. Gör. Dr. Sultan Gülce İz, Dr. Zeliha Demirel, İdil Gültepe, Mine Güngörmüşler, Hilal Betül Kaya, Çiğdem Demirkaya, Özge Akyüz'e ve bu sürece katkı sağlamış olan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için finansal destek sağlayan TÜBİTAK ve EBİLTEM'e çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca, her konuda bana olan sonsuz desteklerinden ötürü annem Mürüvet İŞLETEN, babam Fevzi İŞLETEN ve canım kardeşim Banu İŞLETEN'e teşekkür ederim.

Son olarak bilgisi, çözümsel yaklaşımı ve sabrı ile her zaman sevgi ve desteğini yanımda hissettiğim eşim Selçuk HOŞOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxvii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	5
2.1 Yağ Asitleri ve Yağların Moleküler Yapısı.....	5
2.2 Tek Hücre Yağı Üretimi Amaçlı Kullanılan Mikroorganizmalarda Yağ Asidi Biyosentezi.....	8
2.2.1 Yağ asidi sentezinde zincir oluşumu.....	9
2.2.2 Yağ asidi zincirinin uzatılması ve uzun zincirli yağ asitlerinin doymamış hale dönüştürülmesi.....	9
2.3 Yağ Üreticisi Olarak Mikroalgler.....	12
2.3.1 Ökaryotik mikroalglerde yağlar ve yağ metabolizması.....	12
2.3.2 Biyodizel üretiminde mikroalg yağlar	14
2.3.3 Çoklu doymamış yağ asitlerinin üretiminde mikroalgler	19

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
2.4 Mikroalg Yetiştiriciliğinde Üretim Sistemleri.....	24
2.4.1 Fototrofik kültür sistemleri	24
2.4.2 Heterotrofik kültür sistemleri	25
2.5 Mikroalglerin Heterotrofik Üretimlerine Etki Eden Faktörler	26
2.5.1 Besinsel bileşenlerin etkisi	26
2.5.2 Çevresel faktörlerin etkisi.....	29
2.5.3 Kültürün büyüme kinetiğinin etkisi.....	30
2.6 Besinsel ve Çevresel Faktörlerin Etkilerinin Belirlenmesi ve Optimizasyonunda İstatistiksel Deney Tasarımları.....	30
2.7 Heterotrofik Mikroalglerin Büyük Ölçekte Üretimi İçin Kullanılan İşletim Sistemleri.....	32
2.7.1 Kesikli işletim sistemi	32
2.7.2 Kesikli beslemeli işletim sistemleri.....	33
2.7.3 Sürekli işletim sistemleri	33
2.8 Mikroalglerin Heterotrofik Yetiştirilmesinde Besin Metabolizması.....	34
2.8.1 Karbon metabolizması.....	34
2.8.2 Azot metabolizması	39
2.9 Heterotrofik Mikroalglerin Kültürasyonunda Endüstriyel Atık ve Yan Ürünlerin Kullanımı	41

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
2.10 Ölçek Büyütme	42
3. MATERYAL VE METOT	45
3.1 Materyal	45
3.1.1 Mikroalgal hücre kültürleri.....	45
3.1.2 Kullanılan kimyasal malzemeler	46
3.1.3 Kullanılan cihazlar	47
3.1.4 Üretim ortamları	48
3.1.5 Çalışmada kullanılan peyniraltı suyu ve mısır ıslatma şurubu	49
3.2 Metot.....	50
3.2.1 Mikroalgleri Yetiştirme Koşulları	50
3.2.2 Spektrofotometre ile optik yoğunluk ölçümü	51
3.2.3 Hücre sayımı ve kuru hücre ağırlığı ölçümü	51
3.2.4 Karbon kaynaklarının tüketim eğilimlerinin belirlenmesi.....	52
3.2.5 Gravimetrik toplam yağ miktarı tayini ve yağ kompozisyonu analizleri.....	52
3.2.6 Nil kırmızısı kullanarak floresan spektrofotometre ile yağ miktarı tayini.....	53
3.2.7 Floresan mikroskop ile hücre içi yağ damlacıklarını görüntüleme	54

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
3.2.8 Mikroalgleri heterotrofik veya fotoheterotrofik koşullara adaptasyon ve kültürasyon çalışmaları	55
3.2.9 Mikroalglerin fotoheterotrofik ve/veya heterotrofik ortamda çoğaltılıp kültür stoklarının hazırlanması.....	56
3.2.10 İstatistiksel deney tasarımları	56
3.2.11 Kesikli biyoreaktör üretimleri	57
3.2.12 Kesikli-beslemeli ve sürekli biyoreaktör üretimleri	59
3.2.13 Ölçek büyütme.....	60
3.2.14 Çalışmada takip edilen basamaklar	62
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	64
4.1 Ön Denemeler.....	64
4.1.1 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ile yapılan çalışmalar	64
4.1.2 <i>Tetraselmis suecica</i> CCMP 906 ile yapılan çalışmalar	66
4.1.3 <i>Chlorella saccharophila</i> UTEX 247 ile yapılan çalışmalar	67
4.1.4 <i>Chlorella minutissima</i> UTEX 2341 ve <i>Monodus subterraneus</i> CCMP 906 ile yapılan çalışmalar.....	68
4.2 Floresan mikroskop ile hücre içi yağ damlacıklarını görüntüleme	71
4.3 <i>Chlorella saccharophila</i> ile Yapılan Çalışmalar	72
4.3.1 Kuru hücre ağırlığı ve optik yoğunluk arasındaki ilişki	73

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
4.3.2 <i>C. saccharophila</i> hücre gelişimi üzerine azot ve karbon kaynaklarının etkisi	73
4.3.3 <i>C. saccharophila</i> için karbon ve azot kaynaklarının optimizasyonu.....	75
4.3.4 <i>C. saccharophila</i> hücrelerinde nil kırmızısı kullanılarak floresan ölçümüne dayalı toplam yağ miktarının belirlenmesi	81
4.3.5 Kesikli biyoreaktörde (2 litrelik) üretim.....	85
4.4 Heterotrofik Koşullarda Kültüre Edilen <i>Cryptocodium cohnii</i> ile Yapılan Çalışmalar	89
4.4.1 Besinsel ve çevresel faktörlerin biyokütle, yağ verimliliği ve yağ kompozisyonu açısından etkilerinin incelenmesi.....	89
4.4.2 Hücre sayısı, optik yoğunluk ve kuru hücre ağırlığı arasındaki korelasyon	91
4.4.3 Nil kırmızısı kullanılarak floresan ölçümüne dayalı toplam yağ miktarının belirlenmesi	91
4.4.4 Kültür ortamındaki karbon, azot ve fosfat kaynaklarının optimizasyonu	93
4.4.5 Kültür ortamındaki maya ekstraktı, deniz tuzu ve gliserol konsantrasyonlarının optimizasyonu.....	97
4.4.6 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen kesikli biyoreaktör üretimleri	105
4.4.7 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen kesikli-beslemeli biyoreaktör üretimleri	119
4.4.8 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen sürekli işletim biyoreaktör üretimleri	121

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
4.4.9 Büyük ölçekte <i>C. cohnii</i> Biyokütle Üretimi	126
4.4.10 <i>C. cohnii</i> biyokütle üretiminde endüstriyel atıkların kullanılma olanaklarının araştırılması.....	130
5. SONUÇLAR.....	143
6. ÖNERİLER.....	147
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	149
ÖZGEÇMİŞ.....	164
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Yağ asidi molekülü.....	6
2.2 Başlıca depo ve zar lipitleri (Nelson and Cox, 2005)	8
2.3 Yağ asidi sentezi ve zincir uzatma işleminin meydana geldiği mekanizmalar (Ratledge, 2004)	10
2.4. Karbon yakalama ve lipit biyosentezi metabolik yoluna genel bakış	14
2.5. Transesterifikasyon reaksiyonunun genel denklemi	15
2.6. Daha basit yapıli ökaryotiklerde uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin (ω -3 ve ω -6) biyosentez yolu (Ratledge, 2004)	22
2.7. DHA açısından zengin yağ globüllerini içeren <i>C. cohnii</i> hücreleri (Wynn et al., 2005).....	23
2.8. Mikroalglerdeki heterotrofik metabolizma (Perez-Garcia et al., 2011).....	36
3.1. Toplam yağ ölçümlerinde kullanılan floresan spektrofotometre	54
3.2 Karanlık koşulların sağlandığı çalkalamalı inkübatörler	55
3.3 Fotoheterotrofik koşulların sağlandığı çalkalamalı inkübatör	55
3.4 <i>C. saccharophila</i> ve <i>C. cohnii</i> hücrelerinin yetiştirilmesinde kullanılan 2 litrelik biyoreaktör.....	58
3.5 Sürekli sistemde kullanılan 2 litrelik biyoreaktör	60
3.6 <i>C. cohnii</i> hücreleriyle yapılan ölçek büyütme çalışmalarında kullanılan (a) 5 ve (b) 30 litrelik biyoreaktörler.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.7 30 litrelik biyoreaktör üretimi sonucunda biyokütleyi kültür ortamından ayırmak için kullanılan çanaklı santrifüj.....	62
3.8 Çalışmada takip edilen basamaklar	63
4.1 <i>P. tricorutum</i> hücrelerinin fotoheterotrofik koşullarda farklı karbon kaynakları varlığında büyüme grafiği	65
4.2 <i>P. tricorutum</i> hücrelerinin fotoheterotrofik koşullarda farklı karbon azot kaynakları (a) üre, (b) NaNO ₃ varlığında büyüme grafikleri	65
4.3 <i>T. suecica</i> hücrelerinin fotoheterotrofik koşullarda farklı gliserol konsantrasyonlarındaki büyüme grafikleri.....	67
4.4 Farklı mikroalg türlerine ait nil kırmızı ile boyama sonucunda floresan mikroskopta görülen yağ damlacıkları görüntüleri; (a) <i>Chlorella saccharophila</i> UTEX 247, (b) <i>Tetraselmis suecica</i> CCMP906, (c) <i>Cryptocodinium cohnii</i> CCMP 316.....	72
4.5 <i>C. saccharophila</i> hücrelerinin kuru hücre ağırlığı (g/l) üzerine bakteriyolojik pepton ve glikozun etkileşimli etkisini gösteren 3 boyutlu yüzey yanıt grafiği	79
4.6 Optimum nil kırmızısı konsantrasyonunun belirlenmesi	82
4.7 Çözelti içersindeki triolein konsantrasyonuna karşılık floresan şiddeti kalibrasyon grafiği.....	83
4.8 <i>C. saccharophila</i> hücrelerinde farklı optik yoğunluklardaki hücrelere (OD _{700nm}) karşılık floresan şiddetindeki değişim.....	84
4.9 <i>C. saccharophila</i> hücrelerinin (OD= 0,050) nötral yağ içeriklerinin floresan ölçümleri ile kalibrasyonu	85

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.10 <i>C. saccharophila</i> hücrelerinin 2 l'lik kesikli biyoreaktörde heterotrofik koşullarda üretimi.....	86
4.11 <i>C. saccharophila</i> hücrelerinin 2 l'lik kesikli biyoreaktör üretiminde büyüme (OD), floresan şiddeti cinsinden toplam yağ miktarındaki (FI) değişim. (▲, OD; ■, FI).....	86
4.12 <i>C. cohnii</i> hücrelerinde farklı optik yoğunluklardaki hücrelere (OD _{700nm}) karşılık floresan şiddetindeki değişim.....	92
4.13 <i>C. cohnii</i> hücrelerinin (OD= 0,1) nötral yağ içeriklerinin floresan ölçümleri ile kalibrasyonu.....	93
4.14 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen Box-Behnken deneme desenine ait bağımsız değişkenlerin ((a) glutamik asit (g/l)- biyokütle (g/l), (b) sodyum β-gliserofosfat - biyokütle (g/l), - (c) maya ekstraktı biyokütle (g/l)) model grafikleri.....	96
4.15 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen 2 ³ -tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımı (CCD) deneme desenine ait bağımsız değişkenlerin (a), deniz tuzu (g/l) biyokütle (g/l), (b) gliserol (g/l)- biyokütle (g/l), (c) maya ekstraktı (g/l)-biyokütle (g/l)) model grafikleri.....	101
4.16 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen 2 ³ -tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımı deneme desenine ait bağımsız değişkenlerin (a) deniz tuzu (g/l)- toplam yağ (g/g), (b) gliserol (g/l) - toplam yağ (g/g), (c) maya ekstraktı (g/l) - toplam yağ (g/g)) model grafikleri.....	103
4.17 <i>C. cohnii</i> hücrelerinin 2 litrelik karıştırmalı biyoreaktörde 100 rpm karıştırma hızında zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.....	106

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.18 <i>C. cohnii</i> hücrelerinin 2 litrelik karıştırmalı biyoreaktörde 150 rpm karıştırma hızında zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri	106
4.19 <i>C. cohnii</i> hücrelerinin 2 litrelik karıştırmalı biyoreaktörde 250 rpm karıştırma hızında zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri	107
4.20 <i>C. cohnii</i> hücrelerinin büyümenin farklı evrelerindeki yağ asidi kompozisyonundaki değişimi.....	111
4.21 <i>C. cohnii</i> hücrelerinin 2 litrelik karıştırmalı biyoreaktörde üretim boyunca pH'nın kontrol edilmediği duruma karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri	112
4.22 <i>C. cohnii</i> hücrelerinin 2 litrelik karıştırmalı biyoreaktörde üretim boyunca pH'nın 6,5'a sabitlendiği duruma karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri	112
4.23 <i>C. cohnii</i> hücrelerinin 2 litrelik karıştırmalı biyoreaktörde farklı 30 °C inkübasyon sıcaklığında zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri	113
4.24 <i>C. cohnii</i> hücrelerinin 2 litrelik karıştırmalı biyoreaktörde farklı 27 °C yetiştirme sıcaklığında zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri	114
4.25 Farklı inkübasyon sıcaklıklarında biyokütledeki toplam yağ kompozisyonundaki değişim.....	115

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.26 <i>C. cohnii</i> üretim ortamında kaskad 1 işletim modunda, zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.....	117
4.27 <i>C. cohnii</i> üretim ortamında kaskad 2 işletim modunda zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.....	117
4.28 <i>C. cohnii</i> üretim ortamında kaskad 3 işletim modunda zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.....	118
4.29 Ortamdaki gliserol konsantrasyonunun kontrol edildiği kesikli beslemeli üretimde zamanla hücre gelişimi (g/l) ve gliserol tüketim hızındaki değişim	120
4.30 Kesikli ve kesikli-beslemeli işletim sisteminde gerçekleştirilen üretimlerin yağ asidi kompozisyonlarındaki farklılıklar.....	120
4.31 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen sürekli biyoreaktör işletim sisteminde zamanla kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), seyrelme hızındaki (-) değişim	122
4.32 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen azot kısıtlamasının yapıldığı sürekli biyoreaktör işletim sisteminde zamanla kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), seyrelme hızındaki (-) değişim.....	123
4.33 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen fosfor (sodyum betagliserofosfat ve K_2HPO_4) kısıtlamasının yapıldığı sürekli biyoreaktör işletim sisteminde zamanla kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), seyrelme hızındaki (-) değişimler.....	124

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.34 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen sürekli biyoreaktör işletim sisteminde (seyrelme hızı 0,25 1/gün) zamanla kuru ağırlık (\diamond), gliserol konsantrasyonundaki (g/l, x) değişim	125
4.35 Farklı karıştırıcılar için Reynolds sayısının fonksiyonu olarak güç sayısı: 1. yassı pervaneli çark, 2. flat six blade open turbine disk, 3. turbin (45° açılı), 4. propeller, 5. propeller, 6. high efficiency impeller (Türker, 2005)	127
4.36 <i>C. cohnii</i> hücrelerinin biyokütle verimliliği (g/l.gün) üzerine deniz tuzu ve CSL'nin etkileşimli etkisini gösteren 3 boyutlu yüzey yanıt grafiği	139

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Doğal olarak bulunan bazı yağ asitleri (Nelson ve Cox, 2005).	7
2.2 Bazı yağ üreticisi mikroorganizmaların yağ içerikleri (Chisti 2007; Subramaniam et al., 2010).....	11
2.3 Heterotrofik kültürlemenin, konvansiyonel karıştırmalı biyoreaktörlerde üretiminde ön koşul, fayda ve kısıtlamaları.....	27
3.1 Çalışmada kullanılan mikroalg kültürleri.....	45
3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler.....	46
3.3 Çalışmada kullanılan cihazlar	47
3.4 Çalışmada kullanılan mikroalglerin üretim ortamları	48
3.5 Kullanılan 2 l'lik biyoreaktörün boyutları	59
3.6 Ölçek büyütmede kullanılan biyoreaktörlerin boyutları	61
4.1 Çalışılan mikroalg türlerinin heterotrofik ve/veya fotoheterotrofik koşullardaki kültürlerinin biyokütle verimlilikleri, toplam yağ miktarı ve yağ asidi kompozisyonları arasındaki farklılıklar	70
4.2 Farklı azot kaynaklarının (NH ₄ Cl, NaNO ₃ , bakteriyolojik pepton) erlenlerde heterotrofik koşullarda gelişim gösteren <i>C. saccharophila</i> hücrelerinin kuru ağırlıkları üzerine etkisi	74
4.3 Farklı karbon kaynaklarının (glukoz, gliserol, sodyum asetat) erlenlerde heterotrofik koşullarda gelişim gösteren <i>C. saccharophila</i> 'nın kuru hücre ağırlığı üzerine etkisi.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ (devamı)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.4 <i>C. saccharophila</i> ile gerçekleştirilen Box-Behnken deneme desenine ait deney tasarımında bağımsız değişkenlerin (glikoz, gliserol ve bakteriyolojik pepton) gerçek değerleri ve elde edilen yanıt (kuru hücre ağırlığı, g/l).....	77
4.5 <i>C. saccharophila</i> 'nın heterotrofik kültürasyonunda yüzey yanıt yöntemiyle yapılan kültür ortamı optimizasyonuna ait ANOVA değerleri.....	78
4.6 Heterotrofik olarak kültüre edilen <i>C. saccharophila</i> 'nın yanıt olarak kuru hücre ağırlığı alınan Box-Behnken deneme desenindeki bazı erlenlerin toplam yağ miktarları (%w/w) ve yağ asidi kompozisyonları (%TFA).	81
4.7 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen Box-Behnken deneme desenine ait, bağımsız değişkenlerin (maya ekstraktı, glutamik asit, sodyum β -gliserofosfat) gerçek değerleri ve elde edilen yanıtlar (kuru hücre ağırlığı, g/l).....	94
4.8 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen Box-Behnken deneme desenine ait ANOVA sonuçları.....	95
4.9 <i>C. cohnii</i> hücrelerinin farklı glikoz ve gliserol konsantrasyonlarında elde edilen biyokütle verimlilikleri	97
4.10 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen 2 ³ -tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımı deneme desenine ait, bağımsız değişkenlerin (deniz tuzu, gliserol, maya ekstraktı) gerçek değerleri ve elde edilen yanıtlar (kuru hücre ağırlığı, g/l).....	99
4.11 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen 2 ³ -tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımı deneme desenine ait biyokütle miktarı (g/l) cinsinden ANOVA sonuçları.....	100

ÇİZELGELER DİZİNİ (devamı)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen 2 ³ -tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımı deneme desenine ait toplam yağ miktarı cinsinden ANOVA sonuçları	101
4.13 Optimizasyon denemeleri sonucunda modifiye edilen <i>C. cohnii</i> kültür ortamı	104
4.14 <i>C. cohnii</i> hücreleriyle gerçekleştirilen 2 litrelik biyoreaktör üretiminde farklı karıştırma hızlarının (100, 150, 250 rpm) toplam yağ miktarı ve yağ asidi kompozisyonuna etkileri.....	108
4.15 <i>C. cohnii</i> hücreleriyle gerçekleştirilen kaskad üretimlerde elde edilen toplam yağ miktarları ve yağ asidi kompozisyonlarındaki farklılıklar	118
4.16 Yüksek Reynolds sayılarında güç sayıları (Türker, 2005).....	128
4.17 <i>C. cohnii</i> ile 5 l ve 30 l'de gerçekleştirilen kesikli biyoreaktör üretimlerinde elde edilen biyokütle verimlilikleri (g/l.gün), toplam yağ miktarı (g/g) ve yağ kompozisyonları	130
4.18 CSL (10 g/100 ml) içeren kültür ortamında biyokütle verimliliğinde etkili olan faktörlerin (gerçek değerlerinde) Taguchi dizaynı ile taranması	131
4.19 Kültür ortamında mısır ıslatma şurubunun (CSL, 10g/100ml) bulunduğu Taguchi deneme deseni sonucunda biyokütle verimliliğine ait ANOVA sonuçları.....	132
4.20 Peyniraltı suyundan oluşan kültür ortamında biyokütle verimliliğine (g/l.gün) etkili olan faktörlerin (gerçek değerlerinde) Plackett-Burman tasarımı ile taranması	134

ÇİZELGELER DİZİNİ (devamı)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.21 Peyniraltı suyundan oluşan kültür ortamında biyokütle verimliliğine (g/l.gün) etkili olan faktörlerin ANOVA sonuçları.....	136
4.22 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen 2 ³ -tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımına ait, bağımsız değişkenlerin (deniz tuzu, tris tampon, mısır ıslatma şurubu) gerçek değerleri ve elde edilen yanıtlar (biyokütle verimliliği, g/l.gün).	137
4.23 <i>C. cohnii</i> ile gerçekleştirilen 2 ³ -tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımına ait, bağımsız değişkenlerin (deniz tuzu, tris tampon, mısır ıslatma şurubu) biyokütle verimliliği (g/l.gün) üzerinden yapılan ANOVA sonuçları.....	138

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
H/T	Sıvı yüksekliğinin tank çapına oranı
D/T	Karıştırıcı çapının tank çapına oranı
C/T	Karıştırıcı açıklığının tank çapına oranı
k_L	Sıvı-kütle aktarım katsayısı
a	Kütle aktarımı için toplam spesifik yüzey alanı
$k_L a$	Oksijen transfer katsayısı
P/V	Birim hacim başına sisteme verilen enerji
U_S	Yüzeysel (superficial) gaz hızı
q_{O_2}	Spesifik oksijen tüketim hızı
U_T	Karıştırıcı ucu hızı
N_i	Karıştırma hızı
d_i	Karıştırıcı çapı
ρ	Yoğunluk
η	Viskozite
μ	Spesifik büyüme hızı
t_d	İkilenme süresi
N_p	Güç sayısı

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devamı)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Re	Reynolds sayısı
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
EPA	Eikozapentanoik asit
DHA	Dokzahegzanoik asit
TAG	Triaçilgliserol
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
SCO	Tek hücre yağları
FAS	Yağ asidi sentaz
ACC	Asetil-CoA karboksilaz
ACP	Açil taşıyıcı protein
MGDG	Monogalaktosildiaçil gliserol
DGDG	Digalaktosildiaçil gliserol
SQDG	Sulfokinovosildiaçil gliserol
PC	Fosfotidilkolin
PG	Fosfotidilgliserol
PE	Fosfotidiletanolamin
PI	Fosfotidilinositol

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devamı)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PA	Fosfotidik asit
DGAT	Diaçilgliserol açıltransferaz
AA	Araşidonik asit
ATP	Adenozin trifosfat
GLA	γ -linoleik asit
RSM	Yüzey yanıt yöntemi
CCD	Merkezi tümleşik tasarım (central composite design)
EM	Emden-Meyerhof
PP	Pentoz fosfat
TCA	Trikarboksilik asit
AMT	Amonyum transporter
GDH	Glutamat dehidrogenaz
GS	Glutamin sentaz
GOGAT	Glutamat sentaz
NiR	Nitrit redüktaz
NR	Nitrat redüktaz
UALse	Üre Amidolaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devamı)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DO	Çözünmüş oksijen konsantrasyonu
OUR	Oksijen tüketim hızı
OTR	Oksijen transfer hızı
HPLC	Yüksek basınç sıvı kromatografisi
GC	Gaz kromatografisi
PAS	Peyniraltı suyu
CSL	Mısır ıslatma şurubu
RI	Refraktif indeks
BHT	Butillenmiş hidroksitoluen
FAME	Yağ asidi metil esterleri
PB	Placket-Burmann
FI	Floresan şiddeti
ANOVA	Varyans analizi

1. GİRİŞ

Mikroalgler, ticari değeri olan farklı kimyasal ve biyolojik bileşikleri üretme yeteneğine sahip mikrobiyal kaynaklardır. Mikroalgler, içerdikleri karbonhidratlar, proteinler, esansiyel amino asitler, vitaminler ve biyoaktif moleküller ile farmasötik, kozmetik ve beslenme alanlarında son derece değerli kaynaklar olarak ortaya çıkmaktadırlar.

Mikroalglerin çoğu yüzyıllardır gıda olarak tüketilmekte ve sağlık üzerindeki etkileri nedeniyle kullanılmaktadır. Bazı ülkelerde mikroalgal biyokütle gıdalara eklenerek gıdaların besin içerikleri arttırılmakta ve fonksiyonel gıdalar oluşturulmaktadır (Spolaore et al., 2006). Son yıllarda yapılan klinik ve epidemiyolojik çalışmalarla ω -3 yağ asitlerinin aterosklerozis (damar sertliği), kanser, romatoid artrit (iltihabi eklem hastalığı), alzheimer ve makula dejenerasyonu gibi yaşla ilişkili hastalıkların tedavisinde önemli bir yere sahip olduğu görülmektedir. Bunlar arasında en önemli uzun zincirli ω -3 yağ asitleri, α -linolenik asit (C18:3n-3), stearidonik asit (C18:4n-3), eikozapentanoik asit (EPA, C20:5n-3) ve dokozahegzanoik asit (DHA, C22:6n-3) olup, son üç tanesi denizel kaynaklardan elde edilmektedir (Gill and Valivety, 1997; Robles-Medina et al., 1998). Kalp damar hastalıkları riskinin düşük olduğu Eskimolar, Norveçli ve Japon balıkçılar üzerinde yapılan çalışmalarda kanlarında yüksek düzeyde EPA ve DHA'ya rastlanmıştır (Demirel ve Özpınar, 2003). Ayrıca, DHA anne sütünün en önemli çoklu doymamış yağ asitidir (Gill and Valivety, 1997). Sonuçta, sağlık, gıda, hayvan beslenmesi gibi pek çok alanda ω -3 yağ asitlerine giderek artan ilgi neticesinde ticari pazarı artmaya başlamıştır. Şu anda çoklu doymamış yağ asitlerinden EPA ve DHA'nın ticari üretiminde balık yağı kullanılmaktadır. Fakat balık yağının hoş olmayan tadı, kokusu ve stabilite problemlerinden dolayı ω -3 yağ asitlerinin balık yağından üretiminde kısıtlamalar bulunmaktadır (Barclay et al., 1994; Vazhappilly and Chen 1998). Ayrıca yağ asitlerinin balık yağından saflaştırma maliyetlerinin yüksek olması, balıkların kirlilikleri bünyelerinde biriktirmeleri dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. ω -3 yağ asitlerine giderek artan talep, balık stoklarında azalma riskini ortaya çıkarmakta ve dolayısıyla uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin başka yollardan elde edilmesi üzerine araştırmalar yoğunlaşmaktadır. Balık yağına alternatif olarak mikroalgler bu yağ asitlerinin eldesinde en iyi potansiyele sahip aday olarak düşünülmektedir. Mikroalgler deniz balıkları yetiştiriciliğinde de gerekli ve kaçınılmaz olan temel besin kaynağını oluştururlar. Özellikle çeşitli su canlılarının ilk dönemindeki beslenmesinde mikroalglerin çok büyük önemi vardır. Örneğin karides larvası

üretiminde ilk başlangıç yemi olarak mikroalgler vazgeçilmeyecek bir gıda kaynağıdır. Bunun yanında balık larvalarına canlı yem olarak kullanılan rotifer yetiştiriciliğinde de rotiferlere yem olarak mikroalglerin üretimi yapılır Deniz balıkları yetiştiriciliğinin yanı sıra istiridye ve karides kültüründeki besleme ile ilgili sorunlar, mikroalg üretim metodlarının geliştirilmesiyle çözülmeye çalışılmaktadır (Gladue and Maxey 1994). İnsan ve hayvan beslenmesinde son derece önemli bir yere sahip olan mikroalglerin biyokimyasal yapısını ve özellikle yağ asidi kompozisyonunu etkileyen parametrelerin değiştirilerek iyileştirilmesi ve üretim kapasitelerinin artırılmasına yönelik artan bir ilgi bulunmaktadır (Demirel ve Özpınar, 2003; Chen et al., 2007; Isleten-Hosoglu et al., 2012; 2013).

Günümüzde, mikroalgal yağlar sadece beslenme açısından değil, benzin ve dizel yakıtlarına alternatif yakıtlar olarak biyodizel üretimi açısından da önemli bir yer teşkil etmektedirler. Mikroalgal yağlar genellikle (>%80) triaçilgliserol (TAG) formunda olup C16 ve C18 numaralı karbon atomlarınca zengin yağ asitleri içermektedir. Alg hücrelerinin ortalama yağ içeriği %20 ile %50 (g/g) oranında değişse de, optimum koşullar sağlandığında %75-80 oranında yağ biriktirebilen mikroalgler de bulunmaktadır (Meng et al., 2009). Bu kapsamda, yüksek yağ üretme potansiyelindeki mikroalgal türlerin taranması, biyokütlenin biyokimyasal kompozisyonunu etkileyen kültür ortamı (başta karbon ,azot, fosfor kaynaklarının çeşidi ve miktarı), çevresel faktörler (sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen konsantrasyonu gibi) ve farklı fermantasyon stratejileri gibi pek çok faktörün etkisinin araştırıldığı çalışmalar son yıllarda gittikçe önem kazanmaktadır (Xiong et al., 2008; Pruvost et al., 2009; Widjaja et al., 2009; ; Li et al., 2011; Isleten-Hosoglu et al., 2012).

Mikroalgler, ışığı enerji kaynağı, CO₂'i ise karbon kaynağı olarak kullanan fototrofik canlılardır. Bu yüzden mikroalg endüstrisinde fototrofik kültürleme modu en yaygın kullanılan üretim sistemidir (Chen, 1996). Bu üretim sistemlerine havuz, göl gibi açık sistemler veya kontrollü kapalı sistemler olarak fotobiyoreaktörler örnek olarak verilebilir. Açık sistemler hava değişiklikleri nedeniyle kontrollerinin zorluğu, yüksek yatırım maliyetleri, elde edilen biyokütle miktarının düşüklüğü ve yüksek kontaminasyon riskleri nedeniyle dezavantajlı olmaktadır. Kapalı sistemler olarak kullanılan fotobiyoreaktörlerin ise açık sistemlere göre avantajları fazla olmasına karşın, bu sistemlerde yaşanan yetersiz ışık geçirgenliği, yüksek konsantrasyonlarda oksijen birikiminden kaynaklanan olumsuz etkiler, çok büyük miktarda suyun işlemden geçirilmesi gerekliliği ve bu işlemin üretim maliyetlerinde oldukça fazla bir yer işgal etmesi gibi dezavantajları

da bulunmaktadır (Lam and Lee, 2011; Demirel ve Özpınar, 2003). Bazı mikroalgler, organik karbon substratlarını karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Heterotrofik kültürleme, bu mikroalglerin kültürasyonunda, fotosentetik sistemlere uygulanamayan kesikli beslemeli veya yüksek biyokütle konsantrasyonu (high cell density) üretim teknikleri kullanılmasına ve mikroalglerin büyük ölçekteki üretimlerine olanak sağlamaktadır. Bu kültürleme modu, ışık ihtiyacını elimine eder ve böylece mikroalgal hücre konsantrasyonunun çoğalma olasılığını artırarak kesikli sistemlerde hacimsel verimliliği de artırır. Ayrıca endüstriyel mikrobiyolojideki fermentör sistemleri değişik işletim modlarında kullanılarak bu verimlilik artırılabilir. Besiyerlerinin steril edilmesi ve üretim boyunca sağlanan aseptik koşullarla kontaminasyonlar elimine edilebilmektedir (Chen, 1996).

Mikroalglerin heterotrofik olarak kültüre edilmesinde biyokütle gelişimi, yağ asidi içeriği ve kompozisyonu üzerine organizmanın yaşı, ortam bileşenlerinin kompozisyonu (karbon ,azot, fosfor kaynaklarının çeşidi ve miktarı), çevresel faktörler (sıcaklık, pH, tuz oranı), fermantasyon stratejileri gibi etkili pek çok faktör bulunmaktadır (Swaaf et al 2003a, 2003b; Wen and Chen 2003). Ürün verimini ve hacimsel verimliliği önemli derecede etkileyen bu faktörlerin, mikroalgal kültürleme ile yüksek verimde yağ ve çoklu doymamış yağ asitleri üretimi için optimizasyonu son derece önemlidir. Heterotrofik üretim potansiyeline sahip diğer mikroalg türlerinin uzun zincirli ω -3 yağ asitleri, α -linolenik asit, EPA, DHA üretim potansiyellerinin araştırılması, ürün oluşturma mekanizmaları üzerine etkili olan parametrelerin ortaya konması, heterotrofik üretim koşullarının optimizasyonu ve ölçek büyütme, bu konuda yapılan çalışmalarda çoğunlukla yetersiz kalan noktalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, çok çeşitli endüstriyel atık ve yan ürünlerin mikroalglerin fototrofik üretiminde kullanıldığı bilinmektedir (Mulbry et al., 2008; Orpez et al., 2009; Kong et al., 2010). Pek çok elzem besin maddesini içerdiği için fermantasyon proseslerinde de kullanım olanakları sıklıkla araştırılmaktadır (Liggett and Koffler, 1948; Maddipati et al., 2011). Bu sebeple, endüstriyel ve tarımsal atıkların mikroalglerin heterotrofik üretiminde de substrat olarak değerlendirilmesi büyük ölçekte çok büyük faydalar sağlayacağı düşünülmektedir. Bu şekilde, ortam ve çevresel koşulların optimizasyon çalışmalarında pek çok farklı yöntem kullanılmakla birlikte, genelde tek bir değişkenin değiştirilip diğer tüm faktörlerin sabit tutulduğu klasik yöntem kullanılmaktadır. Günümüzde gittikçe artan araştırma giderlerini minimuma indirmek için mümkün olan en az sayıda deneme yapmayı ve klasik yöntemlerin yetersizliğini gidermeyi hedefleyen

istatistiksel deney tasarımları geliştirilmiştir (Mandenijs and Brundin, 2008; Wang and Wan, 2009).

Bu tez çalışması kapsamında, temel olarak heterotrofik kültürleme ve uzun zincirli ω -3 yağ asitlerine sahip farklı mikroalg türlerinin heterotrofik koşullardaki büyüme ve farklı ortam, çevre koşullarında biyokütle gelişimi, toplam yağ ve söz konusu yağ asitlerinin üretim potansiyellerini ortaya koymak hedeflenmiştir. Bu hedefe yönelik olarak, α -linolenik asit, EPA ve/veya DHA verim ve verimliliği açısından en yüksek potansiyele sahip olan türü ve o tür için belirlenmiş olan ortam ve çevre koşullarını istatistiksel deney tasarımları kullanılarak optimize etmek ve ayrıca ölçek büyütme çalışmalarını gerçekleştirerek endüstriyel üretime hazır hale getirilmiş fizibil bir proses tasarlanması amaçlanmıştır. Ayrıca, bu çalışmayla, dünya çapında bu konu üzerinde yapılan araştırmalarda yer almak ve çalışmalara katkı sağlamak hedeflenmiştir. Bilindiği kadarıyla da ülkemizde mikroalglerin heterotrofik olarak kültürlenmesi ve ürünleri üzerine yapılan ilk çalışma olmaktadır. Bu çalışma, gelecekte ise kendi kültür koleksiyonumuzda bulunan yerel su kaynaklarımızdan izole edilen mikroalg türlerinin, heterotrofik koşullarda bu tür ve/veya başka ürünlerinin araştırılması için tecrübe kazanılmasına ve alt yapısının oluşturulmasına imkan sağlayacak şekilde planlanmıştır.

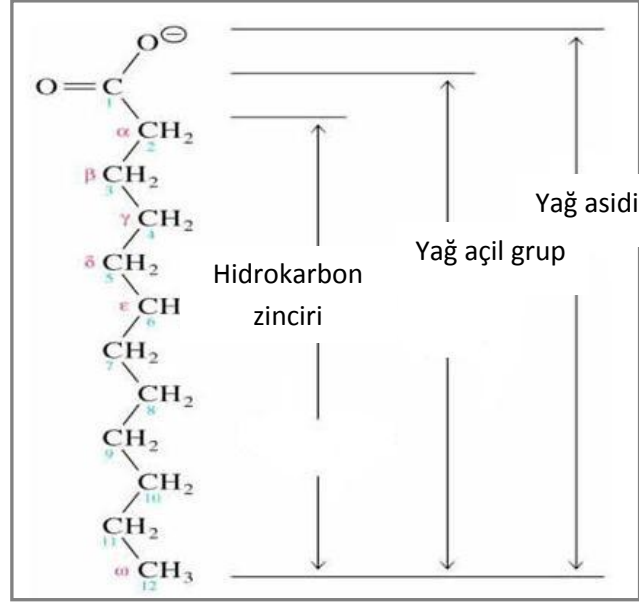
2. LİTERATÜR ÖZETİ

Canlı organizmalarda pek çok önemli rol oynayan lipidler iki ana grup altında toplanabilirler: Nonpolar lipidler (açılgliceroller, steroller, serbest yağ asitleri, waksar ve sterilesterleri) ve polar lipidler (fosfolipidler, glikolipidler). Polar lipidler ve steroller hücre membranının önemli yapısal bileşenleridir ve hücre organelleri için selektif bariyer görevi görmektedir. Bu lipidler, spesifik membran fonksiyonlarını sürdürerek çok çeşitlilikteki metabolik prosesler için matriks sağlamaktadır. Yapısal fonksiyonları yanısıra, bazı polar lipidler hücre sinyal döngülerinde (inositol lipidleri, sfingolipidler, oksidatif ürünler) anahtar ara ürünler (veya ara ürünlerin precursoru) olarak davranmakta ve çevresel değişikliklere cevap vermede rol almaktadır. Nonpolar lipidlerden triaçılgliceroller, metabolik enerji sağlamak üzere kolaylıkla katabolize olabilen depo ürünleridir (Champe and Harvey, 1997).

Algler, sucul ekosistemin önemli organizmalarıdır. Dünyadaki birincil gıda zinciri üretiminin yarısını oluşturmaktadır. Yapılarındaki pigmentleri sayesinde karbondioksit ve suyu ışığın etkisi ile karbonhidratlara çevirirler, böylece su ortamındaki besin değerinin ve çözülmüş oksijen oranının artmasını sağlarlar. Sonuçta kendi gelişimlerini sağlayarak besin zincirinin ilk halkasını oluştururlar. Bu şekilde üretime olan katkıları ve üst basamaktaki canlılarla olan ilişkileri açısından önem taşımaktadırlar. Algal lipidler tüketiciler için başlıca enerji ve besin kaynağıdır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (α -linolenik asit, eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA)) sucul çevre ve insan sağlığı için önemi ortaya konmuştur. Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) sadece önemli membran bileşenleri olması dışında pek çok fizyolojik prosesin düzenlenmesinde de örneğin prostoglandin, tromboksanlar, leukotrienler gibi biyoaktif moleküllerin sentezinde rol oynamaktadır. Yağ asitleri pek çok algal lipidin bileşenleridir ve nadiren serbest formda bulunurlar (Spolaore et al., 2006).

2.1 Yağ Asitleri ve Yağların Moleküler Yapısı

Yağ asitleri serbest veya triasilglicerol gibi daha karmaşık moleküllerde yağ asit esterleri olarak bulunurlar. Yağ asitleri, 4'ten 36'ya kadar uzunlukta karbon içeren (C_4 'ten C_{36} 'ya) hidrokarbon zincirli karboksilik asitlerdir (Şekil 2.1). Bazı yağ asitlerinde bu zincir tamamen doymuştur (hiç çift bağ içermez) ve dallanmamıştır; fakat bazılarında zincir bir veya daha fazla sayıda çift bağ içerir.



Şekil 2.1 Yağ asidi molekülü.

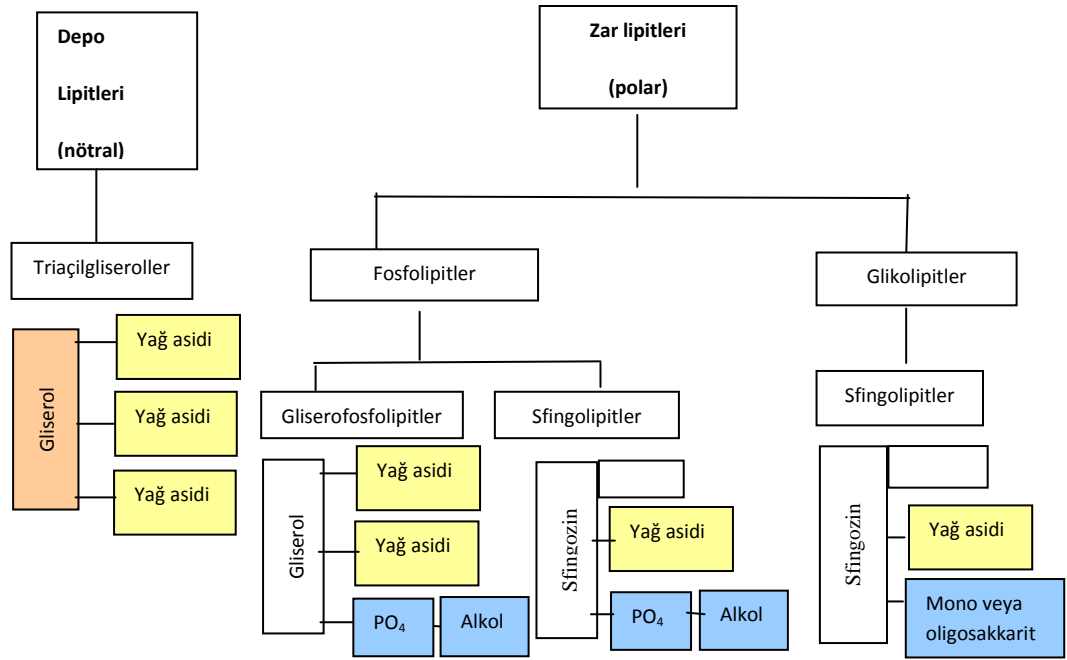
Yağ asidi molekülündeki karbon sayısına göre “kısa” (6’dan az), “orta” (6-10) ve “uzun zincirli” (12 ve daha fazla) yağ asitleri olarak adlandırılabilirler (Çizelge 2.1). Yağ asitleri hidrokarbon zincirdeki bağlara göre doymuş veya doymamış yağ asitleri olmak üzere de iki grupta incelenebilirler. Yağ asitlerinde bir çift bağın yeri Δ (delta’nın) üstüne konulan bir sayı ile belirtilir (Nelson and Cox, 2005).

Yağ asitlerinin uzunluğu ve çift bağlarının sayısı ve yerleşimleri farklı olabilir. Beslenme konusundan söz edilirken genellikle doymuş yağ ve doymamış yağ terimleri kullanılır. Bu terimler yağ asitlerindeki hidrokarbon zincirlerinin yapısını anlatmaktadır. Eğer zinciri oluşturan karbon atomları arasında hiç çift bağ yoksa, bu yapıdaki yağ asidi doymuş yağ asidi olarak adlandırılır. Doymamış yağ asidi ise bir ya da daha fazla çift bağ içerir (Campbell and Reece, 2006). Doymuş yağ asitleri oda sıcaklığında katı halde buldukları için vücutta birikebilirler. Çoklu doymamış yağ asitleri ise oda sıcaklığında sıvı haldedirler ve aynı zamanda insan hayatının devamlılığı için de çok önemlidirler. Bundan dolayı temel yağ asitleri olarak adlandırılarak omega (ω)-6, omega (ω)-3 yağ asitleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Kaya ve ark., 2004). ω -3 yağ asitleri keten tohumu, ceviz ve özellikle planktonlar ile yağlı balıklarda bol miktarda bulunur. Keten tohumu ve cevizde α -linolenik asit, balık yağlarında ise EPA ve DHA en önemli yağ asitleridir. EPA ve DHA’nın mutlaka dışardan alınması gerekir. Çünkü vücut tarafından sentezlenemedikleri için elzem yağ asitleri olarak adlandırılırlar (Gill and Valivety, 1997; Kaya ve ark., 2004).

Çizelge 2.1 Doğal olarak bulunan bazı yağ asitleri (Nelson ve Cox, 2005).

Bilinen adı	Sistematik ismi	Yapı	Karbon iskeleti
Doymuş yağ asitleri			
Laurik asit	Dodekanoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0
Myristik asit	Tetradekanoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	14:0
Palmitik asit	Hekzadekanoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0
Stearik asit	Oktadekanoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18:0
Tekli doymamış yağ asitleri			
Palmitoleik asit	Δ^9 -Hekzadekenoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Δ^9 16:1
Oleik asit	Δ^9 -Oktadekenoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Δ^9 18:1
Çoklu doymamış yağ asitleri			
Linoleik asit	Δ^9, Δ^{12} Oktadekadienoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2
α -Linolenik asit (LNA)	$\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$ - Oktadekatrienoik asit	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	18:3
Araşidonik asit	$\Delta^5, \Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$, Ikozetetraenoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	ω -3 20:5

Yağ asitlerinden oluşan en basit lipitler, trigliseritler, yağlar, nötral yağlar olarak da bilinen triaçilgliserollerdir (TAG). Triaçilgliseroller, her biri bir gliserole ester bağlarıyla bağlanmış üç yağ asidinden oluşmaktadır. Lipitlerin sınıflandırılması Şekil 2.2’de özetlenmiştir.



Şekil 2.2 Başlıca depo ve zar lipitleri (Nelson and Cox, 2005).

Üç konumda da aynı tip yağ asidi içeren TAG'lere basit TAG'ler denir. Doğada bulunan TAG'lerin çoğu karışıktır; yani iki veya daha fazla farklı yağ asidi içerir. Ökaryotik hücrelerin çoğunda, TAG'ler metabolik yakıt depoları olarak kullanılan ve sulu sitozolde yağ damlacıkları şeklinde bulunurlar (Nelson and Cox, 2005).

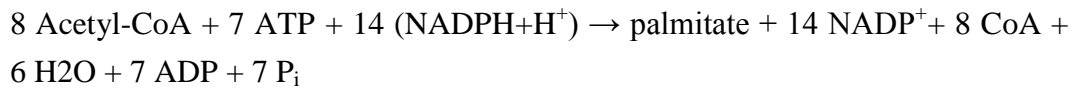
2.2 Tek Hücre Yağı Üretimi Amaçlı Kullanılan Mikroorganizmalarda Yağ Asidi Biyosentezi

Pek çok mikroorganizma grubu, maya, küf, bakteri ve mikroalg belli bazı spesifik koşullar altında nötral yağ biriktirme özelliğine sahiptirler. Bu mikroorganizmalardan elde edilen ve tek hücre yağları (SCO) olarak isimlendirilen mikrobiyal yağlar günümüzde tüm dünyada yoğun ilgi görmektedir (Ratledge and Cohen, 2008). Mikroorganizmalar polar ve nötral olmak üzere iki tip yağ sentezi gerçekleştirirler. Polar lipitleri hücre membran yapısında bulunan fosfolipit ve glikolipitler oluştururken; TAG'ler, ökaryotik mikroorganizmalarca da sentezlenebilen nötral lipitleri oluşturur. Mikrobiyal yağlar yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi içerebilir veya yine içerdiği yağ kompozisyonu içeriğine göre yakıt amaçlı kullanılabilirler (Ratledge, 2005; Subramaniam et al., 2010). Mikrobiyal yolla yağ eldesi prosesinin endüstriyel anlamda fizibil olması için üretilen yağ ve yağ asitlerinin yüksek verimlilikte veya yüksek değerlilikte (çoklu doymamış yağ asitlerince zengin) olması gerekmektedir.

Hacimsel verimliliği etkileyen en önemli faktörler kuru biyokütle miktarı, kuru biyokütledeki yağ oranı ve yağın istenen yağ asidi kompozisyonunda olmasıdır (Griffiths and Harrison, 2009).

2.2.1 Yağ asidi sentezinde zincir oluşumu

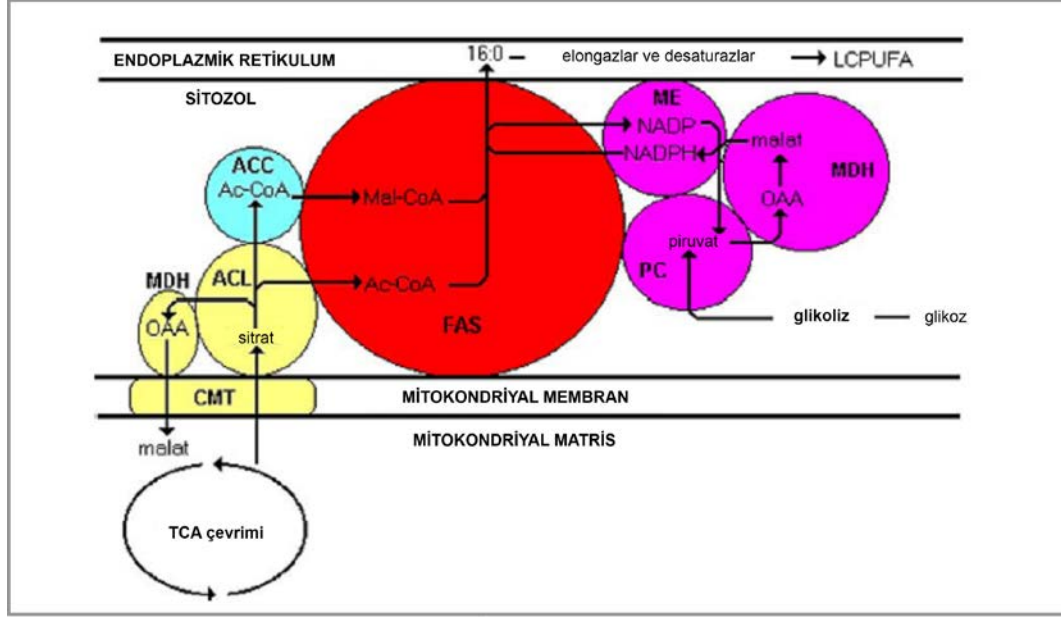
Yağ asidi sentezinde, asetil-CoA, yağ asidi-sentaz sistemi yoluyla palmitik asite (C16:0) çevrilir. Yağ asidi sentezi için gerekli olan asetil-CoA'lar mitokondride oluşmaktadır. Ancak sentez sitoplazmada gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle asetil-CoA mitokondri zarını geçerek sitozole taşınır. Yağ asidi sentezi, yağ asidi sentaz (FAS) sistemi denilen yedi enzimden oluşan bir kompleks tarafından gerçekleştirilmektedir. Yağ asidi sentezindeki ilk adım, asetil-CoA'nın karboksilasyonu ile malonil-CoA'nın oluşumudur. ATP gerektiren bu reaksiyon asetil-CoA karboksilaz (ACC) yoluyla katalizlenir. Hayvan hücrelerinde ACC sitoplazmada bulunur. Mayaların, hem sitoplazmik hem de mitokondrial ACC'ye sahip oldukları belirlenmiştir. Bitkilerde ise yağ asidi sentezi gelişen tohumların plastidlerinde gerçekleşmekte ve ACC, bu organellerde bulunan asetil-CoA'yı kullanmaktadır (Sakthivel et al., 2011). Malonil-CoA sentezi dışında yağ asidi biosentezindeki tepkimelerin katalizörlüğünü FAS yapmaktadır. Yağ asidi sentezinde zincir uzaması malonil-CoA'dan iki karbonun zincire katılması ile olmaktadır. Asetil transaçilaz, asetil-CoA ve açıl taşıyıcı proteinin (ACP), acetyl-ACP ve CoA'ya dönüşümünü katalizler (2. adım). Malonil transaçilaz ise malonil-CoA ve ACP'yi malonil-ACP ve CoA'ya katalizler (3. adım). Ardarda gelen dört reaksiyon boyunca (4-7. adımlar), asetil-ACP, malonil-ACP ve 2(NADPH+H⁺) harcanmasıyla butiril-ACP, CO₂, ACP, H₂O ve 2NADP⁺ oluşur. Bu reaksiyonla sırasıyla, açıl malonil-ACP enzim, β-keto-asil-ACP-redüktaz, 3-hidroksiasil-ACP-dehidrataz ve enoil-ACP-redüktaz tarafından katalizlenir. Her aşamada eklenen iki karbon atomuyla yağ açıl zinciri uzamaya devam eder (Campell and Reece, 2006; Fidancı, 2009). Palmitik asit oluşumu ile tamamlanan tüm zincirin stokiometrisi aşağıdaki şekildedir:



2.2.2 Yağ asidi zincirinin uzatılması ve uzun zincirli yağ asitlerinin doymamış hale dönüştürülmesi

Yağ asidi-sentaz sisteminin normal ürünü olan palmitik asit uzun zincirli yağ asitlerinin öncül molekülüdür. Yağ asidi zincirleri, açıl gruplarına iki karbon

atomlu birimler eklenerek uzatılmaktadır. Palmitik aside iki karbon daha ilave edilerek 18 karbonlu stearik asit veya daha fazla karbon ilave edilerek daha uzun zincirli yağ asitleri meydana gelmektedir. Yağ asidi zincir uzatma sistemi endoplazmik retikulum ve mitokondride bulunmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Yağ asidi sentezi ve zincir uzatma işleminin meydana geldiği mekanizmalar (Ratledge, 2004).

Onaltı karbonlu ve doymuş bir yağ asidi olan palmitik asit, yağ asit sentaz aktivitesinin son ürünü olmasına rağmen ayrı enzimatik işlemler tarafından zincir uzunluğu daha da arttırılabilir, ve/veya doymamış hale getirilebilir. Bu enzimler mitokondride bulunan ve endoplazmik retikulumda yerleşmiş olup zincir uzunluğu ve doymuşluk derecesi değişik yağ asitlerini substrat olarak kullanabilirler. İnsanlar 9-10. karbonlardan daha ötede bir yere çift bağ sokabilme yeteneğinden yoksun olduklarından, çoklu doymamış yağ asitleri olan linoleik ve linolenik asitleri diyetle almalıdırlar (Champe and Harvey, 1997; Ratledge, 2004).

Mikroorganizmalardan yağ eldesi geliştirilmesi istenen bir konudur ve bunun çeşitli nedenleri vardır:

- (i) Mikroorganizmalar hızlı gelişebilme özelliğine sahiptir ve endüstriyel yan ürünlerde ve atıklarda düşük maliyetle geliştirilebilirler (Chi et al., 2007; Meng et al., 2009; Li et al., 2010; Subramaniam et al., 2010).
- (ii) Yağ üretimi mevsimsel değildir. Gelişme koşulları kontrol edilerek ve/veya yapılan değişikliklerle yağ asiti bileşiminde ve miktarında

istenilen ayarlamalar yapılabilir (Shwu-Tzy et al., 2005; Beltran et al., 2008; Isleten-Hosoglu et al., 2012).

- (iii) Mikroorganizmaların genetik modifikasyonu ile elde edilen biyokütlenin verimi artırılabilir (Kalscheuer et al., 2006; Meng et al., 2009; Radakovits et al., 2010;).
- (iv) Mikroorganizmalardan değerli mikrobiyal çoklu doymamış yağ asitleri eldesi mümkündür (Shwu-Tzy et al., 2005; Mendes et al., 2009).

Mikrobiyal yağ üretim potansiyeli olan pek çok mikroorganizma Çizelge 2.2'de listelenmiştir.

Çizelge 2.2 Bazı yağ üreticisi mikroorganizmaların yağ içerikleri (Chisti 2007; Subramaniam et al., 2010).

Mikroorganizma	Yağ içeriği (% kuru ağırlık)
Bakteri	
<i>Arthrobacter sp.</i>	> 40
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24
Maya	
<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
Küf	
<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Humicola lanuginose</i>	75
Mikroalgler	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>C. cohnii</i>	20
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzchia sp.</i>	45-47
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33

2.3 Yağ Üreticisi Olarak Mikroalgler

2.3.1 Ökaryotik mikroalglerde yağlar ve yağ metabolizması

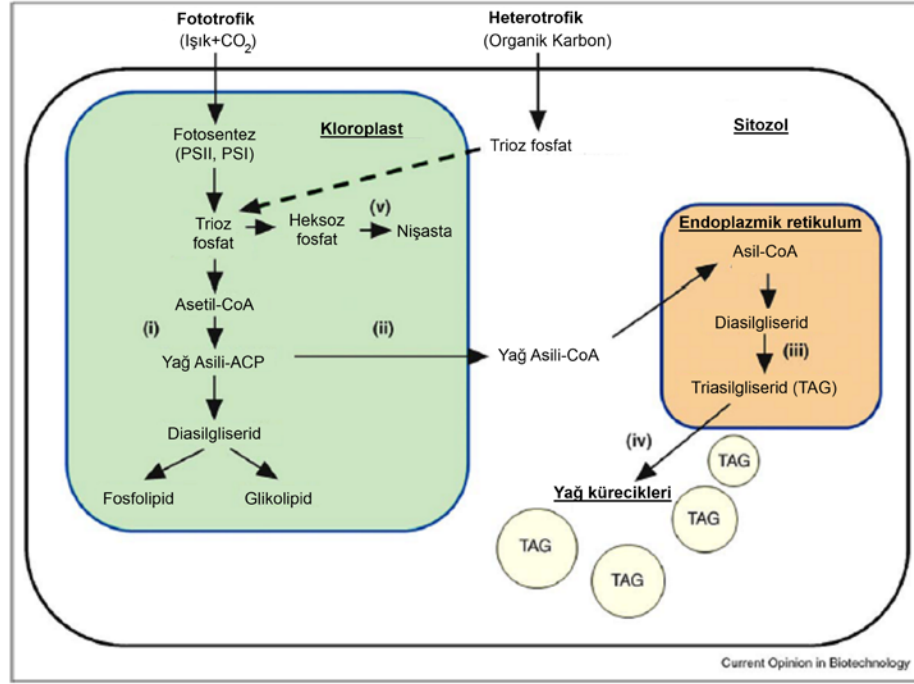
Algler, deniz ve tatlı su ortamlarından çöl kumları, kaplıcalar, karlı ve buzlu alanlar gibi çok farklı ekosistemlerin önemli parçalarıdır. Algler çok çeşitli ve son derece uzmanlaşmış organizma gruplarıdır. Alglerin sistematigi, farklı algal türlerde bulunan fotosentetik pigmentlerin çeşit ve kombinasyonlarına göre yapılmaktadır. Ayrıca, farklı algal grupların tanımlanmasında depo ürünlerinin kimyasal yapısı ve hücre duvarı rol oynamaktadır. Sistematik sınıflandırmaya göre, binlerce ökaryotik algal tür 2 ana sınıf altında alt sınıflara ayrılmıştır. Prokaryotlar olarak adlandırılan ilk ana sınıf altında siyanobakteriler (Cyanophyta ve Prochlorophyta gruplarını içeren) grubu yer almaktadır. Bunlar yapılarında klorofil a içeren prokaryotik mikroalglerdir. En çok bilinenleri mavi-yeşil olanlarıdır. İkinci ana grup olan ökaryotik mikroalgler ise çok çeşitli algal sınıflardan oluşur. Bunlar, Rhodophyceae (kırmızı alg, örn. *Porphyridium* türleri); Chlorophyta (yeşil alg, örn. *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*); Dinophyta (dinoflagellates, örn. *C. cohnii*); Chrysophyta (sarı-kahverengi algler, örn. *Ochromonas malhamensis*); Prymnesiophyta (örn. *Prymnesium paruum*, *Isochrysis* ve *Pavlova* suşları); Bacillariophyta (diatomlar, örn. *Nitzschia laevis*); Xanthophyta (örn. *Monodus subterraneus*); Rhaphidophyta (örn. *Fibrocapsa japonica*); Phaeophyta (kahverengi algler) 'dır. (Tomaselli, 2004).

Özellikle, biyoyakıt üretiminde sürdürülebilir hammadde potansiyeli olması dolayısıyla, mikroalglerin hücre ve moleküler biyolojisi üzerine çalışmalar son yıllarda hızlanarak artmaktadır. Enerjice zengin açıl grupları ile hidrokarbon enerji yoğunluğuna yakın TAG'ler en önemli depo enerjileridir. Dolayısıyla yağ damlacıklarındaki TAG biyosentezi, dönüşümü ve depolanması konuları mikroalgal araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Fotosentetik bir organizma olarak mikroalgler gün boyunca CO₂'i mikroalgal tür ve ortamdaki besin elementlerinin azalması gibi spesifik koşullara bağlı olarak TAG gibi pek çok ürüne dönüştürürler. Son zamanlara kadar, mikroalgal TAG üretiminin detayları ve dinamikleri, membran lipid metabolizması çoğunlukla keşfedilmemiş noktalar olarak kalmıştır. Fakat, bu eğilim son yıllarda bu konularda yayınlanan çalışmalarla hızlı bir yükselişe geçmiştir (Kwok and Wong, 2005; Guschina and Harwood, 2006; Liu and Benning, 2012).

Fosfolipitler, hücreler ve organeller arasında geçirgenliği sağlayan tüm biyolojik membranların yapılarında yer alırlar. Hücre geçirgenliğindeki bariyer görevlerinden başka, çok çeşitli enzim gruplarının fonksiyonları için uygun matriks oluşturarak çeşitli makromoleküllerin sentezinde yer alırlar (Guschina and Harwood, 2009). Monogalaktosildiaçilgliserol (MGDG), digalaktosildiaçilgliserol (DGDG) ve sulfokinovosildiaçilgliserol (SQDG)'leri içeren glikolipitler kloroplast ve diğer ilgili organellerin membran yapısında yer alırlar ve yüksek bitkilerle alglerin fotosentetik dokularında en çok bulunan açıl lipidlerdir. Örneğin, fotosentezin meydana geldiği tilakoid membranlarda DGDG'ler asimetrik olarak dağınık halde bulunurlar (Guschina and Harwood, 2009).

Nötral lipitler, özellikle TAG'lerin, bazı çevresel stres koşulları altında pek çok mikroalgde birikim yaptığı bilinmektedir. Bununla beraber, büyümeyle glikolipitler örneğin fosfatidilkolin (PC), fosfatidilgliserol (PG), fosfatidilethanolamin (PE), fosfatidilinositol (PI) ve fosfatidik asit (PA) gruplarında da değişim gözlenmektedir. Örneğin, polar lipitlerde azalma, nötral lipitlerde artma mikroalglerin azot stresine verdikleri genel bir yaklaşım olmaktadır (Alonso et al., 2000). Ayrıca pek çok mikroalg dışardan verilen farklı karbon kaynakları ile heterotrofik olarak büyüme yeteneğine sahiptir. Bu da karbon yakalama ve lipit biyosentezi için kullanmada farklılık yaratmaktadır (Şekil 2.4).

Açıklık kazandırmak için Şekil 2.4'de sadece ana adımlar gösterilmiştir. Öncü yağ asitleri *de novo* olarak fotosentez esnasında yakalanan karbonu veya dışarıdan sağlanan organik karbonu kullanarak kloroplastta sentezlenir. Mikroalglerde, kloroplasta girenin tam niteliği bilinmemektedir (kesikli çizgi). Serbest yağ asitleri kloroplasttan gönderilir ve endoplasmik retikulumda TAG'lere dönüştürülür ve yağ kürecikleri halinde sitozole salınır. (i)=ACC; (ii)yağ asitithioesteraz ve açıl-CoA sentaz; (iii)=TAG biyosentez enzimleri (açıl-CoA:diaçilgliserol açıltransferaz (DGAT); (iv)=yağ kürecikleri oluşumu ve (v)=ADP-glikozpirofosforilaz ve nişasta sentaz (Scott et al., 2010)



Şekil 2.4. Karbon yakalama ve lipit biyosentezi metabolik yoluna genel bakış (Scott et al., 2010).

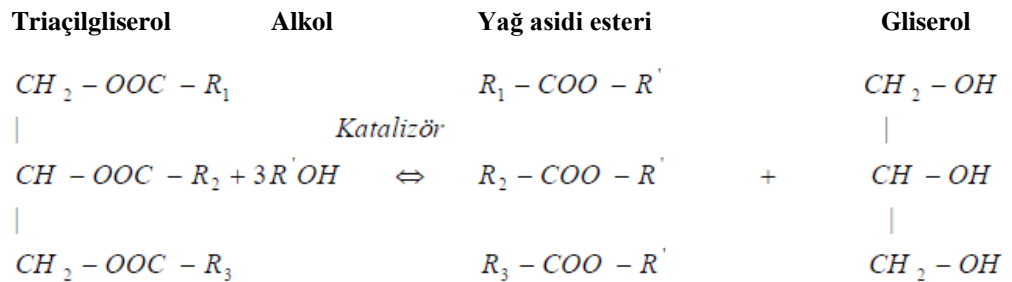
Yağ asitleri, metabolizma içerisinde serbest (esterleşmemiş) veya TAG gibi daha karmaşık moleküllerde yağ asit esterleri olarak bulunurlar. Yağ asitleri glikolipitler, fosfolipitler, sfingolipitler, prostaglandinler ve kolesterol esterlerini içeren birçok bileşiğin öncül maddesidir. Yağ asitlerinin bundan başka çok çeşitli fonksiyonları ortaya konulmaktadır (Champe and Harvey, 1997; Gill and Valivety, 1997; Kaya ve ark., 2004). Çoklu doymamış yağ asitleri, araşidonik asit (AA), EPA ve DHA esansiyel yağ asitlerindedir. Bu yağ asitleri insan ve hayvanlarda sentezlenemediğinden mutlaka besin zinciriyle alınmalıdır. PUFA'lar fosfolipidlerin önemli bileşenleri olup membran sertliğini azaltarak onların bu gibi belirgin özellikleri kazanmasını sağlarlar. Ayrıca, biyotransformasyonla biyolojik sistemlerde pek çok biyoaktif metabolite (prostaglandinler, tromboksanlar, leukotrienler) dönüşürler. Yapılan klinik ve epidemiyolojik çalışmalarla ω -3 yağ asitlerinin aterosklerozis (damar sertliği), kanser, romatoid artrit (iltihabi eklem hastalığı), alzheimer ve makula dejenerasyonu gibi yaşla ilişkili hastalıkların tedavisinde önemli bir yere sahip olduğu görülmektedir (Gill and Valivety, 1997).

2.3.2 Biyodizel üretiminde mikroalgal yağlar

Dünya enerji tüketimi, sanayideki gelişmeler ve hızlı nüfus artışı dolayısıyla artmaktadır. Günümüzde enerjinin büyük bir bölümü fosil yakıtlardan sağlanmaktadır. Ancak fosil yakıtların fiyatlarındaki belirsizlik, rezervlerin hızla

tükenmesi, fosil yakıtların tüketilmesi sonucu atmosfere salınan gazlar çevre kirliliğinin yanı sıra oluşturdukları sera etkisi sonucu küresel ısınma ve iklim değişikliklerine sebebiyet vermektedirler. Bu gibi nedenlerden dolayı gelecekte enerji üretiminde alternatif yöntemler aranmaktadır (Meng et al., 2009; Scott et al., 2010). Ayrıca, ülke olarak kullandığımız enerjinin %70'lik kısmını dışarıdan ithal etmekteyiz ve bu da ülke ekonomisine ağır bir yük olmakta alternatif enerji kaynaklarının bulunması gittikçe önem kazanmaktadır. Bu bağlamda yenilenebilir (güneş, rüzgar, hidro, jeotermal ve biyokütle ve atık enerjisi) ve yüksek verimli enerji kavramı önemli hale gelmiş ve birçok ülkede fosil yakıt kullanımını sınırlandırmak için kullanılmaktadır (Sakthivel et al., 2011). Bununla birlikte, uluslararası enerji biriminin yaptığı bir araştırmaya göre, atıklardan ve yanabilen yenilenebilir kaynaklardan (katı biyokütle, sıvı biyokütle, biyogaz, endüstriyel ve evsel atık) elde edilen enerji diğer yenilenebilir kaynaklara göre daha yüksek bir potansiyele sahiptir. Rapora göre, toplam enerji arzının %2,2'sini oluşturan hidroenerji ve %0,7'sini oluşturan diğer enerji kaynaklarına (jeotermal, güneş, rüzgar ve ısı) göre bu tür yenilenebilir kaynakların enerjisi toplam enerji arzının %10'unu oluşturmaktadır. Böylece, yanabilen kaynaklardan elde edilen enerjinin (biyodizel gibi), gelecekteki küresel enerji ihtiyacını çeşitlendirmede çok önemli bir rol oynayacağı tahmin edilmektedir (Lam and Lee, 2011).

Biyodizel, bitkisel ve hayvansal yağların uzun zincirli yağ asitlerinin transesterifikasyonu sonucu oluşan yakıt türüdür (Şekil 2.5). Biyodizelin petrol kökenli yakıtlarla karşılaştırıldığında; zararlı gaz emisyonlarını azaltması ve biyolojik olarak parçalanabilmesi başta olmak üzere pek çok avantajı bulunmaktadır (Fukuda et al., 2001).



Şekil 2.5 Transesterifikasyon reaksiyonunun genel denklemi

Biodizel üretiminde kullanılan en yaygın yöntem transesterifikasyondur. Transesterifikasyon reaksiyonu üç ardışık tersinir reaksiyondan oluşmaktadır. Bu süreçte, triaçilgliserol; her bir basamakta 1 mol alkil esterinin oluştuğu adım adım diaçilgliserol, monoaçilgliserol ve son olarak gliserole dönüştürülür. Diğer bir tanımla lipitlerde bulunan gliseridlerin bir katalizör varlığında bir alkol ile reaksiyona girerek ester ve gliserol oluşturmasıdır (Scott et al., 2010). 1 mol metilester ve 1 mol gliserol üretmek için transesterifikasyonda her bir mol trigliserid için 3 mol alkol gerekmektedir (Bkz. Şekil 2.5). Endüstriyel proseslerde her bir mol trigliserid için 6 mol metanole ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kadar yüksek oranda metanol kullanılmasının sebebi reaksiyonu daha çok metil esterleri oluşumuna doğru yönlendirmektir (Chisti, 2007).

Transesterifikasyonda kullanılan katalizörler alkali, asit ve enzim olarak sınıflandırılmaktadır.

Baz ile katalizlenen transesterifikasyon; alkali katalizör olarak genellikle kullanılan katalizörler sodyum hidroksit ve potasyum hidroksittir. Bu katalizörler, düşük sıcaklık ve atmosferik basınçta reaksiyonu katalizleyebilmekte, kısa sürede yüksek dönüşüm verimi elde edilmesini sağladığı ve ekonomik oldukları için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bunlara ek olarak asidik bir katalizörle gerçekleştirilen reaksiyona göre 4000 kat daha hızlı olabilmektedir. Fakat bazik bir katalizör ancak, serbest yağ içeriği %0,5'den az olan veya asit değeri 1 mg KOH/g olan rafine bitkisel yağların transesterifikasyonunda kullanılabilir (Fukuda et al., 2001).

Asit ile katalizlenen transesterifikasyon; genellikle kullanılan katalizörler sülfürik ve hidroklorik asittir. Bazik katalizörlere göre iki önemli avantajı vardır; birincisi hammaddede bulunan serbest yağ içeriğinden etkilenmez, ikincisi ise esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını birlikte katalizleyebilmeleridir. Esterifikasyon, bir alkol ve bir asit (serbest yağ asidi) varlığında esterin oluşturulduğu kimyasal bir reaksiyondur. Yağda bulunan serbest yağ asiti %1'den daha fazla ise asidik bir katalizör reaksiyon için daha uygundur. Ek olarak tek basamaklı bir süreçten oluşan asidik katalizleme, serbest yağ asitlerini metil esterlerine çevirmek için ekstra basamak gerektiren bazik katalizlemeye göre daha ekonomiktir. Fakat asit katalizörün kullanıldığı bir sistem ticari uygulamalar için uygun değildir. Çünkü, reaksiyon hızı düşüktür, yüksek sıcaklık ve alkol:yağ oranına ihtiyaç vardır. Katalizörün ortamdan ayrılması çevresel endişeler ve korozyon problemleri taşımaktadır (Lam et al., 2010).

Enzim (biyokatalizör) ile katalizlenen transesterifikasyon; lipazlar hidroliz, alkolizis, asidolizis gibi reaksiyonların yanı sıra esterifikasyon ve transesterifikasyon gibi reaksiyonları da katalizleyebilen enzimlerdir. Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolazlar; EC 3.1.1.3) uzun zincirli yağ asitlerinin gliserol esterlerini parçalayan, endüstride ve tıpta oldukça geniş uygulama alanı bulan biyokatalizörlerdir. Bu enzimler bakteri, fungus, maya, hayvan ve bitki kaynaklı olabilmektedirler. Bakterilerden elde edilen lipazlar ökaryotik organizmalardan elde edilenlere göre daha fazla olduğu için mikrobiyal lipazlar daha çok ilgi çekmiştir. Hem hücre içinde hem de hücre dışında salgılanan lipazlar TAG'lerin transesterifikasyon reaksiyonunu etkili bir şekilde katalizleyebilmektedir (Lam et al., 2010).

Bitkisel ve hayvansal yağlar dizel yakıt kaynağı olarak kullanılsa da özellikle direk enjeksiyon yapan makinelerde birçok problemle karşılaşmaktadır. Biyodizelin yüksek kaliteye sahip, pahalı bitkisel yağlardan yapılıyor olmasından kaynaklanan yüksek hammadde maliyeti, yemeklik olmayan veya atık yağların hammadde olarak kullanımıyla indirgenebilmektedir (Zhang et al., 2003).

Son yıllarda mikroalglerin enerji kaynağı olarak kullanımı yaygındır. Mikroalgler, fotosentez yaparak yani güneşten aldığı enerjiyi biyolojik enerjiyeye (ATP) çevirip ve CO₂ fiksasyonu için gerekli enerjiyi sağlamak amacıyla ve hücre içindeki diğer metabolik faaliyetler için kullanarak büyüyen ve çoğalan organizmalardır. Ayrıca bir azot kaynağı ve P, Fe, K, S, Mg gibi diğer elementlere de ihtiyaç duymakta, tatlı veya tuzlu su gibi sucul ortamlarda gelişmektedirler. Mikroalglerin, tarımsal ürünlerle ve diğer sucul bitkilerle karşılaştırıldığında gelişme hızları oldukça yüksektir. Bununla birlikte biyodizel üretiminde kullanılan tarımsal hammaddelerle karşılaştırıldığında, gelişimleri için çok daha küçük alanlara ihtiyaç duymaktadırlar. Mikroalglerin biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanımı sayesinde ekilebilir alanların biyodizel üretimine hammadde yetiştirmek için ayrılması önemli ölçüde azaltılacaktır. Örneğin Amerika'da toplam ekilebilir alanın %1-3 arası, ulaşım için ihtiyaç duyulan yakıt ihtiyacının %50'sini karşılayabilecek algal biyokütle üretimi için yeterli olacaktır (Chisti, 2007; Ratledge and Cohen, 2008; Brennan and Owende, 2010).

Mikroalgal lipitler genellikle (>%80) TAG formunda olup 16 ve 18 numaralı karbon atomlarınca zengin yağ asitleri içermektedir. Alg hücrelerinin ortalama lipit içeriği %20 ile %50 (g/g) oranında değişse de, optimum koşullar sağlandığında %75-80 oranında lipit biriktirebilen mikroalgler de bulunmaktadır

(Meng et al., 2009). Yapılan bir çalışmaya göre, mikroalgal biyokütle üretimi ortalama 15-25 ton/hektar/yıl civarında olmaktadır. Biyokütlenin %30 oranında yağ içerdiği varsayılırsa, bu da yaklaşık 4,5-7,5 ton/hektar/yıl yağ üretimi anlamına gelmektedir. Bu miktar, soyadan (0,4 ton/hektar/yıl); keten tohumundan (0,68 ton/hektar/yıl); palm'dan (3,62 ton/hektar/yıl) ve hint fıstığından (4,14 ton/hektar/yıl) elde edilen yağ üretiminden daha yüksektir (Chisti, 2007; Lam and Lee, 2011).

Bu kapsamda, yüksek yağ üretme potansiyelindeki mikroalgal türlerin taranması, yapılan çalışmalarda önemli yer tutmaktadır (Danielewicz et al., 2011; Doan et al., 2011). Bunun dışında, biyokütle gelişimi, yağ asiti içeriği ve kompozisyonu üzerine ortam bileşenlerinin (karbon ,azot, fosfor kaynaklarının çeşidi ve miktarı) etkisi, çevresel faktörler (sıcaklık, pH, tuz oranı), fermentasyon stratejileri gibi pek çok faktörün etkisinin araştırıldığı çalışmalar son yıllarda gittikçe önem kazanmıştır (Xiong et al., 2008; Pruvost et al., 2009; Widjaja et al., 2009; Li et al., 2011; Isleten-Hosoglu et al., 2012).

Mikroalgal yağların kullanımını sınırlandıran en büyük faktör olan yüksek üretim maliyetlerini düşürmek amacıyla Li et al (2011) tarafından yapılan çalışmada, *Chlorella minutissima* fotoheterotrofik koşullarda yetiştirilmiştir. Bu çalışmada, istatistiksel optimizasyon metodları kullanılarak ortam bileşenleri optimize edilerek, fototrofik koşullara göre 59 kat daha yüksek biyokütle verimliliği (1,78 g/l.gün) elde edilmiştir. Yağ verimliliğinde ise 0,29 g/l.gün değerine ulaşarak daha önce bu konuda sunulan değerlerin 11,9 kat fazlası olduğu belirtilmiştir.

Xiong et al (2008) heterotrofik *Chlorella protothecoides* ile yaptıkları çalışmada, geliştirdikleri kesikli-beslemeli sistemle 5 l'lik biyoreaktörde 7,96 g/l.gün biyokütle verimliliğine ve %50,3 (g/g) toplam yağ içeriğine ulaşmışlardır. Ayrıca, transesterifikasyon reaksiyonunu immobilize lipaz kullanarak gerçekleştirmişler ve %98'lik bir dönüşüm oranı ortaya koymuşlardır.

Widjaja et al (2009) *Chlorella vulgaris* ile yaptıkları çalışmada, ortamdaki CO₂ konsantrasyonunun, azot tükenmesinin ve hasat zamanının yağ üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Azotun tükenmiş olduğu ortamlarda kültüre alınan hücrelerin daha yüksek yağ içeriklerine sahip oldukları saptanmıştır. Hücreler, normal ortamdaki azotun tükendiği ortama geçtiğinde serbest yağ asitlerince zengin yağ kompozisyonunun yerini triaçilgliserolce zengin bir

kompozisyona bıraktığı belirtilmiştir. Ayrıca, ortamdaki CO₂ konsantrasyonunun artırılması hem büyümeyi hem de yağ üretimini teşvik edici yönde etki ettiği saptanmıştır.

Popovich et al (2012) yaptıkları çalışmada, tatlı su mikroalgi *Neochloris oleoabundans* hücrelerini zenginleştirilmiş deniz suyu ortamında geliştirerek, optimum büyüme ve azot stresi koşulları altında yağ üretim potansiyeli bakımından incelemişlerdir. Optimum koşullarda hücrelerin spesifik büyüme hızı 0,73 1/gün şeklinde olup, 1,5 g/l biyokütle konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Azot stresi koşullarında hücrelerin toplam yağ içeriği ise %26 (g/g) olarak saptanmıştır.

2.3.3 Çoklu doymamış yağ asitlerinin üretiminde mikroalgler

Mikroalglerden elde edilen yağların bir kısmı biyodizel üretiminde kullanılabilirdiği gibi, bazı mikroalglerden elde edilen yağlar PUFA içeriğince zengin oldukları için farmasötik ve beslenme amaçlı kullanılmaktadırlar. Bazı mikroalgler, AA, EPA (C20:5n-3), γ -linolenik asit (GLA), α -linolenik asit (C18:3n-3) ve DHA (C22:6n-3) gibi yağ asitleri açısından oldukça zenginlerdir (Ratledge, 2004). Bu yağ asitlerinden çoklu doymamış ω -3 yağ asitlerinin- özellikle α -linolenik asit, EPA ve DHA terapötik önemi, gerek gıda gerekse ilaç sektöründeki birçok önemli uygulamalarından dolayı kanıtlanmış ve bu yüzden de bu ürünlere olan ilgi gittikçe artmıştır. Yapılan klinik ve epidemiyolojik çalışmalarla ω -3 yağ asitlerinin aterosklerozis (damar sertliği), kanser, romatoid artrit (iltihabi eklem hastalığı), alzheimer ve makula dejenerasyonu gibi yaşla ilişkili hastalıkların tedavisinde önemli bir yere sahip olduğu görülmektedir (Gill and Valivety, 1997; Tonon et al., 2002). Uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin deniz ürünleri yetiştiriciliğinde ve hayvan yemlerine katkı maddesi olarak da geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Yetiştiriciliği yapılan balık larvalarının besin zincirinin temelini mikroalgler oluşturmaktadır. Ayrıca, bazı larvaların beslenmesinde, larvaların ilk canlı yemini oluşturan rotifer ve artemia gibi zooplanktonların beslenmelerinde mikroalgler kullanılır (Sijtsma and de Swaaf, 2004). Sonuçta, sağlık, gıda, hayvan beslenmesi gibi pek çok alanda ω -3 yağ asitlerine giderek artan ilgi neticesinde ticari pazarı artmaya başlamıştır. Şu anda çoklu doymamış yağ asitlerinden EPA ve DHA'nın ticari üretiminde balık yağı kullanılmaktadır. Fakat balık yağının hoş olmayan tadı, kokusu ve iklim ve mevsimsel değişikliklerden kaynaklanan kalite problemlerinden dolayı ω -3 yağ asitlerinin balık yağından üretiminde kısıtlamalar bulunmaktadır. Ayrıca, yağ asitlerinin balık yağından saflaştırma maliyetlerinin yüksek olması, balıkların

kirlilikleri bünyelerinde biriktirmeleri dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. ω -3 yağ asitlerine giderek artan talep, balık stoklarında azalma riskini ortaya çıkarmakta ve dolayısıyla uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin başka yollardan elde edilmesi üzerine araştırmalar yoğunlaşmaktadır. Balık yağına alternatif olarak mikroalgler, bu yağ asitlerinin eldesinde en iyi potansiyele sahip aday olarak düşünülmektedir (Vazhappilly and Chen 1998; Sijtsma and De Swaaf, 2004).

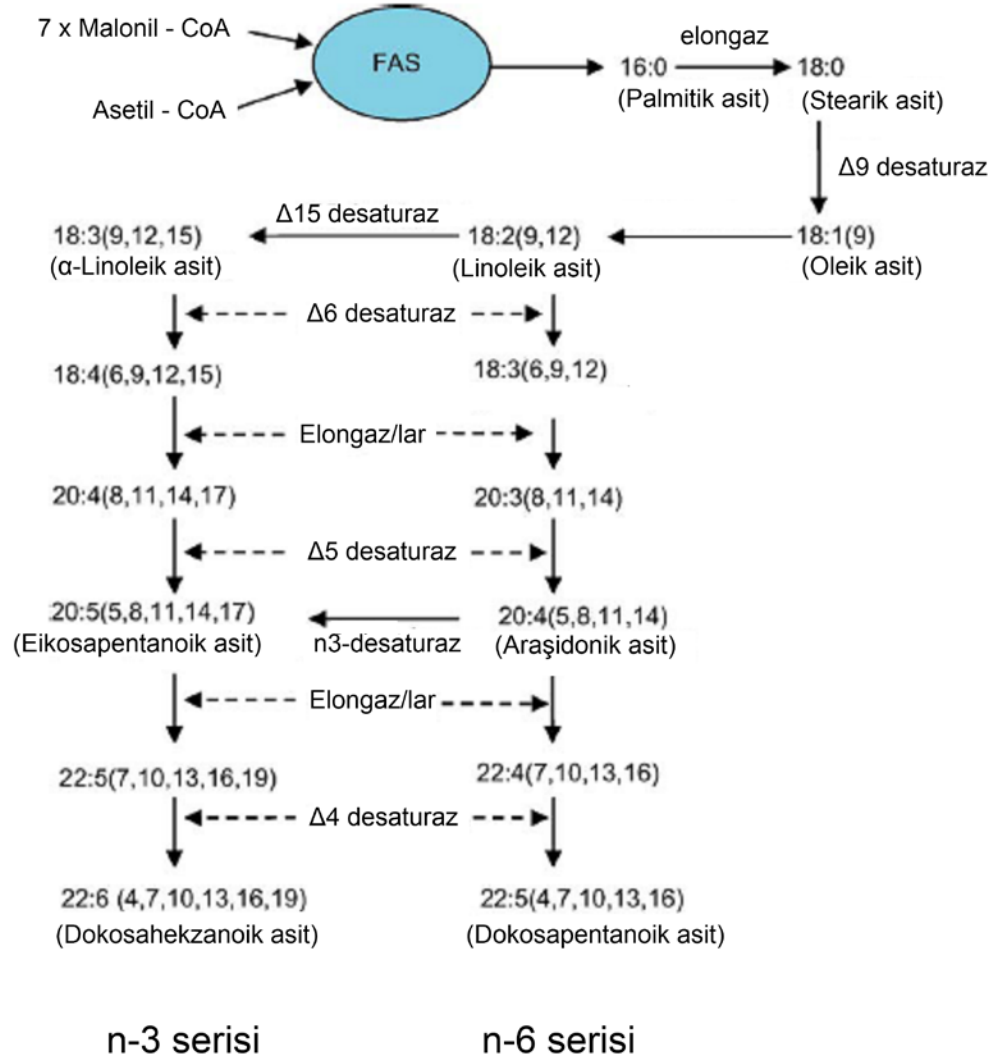
Lipitler, mikroalglerde çoklu doymamış yağ asitlerinin tek kaynağıdır. Günümüzde, insan ve hayvan beslenmesinde son derece önemli bir yere sahip olan mikroalglerin toplam yağ ve özellikle yağ asidi kompozisyonunu etkileyen parametrelerin değiştirilerek iyileştirilmesi ve üretim kapasitelerinin artırılmasına yönelik pek çok çalışma bulunmaktadır (Chen et al., 2007; Demirel ve Özpınar, 2003, Tonon et al., 2002). En önemli parametre uygun mikroalgal suşun seçilmesidir. Özellikle yağ üretimi için, uygun suşların belirlenmesinde gözönüne alınan parametreler, türün spesifik büyüme hızı, optimum kültür koşullarındaki biyokütle üretimi, toplam yağ içeriği ve yağ kompozisyonundaki doymuş/doymamış yağ asiti oranlarıdır. Özellikle PUFA üretimine ait alt akım işlemleri açısından düşünüldüğünde, PUFA'ların hücre içerisindeki lokalizasyonunu (hücre membran yapısındaki fosfolipitler içerisinde ya da sitozolde bulunan TAG'lerin bir parçası olup olmaması) ve farklı PUFA'ların kompozisyon içerisinde yer alıp almadığını bilmek önemlidir (Sijtsma and De Swaaf, 2004).

Vazhappilly and Chen (1998) yaptıkları çalışmada, 20 farklı mikroalgal türün fototrofik koşullarda EPA ve DHA üretme potansiyellerini ortaya koymuşlardır. En yüksek EPA oranı (% toplam yağ asitleri) sırasıyla *Monodus subterraneus* UTEX 151 (34,2%), *Chlorella minutissima* UTEX 2341 (31,3%) ve *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 642 (21,4%) de saptanmıştır. En yüksek DHA oranı ise *Cryptocodinium cohnii* UTEX L1649 (19,9%) da bulunmuştur. Mikroalglerin endüstriyel anlamda heterotrofik üretim potansiyelleri seçilen suşun iyi bir yağ kompozisyonu ve verimi ile heterotrofik olarak büyüebilmesine bağlıdır. Söz konusu çalışmada, 20 mikroalg ayrıca glikoz ve asetat varlığında heterotrofik olarak büyüme potansiyelleri bakımından da incelenmiştir. Mevcut türler içerisinde sadece *Nannochloropsis oculata* UTEX LB 2164 glikoz (5g/l) varlığında, diğer 12 tür ise sadece asetat (1g/l) varlığında heterotrofik olarak büyüme göstermişlerdir (Vazhappilly and Chen, 1998).

2.3.3.1 Tek hücreli ve ökaryotik hücrelerde EPA ve DHA sentezi

Çoklu doymamış yağ asitlerinin oluşumunda öncelikle oleik asit, enzimatik işlemlerle doymamışlığı arttırılarak linoleik asit ardından da linolenik asite çevrilir. Bunu takip eden aşamalarda enzimatik işlemlerle zincir uzunluğu ve doymamışlıkları arttırılarak ω -3 ve ω -6 yağ asitleri oluşturulur. Şekil 2.6'da görüldüğü gibi AA ve EPA sentezi linoleik asit veya α -linolenik asitten başlamaktadır. Bu “klasik metabolik yol” doymamışlığın arttırılması için moleküler oksijen isteyen ve çeşitli organizmalarda da geçerli olduğu düşünülen yolizidir. Tek hücrelilerde ve ökaryotik hücrelerde DHA sentezinde, EPA enzimatik işlemlerle (Δ 5-spesifik elongaz) zinciri uzatılarak ω -3 C22:5'e dönüştürülmekte ve Δ 4-desaturaz ile doymamışlığı arttırılarak DHA oluşturulmaktadır (Wen and Chen, 2003; Ratledge, 2004).

Tonon et al (2002), *Nannochloropsis oculata*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana* ve *P. lutheri* ile uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin oluşumu ve bunların TAG'lerdeki oranlarını ortaya koymuşlardır. DHA ve EPA'in TAG'lerde bulunma oranının yetiştirme süresince farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Bu farklılıklar sadece türler arasında olmayıp, herbir türün büyüme eğrilerinin farklı zamanlarında da değişiklik gösterdiği saptanmıştır. *N. oculata*'da durağan fazın sonunda toplam yağ asitlerinin %90'nının TAG'lerde bulunduğu belirtilmiştir. Bu mikroalgdeki EPA oranı logaritmik faz boyunca sabit kalmakta, fakat hücreler durağan faza girdiğinde artış gözlenmektedir. Durağan fazın sonunda toplam EPA'in %68'inin TAG'larda toplandığı saptanmıştır. *P. tricornutum*'da ise durağan faza geçildiğinde hücrelerin EPA içeriğinde bir değişim gözlenmemekle birlikte TAG'lerdeki EPA oranının %3'ten %40'a çıktığı saptanmıştır. Diğer bir diatom *T. pseudonana*'da ise toplam yağ asiti miktarında durağan fazda önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Bu fazda, toplam serbet yağ asitlerinin %74'ünün ise TAG'larda toplandığı belirlenmiştir. Ayrıca, TAG'larda yer alan EPA oranının %16'dan %67'ye çıktığı ortaya konmuştur (Tonon et al., 2002).

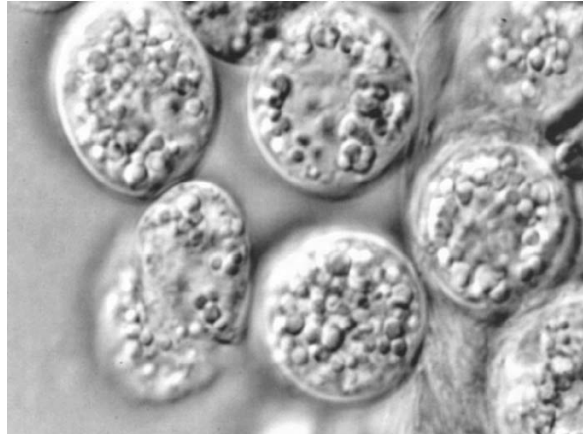


Şekil 2.6 Daha basit yapılı ökaryotiklerde uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin (ω -3 ve ω -6) biyosentez yolu (Ratledge, 2004)

Toplam yağ asitlerinin %30 kadarını EPA olarak içeren *P. tricornutum* su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yetiştirme esnasında sıcaklığın düşürülmesinin organizmada EPA birikimi üzerine olumlu katkı sağladığı saptanmıştır (Jiang and Gao, 2004). Yetiştirme sıcaklığının 12 saat süresince 25 °C'den 10 °C'ye düşürüldüğünde EPA konsantrasyonunda kontrole göre %120 artış belirlenmiştir. Ayrıca, sürekli sistem üretimlerinde farklı açıl sınıflarındaki yağ asiti dağılımı, ayrıca kültürün yaşı ve azot kaynağı konsantrasyonunun bu yağ asitleri dağılımına etkileri ortaya konmuştur. Toplam yağ asitlerinin %50'sini oluşturan hegzadekanoik asit ve EPA'nın bu mikroalgde bulunan iki önemli yağ asidi olduğu saptanmıştır (Jiang and Gao, 2004).

Navicula saprophila, *Rhodomonas salina* ve *Nitzschia* sp. tarafından fototrofik, heterotrofik ve mikсотrofik yetiştirme koşullarının EPA üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir araştırmada, fototrofik koşullarda toplam yağ asitleri içerisindeki EPA oranı *N. saprophila*'da %20,1; *R. salina*'da %15,4 ve *Nitzschia* sp.'de %24,7 olarak belirlenmiştir. Asetik asit kullanılarak gerçekleştirilen mikсотrofik kültürlemeyle ise *Nitzschia* sp.'de yüksek büyüme hızı ve EPA üretimi elde edilmiştir (Kitano et al., 1997).

Kloroplastı olmayan heterotrofik denizel bir mikroalg türü olan *Cryptocodinium cohnii* ω -3 çoklu doymamış yağ asitlerinden DHA açısından oldukça zengin bir türdür (Şekil 2.7). *C. cohnii* toplam biyokütlenin %20'si kadar yağ içermekte olup, toplam yağ asitleri içerisindeki DHA oranının da %30-50 olduğu bilinmektedir. Toplam yağ asitleri içerisinde DHA dışında başka çoklu doymamış yağ asidi olmadığı için, mikroalglerde DHA sentezi metabolik yolu üzerinde çalışılmaya uygun bir organizma olarak görülmektedir (Sijtsma and De Swaaf, 2004). De Swaaf et al (1999), *C. cohnii* ile DHA üretimini optimize etmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, normal deniz suyu konsantrasyonunun yarısı kadar bir tuz konsantrasyonunun organizmada iyi bir büyüme ve yağ üretimi için yeterli olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca, glikoz konsantrasyonu 25-84,3 g/l arasında iyi bir büyüme gösterdiğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar ayrıca, yüksek inkübasyon sıcaklıklarının (30 °C) büyümeyi teşvik ettiği fakat yağ oluşumunun daha düşük sıcaklıklarda (27 °C) daha yüksek olduğunu saptamışlardır.



Şekil 2.7 DHA açısından zengin yağ globüllerini içeren *C. cohnii* hücreleri (Wynn et al., 2005).

C. cohnii ile yapılan DHA üretimi üzerine metabolik yol çalışmalarında, *C. cohnii* de yağ asidi sentezinde sıkı düzenlenmiş 3 farklı sistemin varlığı ortaya

konulmuştur. Bunlar sırasıyla (1) doymuş yağ asitlerinin sentezi, (2) doymuş yağ asitlerinin tekli doymamış yağ asitlerine dönüşümü, (3) DHA yapımı şeklinde olmaktadır. Son aşama ile ilgili olarak *C. cohnii*'de C18'li çoklu doymamış yağ asitlerinin çok düşük düzeyde olmasının nedeni, DHA metabolik yolunun çok sıkı düzenlendiği ve böylece çok az ara ürünün burdan kurtulabildiği şeklinde açıklanmaktadır (De Swaaf et al., 2003c).

Çoklu doymamış yağ asitlerince zengin pek çok mikroalg türü bilinmesine rağmen, sadece birkaçının endüstriyel olarak üretim potansiyeli bulunmaktadır. Bunun nedeni büyük çoğunlukla, mikroalg yetiştiriciliğinde geleneksel üretim sistemi olan fototrofik sistemlerden kaynaklanan düşük spesifik büyüme hızı ve düşük hücre yoğunluklarıdır.

2.4 Mikroalg Yetiştiriciliğinde Üretim Sistemleri

Çoklu doymamış yağ asitlerinin ticari olarak üretimi için verimi yüksek büyük ölçek yetiştirme sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Mikroalglerin fototrofik, yani büyüme için ışığa gereksinim duydukları bilinmektedir. Bununla birlikte, bazı mikroalgler karbon ve enerji kaynağı olarak bir veya daha fazla organik besinleri tüketebilecek heterotrofik büyüme yeteneğine sahiptirler (Wen and Chen, 2003).

2.4.1 Fototrofik kültür sistemleri

Mikroalg yetiştiriciliğinde geleneksel üretim yöntemi fototrofik yetiştirmedir. Bu amaçla, 3 ana temele dayanan fototrofik sistemler kullanılmaktadır. Bunlar, (1) açık havuzlar, (2) doğal aydınlatmalı (gün ışığı) kapalı fotobiyoreaktörler, (3) yapay aydınlatmalı kapalı fotobiyoreaktörlerdir (Brennan and Owende, 2010).

Açık sistemler mikroalgal kültür sistemleri içinde en basit ve temelde mikroalglerin doğal yaşam ortamlarına benzer koşulların sağlandığı sistemlerdir. Açık sistemlerin temel tipleri; sığ-büyük havuzlar, tanklar, dairesel havuzlar, kanallı (raceway) havuzlar, kaskatlı havuzlar olarak özetlenebilir. Genel olarak havuzlarla yapılan ticari amaçlı ölçek büyütme, istenmeyen mikroalg türleri, bakteriler ve diğer protozoalardan kaynaklanan kontaminasyon problemleri nedeniyle oldukça zor olmaktadır. Bunun yanısıra, açık havuzlarda yoğun kültür elde etmek çok zor olduğu için seyreltik kültürlerin ayırma saflaştırma işlemleri

son derece pahalı olmaktadır (Wen and Chen 2003; Brennan and Owende, 2010). Sonuçta, sadece birkaç mikroalg türü seçici ortamlarında açık havuzlarda kültüre alınabilmektedir.

Işık ile enerji ihtiyaçlarını sağlayan mikroalglerin ihtiyaç duydukları optimum koşulları sağlayan ve ışık geçişine izin veren sistemler kapalı fotobiyoreaktörlerdir. Açık sistemlerde karşılaşılan kontaminasyon ve ortam koşullarının kontrol edilememesi gibi problemler kapalı fotobiyoreaktörlerle önlenmeye çalışılmaktadır. Fakat, bu sistemlerdeki yetersiz ışık penetrasyonu, sıcaklık artışının kontrol edilememesi, yüksek konsantrasyonlarda oksijen birikiminden kaynaklanan olumsuz etkiler dolayısıyla mikroalgal büyüme istenen düzeylere çıkamamaktadır. Bunun yanı sıra, fotobiyoreaktörler ile ölçek büyütme çok zor olmaktadır. Konfigurasyonlarındaki karmaşıklık ve yapım malzemeleri dolayısıyla yatırım maliyetleri yüksek olmaktadır (Chen and Chen, 2006; Brennan and Owende, 2010).

2.4.2 Heterotrofik kültür sistemleri

Heterotrofik kültürleme, bazı mikroalgal türlerle sınırlı olan, ışık kullanılmayan, dışardan verilen organik maddenin kültür ortamında çözülmesiyle organizmaya karbon ve enerji kaynağı sağlayan, fotobiyoreaktörlerdeki fototrofik kültürlemeye fizibil bir alternatif olan kültür sistemleridir (Sakthivel et al., 2011). Işığa ihtiyaç duyulmadığı için, yüksek hücre yoğunluklarına ve verimliliklerine ulaşmak fototrofik sistemlere göre çok daha kolay olmaktadır. Heterotrofik kültürlemede temel kültür ortamı fototrofik kültür ortamlarına benzemekle birlikte tek fark, ilave edilen organik madde ve kültürasyonun karanlıkta gerçekleşmesidir. Miksotrofik kültür ise heterotrofik kültürlemenin bir türü olmakla birlikte, bu tür sistemlerde hem CO₂ hem de organik karbon eş zamanlı olarak solunum ve fotosentetik metabolizmayla kullanılmaktadır. Fotoheterotrofik kültürlemede ise, organizma organik karbonu kullanmak için ışığa ihtiyaç duymaktadır (Perez-Garcia et al., 2011). Heterotrofik kültürleme, fotobiyoreaktörlerde karşılaşılan 2 önemli noktayı kapatmada üstünlük sağlamaktadır. Birincisi, ilaç, gıda gibi çeşitli sektörlerde kullanılabilen fermentörler heterotrofik mikroalgal kültürleme için de kullanılabilir. Böylece özel bir fermentöre ihtiyaç duyulmamakta, bir çok proses için kullanılacak bu tip fermentörler ile yatırım maliyetlerinde son derece önemli bir azalma gerçekleşmektedir. Heterotrofik sistemlerin işletim kolaylığı ve en önemlisi büyük ölçek üretimlerde çok yüksek hücre yoğunluklarına ulaşılması en

önemli avantajlarıdır. Örneğin bazı heterotrofik kültürlerde tür ve suşa bağlı olarak büyüme hızı, kuru biyokütle, yağ üretimi fototrofik kültür sistemlerine göre çok daha yüksek seviyelerde olmaktadır (Chen and Chen, 2006; Bumbak et al., 2011; Isleten-Hosoglu et al., 2012). Bazı heterotrofik sistemlerde mikroalgal biyokütle litrede 50-100 g kuru biyokütle değerlerine ulaşabilmekte ki bu değer litrede maksimum 30 g elde edilen fototrofik üretimlerle kıyaslandığında oldukça yüksektir. Heterotrofik sistemlerde, 100,000 l'ye kadar çıkan hacimlerle yüzlerce kilogram ürün eldesi söz konusu olabilmektedir. Dolayısıyla heterotrofik kültürlemeyle elde edilen yüksek hacim ve verimlilik değerleri maliyet açısından fototrofik kültürlemeye göre çok daha avantajlı olmaktadır. Örneğin, Japonya'da *Chlorella* spp.'nin heterotrofik ortamlarda 500 ton kuru biyokütle elde edilmekte bu da Japonya'daki bu alg üretiminin %50'sine karşılık gelmektedir (Chen and Chen, 2006; Bumbak et al., 2011).

Mikroalglerin karıştırmalı biyoreaktörlerde heterotrofik olarak yetiştirilebilmeleri için bir dizi koşullara sahip olmaları gerekmektedir. Çizelge 2.3'de bu kriterler ve heterotrofik kültürlemenin avantaj ve dezavantajları detaylı olarak sunulmuştur (Bumbak et al., 2011).

2.5 Mikroalglerin Heterotrofik Üretimlerine Etki Eden Faktörler

Çizelge 3'de verilen mikroalglerin heterotrofik üretim için taşınması gereken temel özellikler dışında, heterotrofik kültürlemede hem hücre büyümesi hem de ürün sentezini ortamdaki besin elementleri ve çevresel faktörler önemli derecede etkilemektedir. En çok etkili olan ortam parametreleri başında karbon, azot ve fosfor kaynakları; çevresel faktörlerin başında ise yetiştirme sıcaklığı, tuzluluk (denizel türler için), pH ve çözülmüş oksijen konsantrasyonu gelmektedir.

2.5.1 Besinsel bileşenlerin etkisi

Karbon kaynağı, heterotrofik kültürlemede en önemli ortam bileşenlerinden biridir. Çünkü hem enerji kaynağı hem de karbon iskeleti olarak kullanılır. Genellikle kullanılan iki karbon kaynağı glikoz ve asetat olmaktadır (Wen and Chen, 2000; Ratledge et al., 2011). Ratledge et al (2001) ve De Swaaf et al (2003a) *C. cohnii* ile yaptıkları çalışmalarda, kesikli beslemeli sistemle DHA üretiminde karbon kaynağı olarak hem glikoz hem de asetik asit kullanmışlardır. Kesikli beslemeli sistemde beslemede %50 (w/v) asetik asit ve glikoz ayrı ayrı kullanılmıştır. Besleme hızı, kültürün pH'sıyla kontrol edilmiştir.

Çizelge 2.3. Heterotrofik kültürlemenin, konvansiyonel karıştırmalı biyoreaktörlerde üretiminde ön koşul, fayda ve kısıtlamaları

	Ön koşul/Faydalar	Kısıtlamalar
Biyoreaktörde yetiştirme	İklim koşullarından bağımsız	Yüksek oksijen ihtiyacı
	Alt akım işlem maliyetinde azalma	Kompleks substrat besleme kontrolü
	Artan verimlilik, substrat konsantrasyonunun kontrolü	Reolojik limitasyonlar (yüksek viskozitelerde)
	Arazi gereksiniminde azalma, ölçeklenebilir proses stratejileri	Metabolitlerin kritik/toksik seviyeleri
	Biyoreaktörlerin çok amaçlı kullanımı	Yeni ekipman ihtiyacında yüksek maliyet
Kültür ortamı	Işığa ihtiyaç duyulmaz	Ortamdaki organik besin elemetlerinden dolayı yüksek kontaminasyon riski
	Ucuz ortamların kullanılma imkanı	Korozyon (yüksek tuzluluk, kritik pH)
	Kolay sterilizasyon	Pahalı hammadde (vitaminler, aminoasitler)
	Yüksek tuzluluk, ekstrem pH, yüksek inkübasyon sıcaklığı (>40 °C) gibi faktörler sayesinde kontaminasyonun önlenmesi	Tanmlı olmayan, kompleks ortam bileşenleri (maya ekstraktı)
Türler	Aksenik olması	Yüzeye yapışma
	Makul bir spesifik büyüme hızı	Agregat oluşumu
	Mekanik dayanım	Viskoz metabolitlerin salınımı
	Konvansiyonel soğutma ile ulaşılabilen inkübasyon sıcaklıkları (25-40 °C)	Osmotik stres
	Direnç ve dayanıklılık (soğukta uzun zaman muhafaza, dondurma, tekrarlanan kültürler vs.)	Hücreiçi ürün hasatı

Buna göre, asetik asidin kullanıldığı denemede DHA verimliliği daha yüksek olmuştur. DHA üretiminde asetik asidin glikoza göre daha yüksek verimlilikte olma nedeni, yağ asidi sentezinin temel yapı taşı olan asetil-CoA metabolizması ile açıklanabilmektedir (De Swaaf et al., 2003a). Glikozun asetil-CoA'ya dönüşümü için birkaç aşamadan geçmesi gerekirken, *C. cohnii*'de

asetatın asetil-CoA metabolizmasına katılımının tek bir basamakta olduğu düşünülmektedir. Heterotrofik mikroalgler türe bağlı olarak etanol, gliserol gibi diğer karbon kaynaklarını da kullanabilmektedirler (De Swaaf et al., 2003c; Pyle et al., 2008). Genel olarak, C/N oranının hücrede yağ ve protein sentezi arasındaki dengeyi sağlayarak hücrede yağ birikimi üzerine etkili olduğu düşünülmektedir. Yüksek C/N oranları kültürdeki azot yokluğundan dolayı yağ üretimini tetiklediği belirlenmiştir. C/N oranı ayrıca yağ asidi kompozisyonu üzerine de etkili olmaktadır (Chen and Johns, 1991).

Karbon kaynaklarının yanısıra, mikroalgal büyüme için önemli bir diğer bileşen azottur. Azot kaynakları nitrat, üre gibi basit azot kaynakları olabildiği gibi maya ekstraktı, tripton, mısır ıslatma şurubu gibi kompleks azot kaynakları da kullanılabilir. Kompleks azot kaynakları aminoasit, vitamin ve büyüme faktörleri açısından zengin oldukları için basit azot kaynaklarına göre daha çok tercih edilebilmektedir (Chen and Chen, 2006). *Schizochytrium* sp. S31 için 20 g/l glikoz ve 0,4 g/l maya ekstraktı konsantrasyonları ve pH'nın 7,0'ye sabitlendiği koşullar DHA üretiminin en yüksek olduğu yetiştirme koşulları olarak belirtilmiştir (Wu et al., 2005).

Fosfor, algal büyüme için gerekli olan bir diğer besin elementidir. Mikroalgal kültürlemede fosfor genellikle ortama ortofosfat (PO_4^{-3}) şeklinde katılmaktadır. Fosfatlar, hücrede enerji transferi, hücre membran ve nükleik asitlerin oluşumundan sorumludur. Ayrıca fosfatlar, astaksantin ve PUFA'lar gibi önemli ürünlerin sentezinde rol oynamaktadır (Chen and Chen, 2006). Fosfat limitasyonunun *Monodus subterraneus*'un yağ asidi ve toplam yağ kompozisyonunda önemli değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir (Khozin-Goldberg and Cohen, 2006). Artan fosfat (K_2HPO_4) konsantrasyonlarında uzun zincirli PUFA'ların ve EPA oranlarının düştüğü saptanmıştır. Buna karşın fosfat eksikliğinde yağ kompozisyonundaki fosfolipidlerin oranı %8,3'tan %1,4'e düşerken; TAG'ların oranının ise %6,5'tan %39,3'e çıktığı belirlenmiştir (Khozin-Goldberg and Cohen, 2006).

Karbon, azot ve fosfor ihtiyaçlarının yanısıra mikroalgler başka spesifik besin elementlerine de ihtiyaç duymaktadır. Örneğin denizel diatom *N. laevis*'in yağ içeriği kültür ortamında azalan silikat miktarıyla artmaktadır (Wen and Chen, 2003). Ayrıca, demirin mikroalg gelişimi ve yağ üretimindeki fonksiyonu da son yıllarda yapılan çalışmalarda ortaya konmaya çalışılmaktadır (Liu et al., 2008).

2.5.2 Çevresel faktörlerin etkisi

Sıcaklık algal büyüme ve toplam yağ, yağ asitleri ve karotenoidler gibi algal metabolitlerin oluşumunu tetikleyen faktörlerin başında gelmektedir. Düşük sıcaklıklarda mikroalgler hücre membran akışkanlığını korumak için daha çok PUFA sentezlemeye çalışmaktadırlar. Ayrıca, düşük sıcaklıklarda ortamda çözülmüş halde bulunan yüksek moleküler oksijen miktarının da PUFA sentezini olumlu etkilediği düşünülmektedir. Çünkü yağ asidi zincirlerinin uzaması ve desaturasyon işlemlerinin etkinliği ortamdaki moleküler O₂ varlığına bağlı olmaktadır (Wen and Chen, 2003). Ayrıca, mikroalglerin kültürasyonunda ω-3 PUFA üretimi ani sıcaklık değişim stratejileri kullanılarak arttırılmaya çalışılmıştır (Jiang and Chen, 2000).

Mikroalgler tarafından ω-3 PUFA üretimini etkileyen bir diğer faktör de pH'dır. *P. tricornutum* kültürlerinde başlangıç pH değerleri 6,0-8,8 arasında değişmiş fakat kültürleme sonundaki pH değerleri her bir kültürde farklılık göstermiştir. Farklı pH değerlerinde kuru hücre ağırlıkları aynı olmasına rağmen, EPA verimi başlangıç pH değeri 7,6 olduğunda en yüksek olarak saptanmıştır (Yongmanitchai and Ward, 1991). Jiang and Chen (2000b) *C. cohnii*'de hücre gelişimi ve ω-3 PUFA üretimi üzerine pH'nın etkisinin önemli olduğunu belirtmişlerdir. Glikozun tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıldığı ve pH 4,0-7,0 aralığında heterotrofik kesikli kültüründe yapılan çalışmada spesifik büyüme hızı, kuru biyokütle, glikoz kullanım verimi, yağ asitlerindeki doymamışlık derecesi ve ω-3 PUFA oranı açısından en uygun pH değeri 7,2 olarak belirlenmiştir.

Tuzluluk, hücrenin fiziksel özelliklerini etkileyen bir parametredir. Tuzluluğun, mikroalglerin büyüme ve karotenoid, yağ gibi çeşitli metabolitlerinin üretimine olan etkileri incelenmiştir (Jiang and Chen, 1999; Rao et al., 2007). Ortamdaki tuz konsantrasyonu arttıkça ω-3 PUFA miktarında da azalma saptanmıştır (Wen and Chen, 2003). Buna karşın, Seto et al (1984) *Chlorella minutissima*'da büyüme ve yağ asidi kompozisyonu üzerine tuz konsantrasyonunun etkisini araştırdıkları çalışmada, tuzlu suda yetişen kültürlerin daha yüksek oranlarda EPA içeriğine sahip olduklarını saptamışlardır. Üç farklı *C. cohnii* suşunda tuzluluğun hücre büyümesi ve DHA üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *C. cohnii* ATCC 30556 ve ATCC 50051'de en yüksek kuru hücre ağırlığı ve DHA verimi tuzluluğun 9 g/l olduğu konsantrasyonda elde edilirken;

C. cohnii RJH en yüksek spesifik büyüme hızı ve DHA içeriğine tuzluluğun 5 g/l olduğu konsantrasyonda ulaşılmıştır (Jiang and Chen, 1999).

Ortamda bulunan organik besin elementlerinden ve mikroalg türünden bağımsız olarak büyüme hızı, havalandırma hızı arttıkça artmaktadır. Oksijen, mikroalglerin heterotrofik yetiştiriciliğinde önemli bir faktördür. Örneğin *Chlorella* spp.'de kültür ortamındaki oksijen limitasyonu spesifik büyüme hızını azaltarak biyokütle verimliliğini düşürmektedir (Wu and Sui, 2007). *Chlorella*, *Tetraselmis* ve *Nitzchia* türleri fototrofik sistemlerle kıyaslandığında heterotrofik sistemlerde daha hızlı büyümektedir (Wen et al., 2002; Azma et al., 2011; Isleten-Hosoglu et al., 2012).

2.5.3 Kültürün büyüme kinetiğinin etkisi

Yağ asitleri kompozisyonu ve miktarı üzerine kültürün büyüme kinetiğinin etkisinin önemli olduğu belirtilmiştir (De Swaaf et al., 1999; Jiang and Chen, 2000; Toron et al., 2002; Widjaja et al., 2009). Fidalgo et al (1998) denizel mikroalg *Isochrysis galbana* ile yaptıkları bir çalışmada, organizmanın nötral lipit miktarında durağan fazın sonlarına doğru artış olduğunu, fakat fosfolipit miktarında azalma olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, maksimum PUFA miktarı durağan fazın başlarında elde edilirken, durağan fazın sonlarına doğru PUFA miktarında azalma saptanmıştır.

2.6 Besinsel ve Çevresel Faktörlerin Etkilerinin Belirlenmesi ve Optimizasyonunda İstatistiksel Deney Tasarımları

Mikroalgler tarafından yüksek verimli ω -3 PUFA üretim prosesinin geliştirilmesinde prosesin verim ve verimliliğini önemli derecede etkileyen besinsel ve çevresel faktörlerin optimizasyonu son derece önemlidir (Wen and Chen, 2001). Bu tür optimizasyon çalışmalarında pek çok farklı yöntem kullanılmakla birlikte, genelde tek bir değişkenin değiştirilip diğer tüm faktörlerin sabit tutulduğu klasik yöntem ve bazı istatistiksel optimizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Klasik yöntemde, söz konusu bağımlı değişken üzerinde parametrelerin etkilerini belirleyebilmek için her defasında bir parametre değiştirilmektedir. Herhangi bir parametrenin etkisini inceleyebilmek için diğer parametreleri sabit tutarken, ilgilenilen parametrenin düşük ve yüksek seviyelerinde denemeler yapılır. Bu şekilde yapılan denemelerde faktörler arasındaki etkileşim (interaksiyon) etkileri kesinlikle belirlenmemektedir.

Ayrıca, çok fazla denemeye ihtiyaç duyulması ve optimum çalışma şartlarını her zaman belirleyememesi; her defasında bir faktörün değiştirildiği klasik yöntemin pratik, ekonomik ve etkinlik açısından uygun olmadığı bilinmektedir. Günümüzde gittikçe artan araştırma giderlerini minimuma indirmek için mümkün olan en az sayıda deneme yapmayı ve klasik yöntemlerin yetersizliğini gidermeyi hedefleyen istatistiksel deney tasarımları geliştirilmiştir (Mandenius and Brundin, 2008; Wang and Wan, 2009).

İstatistiksel deney tasarımında tam faktöriyel tasarım, kısmi faktöriyel tasarım, Taguchi metodu, PB metodu vb. pek çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bir deneyde birden fazla faktörün söz konusu olduğu durumlarda faktöriyel tasarım kullanılmalıdır. Faktöriyel tasarım, her bir faktörün seviyelerinin tüm mümkün kombinasyonlarının denemeye tabi tutulmasıdır. Başka bir ifade ile, tam faktöriyel deney tasarımı en az iki veya daha fazla faktör ve bu faktörlere ait en az iki veya daha fazla seviyelerin bulunduğu deneylerde seviyelerin birbirleri ile etkileşimi ile oluşan kombinasyondur (Montgomery, 2005). Kısmi faktöriyel tasarımlardan PB ve Taguchi gibi yöntemler ise çok sayıda faktörün iki ve daha fazla seviyede etkisinin incelenmesine imkan sağlamaktadır. Deney planında faktörlerin sadece asıl etkileri dikkate alınmaktadır. Böylece, deneme sayısının çokluğu nedeniyle, çok fazla zaman ve araştırma gideri gerektiren ve bu nedenle yapılamayan çalışmaların yapılmasına imkan sağlamaktadır (Chi et al., 2007; Wang and Wan, 2009).

Optimizasyon, prosesin belirlenen hedefler (yanıtlar) doğrultusunda, bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bu bağımsız değişkenlerin yanıt (response) olan etkileri de göz önünde bulundurularak bir araya getirilip uygulanması işlemidir. Optimizasyon proses tasarımlarını verimli hale getirmek (üretimi ve kaliteyi iyileştirmek ve maliyeti minimize etmek) için kullanılmaktadır. Yüzey yanıt yöntemleri (RSM) sahip oldukları avantajlardan dolayı son yıllarda birçok mühendislik ve uygulamalı bilim dalında sıklıkla ve başarılı bir biçimde kullanılmaktadır. En önemli avantajları; kolay optimizasyon imkanı, az sayıda deneysel veri ile maksimum bilgiye ulaşılması, etkin parametreleri eş zamanlı olarak değiştirebilme imkanı, parametreler arasındaki etkileşimin belirlenebilmesi ve önemsiz parametrelerin çıkarılması olarak sıralanabilir (Elibol, 2004; Turan ve Altındoğan, 2011). Yüzey yanıt yöntemleri genel olarak 3 aşamadan (eleme denemeleri, bölge araştırması ve işlemin veya ürünün optimizasyonu) oluşmaktadır. Eleme denemeleri, daha az sayıda ve daha verimli esas deneme yapılmasına olanak sağlamaktadır. İkinci aşama olan bölge

araştırmasında amaç, eleme denemeleri ile belirlenen bağımsız değişkenlerin sistemin yanıtında oluşturdukları değerlerin, optimum noktaya yakın sonuçlar verip vermediğini belirlemektir. Yüzey yanıt yönteminin üçüncü aşaması, işlem optimum noktaya yaklaşıldığında başlamaktadır. Gerçek yanıt fonksiyonu optimum nokta etrafında önemli bir eğrilik göstermektedir. Bu eğriliğin tahminlenmesinde lineer olmayan modeller, genellikle ikinci dereceden polinomial modeller, üssel modeller veya eksponensiyel modeller kullanılır. Uygun bir model elde edildikten sonra, bu model optimum noktanın araştırılmasında kullanılır (Koç ve Ertekin-Kaymak, 2009).

N. laevis ile EPA üretiminde faktöriyel deney tasarımlarından Plackett-Burman kullanılarak besinsel ve çevresel faktörlerin organizmanın büyüme ve EPA üretimine etkileri taranmıştır (Wen and Chen, 2001). Bu tarama sonuçlarına göre, büyüme ve EPA üretimi üzerine NaCl ve CaCl₂ konsantrasyonlarıyla pH ve sıcaklığın etkilerinin önemli olduğu saptanmıştır. Etkileri önemli olan bu faktörlerin, sonrasında yüzey yanıt yöntemlerinden merkezi tümleşik tasarım (central composite design, CCD) metodu ile optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. İstatistiki değerlendirmeler sonucu elde edilen optimizasyon sonuçları tekrarlanarak bulunan sonuçların doğrulaması yapılmıştır. Tamamlanan bu optimizasyon çalışmaları sonucunda *N. laevis* ile 280 mg/l EPA ve 28 mg/l.d EPA verimlikleri elde edilmiştir.

2.7 Heterotrofik Mikroalglerin Büyük Ölçekte Üretimi İçin Kullanılan İşletim Sistemleri

2.7.1 Kesikli işletim sistemi

Bu tür üretim sistemlerinde, üretim ortamında olması gereken tüm besin elementleri reaktör içersine konularak mikrobiyal ekim yapılır. Reaktör, içerisinde istenilen oranda ürün oluşuncaya kadar uygun koşullarda işletilmeye devam eder. Üretim sonunda karışım, reaktörden çıkarılarak istenilen ürünler ayrılır ve saflaştırılır. Bu sırada reaktör temizlenerek yeni bir işlem için kullanılmaya hazır hale getirilir (Doran, 1995). Heterotrofik mikroalglerin yetiştiriciliğinde genel olarak kullanılan işletim sistemidir (Sobczuk et al., 2006; Xu et al., 2006; Isleten-Hosoglu et al., 2012)

2.7.2 Kesikli beslemeli işletim sistemleri

Kesikli beslemeli üretim sistemleri fermentasyon sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu kültür stratejisi ile inhibisyona neden olan veya sınırlayıcı besin elementleri kontrol edilerek yüksek hücre yoğunlukları elde edilmektedir. *N. laevis* tarafından üretilen EPA miktarını arttırmak amacıyla kesikli beslemeli üretim prosesi geliştirilmiştir (Wen et al., 2002). Ortamda bulunan besinsel bileşenler arasında glikoz, nitrat, tripton ve maya ekstraktı sınırlayıcı substratlar olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla bu 4 besin elementi kesikli beslemeli stoğunda belirlenen optimum konsantrasyonda (glikoz:nitrat:tripton:maye ekstraktı; 32:1:2,58:1,29) konulmuştur. Ortamdaki glikoz konsantrasyonu takip edilerek besleme kültür ortamına ilave edilmiştir. Kesikli beslemeli üretim stratejisi sonunda 22,1 g/l kuru hücre ağırlığına ve 695 mg/l EPA verimine ulaşıldığı belirtilmiştir.

Kesikli beslemeli sistemler substrat limitasyonunu elimine edebilse de, üretim boyunca hücreler tarafından üretilen toksik metabolitlerin inhibisyonu bu sistemle engellenememektedir. Hücre yoğunluğu maksimum seviyeye çıktığında önemli miktarda toksik metabolitlerin birikimi ve olabilmekte bu da hücrelerin büyümesini engellemektedir. Dolayısıyla daha etkili kültür stratejilerinin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Wen and Chen, 2003).

2.7.3 Sürekli işletim sistemleri

Sürekli üretim sistemleri, kesikli ve kesikli beslemeli sistemlere göre genelde daha yüksek ürün verimliliklerine sahip olmaktadır. Ayrıca sürekli üretim sistemlerinde, spesifik büyüme hızı, hücre yoğunluğu ve verimlilik gibi kinetik parametreler yatışkın durumda sabitlenmeye çalışıldığı için, organizmanın temel fizyolojik davranışları üzerine de araştırma yapmayı mümkün kılmaktadır (Wen and Chen, 2003).

Hücresel fizyoloji ve EPA verimliliğini arttırmak amacıyla, farklı seyrelme hızı (D) ve farklı glikoz besleme konsantrasyonlarında *N. laevis* sürekli işletim sistemlerinde üretilmiştir (Wen and Chen, 2002). Başlangıç glikoz konsantrasyonunun 20 g/l olduğu sistemde farklı seyrelme hızlarında (0,1-1 1/g); bunun yanısıra sabit seyrelme hızında (D=0,31 1/g) farklı glikoz konsantrasyonlarında (5-35 g/l) kurulan sürekli üretim sistemlerinde, yatışkın durumdaki kuru hücre ağırlığı, kalan glikoz konsantrasyonu, hücre büyüme

verimi, spesifik glikoz tüketim hızı ve yağ asidi profilleri incelenmiştir. Sonuç olarak en yüksek EPA verimliliği (73 mg/l.gün) seyrelme hızının 0,5 l/gün ve glikoz besleme konsantrasyonunun 20 g/l olduğu durumda elde edilmiştir.

2.8 Mikroalglerin Heterotrofik Yetiştirilmesinde Besin Metabolizması

Mikroalgler de dahil olmak üzere tüm organizmalar solunum için aynı metabolik yolu kullanırlar. Mikroalglerin metabolizması çok küçük değişikliklerle yüksek bitkilerinkine benzemektedir. Fakat belirli herhangi bir mikroalg tarafından hangi spesifik substratların kullanılabileceğini veya tercih edileceğini kesin olarak tahmin etmek mümkün değildir. Solunum boyunca O_2 tüketilerek CO_2 üretilir. Herhangi bir substrat için solunum hızı büyüme ve hücre bölünmesine bağlıdır. Karanlık solunum hızı (mol O_2 /mol karbon.gün) büyüme hızıyla artmaktadır. İdeal koşullarda, solunum hızı büyüme hızının %20-30'u kadardır. Mikroalglerde, organik besin elementlerinin karanlık solunumu 0,01-0,6 l/gün değişen hızlara sahiptir. Mikroalglerde karanlık solunum iki önemli rol oynamaktadır: (a) karanlık koşullarda organizmanın bakım ve biyosentez aktiviteleri için enerji kaynağıdır. (b) herhangi bir büyüme altında biyosentez için gerekli karbon iskeletini sağlamaktadır. Solunumun fizyolojik düzenlemesinin, solunum metabolizması ürünlerine (ATP, NADH gibi) ve organik besinlerden sağlanan karbon iskeletine duyulan ihtiyaca göre kontrol edildiği düşünülmektedir. Heterotrofik büyüme koşulları altında, solunum hızı, biyokütle sentezinin teorik minimum maliyetine eşit olmakta veya onu aşmaktadır. *Chlorella* türleri ve diatomlar için karbon atomu başına oluşan CO_2 'in biyokütle katılım oranı (CO_2/C) 0,4-1,4 arasında değişmektedir. Bu da göstermektedir ki, heterotrofik koşullardaki biyokütle sentezi neredeyse maksimum teorik verimliliğe yakın olmaktadır. Çünkü fototrofik büyüme için CO_2/C oranı heterotrofik büyümeden çok daha düşüktür (Perez-Garcia et al., 2011b).

2.8.1 Karbon metabolizması

Glikoz, heterotrofik mikroalgal kültürlemede en çok kullanılan karbon kaynağıdır. Kültür ortamında, şeker, şeker alkolleri, organik asitlere nazaran glikoz kullanıldığında çok daha yüksek büyüme ve solunum hızları elde edilmektedir (Azma et al., 2010; Heredia-Arroyo et al., 2010; Isleten-Hosoglu et al., 2012). Çünkü glikoz diğer karbon kaynakları ile karşılaştırıldığında mol başına daha yüksek enerji içermektedir. Örneğin asetat ile karşılaştırıldığında (~ 0,8 kJ/mol) glikoz ~2,8 kJ/mol enerji üretmektedir (Boyle and Morgan, 2009).

Glikozun oksidatif asimilasyonu, glikozun glikoz 6-fosfata fosforilasyonu ile başlar (Şekil 2.8). Mikroorganizmalar aerobik glikoliz (glikozun yıkımı) için pek çok metabolik yol kullanmaktadırlar. Fakat, mikroalgler tarafından Embden-Meyerhof (EM) metabolik yolu ve Pentoz-Fosfat (PP) metabolik yolunun kullanıldığı bilinmektedir. Glikozun katabolizması sonucu açığa çıkan enerji yetersiz olduğu için mikroalgler, anaerobik koşullarda glikozu metabolize edemezler. Ayrıca, mikroalglerde anaerobik fermentasyon prosesinin tamamlanması için gerekli olan laktat-dehidrogenaz enzimi çok düşük seviyelerdedir. Mikroalg tarafından alınan glikozun ancak %1'i serbest glikoz olarak kalabilmektedir. Glikozun %85'den fazlası asimile edilir ve oligo- (çoğunlukla sükröz, ~ %50) ve polisakkaritlere (çoğunlukla nişasta, ~%30) dönüştürülür (Perez-Garcia et al., 2011b). Mikroalglerin fototrofik glikoz veya diğer karbohidrat olmayan organik besin elementlerinin metabolizmasından farklı olarak, heterotrofik büyümedeki glikoz metabolizmasındaki en göze çarpan farklılık, glikozun çoğunlukla PP metabolik yoluyla metabolize olmasıdır. EM metabolik yolu ise, hücrelerin ışık varlığındaki esas glikolitik yolu olmaktadır (Yang et al., 2000). Her iki metabolik olay da sitozolde gerçekleşmektedir. Fakat, ortamdaki ışık ve glikoz miktarına bağlı olarak PP metabolik yolu daha yüksek akış hızına sahiptir. Karanlık koşullarda ve karbon kaynağı olarak glikozun bulunduğu ortamda, *Chlorella pyrenoidosa*'daki PP metabolik yolu glikoz 6 – fosfat dehidrogenazla olan glikoz metabolik akış dağılımının %90'ından sorumlu olmaktadır (Yang et al., 2000). Bir siyanobakteri olan *Synechocytis* spp.'nin heterotrofik kültüründe glikoz 6-fosfat dehidrogenaz (EC: 1.1.1.49) ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (EC: 1.1.1.44) yoluyla gerçekleşen PP metabolik yolu glikoz katabolizmasının başlıca yolu olmaktadır. EM metabolik yolu ise tamamıyla aşağıya doğru kaymaz. Sadece, glikoz 6-fosfat izomeraz (EC: 5.3.1.9), 6-fosfofruktokinaz (EC: 2.7.1.11) ve fruktoz-bifosfat aldolaz (EC:4.1.2.13) glikoz asimilasyonunda etkili olmaktadır. Bu metabolik yolun diğer reaksiyonları ise fototrofik büyümedeki gibi aktif kalmaktadır (Perez-Garcia et al., 2011b).

Trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ve mitokondrial oksidatif fosforilasyon döngülerinin ışıklı ortamdayken bile *C. pyrenoidosa*'da yüksek aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Bu da bazı mikroalg türleri için ışığın, bu metabolik yollarda etkisinin çok az olduğunu göstermektedir (Yang et al., 2000). Bununla birlikte, ışık varlığında PP döngüsünde akış çok düşük seviyelerde kalmaktadır (Yang et al., 2000).

(Schmidt et al., 2005; Azma et al., 2011; Isleten-Hosoglu et al., 2012). Dolayısıyla mikroalgler için optimum bir glikoz konsantrasyonu söylemek oldukça zordur. Mikroalgal tür ana faktör olmakla birlikte yetiştirme ortamındaki diğer besin elementleri ve çevresel pek çok faktör bunun üzerinde etkili olmaktadır (Jiang and Chen 2000b; Wu et al., 2005; Azma et al., 2011). Fakat genel olarak, glikozun mikroalgler tarafından en çok tercih edilen karbon kaynağı olduğu söylenebilir.

Mikroalglerdeki glikoz metabolizmasının basitliğine rağmen, pek çok mikroalgin yetiştiriciliğinde gliserolün kullanılması da söz konusudur. Genellikle de bu türlerin pek çoğu doğal olarak deniz gibi, osmolaritenin yüksek olduğu yerlerde yaşamaktadırlar. Gliserol, çözeltinin osmotik dayanımını artırıcı etkiye sahip olup, hücre içerisindeki osmotik dengeyi sağlar. Gliserol, enerji ve karbon ihtiyacı yönünden ekonomik bir karbon kaynağıdır. Enzimler ve membranlarla uyum içindedir ve yüksek konsantrasyonlarda bile toksik etkisi bulunmamaktadır (Chi et al., 2007; Perez-Garcia et al., 2011b). Gliserol yağların hidroliz ürünüdür ve mikroalgler gliserolipid metabolizmasının bir parçası olarak gliserol üretebilmektedir. Gliserol, mikroalglerin büyüme hızını arttırabilmekte, fotosentetik sistemdeki biyokimyasal ve yapısal değişiklikleri indükleyebilmektedir (Perez-Garcia et al., 2011b).

Bitki hücrelerinde gliserol hücreye basit difüzyon ile girmektedir. Hücre içinde gliserol osmoregulator molekül olarak kullanılır. Gliserolün öncelikle ATP kullanılarak fosforilasyonu gerçekleşir ve gliserofosfat'ın trioz fosfata yıkımı gerçekleşir. Bitki hücreleri gliserolü, TCA döngüsüne girecek olan piruvatı oluşturmak üzere EM döngüsünün ara ürünleri olan gliseraldehit-3-fosfat ve gliserat'a dönüştürecek olan gliserol kinaz (EC: 2.7.1.30), sn-gliserol-3-fosfat NAD⁺ oksidoreduktaz (EC: 1.1.1.8) ve trioz-fosfat (EC:5.3.1.1) enzimlerine sahiptir. Gliseraldehit 3-fosfat, fotosentezin Calvin-Benson döngüsünün ara ürünü olan 3-fosfogliseratın indirgenmesi ile de oluşabilmektedir. sn-gliserol 3-fosfat, glukojenesis döngüsünde olduğu gibi glikolitik döngünün tersinir olmasını engeller. Gliserol tek karbon kaynağı olması durumunda, PP döngüsünün inhibe olduğu araştırmacılar tarafından saptanmıştır (Perez-Garcia et al., 2011b).

Gliserol ve ışık, bazı mikroalglerin kültürasyonunda çok önemli sonuçlar oluşturacak şekilde kullanılmaktadır. Örneğin *Phaeodactylum tricornutum* 0,1 M gliserol ve 165 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kültür ortamında fototrofik koşullara göre %74 daha fazla bir büyüme göstermiştir (Ceron-Garcia et al., 2000). Sonuç olarak,

gliserol heterotrofik sistemlerde substrat olarak kullanılmasına karşın, metabolizması hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Mikroalglerin heterotrofik yetiştiriciliğinde, asetik, sitrik, fumarik, glikolik, laktik, malik, pürivik ve süksinik asit gibi çözünmüş karboksilik asitlerin kullanımı uzun zamandır bilinmektedir. Asetat (veya asetik asit) mikroalgler de dahil olmak üzere mikrobiyal türlerde en çok kullanılan karbon kaynaklarından biridir. Karanlık ve aerobik koşullarda, ökaryotik hücreler asetati monokarboksilik/proton transporter proteini kullanarak alırlar. Asetat asimilasyonunun başladığı mikroalgal hücrenin sitozolünde, koenzim-A'nın asetilasyonu asetil-CoA sentaz tarafından tek molekül ATP'nin kullanılmasıyla gerçekleşir (Bkz. Şekil 2.8). Asetatın (koenzim A tarafından taşınan) genellikle 2 metabolik döngü boyunca yıkımı olmaktadır: (a) asetati, oksaloasetata dönüştüren glioksilat döngüsüdür. Glioksilat döngüsünde izositrat, izositrat liyaz (EC 4.1.3.1) vasıtasıyla süksinat ve glioksilata yıkılır. Daha sonra glioksilat, malat sentaz tarafından katalizlenen bir reaksiyonda malat oluşturmak üzere asetil-CoA ile kondense olur. (b) metabolizmaya karbon iskeleti, ATP ve NADH sağlayan ve mitokondride gerçekleşen TCA döngüsü boyunca olmaktadır (Perez-Garcia et al., 2011b).

Asetati asimile ederek büyüyen mikroalglerin, asetil CoA'nın asetil gruplarının karbon iskeletine etkin bir biçimde birleşmesi için glioksilat döngüsüne sahip oldukları düşünülmektedir. Glioksilat döngüsünde kullanılan izositrat liyaz ve malat sentaz, hücreler, asetat içeren ortama transfer edildiğinde indüklenmektedirler. *Chlorella vulgaris* hücrelerinde izositrat liyazın temel olarak sentezlendiği fakat glioksilat döngüsünün sadece asetat üzerinde büyüme olduğunda fonksiyonel olduğu saptanmıştır (Perez-Garcia et al., 2011b). *Scenedesmus obliquus* hücrelerinde izositrat liyaz aktivitesinin karanlıkta asetat varlığında 24 saatlik büyümeden sonra 4 katına çıktığı saptanmıştır. Heterotrofik koşullarda, izositrat liyaz aktivitesi artan asetat konsantrasyonu ile artmaktadır (Combres et al., 1994). Asetat üzerinde gelişen *C. reinhardtii* hücrelerinde sitozol için NADPH sağlayan oksidatif PP döngüsünün de aktif olduğu bilinmektedir (Boyle and Morgan, 2009). Asetat, yüksek konsantrasyonlarda bazı organizmalar için toksik etkide olabilmektedir. Fakat, kültür içerisindeki miktarı düşük ve kontrol edilebilir olduğunda pek çok mikroalg asetati karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Bu da asetatın hem kolay bulunabilir hem de ucuz olması dolayısıyla endüstriyel ölçekte kullanımını avatajlı hale getirecektir.

2.8.2 Azot metabolizması

Azot, karbondan sonra mikroalgal biyokütleyle katılan bir diğer önemli elementtir. Mikroalglerdeki karbon ve azot metabolizması birbiriyle bağlantılıdır. Çünkü CO₂'in solunumundan (fototrofik büyüme) ve asimile edilen karbon kaynağından (heterotrofik büyüme) sağlanan karbonu, TCA döngüsü ve mitokondrial elektron transport zincirinden sağlanan enerjiyi paylaşırlar. Mikroalglerde azot, büyüme üzerinde genellikle pozitif etkiye, yağ birikimi üzerinde ise negatif etkiye sahiptir. Mikroalgler başta amonyak (NH₄⁺), nitrat (NO₃⁻) ve üre olmak üzere maya ekstraktı, pepton, aminoasitler gibi pek çok azot kaynağını kullanabilme yeteneğindedirler.

Amonyum, mikroalgler tarafından en çok tercih edilen azot kaynağıdır. Hücelere alımında az bir enerjiye ihtiyaç duyulur. Dolayısıyla enerji olarak da verimli bir kaynaktır. Fototrofik ve heterotrofik koşullarda, amonyum, hücre membranından amonyum transporter (AMT) ailesine ait olan bir grup protein yoluyla geçmektedir. Amonyum hücrelerin tüm bölmelerinde bulunmaktadır. Hücre bölmelerindeki amonyum konsantrasyonu, komşu bölmelerdeki amonyum konsantrasyonuna aradaki elektriksel potansiyel ve pH farklılıklarına bağlı olarak değişmektedir. Amonyumun metabolize olamadığı bölmelerde (örneğin vakuollerde) amonyum konsantrasyonu dengedir. Amonyumun metabolize olduğu bölmelerde ise (örneğin sitozol ve plastidlerde) amonyumun yatışkın hal konsantrasyonu tahmin edilen denge değerinden biraz daha düşük olabilmektedir. Amonyum ile gerçekleşen solunum, ortamda amonyum konsantrasyonu ölçülemez konsantrasyona gelene kadar veya hücre içi karbohidrat rezervleri tükenene kadar devam etmektedir. Ortama glikoz eklenmesi amonyum assimilasyonuna devam edilmesini sağlamaktadır (Perez-Garcia et al., 2011b).

Fototrofik veya heterotrofik koşullarda, amonyumun asimilasyon metabolizması glutamin üreten glutamin sentaz (GS; EC 6.3.1.2) ve glutamin ile bir molekül α -ketoglutarattan 2 molekül glutamat üreten glutamat sentaz (GOGAT; EC 1.4.1.14) yoluyla katalizlenmektedir (Bkz. Şekil 2.8). Alternatif olarak amonyumun glutamata dönüşümü glutamat dehidrogenazla (GDH, EC 1.4.1.2) katalizlenen α -ketoglutarat ile de olmaktadır. GS/GOGAT döngüsü amonyum asimilasyonunda öncelikli metabolik döngü olduğu, GDH döngüsünün ise glutamat oluşumunda önemsiz bir rol oynadığı düşünülmektedir. GDH'ın ancak stres koşullarında aktif olduğu düşünülmektedir. Amonyaya yüksek afinitesi olduğu bilinen glutamin sentaz bütün fototrofik organizmalarda hatta

heterotrofik metabolizmada bile önemli bir enzimdir. Bu enzim biyosentez için glutamin sağlamak ve amonyak asimilasyonunda rol oynamaktadır. Amonyumun GS/GOGAT döngüsü veya GDH ile glutamata dönüşmesini takiben, azot, birçoğu oksaloasetat ile transaminasyon yoluyla aspartat oluşturmak üzere diğer aminoasitler arasında dağıtılır. Asparajin sentaz (EC;6.3.5.4) tarafından katalizlenen reaksiyon boyunca, glutaminden bir molekül grubu, bir molekül glutamat ve asparajin oluşturmak üzere aspartata transfer edilir. Glutamin, glutamat, aspartat ve asparajin aminoasitler, nukleotidler, klorofiller, poliaminler gibi organik azotlu bileşiklerin yapı taşlarıdır (Perez-Garcia et al., 2011b).

Heterotrofik büyüme koşulları amonyumun alım hızını ve azot asimilasyonu yapan enzimlerin ekspresyonunu etkilemezken, mikсотrofik koşullar bunu etkileyebilmektedir. Çok çeşitlilikte organik ve inorganik azotlu bileşikleri kullanabilen *Chlorella* spp. ve *Dunaliella* spp. hücrelerinin amonyuma olan tercihleri ortaya konmuştur (Perez-Garcia et al., 2011b).

Nitrat genel olarak bitkilerin büyüme ve metabolizmasında son derece önemli etkiye sahip bir diğer azot kaynağıdır. Nitratı asimile etmek için bitki hücreleri onu membrandan geçirerek amonyağa indirgemektedir. Bu proses son derece fazla enerji, karbon ve proton harcamaktadır. Amonyum tüketilmesiyle görülen pH düşüşünün aksine, nitrat tüketimiyle pH'da artış görülmektedir. Yüksek bitkiler ve mikroalgler üzerinde yapılan çalışmalarda nitratı amonyuma katalizleyen iki enzimin nitrat redüktaz (NR; EC 1.6.6.1-3) ve nitrit redüktaz (NiR; EC 1.7.7.1) olduğunu ortaya koymuşlardır. NR, nitratın nitrite indirgenmesini katalizler. NiR ise nitriti elektron donor olarak ferredoksin kullanarak amonyuma dönüştürür. NR sitoplazmada ve yeşil alglerin pirenooidlerinde bulunmasına karşın, NiR kloroplastik bir enzimdir (Perez-Garcia et al., 2011b).

Çevresel faktörler nitrat asimilasyonunu etkilemektedir. Karanlık koşullar nitrat asimilasyonunda negatif etkiye sahip olabilmektedir. Birçok mikroalg nitratı ışık varlığında, karanlık ortama göre daha çabuk asimile etmektedir. Nitrat ve nitritin fotokimyasal indirgenmesi kloroplastlarda gözlenmektedir. Işık flavoprotein, ferredoksin ve piridin nukleotidleri gibi kofaktörleri indirger ve bunlar nitrat ve nitrit indirgenmesinde elektron verici olarak kullanılırlar (Perez-Garcia et al., 2011b).

Mikroalgler heterotrofik ve fototrofik koşullarda organik azot kaynaklarını kullanabilmektedir. Mikroalglerin organik azot kaynakları üzerindeki büyümeleri suşa, kullanılan azot ve karbon kaynağına göre değişmekle birlikte, nitrat ve amonyum kullanımıyla karşılaştırılabilir büyüme verimleri elde edilmektedir (Shen et al., 2009; Isleten-Hosoglu et al., 2012, 2013). Üre ve glutamin mikroalglerde büyümeyi destekleyen ve en yaygın olarak kullanılan organik azot kaynaklarıdır. Bazı *Chlorella* spp. türleri üreyi tek azot kaynağı olarak kullanabilmektedir. Azot, genellikle hücreye girmeden önce amonyak ve bikarbonata hidrolize olmaktadır. Mikroalglerde üre, üreaz (EC: 3.5.1.5) ve üre amidolaz (üre karboksilaz) (UALse, EC:6.3.4.6) adı verilen 2 enzim ile metabolize olmaktadır. Fakat pek çok *Chlorella* spp. türünde üreaz bulunmamakta ve üre UALse ile metabolize olmaktadır (Perez-Garcia et al., 2011b).

Heterotrofik koşullardaki azot metabolizması üzerine şu ana kadar elde olan bilgilere dayanılarak, pek çok mikroalg türü tarafından tercih edilen azot kaynakları sıralaması amonyum>nitrat>nitrit>üre şeklinde olmaktadır (Perez-Garcia et al., 2011b).

2.9 Heterotrofik Mikroalglerin Kültürasyonunda Endüstriyel Atık ve Yan Ürünlerin Kullanımı

Çok çeşitli endüstriyel atık ve yan ürünlerin mikroalglerin fototrofik üretiminde kullanıldığı bilinmektedir (Mulbry et al., 2008; Orpez et al., 2009; Kong et al., 2010). Biyoyakıt hammaddesi olarak kullanılan mikroalglerin büyüme ortamının sürdürülebilirliği açısından bu atıklar önemli bir yer teşkil etmektedir (Orpez et al., 2009; Chinnasamy et al., 2010; Pittman et al., 2011). Mikroalgal biyokütle üretimi için sıklıkla kullanılan fototrofik büyüme yerine heterotrofik sistemler biyokütle ve yağ verimliliklerini önemli derecede arttırarak, fototrofik sistemlere göre üretim maliyetlerini azaltmaktadır (Perez-Garcia et al., 2011b). Mikroalglerin heterotrofik olarak atıksu arıtımında kullanılması ve değerlendirilmesine yönelik çok az çalışma bulunmaktadır (Mendes et al., 2007; Perez-Garcia et al., 2010). Endüstriyel atıklardan olan peyniraltı suyu (PAS) yüksek kimyasal oksijen ihtiyacı nedeniyle çok kuvvetli bir atık su olarak bilinmektedir. Dünyada yıllık PAS'ın, atık olarak üretimi gittikçe artmakta, bu atığın biyoteknolojik yollarla değerlendirilmesine yönelik pek çok araştırma yapılmaktadır (Pesta et al., 2007; Azbar et al., 2009). Mısır ıslatma şurubu ise mısır endüstrisinden, mısır ıslatma sırasında açığa çıkan atıksuyudur. Hayvan yemi veya başka amaçlarla kullanılmak üzere yoğunlaştırılır. Pek çok esansiyel

besin maddesini içerdiği için fermentasyon proseslerinde de kullanım olanakları sıklıkla araştırılmaktadır (Liggett and Koffler, 1948; Maddipati et al., 2011). Bu sebeple, endüstriyel ve tarımsal atıkların heterotrofik mikroalglerin üretiminde substrat olarak değerlendirilmesi büyük ölçekte çok büyük faydalar sağlayacağı düşünülmektedir.

2.10 Ölçek Büyütme

Ölçek büyütme, laboratuardan endüstriye aktarımdaki en büyük basamaktır. Ölçek büyüdükçe, hücreler için aynı mikroçevrenin sürdürülebilirliğini sağlamak son derece önemlidir. Amaç, küçük çapta elde edilen verimin, ölçek büyüdüğünde de maksimum düzeyde elde edilmesidir. Her prosese uygulanabilecek genel amaçlı bir kılavuz bulunmamaktadır. Bu da, 3-fazlı biyoreaktör sistemlerinin karmaşıklığından ve türbülent akış rejimindeki akışkanın bilinmeyen davranışlarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, hücrelerin çevreyle etkileşiminin nasıl olacağı da bilinmemektedir.

Ölçek büyütmeyle çalışma hacmi, besleme hacmi, karıştırıcı ve havalandırma hızı değişmektedir. Zaman uzunluğu açısından bakıldığında, karıştırma için karakteristik zaman, sirkülasyon ve kütle transferi büyük ölçek reaktörlerde artar. Fakat, oksijen alımı için karakteristik zaman ve diğer biyolojik reaksiyonlar sabit kalır. Dolayısıyla, karıştırma ve kütle transferi büyük ölçeğe geçerken ele alınması gereken en önemli adımlardır. Aşağıda ölçek büyütme için ele alınan ampirik ve yarı-ampirik yaklaşımlar görülmektedir (Nielsen et al., 2003).

(i) Geometrik benzerlik: Küçük ölçekteki karıştırma rejimini kopyalamak için, biyoreaktörlerde genellikle benzerliğe dayanan ölçek büyütme gerçekleştirilir. Önemli geometrik parametreler; sıvı yüksekliğinin tank çapına oranı (H/T), karıştırıcı çapının tank çapına oranı (D/T), karıştırıcı açıklığının tank çapına oranı (C/T)'dir. Boy oranı aralığı (H/T) 1:1-3:1 arasındadır. Masaüstü biyoreaktörler için bu oran 1:1-1,5:1 arasındadır. Büyük ölçek biyoreaktörlerde ise 2:1 veya daha fazla olmaktadır. Ayrıca, yüksek D/T enerji verimliliği açısından ticari üretimlerde avantaj sağlar. Daha büyük karıştırıcıların kullanılmasıyla, gaz tutma kapasitesi ve gaz dağılımı artırılmış olur. Diğer taraftan, ölçek büyütmede reaktör yüksekliği kaçınılmaz bir şekilde artar. Dolayısıyla, karıştırıcı sayısını da arttırmak gerekmektedir. Bu da, reaktör içerisindeki sıvının bölmelere ayrılması ve dolayısıyla karıştırmanın verimsiz

olması gibi sonuçlar doğurur (Junker, 2004). Farklı karıştırıcı tipleri örneğin Rushton ve marin tip karıştırıcılar büyük ölçek biyoreaktör üretimlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Mikroalglerle biyoreaktör düzeyinde yapılan çalışmalar incelendiğinde, genellikle 4 ve 6 bıçaklı Rushton tipi karıştırıcı kullanıldığı saptanmıştır (Sobczuk et al., 2006; Li et al., 2007; Pleissner and Eriksen, 2012).

(ii) Eşit hacimsel oksijen transfer katsayısı, k_{La} : Literatürde kütle aktarım katsayısı için verilen bağıntılar genellikle O_2 aktarımı için elde edilmiştir. Aerobik proseslerde gaz-sıvı kütle transferi yani oksijenin gaz halden sıvıya aktarımı son derece önemlidir. Oksijenin sulu çözeltilerde çözünürlüğünün düşük olmasından dolayı proseslerde anahtar substratlardan biridir (Türker, 2005). Oksijen transfer katsayısının (k_{La} ; k_L , sıvı-kütle aktarım katsayısı ve a , kütle aktarımı için toplam spesifik yüzey alanı) hesaplanmasında birim hacim başına sisteme verilen enerji (P/V) ve yüzeysel (superficial) gaz hızına (U_s) dayanan pek çok ampirik korelasyonlar bulunmaktadır. k_{La} , biyoreaktörlerin ölçek büyütme tasarımlarında kullanılan en önemli parametrelerden birisidir. Üretimler boyunca oksijen probu ile çözülmüş oksijen miktarı ($DO, \%$) izlenerek ve havalandırma belli noktalarda kesilerek oksijen tüketim hızı (OUR) ve oksijen transfer hızları (OTR) hesaplanabilmektedir. OUR üretim proseslerinin optimizasyonu ve kültürün gelişimi için temel fizyolojik karakteristiklerindedir. OUR hava girişi kesildikten sonra zamana karşı çizilen çözülmüş oksijen konsantrasyonu grafiğinin eğiminden elde edilmektedir. O anda ortamda bulunan biyokütle konsantrasyonunun bilinmesi de önemlidir. Havalandırmanın kesildiği noktadaki hücre yoğunluğu, havalandırmanın kesilme süresi ve çözülmüş oksijen miktarındaki değişim kullanılarak spesifik oksijen tüketim hızı (q_{O_2}) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmaktadır. Oksijen tüketimini hesaplamak için kullanılan bu metot dinamik metot olarak adlandırılmaktadır (Bailey and Ollis, 1986).

$$\frac{dc}{dt} = q_{O_2} C_x = OUR \quad \text{Denklem 1}$$

Havalandırma tekrar açıldığında, çözülmüş OTR ile oksijen konsantrasyonu sabit bir yere ulaşana kadar artmakta ve tahmini OUR değeri kullanılarak çözülmüş oksijen konsantrasyonu hesaplanmasından k_{La} belirlenebilmektedir (Bailey and Ollis, 1986).

$$OTR = k_{La} (C_L^* - C_L) \quad \text{Denklem 2}$$

Mikroalg hücrelerinde, büyük ölçek üretimlerde özellikle $k_L a$ üzerine sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır (Da Silva et al., 2006; Sobczuk et al., 2006).

(iii) Eşit karıştırıcı ucu hızı: Karıştırmalı tank reaktörlerde karıştırıcı tarafından yaratılan kayma kuvvetine karşı mikroalg hücrelerinin hassasiyeti konusunda yapılan araştırmalar bulunmaktadır (Da Silva et al., 2006; Sobczuk et al., 2006). Diğer taraftan, homojeniteyi sağlamak için de yeterli ve etkin karıştırmanın yapılması gerekmektedir. Bu yüzden karıştırıcı ucu hızı (U_T) ölçek büyütme kriteri olarak seçilebilmektedir. Karıştırmalı tank biyoreaktörde fototrofik olarak gerçekleştirilen bir üretim süresince yapılan ölçümler sonucunda, *Phaeodactylum tricornutum* için karıştırıcı ucu hızının 1,56 m/s'den büyük olduğunda hücrelere zarar verdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan, *P. tricornutum* için karıştırıcı ucu hızı eşik değerinin ise 2,45-2,89 m/s arasında olduğu ortaya konmuştur (Sobczuk et al., 2006).

(iv) Eşit enerji dağılım hızı (EDR): Enerji dağılım hızı, ölçek büyütmede tavsiye edilen bir diğer kriter olmaktadır. Karıştırmalı reaktörlerin tasarımında en önemli parametre karıştırıcıları çevirmek için gerekli güç miktarıdır. Gerekli güç kuramsal olarak hesaplanamadığından ampirik bağıntılar kullanılarak hesaplanabilmektedir. Karıştırma için gerekli güç pek çok faktöre dayanmaktadır. En önemlileri karıştırma hızı, N_i , karıştırıcı çapı, d_i , sıvının yoğunluğu, ρ_L , sıvının viskozitesi, η' 'dir. Boyut analizi yapıldığında, bu faktörleri boyutsuz bir sayıda bir araya getirmek mümkün olabilmektedir (Türker, 2005).

3. MATERYAL VE METOT


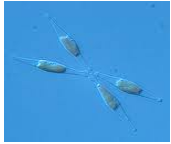
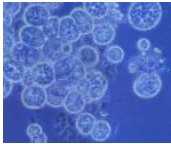
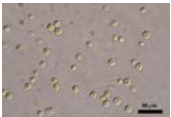
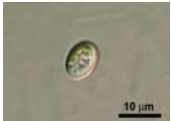
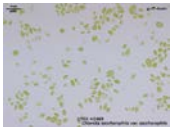
Tez çalışmasında kullanılan mikroalg kültürleri, kimyasal malzemeler, yararlanılan cihazlar ve araştırma metotları bu bölümde açıklanmıştır.

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroalgal hücre kültürleri

Çalışmada kullanılan mikroalgal hücre kültürleri ve temin edildikleri kültür koleksiyonları Çizelge 3.1’de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan mikroalg kültürleri

Kültür ismi	Kültür koleksiyonu	Görünüm
<i>Tetraselmis suecica</i> CCMP906	The Provasoli-Guillard National Center for Culture Collection of Marine Phytoplankton, Amerika	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP630	The Provasoli-Guillard National Center for Culture Collection of Marine Phytoplankton, Amerika	
<i>Cryptocodinium cohnii</i> CCMP316	The Provasoli-Guillard National Center for Culture Collection of Marine Phytoplankton, Amerika	
<i>Chlorella minutissima</i> UTEX2341	University of Texas, Austin, Amerika	
<i>Monodus subterraneus</i> UTEX151	University of Texas, Austin, Amerika	
<i>Chlorella sacharophila</i> UTEX 247	University of Texas, Austin, Amerika	

3.1.2 Kullanılan kimyasal malzemeler

Çalışma boyunca kullanılan kimyasal malzemeler ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.2’de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

İsim	Marka
Bakteriyolojik pepton	Oxoid, İngiltere
Gliserol	Merck, Almanya
Maya ekstraktı	Merck, Almanya
Deniz tuzu	Tropic Marine, Almanya
L-glutamik asit potasyum tuzu monohidrat	Sigma-Aldrich, Amerika
D-glikoz	Merck, Almanya
NH ₄ Cl	Merck, Almanya
Hegzan	Merck, Almanya
Kloroform	Merck, Almanya
Methanol	Merck, Almanya
β-gliserofosfat disodyum tuz pentahidrat	Sigma, Amerika
Thiamine HCl (vit. B ₁)	Applichem, Almanya
Biotin (vit. H)	Applichem, Almanya
FeCl ₃ 6H ₂ O	Merck, Almanya
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	Merck, Almanya
NaNO ₃	Merck, Almanya
H ₃ BO ₃	Merck, Almanya
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck, Almanya
Asetik asit	Merck, Almanya
Etanol	Merck, Almanya
Isopropanol	Merck, Almanya
Triolein (C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆)	Sigma-Aldrich, Amerika

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler (devamı)

Nil kırmızı	N3013, Sigma-Aldrich, Amerika
GC kolonu	Supelco sp-2380 A capillary column (60 m × 250 µm × 0.2 µm)
HPLC kolonu	Phenomenex Rezex RHM Monosaccharide (H+) (300 × 7.8 mm)

3.1.3 Kullanılan cihazlar

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Firma-Model
Spektrofotometre	Amersham Ultrospec 1100pro UV/Visible spectrophotometer, ABD
Cam fiber filtre düzeneği	Glass-microfiber discs, Sartorius, Almanya
Terazi	Radwag AS 220/C/2
Manyetik karıştırma	Biosan MSH300, Letonya
Liyofilizatör	Christ, Alpha 1-2 LD plus, Germany
Rotary evaporatör	Stuart, RE300, UK
Yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC)	Thermo Scientific Finnigan Surveyor RI plus detector
Gaz kromatografisi (GC)	Agilent 7890, ABD
Laminer akışlı kabin (Class II)	NuAir NU 425-400E
Santrifüj	Universal Hettich Rotofix 32
Santrifüj	Universal Hettich 3R
Sonikatör	Bandelin, Almanya
Biyoreaktör (2 L)	Biostat B-plus®, Sartorius Stedim, Almanya
Biyoreaktör (5 L)	Biostat B-plus®, Sartorius Stedim, Almanya
Biyoreaktör (30 L)	Infors
Mikroskop	Olympus CH40
Çalkalamalı İnkubatör	Ika KS 4000
Çalkalamalı İnkubatör	ZHWY-2102, ZHICHENG, Çin

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan cihazlar (devamı)

Çalkalamalı İnkubatör	Thermoshake, Gerhardt
Su banyosu	Memmert, Almanya
Floresans spektrofotometre	Varian, Cary Eclipse, Australia
pH probu	Hamilton Easyferm K8 200, Bonaduz, Switzerland
Oksijen probu	Hamilton Oxyferm FDA 225, Bonaduz, Switzerland
Etüv	Memmert, Almanya
pH metre	Hanna HI 2211, Amerika
Çanaklı santrijüj	GEA, Almanya
Peristaltik pompa	Watson Marlow 2058, Amerika
Floresans mikroskop	Leica DM IL, Almanya
Buhar jeneratörü	Akkaya Blowtherm, Türkiye

3.1.4 Üretim ortamları

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan mikroalglerin üretim ortamları

Besiyeri	İçerik
f/2 ortamı	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1.06×10^{-4} M); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3.62×10^{-5} M); NaNO_3 (8.82×10^{-4} M) İz metal stok çözeltisi [M] (1ml/l) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 1.17×10^{-5} $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1.17×10^{-5} $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 3.93×10^{-8} $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 2.60×10^{-8} $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 7.65×10^{-8} $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 4.20×10^{-8} $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 9.10×10^{-7} Vitamin stok çözeltisi [M] (1 ml/l) thiamine HCl (vit. B ₁): 2.96×10^{-7} biotin (vit. H): 2.05×10^{-9} ; cyanocobalamin (vit. B ₁₂): 3.69×10^{-10}
Zenginleştirilmiş Deniz Suyu Ortamı (ESW)	Yapay deniz tuzu (30g/l); Zenginleştirme ortamı (20 ml/l) Zenginleştirme ortamı içeriği: NaNO_3 (2,35 g/l); $\text{Na}_2\text{glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,35 g/l); HEPES buffer (3,25 g/l); ES Fe çözeltisi (162,5 ml/l); $[(\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ (0,7 g/l); $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,6 g/l)]; P-II metal çözeltisi (162,5 ml/l); $[\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/100ml); H_3BO_3 (0,114 g/100 ml); $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4,9 mg/100 ml); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (16,4 mg/100 ml); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,2 mg/100ml); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,48 mg/100 ml)]; Vitamin B12 (1,5 ml/l); [HEPES buffer pH 7.8 (1,2 g/100ml); Vitamin B ₁₂ (0,013g/100 ml)]; Biotin vitamin çözeltisi (1,5 ml/l); [Biotin (0,0025g/100ml); HEPES buffer pH 7.8 (1,2 g/100ml)]; Tiamin vitamin çözeltisi (1,5 ml/l);

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan mikroalglerin üretim ortamları (devamı)

Bold basal ortamı	NaNO ₃ (2,94*10 ⁻³ M); CaCl ₂ .2H ₂ O (1,7*10 ⁻⁴ M); MgSO ₄ .7H ₂ O (3,04*10 ⁻⁴ M); K ₂ HPO ₄ (4,31*10 ⁻⁴ M); KH ₂ PO ₄ (1,29*10 ⁻³ M); NaCl (4,28*10 ⁻⁴ M); Alkali EDTA çözeltisi (1ml/l) [EDTA, 4,28*10 ⁻⁴ M; KOH, 1,38*10 ⁻³ M]; Asidik demir çözeltisi (1ml/l) [FeSO ₄ .7H ₂ O, 4,48*10 ⁻⁵ M; H ₂ SO ₄ 1ml]; Boron stok çözeltisi (1ml/l)[H ₃ BO ₃ , 4,62*10 ⁻⁴ M], İz metal çözeltisi (1ml/l)[ZnSO ₄ *7H ₂ O, 7,67*10 ⁻⁵ M; MnCl ₂ .4H ₂ O, 1,82*10 ⁻⁵ M; MoO ₃ , 1,23*10 ⁻⁵ M; CuSO ₄ .5H ₂ O, 1,57*10 ⁻⁵ M; Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O, 4,21*10 ⁻⁶ M]
Bristol Ortamı	NaNO ₃ (2,94 mM), CaCl ₂ .2H ₂ O (0,17 mM), MgSO ₄ .7H ₂ O (0,3 mM), K ₂ HPO ₄ (0,43 mM), KH ₂ PO ₄ (1,29 mM), NaCl (0,068 mM)
BG-11 ortamı	NaNO ₃ (17,6 mM); K ₂ HPO ₄ (0,22 mM);), MgSO ₄ .7H ₂ O (0,03 mM);), CaCl ₂ .2H ₂ O (0,2 mM); Sitrik asit. H ₂ O (0,03 mM); amonyum ferik sitrat (0,02 mM); Na ₂ EDTA.2H ₂ O (0,002 mM); Na ₂ CO ₃ (0,18 mM), BG-11 İz metal (1 ml/l); sodyum tiyosülfat pentahidrat (1 mM)
Walne ortamı	İz element stok çözeltisi (TMS stok) (100ml) ZnCl ₂ - 2.1 g; CoCl ₂ .6H ₂ O - 2.0 g; (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O - 0.9 g CuSO ₄ .5H ₂ O - 2.0 g Vitamin çözeltisi (100 ml) Cyanocobalamin - 10.0 mg; Thiamine - 10.0 mg; Biotin - 200.0 µg Besin çözeltisi (1) FeCl ₃ .6H ₂ O - 1.3 g; MnCl ₂ .4H ₂ O - 0.36 g; H ₃ BO ₃ - 33.6 g; EDTA (disodium salt) - 45.0 g; NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O - 20.0 g; NaNO ₃ - 100.0g; TMS stock (1) - 1.0 ml Besin çözeltisi 1ml + vitamin stok 0,1 ml / 1 l deniz suyuna ilave edilir.
ATCC 460 A2E6 kültür ortamı	Yapay deniz tuzu (30 g/l) ; FeCl ₃ . 6H ₂ O (0,01 g/l); Sodium glycerophosphate (0,15 g/l); (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,05 g/l); Tris Buffer (3 g/l); K ₂ HPO ₄ (0,01 g/l); Glutamik asit (1,5 g/l); Glikoz (3 g/l) Vitamin Çözeltisi (1ml/l); Metal karışımı (3ml/l); Metal Karışımı (100 ml için): EDTA (1g); FeCl ₃ . 6H ₂ O (0,05 g); H ₃ BO ₃ (1g); MnCl ₂ . 4H ₂ O (0,15 g); ZnCl ₂ (0.01g); CoCl ₂ . 6H ₂ O (0.005) Vitamin Çözeltisi (1 l için): Biotin (0,003 g); Thiamine (1 g)

3.1.5 Çalışmada kullanılan peyniraltı suyu ve mısır ıslatma şurubu

Bu çalışmada kullanılan peyniraltı suyu (PAS), Pınar Süt Mamülleri Sanayi A.Ş (Işıkkent, İzmir) tesislerinden; mısır ıslatma şurubu (CSL) ise CARGILL Tarım ve Gıda San. Tic. A.Ş'den temin edilmiştir. Her iki endüstriyel atık da kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2 Metot

3.2.1 Mikroalgleri yetiştirme koşulları

3.2.1.1 *Chlorella saccharophila* hücrelerinin kültür koşulları

C. saccharophila (UTEX 247) hücrelerinin aksenik olarak Bristol ortamında (Bkz Çizelge 3.4) devamlılıkları sağlanmıştır. Heterotrofik koşullar için ortama 3 g/l glikoz ilave edilmiş ve stoklar karanlık koşullarda inkube edilmiştir. Stok tüpleri, içerisinde yaklaşık 100 ml Bristol ortamı bulunan 250 ml'lik erlenlere aktarılmıştır. Erlenler karanlıkta, 24 °C'deki rotary karıştırıcıda 120 rpm hızla karıştırılmıştır. İnokulasyon erlenleri, bu erlenlerin eksponansiyel fazdaki hücrelerinden alınarak oluşturulmuştur. Genel olarak kullanılan inokulasyon oranı %10 (v/v) düzeyinde olmuştur. Erlenlerin başlangıç pH'ları 6,5-6,6 olarak ayarlanmıştır. Logaritmik faza gelen hücreler daha sonraki inokulasyonlarda kullanılmıştır. Kültür ortamına konulacak olan organik karbon kaynakları (glikoz, gliserol sodyum asetat gibi) farklı cam şişelerde ayrı ayrı otoklavlanarak daha sonrasında aseptik olarak kültür ortamına ilave edilmiştir.

Fototrofik kültürler Bristol ortamında 1 litrelik cam şişelerde yetiştirilmiştir. Cam şişeler, 0,2 µm'lik hava filtrelerinden geçen steril hava ile karıştırılmışlardır. Azot kaynağı olarak bakteriyolojik pepton (1g/l) kullanılmıştır. Cam şişelerde çalışma hacmi 0,8 litre olup 24 °C'de ve yüzeyde 30 µmol photons/ m² s ışık alacak şekilde inkube edilmişlerdir. Senkronize kültür eldesi için 12:12 karanlık:aydınlık rejim uygulanmıştır.

3.2.1.2 *Cryptocodinium cohnii* hücrelerinin kültür koşulları

C. cohnii (CCMP 316) hücrelerinin aksenik olarak ATCC 460 A2E6 ortamında (Bkz. Çizelge 3.4) devamlılıkları sağlanmıştır. Heterotrofik koşullar için ortama 6 g/l glikoz veya gliserol ilave edilmiş ve stoklar karanlık koşullarda inkube edilmişlerdir. Stok tüpleri, içerisinde yaklaşık 100 ml ATCC 460 A2E6 ortamı bulunan 250 ml'lik erlenlere aktarılmıştır. Erlenler karanlıkta, 24 °C'deki rotary karıştırıcıda 130 rpm hızla karıştırılmıştır. İnokulasyon erlenleri, bu erlenlerin eksponansiyel fazdaki hücrelerinden alınarak oluşturulmuştur. Genel olarak kullanılan inokulasyon oranı %10 (v/v) düzeyinde olmuştur. Erlenlerin başlangıç pH'ları 6,4-6,5 olarak ayarlanmıştır.

3.2.1.3 Diğer mikroalg türleri

Chlorella minutissima hücreleri aksenik olarak Bristol ortamına (Bkz. Çizelge 3.4) proteose peptonun (1g/l) ilave edildiği ortamlarda vidalı kapaklı tüplerde ve 50 ml'lik erlenlerdeki kültür ortamlarında muhafaza edilmişlerdir.

Phaeodactylum tricornutum CCMP630 hücreleri aksenik olarak f/2 ortamında (Bkz. Çizelge 3.4) vidalı kapaklı tüplerde ve 50 ml'lik erlenlerdeki kültür ortamlarında muhafaza edilmişlerdir.

Tetraselmis suecica CCMP 906 hücreleri aksenik olarak f/2+Si ortamında (Bkz. Çizelge 3.4) vidalı kapaklı tüplerde ve 50 ml'lik erlenlerdeki kültür ortamlarında muhafaza edilmişlerdir.

Monodus subterraneus CCMP 906 hücreleri ise aksenik olarak BG-11 kültür ortamında vidalı kapaklı tüplerde ve 50 ml'lik erlenlerde muhafaza edilmişlerdir.

3.2.2 Spektrofotometre ile optik yoğunluk ölçümü

Mikroalglerin absorbans spektrumuna göre belirlenen uygun dalga boylarında optik yoğunluk ölçümleri spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Optik yoğunluk zamana bağlı olarak takip edilerek mikroalglerin hücre konsantrasyonundaki artış takip edilmektedir.

3.2.3 Hücre sayımı ve kuru hücre ağırlığı ölçümü

Kültürlerde hücre sayımı Neubauer sayım kamarası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hareketli hücrelerin fiksasyonu 0,4 mM glutaraldehitte yapılmıştır.

Mikroalglerin hücre konsantrasyonundaki artışı takip etmek için kuru hücre ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Kuru ağırlık ölçümleri filtrasyon ve kurutma olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Öncelikle, belli hacimdeki örnek alınarak cam fiber filtre düzeneğinden süzülmüştür. Daha sonrasında ise, örnek içerisindeki çözünmüş tuzları uzaklaştırmak amacıyla aynı hacimdeki distile su filtredeki örnek üzerinden iki defa geçirilmiştir. Sonrasında ise filtre kağıtları 105 °C'deki etüv de 1,5 saat kurumaya bırakılmıştır. Örnekler sabit tartıma geldiğinde sonuç

alınmış ve litredeki gram hücre konsantrasyonu (g/l) olarak ifade edilmiştir. Ayrıca belli optik yoğunluk ölçümlerine karşın kuru ağırlık ölçümleri yapılarak optik yoğunluğa karşın kuru ağırlık kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir.

3.2.4 Karbon kaynaklarının tüketim eğilimlerinin belirlenmesi

Heterotrofik veya miksotrofik koşullarda büyüyen mikroalglerin farklı karbon kaynaklarını tüketim eğilimlerini belirlemek için bölümümüz Çevre ve Biyoenerji Laboratuvarında bulunan HPLC sistemi (Thermo Scientific Finnigan Surveyor RI plus detector) kullanılmıştır. Başta glikoz olmak üzere mikroalglerin kültüre edilmesinde kullanılan karbon kaynaklarının (gliserol, etanol, ksiloz) belirlenmesi için literatürde bulunan metodlar da gözönüne alınarak mevcut sistemde metod geliştirilmiştir (Azma et al., 2010). Sistemde refraktif indeks detektör (RI) ve Phenomenex marka Rezex RHM Monosaccaride (H+) 300 x 7,8 mm iyon değıştirici türde bir kolon kullanılmıştır. Yürütücü solvent 5 mM'lık H₂SO₄ çözeltisi, akış hızı 0,8 ml/dakika, kolon sıcaklığı 65°C, dedektör sıcaklığı 45°C ve enjeksiyon hacmi 15 µl olacak şekilde metod geliştirilmiş ve kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir (Bkz. Ek 1-6).

3.2.5 Gravimetrik toplam yağ miktarı tayini ve yağ kompozisyonu analizleri

Erlenlerde ve/veya reaktörlerde geliştirilmiş olan mikroalg kültürlerinin 1500 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek ortamdaki ayrılması sağlanmıştır. Santrifüj edilen hücreler 2 kez distile suyla yıkanarak tekrar santrifüj edilmişlerdir. Liyofilizasyon işlemine kadar -20 °C'de saklanmışlardır. Mikroalg hücreleri -52 °C'de 0,030 bar basınç altında 7 saat ve son olarak da -55 °C'de 0,021 bar basınçta 3 saat tutularak liyofilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Liyofilize olmuş hücreler hava almayacak bir şekilde -20 °C'de saklanmışlardır.

Gravimetrik yağ ölçümleri liyofilize kuru hücre üzerinden yapılmıştır. Elde edilen biyokütle miktarına bağlı olarak 0,05-0,1g arasında kuru hücre tartılıp modifiye Bligh and Dyer (1959) metoduyla analiz edilmiştir. Buna göre, 0,05-0,1g olarak tartılan liyofilize hücreler 15 ml'lik falkon tüplerine alınarak, üzerine 4 ml kloroform: metanol (2:1,v/v), 0,25 mg/ml nonadekanoik asit ve 0,5 mg/ml buthylated hidroksitoluen (BHT) ilave edilerek 24 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde ekstraksiyona bırakılmıştır. Santrifügasyon işleminden sonra, ekstrakte edilen yağı içeren supernatant fazı alınarak transesterifikasyona kadar 4 °C'de depolanmıştır (de Swaaf et al., 1999). Transesterifikasyondan önce ise,

örneklerdeki toplam yağ miktarını bulmak amacıyla ekstrakte edilen kloroform içerisindeki örnekler darası önceden alınmış evaporatör balonlarına alınarak kloroform fazı uçurulmuştur. Kloroform fazı uçuktan sonra geride kalan miktar tartılarak toplam yağ miktarı kuru ağırlıktaki yüzde (%LC/DW) şeklinde ifade edilmiştir.

Yağ asitlerinin metil esterleri kloroform:hidroklorik asit:methanol (10:1:1) karışımının ilavesiyle 80 °C'de 2 saat tutularak elde edilmiştir. Esterifikasyon sonucunda faz ayrımı su ilavesiyle yapılmış ve metil esterleri hekzan fazıyla geri kazanılmıştır. Hekzan fazına alınan metil esterleri Gaz kromatografisi viallerine alınarak analiz edilinceye kadar 4 °C'de depolanmıştır.

Yağ asidi metil esterleri analizleri, Ege Üniversitesi Deri Mühendisliği Bölümü bünyesinde bulunan ve 2007 DPT001 Projesi ile alınan Gaz Kromatografisinde (GC, Agilent 7890) analiz edilmiştir. Gaz kromatografisinde Supelco sp-2380 A, 60m x 250µm x 0,2 µm kolon ve helyum taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Oluşturulan metoda göre GC koşulları: Taşıyıcı gaz: helyum; inlet basıncı: 27,54; toplam akış: 0,7ml/min; dedektör sıcaklığı 260 °C; fırın sıcaklık programı: başlangıç sıcaklık ve süresi: 100 °C, Ramp: 10 °C/dak 250 °C'ye ulaşılmış ve bu sıcaklıkta 3 dakika beklenmiştir. Örnek hacmi 1 µl olup split oranı 20:1 şeklinde olmuştur. Yağ asitleri miktarı, toplam yağ asitleri içerisinde yüzde (%) olarak verilmiştir. Çalışmada öncelikle 37 adet yağ asidi metil esteri standardının (F.A.M.E Mix C4-C24 (Supelco, USA) optimum ayrımı için çalışılmıştır. Yağ asitleri metil esterlerinin kromatogramları ve toplam yağ asitleri miktarları ChemStation bilgisayar programı ile elde edilmiştir Mikroalglerde çoğunlukla bulunan bazı yağ asitleri elde edilen yağ asitleri metil esterleri standart kromatogramı üzerinde gösterilmiştir (Bkz. Ek 7). Analiz edilen örneklerin kromatogramındaki pikler, standarttaki bütün yağ asitlerinin metil esterlerinin alıkonma zamanları ile karşılaştırılarak teşhis edilmiştir. Sonuçlar toplam yağ içerisindeki % yağ asidi olarak verilmiştir.

3.2.6 Nil kırmızısı kullanarak floresan spektrofotometre ile yağ miktarı tayini

Toplam yağ miktarı tayini için gravimetrik yöntem alternatif olarak floresan spektrofotometre (Şekil 3.1) kullanılarak nil kırmızısı boyasıyla metod geliştirilmiştir.



Şekil 3.1 Toplam yağ ölçümlerinde kullanılan floresan spektrofotometre

Floresan spektrofotometrik yağ tayini için, yağ içerisinde çözünebilen, floresans özelliğe sahip bir boyaya olan Nil kırmızısı (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxa-]phenoxazine-5-one) kullanılmıştır. Nil kırmızısının isopropanolde stok çözeltisi (1 mg/100ml) hazırlanmıştır. Nötral lipid standardı olarak kullanılan triolein ise isopropanol içerisinde 2 mg/ml stok konsantrasyonda hazırlanmıştır. Nil kırmızısı ile boyanan triolein çözeltisi için uygun eksitasyon dalga boyu 500 nm, emisyon dalga boyu ise 575~580 nm olarak belirlenmiştir. Tarama süresince kullanılan koşullar ise şu şekilde olmuştur: eksitasyon slit: 5 nm, emisyon slit: 5 nm, photomultiplier: 400 V.

Spektrorometrik olarak yağ içeriğini belirlemek amacıyla farklı mikroalg hücreleri ile çalışmalara geçilmiştir. Her bir tür kendine özgü hücre duvarı yapısına sahiptir. Bu sebeple, nil kırmızısı boyasının hücre içine penetre olabilmesi için farklı fiziksel ve/veya kimyasal ön işlemlere gerek duyulmaktadır. Çalışılan türler için bu ön işlemler denenmiş ve optimize edilmiştir.

3.2.7 Floresan mikroskop ile hücre içi yağ damlacıklarını görüntüleme

Farklı mikroalg hücrelerinin, yağ içerikleri hakkında fikir sahibi olabilmek için, Biyomühendislik Bölümü Kanser Biyolojisi Laboratuvarında bulunan floresan mikroskobu da (Leica DM IL, Germany) zaman zaman kullanılmıştır. Hareketli olan mikroalg türleri öncelikle glutaraldehit ile fikse edilmiştir. Daha sonra, nil kırmızı ile boyanan hücreler floresan mikroskop ile incelenmiştir. Mikroskopik fotoğraflar Leica DM IL (Germany) mikroskop ile, fotoğraflar ise Leica image software (LAS) kullanılarak 5.5 milyon piksel CCD kamera ile alınmıştır.

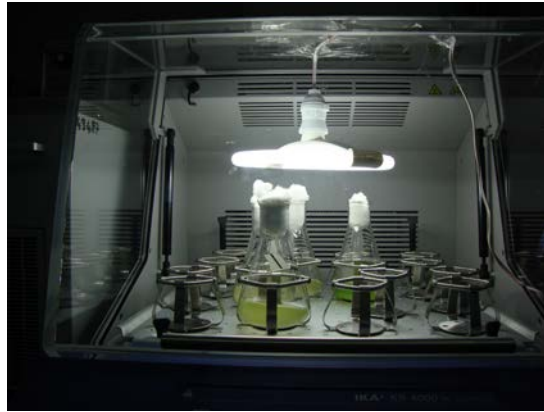
3.2.8 Mikroalgleri heterotrofik veya fotoheterotrofik koşullara adaptasyon ve kùltürasyonu çalışmaları

Mikroalgleri heterotrofik ortamda kùltürasyonu çalışmaları erlenlerde çalkalamalı inkübatörlerde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). İnkübasyon sıcaklıkları ve çalkalama hızları çalışılan mikroalg türüne göre değişiklik göstermiştir.



Şekil 3.2 Karanlık koşulların sağlandığı çalkalamalı inkübatörler

Heterotrofik koşullarda büyümesi yavaş olan türler için ayrıca fotoheterotrofik koşullarda kùltürasyonu çalışmaları da yapılmıştır. Mikroalglerin fotoheterotrofik olarak büyütülmesinde tek fark, ortamda ışık kaynağının kullanılmasıdır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Fotoheterotrofik koşulların sağlandığı çalkalamalı inkübatör

Mikroalglerin farklı ortam ve çevre koşullarında nasıl bir büyüme eğilimi gösterdikleri yapılan denemelerle ortaya konmuştur. Çalışmalar 250 ml'lik erlenlerde, 100 ml çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. Örneklemler laminar akışlı kabin içinde steril koşullar altında yapılmıştır. Erlenlerdeki kùltürlerin

aksenik koşullarının kontrolü günlük olarak mikroskop ile yapılmıştır. Ayrıca, gerek duyuldukça mikrobiyolojik ekim yöntemlerine başvurulmuştur.

Her bir tür için, erlenlerin ilk inokulasyonları fototrofik koşullarda büyüyen stok kültürlerinden yapılmış, devam eden çalışmalarda ise hetetrofik veya fotoheterotrofik koşullara adapte olmuş kültürler kullanılmıştır. Erlenlerde inokulasyon oranları %5-10 arasında değişmekte olup inokulasyonlar logaritmik fazdaki kültürlerden yapılmıştır.

3.2.9 Mikroalglerin fotoheterotrofik ve/veya heterotrofik ortamda çoğaltılıp kültür stoklarının hazırlanması

Çalışmada mikroalglerin heterotrofik veya fotoheterotrofik koşullardaki stok kültürlerinin hazırlanması, kültürlerin devamlılığının sağlanması açısından en önemli aşamalardan birisidir. Aksenik mikroalglerin heterotrofik veya fotoheterotrofik koşullarda büyüme potansiyellerinin araştırılması ve adaptasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra stok kültür hazırlanarak her bir tür uygun olan koşullarda saklanmıştır.

3.2.10 İstatistiksel deney tasarımları

Yapılan araştırmalarda; ülke ekonomisi, kaynak, süre gibi faktörler göz önüne alındığında araştırmanın geniş çerçevede yapılabilmesinin zor olduğu ortaya çıkmıştır. Bu açıdan deney tasarımı zorunlu hale gelmiştir. Deneysel çalışmanın etkin bir şekilde yapılabilmesi için deneyleri planlarken bilimsel yaklaşımın kullanılması da gerekmektedir. Deney tasarımı, sürecin incelenen kalite karakteristiğine etki eden kontrol edilebilir değişkenlerin değerlerini sistematik olarak değiştirerek süreç performansını etkileyecek değişken değerlerini belirlemede kullanılan bir tekniktir (Montgomery, 2005). İstatistiksel deney tasarımı ile, analiz edilebilecek uygun verilerin toplanmasını sağlayacak deneylerin planlanması ve bu deneylerden geçerli sonuçlar çıkarılabilmesi amaçlanmaktadır. Burada asıl amaç, en az sayıda deneyle çok fazla sayıda doğru bilgi elde etmektir.

Farklı mikroalg türleri ile heterotrofik koşullara uyumları açısından yapılan erlen denemeleri sonucunda büyüme ve yağ üretimi açısından en iyi sonuçları veren türler olan *C. saccharophila* ve *C. cohnii* ile kültür ortamının optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu tür optimizasyon çalışmalarında sıklıkla

kullanılan ve yüzey yanıt yöntemleri olarak bilinen Box-Behnken ve CCD istatistiksel metodları kullanılmaktadır (Mandenius and Brundin, 2008). Box-Behnken dizayn, bağımsız değişkenlerin daha az sayıda kombinasyonu ile bağımlı değişkeni etkileme dereceleri daha kolay ve verimli şekilde yorumlanmasına imkan vermektedir (Muthukumar et al., 2003).

Taguchi ve PB deney tasarım yöntemleri ise, farklı parametrelerin, farklı seviyeleri arasından optimum kombinasyonu saptamak amacıyla kullanılan oldukça faydalı yöntemlerdir. *C. cohnii* ile endüstriyel atıkların kullanıldığı kompleks besin ortamlarında organizmanın gelişimi üzerine hangi besin elementlerinin ana etkilerinin önemli olduğunu saptamak amacıyla Taguchi ve PB yaklaşımları kullanılmıştır. CSL içeren kültür ortamında hangi besin elementlerinin *C. cohnii* hücrelerinin gelişimi üzerine etkili olduğunu araştırmak amacıyla Taguchi; PAS içeren kültür ortamında ise hangi besin elementlerinin *C. cohnii* hücrelerinin büyümesi üzerine etkili olduğunu araştırmak amacıyla PB deney tasarımı kullanılmıştır. Tüm bu optimizasyon çalışmaları Design Expert programı (versiyon 7.0.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yapılan denemelerde, istatistiksel optimizasyon metodlarının kullanıldığı denemeler dışındaki analiz sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde varyans analizi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda ise Tukey's post hoc test kullanılmıştır. Söz konusu istatistik analizlerin yapılmasında SPSS for Windows (versiyon 18.0) ve Minitab for Windows (versiyon 13.0) istatistik paket programlarından yararlanılmıştır. Tüm yapılan istatistikler % 99 ($p \leq 0.01$) veya % 95 ($p \leq 0.05$) güven aralıklarına göre yorumlanmıştır.

3.2.11 Kesikli biyoreaktör üretimleri

C. saccharophila ve *C. cohnii* mikroalg kültürleri ile çevresel faktörlerin etkilerinin araştırıldığı denemeler 2 litrelik kesikli biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Biyoreaktörün örnek alma ünitesi, asit, baz ve inokulasyon şişeleri otoklava dayanıklı silikon hortumlar ile biyoreaktöre bağlanmıştır. Bağlantı yerleri otoklavlanabilen tek kullanımlık kelepçeler ile sıkıştırılmış ve sistemin kapalı kalması sağlanmıştır. Biyoreaktörde bir adet Rushton 6 bıçaklı (yassı pervaneli çark) karıştırıcı bulunmaktadır. Biyoreaktörün içine pH probu monte edilmeden önce pH 4 ve pH 7 tampon çözeltileri ile kalibrasyonu yapılmıştır. Sıcaklık sensörü ve O₂ probu monte edildikten sonra ise

reaktör içerisine önce azot gazı ile azot kalibrasyonu, sonrasında ise hava ile O₂ probunun kalibrasyonu tamamlanmıştır. Hava dağıtıcı olarak ring hava dağıtıcı kullanılmıştır ve hava dağıtıcı girişine ve yoğuşturucu çıkışına 0,2 µm gözenek çaplı hava sterilizasyon filtreleri takılmıştır. Biyoreaktör içerisine kültür ortamları konulduktan sonra 121 °C sıcaklıkta 30 dakika sterilizasyon yapılmıştır. Sterilizasyon tamamlandıktan sonra biyoreaktörün tüm bağlantıları tamamlanarak üretime hazır hale getirilmiştir. Çizelge 3.5’de kullanılan biyoreaktörlerin boyutları verilmiştir.

Kullanılan inokulant miktarı biyoreaktör haciminin %10’u kadardır. Erlenlerde hazırlanan logaritmik fazdaki hücreler steril kabin içerisinde steril cam şişelere aktarılmış ve bu şişeler reaktöre bağlı inokulant şişesi ile alev yanında yer değiştirilmiştir. İnokulant peristaltik pompa vasıtasıyla reaktör içerisine gönderilmiştir.



Şekil 3.4 *C. saccharophila* ve *C. cohnii* hücrelerinin yetiştirilmesinde kullanılan 2 litrelik biyoreaktör

Üretimler sırasındaki spesifik büyüme hızı (μ) ve ikilenme süreleri (t_d) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (Doran, 1995):

$$\mu = \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{t_2 - t_1}$$

Denklem 3

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Denklem 4

Çizelge 3.5 Kullanılan 2 l'lik biyoreaktörün boyutları

Özellik	Uzunluk (cm)
Genişlik	23
Yükseklik (üst kapağa kadar)	28,5
Tüm biyoreaktör uzunluğu	39,1
İç çapı	13
Rushton tip karıştırıcının çapı	5,3

3.2.12 Kesikli-beslemeli ve sürekli biyoreaktör üretimleri

Kesikli beslemeli işletim sistemiyle gerçekleştirilen üretimlerinde 2 litrelik biyoreaktör kullanılmıştır (Bkz Şekil 3.4). Reaktörün hazırlığı Bölüm 3.2.11'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılacak substratlar, şişelerle reaktöre bağlanmış ve peristaltik pompa vasıtasıyla reaktör içerisine gönderilmiştir.

Sürekli işletim sistemiyle gerçekleştirilen üretimlerinde gerekli ekipmanların ilavesiyle 2 litrelik biyoreaktör kullanılmıştır (Şekil 3.5). Reaktörün hazırlığı Bölüm 3.2.11'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılacak substratlar, 5 l'lik şişelerle reaktöre bağlanmış ve peristaltik pompa vasıtasıyla reaktör içerisine gönderilmiştir. Reaktör 1,5 l çalışma hacminde işletilmiştir. Atık şişesi reaktöre bağlanarak, peristaltik pompa vasıtasıyla reaktör içerisinden ortam kazanımı sağlanmıştır.



Şekil 3.5 Sürekli sistemde kullanılan 2 litrelik biyoreaktör

3.2.13 Ölçek büyütme

Çalışmamızda *C. cohnii* hücreleri ile yapılan ölçek büyütme çalışmalarında (5 l ve 30 l) enerji dağılım hızı ölçek büyütmede kriter olarak alınmıştır. Karıştırmalı reaktörlerde, karıştırıcıyı çevirmek için gerekli güç ampirik bağıntılar kullanılarak hesaplanmıştır (Nielsen et al., 2003). Çizelge 3.6'da ölçek büyütülen biyoreaktörlerin boyutları ve Şekil 3.6'da kullanılan biyoreaktörlerin görüntüsü verilmiştir.

Karıştırma için gerekli güç pek çok faktöre dayanmaktadır. En önemlileri N_i , d_i , ρ_L ve η' 'dir. Boyut analizi yapıldığında, bu faktörleri boyutsuz bir sayıda biraraya getirmek mümkün olabilmektedir (Türker, 2005). Karıştırma için güç tüketimi, boyutsuz bir sayı olan güç sayısı (N_p) ile açıklanabilmektedir.

$$N_p = \frac{P}{\rho_L * N_i^3 * d_i^5}$$

Denklem 5

Çizelge 3.6 Ölçek büyütmede kullanılan biyoreaktörlerin boyutları

Biyoreaktör	Özellik	Uzunluk (cm)
5 litre	Genişlik	26
	Yükseklik (iç kapağa kadar)	34,5
	İç çapı	16
	Hava dağıtıcı ve karıştırıcı arasındaki mesafe	2,5
	Rushton tip karıştırıcının çapı	6,4
	Tüm biyoreaktör uzunluğu	32
	Ring hava dağıtıcı gözenek büyüklüğü	0,08
30 l	Genişlik	85
	Yükseklik	175
	İç çapı	25
	Rushton tip karıştırıcının çapı	8
	Baffle (4 adet) genişlik	2,5



(a)

(b)

Şekil 3.6 *C. cohnii* hücreleriyle yapılan ölçek büyütme çalışmalarında kullanılan (a) 5 ve (b) 30 litrelik biyoreaktörler

Güç sayısı Reynolds sayısının (Re) bir fonksiyonu olarak açıklanabilmektedir. Reaktördeki türbülans karıştırıcının Reynolds sayısı ile tanımlanır. Üretim ortamının yoğunluğu, dinamik viskozite değeri, karıştırıcının çapı ve karıştırma hızı kullanılarak Reynolds sayısı hesaplanmıştır (Bailey and Ollis, 1986).

$$Re = \frac{\rho_L * N_i * d_i^2}{\eta}$$

Denklem 6

30 l'lik biyoreaktör üretimi için gerekli olan inokulant 2 l'lik biyoreaktörde yapılan üretim ile elde edilmiştir. Hücreler logaritmik faza geldiğinde (yaklaşık 4-5 gün) reaktör içerisinden peristaltik pompa vasıtasıyla 2 l'lik steril cam şişeye alınmıştır.

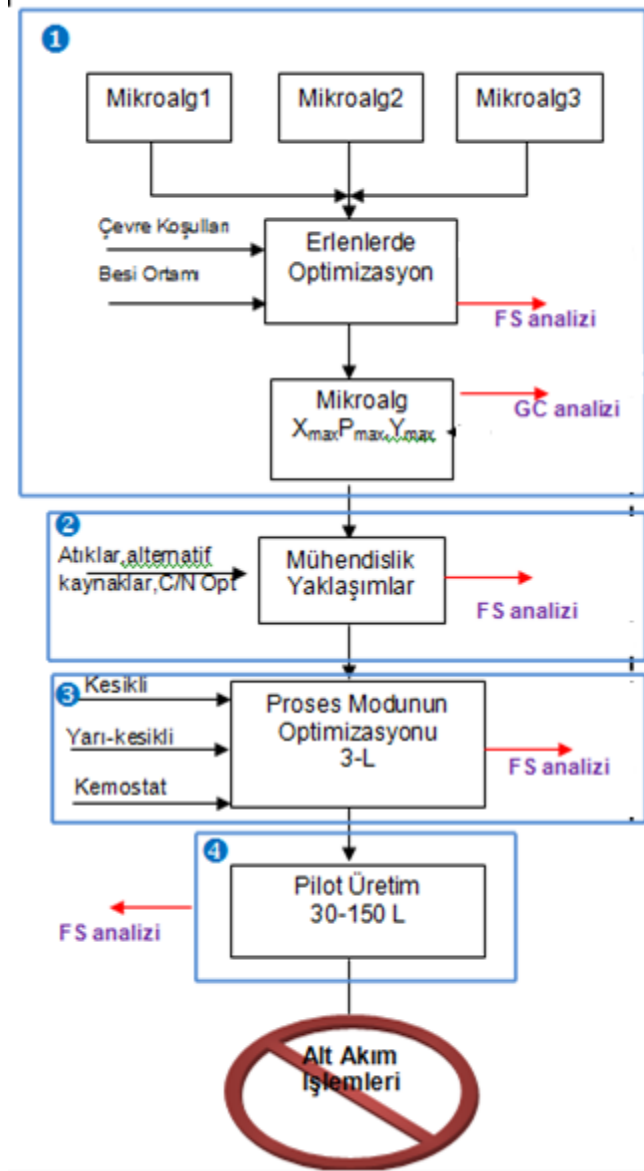
30 litrelik biyoreaktör üretimi sonucunda elde edilen biyokütleyi kültür ortamından ayırmak için Şekil 3.7'de verilen çanaklı santrifüj kullanılmıştır.



Şekil 3.7 30 litrelik biyoreaktör üretimi sonucunda biyokütleyi kültür ortamından ayırmak için kullanılan çanaklı santrifüj

3.2.14 Çalışmada takip edilen basamaklar

Çalışmada takip edilecek yöntem ve basamaklar genel hatlarıyla Şekil 3.8'de gösterilmektedir.



Şekil 3.8 Çalışmada takip edilen basamaklar

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

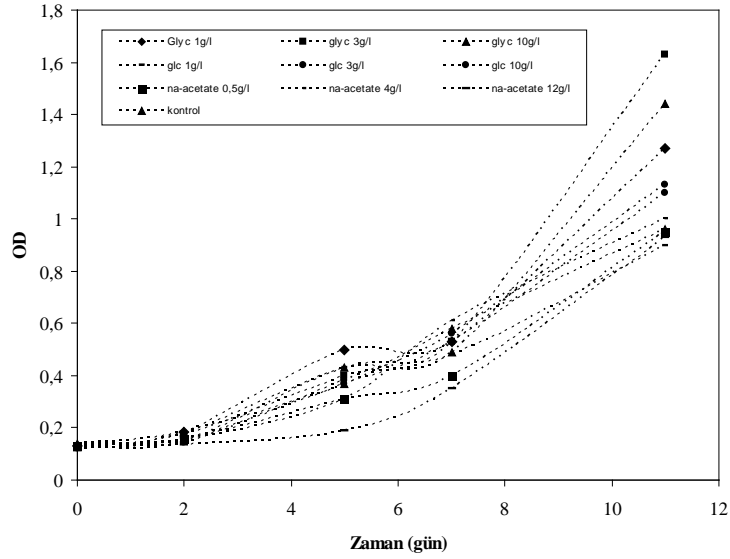
4.1 Ön Denemeler

Bu çalışmada öncelikle, çoklu doymamış yağ asitlerince zengin yağ asidi kompozisyona sahip oldukları düşünülen farklı mikroalg türlerinin heterotrofik koşullardaki büyüme potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, *Tetraselmis suecica* CCMP906, *Phaeodactylum tricornutum* CCMP630, *Cryptocodinium cohnii* CCMP316, *Chlorella minutissima* UTEX2341, *Monodus subterraneus* UTEX151, *Chlorella saccharophila* UTEX türlerinin, farklı ortam ve kültürasyon koşullarında (fotoheterotrofik ve heterotrofik) büyüme ve yağ üretimi açısından potansiyelleri ortaya konulmuştur.

4.1.1 *Phaeodactylum tricornutum* ile yapılan çalışmalar

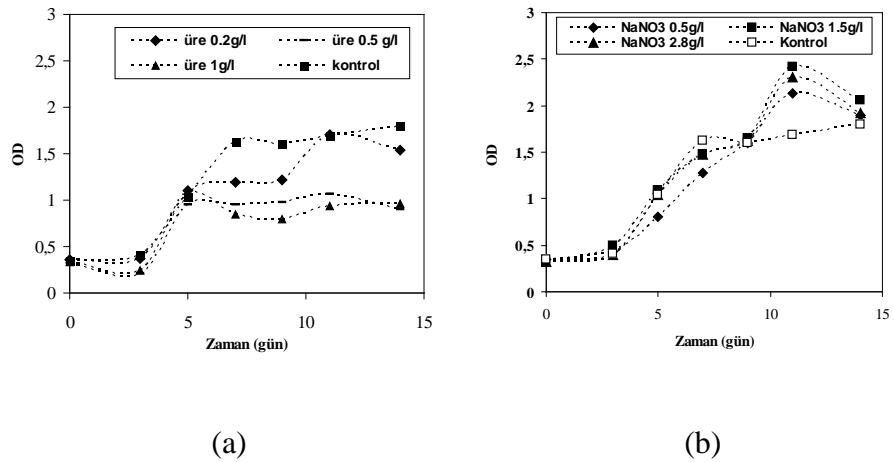
Denizel bir tür olan *Phaeodactylum tricornutum* hücrelerinin çoklu doymamış yağ asitlerinden EPA içerdiği bilinmektedir (Meiser et al., 2004). Bu çalışmada *P. tricornutum* CCMP630 hücrelerinin heterotrofik kültürasyon koşullarındaki ortam denemelerine f/2 ortamıyla, karbon kaynağı olarak glikozun kullanıldığı denemelerle başlanmıştır. Fakat, yapılan birkaç alt kültür sonucunda, *P. tricornutum* hücrelerinde heterotrofik koşullarda büyüme olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla çalışmalara 12/12 karanlık/aydınlık koşulların sağlandığı 24 °C inkübasyon sıcaklığında fotoheterotrofik koşullarda devam edilmiştir. Öncelikle farklı karbon kaynaklarıyla, farklı konsantrasyonlardaki denemelere başlanmıştır. Bu amaçla, glikoz ve gliserol 1; 3; 10 g/l konsantrasyonlarında; sodyum asetat ise 0,5; 4; 12 g/l konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Erlenlerde gerçekleştirilen yaklaşık 11 günlük üretim sonunda, organizmanın zamana karşı büyüme grafiği Şekil 4.1’de görülmektedir.

Şekil 4.1’e bakıldığında en yüksek hücre gelişimi gliserolün 3g/l konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bunu, yine gliserolün 10 g/l ve 1g/l konsantrasyonlarının takip ettiği görülmektedir. Hücrelerin, glikozu ise ikinci karbon kaynağı seçeneği olarak kullandığı yine Şekil 4.1’den görülmektedir. Sodyum asetatın karbon kaynağı olarak kullanıldığı erlenlerde ise kontrole göre daha düşük bir biyokütle elde edilmiştir. *P. tricornutum* hücrelerinin mikсотrofik koşullarda glikoza nazaran gliserolü karbon kaynağı olarak daha çok tercih ettiği daha önceki çalışmalarda da ortaya konmuştur (Ceron Garcia et al., 2000, 2005).



Şekil 4.1 *P. tricornutum* hücrelerinin fotoheterotrofik koşullarda farklı karbon kaynakları varlığında büyüme grafiği.

Farklı azot kaynaklarının ve konsantrasyonlarının *P. tricornutum* hücrelerinin fotoheterotrofik koşullardaki gelişimi üzerine etkilerini belirlemek için erlen denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için f/2 ortamında bulunan NaNO_3 0,5; 1,5 ve 3 g/l düzeylerinde; organik azot kaynağı olarak ise üre 0,2;0,5 ve 1 g/l düzeylerinde ortama konulmuştur. Ortamda karbon kaynağı olarak gliserol 3 g/l düzeyinde kullanılmıştır. Karanlık/ aydınlık (12/12, saat) koşulların sağlandığı 24 °C inkübasyon sıcaklığında 14 gün boyunca yapılan deneme sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.2’de görülmektedir.



Şekil 4.2 *P. tricornutum* hücrelerinin fotoheterotrofik koşullarda farklı azot kaynakları (a) üre, (b) NaNO_3 varlığında büyüme grafikleri.

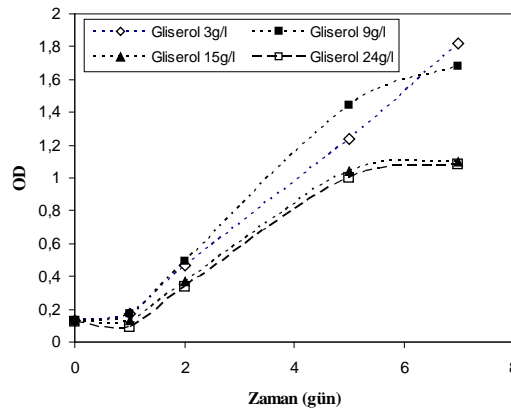
P. tricornutum hücrelerinin üre varlığındaki gelişimlerinin kontrol ortamına (f/2) göre daha düşük seviyede kaldığı görülmektedir (Bkz. Şekil 4.2). Buna karşın kontrole göre en iyi büyümenin, NaNO₃'ün 1,5 g/l düzeyinde olduğu denemede elde edildiği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.2). Bu denemede yaklaşık olarak 0,4 g/l kuru hücre ağırlığı elde edilmiştir. *P. tricornutum* gelişme ortamında azot kaynağı olarak genelde NaNO₃'ün kullanıldığı daha önceki çalışmalarda da belirtilmiştir (Ceron Garcia et al., 2000, 2005). Elde edilen biyokütlelerin toplam yağ miktarlarının %20-30 (g/g) düzeyinde olduğu saptanmıştır. *P. tricornutum* hücrelerinin toplam yağ asidi profillerine bakıldığında ise başlıca C14:0 (%14-20), C16:0 (%16-24), C16:1 (%22-27), C18:0 (%6-10), C18:1 (%6-8) ve C20:5 (%8-15) yağ asitlerini içerdiği belirlenmiştir.

4.1.2 *Tetraselmis suecica* CCMP 906 ile yapılan çalışmalar

Tetraselmis türleri özellikle su ürünleri yetiştiriciliğinde çok sıklıkla kullanılan bir mikroalg türüdür. *Tetraselmis suecica* CCMP 906 ile heterotrofik koşullarda yapılan denemelerde hücrelerin flajellerini kaybettiği ve büyümenin çok yavaş olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla, *T. suecica* ile yapılan çalışmalara fotoheterotrofik koşullarda (12:12, karanlık:aydınlık) devam edilmiştir. *T. suecica*'nın sodyum metasilikatlı f/2 (f/2+Si) büyüme ortamında farklı karbon kaynaklarının (glikoz, gliserol, ksiloz) kullanıldığı denemeler sonucunda hücrelerinin karbon kaynağı olarak gliserolü tercih ettiği belirlenmiştir. Daha sonraki aşamada ise gliserolün farklı konsantrasyonlarında (3, 9, 15 ve 24 g/l) 8 günlük erlen üretimleri sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.3'de görülmektedir. Gliserolün 3 g/l ve 9 g/l konsantrasyonlarında gelişim, diğer konsantrasyonlara göre daha yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Farklı gliserol konsantrasyonlarında elde edilen toplam biyokütle miktarlarının 0,3-0,42 g/l olduğu saptanmıştır.

Tetraselmis suecica CCMP 906 denizel bir mikroalg türü olduğu için f/2 +Si ortamı yanı sıra, diğer denizel kültür ortamları olan zenginleştirilmiş deniz suyu (ESW) ve Walne ortamları da mikroalgal büyüme amaçlı kullanılmıştır. Üç farklı temel ortam büyüme açısından karşılaştırıldığında, f/2+Si ortamında *T. suecica* hücrelerinin daha iyi bir gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonrasında, f/2+Si ortamı temel alınarak, farklı azot kaynaklarının kullanıldığı erlen denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denemeler, fotoheterotrofik koşullarda 250 ml'lik erlenlerde, çalkalamalı inkübatörde 23 °C sıcaklıkta ve 130 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Karbon kaynağı olarak gliserol (3 g/l) kullanılırken, farklı

azot kaynaklarının fotoheterotrofik büyümeye etkisi incelenmiştir. Buna göre, en fazla biyokütle (0,3-0,6 g/l), azot kaynağı olarak proteoz pepton ve maya ekstraktının kullanıldığı denemelerde elde edilmiştir. *T. suecica* için bu denemelerden elde edilen biyokütlelerin toplam yağ miktarlarının kuru ağırlığın %22-31'i arasında değişmekte olduğu saptanmıştır. Yağ asidi kompozisyonları açısından incelendiğinde ise başlıca C14:0 (%5,5-10), C16:0 (%19-24), C16:1 (%2-5), C17:1 (5-12), C18:0 (%5-9), C18:1 (%4-9), C18:2t (10-17), C18:2c (3-7), C20:1 (9-13), C21:0 (3-9), C20:5 (%4-6) ve C22:6 (3-8) yağ asitlerini içerdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.3 *T. suecica* hücrelerinin fotoheterotrofik koşullarda farklı gliserol konsantrasyonlarındaki büyüme grafikleri.

4.1.3 *Chlorella saccharophila* UTEX 247 ile yapılan çalışmalar

Yeşil bir mikroalg olan *Chlorella* türleri, ticari olarak üretilen en eski mikroalg türlerinden biridir. Ayrıca biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalar için de model teşkil etmektedir. *Chlorella saccharophila* bir tatlı su türüdür. *C. saccharophila* ile yapılan ön denemelerde ortamda bulunan glikoz ve gliserol varlığında heterotrofik olarak gelişim gösterdiği saptanmıştır. Kültür ortamı olarak Bristol ortamı temel alınarak farklı azot kaynaklarının ((NH₄)₂SO₄, KNO₃, bakteriyolojik pepton, maya ekstraktı) heterotrofik koşullarda büyüme üzerine etkisinin incelendiği 6 günlük üretim sonunda, en yüksek biyokütle miktarının (0,6-0,8 g/l) organik azot kaynakları varlığında elde edildiği belirlenmiştir. *C. saccharophila* için bu denemelerden elde edilen biyokütlelerin toplam yağ miktarlarının ise kuru ağırlığın %20-38'i arasında değişmekte olduğu saptanmıştır. Yağ asidi kompozisyonları açısından incelendiğinde ise başlıca C14:0 (%3-10), C16:0 (%15-22), C17:1 (%2-9), C18:0 (%5-11), C18:1 (%21-31),

C18:2c (%18-29), C20:1 (%6-10), C18:3 (%1-2) yağ asitlerini içerdiği belirlenmiştir

Ayrıca, organizmanın tuz dayanımını belirlemek için yapılan denemede, NaCl'ün 5-25g/l konsantrasyonlarının biyokütle üzerine etkisi incelenmiş ve tuz konsantrasyonunun biyokütle üzerine etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). NaCl'ün 4g/l konsantrasyonunda maksimum biyokütle elde edilmiştir. NaCl'ün bu etkisi bazı *Chlorella* türleri için de bilinmektedir. Büyüme ortamında NaCl'ün 4-5 g/l olması durumunda büyümeyi olumlu yönde etkilemektedir (Seto et al., 1984). *C. saccharophila* için de NaCl'ün bu etkisi yapılan bu ön denemelerde belirlenmiştir.

4.1.4 *Chlorella minutissima* UTEX 2341 ve *Monodus subterraneus* CCMP 906 ile yapılan çalışmalar

Chlorella minutissima, çoklu doymamış yağ asitlerinden EPA içeriği çok yüksek olan denizel mikroalg türüdür. *C. minutissima*'nın heterotrofik veya fotoheterotrofik büyüme potansiyelinin araştırılması için 3 farklı karbon kaynağının kullanıldığı denemeler gerçekleştirilmiştir. *C. minutissima*'nın heterotrofik koşullarda kültüvasyonunda, hücrelerin klorofilini kaybettiği ve renksizleştiği belirlenmiştir. Bu sebeple, *C. minutissima* ile yapılan çalışmalar fotoheterotrofik koşullarda gerçekleştirilmiştir. *C. minutissima*'nın fotoheterotrofik koşullarda her 3 karbon kaynağını da (glikoz, gliserol ve etanol) kullanabildiği, fakat gliserol ve glikoz varlığında büyümenin daha hızlı gerçekleştiği saptanmıştır. *C. minutissima* ile fotoheterotrofik koşullarda elde edilen biyokütle verimliliği ise 0,12-0,15 g/l.gün düzeyinde gerçekleşmiştir. Biyokütle yağ içeriğinin ise %17-20 düzeyinde olduğu saptanmıştır. Yağ asidi kompozisyonları açısından incelendiğinde ise başlıca C14:0 (%3-9), C16:0 (%10-15), C18:0 (%2-7), C18:1 (%10-18), C18:2c (%30-35), C18:3 (%2-3) ve C20:5 (%4-7) yağ asitlerini içerdiği belirlenmiştir.

Monodus subterraneus CCMP 906 ise genelde tatlı su koşullarında yaşayan bir mikroalg türüdür. Denemeler, BG-11 kültür ortamında gerçekleştirilmiştir. Organik azot kaynağı olarak pepton kullanıldığında diğer inorganik azot kaynaklarına göre büyümenin daha iyi olduğu saptanmıştır. Fotoheterotrofik koşullarda yapılan kültürlenme sonucunda elde edilen biyokütle verimliliğinin 0,1-0,12 g/l.gün düzeyinde kaldığı ortaya konmuştur. Biyokütlenin toplam yağ içeriğinin kuru ağırlığın %12-14'ü arasında değişmekte olduğu, diğer mikroalg

türlerine göre daha düşük seviyede kaldığı belirlenmiştir. Yağ asidi kompozisyonunda ise toplam yağ asitleri içerisinde %22-26 ile C16:0 ve %18-20 ile C16:1 başı çekmektedir. Toplam yağ asitleri içerisinde EPA ise %13-16 arasında bulunmaktadır.

Farklı mikroalg türleri ile yapılan ön denemeler neticesinde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

Söz konusu mikroalglerden 4 tanesinin (*C. minutissima*, *T. suecica*, *P. tricornutum* ve *M. subterraneus*) ortamda bulunan karbon kaynağı varlığında, fotoheterotrofik olarak büyüme gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Mikroalglerin büyük ölçek üretimleri söz konusu olduğunda en önemli parametrelerden biri biyokütle verimliliğidir. Biyokütle verimliliği açısından mikroalg türlerini karşılaştırdığımızda, 0,05-0,100 g/l.gün ile *T. suecica* en düşük değere sahip olduğu görülmektedir. *T. suecica* hücrelerini 0,087-0,100 g/l.gün değerleriyle *P. tricornutum* izlemektedir. *C. minutissima* ve *M. subterraneus* ise hemen hemen aynı biyokütle verimliliklerine sahiptir. Fotoheterotrofik koşullarda gelişen bu mikroalg türlerini, yağ miktarları ve yağ kompozisyonları açısından ele aldığımızda ise; kuru ağırlığının %20-32’si kadar yağ içeren *P. tricornutum*, hem toplam yağ miktarı hem de içerdiği EPA ve DHA ile dikkati çekmektedir. *P. tricornutum*’u, toplam yağ miktarı açısından (%20-34) *T. suecica* takip etse de, yağ kompozisyonuna baktığımızda neredeyse yarısı kadar EPA, az miktarda da DHA içerdiği görülmektedir. Fakat, *T. suecica* toplam yağ asitleri içerisinde %15-18 oranında α -linolenik asit (C18:3n3) içermektedir. α -linolenik asit çoklu doymamış ω -3 yağ asitlerinden olup vücut için elzem yağ asitlerinden biridir. Toplam yağ asitleri içerisindeki EPA miktarı açısından *P. tricornutum* ile hemen hemen aynı değerlere sahip mikroalg türü olarak *M. subterraneus* göze çarpmaktadır. Fakat, *M. subterraneus*’un diğer 3 mikroalg türü ile karşılaştırıldığında, daha düşük bir yağ içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Bu mikroalg türleri, hem heterotrofik koşullarda büyüme gösterememeleri hem de heterotrofik koşullara alternatif olan fotoheterotrofik koşullardaki biyokütle verimlilikleri, yağ miktarı ve kompozisyonları açısından düşük değerlerde kaldıkları için çalışmanın bundan sonraki aşamaları için kapsam dışında bırakılmışlardır.

Çizelge 4.1 Çalışılan mikroalg türlerinin heterotrofik ve/veya fotoheterotrofik koşullardaki kültürlerinin biyokütle verimlilikleri, toplam yağ miktarı ve yağ asidi kompozisyonları arasındaki farklılıklar

Mikroalg	Büyüme modu	Biyokütle verimliliği (g/l.gün)	Toplam yağ miktarı (% g/g)	Yağ kompozisyonu(% TFA)								
				C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:5	C22:6
<i>C. saccharophila</i>	Heterotrofik	0,156-0,400	22-48	2-10	17-23	-	4-10	20-30	22-30	6-10	-	-
<i>C. minutissima</i>	Fotoheterotrofik	0,120-0,150	17-20	3-9	10-15	-	2-7	10-18	35-40	2-3	-	-
<i>T. suecica</i>	Fotoheterotrofik	0,05-0,100	20-34	6-8	25-31	-	7-10	7-10	7-10	15-18	5-7	3
<i>P. tricorutum</i>	Fotoheterotrofik	0,087-0,100	20-32	14-21	16-25	-	4-10	6-8	-	-	8-16	2-4
<i>C. cohnii</i>	Heterotrofik	0,400-0,750	25-50	11-17	16-25	-	2-7	8-20	2-8	-	-	30-50
<i>M. subterraneus</i>	Fotoheterotrofik	0,100-0,120	12-15	10-13	22-26	18-20	-	-	-	-	13-15	-

Söz konusu mikroalg türleri içerisinde, heterotrofik koşullarda büyüme gösteren türler *C. saccharophila* ve *C. cohnii* olmuştur. *C. saccharophila* ile heterotrofik koşullarda gerçekleştirilen üretimlerdeki biyokütle verimliliklerinin 0,156-0,400 g/l.gün arasında değişmekte olduğu ve bu verimlilik değerlerinin fototrofik koşullarda gerçekleştirilen üretime göre (0,018 g/l.gün) oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca, fototrofik ve heterotrofik kültürlerin yağ miktarları ve yağ asidi kompozisyonları arasındaki farklılıklar da göze çarpmaktadır. Heterotrofik koşullarda büyüyen hücrelerin kuru ağırlığının %54'ü oranında yağ içerdikleri belirlenmiştir. *C. saccharophila*'nın yağ asidi kompozisyonuna bakıldığında ise toplam yağ asitleri içerisinde %20-30 oranlarında C18:1 ve C18:2, %5-10 oranlarında da C18:3 içerdiği ortaya konmuştur. Linoleik asit ve α -linolenik asit organizmada sentezlenemeyen ve besinlerle birlikte alınması gerekli olan elzem yağ asitlerindedir. Dolayısıyla, *C. saccharophila*, zengin linoleik asit ve α -linolenik asit içeriği ile su ürünleri yetiştiriciliğinde yem kaynağı olarak da kullanılabilen düşünlmektedir.

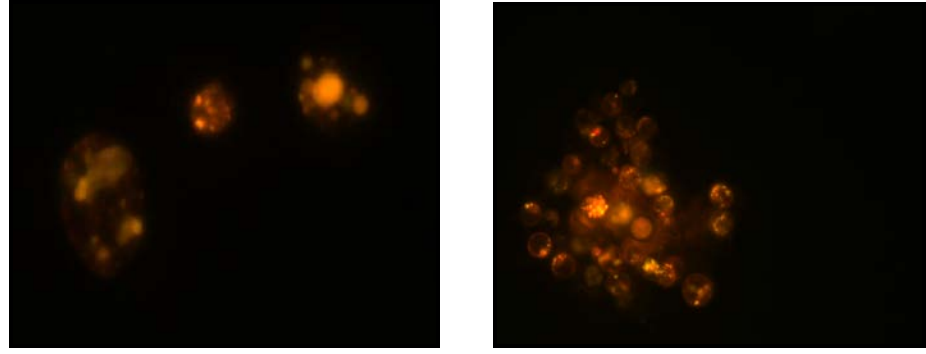
Heterotrofik koşullarda büyüme gösteren ve zengin DHA içeriğiyle dikkat çeken organizma *C. cohnii* olmuştur. *C. cohnii* ile DHA üretimi üzerine yapılan çalışmalarda çoğunlukla ATCC 30772, ATCC 30556, ATCC 50051 türleri kullanılmıştır (De Swaaf et al., 1999; Jiang et al., 2000a, b; Ratledge et al., 2001). Bu projede ise, *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 (Culture Collection of Marine Phytoplankton, USA) türü ile çalışılmıştır. *C. cohnii* fotoheterotrofik ve heterotrofik koşullardaki kültürlemeleri çalışılan diğer mikroalg türleri içerisinde en yüksek biyokütle verimliliğine ve yağ içeriğine sahip tür olarak göze çarpmaktadır (Bkz. Çizelge 4.1). Bunun yanı sıra, toplam yağ asitleri içerisinde %30-50 oranında yüksek DHA içeriğine sahiptir.

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında, heterotrofik koşullara adaptasyon ve biyokütle verimliliği, toplam yağ üretimi ve yağ kompozisyonu açısından umut vaadeden mikroalg türleri *Chlorella saccharophila* UTEX 247 ve *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 hücreleri ile kültür ve çevre koşullarının optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.2 Floresan Mikroskop ile Hücre İçi Yağ Damlacıklarını Görüntüleme

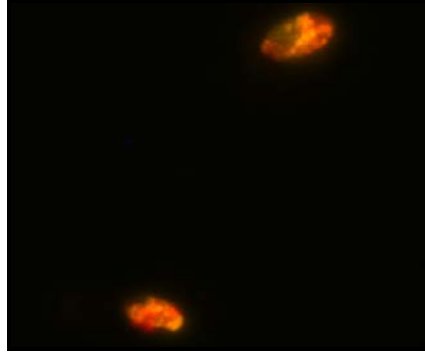
Floresan mikroskop, çalışılan türlerin hücre içi yağ damlacıklarını görüntülemek amacıyla kullanılmıştır. Şekil 4.4'de bazı türlerin hücre içindeki yağ globülleri görülmektedir. Floresan mikroskop, farklı türlerle farklı koşullarda

yapılan ön denemeler sırasında hücrelerin yağ damlacıklarını gözlemlemek amacıyla zaman zaman kullanılmıştır.



(a)

(b)



(c)

Şekil 4.4 Farklı mikroalg türlerine ait nil kırmızı ile boyama sonucunda floresan mikroskopta görülen yağ damlacıkları görüntüleri; (a) *Chlorella saccharophila* UTEX 247, (b) *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316, (c) *Tetraselmis suecica* CCMP906

4.3 *Chlorella saccharophila* ile Yapılan Çalışmalar

C. saccharophila hücrelerinin heterotrofik koşullarda en iyi büyümeyi gösterdiği uygun azot ve karbon kaynakları belirlenmiştir. Daha sonra, belirlenen karbon ve azot kaynaklarının istatistiksel optimizasyon metodları ile kültür ortamındaki konsantrasyonlarının optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Son olarak da, oluşturulan optimum kültür koşullarında biyoreaktör denemesi gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktördeki üretim boyunca, büyümenin yanı sıra *C. saccharophila* hücreleri için geliştirilmiş olan nil kırmızı metoduyla floresan spektrofotometre mikropłaka okuyucuda hücrelerin nötral yağ üretimi de takip edilmiştir.

4.3.1 Kuru hücre ağırlığı ve optik yoğunluk arasındaki ilişki

Büyümeyi takip etmek için, *C. saccharophila* hücrelerinde kuru ağırlık (g/l) ölçümleri yapılarak optik yoğunluğa (700 nm) karşın kuru ağırlık kalibrasyon denkliği elde edilmiştir. Buna göre;

$$\text{Kuru ağırlık (g/l)} = 0,242\text{OD}_{700}; R^2 = 0,95, p < 0,05 \text{ şeklindedir.} \quad \text{Denklem 7}$$

C. saccharophila ile yapılan tüm çalışmalarda denklem 7'de verilen kuru ağırlık denkliği kullanılmıştır.

4.3.2 *C. saccharophila* hücre gelişimi üzerine azot ve karbon kaynaklarının etkisi

Erlenlerde yapılan denemelerde, farklı azot kaynaklarının (NH_4Cl , NaNO_3 ve bakteriyolojik pepton) heterotrofik koşullarda *C. saccharophila* hücrelerinin gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Kültür ortamında farklı azot kaynakları kullanıldığında, temel Bristol ortamında bulunan NaNO_3 ortamdan çıkarılmıştır. Erlenlerde karbon kaynağı olarak glikoz kullanılmış ve her bir erlendeki C/N oranı 20 olacak şekilde ayarlanmıştır. Kültür ortamında kullanılan farklı azot kaynaklarının hücre büyümesi üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2). En yüksek kuru hücre ağırlığı (0,48 g/l) azot kaynağı olarak bakteriyolojik pepton kullanıldığında elde edilmiştir. Amonyak tuzları kullanıldığında, kültürasyonun 70. saatinden sonra pH'da düşüş saptanmış ve hücrelerde lizis gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, *C. vulgaris* kullanılarak kentsel atık sularından amonyumun uzaklaştırılması denemesinde, ortamda glikoz ve asetat bulunduğunda daha iyi sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (Perez-Garcia et al., 2011a).

Farklı karbon kaynaklarının (glikoz, gliserol, asetik asit) sırasıyla 6 g/l; 5 g/l; 7g/l konsantrasyonlarda heterotrofik koşullarda *C. saccharophila* hücrelerinin gelişimi üzerine etkisi erlen denemeleri ile ortaya konmuştur. Bu denemede, 1 g/l bakteriyolojik peptonun Bristol ortamına ilave edildiği ortam temel ortam olarak alınmıştır. Deneme sonucunda, maksimum hücre konsantrasyonunun glikoz varlığında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). *C. saccharophila* hücrelerinin hücre büyümesi üzerine glikoz ve gliserolün farklı etkileri olduğu saptanmış ve kuru hücre ağırlığı açısından aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Farklı karbon kaynaklarının *Chlorella vulgaris* ve

Chlorella sorokiniana hücrelerinin gelişimi üzerine etkileri de başka araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Hongjin and Guangce, 2009; Perez-Garcia et al., 2011a). Bu çalışmada, organizmanın glikoz ve gliserol tercihindeki farklılık gibi, Liang et al (2009) da glikozun asetata göre daha yüksek hücre büyüme hızlarına neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Heterotrofik *C. vulgaris* için de farklı karbon kaynakları tercihleri belirlenmiştir (Perez-Garcia et al., 2011a). *C. vulgaris* hücrelerinin glikoz varlığında steril kentsel atıksularda gelişimi, asetat ile karşılaştırıldığında daha iyi sonuçlar vermiştir. Yapılan diğer çalışmalarda da, farklı glikoz ve gliserol konsantrasyonlarının mikroalgal hücre büyümesi ve gelişimi üzerinde farklı etkileri olduğu saptanmıştır (Heredia-Arroyo et al., 2010; Azma et al., 2011).

Çizelge 4.2 Farklı azot kaynaklarının (NH_4Cl , NaNO_3 , bakteriyolojik pepton) erlenlerde heterotrofik koşullarda gelişim gösteren *C. saccharophila* hücrelerinin kuru ağırlıkları üzerine etkisi^a.

	Azot kaynağı ^b		
	NH_4Cl	NaNO_3	Bakteriyolojik pepton
Kuru hücre ağırlığı (g/l)	0,165±0,003 ^B	0,138±0,013 ^B	0,480±0,056 ^A

^aÖrnekler hücreler durağan fazdayken alınmıştır. İnokulasyon oranı %10 (v/v). Kullanılan glikoz konsantrasyonu 6 g/l'dir. (Ort. ± Std. Hata; n=4).

^{A,B} Farklı büyük harflerle gösterilen azot kaynakları arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.3 Farklı karbon kaynaklarının (glikoz, gliserol, sodyum asetat) erlenlerde heterotrofik koşullarda gelişim gösteren *C. saccharophila*'nın kuru hücre ağırlığı üzerine etkisi^a.

	Karbon kaynakları ^b		
	Glikoz	Gliserol	Sodyum asetat
Kuru hücre ağırlığı (g/L)	0,344 ± 0,012 ^A	0,248 ± 0,006 ^B	0,092 ± 0,004 ^C
$Y_{X/S}$ (g biyokütle/g substrat)	0,25 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,09 ± 0,02

^aÖrnekler hücreler durağan fazdayken alınmıştır. İnokulasyon oranı %10 (v/v). Azot kaynağı olarak bakteriyolojik pepton (1g/l) kullanılmıştır (Ort. ± Std. Hata; n=4).

^bFarklı karbon kaynakları (glikoz, gliserol, sodyum asetat) sırasıyla 6g/l; 5g/l; 7 g/l.

^{A,B} Farklı büyük harflerle gösterilen karbon kaynakları arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$).

Fototrofik ve heterotrofik sistemler biyokütle ve yağ verimlilikleri açısından karşılaştırıldığında, heterotrofik ortamlarda daha yüksek değerler elde edilebilmektedir (Tan and Johns, 1991; Azma et al., 2011; Li et al., 2011). Ancak maliyet açısından gözönüne alındığında, karbon ve azot kaynaklarının dikkatli seçilmesi gerekmektedir (Perez-Garcia et al., 2011b). Yüksek substrat

maliyetlerinden kaçınmak için ucuz kaynakların kullanılması önemlidir. Bu çalışmada da, farklı azot ve karbon kaynaklarının *C. saccharophila* hücrelerinin heterotrofik büyümesi üzerine etkileri incelenmiştir. Diğer inorganik azot kaynaklarına göre maliyeti daha yüksek olmasına karşın, *C. saccharophila* ile en iyi büyüme bakteriyolojik pepton kullanıldığında elde edilmiştir. *C. saccharophila* hücrelerinin organik azot kaynağı tercihi bu çalışmayla ortaya konduğu için, bira mayası atığı olan maya ekstraktının da alternatif azot kaynağı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Organizmanın karbon kaynakları tercihleri göz önüne alındığında ise, glikoz ve gliserol ile kıyaslandığında asetatın en düşük biyokütle konsantrasyonunu verdiği saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.3). Oysa ki, atıksu arıtımında kullanılan diğer *Chlorella* türlerinde asetat kullanımı en ekonomik substrat olmaktadır (Perez-Garcia et al., 2011a). Fakat, asetat %1-2 konsantrasyonlarının üzerinde pek çok hücre için toksik olabilmektedir (Vazhappilly and Chen, 1998). Bu kadar düşük karbon konsantrasyonlarında bir fermentasyon prosesi yürütmek son hücre biyokütlesi açısından düşünüldüğünde pratik olmamaktadır. Böyle bir durumda fermentasyonu kesikli beslemeli olarak işletmek gerekecektir ki bu da işletme maliyetlerini arttırıcı bir sonuç yaratacaktır (De Swaaf et al., 2003b).

Yüksek besin ortamı maliyetlerinden kaçınmak için, bir biyodizel atığı olan gliserolün karbon kaynağı olarak değerlendirilebileceği bilinmektedir (O'Grady and Morgan, 2010). Bu bilgiden yola çıkarak bu çalışmada da, gliserolün *C. saccharophila* hücrelerinin heterotrofik ortamda alternatif karbon kaynağı olarak kullanılabileceği de gösterilmiştir. Gliserol varlığında hem hücre büyümesi hem de kuru hücre ağırlığı glikozlu ortama göre daha düşük seviyede kalsa da, asetatın kullanıldığı ortama göre daha yüksek değerde olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Daha önce yapılan çalışmalarda, pek çok heterotrofik mikroalg için en uygun karbon kaynağının glikoz olduğu saptanmıştır (Xu et al., 2006; Liang et al., 2009; Azma et al., 2011). Glikozun, *C. saccharophila* için de uygun bir karbon kaynağı olduğu bu çalışma ile ortaya konmuştur.

4.3.3 *C. saccharophila* için karbon ve azot kaynaklarının optimizasyonu

Mikroalgal biyokütle üretimi üzerine yapılan çalışmaların pek çoğunda tek bir değişkenin değiştirildiği, diğer tüm parametrelerin sabit tutulduğu, klasik yöntemin kullanıldığı görülmektedir (Shi et al., 1999; Liang et al., 2009; O'Grady and Morgan, 2010). Klasik yöntemle yapılan denemeler, analiz edilmesi ve yürütülmesi kolay olmasına karşın iki büyük eksiklik içermektedir. Birincisi, bu

deneme desenleri faktörler arasındaki etkileşmeyi dikkate almamaktadır. Özellikle faktörler arasındaki etkileşimin önemli olduğu durumlarda optimum koşulların ortaya konmasında eksiklik yaşanacaktır. İkinci olarak, yapılması gereken deneme sayısı her zaman için daha fazladır. Faktör sayısı fazla olduğunda bu durum daha karmaşık bir hal alacak, zaman ve emek kaybına yol açacaktır (Mandenius and Brundin, 2008).

Yüzey yanıt yöntemi, proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntemdir (Mandenius and Brundin, 2008). Bu yöntem, sadece optimizasyon amaçlı değil, işlem değişkenlerinin ayrı ayrı ve birbirleriyle etkileşimlerinin yanıtlar üzerine etkilerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2009). Mikroalgal kültürlemelerde ortam kompozisyonunun optimizasyonu amacıyla yüzey yanıt yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (YouWen and Chen, 2001; Azma et al., 2011; Li et al., 2011). Bu çalışmada da, Box-Behnken deneme deseni kullanılarak heterotrofik *C. saccharophila* hücrelerinin kültür ortamının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamının optimize edilecek tasarım parametreleri bakteriyolojik pepton, glikoz ve gliserol olarak belirlenmiştir. Tüm tasarım parametrelerinin minimum ve maksimum değerleri belirlenerek merkezde 3 tekrarlı deney ile toplam 15 deney setinden oluşan tasarım elde edilmiştir. Kuru hücre ağırlığı (g/l) tasarımda yanıt olarak alınmıştır. Tasarımdaki farklı deney setlerine ait her bir sonuç Çizelge 4.4'te görülmektedir.

Yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.5'de görülmektedir. F değeri, belirli bir veri kümesine ilişkin olan bir modelin, bu veri kümesindeki varyasyonun ne kadarını açıklayabildiği ile ilişkilidir. Bu ilişki ise, açıklanan varyasyonun açıklanmayan varyasyona oranı şeklindedir. Regresyon eşitliğiyle (model ile) açıklanan varyasyon miktarının daha büyük olması; bu eşitliğin, sonuçları anlamlı bir şekilde açıklama olasılığının da daha büyük olduğunu ifade eder. Varyans analizinde elde edilen F değeri, bu ilişkinin bir ölçüsüdür. Daha büyük F değeri, regresyon eşitliğinin, verileri anlamlı olarak açıklamada daha yetenekli olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.5'de görülen model F değeri (19,15), modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, 0,35 olan uyum eksikliği F değeri ("*Lack of fit F value*"), bu uyumsuzluğun, tekrarlanan deneylerde görülen hata payı olan saf hataya ("*pure error*") göre çok küçük olduğunu, diğer bir deyişle bu uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. ANOVA testi sonuçlarına göre heterotrofik olarak kültüre edilen *C. saccharophila*'nın kuru hücre

ağırlığı üzerine bakteriyolojik pepton ve glikoz etkileşiminin önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.4 *C. saccharophila* ile gerçekleştirilen Box-Behnken deneme desenine ait deney tasarımında bağımsız değişkenlerin (glikoz, gliserol ve bakteriyolojik pepton) gerçek değerleri ve elde edilen yanıt (kuru hücre ağırlığı, g/l).

Bağımsız değişkenler (g/l)	Sembol	Kodlanmış faktörlerin gerçek değerleri		
	Kodlanmış	-1	0	1
Glikoz	X_1	0	20	40
Gliserol	X_2	0	5	10
B. pepton	X_3	0.1	0.55	1
Runs	X_1	X_2	X_3	Kuru hücre ağırlığı (g/l)
1	0	10	0,55	0,20
2	40	5	0,10	0,30
3	20	10	0,10	0,35
4	20	0	0,10	0,55
5	20	5	0,55	0,65
6	0	0	0,55	0,10
7	20	5	0,55	0,45
8	40	0	0,55	0,95
9	20	10	1,00	1,05
10	0	5	1,00	0,10
11	40	10	0,55	0,65
12	20	0	1,00	1,05
13	40	5	1,00	1,10
14	20	5	0,55	0,80
15	0	5	0,10	0,05

Box-Behnken deneme deseni sonucunda elde edilen ve yanıtı ilgili bağımsız değişkenlerle ilişkilendiren, istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülen ikinci dereceden polinom model denklemi şu şekildedir:

Çizelge 4.5 *C. saccharophila*'nın heterotrofik kültürasyonunda yüzey yanıt yöntemiyle yapılan kültür ortamı optimizasyonuna ait ANOVA değerleri.

Kaynak	SS	DF	MS	F-değeri	p>F
Model	1,81	6	0,30	19,15	0,05
X ₁ -Glikoz	0,81	1	0,81	51,63	< 0,0001
X ₂ -Gliserol	0,02	1	0,02	1,27	0,2923
X ₃ -B. pepton	0,53	1	0,53	33,37	0,0004
X ₁ X ₂	0,04	1	0,53	2,54	0,1496
X ₁ X ₃	0,14	1	0,14	8,93	0,0174
X ₁ ²	0,27	1	0,27	17,13	0,0033
Artan	0,13	8	0,016		
Uyum eksigi F değeri	0,064	6	0,011	0,35	0,87
Saf hata	0,062	2	0,031		
Std. Sapma	0,13	R ²	0,9349	Yaklaşık tahmin	13,417
Ortalama	0,56	Adj R ²	0,8861		
C.V.%	22,54	Pred R ²	0,8229		

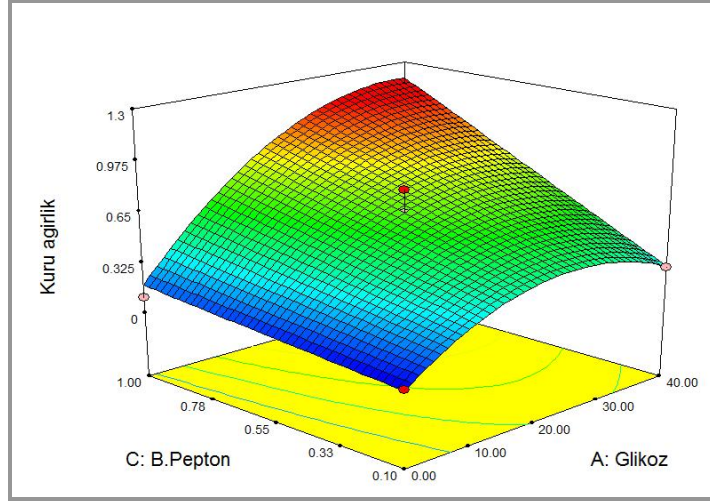
SS, kareler toplamı; DF, serbestik derecesi; MS, kareler ortalaması.

$$Y = 0,70 + 0,32 * X_1 - 0,050 * X_2 + 0,26 * X_3 - 0,100 * X_1 * X_2 + 0,19 * X_1 * X_3 - 0,27 * X_1^2$$

Denklem 8

Denklemden görülen Y, tasarımda yanıt olan kuru hücre ağırlığının (g/l), X₁, X₂, X₃ ise sırasıyla glikoz, gliserol ve bakteriyolojik pepton (g/l) bağımsız değişkenlerinin kodlanmış halidir.

Bakteriyolojik pepton ve glikoz arasındaki etkileşim ayrıca Şekil 4.5'de görülen yüzey yanıt eğrisinden de görülmektedir. Bu eğri, bağımsız değişken gliserol merkezdeyken diğer iki bağımsız değişkenin (glikoz ve bakteriyolojik pepton) sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını vermektedir. Şekil 4.5, glikoz konsantrasyonu 30-40 g/l aralığında ve bakteriyolojik pepton 1 g/l konsantrasyonu etrafında en yüksek kuru biyokütle ağırlığının elde edileceğini göstermektedir. Benzer olarak, *Tetraselmis suecica* üretiminde maya ekstraktı ve peptonun glikoz ile etkileşimde olduğu daha önceki bir çalışmada da gösterilmiştir (Azma et al., 2011).



Şekil 4.5 *C. saccharophila* hücrelerinin kuru hücre ağırlığı (g/l) üzerine bakteriyolojik pepton ve glikozun etkileşimli etkisini gösteren 3 boyutlu yüzey yanıt grafiği.

Optimizasyon sonuçlarına göre *C. saccharophila* hücrelerinin gelişiminin yüksek glikoz konsantrasyonlarından etkilenmediği saptanmıştır. Benzer şekilde, *C. protothecoides* hücrelerinde de 10-80 g/l konsantrasyonlarındaki glikoz seviyelerinde herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir (Shi et al., 1999). Mikroalglerin azot kısıtlı ortamda heterotrofik büyümeye daha kolay adapte olduğu bilindiği için, kullanılan istatistiksel tasarım modelinde bakteriyolojik pepton seviyesi 0,1-1 g/l gibi dar bir aralıkta tutulmuştur (Thomas et al., 1984; Azma et al., 2011). Daha önceden yapılmış bir çalışmada, *C. saccharophila* hücrelerinin dayanabildiği maksimum glikoz konsantrasyonunun 25 g/l olduğu ortaya konmuştur (Tan and Johns, 1991). Bu çalışmada ise *C. saccharophila* hücrelerinin geniş bir glikoz konsantrasyonu aralığında (0-40 g/l) gelişimi incelenmiştir. *Chlorella* türlerinin heterotrofik üretiminde daha yüksek glikoz konsantrasyonlarının kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (Shi et al., 1999; Wu and Shi, 2007). Dolayısıyla, hangi konsantrasyonda inhibisyon etkisinin olduğunu belirlemek için geniş bir aralıkta tarama yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada elde edilen optimizasyon sonuçlarına göre, *C. saccharophila* hücrelerinin büyümesinde yüksek glikoz konsantrasyonlarının inhibe edici etkisinin olmadığı, hatta daha yüksek kuru hücre ağırlıklarının elde edildiği saptanmıştır.

Optimizasyon amaçlı yapılan deney tasarımı yaklaşık olarak 8 gün sürmüştür ve deneme sonunda erlenlerin çoğunun durağan fazda oldukları belirlenmiştir. Erlenlerdeki büyüme durduğunda, ortamda hala kullanılmamış glikoz ve gliserol olduğu belirlenmiştir. Bu da, ortamda karbon dışında kısıtlama yaratan başka bir besin kaynağının (azot gibi) olduğunun göstergesidir. Glikoz ve

gliserolün aynı ortamda olduğu denemelerde, hücre veriminin 0,11-0,18 g hücre/g (glikoz ve gliserol) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, sadece glikoz içeren ortamlardaki glikoz veriminin 0,15-0,25 g hücre/g glikoz olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu değerler, Shi et al (1999) tarafından *C. protothecoides* ile yapılan sonuçlara göre daha düşük kalırken; *C. saccharophila* ile gerçekleştirilen diğer bir çalışmada elde edilen değerlere yakın olduğu saptanmıştır (Tan and Johns, 1991).

Bu çalışmada, *C. saccharophila* hücrelerinin karbon kaynağı olarak gliserolü daha az tercih ettikleri saptanmıştır. Benzer davranış farklı glikoz ve gliserol konsantrasyonlarında kültüre alınmış *C. vulgaris* hücrelerinde de görülmüştür. Karbon kaynaklarının her ikisinin de düşük düzeyde olduğunda, glikoz varlığında kuru hücre ağırlığının daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Liang et al., 2009). Benzer şekilde, bazı *Chlorella* türleri için de gliserol tercihi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, O'Grady and Morgan (2010) tarafından yapılan çalışmada *C. protothecoides* hücrelerinin pek çok organik substratı eş zamanlı şekilde tükettiği saptanmıştır. Heredia-Arroya et al (2010) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, *C. vulgaris* hücrelerine gliserolün kısıtlayıcı etkide bulunduğu, asetatin ise hücreler tarafından aktif bir şekilde tüketildiği ortaya konmuştur. Bu çalışmaya göre ise, *C. saccharophila* hücrelerinin gliserolü kullanabildiği belirlenmiştir. Fakat, glikoz üzerindeki hücre büyümesi her zaman gliserolden daha yüksek olmuştur.

Çizelge 4.6'da da görüldüğü gibi bazı denemelerde (2,4,12,13,14,15 no'lu) biyokütle verimliliği 0,055-0,125 g/l.gün arasında değişmektedir. O'Grady and Morgan (2010) yaptıkları çalışmada, *C. protothecoides* için glikoz ve gliserol üzerinden daha yüksek biyokütle verimlilikleri elde etmişlerdir. Bu çalışmada yüksek biyokütle verimliliklerine sahip bazı erlenlerin toplam yağ miktarı ve yağ asidi kompozisyonları Çizelge 4.6'da görülmektedir. Heterotrofik olarak kültüre alınmış *C. saccharophila* hücrelerinin toplam yağ içeriklerinin %27-37 (g/g) arasında değiştiği görülmektedir. Bu değer yeşil mikroalgler için ortalama bir yağ miktarı değeri olan %23'den daha fazladır (Griffiths and Harrison, 2009). Diğer taraftan, heterotrofik olarak kültüre alınmış *C. protothecoides* hücrelerinin toplam yağ içeriğinin %50 olduğu saptanmıştır (Xu et al., 2006; Shen et al., 2009). Sonuçlardaki bu farklılığın, kullanılan *Chlorella* türlerindeki ve kültür koşullarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, heterotrofik olarak kültürlenmiş *C. saccharophila* hücrelerinde tanımlanan yağ asidi metil esterleri sırasıyla miristik asit (C14:0), palmitic asit (C16:0), stearik asit (C18:0), oleik asit (C18:1), linoleik asit (C18:2) ve α -linolenik asit (C18:3)

olmuştur (Çizelge 4.6). Toplam yağ kompozisyonu içerisinde, oleik asit ve linoleik asit metil esterlerinin benzer oranlarda bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca, Çizelge 4.5’den de görülebileceği gibi toplam yağ asitleri kompozisyonunun %50-60 kadarını C18:1 ve C18:2 oluşturmaktadır. Tan and John (1991) yaptıkları çalışmada *C. saccharophila* için benzer bir yağ asidi kompozisyonu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmadan farklı olarak, linoleik asitin (C18:2) toplam yağ kompozisyonu içerisinde daha baskın bir miktarda bulunduğunu belirtmişlerdir. Pek çok araştırmacı *Chlorella* türü için benzer kalitatif yağ asidi kompozisyonu (C14:0; C16:0; C16:1; C16:3; C18:0; C18:1; C18:2; C18:3) ortaya koymuş ve toplam yağ asidi içerisinde bu yağ asitlerinin değişen oranlarının suş farklılığından veya kültür koşullarındaki farklılıktan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (Petkov and Garcia, 2007; Griffiths and Harrison, 2009).

Çizelge 4.6 Heterotrofik olarak kültüre edilen *C. saccharophila*’nın yanıt olarak kuru hücre ağırlığı alınan Box-Behnken deneme desenindeki bazı erlenlerin toplam yağ miktarları (%w/w) ve yağ asidi kompozisyonları (%TFA).

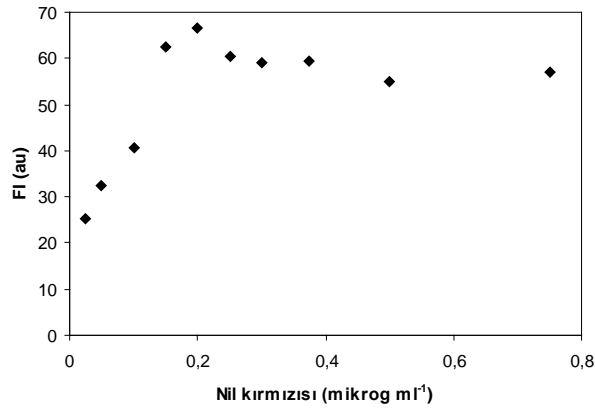
Erlen #	Glikoz (g/l)	Gliserol (g/l)	B. pepton (g/l)	Kuru ağırlık (g/l)	Toplam yağ (%g/g)	Yağ asidi kompozisyonu (%TFA)					
						C:14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
2	40	0	0,55	0,95	36,3	2,7	17,6	4,9	32,2	31,1	9,8
4	40	10	0,55	0,65	26,7	4,7	22,9	5,9	26,2	27,2	9,7
8	40	5	1,00	1,10	37,0	2,2	21,3	5,2	28,8	30,1	9,9
13	20	5	0,55	0,45	29,5	2,8	23,5	3,9	27,8	28,6	10,9
14	20	5	0,55	0,82	31,0	10,2	22,7	11,6	23,4	22,7	5,9
15	20	5	0,55	0,65	31,0	13,1	24,2	8,8	21,1	23,3	8,8

4.3.4 *C. saccharophila* hücrelerinde nil kırmızısı kullanılarak floresan ölçümüne dayalı toplam yağ miktarının belirlenmesi

Gravimetrik yöntemle toplam yağ miktarı tayini amacıyla hegzan, kloroform, etilasetat, metanol gibi solventler kullanılmaktadır. Bu tür solventler hem kullanımı sırasında, hem de sonrasında atık olarak çevre ve insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Ayrıca ekstraksiyon prosedürü sırasında, biyokütledeki tüm yağların bozulmadan ve herhangi bir taşıyıcı ugramadan ekstrakte edilmesi gerekir. Bu da son derece maliyetli, emek ve zaman isteyen bir çalışmadır (Kimura et al., 2004).

Floresan spektrofotometreye dayalı olarak yağ miktarı tayini ise gravimetrik yöntemle göre daha basit bir yöntemdir. Solvent kullanılmaması, daha kısa sürede ve çok daha az miktarlarda örneklerle sonuç alınması avantajları arasındadır (Lee et al., 1998; Kimura et al., 2004; Huang et al., 2009). Bu metotta, nil kırmızısı boyası kullanılarak, hücre içi ve hücre organellerinde bulunan yağ damlacıkları boyanarak, yağ miktarının kantitatif ve kalitatif tayinine olanak sağlamaktadır (Alonzo and Mayzoud, 1999). Mikroalg türleri ve ölçüm koşullarına göre, nil kırmızısı boyasının hücre içine penetrasyonu ve yağ globüllerine bağlanması farklı şekillerde etkilenmektedir (Chen et al., 2009). Bu çalışmada, *C. saccharophila* hücrelerinin nötral yağ içeriğini belirlemek amacıyla nil kırmızısının kullanıldığı detaylı bir protokol geliştirilmiştir.

Çalışmalara öncelikle, nötral yağ standardı triolein için uygun eksitasyon ve emisyon dalga boylarının taranması ile başlanmıştır. Triolein çözeltisi isopropanol içerisinde 2 mg/ml stok konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Farklı araştırmacılar tarafından farklı dalga boyları kullanılmıştır (Chen et al., 2009; Huang et al., 2009). Nötral yağ içeriğinin belirlenmesinde kullanılan dalga boyları 470 nm ile 530 nm arasında değişmektedir (Elsey et al., 2007; Chen et al., 2009; Huang et al., 2009). Bu çalışmada yapılan taramalar sonucunda, daha sonraki aşamada ise, çözeltideki optimum nil kırmızısı konsantrasyonu belirlenmiştir. Çalışmalarda tampon çözelti olarak, hücreler için toksik olmayan izotonik PBS (Phosphate Buffered Saline) kullanılmaktadır. Isopropanolde çözünen nil kırmızı artan konsantrasyonlarda hazırlanarak floresan şiddetleri (FI) okunmuş ve optimum nil kırmızısı konsantrasyonu 0,2 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). Belirlenen bu nil kırmızısı konsantrasyonu daha önceki bir çalışmada *C. vulgaris* için belirlenen konsantrasyondan biraz daha fazladır (Chen et al., 2009).

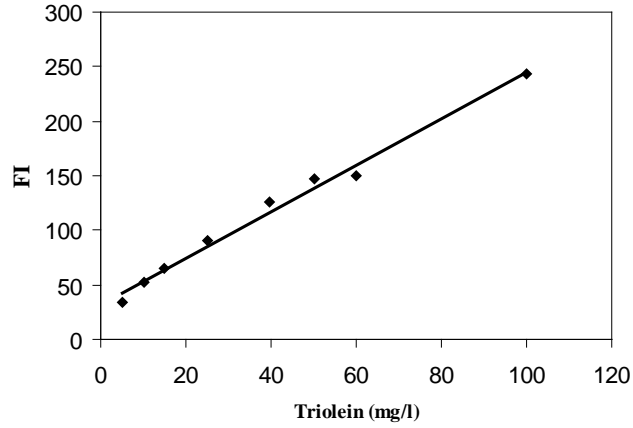


Şekil 4.6 Optimum nil kırmızısı konsantrasyonunun belirlenmesi.

Optimum NR konsantrasyonunun belirlenmesinden sonra, nötral yağ standardı triolein, artan konsantrasyonlarda hazırlanarak floresan şiddetine karşın yağ konsantrasyonu kalibrasyon grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.7). Elde edilen kalibrasyon eğrisi denklemi;

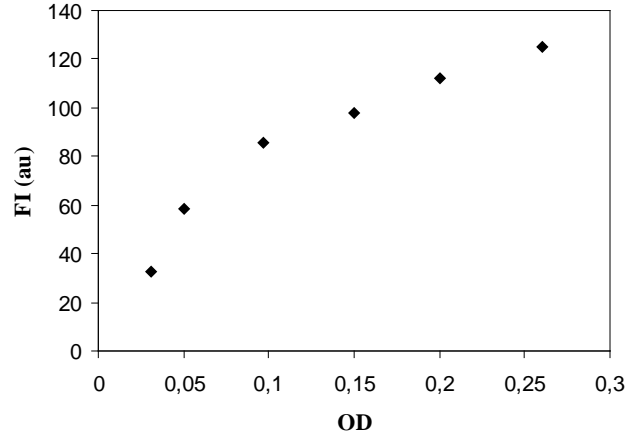
$$FI \text{ (a.u)} = 2.1294 \times \text{triolein konsantrasyonu (mg/l)} + 32.297; R^2 = 0.99$$

şeklindedir Denklem 9



Şekil 4.7 Çözelti içerisindeki triolein konsantrasyonuna karşılık floresan şiddeti kalibrasyon grafiği

Hücre konsantrasyonunun NR ile nötral yağ ölçüm metodu üzerine etkisini belirlemek için liyofilize *C. saccharophila* hücreleri OD_{700nm} değerleri 0,03-0,4 konsantrasyon aralığında PBS içerisinde hazırlanmıştır. Farklı OD_{700nm} değerlerinin kuru ağırlık (g/l) cinsinden karşılıkları Denklem 7'ye göre hesaplanmıştır. Farklı OD_{700nm} konsantrasyonlarında hazırlanan algal süspansiyonlara 45 saniye sonikasyon uygulandıktan sonra karanlık koşullarda NR (0,2 µg/ml) ilavesi yapılmış ve floresan spektrofotometrenin 96 gözlü mikropkaya okuyucusuna artan konsantrasyonlarda yerleştirilmiştir. Hücre konsantrasyonu ile relatif floresan şiddeti arasındaki ilişki Şekil 4.8'de verilmiştir.



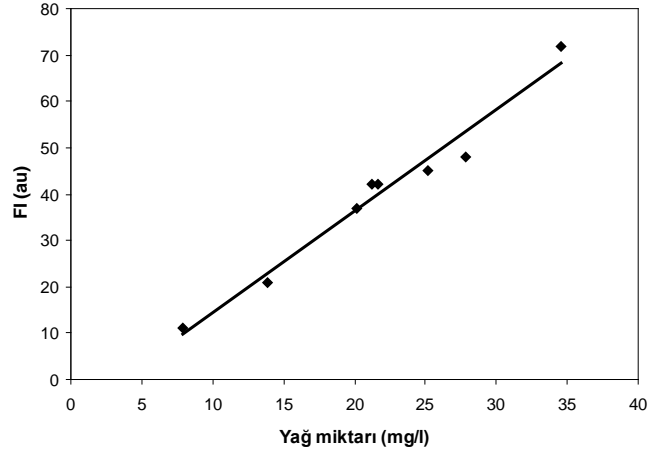
Şekil 4.8 *C. saccharophila* hücrelerinde farklı optik yoğunluklardaki hücelere (OD_{700nm}) karşılık floresan şiddetindeki değişim.

Nil kırmızı ile boyanan *C. saccharophila* hücrelerinin OD_{700nm} değeri 0,03-0,10 arasında lineerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu sebeple OD_{700nm} 0,05 değeri *C. saccharophila* hücreleri floresan ölçümlerinde kullanılabilir optimum konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Benzer olarak yapılan başka bir çalışmada, *C. vulgaris* hücrelerinin nil kırmızısı ile boyama prosedüründe OD_{700nm} değeri 0,06 en uygun konsantrasyon olarak belirlenmiştir (Huang et al., 2009).

Farklı yağ içeriklerine sahip 8 farklı *C. saccharophila* kültürü hücre yoğunluğu OD 0,050 olarak ayarlanarak nil kırmızısı ile boyanmıştır. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, bu örneklerin relatif floresan şiddeti ölçümlerine karşılık gravimetrik ölçümle gerçekleştirilen toplam yağ miktarı kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrisi denklemi;

$$FI (a.u) = 2.19 * Yağ miktarı (mg/l) - 7.56; \quad R^2 = 0.97 \quad \text{şeklindedir}$$

Denklem 10



Şekil 4.9 *C. saccharophila* hücrelerinin (OD= 0,050) nötral yağ içeriklerinin floresan ölçümleri ile kalibrasyonu.

4.3.5 Kesikli biyoreaktörde (2 litrelik) üretim

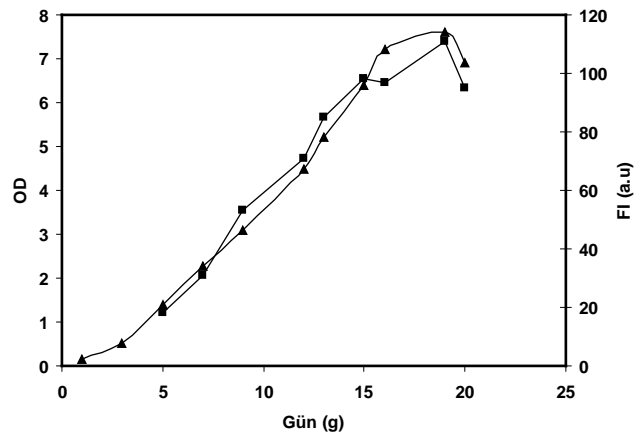
Kesikli üretimler 2 litrelik biyoreaktörde Bristol ortamında optimum karbon (glikoz, 20 g/l) ve azot (bakteriyolojik pepton, 1g/l) kaynakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10). Çalışmanın bu kısmında amaç, kesikli biyoreaktör üretimiyle *C. saccharophila*'yı yüksek hücre yoğunluklarında elde etmektir. Ayrıca, reaktördeki üretim boyunca yağ miktarının, *C. saccharophila* için geliştirilen nil kırmızısı metoduyla takibi yapılacaktır.

Zamana karşılık OD ve FI değerleri Şekil 4.11'de verilmiştir. İlk 7 gün boyunca büyümenin, 0,44 1/gün spesifik büyüme hızıyla logaritmik olarak sürdüğü görülmektedir. Bu noktadan sonra, biyokütle konsantrasyonunun lineer olarak artmaktadır. Bu durumun tanımlanamayan bazı besin limitasyonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ondokuzuncu günden sonra büyüme hızının düştüğü gözlenmektedir (Şekil 4.11). Bu arada glikoz tüketimlerine bakıldığında, glikozun tam olarak harcanmadığı ve hala 9,6 g/l glikozun ortamda bulunduğu saptanmıştır. Glikoz üzerinden verim ($Y_{X/S}$) 0,33 g/g ve biyokütle verimliliği 0,165 g/l.gün olarak bulunmuştur. Bu değerlerin aynı ortam koşullarındaki erlen üretimlerinden (0,15 g/g ve 0,125 g/l.gün) daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca bu değerler, 1 litrelik fermentörde, 0,15 vvm havalandırmayla kültüre edilen *C. saccharophila* hücrelerinin verim ve verimlilik değerlerinin üzerinde olduğu saptanmıştır (Tan and Johns, 1991). Bu iki çalışma arasındaki farklılığın, yetiştirme koşullarındaki değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada 250 rpm mekanik karıştırma ve 1 vvm havalandırma kullanılmıştır.

Yüksek havalandırma hızlarının ve mekanik karıştırmanın da belli bir üst limite kadar mikroalgal büyüme için gerekli olduğu bilinmektedir (Tan and Johns, 1991; Sobczuk et al., 2006).



Şekil 4.10 *C. saccharophila* hücrelerinin 2 l'lik kesikli biyoreaktörde heterotrofik koşullarda üretimi.



Şekil 4.11 *C. saccharophila* hücrelerinin 2 l'lik kesikli biyoreaktör üretiminde büyüme (OD), floresan şiddeti cinsinden toplam yağ miktarındaki (FI) değişim. (▲, OD; ■, FI).

Nil kırmızı ile floresan ölçümüne dayanan yağ miktarı ölçümleri 5. günden başlayarak 20. güne kadar devam etmiştir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi, toplam yağ içeriği 5. günden başlayarak artış göstermiş ve en son 111 relatif floresan şiddetine ulaşmıştır. Bu değer, 18. günün sonunda hücrelerin yağ içeriğinin %54 (g/g) olduğunun göstergesidir. Ondokuzuncu günden sonra toplam yağ içeriğinde

düşüş gözlenmiştir. Bu sebeple üretim sonlandırılmıştır. Şekil 4.11'den de görüldüğü gibi yağ üretim eğrisi biyokütle üretim eğrisi ile benzerlik göstermektedir. Bu sebeple yağ üretiminin büyüme ile bağlantılı olduğu söylenebilir. Bu çalışmada görülen büyüme ile bağlantılı yağ üretimi, fotoheterotrofik koşullarda *C. minutissima* için geliştirilen modelde de görülmektedir (Yang et al., 2011). *C. saccharophila* için geliştirilen nil kırmızısıyla floresan ölçümüne dayanan toplam yağ miktarı tayini üretimin ne zaman sonlandırılacağına dair kolaylık sağlamaktadır. Bu yöntemin endüstriyel üretimlerde de kolaylıkla kullanılabilmesi gözönüne alınırsa, çalışmanın bu yönüyle de proseslere katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

C. saccharophila hücrelerinin fototrofik koşullardaki büyüme karakteristikleri de bu çalışma kapsamında araştırılmıştır. Fototrofik hücreler, heterotrofik hücrelerle karşılaştırıldığında daha yavaş bir büyüme göstermişlerdir. Yirmiiki günlük kültür süresi sonunda 0,4 g/l kuru biyokütle elde edilmiştir. Biyokütle konsantrasyonu açısından fototrofik ve heterotrofik kültürasyonlar arasındaki bu farklılık çeşitli nedenlere bağlanabilir. Öncelikle, fototrofik koşullardaki hücre konsantrasyonu ile ters orantılı olan ışık penetrasyonu nedeniyle yüksek hücre yoğunluklarına ulaşılması çok zor olmaktadır (Azma et al, 2011). İkinci faktör olarak ise, fototrofik kültürlemedeki düşük enerjili büyüme verimi söylenebilir. Bu sonuç, *Chlorella pyrenoidosa* hücreleri için de önceki çalışmalarda saptanmıştır (Yang et al., 2000). *C. pyrenoidosa* hücrelerindeki metabolik akı çalışmalarında, mikroalgal hücrelerin heterotrofik ve miksotrofik koşullarla karşılaştırıldığında, fototrofik koşullarda absorbe edilen enerjinin çok azının ATP'ye dönüştürüldüğü belirlenmiştir. Bu da demek oluyor ki, organik besinlerle karşılaştırıldığında, ışık enerjisinin yakalanması ve hücreler tarafından ATP'ye dönüştürülmesi daha zor olmaktadır (Yang et al., 2000).

Fototrofik ve heterotrofik hücrelerin farklı yağ içerikleri ve yağ asidi kompozisyonlarına da sahip oldukları belirlenmiştir. Heterotrofik koşullarda *C. saccharophila* hücrelerinin (%54, g/g) fototrofik koşullardaki hücrelerle (%18, g/g) karşılaştırıldığında 3 kat daha fazla yağ içeriğine sahip oldukları saptanmıştır. Heterotrofik koşullarda fototrofik koşullara göre sadece biyokütle verimliliği açısından değil, ayrıca hücre içi yağ miktarı bakımından da yüksek değerler elde edildiği bilinmektedir (Xu et al., 2006; Yang et al., 2011). Bunun da heterotrofik koşullarda depo yağlarının artmasını sağlayan karbon kaynaklarının bolluğundan dolayı olduğu düşünülmektedir (Tan and Johns, 1991). *C. saccharophila* hücrelerinin bu yüksek yağ içeriği dolayısıyla, heterotrofik kültürasyonla

biyoyakıt üretiminde kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir. Mikroalgal yağların sıvı yakıt kaynağı olarak rekabet edebilir düzeyde olması için yüksek yağ oranlarına (biyokütlenin %50-60'ı kadar) sahip olması gerekmektedir (Yang et al., 2000). Toplam yağ miktarındaki farklılıklarla beraber, heterotrofik ve fototrofik *C. saccharophila* hücreleri arasında yağ kompozisyonu açısından da kantitatif farklılıklar olduğu saptanmıştır. Heterotrofik kültürlerde, oleik asit (C18:1) ve linoleik asit (C18:2) başlıca doymamış yağ asitleri olup toplam yağ asitleri içerisinde sırasıyla %34,4 ve %30,1 oranlarında buldukları belirlenmiştir. α -linolenik asit (C18:3) ise en çok bulunan 3. doymamış yağ asididir. En çok bulunan doymuş yağ asidi ise %13,3'lük oranıyla palmitik asit (C16:0) olarak belirlenmiştir. *C. saccharophila* hücrelerinin heterotrofik ortamda daha yüksek oranda C18 yağ asitlerini içerdiği ortaya konmuştur. Buna karşılık, fototrofik kültürlerde yüksek oranda C16:0 (%29,6) bulunduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar Tan and Johns'un (1991) yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir. *C. saccharophila* hücrelerinin biyodizel üretimi için uygun bir tür olduğu düşünülmektedir. Çünkü toplam yağ asitlerinin %30'u C16:0-C18:1'den oluşmaktadır. Bunun yanısıra, yüksek linoleik asit ve α -linolenik asit gibi esansiyel yağ asitlerinin yüksek oranlarda (%30-42) içermesi dolayısıyla, *C. saccharophila* hücrelerinin insan ve hayvan beslenmesinde de kullanılabileceği düşünülmektedir. Ortam koşulları ve çevresel koşulların mikroalglerin toplam içeriği ve kompozisyonunu etkilediği bilinmektedir (de Swaaf et al., 2003a, b; Liang et al., 2009; Heredia-Arroyo et al., 2010).

Çalışmanın bu kısmında, *C. saccharophila* hücrelerinin heterotrofik üretiminde yüksek biyokütle ve yağ verimliliklerinin elde edilebildiği ortaya konmuştur. Hücrelerin ortamdaki karbon ve azot konsantrasyonlarına bağlı olarak farklı büyüme karakteristikleri, yağ içerikleri ve kompozisyonlarına sahip oldukları saptanmıştır. *C. saccharophila* hücrelerinin heterotrofik koşullardaki optimum gelişimleri için gerekli olan besin elementlerinin optimizasyonu istatistiksel metodlarla ortaya konmuştur. Bu optimizasyon sonucunda, glikoz ve bakteriyolojik peptonun hücre kuru ağırlığı üzerindeki etkisinin karşılıklı etkileşimli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *C. saccharophila* hücrelerinde yüksek glikoz konsantrasyonlarında büyüme hızlarında artış görülmüştür. Ayrıca, *C. saccharophila* hücrelerinin karıştırmalı tank biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerinde fototrofik kültürlerine göre daha yüksek oranda doymamış yağ asitleri elde edilmiştir. *C. saccharophila* hücrelerinin yağ asidi kompozisyonu gözönüne alındığında, biyodizel üretimi için uygun bir kaynak olduğu düşünülebilir. Bu çalışmada, *C. saccharophila* için geliştirilen nil kırmızısı

metoduyla hücre içi yağ üretiminin proses boyunca takibi kolaylıkla sağlanmaktadır. Bu metot, araştırmacılar tarafından potansiyel yağ üreticisi mikroalglerin kolay ve hızlı bir şekilde taranmasına imkan sağlayacaktır.

4.4 Heterotrofik Koşullarda Kültüre Edilen *Crypthecodinium cohnii* ile Yapılan Çalışmalar

4.4.1 Besinsel ve çevresel faktörlerin biyokütle, yağ verimliliği ve yağ kompozisyonu açısından etkilerinin incelenmesi

C. cohnii yağ üreticisi heterotrofik dinoflagellat türüdür. *C. cohnii*'deki toplam yağ asitlerinin yarısına yakını, çoklu doymamış yağ asitlerinden biri olan DHA'den oluşmaktadır (De Swaaf et al., 1999; De Swaaf et al., 2003a,b; Ratledge et al., 2001). *C. cohnii* hücrelerinin toplam yağ içeriğinin genelde kuru ağırlığın %10-20'si şeklinde olduğu belirtilmiştir (De Swaaf et al., 1999; De Swaaf et al., 2003a; Mendes et al., 2007). Diğer taraftan, karbon kaynağı olarak asetik asit veya etanol kullanıldığında toplam yağ miktarının kuru ağırlığın %40'nı geçtiği saptanmıştır (De Swaaf et al., 2003b; Ratledge et al., 2001). Toplam yağın %70'nin nötral yağlardan oluştuğu ortaya konmuştur (de la Jara et al., 2003). Yağ asitleri içerisinde DHA yanısıra laurik asit (C12:0), miristik asit (C14:0), palmitik asit (C16:0), palmitoleik asit (C16:1), stearik asit (C18:0) ve oleik asit (C18:1) bulunmaktadır (Jiang and Chen, 2000a,b). *C. cohnii* hücrelerinin ayrıca, özel bir tip nişasta olan "floridean" şeklinde depoladığı da ortaya konmuştur (Pleissner and Eriksen, 2012).

Mikroalglerde yağ ve nişasta depolanması besin kısıtlanmasından kaynaklanmaktadır (Griffiths and Harrison, 2009; Chen et al., 2011; Pleissner and Eriksen, 2012). *C. cohnii* ile yağ üretimi üzerine çalışmalar karbon kaynağı olarak glikoz, asetik asit ve etanol kullanılan kesikli, yarı kesikli ve pH-stat sistemlerle gerçekleştirilmiş ve organizmada yağ üretimi üzerine besin limitasyonunun etkisi ortaya konmuştur (De Swaaf et al., 1999; De Swaaf et al., 2003a,b; Ratledge et al., 2001). De Swaaf et al (1999) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *C. cohnii* hücrelerinin glikoz kullanılan kesikli üretiminde toplam yağ içeriği ile maya ekstraktı konsantrasyonu arasında ters bir ilişki olduğu saptanmıştır. Diğer araştırmacılar ise, karbon kaynağı olarak asetik asit veya etanol kullanan *C. cohnii* hücrelerinin glikoz kullananlara göre daha yüksek yağ miktarına sahip olduklarını ortaya koymuşlardır (De Swaaf et al., 2003a,b; Ratledge et al., 2001). *C. cohnii*

hücrelerinde en yüksek yağ üretiminin ise asetik asidin titrant olarak kullanıldığı pH-stat sistemiyle elde edildiği belirtilmiştir (Ratledge et al., 2001).

Farklı besin elementlerinin *C. cohnii* yetiştiriciliğinde kullanılması, hem büyüme hem de yağ üretimi açısından etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Örneğin karbon kaynağı olarak gliserol, *C. cohnii* yetiştiriciliğinde potansiyel bir karbon kaynağı olarak düşünülebilmektedir. Gliserol, biyodizel üretiminde açığa çıkan bir yan üründür ve biyodizel üretimindeki hızlı gelişmelerle miktarı gittikçe artmaktadır. Dolayısıyla araştırmacılar bu yeni kaynak için farklı kullanım alanları bulmaya çalışmaktadırlar (Chi et al., 2007). Yağ üretimi amaçlı kültüre edilen pek çok mikroalg için gliserol kullanım alanı bulmaya başlamıştır (Ceron Garcia et al., 2000; Chi et al., 2007). Bazı araştırmacılar, *C. cohnii* hücrelerinin de gliserolü kullanabildiğini belirtirken (Mendes et al., 2009); diğer araştırmacılar gliserol üzerinde önemli bir büyüme görülmediğini ortaya koymuşlardır (De Swaaf et al., 1999). Bu çalışmalardan başka, *C. cohnii* yetiştiriciliğinde gliserol kullanımının büyüme ve yağ üretimine etkilerinin incelendiği bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Mikroalgal yağ üretiminde çevresel faktörlerin de (pH, sıcaklık, karıştırma hızı, çözülmüş oksijen konsantrasyonu gibi) yağ üretimi üzerinde son derece önemli etkileri olduğu ortaya konmuştur. Da Silva et al (2006) oksijen vektörü (n-dodekan) kullanarak, hidrokarbonun *C. cohnii* hücrelerinin büyüme ve DHA üretimine etkilerini belirlemişlerdir. Fermentasyonun 86,7. saatinden sonra içerisinde %1 (v/v) n-dodekan bulunan reaktörde biyokütle konsantrasyonunun, spesifik büyüme hızının, DHA ve toplam yağ asidi üretiminin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Jiang and Chen (2000b) ise *C. cohnii* hücrelerinin gelişimi ve DHA üretimi üzerine pH'nın etkisinin önemli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mikrobiyal prosesler son derece komplekstirler. Pek çok faktörden ve bu faktörlerin etkileşimlerinden etkilenmektedirler (Mandenius and Brundin, 2008; Azma et al., 2011). Özellikle faktörler arasındaki etkileşimin dikkate alınmadığı klasik yöntemler *C. cohnii* yetiştiriciliğinde de en çok kullanılan yöntemlerden olmuştur (de Swaaf et al., 1999; Jiang and Chen 2000a,b). İstatistiksel tasarım yöntemleri, sadece optimizasyon amaçlı değil, faktörlerin ayrı ayrı ve birbirleriyle etkileşimlerinin yanıtlar üzerinde etkilerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2009). *C. cohnii* yetiştiriciliğinde biyokütle, yağ veya DHA üretiminin bu tür istatistiksel tasarım metodları kullanılarak ortam ve/veya çevre koşullarının optimizasyonuna yönelik çalışmalara rastlanmamıştır.

Çalışmanın bu kısmında, *C. cohnii* hücrelerinin gelişimi üzerine etkili olan besinsel ve çevresel faktörlerin ortaya konması, hem biyokütle hem yağ üretimi açısından optimizasyonlarının gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Gerçekleştirilen kesikli biyoreaktör üretimleriyle çeşitli ortam parametrelerinin etkileri (pH, sıcaklık, karıştırma hızı gibi) ortaya konmaya çalışılmıştır. Ayrıca farklı işletim sistemlerinin (kesikli beslemeli, sürekli gibi) biyokütle ve yağ verimliliği açısından karşılaştırılması hedeflenmiş ve ölçek büyütme çalışmaları tamamlanmıştır.

4.4.2 Hücre sayısı, optik yoğunluk ve kuru hücre ağırlığı arasındaki korelasyon

Büyümeyi takip etmek için, *C. cohnii* hücrelerinde hücre sayısı ve optik yoğunluk arasında aşağıda görülen kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. Buna göre;

$$\text{Hücre sayısı } (*10^4/\text{ml}) = 128,33\text{OD}_{700} \quad R^2 = 0.99 \quad \text{şeklindedir.}$$

Denklem 11

C. cohnii hücrelerinde hücre sayısı ve kuru ağırlık (g/l) arasında ise aşağıda görülen kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. Buna göre;

$$\text{Hücre sayısı } (*10^4/\text{ml}) = 89,023 * \text{kuru ağırlık (g/l);} \quad R^2 = 0.99$$

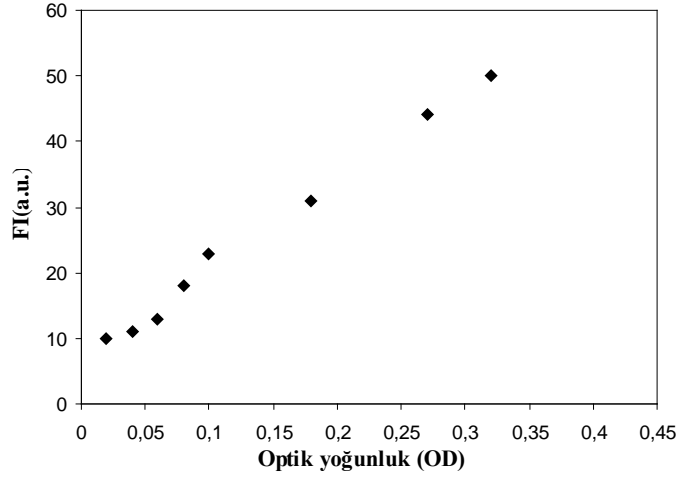
şeklindedir. Denklem 12

4.4.3 Nil kırmızısı kullanılarak floresan ölçümüne dayalı toplam yağ miktarının belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında, *C. cohnii* hücrelerinin nötral yağ içeriğini belirlemek amacıyla nil kırmızısının kullanıldığı detaylı bir protokol geliştirilmiştir.

Öncelikle *C. cohnii* hücre konsantrasyonunun, floresan spektrofotometre ile kantitatif olarak yağ miktarına etkisini belirlemek amacıyla liyofilize hücreler optik yoğunluk ($\text{OD}_{700\text{nm}}$) değerleri 0,05-0,400 arasında PBS tamponuyla 2 ml'lik Eppendorf tüplerinde hazırlanmıştır. Farklı $\text{OD}_{700\text{nm}}$ konsantrasyonlarında hazırlanan algal süspansiyonlara 15 saniye sonikasyon uygulandıktan sonra karanlık koşullarda nil kırmızısı konsantrasyonu 0,2 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde ilave

edilerek (Bkz. Materyal ve Metot 3.2.6) floresan spektrofotometrenin 96 gözlü mikropilaya okuyucusuna artan konsantrasyonlarda yerleştirilmiştir. Nötral yağlar için nil kırmızısı ile belirlenmiş eksitasyon dalga boyu 500 nm ve emisyon 575-580 nm (Bkz. Materyal ve Metot 3.2.6) dalga boyundaki FI ölçülerek, artan hücre konsantrasyonuna karşılık FI belirlenmiştir (Şekil 4.12).



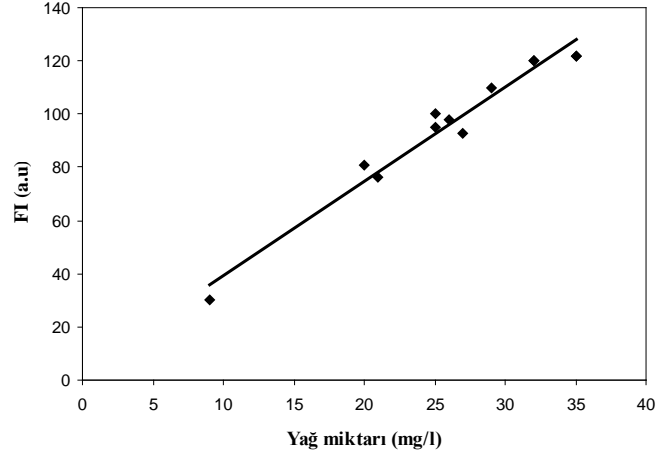
Şekil 4.12 *C. cohnii* hücrelerinde farklı optik yoğunluklardaki hücrelere (OD_{700nm}) karşılık floresan şiddetindeki değişim.

Nil kırmızı ile boyanan *C. cohnii* hücrelerinin OD_{700nm} değeri 0,05-0,1 arasında lineerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu sebeple OD_{700nm} 0,1 değeri *C. cohnii* hücreleri floresan ölçümlerinde kullanılabilir optimum konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Farklı yağ içeriklerine sahip liyofilize 8 farklı *C. cohnii* kültürü, hücre yoğunluğu OD 0,1 olarak ayarlanarak nil kırmızısı ile boyanmıştır. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi, bu örneklerin FI ölçümlerine karşılık gravimetrik ölçümle gerçekleştirilen toplam yağ miktarları kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrisi denklemi;

$$FI(a.u.) = 3,52 * \text{Yağ miktarı (mg/l)} + 4,3; R^2 = 0,96$$

şeklindedir.

Denklem 13



Şekil 4.13 *C. cohnii* hücrelerinin (OD= 0,1) nötral yağ içeriklerinin floresan ölçümleri ile kalibrasyonu

4.4.4 Kültür ortamındaki karbon, azot ve fosfat kaynaklarının optimizasyonu

Azot, karbon ve fosfor kaynakları mikroalgal gelişimi etkileyen en önemli 3 besin grubudur (Chen and Chen, 2006). Mikroalglerin yaklaşık %45'i karbondan oluşmaktadır. Karbon kaynağı ve konsantrasyonu *C. cohnii* hücrelerinde de hem biyokütle hem de yağ verimliliklerini önemli derecede etkilemektedir (Jiang and Chen, 2000b; Ratledge et al., 2001; Mendes et al., 2007). Azot ise mikroalglerde yağ üretimini etkileyen ikinci kritik besin elementidir (Brennan and Owende, 2010). Pek çok çalışmada mikroalglerde yağ üretiminin azot yokluğunda tetiklendiği belirtilmiştir (de Swaaf et al., 1999; Dean et al., 2010; Lv et al., 2010). Fosfor, mikroalgal büyümede önemli olan bir diğer besin elementidir. Araştırmacılar sulardaki algal çoğalmayı sudaki azot ve fosfor konsantrasyonunun artmasından kaynaklandığını ortaya koymuşlardır (Li et al., 2011). Dolayısıyla, yüksek biyokütle verimliliklerine ulaşabilmek için, mikroalgal kültür ortamındaki karbon, azot ve fosfor kaynaklarının optimize edilmesi gerekmektedir. *C. cohnii* yetiştiriciliğinde en yaygın kullanılan azot kaynağı maya ekstraktı olmuştur (de Swaaf et al., 1999; Ratledge et al., 2001; Mendes et al., 2007).

Bu çalışmada, kültürlerin çoğaltılmasında kullanılan ATCC 460 A2E6 ortamında azot kaynağı olarak glutamik asit, fosfor kaynağı olarak ise sodyum β -gliserofosfat bulunmaktadır. *C. cohnii* kültür ortamındaki etkileri belirlenecek ve optimize edilecek tasarım parametreleri maya ekstraktı, glutamik asit ve sodyum β -gliserofosfat olarak belirlenmiştir. Tüm tasarım parametrelerinin minimum ve

maksimum değerleri belirlenerek merkezde 4 tekrarlı deney ile toplam 16 farklı kombinasyondan oluşan Box-Behnken deneme deseni Design Expert 7.0.0 programı kullanılarak oluşturulmuştur. Kuru hücre ağırlığı (g/l) tasarımda yanıt olarak alınmıştır. Tasarımdaki farklı kombinasyonlara ait her bir sonuç Çizelge 4.7’de görülmektedir.

Çizelge 4.7 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen Box-Behnken deneme desenine ait, bağımsız değişkenlerin (maya ekstraktı, glutamik asit, sodyum β -gliserofosfat) gerçek değerleri ve elde edilen yanıtlar (kuru hücre ağırlığı, g/l).

Bağımsız değişkenler (g/l)	Sembol	Kodlanmış faktörlerin gerçek değerleri		
	Kodlanmış	-1	0	1
Glutamik asit	X_1	0,1	1,05	2
Sodyum β -gliserofosfat	X_2	0,15	0,53	0,90
Maya ekstraktı	X_3	0,1	1,05	2
Denemeler	X_1	X_2	X_3	Kuru hücre ağırlığı (g/l)
1	1,05	0,53	1,05	3,04
2	2,0	0,15	1,05	3,18
3	0,1	0,53	0,1	1,22
4	1,05	0,53	1,05	3,17
5	1,05	0,15	0,1	1,35
6	0,1	0,9	1,05	3,07
7	1,05	0,53	1,05	3,10
8	0,10	0,53	2,0	4,27
9	2,0	0,53	2,0	4,41
10	1,05	0,90	0,1	1,29
11	1,05	0,90	2,0	3,90
12	1,05	0,53	1,05	3,03
13	2,0	0,90	1,05	3,22
14	0,1	0,15	1,05	3,39
15	1,05	0,15	2,0	3,94
16	2,0	0,53	0,1	1,24

Kuru hücre ağırlığı için kodlanmış faktörler cinsinden matematiksel regresyon modeli şu şekildedir:

$$\text{Kuru hücre ağırlığı (g/l)} = 3,15 + 0,011X_1 - 0,047 X_2 + 1,43 X_3 - 0,45 X_3^2$$

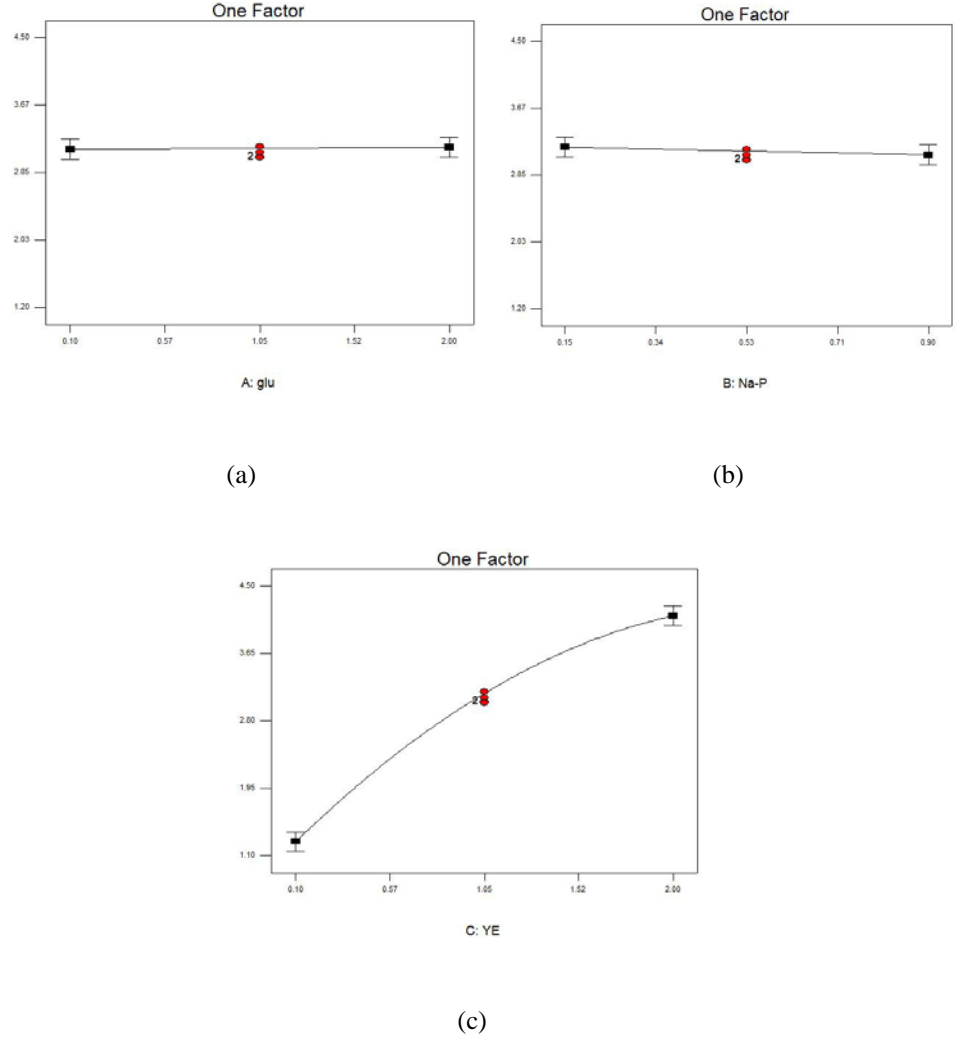
Denklem 14

ANOVA sonuçları Çizelge 4.8’de görülmektedir. Model F değeri (170,18) modelin anlamlı olduğunu göstermektedir ($p < 0,01$). Prob > F değerinin 0.0100’in altında olması da modelin önemli olduğunu bir göstergesidir. ANOVA testi sonuçlarına göre heterotrofik olarak kültüre edilen *C. cohnii*’nin kuru hücre ağırlığı üzerine sadece maya ekstraktının etkisinin önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0,01$). Glutamik asit ve sodyum β -gliserofosfatın ortamda minimum değerlerinde olması gerektiğine karar verilmiştir.

Çizelge 4.8 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen Box-Behnken deneme desenine ait ANOVA sonuçları.

Kaynak	SS	DF	MS	F-değeri	$p > F$
Model	17,1	4	4,27	170,18	<0,0001
X ₁ -Glutamik asit	1,046*10 ⁻³	1	1,046*10 ⁻³	0,042	0,8420
X ₂ -Sodyum β -gliserofosfat	0,018	1	0,018	0,70	0,4202
X ₃ -Maya ekstraktı	16,28	1	16,28	648,23	<0,0001
X ₃ ²	0,80	1	0,80	31,74	0,0002
Artan	0,28	11	0,025		
Uyum eksisiği	0,26	8	0,033	8,15	0,0559
Saf hata	0,012	3	4,05*10 ⁻³		

C. cohnii ile yapılan pek çok çalışmada azot kaynağı olarak tercih edilen maya ekstraktı konsantrasyonunun 1-11,5 g/l arasında değiştiği görülmektedir (de Swaaf et al., 1999; 2003a,b; Mendes et al., 2007). Bu çalışmada, biyokütle üzerine etkisi önemli olan maya ekstraktının ve etkileri önemsiz diğer iki bileşenin model grafikleri Şekil 4.14’de görülmektedir. Maya ekstraktının 1,5 g/l’den sonraki konsantrasyonlarında, artan maya ekstraktı konsantrasyonlarına karşılık, biyokütle miktarında artışın daha yavaş olduğu belirlenmiştir. Yani, maya ekstraktının da belli bir konsantrasyonun üzerinde organizma üzerinde inhibisyon etkide bulunduğu tahmin edilmektedir.



Şekil 4.14 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen Box-Behnken deneme desenine ait bağımsız değişkenlerin ((a) glutamik asit (g/l)- biyokütle (g/l), (b) sodyum β -gliserofosfat - biyokütle (g/l), - (c) maya ekstraktı biyokütle (g/l)) model grafikleri.

Yapılan çalışmalarda *C. cohnii* büyüme ortamında karbon kaynağı olarak genellikle glikoz kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda glikoz ve gliserolün kullanıldığı erlen denemelerine ait sonuçlar Çizelge 4.9'da görülmektedir. Aynı konsantrasyonlarda glikoz ve gliserolün kullanıldığı denemelerde biyokütle verimlilikleri ve toplam yağ miktarı açısından en iyi sonuçlar, karbon kaynağı olarak gliserolün kullanıldığı denemelerde elde edilmiştir. Ayrıca, karbon tüketimlerini takibi amacıyla yapılan HPLC analizi sonuçlarına göre, 8 günlük üretim sonunda glikozun 24 g/l konsantrasyonda bulunduğu ortamda 6 g/l kullanılmayan glikoz kaldığı saptanmıştır. Diğer taraftan, gliserolün 24 g/l konsantrasyonda bulunduğu ortamda 8 günlük üretim sonunda hiç gliserol kalmadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla organizmanın glikoza göre gliserolü daha çok tercih ettiği belirlenmiş ve sonraki denemelerde karbon kaynağı olarak gliserolün kültür ortamındaki konsantrasyonunun optimizasyonu planlanmıştır.

Yapılan varyans analizi sonucunda, glikoz konsantrasyonu 18 g/l, 24 g/l ve 30 g/l arasında biyokütle verimliliği açısından fark olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.9). Fakat, glikozun 24 g/l konsantrasyonundan itibaren ortamda kullanılmayan glikoz kaldığı ortaya konmuştur. Gliserol konsantrasyonunda ise 12 g/l, 15 g/l ve 18 g/l arasında biyokütle verimliliği açısından fark olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.9 *C. cohnii* hücrelerinin farklı glikoz ve gliserol konsantrasyonlarında elde edilen biyokütle verimlilikleri.

Karbon kaynağı	Konsantrasyon	Ortalama biyokütle verimliliği (g/l.gün)
Glikoz	9 g/l	0,14 ^E
	12 g/l	0,26 ^{DE}
	15 g/l	0,40 ^{CD}
	18 g/l	0,55 ^{BC}
	24 g/l	0,66 ^{AB}
	30 g/l	0,79 ^{AB}
	40 g/l	0,83 ^A
Gliserol	9 g/l	0,23 ^d
	12 g/l	0,40 ^{cd}
	15 g/l	0,54 ^{bcd}
	18 g/l	0,73 ^{abc}
	24 g/l	0,82 ^{ab}
	30 g/l	0,92 ^{ab}
	40 g/l	0,87 ^a

^{A,B,C} Farklı büyük harflerle gösterilen glikoz konsantrasyonları ortalamaları arasındaki fark önemlidir.

^{a,b}Farklı küçük harflerle gösterilen gliserol konsantrasyonları ortalamaları arasındaki fark önemlidir ($p < 0,01$).

4.4.5 Kültür ortamındaki maya ekstraktı, deniz tuzu ve gliserol konsantrasyonlarının optimizasyonu

Birinci denemede, *C. cohnii* kültür ortamında bulunan glutamik asit ve sodyum β -gliserofosfat'ın ortamda minimum seviyede bulunması gerektiği ortaya konmuştur. Dolayısıyla bundan sonraki denemelerde glutamik asitin ortamda 0,1 g/l; sodyum β -gliserofosfatın ise 0,15 g/l düzeyinde bulunmasına karar verilmiştir. Büyümeyle etkileyen en önemli besin kaynağının ise maya ekstraktı olduğu

saptanmıştır. Organizmanın karbon kaynağı seçiminin gliserolden yana olduğu ortaya konduğu için karbon kaynağı olarak gliserol kullanılmasına karar verilmiştir. Denizel türlerde tuzluluk, hem büyüme hem de yağ üretimi üzerinde etkili olmaktadır (De Swaaf et al., 1999). Dolayısıyla *C. cohnii* kültür ortamında maya ekstraktı, gliserol ve deniz tuzunun büyüme ve toplam yağ miktarı üzerindeki etkilerini görmek ve optimizasyonu amacıyla ikinci bir deney tasarımı planlanmıştır. Deney tasarımı olarak, merkezde 6 tekrarı içeren, 20 farklı kombinasyondan oluşan 2³-tam faktöriyel CCD deney tasarımı Design Expert 7.0.0 programı kullanılarak oluşturulmuştur. Kuru hücre ağırlığı (g/l) ve toplam yağ miktarı (%LC, g/g) tasarımda yanıt olarak alınmıştır. Tasarımdaki farklı kombinasyonlara ait her bir sonuç Çizelge 4.10'da görülmektedir.

Kuru hücre ağırlığı (g/l) için kodlanmış faktörler cinsinden matematiksel regresyon modeli şu şekildedir:

$$\text{Kuru hücre ağırlığı (g/l)} = 7,51 - 0,44X_1 + 2,07 X_2 + 0,33 X_3 - 1,17X_2^2 - 0,88 X_3^2$$

Denklem 15

Yapılan ANOVA sonuçları Çizelge 4.11'de görülmektedir. Model F değeri (62,76) modelin anlamlı olduğunu göstermektedir ($p < 0,01$). Prob > F değerinin 0,0100'in altında olması da modelin önemli olduğunu bir diğer göstergesidir. ANOVA testi sonuçlarına göre heterotrofik olarak kültüre edilen *C. cohnii*'nin kuru hücre ağırlığı üzerine deniz tuzunun, gliserolün ve maya ekstraktının etkisinin önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.10 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen 2³-tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımı deneme desenine ait, bağımsız değişkenlerin (deniz tuzu, gliserol, maya ekstraktı) gerçek değerleri ve elde edilen yanıtlar (kuru hücre ağırlığı, g/l).

Bağımsız değişkenler (g/l)	Sembol	Kodlanmış faktörlerin gerçek değerleri			Kuru hücre ağırlığı (g/l)	Toplam yağ içeriği (% g/g)
	Kodlanmış	-1	0	1		
Deniz tuzu	X ₁	8	16	24		
Gliserol	X ₂	10	30	20		
Maya ekstraktı	X ₃	1,4	2,4	3,4		
Denemeler	X ₁	X ₂	X ₃			
1	24	30	3,4	6,5	23	
2	16	20	2,4	7,7	24	
3	8	30	3,4	8,1	23,2	
4	8	10	1,4	3,3	25	
5	16	20	2,4	7,9	27,4	
6	8	10	3,4	3,7	19	
7	24	30	1,4	7,4	30	
8	24	10	3,4	3,1	24	
9	16	36,82	2,4	7,8	29,5	
10	16	20	2,4	8,1	25	
11	8	30	1,4	8,1	20	
12	16	20	2,4	7,8	26	
13	16	20	0,72	6,8	24	
14	16	20	4,08	3,9	30	
15	24	10	1,4	6,5	23,4	
16	16	3,18	2,4	2,8	22,7	
17	16	3,18	2,4	1	20	
18	29,45	20	2,4	6,4	20	
19	16	20	2,4	7,6	23	
20	16	20	2,4	7,8	22,5	

Çizelge 4.11 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen 2³-tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımı deneme desenine ait biyokütle miktarı (g/l) cinsinden ANOVA sonuçları.

Kaynak	SS	DF	MS	F-değeri	p>F
Model	91,48	5	18,3	62,76	<0,0001
X ₁ -Deniz tuzu	2,6	1	2,6	8,92	0,0098
X ₂ -Gliserol	58,79	1	58,79	201,7	<0,0001
X ₃ -Maya ekstraktı	1,46	1	1,46	5,02	0,0417
X ₂ ²	19,76	1	19,76	67,78	<0,0001
X ₃ ²	11,33	1	11,33	38,87	<0,0001
Artan	4,08	14	0,29		
Uyum eksikliği	3,18	9	0,35	1,97	0,2358
Saf hata	0,90	5	0,18		
Cor Total	95,56	19			

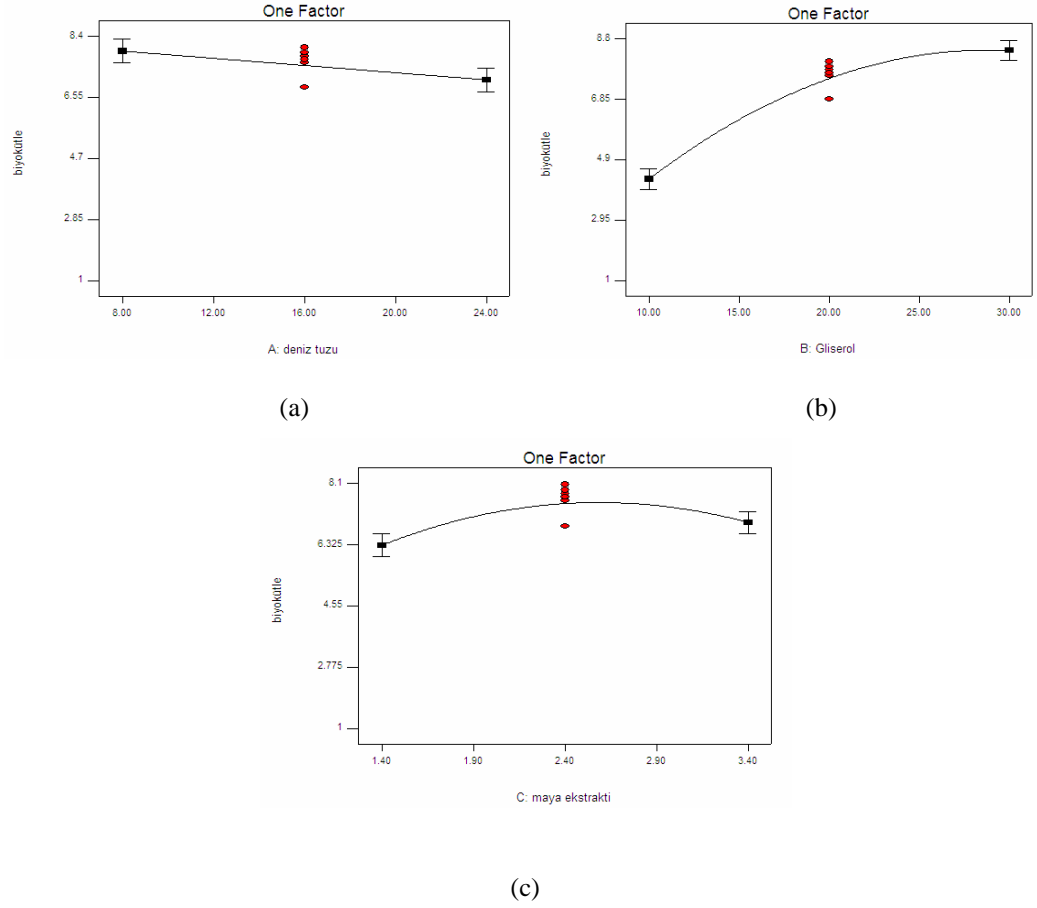
Her bir faktörün yanıt üzerine etkisinin ne yönde olduğunu görmek için ise Şekil 4.15’de görülen model grafikleri incelemek gerekmektedir. Buna göre, artan tuz konsantrasyonu ile biyokütle verimliliğinde azalma görülmektedir.

Gliserolün ise 20 g/l’den daha fazla olan konsantrasyonlarında biyokütle verimliliğinde daha yavaş bir artış olmakta ve daha sonrasında ise sabit kalmaktadır. Maya ekstraktının ise 2.4 g/l’den fazla konsantrasyonlarında biyokütle verimliliğinde azalma gözlenmektedir. Toplam yağ miktarı (%w/w) için kodlanmış faktörler cinsinden matematiksel regresyon modeli şu şekildedir:

$$\text{Toplam yağ miktarı (\%w/w)} = 25,14 + 0,5X_1 + 2,03 X_2 - 1,85X_3 - 1,57X_1^2$$

Denklem 16

Yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.12’de görülmektedir. Model F değeri (9,49) modelin anlamlı olduğunu göstermektedir ($p < 0,01$). Prob > F değerinin 0,0100’in altında olması da modelin önemli olduğunu bir göstergesidir. ANOVA testi sonuçlarına göre heterotrofik olarak kültüre edilen *C. cohnii*’nin toplam yağ miktarı üzerine gliserol ve maya ekstraktının etkisinin önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0,01$).



Şekil 4.15 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen 2^3 -tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımı deneme desenine ait bağımsız değişkenlerin (a), deniz tuzu (g/l) - biyokütle (g/l), (b) gliserol (g/l)- biyokütle (g/l), (c) maya ekstraktı (g/l) - biyokütle (g/l) model grafikleri.

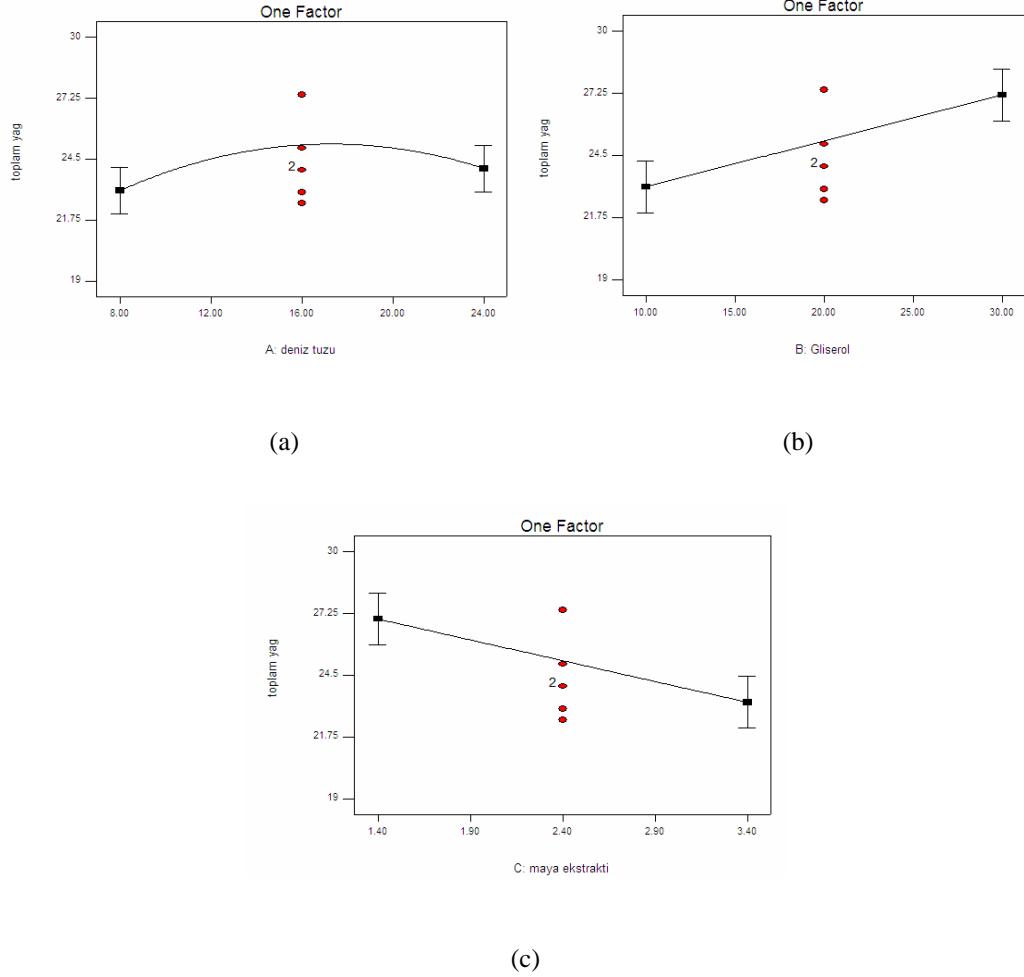
Çizelge 4.12 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen 2^3 -tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımı deneme desenine ait toplam yağ miktarı cinsinden ANOVA sonuçları.

Kaynak	SS	DF	MS	F-değeri	$p>F$
Model	142,75	4	35,69	9,49	0,0005
X_1 -Deniz tuzu	3,39	1	3,39	0,90	0,3577
X_2 -Gliserol	56,5	1	56,5	15,03	0,0015
X_3 -Maya ekstraktı	46,87	1	46,87	12,47	0,0030
X_1^2	36	1	36	9,57	0,0074
Artan	56,39	15	3,76		
Uyum eksikliği	41,19	10	4,12	1,35	0,3883
Saf hata	15,21	5	3,04		
Cor Total	199,14	19			

Her bir faktörün yanıt üzerine etkisinin ne yönde olduğunu görmek için ise Şekil 4.16'da görülen model grafikleri incelemek gerekmektedir. Buna göre, artan gliserol konsantrasyonu ile toplam yağ içeriğinde artma; artan maya ekstraktı konsantrasyonu ile ise toplam yağ miktarında azalma görülmektedir. Tuzluluğun ise 16 g/l'ye kadar konsantrasyonlarında toplam yağ miktarında artış; bu konsantrasyon sonrasında ise azalma görülmüştür. De Swaaf et al (1999), *C. cohnii* ATCC 30772 ile yaptıkları çalışmada, artan maya ekstraktı konsantrasyonu ile hücrelerin optik yoğunluk değerlerinde artış, buna karşın, hücrelerin yağ içeriğinde ise azalma olduğunu saptamışlardır. Bu da, artan maya ekstraktı konsantrasyonuna karşılık toplam yağ içeriğindeki azalma açısından bu çalışmayla uyum içerisindedir. Diğer taraftan ise, maya ekstraktının belli bir konsantrasyon sonrasında (2,4 g/l) biyokütle miktarında azalmaya neden olduğu bu çalışmada saptanmıştır. Ayrıca, artan gliserol konsantrasyonunun toplam yağ miktarında artışa neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.16). Sonuçlar bu yönüyle literatürle uyum içerisindedir. Genel olarak, mikroorganizmalarda yağ üretimi ortamdaki karbon fazlalığında ve herhangi bir besin elementinin (genellikle azot) limitasyonunda teşvik edilmektedir (Subramaniam et al., 2010; Chen et al., 2011). *C. cohnii* yetiştiriciliğinde karbon kaynağı olarak genelde glikoz kullanılırken (De Swaaf et al., 1999; Jiang and Chen, 1999), gliserolün kullanıldığı çalışmalara rastlanmamıştır. Bu çalışmada, gliserolün 20 g/l'den daha fazla olan konsantrasyonlarının biyokütle üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.15). Dolayısıyla, biyoreaktör düzeyindeki üretimlerde gliserolün bu etkisinin gözönüne alındığı kesikli-beslemeli sistemlerin daha uygun olabileceği öngörülmektedir. Diğer taraftan, glikoz için yüksek konsantrasyonlarda (50-75 g/l) inhibisyon etkisinden söz edilmemektedir. Tam tersi, yüksek optik yoğunluk değerlerine yüksek glikoz konsantrasyonlarında ulaşıldığı ortaya konmuştur (De Swaaf et al., 1999).

De Swaaf et al (1999) tarafından, *C. cohnii*'de hem büyüme hem de yağ üretiminin ortamdaki artan tuz konsantrasyonu (2,8-27,8 g/l) ile arttığı da ortaya konmuştur. Yeesang and Cheirsilp (2011), *Botryococcus* spp. olarak tanımladıkları 4 farklı izolatta artan tuz konsantrasyonu ile toplam yağ miktarında düşüş belirlemişlerdir. Bu çalışmada, büyüme ve yağ üretimi, ortamdaki yüksek tuzluluk (27,8 g/l) ve ortalama tuzluluk (17,8 g/l) değerleri açısından karşılaştırıldığında hemen hemen benzer sonuçların elde edildiği saptanmıştır. Dolayısıyla optimum büyüme ve yağ üretimi için 17,8 g/l tuzluluğun yeterli olduğu belirtilmiştir. Jiang and Chen (1999) yaptıkları çalışmada, *C. cohnii* ATCC 30556 ve *C. cohnii* ATCC 50051'in en yüksek biyokütle konsantrasyonlarına

(2,51 g/l ve 1,56 g/l, sırasıyla) 9 g/l NaCl konsantrasyonunda ulaştıkları belirtilmiştir. *C. cohnii* RJH ile ise en yüksek biyokütle konsantrasyonuna (2,49 g/l) 5 g/l NaCl konsantrasyonunda ulaştığını saptamışlardır (Jiang and Chen, 1999).



Şekil 4.16 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen 2^3 -tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımı deneme desenine ait bağımsız değişkenlerin (a) deniz tuzu (g/l)- toplam yağ (g/g), (b) gliserol (g/l) - toplam yağ (g/g), (c) maya ekstraktı (g/l) - toplam yağ (g/g) model grafikleri.

Ayrıca, erlenlerin toplam yağ içeriklerinin % 20-30 (g/g) arasında değiştiği görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.10). *C. cohnii* ile yapılan erlen düzeyindeki bir çalışmada, toplam yağ miktarının % 5-15 (g/g) arasında değiştiği bildirilmiştir (De Swaaf et al., 1999). Toplam yağ miktarındaki bu farklılığın temelde kullanılan kültür ortamı ve karbon kaynakları ile karbon ve maya ekstraktı konsantrasyonlarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Erlen düzeyinde yapılan bu denemede elde edilen biyokütle miktarlarının 1,4-8,1 g/l arasında değiştiği görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.10). Erlenlerin

biyokütle verimlilikleri 0,13-1,0 g/l.gün arasında değişmektedir. Pleissner and Eriksen (2012) tarafından gerçekleştirilen kesikli biyoreaktör üretimlerinde elde edilen biyokütle verimliliklerinin 0,72-1,0 g/l.gün arasında değiştiği ortaya konmuştur. Jiang and Chen (2000b) ise, 1g/l maya ekstraktının ve 1 g/l triptonun azot kaynağı olarak kullanıldığı ortamda, glikoz konsantrasyonunun 20-30 g/l arasında değişen konsantrasyonlarında 3-3,2 g/l arasında biyokütle elde ettiklerini belirtmişlerdir. Erlenlerde elde edilen biyokütlenin gliserol üzerinden verimlerinin (Yx/s) ise 0,30-0,48 (g/g) arasında değiştiği saptanmıştır. Bu değer, *C. cohnii* için glikoz üzerinden verilen verim değerine (0,45-0,50, g/g) yakın olduğu görülmektedir (Jiang and Chen, 2000b).

Bu çalışmada, hem biyokütle hem de yağ üretimini maksimize edecek şekilde Design Expert 7.0.0 programında *C. cohnii* için optimum ortam reçetesi araştırıldığında, tuzluluğun yaklaşık 16 g/l; maya ekstraktının 1,7-1,88 g/l; gliserolün ise 30 g/l olarak sunulduğu görülmektedir. Fakat, toplam biyokütle miktarının artan gliserol miktarı ile ilişkisi açısından bakıldığında (Bkz. Şekil 4.15), gliserolün 20 g/l'den fazla konsantrasyonlarında toplam biyokütle miktarında artış hemen hemen hiç olmamaktadır. Ayrıca, yapılan HPLC analizleri sonuçlarına göre başlangıç gliserol konsantrasyonunun 30 g/l olduğu erlenlerde yaklaşık 10-15 g/l kadar ortamda kullanılmadan kalan gliserol olduğu saptanmıştır. Başlangıç gliserol konsantrasyonu 20 g/l olan erlenlerde ise ortamda kullanılmadan kalan gliserol miktarının ortalama 2-5 g/l arasında olduğu görülmüştür. Gliserolün toplam yağ üretimi üzerine etkisi de göz önüne alındığında, *C. cohnii* büyüme ortamında başlangıç gliserol miktarının maksimum 18-20 g/l arasında olması gerektiğine karar verilmiştir.

Buna göre *C. cohnii* ATCC 460 A2E6 ortamı yapılan bu optimizasyon çalışmaları sonucunda Çizelge 4.13'de görüldüğü şekilde modifiye edilmiştir.

Çizelge 4.13 Optimizasyon denemeleri sonucunda modifiye edilen *C. cohnii* kültür ortamı

Ortam	İçerik
ATCC 460 A2E6 kültür ortamı	Yapay deniz tuzu (16 g/l) ; Maya ekstraktı (1,7 g/l); FeCl ₃ . 6H ₂ O (0,01 g/l); Sodyum gliserofosfat (0,15 g/l); (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,05 g/l); Tris tampon (1,5 g/l); K ₂ HPO ₄ (0,01 g/l); Glutamik asit (0,1 g/l); Gliserol (18 g/l); Vitamin Çözeltisi (1ml/l); Metal karışımı (3ml/l); Metal Karışımı (100 ml için): EDTA (1g); FeCl ₃ . 6H ₂ O (0,05 g); H ₃ BO ₃ (1g); MnCl ₂ . 4H ₂ O (0,15 g); ZnCl ₂ (0.01g); CoCl ₂ . 6H ₂ O (0.005) Vitamin Çözeltisi (1 l için): Biotin (0,003 g); Thiamine (1 g)

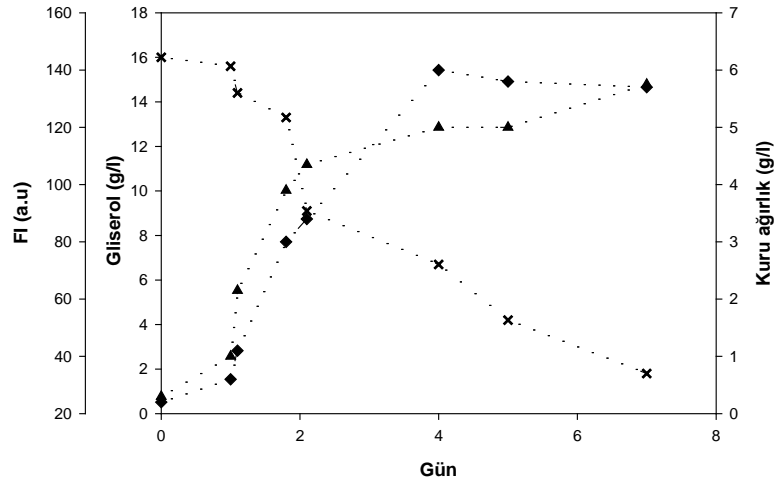
4.4.6 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen kesikli biyoreaktör üretimleri

4.4.6.1 Farklı karıştırma hızlarının biyokütle verimliliği, toplam yağ içeriği ve yağ asidi kompozisyonuna etkilerinin incelenmesi

Kültür ortamının optimizasyonu tamamlandıktan sonraki aşamada, 2 l'lik karıştırmalı tank biyoreaktörde kesikli işletim sisteminde, bazı çevresel parametrelerin (karıştırma hızı, pH kontrolü, hava akış hızı, çözülmüş oksijen konsantrasyonu gibi) *C. cohnii* hücre gelişimi, toplam yağ miktarı ve kompozisyonuna etkilerinin incelenmesi ve biyoreaktörde üretim koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

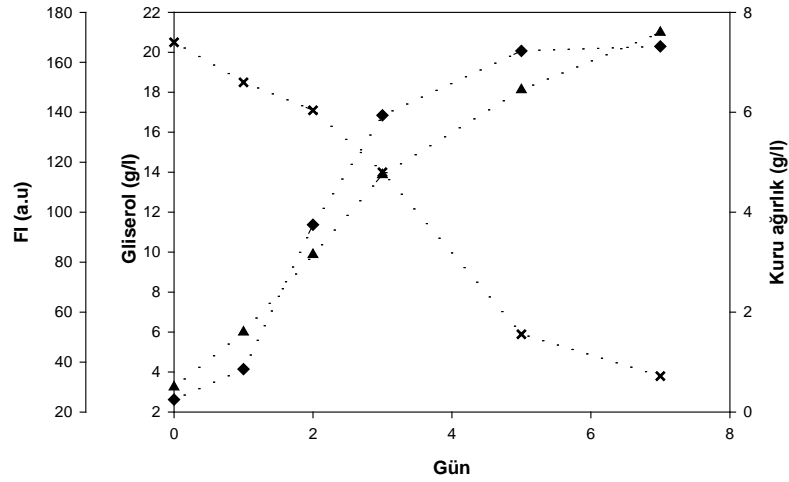
Çalışmanın bu kısmında, *C. cohnii* ile 2 l'lik biyoreaktörde 3 farklı karıştırma hızında (100 rpm, 150 rpm ve 250 rpm) biyokütle verimliliği, toplam yağ içeriği ve yağ asidi kompozisyonuna etkilerinin incelendiği reaktör denemeleri gerçekleştirilmiştir. Ortamın pH'sı 7.0'ye (2N HCl ve 1N NaOH), sıcaklık ise 24 °C'ye sabitlenmiştir. Havalandırma hızı 1 vvm olarak ayarlanmıştır. Karbon kaynağı olarak gliserol (18 g/l) kullanılmıştır. Tüm üretimler boyunca büyüme, hücre sayımı ve kuru ağırlık tayinleri ile; karbon kaynaklarının tüketimleri HPLC ile; organizmadaki yağ üretimi ise floresan spektrofotometrik ölçümlerle takip edilmiştir. Üretim sonrası elde edilen biyokütleler santrifüjle ortamdaki ayrılarak liyofilizatörde kurutulmuş, biyokütle verimliliği ve gravimetrik toplam yağ ölçümleri tamamlanmıştır. Yağ ekstraksiyonları tamamlandıktan sonra, metil esterleri hazırlanarak GC'de yağ asidi analizlerine geçilmiştir.

Farklı karıştırma hızlarındaki her bir biyoreaktör üretiminin zamana karşı biyokütle, gliserol konsantrasyonu ve floresan şiddeti yönünden toplam yağ miktarındaki değişim incelenmiştir. Karıştırma hızının 100 rpm olarak ayarlandığı üretim sonunda yaklaşık olarak 5,7 g/l biyokütle elde edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 *C. cohnii* hücrelerinin 2 litrelik karıştırılmalı biyoreaktörde 100 rpm karıştırma hızında zamana karşılık kuru ağırlık (♦), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.

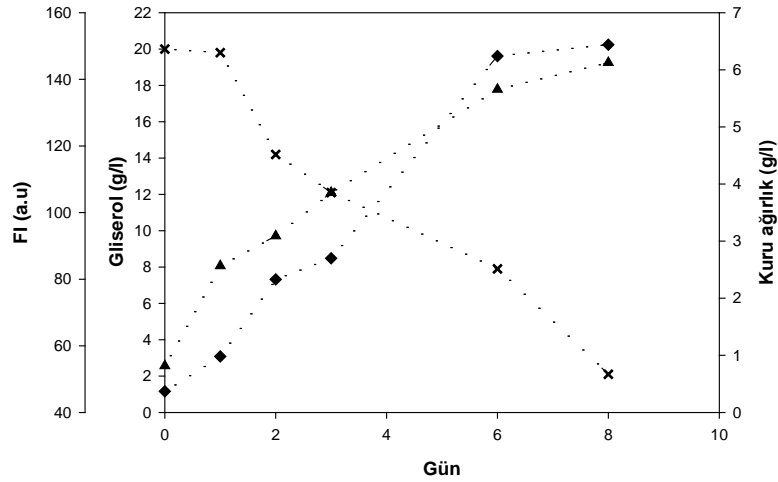
Biyokütle verimliliği 0,94 g/l.gün; substrat kullanım verimi ise ($Y_{X/S}$) 0,46 olarak belirlenmiştir. *C. cohnii* hücreleriyle 150 rpm karıştırma hızında yapılan biyoreaktör üretimi sonucunda ise 7,3 g/l biyokütle elde edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 *C. cohnii* hücrelerinin 2 litrelik karıştırılmalı biyoreaktörde 150 rpm karıştırma hızında zamana karşılık kuru ağırlık (♦), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.

Biyokütle verimliliği yaklaşık 1,3 g/l.gün; substrat kullanım verimi ise ($Y_{X/S}$) 0,40 olarak belirlenmiştir. Karıştırma hızının 250 rpm olarak tutulduğu üretim sonucunda ise 6,4 g/l biyokütle elde edilirken; biyokütle verimliliği 0,8

g/l.gün ve substrat kullanım verimi ise ($Y_{X/S}$) 0,36 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 *C. cohnii* hücrelerinin 2 litrelik karıştırılmalı biyoreaktörde 250 rpm karıştırma hızında zamana karşılık kuru ağırlık (♦), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.

Gravimetrik olarak yapılan toplam yağ ölçümleri ve daha sonrasında yapılan transesterifikasyon işlemi ile GC analizleri gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.14’de görüldüğü gibi 150 rpm karıştırma hızında yapılan üretimde elde edilen toplam yağ miktarının, 100 rpm karıştırma hızında yapılan üretimden daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Toplam yağ miktarı açısından 150 rpm ve 250 rpm karıştırma hızlarında gerçekleştirilen üretimler arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla, enerji maliyeti açısından düşünüldüğünde 150 rpm karıştırma hızının daha uygundur. Ayrıca, elde edilen biyokütle verimlilikleri karşılaştırıldığında 150 rpm karıştırma hızıyla gerçekleştirilen üretimde daha yüksek biyokütle verimliliği elde edilmiştir.

Üç farklı karıştırma hızında elde edilen toplam spesifik DHA konsantrasyonları (mg/g biyokütle) da farklılık göstermektedir. Karıştırma hızının 150 rpm olarak ayarlandığı biyoreaktör üretimi sonucunda DHA konsantrasyonunun 49 mg/g düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Karıştırma hızının 100 rpm ve 250 rpm olarak ayarlandığı biyoreaktör üretimi sonucunda ise DHA konsantrasyonları sırasıyla 34 mg/g ve 32 mg/g düzeyinde saptanmıştır.

Farklı karıştırma hızlarında (50 ve 100 rpm) erlen düzeyinde yapılan bir çalışmada, 100 rpm karıştırma hızında, 50 rpm ile ulaşılan optik yoğunluk değerinin yaklaşık 4 katı daha yüksek değerlere ulaşıldığı ortaya konmuştur.

Çizelge 4.14 *C. cohnii* hücreleriyle gerçekleştirilen 2 litrelik biyoreaktör üretiminde farklı karıştırma hızlarının (100, 150, 250 rpm) toplam yağ miktarı ve yağ asidi kompozisyonuna etkileri.

Karıştırma hızı	%Toplam yağ	Yağ kompozisyonu (% TFA)						
		C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C22:6
100	28,0 ^B	3,2	11,5	20,3	20,3	1,6	7,0	34,0
150	36,5 ^A	3,3	8,8	21,1	20,1	1,6	7,5	36,0
250	30,5 ^{AB}	2,2	8,0	22,0	19,2	1,7	8,0	38,0

^{A,B,C} Farklı büyük harflerle gösterilen toplam yağ miktarları ortalamaları arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$).

Karıştırma hızının artmasıyla artan oksijen transferinin hücre gelişimine katkı sağladığı belirtilmiştir (De Swaaf et al., 1999). Bu çalışmada, 3 farklı karıştırma hızı biyokütle verimliliği açısından karşılaştırıldığında 250 rpm karıştırma hızının en düşük seviyede kaldığı belirlenmiştir. Benzer olarak, yeşil bir mikroalg türü olan *Ettlia texensis* hücrelerinin farklı karıştırma hızlarında gerçekleştirilen biyoreaktör üretimleri sonucunda elde edilen biyokütle verimliliği ve toplam yağ miktarlarında da farklılıklar olduğu ortaya konmuştur (Isleten-Hosoglu et al., 2013).

Mekanik karıştırmanın, radyal karışmayı hızlandırdığı bilinmektedir (Doran, 1995). Fakat mekanik karıştırma algal hücrelere zarar da verebilmektedir (Garcia et al., 2000; Sobczuk et al., 2006). Bazı mikroalg türleri (*Dunaliella* gibi) son derece kırılabilir bir yapıya sahip olurken, diğer pek çok tür yüksek seviyedeki türbülanslara ve gaz püskürtülmelerine karşı da son derece dayanıklı olabilmektedir (Sobczuk et al., 2006). *C. cohnii* ile yapılan çalışmalarda reaktör içerisindeki çözünmüş oksijen konsantrasyonunu belli bir değerde (genellikle %30-40) tutmak amacıyla, üretim boyunca 100 rpm ile 1000 rpm arasında değişen karıştırma hızları kullanılmıştır (de Swaaf et al., 1999; Ratledge et al., 2001; Mendes et al., 2007). Pleissner and Eriksen (2012) *C. cohnii* ile çözünmüş oksijen konsantrasyonunu %40 doygunluk seviyesinde tutmak için üretim boyunca 450-800 rpm arasında değişen karıştırma hızlarında kesikli üretimler gerçekleştirmişlerdir. Asetik asit ve glikozun karbon kaynakları olarak birlikte kullanıldığı 4 günlük kesikli üretim sonucunda elde ettikleri toplam biyokütle miktarının yaklaşık 3 g/l; toplam yağ miktarının %15-23 (g/g); spesifik DHA konsantrasyonunun ise yaklaşık 38 mg/g düzeyinde olduğunu ortaya

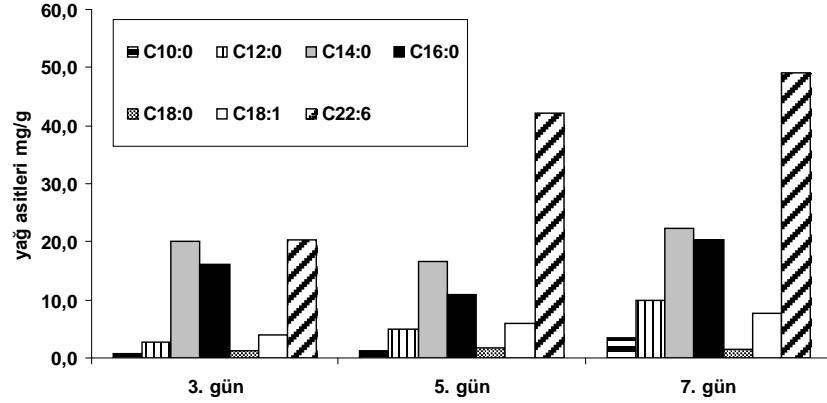
koymuşlardır. Bu çalışmada optimum karıştırma hızı olarak belirlenen 150 rpm karıştırma hızında yapılan üretim sonucunda elde edilen biyokütle verimliliği, toplam yağ ve DHA miktarları açısından daha yüksek sonuçların elde edildiği ortaya konmuştur

Bazı araştırmacılar, erlen düzeyinde yaptıkları çalışmalarında *C. cohnii* hücrelerinin gliserolü kullanabildiğini belirtirken (Mendes et al., 2009); diğer araştırmacılar gliserol üzerinde herhangi bir marjinal büyüme görülmediğini belirtmişlerdir (De Swaaf et al., 1999). Bu çalışmada ise, biyoreaktör düzeyinde yapılan bu kısımda organizmanın gliserol kullanım veriminin 0,36-0,46 (g/g) arasında değiştiği ortaya konmuştur. Bu verim değeri, glikoz için ortaya konan biyokütle verim değerlerine (0,35-0,48, g/g) çok yakın olup (Jiang and Chen, 2000b); etanol (0,31, g/g), asetik asit (0,12-0,22, g/g) gibi önerilen diğer alternatif karbon kaynakları için belirtilen verim değerlerinin üzerinde kalmaktadır (Ratledge et al., 2001; De Swaaf et al., 2003a,b). *C. cohnii* hücrelerinden, DHA bakımından zengin yağ üretimi ticari olarak yapılmakta, hem yetişkinler için ek besin kaynağı olarak kullanılmakta hem de bebek gıdalarının formülasyonunda yer almaktadır. Bu ticari prosesin teknik yönleri gizli tutulsa da, organizmanın büyük ölçek fermentörlerde karbon kaynağı olarak glikozun kullanıldığı bir prosesle elde edildiği tahmin edilmektedir (Ratledge et al., 2001). Toplam kültür ortamı maliyetinin %80'ini glikozun oluşturduğu bilinmektedir (Li et al., 2007). Biyokütle, yağ ve DHA verimleri ise şirket sırrı olarak gizli tutulmaktadır. Bununla birlikte, bu çalışmada elde edilen sonuçlar geleneksel olarak kullanılan glikoz yerine, alternatif karbon kaynağı olarak gliserolün kullanılabilceğini ortaya koymuştur. *C. cohnii* hücrelerinin gliserolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı proseslerde glikoza son derece yakın; diğer alternatif karbon kaynaklarına göre ise (asetik asit, etanol gibi) daha yüksek biyokütle verimlerine sahip olduğu saptanmıştır. Böylece biyodizel üretimi sırasında tranesterifikasyon aşamasında oluşan bir yan ürün olan gliserolün değerlendirilmesiyle ortam maliyetlerini düşürmenin mümkün olabileceği düşünülmektedir (Li et al., 2007).

Nil kırmızısıyla floresan ölçümüne dayalı toplam yağ miktarı tayini ile organizmanın yağ üretiminin hangi şartlarda tetiklendiği belirlenebilmektedir. Buna göre, yapılan diğer çalışmalarla da benzer olarak *C. cohnii* hücrelerinde de başta büyümeyle bağlantılı bir yağ üretimi söz konusu olmaktadır (Yang et al., 2011; Isleten-Hosoglu et al., 2012). Fakat sonrasında ise, bu artışın hücreler durağan faza geçtiğinde de devam ettiği tespit edilmiştir. Benzer olarak, Pleissner and Eriksen (2012) de, hücreler durağan faza girdikten sonra da toplam yağ asidi

konsantrasyonundaki artışa, biyokütle miktarında düşüş gözlenmeye başladığında ise toplam yağ asidi miktarının değişmediğine dikkat çekmişlerdir. Farklı sodyum asetat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen başka bir çalışmada, gravimetrik yöntemle yapılan hücre içi yağ konsantrasyonu ölçümünde, sodyum asetatın düşük konsantrasyonlarında büyümeyle artan bir yağ oluşumu gözlenmiştir (Ratledge et al., 2001). *C. cohnii* için geliştirilen nil kırmızısıyla floresan ölçümüne dayanan yağ tayininin, üretimde biyokütlenin yanı sıra yağ üretiminin de kontrol edilmesini sağlayarak, bir üretimin ne zaman sonlandırılacağına imkan vereceği ve çalışmanın bu yönüyle de endüstriyel proseslere katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Isleten-Hosoglu et al., 2012).

Mikroalg hücrelerinin yağ asitleri kompozisyonu ve miktarı üzerine kültürün büyüme evresinin etkisinin önemli olduğu ortaya konmuştur (Fidalgo et al 1998; Jiang and Chen, 2000a). Bu çalışmada da, karıştırma hızının 150 rpm de tutulduğu üretim süresince büyüme evresinin farklı zamanlarında alınan örnekler yağ asiti kompozisyonu açısından incelenmiştir (Şekil 4.20). Üretimin 3. gününe kadar görülen lineer büyüme evresinin ardından (Bkz. Şekil 4.18) hücreler daha hızla büyüme eğilimine girmişler ve bu evrede (5. gün) DHA miktarının oldukça arttığı belirlenmiştir. Hücrelerin durağan fazda olduğu durumda ise DHA miktarındaki artış biraz daha düşük seviyede kalmıştır. Ayrıca, 5. günde C14:0 ve C16:0 yağ asitleri oranında azalma, sonrasında ise bir miktar artış göze çarpmaktadır. DHA miktarındaki artışın hücreler durağan faza girmeden hemen önceki durumda en yüksek düzeyde olduğu ve durağan faz boyunca değişimin fazla olmadığı gözlemlenmiştir. Benzer olarak, Jiang and Chen (2000a) *C. cohnii* hücrelerinde hücreler geliştikçe durağan fazın başlarına kadar hücre içi DHA oranının arttığını saptamışlardır. De Swaaf et al (1999) ise *C. cohnii* ile 1 l'lik reaktörde gerçekleştirdikleri çalışmada, hücrelerin DHA içeriğinin lineer büyüme fazından başlayarak durağan fazın ortalarına kadar arttığını ortaya koymuşlardır. Logaritmik fazın sonlarında veya durağan fazın başlarında hücrelerin doymuş yağ asitleri miktarında azalma, doymamış yağ miktarlarında ise artma görülmesinin sebebi, besin ortamında bazı spesifik besin elementlerinin tamamıyla tüketilmesi veya kıtlığından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Chen and Johns, 1991).

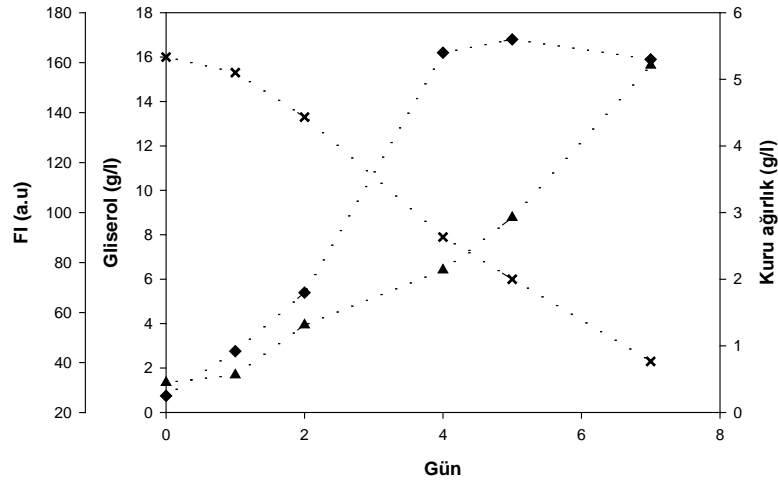


Şekil 4.20 *C. cohnii* hücrelerinin büyümenin farklı evrelerindeki yağ asidi kompozisyonundaki değişimi

4.4.6.2 Kontrollü pH ortamında biyokütle verimliliği, toplam yağ içeriği ve yağ asiti kompozisyonuna etkilerinin incelenmesi

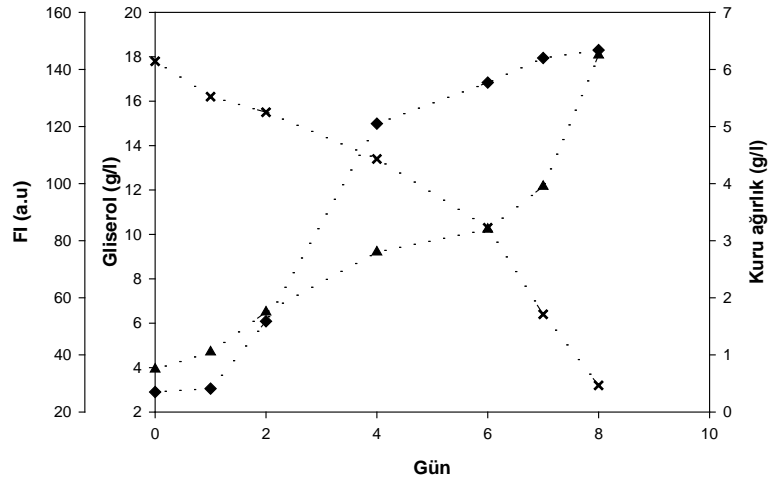
C. cohnii ile yapılan çalışmalarda üretimlerin farklı pH değerlerinde yapıldığı görülmektedir (Mendes et al., 2007; Pleissner and Eriksen, 2012). Erlen düzeyinde yapılan üretimlerde ise pH kontrolü mümkün olmamaktadır (Jiang and Chen, 1999; Jiang and Chen, 2000a,b). Çalışmanın bu kısmında, aynı biyoreaktör koşullarında üretim boyunca pH'nın kontrol edilmediği ve pH'nın 6,5 ve 7,0'ye sabitlendiği 3 üretim gerçekleştirilerek, bu değişimlerin biyokütle verimliliği, toplam yağ içeriği, gliserol tüketimleri ve yağ asidi kompozisyonuna etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Üretimler boyunca, karıştırma hızı 150 rpm; havalandırma hızı ise 1 vvm olarak ayarlanmıştır. Biyokütle verimliliği ve toplam yağ miktarı açısından 3 üretim karşılaştırıldığında, pH'nın kontrol edilmediği üretimde 0,88 g/l.gün biyokütle verimliliği ve %33 (g/g) toplam yağ elde edilmiştir. Gliserol kullanım veriminin ise 0,4 (g/g) olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 *C. cohnii* hücrelerinin 2 litrelik karıştırmalı biyoreaktörde üretim boyunca pH'nın kontrol edilmediği duruma karşılık kuru ağırlık (♦), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.

pH değerinin 6,5'a sabitlendiği üretimde ise, biyokütle verimliliği ve toplam yağ miktarı açısından pH'nın kontrol edilmediği üretime benzer sonuçlar (0,82 g/l.gün; %32, g/g) elde edilmiştir (Şekil 4.22).



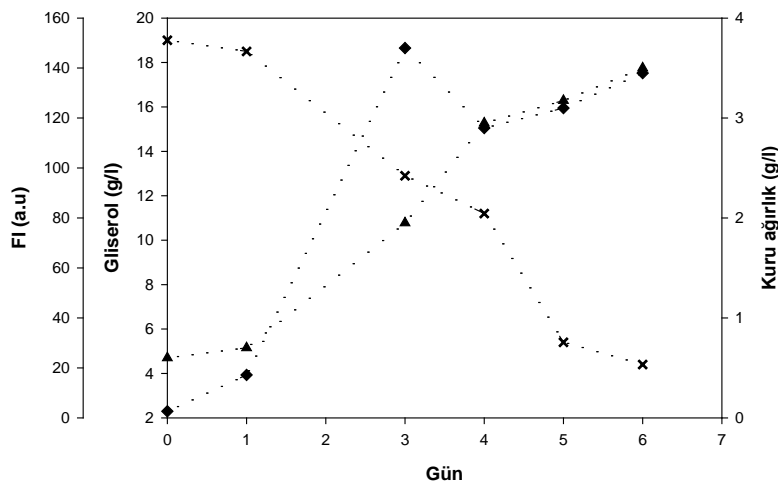
Şekil 4.22 *C. cohnii* hücrelerinin 2 litrelik karıştırmalı biyoreaktörde üretim boyunca pH'nın 6,5'a sabitlendiği duruma karşılık kuru ağırlık (♦), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.

pH'nın 7.0'ye sabitlendiği üretimde ise daha yüksek biyokütle verimliliği ve toplam yağ miktarı (1,3 g/l.gün; %36,5, g/g) elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.18). Gliserol kullanım veriminin her 3 üretimde de 0,4 (g/g) civarında olduğu belirlenmiştir. DHA miktarı açısından ise pH'nın kontrol edilmediği ve pH'nın

6,5'a sabitlendiği üretimler sonucuna elde edilen DHA miktarları (25 mg/g ve 36 mg/g, sırasıyla) üretimin pH'sının 7,0'ye sabitlendiği üretime göre (49 mg/g) biraz daha düşük kaldığı saptanmıştır. *C. cohnii* hücreleri ile erlen düzeyinde yapılan bir çalışmada, farklı başlangıç pH'larında (pH 4-10) üretime başlanmış ve başlangıç için optimum pH değerinin 7,2 olduğu ortaya konmuştur (Jiang and Chen, 2000b). Ayrıca aynı çalışmada, DHA oluşumunda ortam pH'sındaki değişimin etkisinin son derece az olduğu, en yüksek DHA oranının ise pH'nın 7,2 ile başlatıldığı üretimde olduğu belirtilmiştir. DHA üreticisi diğer bir organizma olan *Schizochytrium* sp. S31 ile yapılan bir çalışmada, pH 5-8 arasında değişen başlangıç pH değerleri arasında en yüksek biyokütle miktarının (6 g/l) ve DHA veriminin (314 mg/l) pH 7,0'de elde edildiği belirtilmiştir (Wu et al., 2005).

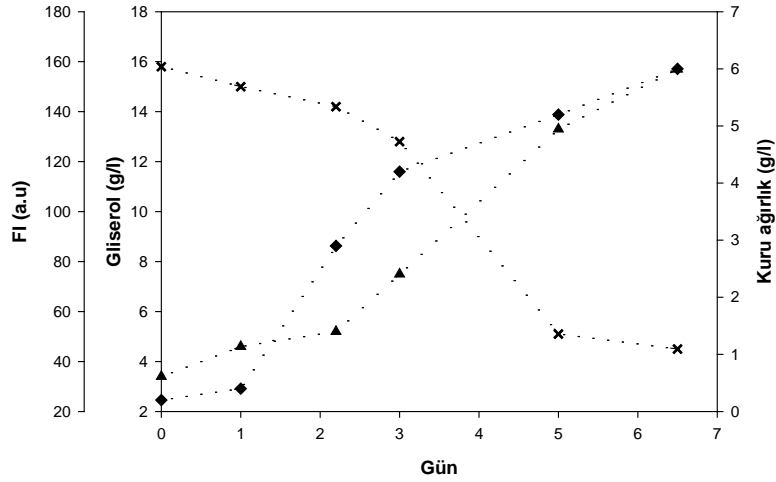
4.4.6.3 İnkübasyon sıcaklığının *C. cohnii* biyokütle verimliliği, toplam yağ içeriği ve yağ asidi kompozisyonundaki etkisi

Biyoreaktör koşullarında, farklı inkübasyon sıcaklıklarının organizmanın biyokütle verimliliği, toplam yağ içeriği ve yağ asidi kompozisyonuna etkilerinin incelenmesi amacıyla 3 farklı sıcaklıkta reaktör üretimleri gerçekleştirilmiştir. Karıştırma hızı olarak 150 rpm, havalandırma hızı ise 1 vvm olarak ayarlanmıştır. Üretim süresince ortamın pH değeri 7,0'ye (2N HCl ve 1N NaOH ile) sabitlenmiştir. İnkübasyon sıcaklığının 30 °C olduğu durumda en düşük biyokütle verimliliği (0,57 g/l.gün) elde edilmiştir. Gliserol üzerinden biyokütle verimi ise 0,23 (g/g) olarak saptanmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 *C. cohnii* hücrelerinin 2 litrelik karıştırmalı biyoreaktörde farklı 30 °C inkübasyon sıcaklığında zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.

İnkübasyon sıcaklığının 24 °C ve 27 °C olduğu üretim koşullarında elde edilen biyokütle verimlilikleri hemen hemen aynı olmakla birlikte 27 °C’de biraz daha düşük değerde (0,98 g/l.gün) kalmıştır (Şekil 4.24).

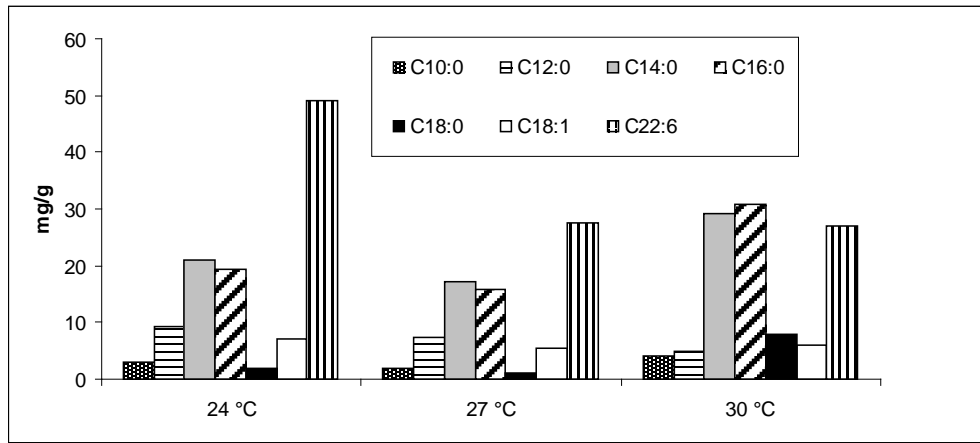


Şekil 4.24 *C. cohnii* hücrelerinin 2 litrelik karıştırılmalı biyoreaktörde farklı 27 °C yetiştirme sıcaklığında zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.

Sıcaklığın 24 °C olduğu üretimde elde edilen biyokütle verimliliği ise 1,3 g/l.gün düzeyinde kalmıştır (Bkz. Şekil 4.18). Gliserol üzerinden biyokütle verimlilikleri açısından bu iki üretim karşılaştırıldığında ise 27 °C’de gerçekleştirilen üretimin (0,52 (g/g)) 24 °C’de gerçekleştirilen üretime göre (0,40 g/g) biraz daha yüksek olduğu saptanmıştır.

De Swaaf et al (1999) 27 °C ve 30 °C olmak üzere iki farklı inkübasyon sıcaklığının *C. cohnii* hücrelerinin gelişimi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada, organizmanın 30 °C sıcaklıkta daha bir iyi gelişim gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Jiang and Chen (2000a) ise 15 °C, 20 °C, 25 °C ve 30 °C olmak üzere 4 farklı inkübasyon sıcaklığında yaptıkları çalışmada, *C. cohnii* hücrelerinin 2,42 g/l ile en yüksek biyokütle miktarının 30 °C inkübasyon sıcaklığında elde edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, glikoz üzerinden en yüksek biyokütle veriminin (0,48, g/g) yine bu sıcaklıkta elde edildiğini saptamışlardır. Düşük sıcaklıkların, glikoliz ve Krebs döngüsündeki enzimlerin aktivitelerini yavaşlattığı ve dolayısıyla karbon metabolizmasını da yavaşlattığı bilinmektedir (Jiang and Chen, 2000a). Bundan dolayı, farklı inkübasyon sıcaklıklarında organizmanın karbon kaynaklarını kullanım hızı ve kullanım verimi de etkilenmektedir.

Organizmanın yağ üretiminin de inkübasyon sıcaklığından etkilendiği saptanmıştır. En yüksek floresan şiddeti sıcaklığın 24 °C; en düşük floresans şiddeti ise sıcaklığın 30 °C olduğu üretimde elde edilmiştir. Gravimetrik toplam yağ miktarı ölçümlerine göre 24 °C’de gerçekleştirilen üretim sonucunda elde edilen biyokütlerdeki yağ oranı %36,5 (g/g) olup, bunu %31 (g/g) ile 27 °C’deki üretim ve %29 ile 30 °C’de gerçekleştirilen üretim takip etmektedir. Sıcaklık artışıyla biyokütlerdeki toplam yağ miktarında düşüş saptanmıştır. Benzer olarak, de Swaaf et al (1999) yaptıkları çalışmada, *C. cohnii* hücrelerinde 27 °C inkübasyon sıcaklığında toplam yağ oranı %13 iken, 30 °C’de bu değer %7,8’e düştüğünü ortaya koymuşlardır. Ayrıca, sıcaklığında yalnızca toplam yağ miktarında değil yağ kompozisyonunda da değişikliğe neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 Farklı inkübasyon sıcaklıklarında biyokütlerdeki toplam yağ kompozisyonundaki değişim

Şekil 4.25’de görüldüğü gibi, DHA, *C. cohnii* hücrelerinde bulunan başlıca yağ asididir. Reaktör işletim sıcaklığının 24 °C’ye ayarlandığı üretimden elde edilen biyokütlerdeki DHA konsantrasyonu 49 mg/g civarındayken, 27 °C ve 30 °C işletim sıcaklıklarında bu miktarın 27 mg/g’a düştüğü belirlenmiştir. Benzer şekilde, Jiang and Chen (2000a), 30 °C’deki yetiştirilen *C. cohnii* hücrelerinin DHA oranlarında çok yüksek miktarda azalma olduğunu, DHA oranındaki bu azalmanın C14:0 ve C16:0 yağ asitlerinin oranında artmayla sonuçlandığını belirtmişlerdir. Diğer taraftan, De Swaaf et al (1999), 27 °C’de yetiştirilen *C. cohnii* hücrelerinin toplam yağ asitleri içerisindeki DHA oranı %35,9 iken, 30 °C’de yetiştirilen hücrelerde bu oranın %40,4’a ulaştığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada, 30 °C’deki yetiştirilen yağ asidi kompozisyonunda da C14:0, C16:0 doymuş yağ asitleri miktarında artış olduğu göze çarpmaktadır (Şekil 4.25). Düşük sıcaklıklarda ortamda çözülmüş halde bulunan yüksek moleküler oksijen

miktarının da doymamış yağ asidi sentezini olumlu etkilediği düşünülmektedir. Çünkü yağ asidi zincirlerinin uzaması ve desaturasyon işlemlerinin etkinliği ortamdaki moleküler O₂ varlığına bağlı olmaktadır (Wen and Chen, 2003). Ayrıca, düşük sıcaklıklarda mikroalgler hücre membran akışkanlığını korumak için daha çok doymamış yağ asitlerini sentezlemeye çalışmaktadırlar (Wen and Chen, 2003).

Endüstriyel ölçekte üretimlerde, soğutma maliyetleri göz önüne alındığında 24 °C ve 27 °C inkübasyon sıcaklıklarının *C. cohnii* üretiminde fazla fark yaratmayacağı düşünülmektedir. Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında, *C. cohnii* için en uygun inkübasyon sıcaklığı 24 °C olarak belirlenmiştir.

4.4.6.4 Çözünmüş oksijen konsantrasyonunun sabitlendiği üretimler

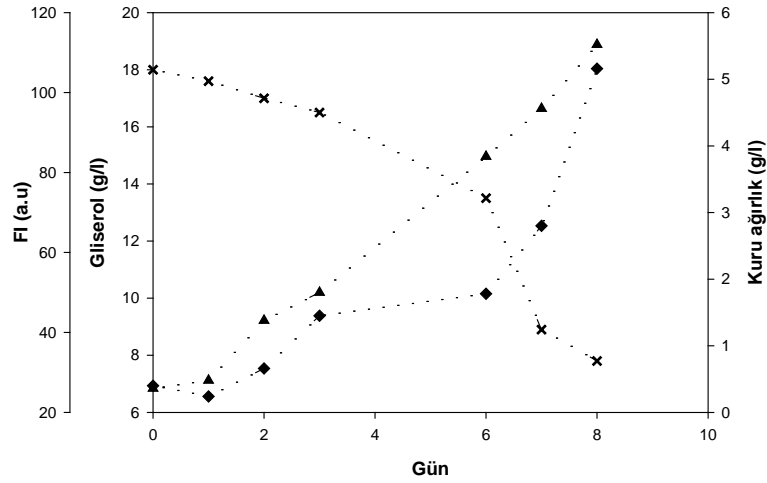
Çalışmanın bu aşamasında, biyoreaktör içerisindeki çözünmüş oksijen konsantrasyonunu (DO) üretim boyunca sabit tutmak (DO, %50) esas alınmıştır. Bu amaçla, reaktör üç farklı kaskad işletim modunda çalıştırılmıştır. Her 3 kaskad işletim modunda da çözünmüş oksijen konsantrasyonu %50'ye set edilmiştir

Kaskad 1: Öncelikle, havalandırma hızı kontrol edilmiştir (maksimum 2 vvm); havalandırma hızı yeterli olmadığında ise karıştırma devreye girmiştir (maksimum 500 rpm). Üretim boyunca pH 7.0'de kontrol edilmiştir.

Kaskad 2: Öncelikle, havalandırma hızı kontrol edilmiştir (maksimum 1 vvm), havalandırma hızı yeterli olmadığında karıştırma devreye girmiştir (maksimum 500 rpm) Üretim boyunca pH 7.0'de kontrol edilmiştir.

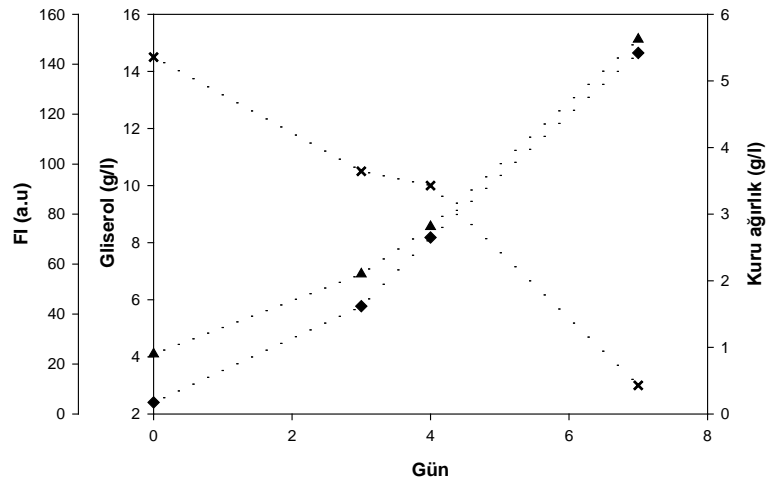
Kaskad 3: Öncelikle, havalandırma hızı kontrol edilmiştir (maksimum 1 vvm), havalandırma hızı yeterli olmadığında ise karıştırma devreye girmiştir (maksimum 500 rpm). Bu üretimde ise üretim boyunca pH kontrol edilmemiştir.

Kaskad 1 üretimi boyunca takip edilen parametreler açısından elde edilen sonuçlar Şekil 4.26'da görülmektedir. Kaskad 1 sonucunda 0,64 g/l.gün biyokütle verimliliği; 0,50 (g/g) gliserol verimi elde edilmiştir.



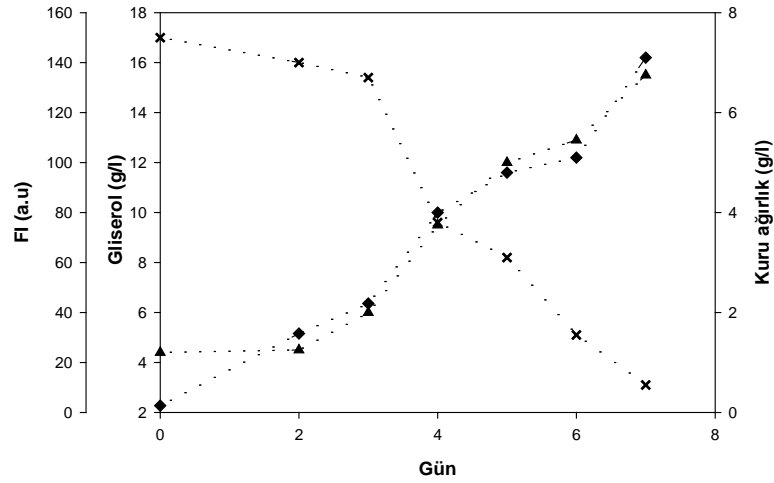
Şekil 4.26 *C. cohnii* üretim ortamında kaskad 1 işletim modunda, zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.

Kaskad 2 işletim modundaki üretim boyunca takip edilen parametreler açısından elde edilen sonuçlar Şekil 4.27'de görülmektedir. Kaskad 2 sonucunda 0,77 g/l.gün biyokütle verimliliği; 0,49 (g/g) gliserol verimi elde edilmiştir.



Şekil 4.27 *C. cohnii* üretim ortamında kaskad 2 işletim modunda zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.

Kaskad 3 denemesinde takip edilen parametreler açısından elde edilen sonuçlar Şekil 4.28'de görülmektedir. Üretim sonucunda 1,0 g/l.gün biyokütle verimliliği; 0,50 (g/g) gliserol verimi elde edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.28 *C. cohnii* üretim ortamında kaskad 3 işletim modunda zamana karşılık kuru ağırlık (◆), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), floresan şiddeti (FI, ▲) değişimleri.

Her 3 üretim toplam yağ miktarı açısından karşılaştırıldığında, üretim sonunda floresan şiddeti 150 (a.u) civarında ölçülen kaskad 2 üretiminde biyokütlenin % 32 (g/g)'sinin yağ olduğu ortaya konmuştur. Kaskad 3 üretimi sonucunda gravimetrik olarak ölçülen yağ miktarı %28 iken; cascade 1 üretimi sonucunda elde edilen toplam yağ miktarının %25 düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Elde edilen biyokütleler toplam yağ asidi kompozisyonları açısından karşılaştırıldığında ise kaskad 1 üretiminde daha yüksek DHA oranı (%36) dikkati çekmektedir (Çizelge 4.15). Diğer yağ asitleri açısından karşılaştırıldığında ise çok fazla bir değişim saptanmamıştır.

Çizelge 4.15 *C. cohnii* hücreleriyle gerçekleştirilen kaskad üretimlerde elde edilen toplam yağ miktarları ve yağ asidi kompozisyonlarındaki farklılıklar

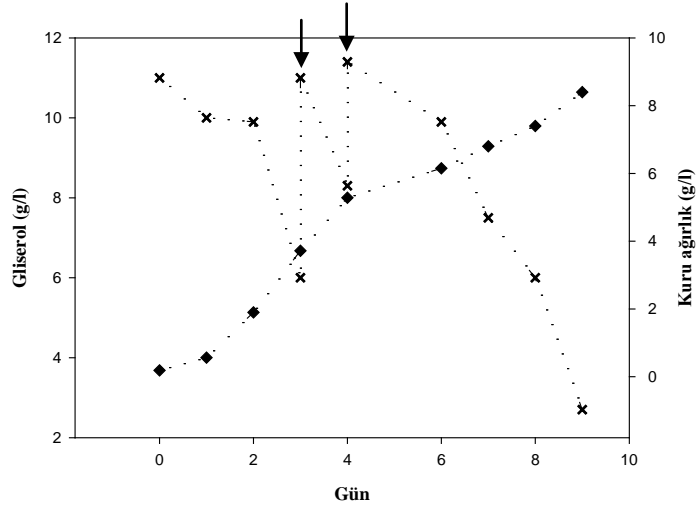
Üretimler	Yağ asidi kompozisyonu (%TFA)						
	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C22:6
Kaskad 1	2	8	20	21	2	10	36
Kaskad 2	3	8	21	19	8	8	31
Kaskad 3	1	8	22	18	7	7	33

Her üç üretimde elde edilen biyokütlelerin DHA konsantrasyonları gözönüne alındığında kaskad 1, kaskad 2 ve kaskad 3 üretimlerinden sırasıyla 30,2 mg/g, 28 mg/g ve 24 mg/g DHA elde edildiği belirlenmiştir. De Swaaf et al (1999), 1 litrelik biyoreaktörde, çözülmüş oksijen konsantrasyonunu %30 doygunluk seviyesinde sabit tutmak için karıştırma hızının otomatik olarak

arttırıldığı (100-800 rpm) kesikli bir üretim gerçekleştirmişlerdir. Üretim sonunda biyokütle verimliliğini 7,3 g/l.gün; toplam yağ miktarını %13,5 (g/g) olarak bildirmişlerdir. Biyokütle verimliliği açısından bu çalışma ile arasındaki bu farklılığın öncelikle, kullanılan yüksek miktardaki maya ekstraktı miktarından (11,5 g/l) ve glikozdan (84,3 g/l) kaynaklandığı düşünülmektedir. Üretim sonunda toplam yağ asitleri içerisindeki DHA oranının %43,6 olduğunu ortaya koymuşlardır (De Swaaf et al., 1999). Toplam yağ asitleri içerisinde DHA'ı sırasıyla %16,9 ve %16,6 ile C16:0 ve C14:0 yağ asitlerinin takip ettiği ortaya konmuştur. Bu çalışmada, hem biyokütle verimliliği hem toplam yağ miktarı hem de DHA konsantrasyonu açısından karşılaştırıldıklarında, çözünmüş oksijen konsantrasyonunun sabit tutulduğu üretimlerin, sabit karıştırma ve havalandırma hızı uygulanan kesikli üretimlere göre daha düşük değerlerde kaldığı belirlenmiştir.

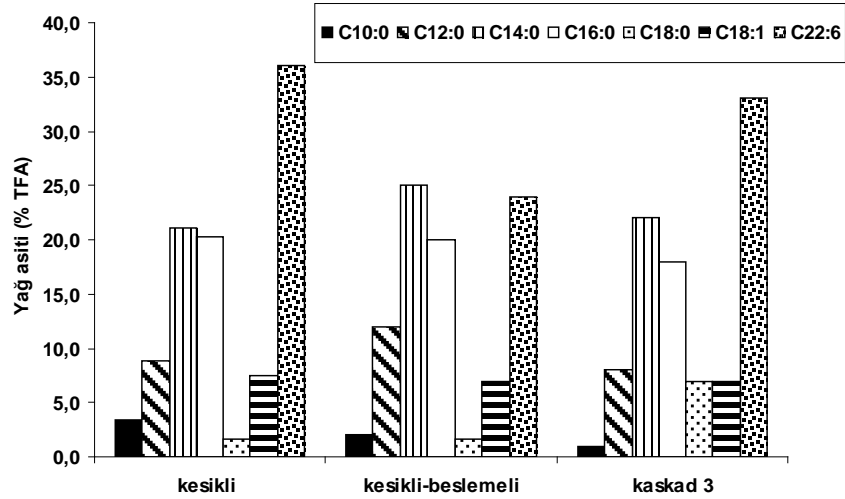
4.4.7 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen kesikli-beslemeli biyoreaktör üretimleri

Erlenlerde gerçekleştirilen optimizasyon sonuçlarına göre, gliserolün 20 g/l; maya ekstraktının ise yaklaşık 2 g/l'den fazla olan miktarlarının organizma üzerinde inhibe edici etkisinin olabileceği saptanmıştır. Dolayısıyla bu faktörlerden gliserolün, ortamdaki konsantrasyonunun kontrol edilebileceği kesikli beslemeli üretim kaskad 3 işletim modunda gerçekleştirilmiştir. Başlangıç gliserol konsantrasyonunun 10-11 g/l arasındadır. Bu üretimde, üretim boyunca ortamdaki gliserol konsantrasyonunu 6-10 g/l arasında tutulması hedeflenmiştir. Üretim boyunca hücresel gelişim Şekil 4.29' da görülmektedir. Üretimin 3. ve 4. günlerinde gliserol beslemesi yapılarak gliserol konsantrasyonunun belli aralıkta sabit kalması sağlanmıştır. Üretim sonunda, organizmanın 1g/l.gün biyokütle verimliliğine ve toplam biyokütlenin %28 oranında yağ içeriğine sahip olduğu saptanmıştır. Üretim sonunda elde edilen biyokütlerdeki DHA miktarı ise yaklaşık 27 mg/g olarak belirlenmiştir. Kesikli-beslemeli olarak gerçekleştirilen üretimde hücrelerin yağ asidi kompozisyonu optimum koşullarda gerçekleştirilen kesikli üretimle karşılaştırıldığında, kesikli- beslemeli üretimde C14:0 yağ asidi oranında artış, DHA oranında ise azalma olduğu saptanmıştır (Şekil 4.30).



Şekil 4.29 Ortamdaki gliserol konsantrasyonunun kontrol edildiği kesikli-beslemeli üretimde zamanla hücre gelişimi (g/l) ve gliserol tüketim hızındaki değişim

Yapılan bir çalışmada, *C. cohnii* ile etanol üzerinden gerçekleştirilen kesikli beslemeli üretimde biyokütledeki toplam yağ miktarının %40; toplam yağ asitleri içerisindeki DHA oranının ise %33 düzeyinde olduğu ortaya konulmuştur (De Swaaf et al., 2003b).



Şekil 4.30 Kesikli ve kesikli-beslemeli işletim sisteminde gerçekleştirilen üretimlerin yağ asidi kompozisyonlarındaki farklılıklar

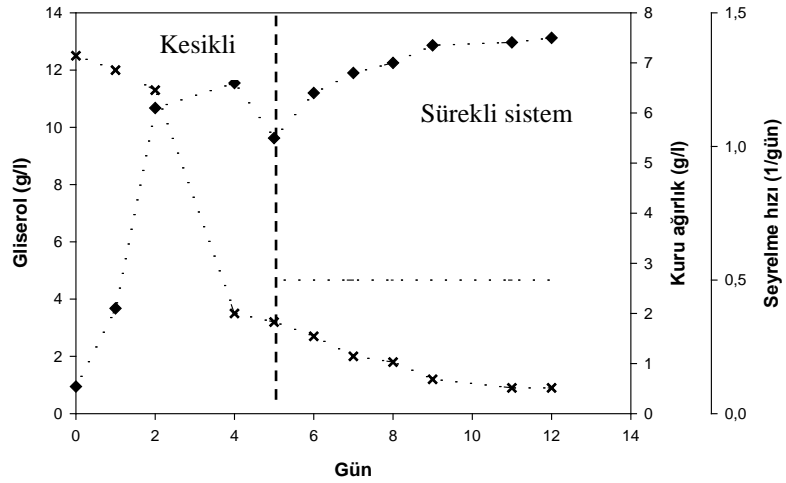
Gliserol konsantrasyonu üzerinden yapılan kesikli-beslemeli üretim sonucunda elde edilen biyokütle verimliliği, toplam yağ miktarı aynı koşullardaki kaskad 3 üretimiyle karşılaştırıldığında herhangi bir fark olmadığı; DHA üretimi açısından ise daha düşük seviyede kaldığı saptanmıştır.

4.4.8 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen sürekli işletim biyoreaktör üretimleri

Kesikli üretimlerde, özellikle yağ ve DHA üretimi açısından en yüksek değerlerin hücreler logaritmik fazın sonları veya stasyonel fazın başlarında elde edildiği saptanmıştır. Dolayısıyla, sürekli sistemlerle hücreleri bu fazda tutmaya çalışarak en yüksek yağ ve DHA içeriğindeki biyokütle miktarını arttırmak amaçlanmıştır. Ayrıca, kültür ortamında bulunan bazı besin öğelerinin (karbon, azot, fosfor kaynaklarının) sürekli üretim boyunca kısıtlandığı durumlar yaratılarak organizmanın hücre gelişimi ve toplam yağ miktarı ve DHA konsantrasyonu açısından verdiği yanıtların araştırılması hedeflenmiştir. Kesikli işletim sistemlerinde hücrelerin spesifik büyüme hızının 1,0-1,3 1/gün arasında değiştiği belirlenmiştir. Sürekli sistemde ilk olarak, seyrelme hızı (D) olarak 0,5 1/gün kullanılmasına ve bu seyrelme hızının biyokütle verimliliğine, toplam yağ miktarı ve yağ kompozisyonuna etkilerinin incelenmesine karar verilmiştir.

4.4.8.1 Herhangi bir besin limitasyonunun olmadığı üretimde, *C. cohnii* biyokütle verimliliği, toplam yağ miktarı ve yağ kompozisyonundaki değişim

Sürekli işletim sistemi denemelerine, kesikli sistemde optimize edilen ortam ve çevresel koşullarda başlanmıştır. Buna göre, *C. cohnii* ile optimize edilen kültür ortamında (Bkz. Çizelge 4.13) karıştırma hızı 150 rpm, havalandırma hızı 1 vvm ve pH değerinin 7.0'ye sabitlendiği koşullarda kesikli üretime başlanmıştır. Başlangıçtaki kesikli üretim boyunca ve sistem sürekli sisteme döndürülmeden önce, hücreler yaklaşık 5,5 g/l biyokütle konsantrasyonuna ulaşmışlardır (Şekil 4.31). Sürekli sisteme geçildikten sonraki günde biyokütle miktarında artış gözlenmekle birlikte 9. günden itibaren yaklaşık 7,5 g/l civarlarında sabitlenme görülmüştür. Besleme başladıktan sonra ortamdaki gliserol konsantrasyonunda da gittikçe azalan bir eğilim belirlenmiştir. Üretim sonunda ise 1 g/l gliserolün ortamda kaldığı saptanmıştır (Şekil 4.31). Üretim sonunda elde edilen biyokütlerdeki toplam yağ miktarının ise %33 (g/g); yağ içerisindeki spesifik DHA miktarının ise 31 mg/g olduğu belirlenmiştir.



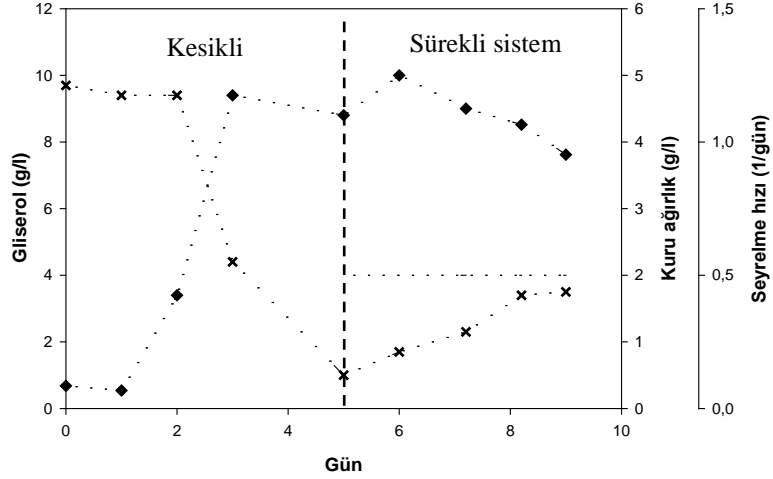
Şekil 4.31 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen sürekli biyoreaktör işletim sisteminde zamanla kuru ağırlık (♦), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), seyrelme hızındaki (-) değişim.

4.4.8.2 Azot kısıtlamasının yapıldığı üretimde *C. cohnii* biyokütle verimliliği, toplam yağ miktarı ve yağ asidi kompozisyonundaki değişim

Sürekli beslemeli sistem denemelerine, kesikli sistemdeki optimum ortam ve çevre şartlarında başlanmıştır. Sürekli sistem boyunca reaktör çalışma hacmi 1,5 l olarak sabitlenmiştir. Sistem öncelikle kesikli olarak başlamış ve üretimin yaklaşık 5. gününden itibaren besleme ve çıkış hatları açılmıştır. Hücrelerin spesifik büyüme hızının 1,0-1,3 1/gün arasında değiştiği belirlenmiştir. Sürekli sistemde seyrelme hızı olarak 0,5 1/gün kullanılmıştır. Azot kısıtlamasının yaratılacağı bu sistemde beslemede maya ekstraktı 0,3 g/l düzeyinde bulunmaktadır. Diğer tüm bileşenler ise başlangıç reaktör ortamı ile aynı olacak şekilde hazırlanmıştır.

Başlangıçtaki kesikli üretim boyunca ve sistem sürekli sisteme döndürülmeden önce, hücreler yaklaşık 4,5 g/l biyokütle konsantrasyonuna ulaşmışlardır (Şekil 4.32). Sürekli sisteme geçildikten sonraki günde biyokütle miktarındaki artış devam etmiştir. Seyrelme hızı yaklaşık olarak spesifik büyüme hızının yarısında tutulduğu için, hücrelerde başta azot kısıtlamasının başlamadığı düşünülmüştür. Takip eden günlerde ise biyokütle konsantrasyonunda azalma gözlenmiştir. Besleme başladıktan sonra ortamdaki gliserol konsantrasyonunda da artış, üretimin 8. gününden sonra ise değişmediği görülmektedir. Üretim sonunda elde edilen biyokütlelerin toplam yağ miktarı %33 (g/g), yağ içerisindeki spesifik DHA miktarının ise 60 mg/g olduğu belirlenmiştir. Pleissner and Eriksen (2012)

tarafından yapılan çalışmada, azot kısıtlamasının üretimin başında oluşturulduğu sürekli üretimde elde edilen biyokütledeki yağ oranının %13-15; DHA miktarının ise yaklaşık 30 mg/g düzeyinde olduğu ortaya konmuştur.



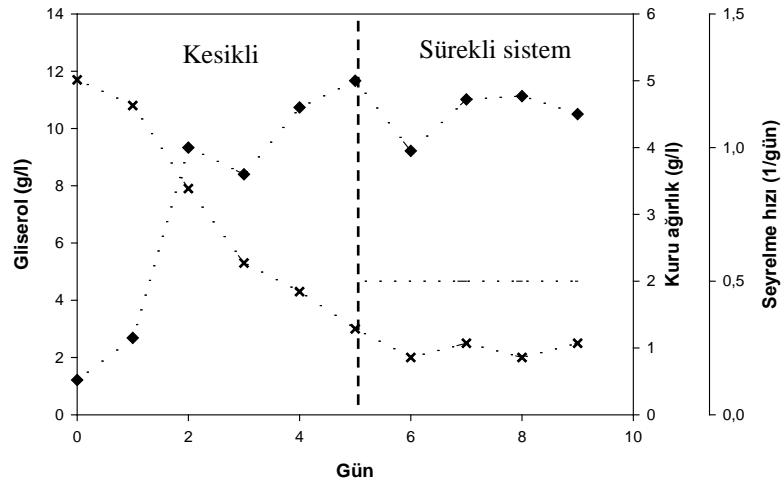
Şekil 4.32 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen azot kısıtlamasının yapıldığı sürekli biyoreaktör işletim sisteminde zamanla kuru ağırlık (♦), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), seyrelme hızındaki (-) değişim.

Üretimin beşinci gününden itibaren azot kısıtlamasının başladığı bu üretimde ve herhangi bir besin kısıtlamasının yapılmadığı bir önceki üretimde (Bkz. Şekil 4.31) elde edilen biyokütlelerin toplam yağ içeriklerinde herhangi bir fark olmadığı saptanmıştır. Azot kısıtlamasının yaratıldığı bu üretimde sürekli sistem başlatıldıktan bir süre sonra biyokütle konsantrasyonunda düşüş başlamıştır. Buna bağlı olarak da ortamdaki gliserol konsantrasyonunda artış gözlenmiştir. Sonuçlar bu yönüyle *C. cohnii* ile sürekli sistemde yapılan bir diğer çalışmayla benzerlik göstermektedir (Pleissner and Eriksen, 2012).

4.4.8.3 Fosfor (sodyum betagliserofosfat ve K_2HPO_4) kısıtlamasının yapıldığı üretimde biyokütle verimliliği, toplam yağ miktarı ve yağ asidi kompozisyonundaki değişim

Daha önce gerçekleştirilen, herhangi bir besin kısıtlamasının yapılmadığı ve azot kısıtlamasının yapıldığı sürekli sistem üretimlerde biyokütlelerdeki toplam yağ oranlarında önemli bir fark saptanmamıştır. İki üretim arasındaki farklılık elde edilen toplam biyokütle yönünden olmuştur (Bkz. Şekil 4.31, Şekil 4.32). Bu denemede ise besleme ortamından fosfor kaynaklarının tümü çıkarılarak organizmanın gelişimi ve toplam yağ miktarı üzerine etkisinin incelenmesi

hedeflenmiştir. Başlangıçtaki kesikli üretimin sonunda 1,0 l/gün spesifik büyüme hızıyla, yaklaşık 5 g/l biyokütle konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Üretimin 5. gününden itibaren 0,5 l/gün seyrelme hızıyla besleme ve çıkış hatları açılmıştır. İlk gün biyokütle konsantrasyonunda düşüş gözlenmiş, sonrasında ise hafif bir artışla biyokütle seviyesi 4,7 g/l seviyelerine ulaşmıştır (Şekil 4.33). Bu arada ortamda 2 g/l düzeyinde kullanılmayan gliserol olduğu da saptanmıştır. Üretim sonunda elde edilen biyokütlenin toplam yağ miktarı %32 (g/g); toplam yağ içerisindeki DHA miktarı ise 36 mg/g olarak belirlenmiştir



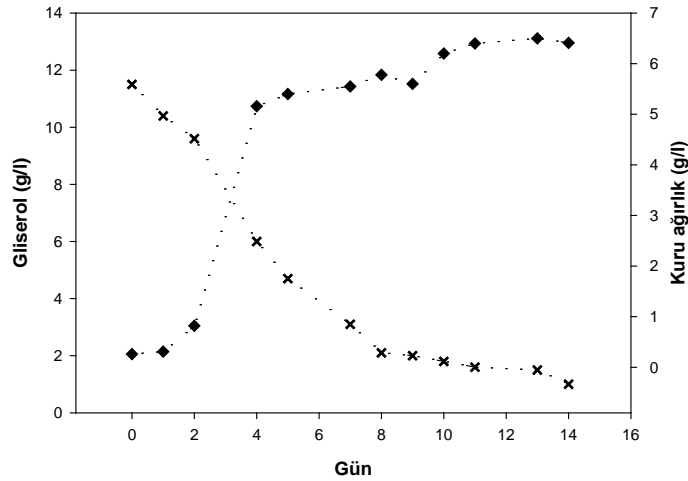
Şekil 4.33 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen fosfor (sodyum betagliserofosfat ve K₂HPO₄) kısıtlamasının yapıldığı sürekli biyoreaktör işletim sisteminde zamanla kuru ağırlık (♦), gliserol konsantrasyonu (g/l, x), seyrelme hızındaki (-) değişimler.

Farklı besin kısıtlamalarının yapıldığı bu üretimler sonucunda, biyokütledeki yağ oranlarında önemli bir fark belirlenmemiştir. Ancak, azot ve fosfor kısıtlamalarının yapıldığı üretimlerde elde edilen biyokütle miktarında düşüş saptanmıştır. Benzer olarak, Pleissner and Eriksen (2012) çeşitli besin öğelerinin (fosfat, azot ve glikoz) başlangıçta kısıtlandığı sürekli üretimler sonucunda elde edilen biyokütlerin toplam yağ ve protein içeriklerinde önemli bir farklılığa rastlamadıklarını belirtmişlerdir. Ayrıca, azot ve fosfat kısıtlamasının yapıldığı *C. cohnii* hücrelerinde birbiriyle benzer olarak toplam biyokütlenin %50'sinden fazlasının nişastadan oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Glikoz kısıtlamasının yaratıldığı üretimde, azalan seyrelme hızıyla daha şiddetli bir kısıtlama oluşturulmuş ve buna bağlı olarak biyokütle miktarında düşüş gözlenmiştir (Pleissner and Eriksen, 2012). Biyokütledeki bu düşüş hücre içindeki nişasta konsantrasyonunun değişimi ile açıklanmıştır.

4.4.8.4 Farklı seyrelme hızında, biyokütle verimliliği, toplam yağ miktarı ve yağ asidi kompozisyonundaki değişim

Önceki üretimlerde kullanılan 0,5 1/gün seyrelme hızı yerine bu kez seyrelme hızının düşürüldüğü (0,25 1/gün) sürekli sistemle üretim gerçekleştirilmiştir. Daha düşük seyrelme hızıyla organizmanın besin öğeleri bakımından daha şiddetli bir kısıtlamaya sokulması ve buna göre organizma üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Başlangıçtaki kesikli üretimin sonunda 5,5 g/l biyokütle konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Üretimin 5. gününden itibaren 0,25 1/gün seyrelme hızıyla besleme ve çıkış hatları açılmıştır. Devam eden günlerde biyokütle miktarında daha yavaş bir artış gözlenmiştir. Ondört günlük üretim sonunda elde edilen biyokütle miktarı yaklaşık 6,5 g/l düzeyinde kalmıştır (Şekil 4.34). Bu arada ortamda 1 g/l düzeyinde kullanılmayan gliserol olduğu da saptanmıştır. Üretim sonunda elde edilen biyokütlenin toplam yağ miktarı %44 (g/g); toplam yağ içerisindeki DHA miktarı ise 45 mg/g olarak belirlenmiştir. Seyrelme hızının düşürüldüğü bu sürekli üretim sonucunda biyokütlerdeki toplam yağ miktarı açısından kesikli üretimlerle kıyaslanabilir ölçüde yüksek bir sonuç elde edilmiştir. Toplam yağ içerisindeki DHA miktarı da optimum koşullarda gerçekleştirilen kesikli üretime (49 mg/g) yakın bir değerde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.34 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen sürekli biyoreaktör işletim sisteminde (seyrelme hızı 0,25 1/gün) zamanla kuru ağırlık (♦), gliserol konsantrasyonundaki (g/l, x) değişim.

Benzer olarak, *S. limanicum* ile farklı seyrelme oranlarında gerçekleştirilen sürekli sistemde üretim sonucunda, azalan seyrelme oranlarıyla hücrelerin DHA

içeriğinde (mg/g) artış olduğu saptanmıştır (Ethier et al., 2011). Yapılan diğer çalışmalarla benzer olarak, *C. cohnii* ile gerçekleştirilen sürekli sistem üretimlerinde belirlenen seyrelme hızı, hücrelerin gelişimi, toplam yağ ve DHA üretim performansları üzerinde daha etkili olmaktadır (Wen and Chen, 2002; Ethier et al., 2011).

EPA üreticisi heterotrofik *N. laevis* hücrelerinin sürekli işletim sistemiyle üretiminde farklı seyrelme hızlarının hücrelerin gelişimi üzerindeki etkileri belirlenmiştir (Wen and Chen, 2002). Hücrelerin kesikli işletim sisteminde maksimum spesifik büyüme hızı 1,0 1/gün olarak belirlenmiştir. Sürekli sistemde optimum seyrelme hızını belirlemek için farklı seyrelme hızları denenmiş ve en yüksek biyokütle verimliliğinin $D=0,6$ 1/gün olduğu durumda elde edilmiştir. Seyrelme hızının $D>0,3$ 1/gün olduğu durumda ortamda oldukça yüksek miktarda glikoz kaldığı belirlenmiştir.

C. cohnii ile 3 farklı işletim sisteminde (kesikli, kesikli-beslemeli ve sürekli) gerçekleştirilen üretimler biyokütle verimi açısından karşılaştırıldığında sürekli sistemle elde edilen verimin daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. Fakat verimlilik (g/1.gün) açısından bakıldığında, kesikli sistemle elde edilen verimlilik değerleri daha yüksek olmaktadır. Gliserol üzerinden biyokütle verimi ise her 3 işletim sistemi için de hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir. Biyokütlerdeki toplam yağ ve DHA miktarı açısından karşılaştırıldıklarında ise, sürekli sistemde azalan seyrelme oranları ile daha yüksek yağ ve DHA içeriğine sahip biyokütle elde edilmiştir. Ayrıca, sabit işletme koşullarında (seyrelme hızı ve başlangıç substrat konsantrasyonu), sürekli sistemle, kesikli ve kesikli beslemeli sistemlere göre daha kararlı bir yağ asidi kompozisyonu elde etmek mümkün olabilmektedir. Çünkü kesikli ve kesikli-beslemeli üretimlerde kültürün büyüme eğrisine bağlı olarak değişken bir yağ asidi profili elde edilmektedir (Ethier et al., 2011; Pleissner and Eriksen, 2012).

4.4.9 Büyük ölçekte *C. cohnii* biyokütle üretimi

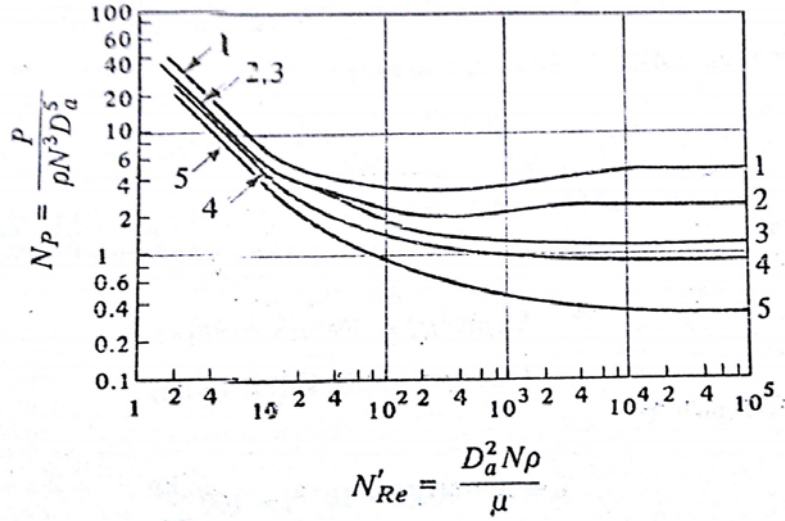
Büyük ölçek üretimlerde hücre canlılığını tehdit eden faktörlerden biri de karıştırıcı hızı ve kayma gerilimi ilişkisidir. Kayma gerilimini biyoreaktördeki üretim ortamının viskozitesi, yoğunluğu, karıştırma hızı, karıştırıcının çapı, kuru hava püskürtmek için kullanılan güç, sıvıya aktarılan güç, sıvıya aktarılan enerji dağılımı ve dinamik viskozite etkilemektedir (Bailey and Ollis, 1986) .

Besi ortamının viskozite ve yoğunluk değerleri suya oldukça yakın olduğu düşünülerek suyun viskozite ($1 \cdot 10^{-3} \text{ kg/m.s}$) ve yoğunluk (997 kg/m^3) değerleri kabul edilmiştir. Dolayısıyla, Reynolds sayısı üretim ortamının yoğunluğu, dinamik viskozite değeri, karıştırıcının çapı ve karıştırma hızı kullanılarak denklem 6 hesaplanmış ve

$$Re = \frac{997 \text{ kg/m}^3 * 2,5 \text{ s}^{-1} * (53 * 10^{-3} \text{ m})^2}{10^{-3} \text{ kg/m.s}}$$

Re=7000 olarak bulunmuştur.

Güç sayısının büyüklüğü Şekil 4.35’de görüldüğü gibi, Reynolds sayısının (Re_s) fonksiyonudur. Laminer akış için güç sayısı Reynold sayısı ile azalırken, turbulent akış için karıştırıcı tipine bağlı olarak sabittir. Endüstriyel biyoreaktörlerde Re_s genellikle büyüktür ve bu durumda çekilen güç karıştırıcı çapı ve devir sayısı ile orantılıdır (Bailey and Ollis, 1986).



Şekil 4.35 Farklı karıştırıcılar için Reynolds sayısının fonksiyonu olarak güç sayısı: 1. yassı pervaneli çark, 2. flat six blade open turbine disk, 3. turbin (45° açılı), 4. propeller, 5. propeller, 6. high efficiency impeller (Türker, 2005).

$$\text{Laminer akış için } P \propto N^2 d_i^3 \text{ ve } N_p \propto \frac{1}{Re}$$

Denklem 17

$$\text{Turbulent akış için } P \propto N^3 d_i^5 \text{ ve } N_p = \text{sabit}$$

Denklem 18

Ayrıca karıştırma için kullanılan güç, yaklaşık karıştırıcı sayısı ile orantılı olarak artar. Bazı karıştırıcılar için güç sayıları Çizelge 4.16'da verilmiştir. Türbin karıştırıcılar diğer karıştırıcılardan daha yüksek N_p değerlerine sahiptir. Yani daha çok enerji kullanırlar. Fermentörlerde karışma ve kütle aktarımı güç tüketimi ile orantılı olduğundan daha yüksek güç sayısına sahip olan karıştırıcı tercih edilmelidir.

Çizelge 4.16 Yüksek Reynolds sayılarında güç sayıları (Türker, 2005)

Karıştırıcı	Güç sayısı (N_p)
Yassı pervaneli çark (Rushton)	5,2
45° pitch four bladed impeller	1,27
Three bladed propeller	0,23
Four bladed large area hydrofoil (A315)	0,75

Reynolds sayısı 7000 iken türbülanslı rejimde güç sayısı (N_p) yaklaşık 5,0 olarak alınmıştır. Şekil 4.34, karıştırıcıların güç karakteristiklerinin belirlenmesi için havalandırmasız ve newtonian sıvılar için tasarlanmıştır (Türker, 2005). Havalandırmalı sistemde karıştırıcıların güç gereksinimleri havalandırmasız sisteme kıyasla önemli ölçüde azalmaktadır. Bunun nedeni, oluşan hava kabarcıklarının karıştırıcı çevresindeki sıvının yoğunluğunu azaltmasıdır. Karıştırıcı tipine ve havalandırma hızına bağlı olarak havalandırmalı sistemin (P_g) güç gereksinimi havalandırmasız sistemin (P) güç gereksinimine oranı P_g/P 0,3-1,0 arasındadır (Nielsen et al., 2003).

Çalışmamızda P_g/P oranı 0,5 olarak kabul edilmiştir. Sıvıya aktarılan güç denklem 5 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$P = N_p \rho_L N_i^3 d_i^5$$

$$P = 5,2 * (997) * (2,5)^3 (0,053)^5$$

$$P = 0,034 \text{ W} \quad \text{2 litrelik biyoreaktör için}$$

$$P_g/P = 0,5 \text{ ise } P_g = 0,017 \text{ W}$$

$$P_g/V=0,016 \text{ W}/1,5*10^{-3} \text{ m}^3$$

$$P_g/ V=10,6 \text{ W}/ \text{ m}^3$$

5 l'lik biyoreaktör için;

$$10,6= P_g/V$$

$$10,6= P_g/0,004\text{m}^3 \text{ ise } P_g= 0,0424 \text{ W}; \text{ karıştırıcı sayısı } 2 \text{ olduğu için}$$

$$P= 0,0424*2=0,0848 \text{ W}$$

$$P = N_p \rho_L N_i^3 d_i^5$$

$$0,0848 = 5,2 * 997 * N^3 (0,064)^5$$

$$N=2,5 \text{ 1/s ise } N=150 \text{ rpm (5 l'lik reaktörde karıştırma hızı)}$$

30 l'lik biyoreaktör için;

$$0,016= P_g/V$$

$$0,016= P_g/0,02 \text{ ise } P_g=3,2* 10^{-4}; \text{ karıştırıcı sayısı } 2 \text{ ise}$$

$$P=6,4*10^{-4}$$

$$P = N_p \rho_L N_i^3 d_i^5$$

$$6,4 * 10^{-4} = 5,2 * 997 * N^3 (0,080)^5$$

$$N=200 \text{ rpm (30 l'lik reaktörde karıştırma hızı)}$$

Belirlenen bu karıştırma hızlarında 5 ve 30 litrelik biyoreaktörlerde yapılan üretimler sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.17'de görülmektedir. Ölçek büyütme ile elde edilen sonuçlar, daha önceki 2 l'lik kesikli üretimlerle karşılaştırıldığında biyokütle verimliliği olarak hemen hemen birbirine yakın değerlerin elde edildiği görülmektedir. Toplam yağ içeriklerinde biraz düşme görülmekle birlikte yağ kompozisyonlarında fazla bir fark olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.17 *C. cohnii* ile 5 l ve 30 l'de gerçekleştirilen kesikli biyoreaktör üretimlerinde elde edilen biyokütle verimlilikleri (g/l.gün), toplam yağ miktarı (g/g) ve yağ kompozisyonları

Biyoreaktör	Biyokütle		Yağ kompozisyonu (% TFA)						
	veriml. (g/l.gün)	%Toplam yağ							
			C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C22:6
5 litre	1,1	30	2	8	20	19	1,5	8	36
30 litre	0,98	31	3	10	19	17	2	8	34

4.4.10 *C. cohnii* biyokütle üretiminde endüstriyel atıkların kullanılma olanaklarının araştırılması

Yeni bir ortam tasarımında ve optimizasyonunda önemli noktalardan biri, ortamdaki her bir bileşenin hücre gelişimi üzerindeki etkisinin taranmasıdır (Mandenius ve Brundin, 2008). Taguchi ortogonal dizaynı ve Plackett-Burman (PB) dizaynları endüstriyel proseslerde özellikle geliştirme evresindeki denemelerde sıklıkla kullanılan istatistiksel tasarımlardır (Strobel and Sullivan, 1999; Chi et al., 2007; Wang and Wan, 2009). Bu tarama çalışmalarının ardından, kültür ortamında önemli etkisi bulunan parametrelerin konsantrasyonlarının optimizasyonu amacıyla yüzey yanıt yöntemleri kullanılmaktadır (Liu et al., 2003; Chi et al., 2007; Gao et al., 2009).

Çalışmanın bu kısmında, PAS ve CSL'nin heterotrofik mikroalg *C. cohnii* tarafından alternatif karbon ve azot kaynakları olarak kullanılıp kullanılmayacağını ortaya koymak hedeflenmiştir. Kültür ortamında PAS ve CSL'nun kullanıldığı ortamlarda önemli besinsel bileşenlerin etkisinin belirlenmesi amacıyla istatistiksel tarama metodları kullanılmıştır. Bu iki endüstriyel atığın değerlendirildiği kültür ortamı oluşturularak optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bilindiği kadarıyla da bu çalışma, bu atık ve yan ürünlerin heterotrofik mikroalg *C. cohnii* tarafından kullanıldığını gösteren ilk çalışma olmaktadır.

4.4.10.1 Mısır ıslatma şurubunun (CSL) kullanıldığı *C. cohnii* kültür ortamında biyokütle verimliliğine etki eden besinsel bileşenlerin taranması

Endüstriyel bir yan ürün olan mısır ıslatma şurubunun (CSL) *C. cohnii*'nin büyüme ortamında kullanım imkanının araştırılması, organizmanın büyümesi,

elde edilen toplam biyokütle, toplam yağ miktarı ve yağ kompozisyonuna olan etkilerinin ortaya konması amacıyla CSL'nin kullanıldığı denemeler gerçekleştirilmiştir. Mısır ıslatma şurubu, mısır tanelerinden mısır unu elde edilebilmesi için tanelerin koçandan ayrılmadan önce hacminin %50'si kadar su ile 45–52 °C'de 40–48 saat süresince çalkalanması ve evaporasyon prosesi esnasında suda çözünebilir materyallerin suya geçişi ile elde edilen viskoz reolojik karaktere sahip endüstriyel bir atıktır. Daha önce, kullanılan CSL'nin toplam azot miktarı 36 g/l; toplam şekeri 200g/l; indirgen şekeri ise 1.62 g/l olarak belirtilmiştir.

C. cohnii kültür ortamında kullanılabilir en uygun CSL konsantrasyonunu belirlemek amacıyla yapılan ön denemeler sonucunda, 10g CSL/100 ml konsantrasyonu biyokütle ve yağ verimliliği açısından uygun bulunmuştur. Ortamdaki bu CSL konsantrasyonu varlığında diğer kültür ortamı bileşenlerinin organizmanın gelişimine etkilerini ortaya koymak amacıyla istatistiksel tarama metodları kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak kullanılan glikoz varlığında kültür ortamında bulunan başlıca 7 bileşenin, organizmanın gelişimi üzerindeki etkileri Taguchi tasarımıyla ortaya konmuştur (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18 CSL (10 g/100 ml) içeren kültür ortamında biyokütle verimliliğinde etkili olan faktörlerin (gerçek değerlerinde) Taguchi dizaynı ile taranması

Run	Faktörler*							Yanıt
	A (g/l)	B (g/l)	C (g/l)	D (ml/l)	E (ml/l)	F (g/l)	G (g/l)	Biyokütle Verimliliği (g/l.gün)
1	0,01	1	0,01	0,1	3	0,05	0,15	0,86
2	0,001	1	0,15	0,1	0,3	0,05	1,5	0,79
3	0,001	1	0,15	1	3	0,005	0,15	1,06
4	0,01	0,1	0,15	1	0,3	0,05	0,15	0,94
5	0,001	0,1	0,01	0,1	0,3	0,005	0,15	1,25
6	0,01	1	0,01	1	0,3	0,005	1,5	0,82
7	0,01	0,1	0,15	0,1	3	0,005	1,5	0,94
8	0,001	0,1	0,01	1	3	0,05	1,5	0,80

*Taguchi tasarımı ile etkileri taranan 7 besin bileşeni (A-G, sırasıyla); dipotasyum hidrojenfosfat, glutamik asit, sodyum β-gliserofosfat, vitamin çözeltisi, metal çözeltisi, ammonyum sülfat, tris tampon

Bu deney tasarımına uygun olarak yapılan denemeler sonucunda elde edilen değerler, programa (Design Expert 7.0.0) girilerek varyans analizi yapılmıştır. Buna göre, 10 g/ 100ml CSL bulunan kültür ortamında, K_2HPO_4 , glutamik asit, vitamin ve metal çözeltileri, $(NH_4)_2SO_4$ ve tris tamponunun biyokütle verimliliği üzerindeki etkileri önemli bulunmuştur (Çizelge 4.19). Tüm bu faktörler biyokütle verimliliği üzerine negatif yönde etkili olmaktadır. Dolayısıyla, bu faktörlerin ortamda en düşük konsantrasyonlarında bulunmaları gerekmektedir. Mısır ıslatma şurubu içerdiği azotlu bileşikler, vitaminler, aminoasitler ve mineraller ile son derece besleyici bir besin kaynağıdır (Liggett and Koffler, 1948). Çalışmanın bu kısmında elde edilen sonuçlara göre, *C. cohnii* kültür ortamında 10g/100 ml konsantrasyonunda bulunan CSL ile sodyum β -gliserofosfat kullanımına gerek kalmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, diğer ortam bileşenlerinin de (K_2HPO_4 , glutamik asit, vitamin ve metal çözeltileri, $(NH_4)_2SO_4$ ve tris tamponu) *C. cohnii* biyokütle verimliliği için en düşük seviyede tutulması gerektiği ortaya konmuştur. Bu çalışma sonuçlarına göre, CSL'nin *C. cohnii* üretiminde kullanılabilir bir besin kaynağı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.19 Kültür ortamında mısır ıslatma şurubunun (CSL, 10g/100ml) bulunduğu Taguchi deneme deseni sonucunda biyokütle verimliliğine ait ANOVA sonuçları

Biyokütle verimliliği (g/l.gün)				
Kaynak	MS	F-value	P>F	
Model	0,029	9370,56	0,0276	
K_2HPO_4	0,014	4643,45	0,0093	
Glutamik asit	0,019	6222,43	0,0081	
Metal çözeltisi	2,358E-003	767,15	0,0230	
Vitamin çözeltisi	6,694E-003	2178,30	0,0136	
$(NH_4)_2SO_4$	0,057	18550,90	0,0047	
Tris tampon	0,073	23861,16	0,0041	
	SS	DF	Adj. R ²	0,9999
Artan	3,073E-006	1	R ²	1,0000

4.4.10.2 Peyniraltı suyu (PAS) kullanılan *C. cohnii* kültür ortamında biyokütle verimliliğine etki eden besinsel bileşenlerin taranması

Bir diğer endüstriyel atık olan PAS'nun *C. cohnii* üretim ortamında değerlendirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sütün peynir mayası veya organik asitle pıhtılaşmasından ve peynirin esasını oluşturan pıhtının alınmasından sonra, geri kalan yeşilimsi sarı renkteki sıvı kısım peyniraltı suyudur. Zengin besin içeriğine sahip PAS genel olarak ortalama 4,5-4,7 pH'ya sahip olup kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) 86,3 g/l, genel olarak askıda asılı madde değeri 6,9 g/l ve toplam azotu 0,2 g/l civarındadır (Azbar et al., 2009). Süt endüstrisinden kaynaklanan atık sularda, en büyük kirletici kaynağı, peynir üretimi sonucu oluşan atık olan peyniraltı suları oluşturmakta ve bu tür atıksular çevre kirliliğine neden olmaktadır. Çalışmanın bu aşamasında, zengin bir besin içeriğine sahip ve süt endüstrisi atığı olan peyniraltı suyunun *C. cohnii*'nin büyüme ortamında kullanım olanaklarının, organizmanın büyümesi, elde edilen toplam biyokütle, toplam yağ miktarı ve yağ kompozisyonuna olan etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Yapılan ön denemeler sonucunda, *C. cohnii* ile en yüksek biyokütle ve yağ verimlilikleri PAS'ın kültür ortamında, seyreltilmeden, doğrudan kullanıldığı denemelerde elde edilmiştir. Kültür ortamından su tamamıyla çıkarılarak ortamın sadece PAS'dan oluşması sağlanmıştır. PB deneme deseni, şayet incelenecek faktör sayısı fazla ise uygulaması son derece pratik bir metottur (Strobel and Sullivan, 1999). Dolayısıyla, bu deneme deseni *C. cohnii* hücrelerinin PAS ortamında gelişimine etki eden faktörlerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Çizelge 4.20'de her bir faktörün 2 seviyesinin ele alındığı 12 denemeden oluşan PB deneme deseni ve yanıt olarak da biyokütle verimliliği görülmektedir.

Yapılan varyans analizi sonucunda (Çizelge 4.21), PAS'dan oluşan *C. cohnii* kültür ortamında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, demir-3-klorit hegzahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), metal ve vitamin çözeltilerinin etkilerinin önemsiz olduğu görülmüştür ($p > 0,05$). PAS'dan oluşan kültür ortamında *C. cohnii* biyokütle verimliliğine etkili olan faktörlerin ise K_2HPO_4 , glutamik asit, maya ekstraktı, tris tampon, sodyum β -gliserofosfat, deniz tuzu ve glikoz olduğu belirlenmiştir. Sodyum β -gliserofosfat ve K_2HPO_4 'ın biyokütle verimliliği üzerine negatif yönde etkili olduğu, dolayısıyla ortamda minimum değerde bulunmaları gerektiği saptanmıştır. Diğer taraftan, tris tamponu, deniz tuzu, glikoz, maya ekstraktı ve glutamik asitin biyokütle verimliliği üzerine pozitif yönde etkili olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın

bu kısmında elde edilen veriler doğrultusunda, PAS'nun birtakım besin elementleri ile zenginleştirilerek *C. cohnii* kültür ortamında kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Çizelge 4.20 Peyniraltı suyundan oluşan kültür ortamında biyokütle verimliliğine (g/l.gün) etkili olan faktörlerin (gerçek değerlerinde) Plackett-Burman tasarımı ile taranması

Faktörler*												Yanıt
Run	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Biyokütle verimliliği (g/l.gün)
1	0,01	1	1,5	0,1	0,3	0,005	1,5	0,001	0,15	28,0	0,00	0,95
2	0,01	1	1,5	0,1	3	0,05	1,5	0,001	0,00	0,00	10,0	1,28
3	0,001	1	1,5	1	0,3	0,005	0,15	0,01	0,00	28,0	10,0	1,33
4	0,01	1	0,1	0,1	0,3	0,05	0,15	0,01	0,15	0,00	10,0	0,06
5	0,01	0,1	0,1	0,1	3	0,005	1,5	0,01	0,00	28,0	10,0	1,08
6	0,001	0,1	0,1	0,1	0,3	0,005	0,15	0,001	0,00	0,00	0,00	0,25
7	0,01	0,1	1,5	1	0,3	0,05	1,5	0,01	0,00	0,00	0,00	0,87
8	0,001	1	0,1	1	3	0,005	1,5	0,01	0,15	0,00	0,00	0,77
9	0,01	0,1	1,5	1	3	0,005	0,15	0,01	0,15	0,00	10,0	0,12
10	0,001	0,1	1,5	0,1	3	0,05	0,15	0,01	0,15	28,0	0,00	0,62
11	0,01	1	0,1	1	3	0,05	0,15	0,001	0,00	28,0	0,00	0,39
12	0,001	0,1	0,1	1	0,3	0,05	1,5	0,01	0,15	28,0	10,0	1,04

*Plackett-Burman tasarımı ile kurulan deneme desenindeki faktörler (A-K, sırasıyla), dipotasyum hidrojenfosfat (g/l), glutamik asit (g/l), maya ekstraktı (g/l), vitamin çözeltisi (ml/l), metal çözeltisi (ml/l), amonyum sülfat (g/l), tris tampon (g/l), demir(III) klorid hegzahidrid, sodyum β -gliserofosfat, deniz tuzu (g/l), glikoz (g/l).

4.4.10.3 Yüzev Yanıt yöntemi (RSM) kullanılarak seçilen ortam bileşenlerinin optimizasyonu

C. cohnii, gelişimi için kompleks besin elementlerine ihtiyaç duymaktadır (Tuttle and Loeblich, 1975). Bu çalışmada, hem PAS ortamında hem de besin elementi olarak CSL'nin kullanıldığı ortamda gelişen *C. cohnii* hücrelerinin besin gereklilikleri yapılan istatistiksel tarama metodlarıyla saptanmıştır (Bkz. Çizelge

4.19). CSL içeren ortamda; K_2HPO_4 , glutamik asit, vitamin ve metal çözeltileri, $(NH_4)_2SO_4$ ve tris tamponunun *C. cohnii* gelişimi üzerinde negatif yönde etkili olduğu saptanmıştır. PAS ortamında gelişen *C. cohnii* hücrelerinin gelişimi üzerine ise, tris tamponunun, deniz tuzunun, glikozun, maya ekstraktının ve glutamik asitin etkili oldukları saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.21). PAS’da yeterli düzeyde azotlu bileşik bulunmadığı için, bu ortamda azot ihtiyacının gerekliliği bilinmektedir (Azbar et al., 2009). Sonuç olarak, PAS ortamında yapılan istatistiksel tarama sonuçlarına göre de, maya ekstraktı ve glutamik asitin hücre gelişimi üzerine olumlu yönde etki ettiği belirlenmiştir. Glikoz her iki denemede de kullanılan tek karbon kaynağı olmuştur. PAS ortamında gelişen *C. cohnii* hücrelerinin azot ihtiyacının ortama CSL ilave edilerek karşılanacağı düşünülmüştür. Dolayısıyla hem PAS’nun hem de CSL’nun birlikte kullanılacağı ortam optimizasyonu planlanmıştır. Bu amaçla, yüzey yanıt yöntemi kullanılmıştır. Her iki atığın kullanıldığı ortam için yapılan tarama sonuçlarına göre biyokütle miktarı üzerine etkisi önemsiz ve negatif yönde etkili olan parametreler, yeni geliştirilen ortamda minimum seviyelerinde tutulmuşlardır. PAS ve CSL’nin kullanılacağı bu yeni *C. cohnii* kültür ortamının optimize edilecek tasarım parametreleri CSL, deniz tuzu ve tris tamponu olarak belirlenmiştir. Tüm tasarım parametrelerinin minimum ve maksimum değerleri belirlenerek merkezde 6 tekrarı içeren, 20 farklı kombinasyondan oluşan 2^3 -tam faktöriyel CCD Design Expert 7.0.0 programı kullanılarak oluşturulmuştur. Kuru hücre ağırlığı (g/l) tasarımında yanıt olarak alınmıştır (Çizelge 4.22).

CCD deneme deseni sonucunda elde edilen ve yanıtı ilgili bağımsız değişkenlerle ilişkilendirilen, istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülen birinci dereceden polinom model denklemi şu şekildedir:

$$Y = 1,43 + 0,20 * X_1 + 0,11 * X_2 + 0,21 * X_3 + 0,038 * X_1 * X_2 - 0,23 * X_1 * X_3 + 0,05827 * X_2 * X_3 \quad \text{Denklem 19}$$

Tahmin edilen yanıt, yani bu denemedeki biyokütle verimliliği (g/l.gün) Y ile gösterilmiştir. X_1 , X_2 , X_3 faktörlerin kodlanmış değerleri olup sırasıyla deniz tuzu (g/l), tris tamponu (g/l) ve CSL konsantrasyonu (g/100 ml)’dir. Çizelge 4.23’de görüldüğü gibi optimize edilen ortamda biyokütle verimliliği, CSL içeren ortamda elde edilen (Bkz. Çizelge 4.18) ve PAS ortamında elde edilen biyokütle verimliliğinden (Bkz. Çizelge 4.20) daha yüksek değerlerdedir.

Çizelge 4.21 Peyniraltı suyundan oluşan kültür ortamında biyokütle verimliliğine (g/l.gün) etkili olan faktörlerin ANOVA sonuçları

Kaynak	Biyokütle verimliliği (g/l.gün)			
	MS	F-value	P>F	
Model	2,13	49,93	0,0042	
K ₂ HPO ₄	0,28	51,75	0,0055	
Glutamik asit	0,057	10,62	0,0472	
Maya ekstraktı	0,21	38,91	0,0083	
Tris tampon	0,88	164,09	0,0010	
Sodium β-gliserofosfat	0,23	42,25	0,0074	
Deniz tuzu	0,36	66,5	0,0039	
Glikoz	0,094	17,63	0,0247	
	SS	DF	Adj. R ²	0,9727
Kalan	0,016	3	R ²	0,9925

Deneme sonunda yapılan varyans analizi Çizelge 4.23’de görülmektedir. Model F değeri (13,96) modelin önemli olduğunu göstermektedir (p<0,01). İstatistiksel analiz sonucunda deniz tuzu ve CSL’nin biyokütle verimliliği üzerinde ikili etkileşiminin önemli olduğu saptanmıştır. Ayrıca, tris tamponun biyokütle verimliliği üzerine etkisinin de önemli olduğu belirlenmiştir.

Deniz tuzu ve CSL konsantrasyonu arasındaki etkileşim ayrıca Şekil 4.36’da görülen yüzey yanıt eğrisinden de görülmektedir. Yüzey yanıt eğrisi, bağımsız değişken tris tamponu merkezdeyken diğer iki bağımsız değişkenin (deniz tuzu ve CSL) sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını vermektedir. Şekil 4.36’ya bakıldığında, PAS içerisinde, başlıca azot kaynağı olarak CSL içeren ortamda *C. cohnii* biyokütle verimliliği için iki optimum bölge görülmektedir. Bu alanlardan bir tanesi, deniz tuzu konsantrasyonunun yüksek, CSL konsantrasyonunun düşük olduğu bölge; bir diğeri ise CSL konsantrasyonunun yüksek, deniz tuzu konsantrasyonunun düşük olduğu bölge olmaktadır. Denizel mikroalgal türlerin, geniş bir tuz aralığına toleranslı olduğu, *C. cohnii* için daha önceki yapılan çalışmalarda da görülmektedir (De Swaaf et al., 1999; Jiang and Chen, 1999).

Çizelge 4.22 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen 2³-tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımına ait, bağımsız değişkenlerin (deniz tuzu, tris tampon, mısır ıslatma şurubu) gerçek değerleri ve elde edilen yanıtlar (biyokütle verimliliği, g/l.gün)

Kodlanmış faktörlerin gerçek değerleri						
Faktörler	Kodlanmış sembol	-1.682	-1	0	+1	+1.682
Deniz tuzu (g/l)	X1	2,52	9,0	18,50	28,0	34,48
Tris tampon (g/l)	X2	0,22	0,8	1,65	2,5	3,08
CSL (g /100 mL)	X3	0,1	3,0	7,25	11,50	14,40

Runs	X1	X2	X3	Biyokütle verimliliği (g/l.gün)
1	0	0	-1,682	1,29
2	0	0	0	1,39
3	0	0	0	1,46
4	-1	1	-1	0,75
5	0	0	1,682	1,69
6	1	-1	1	1,51
7	-1	-1	-1	0,68
8	1,682	0	0	1,45
9	0	0	0	1,39
10	1	1	1	1,97
11	0	0	0	1,59
12	0	0	0	1,54
13	0	0	0	1,41
14	0	-1,682	0	1,25
15	1	1	-1	1,77
16	-1,682	0	0	1,01
17	-1	1	1	1,86
18	1	-1	-1	1,55
19	0	1,682	0	1,50
20	-1	-1	1	1,56

Bu çalışmada ise, deniz tuzu konsantrasyonu 9-28 g/l arasında incelenmiştir. Deniz tuzu konsantrasyonunun 10-11 g/l arasında olduğunda elde edilen biyokütle

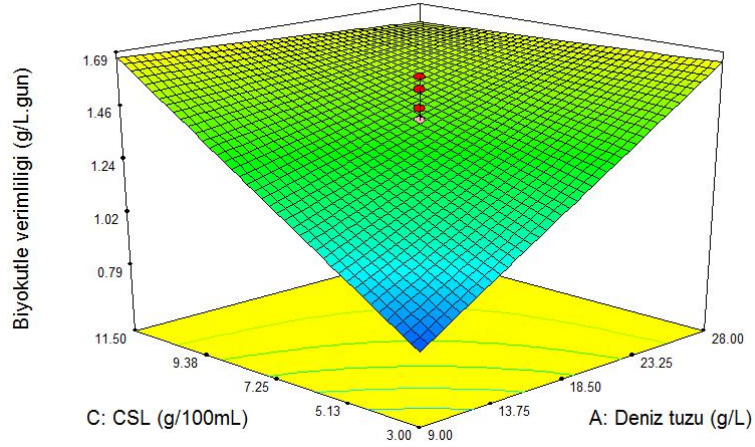
verimliliği ile; deniz tuzu konsantrasyonunun 28 g/l olduğunda elde edilen biyokütle verimlilikleri hemen hemen aynı olmaktadır (Şekil 4.36). RSM'nin yapıldığı program (Design Expert) aynı zamanda numerik optimizasyona imkan sağlamaktadır. Buna göre, kültür ortamı için, numerik optimizasyon sonucu programın önerdiği optimum değerler; CSL için 11,5 g/100 ml, tris tamponu için 2,5 g/l; deniz tuzu için ise 15 g/l şeklindedir. Daha önce yapılan bir çalışmada, deniz tuzu konsantrasyonu 9 g/l'nin *C. cohnii* CCMP316 için belirlenmiş optimum tuz konsantrasyonunun altında olduğu belirlenmiştir (Mendes et al., 2007). Özellikle büyük ölçek üretimlerde, ortamdaki deniz tuzu konsantrasyonunun sterilizasyon sırasındaki korozyon problemini önlemek amacıyla mümkün olduğunca düşük tutulması gerekmektedir (Behrens, 2005). Çok düşük tuz konsantrasyonlarında elde edilen biyokütle verimliliklerinin ise (Bkz. Çizelge 4.22, deneme 16) son derece düşük olduğu görülmektedir. Tuzluluğun belli bir dereceye kadar biyokütle verimliliğini arttırdığı yapılan diğer bir çalışmada da ortaya konmuştur (De Swaaf et al., 1999).

Çizelge 4.23 *C. cohnii* ile gerçekleştirilen 2³-tam faktöriyel merkezi tümleşik tasarımına ait, bağımsız değişkenlerin (deniz tuzu, tris tampon, mısır ıslatma şurubu) biyokütle verimliliği (g/l.gün) üzerinden yapılan ANOVA sonuçları

Kaynak	SS	DF	MS	F-değeri	P>F
Model	1.74	6	0.29	13.96	<0.0001
X ₁ -Deniz tuzu	0.53	1	0.53	25.66	0.0002
X ₂ -Tris tampon	0.16	1	0.16	7.69	0.0158
X ₃ -CSL	0.59	1	0.59	28.25	0.0001
X ₁ * X ₂	0.012	1	0.012	0.56	0.4672
X ₁ * X ₃	0.42	1	0.42	20.31	0.0006
X ₂ * X ₃	0.027	1	0.027	1.30	0.2741
Kalan	0.27	13	0.021		
Uyum eksikliği	0.23	8	0.029	4.11	0.0680
Saf hata	0.036	5	7.107E-003		
Std. sapma.	0.14		R ²	0.8657	
ortalama	1.43		Adj R ²	0.8037	

C. cohnii için kullanılan pek çok kültür ortamında maya ekstraktı genellikle kullanılan azot kaynağı olmuştur (Jiang and Chen, 1999; De Swaaf et al., 1999; Mendes et al., 2007). *C. cohnii* kültür ortamında, maya ekstraktı (5g/l) ve seyreltilmiş keçiyoynuzu hamuru şurubunun alternatif karbon kaynağı olarak

kullanıldığı bir çalışmada elde edilen biyokütle verimliliğinin (0,096 g/l.gün) bu çalışmayla karşılaştırıldığında daha düşük değerlerde kaldığı belirlenmiştir (Mendes et al., 2007). Bu çalışmada, CSL'nin *C. cohnii* gelişimini önemli derecede etkilediği, maya ekstraktı yerine kullanılabilir alternatif bir azot kaynağı olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 4.36 *C. cohnii* hücrelerinin biyokütle verimliliği (g/l.gün) üzerine deniz tuzu ve CSL'nin etkileşimli etkisini gösteren 3 boyutlu yüzey yanıt grafiği

C. cohnii için optimum gelişme pH'sı 6,5-6,6 olarak belirtilmiştir (Tuttle and Loeblich, 1975; Mendes et al., 2007). Daha önceki yapılan çalışmalarda, pH 7.0'den sonra hücre büyümesinin yavaşladığı belirtilmiştir (Jiang and Chen, 2000a). Dolayısıyla, bu çalışmada kültür ortamında tris tamponu kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonuçları, tris tamponunun biyokütle verimliliği üzerinde etkisinin önemli olduğunu ortaya koymuştur (Bkz. Çizelge 4.23). Tamponun hücre büyümesi üzerindeki bu pozitif etkisi, hücreleri logaritmik büyüme fazında tutarak daha yüksek hücre yoğunluklarına ulaştırmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Tuttle and Loeblich, 1975).

CSL içeren PAS ortamında yetiştirilen *C. cohnii* CCMP 316 hücrelerinin toplam yağ içeriklerinin kuru hücre ağırlığının %14-35 (g/g) arasında değiştiği belirlenmiştir. Farklı kültür koşullarında yetiştirilen *C. cohnii* hücrelerinin toplam yağ içeriklerinin kuru hücre ağırlığının % 6- 44 (g/g)'ü kadar olduğu belirtilmiştir (De Swaaf et al., 1999; Ratledge et al., 2001; De Swaaf et al., 2003a). Bu çalışmada CSL içeren PAS ortamında yetiştirilen *C. cohnii* CCMP 316 hücrelerinin yağ içerikleri, karbon kaynağı olarak glikozun (9g/l), azot kaynağı olarak ise maya ekstraktının (0-10 g/l) kullanıldığı diğer bir çalışmada (De Swaaf

et al., 1999) elde edilen sonuçlara göre daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, PAS ve CSL'nin kullanıldığı bu kültür ortamında yetiştirilen *C. cohnii* hücrelerinin toplam yağ içeriğinin pH-auxostat sisteminde yetişmiş 4 farklı *C. cohnii* suşundan daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir (Ratledge et al., 2001). Kentsel atıksularıyla yapılan bir diğer çalışmada, *Chlamydomonas reinhardtii* hücrelerinin kesikli kültürlerinde toplam yağ içeriğinin kuru ağırlığın %16,6'sı kadar olduğu ortaya konmuştur (Kong et al., 2010). Benzer şekilde, ikincil işlem görmüş kentsel atıksuyunda yetiştirilmiş *B. braunii* hücreleri için de bu oran %18 civarında kalmıştır (Orpez et al., 2009). Heterotrofik olarak büyüme yeteneğinde olan *C. saccharophila*, *C. minutissima*, *C. cohnii* gibi mikroalg türleri yüksek biyokütle ve yüksek yağ içeriklerine sahip olabilmektedirler (De Swaaf et al., 2003a; Li et al., 2011; Isleten-Hosoglu et al., 2012). Bu çalışmada, endüstriyel atıklarda yetiştirilen *C. cohnii* hücrelerinin yüksek biyokütle ve yağ içeriklerine sahip olabildiği ortaya konmuştur.

C. cohnii hücrelerinde bulunan başlıca yağ asitleri C12:0; C14:0; C16:0; C18:0; C18:1 ve C22:6 şeklinde olmaktadır (Jiang and Chen, 1999; Jiang and Chen, 2000a,b; Mendes et al., 2007). Bu çalışmada 20 erlenden oluşan optimizasyon denemesinde elde edilen yağ asitleri ve toplam yağ asitleri içerisindeki oranları, C12:0 (2.0-3.4%); C14:0 (12.0-16.8%) ; C16:0 (24-38.7%); C18:0 (11.2-14.4%); C18:1 (20-26%) şeklinde olmuştur. C22:6 (DHA) oranları ise %7,5-12 şeklinde olduğu belirlenmiştir. *C. cohnii* hücrelerinin toplam yağ asiti kompozisyonu düşünüldüğünde son derece yüksek DHA oranları (toplam yağ asitlerinin %50'ye yakını) organizmanın karakteristiği olarak bilinmektedir (Jiang and Chen, 1999; Ratledge et al., 2001; De Swaaf et al., 2003a). Bu çalışmada ise, toplam yağ asitleri içerisinde DHA oranı son derece düşük kalmaktadır. PAS ortamında yetiştirilmiş *C. cohnii* hücrelerinin yüksek miktarda doymamış yağ asitlerinden C16:0 (24-38,7%) ve C18:0 (11,2-14,4%); tekli doymamış yağ asitlerinden ise C18:1 (20-26)'i içerdiği belirlenmiştir. Mikroalglerin yağ asidi kompozisyonu kültür ortamı kompozisyonundan etkilenmekte ve organizma bu kompozisyon değişikliklerine biyokimyasal kompozisyonunu değiştirerek cevap vermektedir (Mendes et al., 2007; Chen et al., 2011). *C. cohnii* tarafından yağ asidi oluşumunun 3 ayrı sistem tarafından düzenlendiği bilinmektedir: (1) doymuş yağ asitlerinin biyosentezi, (2) doymuş yağ asitlerinin tekli doymamış yağ asitlerine dönüşümü, (3) desaturazlar ile DHA sentezi. Yağ asidi biyosentez yolu düşünüldüğünde, çift bağ oluşumu oksidatif bir proses olup moleküler oksijene gerek duymaktadır (De Swaaf et al., 2003b). Oksijenin çözünürlüğünün ise fermentasyon ortamına eklenen iyonlar ve şekerler ile azaldığı bilinmektedir

(Doran, 1995). Melas, mısır ıslatma şurubu ve protein ajanları gibi iyonik ve iyonik olmayan çözenlerin oksijen çözünürlüğü üzerine etkisi pek çok araştırmada belirtilmiştir (Doran, 1995; Jiang and Chen, 2000a). Ayrıca, filamentli olmayan mikroorganizmalarla fermentasyonda, üretilen hücre dışı polisakkaritlerden dolayı kültür ortamında vizkozite artışı olmaktadır (De Swaaf et al., 2003a). Dolayısıyla, PAS ve CSL içeren bu kültür ortamında bulunan yüksek miktarda iyonik ve iyonik olmayan çözenlerden dolayı son derece az miktarda çözülmüş oksijen olduğu düşünülmektedir. Bu da yağ asidi desaturasyonunu katalizleyecek oksijene-bağımlı enzimlerin çalışmasını engellemekte ve yağ asidi kompozisyonunda bu tür değişikliklere neden olmaktadır (De Swaaf et al., 2003b). *C. cohnii* hücrelerinin PAS ve CSL içeren bu kültür ortamında yetiştirilmesiyle elde edilen yağların biyodizel amaçlı kullanılabilirliği düşünülebilir. Çünkü yağ kompozisyonunun %30'dan fazlası C16:0-C18:1'den oluşmaktadır. Farklı çeşitlilikte atık sularda yetiştirilebilen türlerin belirlenmesi ve aynı zamanda da biyodizel, biyometan ve biyoetanol gibi biyoyakıt üretiminde kullanılacak hammaddeye dönüşebilmesi son derece önemlidir (Chinnasamy et al., 2010). Bu çalışmada, *C. cohnii*'nin peynir endüstrisinden gelen PAS ve mısır endüstrisinden gelen CSL'nin bulunduğu ortamlarda yetiştirilebildiği ortaya konmuştur. Ayrıca, *C. cohnii* hücrelerinin, bu yeni kültür ortamında yağ asidi kompozisyonunu değiştirerek daha çok biyodizel üretimi için uygun bir hammadde kaynağı haline geldiği saptanmıştır. Sonuç olarak bu endüstriyel atık ve yan ürünlerin *C. cohnii* yetiştiriciliğinde uygun birer sürdürülebilir kaynak oldukları ilk defa bu çalışmayla ortaya konmuştur.

4.4.10.4 2 litrelik biyoreaktörde kesikli üretim

Daha önce optimize edilen kültür ortamıyla (CSL 11,5 g/100 ml, tris tamponu 2,5 g/l ve deniz tuzu da 15 g/l) 2 l'lik karıştırmalı tank biyoreaktörde kesikli üretim gerçekleştirilmiştir. Ortamdaki başlangıç glikoz ve laktoz konsantrasyonları sırasıyla 9 g/l ve 37,8 g/l düzeyindedir. Çalışmanın bu kısmında, *C. cohnii* hücrelerinin PAS ve CSL içeren optimize edilmiş kültür ortamında karıştırmalı biyoreaktörde üretimi amaçlanmıştır. Proses sonunda (168 saat sonunda) 16 g/l biyokütle konsantrasyonuna yani 2,28 g/l.gün biyokütle verimliliğine ulaşılmıştır. Üretim sonunda ortamda 0,5 g/l glikoz kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, *C. cohnii* hücrelerinin karbon kaynağı olarak laktozu hiç tercih etmediği, üretim sonunda ortamda hemen hemen aynı miktarda kalmış olan laktoz miktarından (35,1 g/l) anlaşılmıştır. Üretim sonunda elde edilen biyokütlenin yağ asidi kompozisyonu incelendiğinde, C16:0 (%33,4); C18:0

(%12,1) ve C18:1 (%24,8) yağ asitlerinin, toplam yağ asitlerinin yaklaşık %70'ni oluşturduğu saptanmıştır. Toplam yağ asitleri içerisindeki DHA oranı ise %9,1 düzeyinde kalmıştır. Denizel heterotrofik mikroalg *C. cohnii* hücrelerinin CSL ile desteklenmiş PAS ortamında bu çalışmada elde edilen sonuçların, farklı endüstriyel atıkların kullanıldığı diğer mikroalg türleri ile yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında daha yüksek biyokütle verimliliği ve yağ içeriğine sahip olduğu ortaya konmuştur (Mulbry et al., 2008; Chinnasamy et al., 2010; Kong et al., 2010). Daha ekonomik algal yağ üretimi için, hacimsel verimlilik üzerine yoğunlaşılması gerekmektedir (Brennan and Owende, 2010). Verimlilik, algal biyokütle konsantrasyonunu ve toplam yağ içeriğini arttırarak yükseltilebilir. *C. cohnii* hücrelerinin CSL ve PAS içeren ortamdaki üretiminde söz konusu iyileştirmelerin her ikisinin de mümkün olabileceği ortaya konmuştur. Öncelikli olarak, endüstriyel atıkların kullanıldığı bu ortamda *C. cohnii* hücreleriyle erlen düzeyinde 1,97 g/l.gün; biyoreaktör düzeyinde ise 2,28 g/l.gün biyokütle verimliliklerine ulaşıldığı belirlenmiştir. İkinci olarak ise, bu ortamda yetiştirilen *C. cohnii* hücrelerinin kuru ağırlığının en az %20'si kadar yağ içerdikleri saptanmıştır. Ayrıca, *C. cohnii* hücrelerinin bu alternatif kültür ortamında yağ asidi kompozisyonunu daha çok doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinden oluşacak şekilde değiştirmesi de oldukça ilginç bir sonuç olarak ortaya konmuştur. Toplam yağ asitlerinin %70'e yakınına oluşturan C16:0-C18:1 yağ asitleri kompozisyonuyla *C. cohnii* biyodizel üretimi için alternatif bir kaynak teşkil etmektedir. Son zamanlarda, bu konudaki araştırmalarda biyodizel maliyetlerini düşürebilecek pek çok alternatif tartışılmaktadır (Pittman et al., 2011). Bu çalışmada, heterotrofik mikroalgler kullanılarak bu potansiyel besin kaynaklarının biyodizel üretimi amacıyla kullanılabilmesi ortaya konmuştur. Ayrıca, kültür ortamında PAS'ın doğrudan kullanılmasıyla *C. cohnii* büyüme ortamındaki taze su gereksinimi tamamıyla ortadan kaldırılmıştır. Böylelikle, su kaynaklarının korunmasını sağlaması nedeniyle bu prosesin potansiyel olarak sürdürülebilir bir proses olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan, *C. cohnii* biyokütle üretimi tamamlandıktan sonra ortamdaki ayrılan üst sıvıda halen kullanılmamış laktoz bulunmaktadır. Dolayısıyla bu üst sıvı, halen diğer değerli yağ asitleri ve biyohidrojen üretimi için uygun bir kaynak olarak bulunmaktadır (Azbar et al., 2009). CSL ve PAS'nun bu şekilde yüksek değerlikli fermantasyon ürünlerine dönüşümünde kullanılması bu atıkları değerlendirme çok büyük faydalar sağlayacaktır.

5. SONUÇLAR

Çalışmada, öncelikle, çoklu doymamış yağ asitlerince zengin yağ asidi kompozisyonuna sahip oldukları düşünülen ve uluslararası kültür koleksiyonlarından temin edilen farklı mikroalg türlerinin (*Tetraselmis suecica* CCMP906, *Phaeodactylum tricornutum* CCMP 630, *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316, *Chlorella minutissima* UTEX 2341, *Monodus subterraneus* UTEX 151, *Chlorella saccharophila* UTEX 247) farklı kültürasyon koşullarında (fototrofik, fotoheterotrofik ve heterotrofik) büyüme ve yağ üretimi açısından potansiyelleri ortaya konmuştur.

Yapılan ön denemeler sonucunda, söz konusu mikroalglerden 4 tanesinin (*C. minutissima*, *T. suecica*, *P. tricornutum* ve *M. subterraneus*) ortamda bulunan karbon kaynağı varlığında, fotoheterotrofik olarak büyüme gösterdikleri belirlenmiştir. Biyokütle verimliliği açısından mikroalg türlerini karşılaştırdığımızda, 0,05-0,100 g/l.gün ile *T. suecica* hücrelerinin en düşük değere sahip olduğu saptanmıştır. *T. suecica*'yı 0,087-0,100 g/l.gün değerleriyle *P. tricornutum* izlemektedir. *C. minutissima* ve *M. subterraneus* hücrelerinin ise hemen hemen aynı biyokütle verimliliklerine sahip oldukları saptanmıştır. Fotoheterotrofik koşullarda gelişen bu mikroalg türlerini, yağ miktarları ve yağ kompozisyonları açısından ele aldığımızda ise; kuru ağırlığının %20-32'si kadar yağ içeren *P. tricornutum*, hem toplam yağ miktarı hem de içerdiği EPA ve DHA yağ asitleri ile dikkat çekmektedir. *P. tricornutum*'u, toplam yağ miktarı açısından (%20-34) *T. suecica* takip etse de, yağ kompozisyonuna baktığımızda neredeyse yarısı kadar EPA, az miktarda da DHA içerdiği görülmektedir. Fakat, *T. suecica* hücrelerinin toplam yağ asitleri içerisinde ω -3 yağ asitlerinden biri olan α -linolenik asiti (C18:3n3) %15-18 oranında içerdiği belirlenmiştir. *M. subterraneus* hücrelerinin ise diğer 3 mikroalg türü ile karşılaştırıldığında, daha düşük bir yağ içeriğine sahip olduğu saptanmıştır. Bu mikroalg türleri, hem heterotrofik koşullarda büyüme gösterememeleri hem de heterotrofik koşullara alternatif olan fotoheterotrofik koşullardaki biyokütle verimlilikleri, yağ miktarı ve kompozisyonları açısından düşük değerlerde kaldıkları için çalışmanın sonraki aşamaları için kapsam dışında bırakılmışlardır.

Fotoheterotrofik ve heterotrofik koşullardaki kültürlemeleri üzerine çalışılan mikroalg türleri içerisinde heterotrofik koşullarda en yüksek biyokütle verimliliğine, yağ içeriğine ve ω -3 yağ asidi kompozisyonuna sahip türlerin *Chlorella saccharophila* UTEX 247 ve *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316

olduğu tespit edilmiş ve kültür ve çevre koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Yapılan ön denemelerde, heterotrofik koşullarda uygun karbon ve azot kaynakları belirlenen *C. saccharophila* hücrelerinin Box-Behnken deneme deseni kullanılarak kültür ortamının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. *C. saccharophila* hücreleriyle optimize edilen kültür koşullarında heterotrofik olarak 2 litrelik karıştırmalı tank biyoreaktörde üretimler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, biyoreaktördeki üretim boyunca hücrelerdeki yağ üretiminin takibi, *C. saccharophila* için geliştirilen floresan spektrofotometreye dayalı nil kırmızısı metoduyla gerçekleştirilmiştir. Heterotrofik koşullarda *C. saccharophila* hücrelerinin (%54, g/g) fototrofik koşullardaki hücrelerle (%18, g/g) karşılaştırıldığında 3 kat daha fazla yağ içeriğine sahip oldukları saptanmıştır. Toplam yağ miktarındaki farklılıklarla beraber, heterotrofik ve fototrofik *C. saccharophila* hücreleri arasında yağ kompozisyonu açısından da kantitatif farklılıklar olduğu saptanmıştır. Heterotrofik kültürlerde, oleik asit (C18:1) ve linoleik asit (C18:2) başlıca doymamış yağ asitleri olup toplam yağ asitleri içerisinde sırasıyla %34,4 ve %30,1 oranlarında buldukları belirlenmiştir. Alfa-linolenik asit (C18:3) ise en çok bulunan 3. doymamış yağ asididir. En çok bulunan doymuş yağ asidi ise %13,3'lük oranıyla palmitik asit (C16:0) olarak belirlenmiştir. Buna karşılık, fototrofik kültürlerde yüksek oranda C16:0 (%29,6) bulunduğu belirlenmiştir. *C. saccharophila* hücrelerinin biyodizel üretimi için uygun bir tür olabileceği tespit edilmiştir. Çünkü toplam yağ asitlerinin %30'u C16:0-C18:1'den oluşmaktadır. Bunun yanısıra, yüksek linoleik asit ve alfa-linolenik asit gibi esansiyel yağ asitlerinin yüksek oranlarda (%30-42) içermesi dolayısıyla, *C. saccharophila* hücrelerinin insan ve hayvan beslenmesinde de kullanılabileceği düşünülmektedir.

C. cohnii ile yapılan çalışmalarda öncelikle farklı besin elementlerinin *C. cohnii* hücrelerinin hem gelişimi hem de yağ üretimi açısından etkileri incelenmiş ve optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. *C. cohnii* hücrelerinin heterotrofik koşullarda biyokütle verimlilikleri ve toplam yağ miktarı açısından en iyi sonuçlar, karbon kaynağı olarak biyodizel atığı olan gliserolün kullanıldığı denemelerde elde edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, hem biyokütle hem de yağ üretimi yönünden *C. cohnii* temel kültür ortamı, tuzluluk yaklaşık 16 g/l, maya ekstraktı 1,7-1,88 g/l, gliserol 18 g/l, glutamik asit 0,1 g/l, sodyum β -gliserofosfatın ise 0,15 g/l olacak şekilde modifiye edilmiştir.

C. cohnii ile kültür ortamının optimizasyonu tamamlandıktan sonraki aşamada, 2 l'lik karıştırmalı tank biyoreaktörde kesikli işletim sisteminde, bazı çevresel parametrelerin (karıştırma hızı, pH kontrolü, hava akış hızı, çözünmüş oksijen konsantrasyonu gibi) *C. cohnii* hücre gelişimi, toplam yağ miktarı ve yağ kompozisyonuna etkilerinin incelenmesi ve biyoreaktörde üretim koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Buna göre, incelenen parametreler açısından optimum karıştırma hızının 150 rpm olduğu, üretim süresince pH'nın 7,0'de sabitlenmesi gerektiği, optimum inkübasyon sıcaklığının 24 °C olduğu, saptanmıştır. Gerçekleştirilen kesikli biyoreaktör üretimlerinde yağ üretimi, *C. cohnii* için geliştirilen floresan spektrofotometreye dayalı nil kırmızısı metoduyla gerçekleştirilmiştir. Gliserol konsantrasyonu üzerinden yapılan kesikli-beslemeli üretim sonucunda ise elde edilen biyokütle verimliliği, toplam yağ ve DHA miktarı aynı koşullardaki kesikli üretimle karşılaştırıldığında herhangi bir fark olmadığı saptanmıştır. Farklı besin kısıtlamalarının yapıldığı sürekli işletim sistemindeki üretimler sonucunda, biyokütlerdeki yağ oranlarında önemli bir fark belirlenmemiştir. *C. cohnii* ile gerçekleştirilen sürekli sistem üretimlerinde seyrelme hızı, hücrelerin gelişimi, toplam yağ ve DHA üretim performansları üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. *C. cohnii* ile 3 farklı işletim sisteminde (kesikli, kesikli-beslemeli ve sürekli) gerçekleştirilen üretimler biyokütle verimi açısından karşılaştırıldığında sürekli sistemle elde edilen verimin daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. Fakat verimlilik (g/l.gün) açısından bakıldığında, kesikli sistemle elde edilen verimlilik değerleri daha yüksek olmaktadır. Gliserol üzerinden biyokütle verimi ise her 3 işletim sistemi için de hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir. Biyokütlerdeki toplam yağ ve DHA miktarı açısından karşılaştırıldıklarında ise, sürekli sistemde azalan seyrelme oranları ile daha yüksek yağ ve DHA içeriğine sahip biyokütle elde edilmiştir. Ayrıca, sabit operasyonel koşullarda (seyrelme hızı ve başlangıç substrat konsantrasyonu), sürekli sistemle, kesikli ve kesikli beslemeli sistemlere göre daha stabil bir yağ asidi kompozisyonu elde etmek mümkün olmuştur. Çalışmamızda *C. cohnii* hücreleri ile yapılan ölçek büyütme çalışmalarında (5 litre ve 30 litre) enerji dağılım hızı ölçek büyütmede kriter olarak alınmış, bunu takiben, 5 ve 30 litrelik reaktörler için sıvıya aktarılan güç hesapları yapılarak 5 litrelik reaktör için 150 rpm; 30 litrelik reaktör içinse 200 rpm karıştırma hızlarında üretimler gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın bir diğer kısmında, peyniraltı suyu ve mısır ıslatma şurubunun heterotrofik mikroalg *C. cohnii* tarafından alternatif karbon ve azot kaynakları olarak kullanılıp kullanılamayacağı ortaya konmuştur. Bunun için öncelikle, her

iki endüstriyel atığın tek tek bulunduğu ortamlarda, *C. cohnii* temel ortamında bulunan besin öğelerin etkinliği istatistiksel tarama metodları ile belirlenmiştir. Sonrasında, hem PAS'nun hem de CSL'nun birlikte kullanılacağı ortam optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda deniz tuzu ve CSL'nin biyokütle verimliliği üzerinde ikili etkileşiminin önemli olduğu saptanmıştır. Endüstriyel atıkların kullanıldığı yeni kültür ortamı için, numerik optimizasyon sonucu CSL için 11,5 g/100 ml, tris tamponu için 2,5 g/l; deniz tuzu için ise 15 g/l optimum değerleri elde edilmiştir. Optimizasyonu tamamlanan ortamda 2 l'lik karıştırmalı tank biyoreaktörde kesikli üretim gerçekleştirilmiştir. Üretim sonunda (168 saat sonunda) 16 g/l biyokütle konsantrasyonuna yani 2,28 g/l.gün biyokütle verimliliğine ulaşılmıştır. Bu ortamda yetiştirilen *C. cohnii* hücrelerinin kuru ağırlığının en az %20'si kadar yağ içerdikleri saptanmıştır. Üretim sonunda elde edilen biyokütlenin yağ asidi kompozisyonu incelendiğinde, C16:0 (%33,4); C18:0 (%12,1) ve C18:1 (%24,8) yağ asitlerinin, toplam yağ asitlerinin yaklaşık %70'ni oluşturduğu saptanmıştır. Toplam yağ asitleri içerisindeki DHA oranı ise %9,1 düzeyinde kalmıştır. Endüstriyel yan ürünlerin kullanıldığı bu ortamda, toplam yağ asitlerinin %70'e yakını oluşturulan C16:0-C18:1 yağ asitleri kompozisyonuyla *C. cohnii* biyodizel üretimi için alternatif bir kaynak teşkil ettiği saptanmıştır.

6. ÖNERİLER

Çalışma kapsamında elde edilen pek çok veri değerlendirildiğinde;

- (i) Uluslararası kültür koleksiyonlarından temin edilen ve fototrofik ve heterotrofik koşullar yerine fotoheterotrofik koşullarda daha iyi gelişim gösteren mikroalgal türlerin de kültür ve ortam koşullarının optimizasyonu çalışmalarına devam edilmesi önerilmektedir.
- (ii) Kendi yerel kaynaklarımızdan izole edilen ve E.Ü.Biyomühendislik Bölümü'ndeki kültür kolleksiyonda yer alan mikroalglerin de fotoheterotrofik ve/veya heterotrofik koşullardaki üretim potansiyellerinin belirlenerek koleksiyon kayıtlarına bu bilgilerin de dahil edilmesi, yapılacak çalışmaların detaylandırılmasını sağlayacağı için önerilmektedir.
- (iii) E.Ü.Biyomühendislik Bölümü'ndeki kültür koleksiyonda yer alan mikroalglerin, fotoheterotrofik ve/veya heterotrofik koşullar için aksenik hale getirilmesiyle, yüksek katma değerli ürünlerin üretim aşamasında da (örneğin GMP kodlarının gerekliliği durumunda) rahatlıkla kullanılabilmesi ve bu konuda yasal haklar edinmek için (lisans, patent gibi) yeni girişimleri doğuracağı düşünülmektedir.
- (iv) *C. saccharophila* ile kesikli üretimlerin detaylandırılarak farklı çevresel parametrelerin ve farklı işletim sistemlerinin biyokütle ve yağ verimliliği üzerine etkilerinin incelenmesi önerilmektedir. Ayrıca, ölçek büyütme çalışmalarını gerçekleştirerek endüstriyel üretime hazır hale getirilmiş fizibil bir prosesin ortaya konması; bunun yanı sıra yine endüstriyel çapta üretimler için hammadde maliyeti açısından avantaj sağlayacak endüstriyel atık ve yan ürünlerinin *C. saccharophila* tarafından da alternatif karbon ve azot kaynakları olarak kullanılıp kullanılmayacağına ortaya konması önerilmektedir.
- (v) *C. cohnii* ile farklı substrat ekleme stratejileri ile kesikli-beslemeli üretimlerin detaylandırılması; ayrıca sürekli üretimlerde farklı seyrelme hızları ve başlangıç substrat konsantrasyonlarında üretimlerin gerçekleştirilerek, hücrelerin büyüme kinetikleri ve matematiksel modellemesi üzerine çalışmalara imkan sağlayacağı düşünülmektedir.

Ayrıca *C. cohnii* ile endüstriyel atıkların kullanıldığı üretimlerin, ölçek büyütme sürecinin devam ettirilmesi önerilmektedir.

- (vi) Yağ ekstraksiyonu için, solvent kullanımına dayanan ve sağlık, çevre, güvenlik açısından dezavantajları olan geleneksel yöntemlere alternatif ekstraksiyon tekniklerinin (süper kritik CO₂ ekstraksiyon, elektiriksel alan gibi) geliştirilmesi önerilmektedir.
- (vii) Balık yağlarından elde edilen çoklu doymamış yağ asitlerinin konsantre hale getirilmesi ve saflaştırılması üzerine detaylı çalışmalar bulunmasına rağmen, mikroalglerle üretilen yağ asitlerinin saflaştırılmasında uygulanacak alt akım işlemlerine dair çalışmalar son derece kısıtlıdır. Dolayısıyla bu yönde yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
- (viii) Mikroalgal suşların genetik olarak iyileştirilmeleri üzerine yapılan çalışmalar gittikçe artmaktadır. Ticari uygulamalarda transgenik mikroalgal türlerin kullanımı çok yaygın olmamakla birlikte oldukça umut verici bir noktadır. Modifiye edilmiş türlerle söz konusu algal metabolitleri daha yüksek oranda elde edilebilmektedir. Yağ üreticisi mikroalglerle genetik mühendisliği yaklaşımlarının kullanılması yağ biyosentezi ve katabolizmasında rol alan genler, ayrıca yağ asitlerinin zincir uzunluğunun ve doymuş yağ asitleri sentezi metabolik yol izleri üzerine çalışmaların yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alonso, D.L., Belarbi, E., Fernandez-Sevilla, J.M., RodriÁguez-Ruiz, J. and Grima, E.M.**, 2000, Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*, *Phytochemistry*, 54:461-471p.
- Alonzo, F. and Mayzoud, P.**, 1999, Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red, *Marine Chemistry*. 67:289-301p.
- Azbar, N., Dokgoz, F.T, Keskin, T., Eltem, R., Korkmaz, K.S., Gezgin, Y., et al.**, 2009, Comparative evaluation of bio-hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions, *International Journal of Green Energy*, 6(2):192–200p.
- Azma, M., Mohamed, M.S., Mohamad, R., Rahim, R.A. and Arif, A.B.**, 2011, Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology, *Biochemical. Engineering, Journal*, 53:187–195p.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F.**, 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals* (2nd edition). Mc-Graw Hill, Inc.
- Barclay, W.R., Meager, K.M. and Abril, J.R.**, 1994, Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms, *Journal of Applied Phycology*, 6:123-129p.
- Behrens, P.W.**, 2005, *Photobioreactors and fermenters, The light and dark side of growing algae*, *Algal Culturing Techniques*, Andersen R. A.(Ed.), Elsevier Academic Pres, Burlington:197-198p.
- Beltran, G., Novo, M., Guillamon, J.M., Mas, A. and Rozes, N.**, 2008, Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds, *International Journal of Food Microbiology*, 121:169–177p.
- Bligh, E.G.and Dyer, W.J.**, 1959, A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, *Canadian Journal of Biochemical Physiology*, 37:911p.
- Boyle, N.R. and Morgan, J.A.**, 2009, Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*, *BMC Systems Biology*, 3:1-14p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Brennan, L. and Owende, P.**, 2010, Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14:557–577p.
- Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V., Hauser, S. and Kovar, K.**, 2011, Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91:31–46p.
- Campell, N.A. and Reece, J.B.**, 2006, *Biyoloji*, (Çev. Ed. E. Gündüz, A. Demirsoy, İ. Türkan), Ankara, 68-80s.
- Ceron Garcia, M.C., Fernandez Sevilla, J.M., Acien Fernandez, F.G., Molina Grima, E. and Garcia Camacho, F.**, 2000, Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricorutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile, *Journal of Applied Phycology*, 12:239-248p.
- Ceron Garcia, M.C., Sanchez Miron, A., Fernandez Sevilla, J.M., Molina Grima, E., Garcia-Camacho, F.**, 2005, Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricorutum* Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition, *Process Biochemistry*, 40:297–305p.
- Champe, P.C. and Harvey, R.A.**, 1997, *Biyokimya*, Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden, (Çev. E. Gür, P. Tuncel, E. Sarandöl, E. Ulukaya, M. Dirican, H. Cangül, A. Tolullugil), İstanbul, 163-205s.
- Chen, F.**, 1996, High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth, *Trends in Biotechnology*.14:421-426p.
- Chen, F and Johns, M.R.**, 1991, Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 3:203-209p.
- Chen, G.Q. and Chen, F.**, 2006, Growing phototrophic cells without light, *Biotechnology Letters*, 28:607–616p.
- Chen, G.Q., Jiang, Y. and Chen, F.**, 2007, Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*, *Food Chemistry*, 104:1580-1585p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T.C., Simon N,K.Y. and Salley, S.O.**, 2011, Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*, *Bioresource Technology*, 102:1649–1655p.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M. and Hu, Q. Ç.**, 2009, A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae, *Journal of Microbiological Methods*, 77:41–47p.
- Chi Z., Pyle D., Wen Z., Frear C. and Chen S.**, 2007, A laboratory study of producing docosaheptaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochemistry*, 42:1537–1545p.
- Chinnasamy S., Bhatnagar A., Hunt R.W. and Das K.C.**, 2010, Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications, *Bioresource Technology*, 101:3097–3105p.
- Chisti, Y.**, 2007, Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, 25:294–306p.
- Combres, C., Laliberte, G., Servin-Reyssac, J. and de la Noue, J.**, 1994, Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*, *Physiologia Plantarum*, 91:729-734p.
- Danielewicz, M.A., Anderson, L.A. and Franz A.K.**, 2011, Triacylglycerol profiling of marine microalgae by mass spectrometry, *Journal of Lipid Research*, 52:2101-2108p.
- Da Silva, T.L., Mendes, A., Mendes, R.L., Calado, V., Alves, S.S., Vasconcelos, J.M.T. and Reis, A.**, 2006, Effect of n-dodecane on *Cryptocodinium cohnii* fermentations and DHA production, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33:408-416p.
- Dean, A.P., Sigee, D.C., Estrada, B. and Pittman, J.K.**, 2010, Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae, *Bioresource Technology*, 101, 4499–4507p.
- De la Jara, A., Mendoza, H., Martel A., Molina, C., Nordström, L., de la Rosa V. and Diaz, R.**, 2003, Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*, *Journal of Applied Phycology*, 15:433–438p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Demirel, G. ve Özpınar, H.**, 2003, Yosunlar ve Hayvan Beslemede Kullanımları, Uludag University. J. Fac. Vet. Med, 22:103-108s.
- De Swaaf, M.E., de Rijk, T.C., Eggink, G. and Sijtsma, L.**, 1999, Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivation by *Cryptocodinium cohnii*, Journal of Biotechnology, 70:185–192p.
- De Swaaf, M.E., Sijtsma, L. and Pronk, J.T.**, 2003a, High-cell density fed-batch cultivation of the docosahexonoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*, Biotechnology and Bioengineering, 81, 6: 666-672
- De Swaaf, M.E., Pronk, J.T. and Sijtsma, L.**, 2003b, Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol, Applied Microbiology and Biotechnology, 61: 40-43p.
- De Swaaf, M.E., de Rijk, T.C., van der Meer, P., Eggink, G. and Sijtsma, L.**, 2003c, Analysis of docosahexaenoic acid biosynthesis in *Cryptocodinium cohnii* by ¹³C labelling and desaturase inhibitor experiments. J Biotechnol;103:21–9p.
- Doan, T.T.Y., Sivaloganathan, B. and Obbard, J.P.**, 2011, Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock, Biomass and Bioenergy, 35:2534-2544p.
- Doran, P.**, 1995, Bioprocess Engineering Principles, London, Academic.
- Elibol, M.**, 2004, Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology, Process Biochemistry, 39:1057–1062p.
- Elsley, D., Jameson, D., Raleigh, B. and Cooney, M.J.**, 2007, Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids, Journal of Microbiological. Methods, 68:639–642p.
- Ethier, S., Woisard, K., Vaughan, D. and Wen, Z.**, 2011, Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid, Bioresource Technology, 102: 88–93pp.
- Fidalgo, J.P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. and Herrero, C.**, 1998, Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*, Aquaculture, 166:105-116p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Fidancı, U.R.**, 2009, “Yağ Asitlerinin Biyosentezi”
http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/LM-Yag_Asitlerinin_Biyosentezi.html (Erişim 1 Aralık 2012).
- Fukuda, H., Kond, A. and Noda, H.**, 2001, Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92:405- 416p.
- Gao, H., Liu, M., Liu, J., Dai, H., Zhou, X., Liu, X., Zhuo, Y., Zhanga, W. and Zhang, L.**, 2009, Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology, *Bioresource Technology*, 100:4012-4016p.
- Garcia, C.F., Contreras, G.A., Mazzuca Sobezuk, T and Molina Grima, E.**, 2000, Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*, *Process Biochemistry*, 35:1045–1050p.
- Gill, I. and Valivety, R.**, 1997, Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications, *Trends in Biotechnology*, 15:401-408p.
- Gladue, R.M. and Maxey, J.E.**, 1994, Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 6:131-141p.
- Griffiths, M.J. and Harrison. S.T.L.**, 2009, Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production, *Journal of Applied Phycology*, 21:493–507p.
- Guschina, I.A. and Harwood, J.L.**, 2006, Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae, *Progress in Lipid Research*, 45:160–186p.
- Guschina, I.A. and Harwood, J.L.**, 2009, Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. Page1-20. Arts, Michael T.; Brett, Michael T.; Kainz, Martin (Eds.) *Lipids in Aquatic ecosystems*.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W. And Hu, B.**, 2010, Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162:1978–1995p.
- Hongjin, Q. and Guangce, W.**, 2009, Effect of carbon source on growth and lipid accu-mulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27:762–768p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Huang, G.H., Chen, G. and Chen, F.,** 2009, Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence, *Biomass Bioenergy* 33:1386–1392p.
- Isleten-Hosoglu, M., Gultepe, I. and Elibol, M.,** 2012, Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochemical Engineering Journal*, 61:11–19p.
- Isleten-Hosoglu, M., Tamiş-Ayyıldız, D., Zengin, G., Elibol, M.,** 2013, Enhanced growth and lipid accumulation by a new *Ettlia texensis* isolate under optimized photoheterotrophic condition, *Bioresource Technology*, 131:258-265p.
- Jiang, Y. and Chen, F.,** 1999, Effects of salinity on cell growth and docosahexaenoic acid content of the heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23:508–513p.
- Jiang, Y. and Chen, F.,** 2000a, Effects of Temperature and Temperature Shift on Docosahexaenoic Acid Production by the Marine Microalga *Cryptocodinium cohnii*, *JAACS*, 77:613-617p.
- Jiang, Y. and Chen, F.,** 2000b, Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochemistry*, 35:1205– 1209p.
- Jiang, H. and Gao, K.,** 2004, Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology*, 40:651–654pp.
- Junker, B.H.,** 2004, Scale-Up Methodologies for *Escherichia coli* and Yeast Fermentation Processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 97:347–364p.
- Kalscheuer, R., Stolting, T., Steinbuchel, A.,** 2006, Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production, *Microbiology*, 152:2529–2536p.
- Kaya, Y., Duyar, H., Avni, E., Erdem, M.E.,** 2004, Balık Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı İçin Önemi, *E.Ü Su Ürünleri Dergisi*, 21:365-370p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Khozin-Goldberg, I. and Cohen, Z.**, 2006, The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodussubterraneus*, *Phytochemistry*, 67:696-701p.
- Kimura, K., Yamaoka, M., Kamisaka, Y.**, 2004, Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence, *Journal of Microbiological Methods*, 56:331–338p.
- Kitano, M., Matsukawa, R. and Karube, I.**, 1997, Changes in eicosapentaenoic acid content of *Navicula saprophila*, *Rhodomonas salina* and *Nitzschia sp.* under mixotrophic conditions. *Journal of Applied Phycology*, 9:559–563p.
- Koç, B. ve Kaymak-Ertekin, F.**, 2009, Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları, *Gıda*, 3:1-8s.
- Kong, Q.X., Li, L., Martinez, B., Chen, P., Ruan, R.**, 2010, Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160:9–18p.
- Kwok, A.C.M. and Wong, J.T.Y.**, 2005, Lipid Biosynthesis and its Coordination with Cell Cycle Progression, *Plant Cell Physiology*, 46:1973–1986p.
- Lam, M.K., Lee, K.T. and Mohamed, A.R.**, 2010, Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review, *Biotechnology Advances*, 28:500–518p.
- Lam, M. K. and Lee, K. T.**, 2011, Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnology Advances*, 30:673-690p.
- Lee, S.J., Yoon, B.D. and Oh, H.M.**, 1998, Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*, *Biotechnology Techniques*, 12:553-556p.
- Li M, Liu GL, Chi Z and Chi, Z.M.**, 2010, Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a, *Biomass and Bioenergy*, 34:101–107p.
- Li, X., Xu, H. and Wu, Q.**, 2007, Large-Scale Biodiesel Production From Microalga *Chlorella protothecoides* Through Heterotrophic Cultivation in Bioreactors, *Biotechnology and Bioengineering*, 98:764-771p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Li, Z., Yuan, H., Yang, J., Li, B.**, 2011, Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341, *Bioresource Technology*, 102:9128-9134p.
- Liang, Y., Sarkany, N. and Cui, Y.**, 2009, Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions, *Biotechnology Letters*, 31:1043–1049p.
- Liggett, R.W. and Koffler, H.**, 1948, Corn steep liquor in microbiology, *Bacteriological Reviews*, 12:297–311p.
- Liu, B. and Benning, C.**, 2012, Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself, *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 1-10p.
- Liu, Z.Y., Wang, G.C. and Zhou, B.C.**, 2008, Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*, *Bioresource Technology*, 99:4717–4722p.
- Liu, C., Liu, Y., Liao, W, Wen, Z. and Chen, S.**, 2003, Application of statistically-based experimental designs for the optimization of nisin production from whey, *Biotechnology Letters*, 25:877–882p.
- Lv, J.M., Cheng, L.H., Xu, X.H., Zhang, L. and Chen, H.L.**, 2010, Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions, *Bioresource Technology*, 101:6797–6680p.
- Maddipati, P., Atiyeh, H.K., Bellmer, D.D., Huhnke, R.L.**, 2011, Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract, *Bioresource Technology*, 102:6494–6501p.
- Mandenius, C.F. and Brundin, A.**, 2008, Bioprocess optimization using design-of experiments methodology, *Biotechnology Progress*, 24:1191–1203p.
- Meiser, A., Schmid-Staiger, U., and Trosch, W.**, 2004, Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricorutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor. *Journal of Applied Phycology*, 16:215–225p.
- Mendes, A., Guerra, P., Madeira, V., Ruano, F., da Silva, T.L. and Reis, A.**, 2007, Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP316 using carob pulp as a promising carbon source, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:1209–1215p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Mendes, A., Reis, A., Vasconcelos, R., Guerra, P. and da Silva, T. L.,** 2009, *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review, *Journal of Applied Phycology*, 21:199-214p.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. and Xian, M.,** 2009, Biodiesel production from oleaginous microorganisms, *Renewable Energy*, 34:1-5p.
- Mulbry, W., Kondrad, S. and Buyer, J.,** 2008, Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates, *Journal of Applied Phycology*, 20:1079-1085p.
- Montgomery, D.C.,** 2005, Design and analysis of experiments, 6th ed., John Wiley & Sons Inc. Newyork, 3-10p.
- Muthukumar, M., Mohan, D. and Rajendran, M.,** 2003, Optimization of mix proportions of mineral aggregates using Box-Behnken design of experiments, *Cem. Concr. Res.* 25, 751-758p.
- Nelson, D.L and Cox, M.M.,** 2005, Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, (Çev. Ed. N. Kılıç), Ankara, 363-387s, 770-799s.
- Nielsen, J., Villadsen, J. and Liden, G.,** 2003, Bioreaction Engineering Principles (2nd edition). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA
- O'Grady, J. and Morgan, J.A.,** 2010, Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol, *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 34:121-125p
- Orpez, R., Martinez, M.E., Hodaifa, G., El Yousfi, F., Jbari, N. And Sanchez, S.,** 2009, Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage, *Desalination*;246:625-630p.
- Perez-Garcia, O., de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P. and Bashan, Y.,** 2010, Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*, *Journal of Phycology*, 46:800-812p.
- Perez-Garcia, O. Bashan, Y. and Puente, M.E.,** 2011a, Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*, *Journal of Phycology*, 47:190-199p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E. and Bashan, Y.,** 2011b. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products, *Water Research*, 45:11–36p.
- Pesta, G., Meyer-Pittroff, R. and Rus, W.,** 2007, Utilization of Whey, 193-207, Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry, Oreopoulou, V. and Russ, W, (Eds.), Springer science Business media, New York
- Petkov, G. and Garcia, G.,** 2007, Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 35:281–285p.
- Pittman, J.K., Dean, A.P. and Osundeko, O.,** 2011, The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102:17–25p.
- Pleissner, D. and Eriksen, N.,** 2012, Effects of Phosphorous, Nitrogen, and Carbon Limitation on Biomass Composition in Batch and Continuous Flow Cultures of the Heterotrophic Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*, *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 2005-2016p.
- Popovich, C. A., Damiani, C., Constenla, D., Martínez, A. M., Freije, H., Giovanardi, M., Pancaldi, S. and Leonardi, P.I.,** 2012, *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition, *Bioresource Technology*, 114:287–293p.
- Pruvost, J., Vooren, G. V., Cogne, G. and Legr, J.,** 2009, Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in Photobioreactor, *Bioresource Technology*, 100:5988–5995p.
- Pyle, D.J., Garcia, R. A. and Wen, Z.,** 2008, Producing Docosahexaenoic Acid (DHA)-Rich Algae from Biodiesel-Derived Crude Glycerol: Effects of Impurities on DHA Production and Algal Biomass Composition, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:3933–3939p.
- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Darzins, A and Posewitz, M. C.,** 2010, Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production, *Eukaryotic Cell*, 486–501p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Rao, A.R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R. and Ravishankar, G.A.,** 2007, Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents, *Bioresource Technology*, 98:560–564p.
- Ratledge, C., Kanagachandran, K., Anderson, A.J., Grantham, D.J. and Stephenson, J.C.,** 2001, Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source, *Lipids*, 36:1241–1246p.
- Ratledge, C.,** 2004, Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production, *Biochimie* 86:807-815p.
- Ratledge, C.** 2005, Single cell oils for the 21st Century, 1-20, In *Single Cell Oil* Cohen, Z. and Ratledge, C. (Eds.) AOCS Pres, USA.
- Ratledge, C and Cohen, Z.,** 2008, Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils, *Lipid technology*, 20:155-160p.
- Robles-Medina, A., Molina-Grima, E., Gimenez-Gimenez, A. and Ibanez-Gonzalez, M.J.,** 1998, Downstream processing of Algal polyunsaturated fatty acids, *Biotechnology Advances*, 16,3:517-580p.
- Sakthivel, R., Elumalai, S. and Arif, M.M.,** 2011, Microalgae lipid research, past, present: A critical review for biodiesel production, in the future, *Journal of Experimental Sciences*, 2(10):29-49p.
- Schmidt, R.A., Wiebe, M.G. and Eriksen, N.T.,** 2005, Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnology and Bioengineering*, 90:77-84p.
- Scott, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I., Howe, C.J., Lea-Smith, D.J. and Smith, A.G.,** 2010, Biodiesel from algae: challenges and prospects, *Current Opinion in Biotechnology*, 21:277-286pp.
- Seto, A., Wang, H.L. and Hesseltine, C.W.,** 1984. Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima*. *JAOCS*, 61;5,892-894p
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z. and Mao, E.,** 2009, Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160:1674–1684p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Shi, X.M., Liu, H.J., Zhang, X.W. and Chen, F.**, 1999, Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures, *Process Biochemistry* 34:341–347p.
- Shwu-Tzy, W., Shih-Tsung, Y., Liang-Ping, L.**, 2005, Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31. *Process Biochemistry*, 40:3103–3108p.
- Sijtsma, L. and de Swaaf, M.E.**, 2004, Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64:146–153p.
- Sobczuk, T.M., Camacho, F.G., Grima, E.M. and Chisti, Y.**, 2006, Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*, *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 28:243–250p.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A.**, 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.101, 2:87-96p.
- Strobel R and Sullivan G.**, 1999, Experimental design for improvement of fermentations, 80-93, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Demain, A.L. and Davies, J.E. (Eds), ASM Press; Washington.
- Subramaniam, R., Dufreche, S., Zappi, M. and Rakesh, B.**, 2010, Microbial lipids from renewable resources: production and characterization, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37:1271-1287p.
- Tan, C.K. and Johns, M.R.**, 1991, Fatty acid production by heterotrophic *Chlorella saccharophila*, *Hydrobiologia*, 215:13–19p.
- Thomas, W.H., Seibert, D.L.R., Alden, M., Neori, A. and Eldridge, P.**, 1984, Yields, photo-synthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. II. *Dunaliella primolecta* and *Tetraselmis suecica* experiments, *Biomass* 5:211–225p.
- Tomaselli, L.**, 2004, The microalgal cell, 3-20, *Handbook of Microalgal Culture, Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond, A. (Ed.), Blackwell Science, UK.
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R. and Graham, I.A.**, 2002, Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae, *Phytochemistry*, 61:15-24p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Turan, M.D. ve Altundoğan, H. S.**, 2011, Hidrometalurjik araştırmalarda yanıt yüzey yöntemlerinin kullanımı, Madencilik, 50, 3:11-23p.
- Tuttle, R.C., Loeblich, A.R.**, 1975, An optimal growth medium for the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*, Phycology, 14:1-8p.
- Türker, M.**, 2005, Biyoreaksiyon Mühendisliği Biyolojik Proseslerin Kinetiği ve Modellemesi, 317-329, Su Vakfı Yayınları, İstanbul
- Vazhappilly, R. and Chen, F.**, 1998, Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Production Potential of Microalgae and Their Heterotrophic Growth, Journal of the American Oil Chemists Society, 75,3:393-397p.
- Wang, J. and Wan, W.**, 2009, Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review, International Journal of Hydrogen Energy 34: 235- 244p.
- Wen, Z.Y. and Chen, F.**, 2000, Heterotrophic production of eicosapentaenoid acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 25:218–224p.
- Wen, Z.Y. and Chen, F.**, 2001, Application of statistically-based experimental designs for the optimization of eicosapentaenoic acid production by the diatom *Nitzschia laevis*. Biotechnology and Bioengineering, 75:159–169p.
- Wen, Z.Y. and Chen, F.**, 2002, Continuous cultivation of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: physiological study and process optimization. Biotechnology Progress,18:21– 28p.
- Wen, Z. Y. and Chen, F.**, 2003, Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae, Biotechnology Advances, 21:273-294p.
- Wen, Z.Y., Jiang, Y. and Chen, F.**, 2002, High cell density of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: fed-batch development, Process Biochemistry, 37:1447–1453p.
- Widjaja, A., Chien, C.C. and Ju, Y.H.**, 2009, Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 40:13–20p.
- Wu, S.T., Yu, S.T. and Lin, L.P.**, 2005, Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31, Process Biochemistry, 40,:3103–3108p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Wu, Z. and Shi, X.**, 2007, Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model, Letters in Applied Microbiology, 44,:13–18p.
- Wynn, J.P., Behrens, P., Sundararajan, A., Hansen, J. and Apt, K.**, 2005, Production of single cell oils by Dinoflagellates, Chapter 6, Single Cell Oil, Cohen, Z. and Ratledge, C. (Eds.), AOCS Pres, USA.
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J. and Wu, Q.**, 2008, High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for micro-biodiesel production, Applied Microbiology and Biotechnology, 78:29–36p.
- Xu, H., Miao, X. and Wu, Q.**, 2006, High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters, Journal of Biotechnology, 126:499–507p.
- Yang, C., Hua, Q. and Shimizu. K.**, 2000, Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions, Biochemical Engineering Journal, 6:87–102p.
- Yang, J., Rasa, E., Tantayotai, P., Scow, K.M., Yuan, H. and Hristova, K.R.**, 2011, Mathematical model of *Chlorella minutissima* UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions, Bioresource Technology, 102:3077–3082p.
- Yeesang, C. and Cheirsilp, B.**, 2011, Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand, Bioresource Technology, 102:3034–3040pp.
- Yongmanitchai, W. and Ward, O.P.**, 1991, Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions, Applied and Environmental Microbiology, 57:419– 425p.
- YouWen, Z. and Chen, F.**, 2001, Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*, Enzyme and Microbial Technology, 29:341–347p.
- Zhang, Y., Dube, M.A., McLean, D.D. and Kates, M.**, 2003, Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. Bioresource Technology, 90:229–240p.

ÖZGEÇMİŞ

Eğitim Geçmişi

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Mezuniyet yılı
BSc	Gıda Müh.	Ege Üniversitesi	1999
MSc	Gıda Müh.	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2006
Phd	Biyomühendislik	Ege Üniversitesi	2007-

İş Deneyimi

2007 Ocak-	Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü/İzmir	Araştırma Gör.
2004 Ocak-2006 Aralık	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü	Araştırma Gör.
2001 Kasım-2004 Ocak	Demko Domates Salça ve Konserve Fabrikası Biga/Çanakkale	Ar-Ge ve Mikrobiyoloji Şefi. Kalite Kontrol Temsilcisi
2000 Kasım-2001 Haziran	Beğendik Hipermarket A.Ş. / Ankara	Restorant Yönetici Asistanı

YAYINLAR

SCI, SCI-EXP. Tarafından Taranan Dergilerde Yapılan Yayınlar

Isleten-Hosoglu, M., Ayyıldız-Tamis, D., Zengin, G., Elibol, M. 2013. Enhanced growth and lipid accumulation by a new *Ettlia texensis* isolate under optimized photoheterotrophic condition. **Bioresource Technology**, 131, 258-265.

Isleten-Hosoglu, M., Elibol, M. 2012. The Potential of Biomass and Lipid Production by Heterotrophic Microalga *Cryptocodinium cohnii* in Cheese Whey Containing Corn Steep Liquor. **Biomass & Bioenergy** (Under review).

Isleten-Hosoglu, M., Gultepe, I., Elibol, M. 2012. Optimization of Carbon and Nitrogen Sources for Biomass and Lipid Production by *Chlorella saccharophila*

under Heterotrophic Conditions and Development of Nile Red Fluorescence Based Method for Quantification of Its Neutral Lipid Content. **Biochemical Engineering Journal**, 61, 11–19.

Yesil-Celiktas, O., **Isleten, M.**, Cetin O. E., Vardar-Sukan F. 2010. *In vitro* release kinetics of pine bark extract enriched orange juice and the shelf stability. **British Food Journal**, 112, (10), 1063-1076.

Karagul Yuceer, Y., Tuncel, B, Guneser, O., Engin, B., **Isleten, M.**, Yasar, K, and Mendes, M., 2009. Characterization of aroma-active compounds, sensory properties, and proteolysis in Ezine cheese. **Journal of Dairy Science**. 2009. 92:4146-4157.

Celiktas Y. Ö., **Isleten M.**, Yuceer K. Y. Bedir E., Sukan V. F. 2009. Influence Of Supercritical CO₂ And Methanolic Extracts Of Rosemary On Sensory Properties And Shelf-Life Of Wheat Germ Oil. **Journal of Food Quality**. 32;709-724.

Isleten, M. and Yuceer, Y. 2008. Effects of Functional dairy based proteins on nonfat yogurt quality. **Journal of Food Quality**. 31;265-280.

Yuceer, K. Y., **Isleten, M.**, Pala, C. 2007. Sensory Characteristics of Ezine Cheese. **Journal of Sensory Studies**. 22;49-65.

Isleten, M. and Yuceer, Y. 2006. Effects of Dried Dairy Ingredients on Physical and Sensory Properties of Non Fat Yogurts. **Journal of Dairy Science**. 89:2865-2872.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yapılan Yayınlar

Kocabaş Hameş, E, Celiktas, Y. O, **Isleten, M**, Sukan-Vardar, F. 2008. Antimicrobial activity of pine bark extract and assessment of potential application in cooked meat. **Gıda**. 33 (3): 123-127.

Isleten, M., Pala, C., Yuceer, K. Y. 2007. Ezine Peynirinin Mineral Madde İçeriği. **Gıda**. 4,173-179.

Isleten, M., Yuceer, K.Y., Yılmaz, E., Mendes, M. 2007. Consumer attitudes and factors affecting buying decision for functional foods. **Gıda**. 32(1):25-32.

Yılmaz, E. and **Isleten, M.** 2004. Gıda matrislerinden aroma maddeleri salınımının fiziksel esasları. Gıda Mühendisliği Dergisi, Yıl: 8, Sayı:18, 25-29.

Uluslararası kongrelerde sunulan çalışmalar

Gultepe, I., **Isleten-Hosoglu, M.**, Elibol, M. Simultaneous Microalgae Production and Phenol Biodegradation in Olive Mill Wastewater Using *Chlorella saccharophila*. 9th European Workshop "Biotechnology of Microalgae". 4-5 June 2012. Berlin, Almanya (Poster sunum)

Ayyıldız-Tamis, D., **Isleten-Hosoglu, M.**, Demirel, Z., Conk-Dalay, M., Elibol, M. Selection of Suitable Microalgae Species for Lipid Production from Local Isolates and Development of Their Cultural Conditions. 9th European Workshop "Biotechnology of Microalgae". 4-5 June 2012. Berlin, Almanya (Poster sunum)

Gultepe, I., **Isleten-Hosoglu, M.**, Elibol, M. "The Effect of Olive Mill Wastewater on Growth of Heterotrophic Microalgae and Removal of Total Phenol Concentration" 14-16 September 2011. IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2011), İspanya (Poster sunum).

Ayyıldız-Tamis, D., **Isleten-Hosoglu, M.**, Elibol, M. "An Efficient Protocol to Obtain Axenic Culture of Oil Rich *Neochloris pseudoalveolaris* and Its Adaptation to Photoheterotrophic Cultivation" 14-16 September 2011. IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2011), İspanya (Poster sunum).

Isleten-Hosoglu, M., Elibol, M. "Docosahexaenoic Acid Production by Heterotrophic Microalga, *Cryptocodinium cohnii* in Whey and Corn Steep Liquor Medium" 14-16 September 2011. IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2011), İspanya (Sözlü sunum)

Isleten-Hosoglu, M., Elibol, M. "Heterotrophic and Mixotrophic Growth Capabilities of Some Microalgae Species For Lipid Production" ATCAB 2010. International Workshop on "Advanced training course in Algal Biotechnology". 25-29 October 2010. İzmir. (Sözlü sunum).

Isleten-Hosoglu, M., Elibol, M. “Lipid Synthesis in Heterotrophic Microalgal Cultures” 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition Biotechnology for the Sustainability of Human Society. 14-18 September 2010 · Palacongredi, Rimini - Italya (Poster sunum)

Yuceer-Karagul, Y., Guneser, O., Togay, O., **Isleten-Hosoglu, M.**, Elibol, M. “Potential use of olive Pomace to Produce Bioaroma” COST Action FA0907, 2nd. European Yeast Flavour Workshop, 26-27 May, 2011 Delft, Hollanda.

Karagül Yüceer, Y., Guneser, O., Toğay-Özmen, S., **Isleten-Hosoglu, M.**, Elibol, M. “Production and optimization of natural flavor compounds from agricultural waste using biotechnology” COST Action FA0907, European Yeast Flavour Workshop, 28-29 October 2010, INSA-Toulouse, Fransa

Isleten, M., Onal, T., Elibol, M. “An Investigation of Heterotrophic Capabilities of Some Microalgal Species” 5. International Bioengineering Congress 16-19 Haziran 2010, İzmir (Sözlü sunum).

Eriksen, N.T., Pleissner, D., **Isleten, M.** “Pigment and Lipid Synthesis in Heterotrophic Microalgal Cultures” 5. International Bioengineering Congress 16-19 Haziran 2010.

Isleten, M., Pala, Ç.U., Karagul-Yuceer, Y. “Fruit Flavoured- Probiotic Dairy Beverages.” TUBITAK Marmara Research Center Food Institute 1st International Food and Nutrition Congress 15-18 Haziran 2005, İstanbul (Poster sunum)

Isleten, M., Karagul-Yuceer, Y., Yılmaz, E., Mendes, M. “Consumer Attitudes and Factors Affecting Buying for Functional Foods” TUBITAK Marmara Research Center Food Institute 1st International Food and Nutrition Congress 15-18 Haziran 2005, İstanbul. (Sözlü sunum).

Tuncel, B., Pala, Ç.U., **Isleten, M.**, Karagul-Yuceer, Y. “Gluten-free Cereal Based Products and Recent Developments” TUBITAK Marmara Research Center Food Institute 1st International Food and Nutrition Congress. 15-18 Haziran 2005, İstanbul.

Karagul-Yuceer, Y., **Isleten, M.**, Pala, Ç.U. “Sensory Characteristics of Ezine Cheese.” TUBITAK Marmara Research Center Food Institute 1st International

Food and Nutrition Congress. 15-18 Haziran 2005, İstanbul.

Ulusal kongrelerde sunulan çalışmalar

Yalçın Bingül, D., **Isleten Hosoglu, M.**, Demirel, Z., Conk Dalay, M. Ege Denizinden İzole Edilen Chlorella sp.'nin Aksenik Kültür Eldesi ve Morfolojik ve Moleküler Tanımlanması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. İzmir. 03-07 Eylül 2012.

Demirel, Z., **Isleten Hosoglu, M.**, Yıldırım, A., Elibol, M., Conk Dalay, M. Coccolithophora ve farklı diatom türlerinin moleküler tanımlanması ve yağ asidi içeriklerinin belirlenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. İzmir. 03-07 Eylül 2012.

Coban, I, **Isleten, M.**, Coban, H.B , Elibol, M. “Zeytinyağı Katı atığı pirinadan mikrobiyal lipaz üretimi” 8. Ulusal Kimya Müh. Kongresi. Malatya. 26-29 Ağustos 2008.

Coban, H.B., Coban, I., **Isleten, M.**, Elibol, M. “Zeytinyağı İşletme atığı karasudan mikrobiyal lipaz üretimi” 8. Ulusal Kimya Müh. Kongresi. Malatya. 26-29 Ağustos 2008.

Isleten, M., Karagül-Yüceer, Y. “Süt Kaynaklı Toz Bileşenlerin Yağsız Yoğurdun Kimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi” III. Ulusal Analitik Kimya Kongresi. 5-7 Temmuz 2006, Canakkale.

Isleten, M., Karagül-Yüceer, Y. 2005. “Keçi Sütü Kullanılarak Üretilen Ürünler” Süt Keçiciliği Ulusal Kongresi Bildiri Kitabı, Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Zootehni Bölümü, Bornova, İzmir, sf 177-180.

Yılmaz, E.; **Isleten, M.** 2004. Aroma Araştırmalarında Kullanılan Enstrümantel Teknikler. Türkiye 8. Gıda Kongresi Bildiri Kitabı. 26-28 Mayıs Bursa.

Pala, Ç., Isleten, M., Karagül-Yüceer, Y. 2004. Geleneksel Çanakkale Keşkek'i. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, sf.263-267.

Katıldığı Araştırma Projeleri

Biyoteknolojik yollarla tarımsal atıklardan doğal aroma maddelerinin üretim ve optimizasyonu. COST Action FA0907 (devam etmekte).

Heterotrofik mikroalglerle ω -3 yağ asidi üretim prosesinin optimizasyonu
TÜBİTAK 109M227.

Zeytinyağı İşletme Atığının Bioproseslerde Hammadde Olarak Değerlendirilmesi.
SAN-TEZ projesi

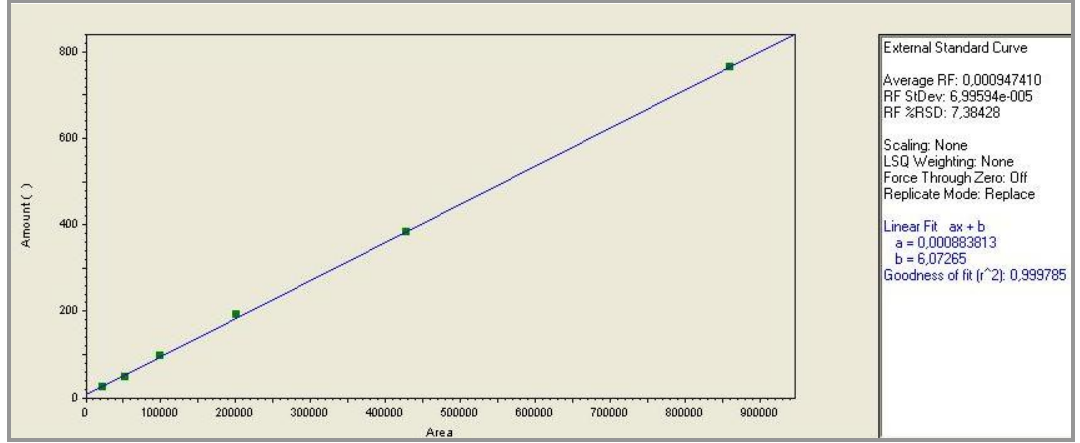
“Heterotrofik mikroalg *Cryptocodinium cohnii*'de yağ biyosentezi” konulu
araştırma projesi kapsamında Aalborg Universitesi, Biyoteknoloji, Kimya ve
Çevre Mühendisliği bölümü Biyoteknoloji Bölümünde, Danimarka çalışmalarında
bulunmak. 1st Nisan- 30th Eylül 2009.

“3. Uluslararası Gıda Kontrolü ve Gıda endüstrisinde risk yönetimi” Hebrew
Universitesi (Kudüs), Ziraat, Gıda ve Çevre Fakültesi, Rehovot / İsrail. 17 Ocak. –
10 Şubat. 2005.

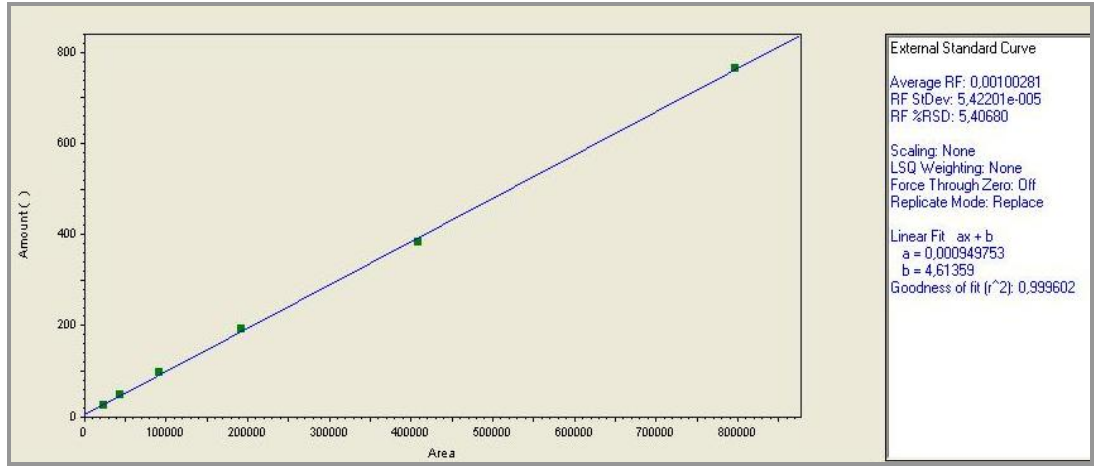
Ezine peynirinin duyuusal ve kimyasal aroma profillerinin belirlenmesi (DPT
projesi).

EKLER

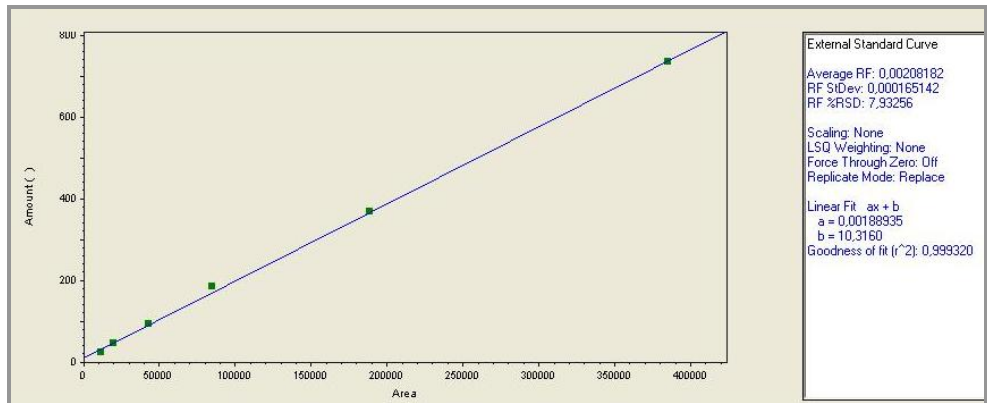
- Ek 1. Glikoz için HPLC kalibrasyon grafiği
- Ek 2. Gliserol için HPLC kalibrasyon grafiği
- Ek 3. Etanol için HPLC kalibrasyon grafiği
- Ek 4. Ksiloz için HPLC kalibrasyon grafiği
- Ek 5. HPLC kalibrasyonunda elde edilen glikoz, gliserol ve etanol moleküllerinin ayrılma grafiği
- Ek 6. HPLC kalibrasyonunda elde edilen ksiloz molekülünün ayrılma grafiği
- Ek 7. Gaz kromatografisi ile analiz edilen yağ asitleri metil esterlerinin kromatogramları



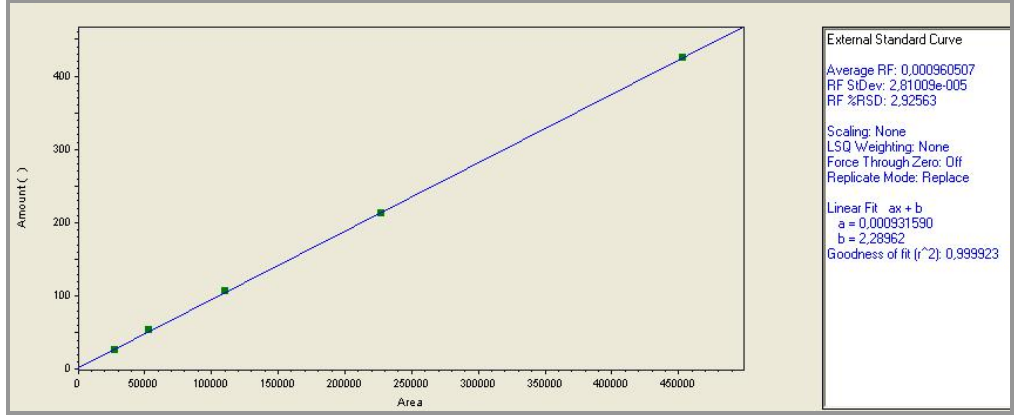
Şekil Ek 1. Gikoz için HPLC kalibrasyon grafiği



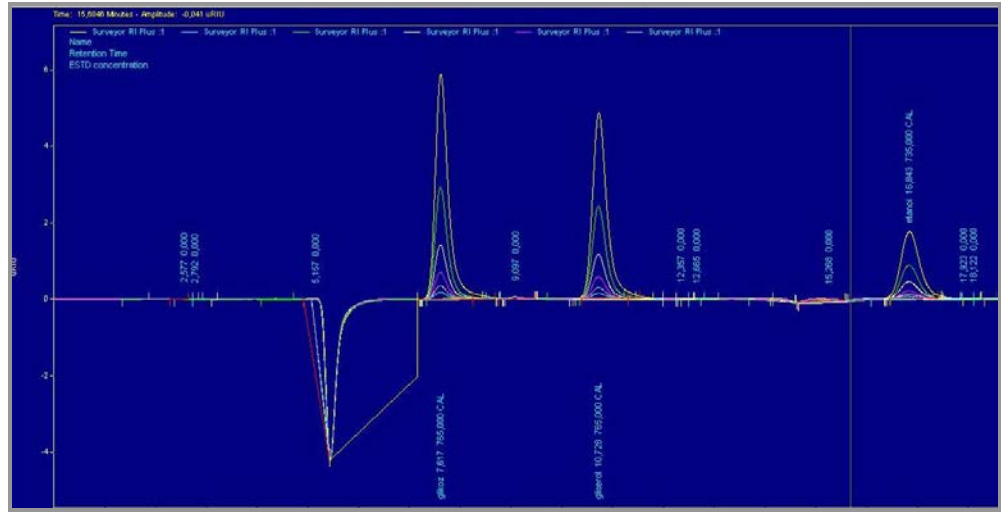
Şekil Ek 2. Gliserol için HPLC kalibrasyon grafiği



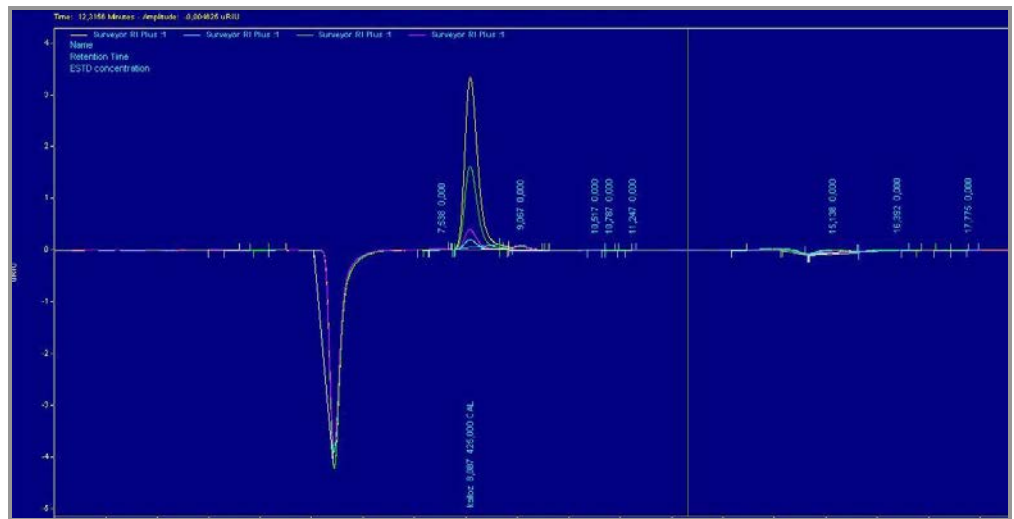
Şekil Ek 3. Etanol için HPLC kalibrasyon grafiği



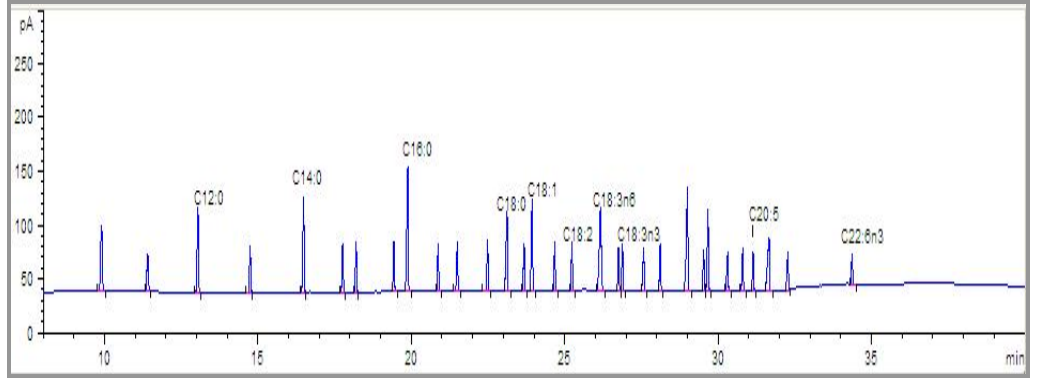
Şekil Ek 4. Ksiloz için HPLC kalibrasyon grafiği



Şekil Ek 5. HPLC kalibrasyonunda elde edilen glikoz, gliserol ve etanol moleküllerinin ayrılma grafiği



Şekil Ek 6. HPLC kalibrasyonunda elde edilen ksiloz molekülünün ayrılma grafiği



Şekil Ek 7. Gaz kromatografisi ile analiz edilen yağ asitleri metil esterlerinin kromatogramları