

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***DUNALIELLA* CİNSİNE AİT TÜRLERİN BİYOETANOL ÜRETİMİNDE  
HAMMADDE OLARAK KULLANIM KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Meltem ERDOĞAN**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2015**

**Her hakkı saklıdır**

## ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

26. 06.2015

Meltem ERDOĞAN

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### *DUNALIELLA* CİNSİNE AİT TÜRLERİN BİYOETANOL ÜRETİMİNDE HAMMADDE OLARAK KULLANIM KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Meltem ERDOĞAN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Sevgi Ertuğrul KARATAY

Tez çalışmasında, ekilebilir tarım arazilerini kullanmadan, yüksek tuz konsantrasyonları varlığında hızla gelişen dört farklı yerel *Dunaliella* türünden elde edilen biyokütlenin biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanım potansiyelleri araştırılmıştır.

*Dunaliella* hücrelerinden elde edilen biyokütlenin içerdiği fermente edilebilir, temel monosakkaritler gibi substratların ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu amaçla yüksek sıcaklıkta ve basınç altında asit muamelesi başta olmak üzere, mekanik parçalama gibi farklı ön muamele işlemlerinin biyokütlerdeki fermente edilebilir substratları ortaya çıkarmadaki etkinlikleri araştırılmıştır. *Dunaliella* hücreleri %15 tuzluluk oranındaki Johnson's Besiyeri'nde, pH 6'da 18 günlük inkübasyon süresi sonunda hasat edilmiştir. Biyokütlerdeki polisakkaritlerin en yüksek verimle fermente edilebilir monosakkaritlere dönüştürüldüğü ön işlem yöntemine % 1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varlığında 1.1 atmosfer basınç altında 15' otoklavlandığında 0.91 g/l etanol elde edilerek ulaşılmıştır. Hücrelerin karbonhidrat biriktirmesine etki eden besin maddelerinin sınırlandırılması gibi parametreler denenmiştir. MgSO<sub>4</sub> sınırlandırmasında %15 tuz konsantrasyonunda pH 6 'da etanol verimi madde miktarı yarıya indirildiğinde 1.21 g/l'ye yükselmiştir. Ancak KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sınırlandırılmasında etanol veriminde düşme gözlemlenmiştir. En yüksek karbonhidrat

biriktirdiği koşullara %15 tuz konsantrasyonunda pH 6'da, 0 g/l KNO<sub>3</sub> içeren sıvı Johnson's Besiyeri'nde ototrofik olarak geliştirildiğinde 1.28 g/l etanol elde edilerek ulaşılmıştır. Fermantasyon ortamının pH değerinin maya gelişimi ve etanol üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve pH 5'te en yüksek maya gelişimi 7.21 g/l ve en yüksek etanol verimi olan 1.23 g/l etanol sonuçları elde edilmiştir. Başlangıçta %15 tuzlulukta, pH 6'da, standart Johnson's Besiyeri'nde geliştirilen *Dunaliella* hücrelerinden elde edilen biyokütle, hiçbir ön işlem yöntemi uygulanmadan *S. cerevisia* mayası ile fermente edildiğinde 0.68 g/l etanol elde edilmiştir. *Dunaliella* türlerinin en yüksek verimle karbonhidrat ürettiği koşullar optimize edilerek bu karbohidratların hammadde olarak biyoetanol üretiminde kullanılabilirliği ve en yüksek verimle etanol eldesi için uygun koşullar belirlendiğinde elde edilen etanol ise 7.26 g/l 'dir. Tez alışması sonunda optimize edilen yöntemlerle başlangıçta elde edilen etanolün 10.67 kat daha fazlasına ulaşılmıştır.

Elde edilen sonuçlar ile; yerli *Dunaliella* izolatlarından elde edilen şekerlerin biyoetanol üretiminde kullanılması, tarım için ayrılan alanlar kullanılmadan, üçüncü nesil biyoetanol üretiminde alternatif olarak halofil alglerden olan ve gıda olarak tüketilmeyen söz konusu mikroalgin hammadde olarak kullanım potansiyeli ortaya konulmuştur. Ayrıca pratik ve ekonomik bir şekilde denizlerle çevrili olan ülkemizde büyük çapta geliştirilebileceği için ticarileşme potansiyelinin olduğu gösterilerek hem ülke ekonomisine hem de literatüre katkı sağlamıştır.

**Haziran 2015, 59 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Yenilenebilir enerji, Biyoetanol, *Dunaliella* spp. ,Mikroalg, Biyoyakıt

## ABSTRACT

Master Thesis

### DETERMINATION OF *DUNALIELLA* SPECIES AS RAW MATERIALS FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Meltem ERDOĞAN

Ankara University  
Graduate School of Nature and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Sevgi Ertuğrul KARATAY

In the study, potential usage as raw material for bioethanol production of biomass that was obtained from four different native *Dunaliella*'s species which are rapidly growing in high salt concentrations without using arable land, were investigated.

Extraction of fermentable substrates, such as basic monosaccharides contained in the biomass obtained from the *Dunaliella* cells, was done. For this purpose, at high temperature and pressure, primarily acid treatment but also different pre-treatment processes such as mechanical disruption was performed in order to reveal the efficiency of processes for obtaining fermentable substrates contained in the biomass, was investigated. *Dunaliella* cells in 15 % salinity of Johnson's medium at pH 6 was harvested after 18 days of incubation time. The highest yield of polysaccharide contained in biomass converted to fermentable monosaccharide was achieved in the pre-treatment method under 1.1 atmospheres pressure in the presence of 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 15 'autoclaved by obtaining 0.91 g/l ethanol. Some parameters such as limiting the nutrients which are effecting the cells accumulation of carbohydrates have been tried. In the MgSO<sub>4</sub> restriction at pH 6 and 15 % salt concentration, when substance amount halved the ethanol yield increased to 1.21 g/l. However, in the KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> restriction decrease was observed in the ethanol yield. The highest carbohydrates accumulating condition was reached at 15 % salt concentration and pH 6 when the liquid containing

0 g/l KNO<sub>3</sub> was autotrophically developed in Johnson's medium by obtaining 1.28 g/ l of ethanol. The effect of fermentation medium's pH value on ethanol production and yeast growth were examined and at pH 5 , the highest yeast growth of 7.21 g/l and the highest ethanol yield of 1.23 g/ l results were obtained. When the biomass, obtained from *Dunaliella* cells which were initially at 15 % salinity and pH 6 and developed at standard Johnson's medium,,fermented with *S.cerevisiae* yeast without applying any pre-treatment method, 0.68g / l of ethanol were obtained. By optimizing the conditions of *Dunaliella* species to produce carbohydrates with the highest efficiency and the availability of these carbohydrates as raw materials in the production of bioethanol and when conditions are determined and set for the highest yield of ethanol production ,the obtained ethanol was 7.26 g / l. In this thesis study, by the optimized methods 10.67 times more ethanol was obtained compared to initially obtained ethanol.

The obtained results; of sugars obtained from native *Dunaliella* isolates used in bioethanol production, without the use of areas allocated for agriculture, which is the third generation bioethanol production from algae as an alternative halophiles and not consumed as food the potential use as raw material the said microalga has been demonstrated. In addition, practical and economical way our country is surrounded by sea to be developed on a large scale showing that the commercialization potential have contributed to both economies and literature.

**June 2015, 59 pages**

**Key Words :** Renewable energy, Bioethanol, *Dunaliella* spp. ,Microalgae, Biofuel

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında tecrübeleri, bilgi birikimi, çalışma ahlakı ile bana yol gösterip örnek olan, bakış açımı genişleten, ilgi ve desteğini esirgemeyen, kendimi geliştirmem için teşvikte bulunan, her konuda beni destekleyip yönlendiren, tecrübeleri ve donanımı ile yolumu aydınlatan, çalışmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında çok büyük emeği geçen tez danışmanım çok değerli hocam Sayın Doç Dr. Sevgi Ertuğrul KARATAY'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Laboratuvara geldiğim ilk andan itibaren örnek kişiliği, iş ahlakı, ilgisi ve anlayışıyla desteğini her an hissettiren çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Gönül Dönmez'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Tez çalışmamda laboratuvar desteği, bilgi birikimi, donanımı ile çalışmalarımın ışık tutan ilgi ve desteğini esirgemeyen çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Sedat Dönmez'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Tezimin hazırlanmasında her türlü olanağı sağlayan Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Deneyleirim sırasında yardım ve desteğini gördüğüm bütün laboratuvar arkadaşlarıma, her konuda ilgi, hoşgörü ve sabır gösteren eşime ve oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Meltem ERDOĞAN  
Ankara, Haziran 2015

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Biyoyakıt Olarak Etanol.....	4
2.2 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Biyokütleler.....	5
2.3 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroalgler.....	7
2.3.1 <i>Dunaliella</i> spp.....	10
2.4 Etanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	11
2.5 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Biyokütle Uygulanan Ön İşlemler.....	13
2.5.1 Fiziksel ön işlemler.....	13
2.5.2 Fizikokimyasal ön işlemler.....	14
2.5.3 Kimyasal ön işlemler.....	15
2.5.4 Enzimatik hidroliz.....	17
2.6 Mikroalglerden Biyoetanol Üretimi İle İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar.....	17
2.6.1 Mikroalglerin biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanımı.....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1 Materyal.....	24
3.2 Yöntem.....	24
3.2.1 Üretim koşulları.....	24
3.2.2 Besiyeri bileşimi.....	24
3.2.3 <i>Dunaliella</i> hücrelerinden biyokütle elde edilmesi.....	26
3.2.4 Biyokütle ön işlenmesi ve sakkarifikasyon.....	26
3.2.5 Besiyeri pH değerinin etkisi.....	26
3.2.6 Besin limitasyonunun etanol üretiminde etkisinin belirlenmesi.....	26



3.2.7 Fermantasyonda kullanılan mikroorganizma ve üreme koşulları.....	27
3.2.8 Fermantasyon.....	28
3.3 Analiz Yöntemleri.....	28
3.3.1 <i>Dunaliella spp.</i> 'nin gelişiminin belirlenmesi.....	28
3.3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin gelişiminin belirlenmesi.....	28
3.3.3 Şeker konsantrasyonunun belirlenmesi.....	28
3.3.4 Etanol konsantrasyonunun belirlenmesi.....	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	30
4.1 <i>Dunaliella spp.</i> 'nin Seçimi.....	30
4.2 Mikroalg Hücrelerine Uygulanan Ön İşlem Yöntemlerinin Etanol Konsantrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	31
4.3 Besin Limitasyonunun Etanol Konsantrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	32
4.4 Hidroliz İşleminde Kullanılan Asit Konsantrasyonunun Etanol Konsantrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	34
4.5 Johnson's Besiyeri'nin pH Değerinin Maya Hücrelerinin Gelişimine Etkisinin Belirlenmesi.....	35
4.6 Fermentasyon Ortamının pH Değerinin Maya Hücrelerinin Gelişimine ve Etanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	36
4.7 İnokülüm Miktarının Maya Hücrelerinin Etanol Üretimine Etkisin Belirlenmesi.....	37
5. TARTIŞMA.....	38
5.1 <i>Dunaliella spp.</i> Seçimi.....	38
5.2 Mikroalg Hücrelerine Uygulanan Ön İşlem Yöntemlerinin Etanol Konsantrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	39
5.3 Besin Limitasyonunun Etanol Konsantrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	44
5.4 Hidroliz İşleminde Kullanılan Asit Konsantrasyonunun Etanol Konsantrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	45
5.5 Johnson's Besiyeri'nin pH Değerinin Maya Hücrelerinin Gelişimine Etkisinin Belirlenmesi.....	47
5.6 Fermentasyon Ortamının pH Değerinin Maya Hücrelerinin Gelişimine ve Etanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	48
5.7 İnokülüm Miktarının Maya Hücrelerinin Etanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	49

<b>6. SONUÇ</b> .....	<b>51</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>52</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>59</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 <i>Dunaliella</i> cinsine ait izolatların 18 günlük inkübasyon süresi sonunda gösterdikleri gelişimleri.....	31
Şekil 4.2 $KNO_3$ , sınırlandırmalarının <i>Dunaliella spp.</i> biyokütlesinden biyoetanol üretimine etkisi.....	33
Şekil 4.3 $MgSO_4$ , sınırlandırmalarının <i>Dunaliella spp.</i> biyokütlesinden biyoetanol üretimine etkisi.....	33
Şekil 4.4 $KH_2PO_4$ , sınırlandırmalarının <i>Dunaliella spp.</i> biyokütlesinden biyoetanol üretimine etkisi.....	34
Şekil 4.5 Asit konsantrasyonunun biyoetanol üretimine etkisinin belirlenmesi.....	35
Şekil 4.6 Besiyeri pH değerinin mikroalg ve maya hücrelerinin gelişimine Etkisi.....	36
Şekil 4.7 Fermentasyon ortamının pH değerinin maya hücrelerinin gelişimine ve etanol üretimine etkisi.....	37
Şekil 4.8 İnokülüm miktarının maya hücrelerinin etanol üretimine etkisi.....	37

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Mikroalg türlerinin karbonhidrat içerikleri.....	9
Çizelge 2.1 Tez çalışmasında kullanılan <i>Dunaliella</i> cinsinin sınıflandırılmasında farklı alternatifler.....	11
Çizelge 4.2 Mikroalg hücrelerine uygulanan ön işlem yöntemlerinin etanol konsantrasyonuna etkisinin belirlenmesi.....	32

## 1. GİRİŞ

Günümüzde hızla artan dünya nüfusu ve teknolojiye bağlı enerji talebi mevcut fosil kaynaklardan sağlanmaktadır. Fosil yakıtlar yüzlerce yıl içinde oluşmaktadır ve kaynaklar günden güne tükenmektedir. Fosil kaynakların tükenmekte olması petrol ve türev ürünlerinin sınırlı doğal kaynaklardan üretiliyor olması tüm dünya için önemli bir sorun oluşturmaktadır.

Mevcut kullanılan fosil yakıtların çevreyi kirletip karbondioksit emisyonunu artırması, karbondioksit emisyonunun iklim üzerindeki olumsuz etkileri, buzulların erimesi ve kuraklığın artması, artan küresel enerji tüketiminin çevreye verdiği zararlar küresel kaygıları her geçen gün artırmaktadır (Lam vd. 2012). Hızlı sanayileşme ve nüfus artışı neticesinde dünyanın hemen her parçasını etkileyen enerji krizi nedeniyle, bu yüzyılda yenilenebilir enerji kaynakları arayışı gelecekte daha sürdürülebilir bir enerji gelişimini teşvik etmek için aşılmaları gereken en önemli konular arasındadır ve bilim insanlarını yenilenebilir enerji kaynaklarını geliştirmeye yönlendirmiştir (John vd. 2011, Lam vd. 2012). Yenilenebilir, temiz, sürdürülebilir, verimli, düşük maliyetli ve güvenli alternatif enerji kaynakları üretimi üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu enerji kaynaklarının başında biyoetanolün de içinde bulunduğu biyokütleden elde edilen enerji gelmektedir.

Biyoetanol, yüksek yanma ısı ve yüksek oktan sayısına sahip olmasından dolayı yakıt ve yakıt katkı maddesi olarak kullanılabilir. Mevcut kullanılan araçlarda herhangi bir modifikasyon yapmaksızın benzine belirli bir oranda karıştırılarak kullanılabilir olması, biyoetanol üretimi için çalışmaların artmasını sağlamıştır. Ayrıca sera gazı emisyonlarını önemli ölçüde azaltabilir.

Biyoetanol, fermantasyon yoluyla çeşitli ham maddelerden elde edilmektedir. Bu ham maddeler basit şekerler, nişasta ve lignoselüloz olarak sınıflandırılabilir. Mısır, sorgum, selüloz ve yosun biyokütlesi gibi yenilenebilir malzemelerin her türlü kullanılarak üretilir. Tarım arazilerinin ve elde edilen tarımsal ürünlerin biyoetanol üretiminde kullanımı dünyada yaşanan açlık ve yoksulluğun her geçen arttığı günümüzde önemli bir sorun teşkil etmektedir. Tarımsal atıkların biyoetanol üretiminde kullanımı ise

içerdikleri lignin kompleksinin parçalanmasındaki zorluk ve maliyetin yüksek oluşundan dolayı biyoetanol üretiminde daha etkili hammadde arayışına yönlendirmiştir.

Üçüncü nesil biyoetanol üretimi temelde hammadde olarak büyük bir kısmını mikroalglerin oluşturduğu sucul mikroorganizmaların kullanımı anlamına gelir. Son yıllarda, yenilenebilir yakıt sektöründe biyoyakıt üretimi için mikroalg yetiştirilmesi yeni bir boyuta yol açmıştır. Mikroalgler hızlı büyüyen mikroorganizmalardır ve tatlı sularda, deniz suyunda, atık su ve acı su gibi çeşitli su kaynaklarında yetiştirilebilir. Mikroalgler hücre içinde biyoetanol üretimi için olası bir hammadde olan yüksek karbonhidrat biriktirebilmektedir. Mikroalgler tarafından sentezlenen karbohidratlar genellikle lignoselülozik biyokütlelere göre basit indirgeyici şekerlere dönüştürülmesi çok daha kolay olan (lignin olmadan) nişasta formundadır. Son zamanlarda, hızla artan talep ve fosil yakıtların kullanımı sonucunda hava kirliliği, buzulların erimesi, kuraklığın sık geçmesi gibi birçok çevresel konu hakkında küresel kaygılar artmıştır. Enerji krizi nedeniyle hızlı sanayileşme ve nüfus artışından dünyanın hemen her parçası etkilenmekte, yenilenebilir enerji kaynakları için bu yüzyılda yapılan çalışmalar gelecekte daha sürdürülebilir bir enerji gelişimini teşvik etmek için önemlidir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında kullanılan hammaddelere alternatif olarak Tuz Gölü'nden izole edilmiş olan *Dunaliella* izolatlarından elde edilen şekerlerden biyoetanol üretilmesi amaçlanmıştır. Halofil bir mikroalg olan *Dunaliella*'nın gıda olarak tüketilmemesi ve ekstrem koşullarda yaşama kabiliyetinin avantajları da göz önünde bulundurularak yerel kaynaklarımızdan üçüncü nesil biyoetanol üretimi için hammadde olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

Gerçekleştirilen tez çalışması ile kullanılan hammaddeden elde edilen şekerin verimi, sakkarifikasyon işlemi, pH, zaman gibi biyoetanolün oluşumunu etkileyen parametrelerin optimize edilmesi ile biyoetanolün verimini artırmak hedeflenmiştir. Biyokütleden elde edilen şekerlerle hazırlanan besiyerinde *Saccharomyces cerevisiae* mayasının fermantasyonu gerçekleştirilerek, maya gelişimini ve biyoetanol üretimini

etkileyen farklı parametreler denenmiş, oluşan biyoetanol Gaz Kromatografi cihazında belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışması ile mikroalglerden biyoetanol üretiminde halofilik mikroalglerin kullanım potansiyeline ilişkin literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Biyoyakıt Olarak Etanol

Etanol, kaynama noktası 78.4 °C, erime noktası -114.3 °C olan molekül ağırlığı 46,07 g/mol, ve 0.79 g/cm<sup>3</sup> yoğunluğa sahip, yanıcı ve renksiz bir sıvıdır. Moleküler formülü C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH olan etanol %52 karbon, %13 hidrojen ve %35 oksijen içermektedir.

Biyoetanol insanlığın kullandığı en eski sentetik organik kimyasaldır. Biyoetanol, farmasötik ve kozmetik gibi değerli ticari ürünlerin üretiminde de kullanılmaktadır. Alkollü meşrubatlarda, çözücülerde, esanslarda, aromalarda, tıpta, kimyasal sentezde ve termometrelerde kullanılmaktadır. Isıtma değerinden dolayı etanol, ısıtma ve aydınlatmada yakıt olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde en yaygın kullanılan sıvı biyoyakıt biyoetanoldür ;temiz ve yenilenebilir bir yakıt olarak oldukça önem kazanmıştır (Gupta ve Demirbaş 2011).

Biyoetanol yüksek yanma ısısı ve oktan sayısına sahiptir bu nedenle yakıt içindeki oksijen seviyesini artırmak için kullanılır; çünkü yakıtın oksijen seviyesini artırmak, yakıtın daha verimli yanmasını sağlayarak, egsoz çıkışındaki zararlı gazları azaltır. Böylece çevreye verilen zararın azaltılması sağlanır.

Biyoetanol, benzer fiziksel ve kimyasal özellikleri paylaştığı için benzine alternatif bir biyoyakıttır (Demirbaş 2000, Dale 2007, Naik vd. 2010).

Biyoetanol günümüzde yakıt veya yakıt katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Dünyada ulaşım sektöründe en yaygın olarak kullanılan alternatif enerji kaynağıdır. Biyoetanolün yanmalı motorlarda benzin yerine kullanılabilmesi özellikle önemlidir ve onu en umut verici biyoyakıtlardan biri yapar; 2015 yılında 100 milyar litre üretime ulaşması beklenmektedir.



Yakın zamanda içten yanmalı motorlarda yakıt olarak da kullanılmıştır. Biyoetanolün taşıma için benzine eklenmesi pek çok ülkede uygulanmaktadır (Luque 2008). Brezilya'da arabaların %15'inden daha fazlası saf etanol kullanılarak çalışmaktadır (Demirbaş 2005).

Etanol benzine %10 oranında karıştırılınca motor modifiye etmeden, şayet modifiye edilirse %85 oranında da kullanılabilir (Gupta ve Demirbaş 2011). Benzin yerine etanol kullanımı asit yağmuru nedeni olan sülfür dioksit salınımını ortadan kaldırırken mısır etanolünden %20 ile selülozik etanolden %85 oranında küresel ısınma emisyonlarını da azaltır.

Türkiye enerji ve yakıt ihtiyacı bakımından dışarı bağımlı bir ülkedir. Nitekim, Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu'nun (EPDK) cari açığın azaltılması, yerli tarımsal atıklardan elde edilen biyoetanol üretiminin teşviki ve benzine katılmasıyla ilgili aldığı karar, 1 Ocak 2013'te yürürlüğe girmiştir. Buna göre benzine yüzde iki oranında biyoetanol katılacaktır (<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/07/20120707.htm> ).

## **2.2 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Biyoküteller**

Canlı ya da yakın zamana kadar canlı olan biyolojik kökenli maddelere biyokütlenmektedir. Biyokütleden etil alkol üretimi kapsamında pek çok tarımsal ürün, yan ürün ve atık çeşitli işlemlerden geçirilerek fermente edilebilmektedir. Biyoetanol genellikle ana hammadde olarak (örneğin, glikoz) karbohidrat kullanılarak maya fermentasyonu ile üretilir. Birinci nesil biyoetanol şeker kamışı, şeker pancarı, mısır ve buğday gibi, özellikle şekerli ve nişastalı hammaddeler olan gıda olarak kullanılan bitkilerden elde edilir (Balat 2009, Naik vd.2010). Ancak, biyoetanol üretimi için hammadde olarak gıda ürünlerinin kullanılması tarım arazilerinin ve su kaynaklarının önemli bir kısmının biyoyakıt hammaddesi için ayrılması ve dünyada açlık sıkıntısı çekilirken bu hammaddelerin enerji üretimi için kullanılması tüm dünyada tartışmalara ve etik kaygılara neden olmuştur (Harun vd. 2010b). Bu nedenle, lignoselülozik biyoküteller biyoetanol üretimi için ikinci nesil hammadde olarak önerilmiştir.

Lignoselülozik biyoküteller dünyada en bol bulunan biyokütellerdir ve tarımsal atıklardan oluşmaktadır (Alvira vd. 2010). Bununla birlikte, biyoetanol üretimi için lignoselülozik biyokütle kullanmadaki temel zorluk, ligninin kompleks yapısının parçalanmasıdır. Çünkü selülozik biyokütlenin ön muamelesinde selülozu yıkmak zor ve yüksek maliyetli işlemlerdir (Sun ve Cheng 2002). Ancak ön muamele aşaması sonrasında fermentasyon için gerekli olan selüloz ve hemiselüloz serbest bırakılabilir (Cardona ve Sanchez 2007).

Buna ek olarak son yıllarda önem kazanan hammaddelerden biri de üçüncü nesil biyoetanol üretiminde mikroalglerin büyük bir kısmını oluşturduğu mikrobiyel biyokütellerdir. Özellikle, mikroalg biyokütlesi son zamanlarda biyoyakıt üretimi için olası yenilenebilir bir kaynak olarak geniş ilgi görmüştür. Mikroalgler yeryüzünde yaşayan en eski mikroorganizmalardan biridir (Song vd. 2008 ) ve farklı ortamlarda yaşayan fotosentetik türlerin geniş bir çeşitliliğini temsil eder (Mata vd. 2010, Yuhanna vd. 2011, Nigam ve Singh 2011 ).

Biyodizel üretimi için, yüksek yağ içeriğine sahip olmasının yanı sıra, bazı mikroalg türleri hücrelerinde yüksek karbonhidrat içeriğine sahip olma özellikleri nedeniyle biyoetanol üretiminde fermentasyon işlemi için karbon kaynağı olarak kullanılabilir (Harun vd. 2010b, Radakovits vd. 2010).

Alglerin yüksek karbonhidrat içerikleri, hızlı ve ekonomik şekilde gelişmeleri sebebiyle mikroalgal biyokütlenin biyoetanol üretiminde gelecek vaad eden hammaddeler olduğu düşünülmektedir.

Alternatif enerji üretiminde enerjinin yenilenebilir olması ve üretim prosesinin tekrarlanabilirliği üstünlük sağlamaktadır. Mikroalglerden biyoetanol üretimi bu üstünlükleri sağlamaktadır. Mikroalgler karasal bitkilerden yüz kat daha hızlı bir derecede büyüebilir ve bir günden daha az bir sürede kendi biyokütellerini ikiye katlayabilir (Tredici 2010).

Ayrıca mikroalglerin, tarım arazilerini işgal etmeden; deniz ve atıksularda bile gelişebiliyor olması, açlık sıkıntısı yaşanan ülkeler düşünüldüğünde biyoyakıt üretimi için ne kadar üstün hammaddeler olduğunu ortaya koymaktadır (Lam ve Lee 2012).

Mikroalgler CO<sub>2</sub>'i tüketerek sera gazı emisyonlarının azaltılmasını sağlar, ekilebilir araziler kullanılmadan üretilebilir.

Mikroalgal büyüme özellikle azot (N) ve fosfor (P) gibi yüksek miktarda besin gerektirir. Sentetik kültür ortamına bir alternatif olarak genellikle yüksek N ve P konsantrasyonu sunan tarımsal-endüstriyel atıksular kullanılabilir.

### **2.3 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroalgler**

Yapısı kök, gövde ve yapraklara farklılaşmayan tallus yapıları organizmalar alg olarak adlandırılmaktadır. Beslenme biçimlerine göre mikroalgler ototrof, heterotrof ve miksotrof olarak üçe ayrılmaktadır. Mikroalgler genelde sucul ortamlarda bulunurlar. Ayrıca birçok türü toprak yüzeyinde yaşamaktadır. Hücre organizasyonlarına göre tek hücreli kamçılı veya kamçısız, kamçılı koloni veya kamçısız koloni, filamentli gibi morfolojik yapıları vardır. Mikroalgler prokaryot ve ökaryot olabilirler. Hücre duvarı birçoğunda olmasına rağmen *Dunaliella* türleri gibi hücre duvarı içermeyenler de mevcuttur.

Yenilenebilir enerji kaynaklarının günümüzde birçok uygulama yöntemi bulunmaktadır. Bunların içerisinde en önemlilerden biri de mikroalglerin geniş çaplı üretimi ile elde edilen biyokütledir. Biyokütlenin ucuz ve bol miktarda elde edilmesi hem CO<sub>2</sub> emisyonunun azaltılmasına hem de birçok uygulamada kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Uygulamaların başında enerji üretimi, insan ve hayvan beslenmesi, sıvı atıkların doğaya salıverilmeden önce iyileştirilmesi gelmektedir.

Mikroalgler, uzun yıllar alternatif bir enerji kaynağı olarak gündeme gelmesinden çok, hayvan yetiştiriciliğinde besin katkısı olarak değerlendirilmiştir. Son yıllarda biyokütle enerjisi araştırmaları sonucu mikroalgler, umut vadeden bir enerji kaynağı olarak görülmeye başlanmıştır. Mikroalgler karbonhidrat, protein, lipid ve vitamin içeren mikroorganizmalardır. Genel olarak, türe göre değişmekle birlikte, mikroalgler yaklaşık % 15-77 yağ içerebilmektedir.

Mikroalgler, fotosentetik olarak gelişebildikleri için karbon kaynağına ihtiyaç duymazlar ve daha önceki tüketimlerin ürünü olan karbondioksiti enerji kaynağı olarak kullanıp karbondioksit nötralizasyonunu sağlamaktadır (Scragg vd. 2003).

Mikroalglerin tarımsal ürünlerle ve diğer sucul bitkilerle karşılaştırıldığında gelişme hızları oldukça büyüktür (Mata vd. 2010).

Lipid içeriklerinin yanı sıra, belirli mikroalg türleri hücreleri içinde büyük miktarlarda karbonhidrat biriktirebilmektedir. Karbohidrat, genellikle hücre duvarında (örneğin, pektin, ağıar, alginat), hücre çeperinin dış tabakasında (örneğin, selüloz, hemiselüloz) ve hücre içinde (örneğin, nişasta) bulunmaktadır (Chen vd. 2013). Hidroliz reaksiyonu sayesinde, karbohidrat fermentasyon işlemi ile biyoetanol üretimi için kullanılan fermente edilebilir şekerlere (örneğin, glikoz) hidrolize edilebilir (Harun vd. 2010b). Belirli mikroalg türlerinin karbonhidrat içerikleri çizelge 1.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1 Mikroalg türlerinin karbonhidrat içerikleri

Mikroalg Türleri	Karbonhidrat içerikleri (%kuru ağırlık)	Referanslar
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	26	Becker (1994)
<i>Chlorella</i> sp.	19	Phukan vd.(2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	12–17	Becker (1994)
<i>Chlorococcum</i> sp.	32.5	Harun and Danquah (2011a)
<i>Dunaliella bioculata</i>	4	Becker (1994)
<i>Dunaliella salina</i>	32	Becker (1994)
<i>Euglena gracilis</i>	14–18	Becker (1994)
<i>Isochrysis galbana</i>	7.7–13.6	Fidalgo vd.(1998)
<i>Isochrysis</i> sp.	5.2–16.4	Renaud vd.(1991)
<i>Mychonastes afer</i>	28.4	Guo vd.(2013)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	8	Biller and Ross (2011)
<i>Porphyridium cruentum</i>	40	Biller and Ross (2011)
<i>Prymnesium parvum</i>	25–33	Becker (1994)
<i>Scenedesmus abundans</i>	41	Guo vd.(2013)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	21–52	Becker (1994)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	15–51.8	Ho vd.(2012)
<i>Spirogyra</i> sp.	33–64	Becker (1994)
<i>Synechococcus</i> sp.	15	Becker (1994)
<i>Tetraselmis maculate</i>	15	Becker (1994)
<i>Tetraselmis</i> sp.	24	Schwenzfeier vd. (2011)
<i>Tetraselmis suecica</i>	15–50	Bondioli vd.(2012)

Çizelge 1.1’de belirtildiği gibi , *Porphyridium cruentum*, *Prymnesium parvum*, *Scenedesmus abundans*, *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus obliquus*, *Spirogyra* sp., *Tetraselmis suecica* *Dunaliella spp.* gibi mikroalgler yüksek karbonhidrat içeriklerinden dolayı biyoetanol üretimi için etkili ve uygun mikroalg türleri arasında

bulunmaktadır. Hücrelerinin kuru ağırlıklarının % 21 ile % 64 arasında değişen karbonhidrat içerikleri lignoselülozik biyokütle ile karşılaştırıldığında yüksek olarak kabul edilir. Buna ek olarak, mikroalglerin lignin içermemelerinden dolayı fermantasyon sürecindeki ve biyoetanol üretimi için gerekli olan fermente edilebilir şekerlerin serbest bırakılması için daha hafif hidroliz işlemleri gereklidir.

Ekilebilir tarım arazileri kullanılmadan yüksek tuz konsantrasyonlarında ve ekstrem koşullarda yetiştirilebilen, gıda olarak tüketilmeyen, halofil bir mikroalg olan, *Dunaliella spp.* belirtilen avantajlarından dolayı tez çalışması kapsamında kullanılmıştır.

### **2.3.1 *Dunaliella spp.***

#### ***Dunaliella* Türlerinin Taksonomisi ve Morfolojisi**

*Dunaliella*, tek hücreli, iki flagellumu olan, hücre çeperi bulunmayan yeşil alglere dahil bir cinstir. *Dunaliella* cinsi ilk defa Teodoresco (1905) tarafından Romanya Tuz Gölü'nden alınan materyallerde bulunan *Dunaliella salina*'ya dayanılarak tanımlanmıştır. Bu tanımlama M.F. Dunal onuruna verilmiştir. Dunal (1837) yılında ilk defa, Fransa'da Montpellier Tuzlası'ndaki kırmızı rengin alglerden geldiğini söyleyen bilim adamıdır. 1905 yılında ilk kez Teodorescos tarafından yapılan *Dunaliella*'nın taksonomik çalışmalarından buyana birçok yeni tür belirlenmiştir. Ancak yeşil aşamada esnekliğin yüksek olması ve kırmızı aşamada neredeyse ayırt edilemez farklılıklar türlerin belirlenmesinin çok zor ve zaman alıcı olmasına neden olmuştur(Olmos yapmak vd.2000). *Dunaliella* cinsi yüksek ışık şiddetleri, yüksek tuz konsantrasyonları, oksijen ve nitrojen sınırlı koşullarına maruz kaldığında büyük miktarlarda  $\beta$ -karoten ve gliserol biriktirebilen daha az sayıda tür içerir (Ben-Amotz vd. 1982 ve Borowitzka 1981 ). *Dunaliella salina* ve *Dunaliella bardawil*  $\beta$ -karoten üretimi için en önemli türlerdir. Çeşitli araştırmalar her iki türün de kuru ağırlığının % 10'undan fazlasını üretebildiklerini göstermiştir (Olmos-Soto vd. 2002). Lutein, klorofil, diğer pigment ve karotenoidler aynı stres ve çevresel koşullar altında, *Dunaliella* türleri tarafından üretilir (Guedes 2011,

Lordan vd. 2011 ve Skjanes vd. 2013). *Dunaliella* türlerinde sucul yetiştiricilik, insan beslenmesi ve biyodizel üretimi için lipidler de araştırılmıştır (Breuer vd. 2012, Fu vd. 2012, Da Silva vd. 2013) .Massyuk ( 1973 ) bu genusu revize ederek 29 türü varyete ve formlarıyla tanımlamıştır.

*Dunaliella* cinsinin bulunduğu taksonomik yapıya bakıldığında takım düzeyinde farklı olarak isimlendirildiği görülmektedir. Aşağıdaki tablo (Ben-Amotz vd. 2009) üç farklı alternatifi içermektedir.

Çizelge 2.1 Tez çalışmasında kullanılan *Dunaliella* cinsinin sınıflandırılmasında farklı alternatifler (Ben-Amotz vd. 2009)

	1. Alternatif	2. Alternatif	3. Alternatif
Sınıf:	Chlorophyceae	Chlorophyce	Chlorophyce
Takım:	Chlamydomonales	Dunaliellales	Volvocales
Aile:	Dunaliellaceae	Dunaliellace	Dunaliellace
Cins:	Dunaliella	Dunaliella	Dunaliella

Yayılma alanları geniştir: Tatlı sular, tuzlu sular, tuzlu araziler. *Dunaliella* 'nın büyümesi için en uygun alanların sıcak iklim koşullarının hakim olduğu, önemli bir miktarda buharlaşmanın görüldüğü ve bundan dolayı havuz sıcaklığının düşük olduğu çorak alanlarda bulunduğu belirlenmiştir.

## 2.4 Etanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Mayalar etil alkol fermantasyonunda en çok kullanılan mikroorganizmalardır ve tek hücreli canlılardır. Hücre şekilleri genellikle silindirik, küresel veya ovaldir. Mayaların üremeleri genellikle bölünerek ya da tomurcuklanarak gerçekleşmektedir (Walker 2000).

Mayaların gelişebilmeleri için optimum pH değerinin 4-5.5 arasında değiştiği bilinmektedir. Biyoetanol üretiminde kullanılan mayalar genellikle *Saccharomyces cerevisia*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* ve *Pachysolen tannophilus*'tur.

*Mucor*, *Rhizopus* ve *Aspergillus* cinslerine ait küf mantarları türlerinin de etanol fermantasyonu yapabildikleri, ancak küf mantarlarının mayalar ve bakteriler kadar hızlı gelişemedikleri, bu nedenle bunların endüstriyel etanol üretimi için uygun olmadıkları, ayrıca etanol üretimi üzerinde fazla çalışma yapılmadığı bildirilmiştir (Shuler ve Kargı 1992).

En iyi etanol üreticisi bakterinin *Zymomonas mobilis* olduğu, bunların yüksek konsantrasyonlardaki glikozu hem kesikli hem de sürekli fermantasyonla etanole dönüştürebildikleri tespit edilmiştir. *Z. mobilis*'in sadece glikoz, fruktoz ve sakkorozu fermente edebildiği, etanolün yanında düşük oranlarda gliserin, süksinat, laktat, asetoin ve bütandiol de ürettiği saptanmıştır (Agbogbo ve Kelly 2008).

*P. stipitis* hücreleri, 3-5 µm boyutunda, krem rengine yakın renkli hücrelerdir. Tomurcuklanarak üremeleri sebebiyle şekilleri tam küresel ya da elips değildir. Çürümekte olan tahtada ve ağaçlarda yaşayan böceklerin larvalarında izole edilen bir maya grubuna ait bir mikroorganizma olması sebebiyle orman atıklarında mevcut olan glikoz, ksiloz, mannoz, galaktoz, sellobiyoz şekerlerinin tümünü fermente edebilmektedir (Parekh ve Wayman 1986, Jeffries vd. 2007).

*P. stipitis*'in büyümesinde, etil alkol üretim veriminde ve inhibitörlere karşı toleransının gelişmesinde kültür yaşının ve besin ortamında kullanılan bileşenlerin çok önemli rolü vardır (Slininger vd. 2009).

Tez çalışmasında *Saccharomyces cerevisia* mayası kullanılmıştır. Bu mayanın ökaryotik ve kararlı yapıda olması, yüksek çoğalma ve etanol üretme hızı 6 karbonlu şeker olan glukozdan etkin bir şekilde etanol üretmesi, oksijenlenmeye gerek duymaması, düşük pH gerektirip etanol ve diğer inhibitörlere karşı yüksek tolerans göstermesi en önemli avantajlarıdır. Ancak beş karbonlu şekerleri kullanamamaktadır.



Hidroliz işleminden sonra elde edilen en bol karbonhidratın *Saccromyces ceriviae* ile geleneksel fermantasyon için tercih edilen karbon kaynağı olan glikoz olması bu mayanın kullanılmasında belirleyici faktör olmuştur.

## **2.5 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Biyokütle Uygulanan Ön İşlemler**

Biyoetanol üretimi için biyokütlenin içerdiği kompleks yapılı karbonhidratın basit yapılı fermente edilebilir monomerlere dönüştürülmesi en önemli aşamalardan biridir. Biyokütlenin içerdiği polisakkaritlerden indirgen şeker elde edilmesi için çeşitli fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve biyolojik ön işlem yöntemleri uygulanmaktadır. Biyokütleye uygulanacak ön işlem yöntemi belirlenirken fermente edilebilir şeker oluşumunu sağlaması, karbonhidratların bozunma miktarının en az olması, mümkün olduğunca az miktarda yan ürün ve inhibitör oluşumuna sebep olması, en önemlisi maliyetin düşük olması dikkat edilmesi gereken konulardır ( Sun ve Cheng 2002)

### **2.5.1 Fiziksel ön işlemler**

Mekanik parçalamada; hammaddeler, selüloz kristalliğini azaltmak için yontma, öğütme ve ezme (presleme) kombinasyonları ile parçalanabilirler. Hammadeyi mekanik olarak parçalamak sonrasında uygulanacak işlemler için yüzey alanını artırarak kolaylaştırmak amacıyla uygulanmaktadır. Materyallerin boyutu yontma işleminden sonra genellikle 10-30 mm, öğütme ve ezme işlemlerinden sonra ise 0.2-2 mm arasındadır. Hammaddenin mekanik parçalanmasının zorluğu, son tanecik boyutu ve atık biyokütle karakteristiklerine bağlıdır (Cadoche ve Lopez 1989).

Piroliz, oksijensiz ortamda hammaddenin yakılması işlemidir. Materyaller 300°C'den daha yüksek sıcaklıklarda işlem gördükleri zaman, selüloz hızlıca ayrışarak gaz ürünleri ve kömür kalıntısı oluşturur (Kilzer ve Broido 1965, Shafizadeh ve Bradbury 1979). Bu ayrışma çok yavaştır ve daha düşük sıcaklıklarda daha az uçucu ürünler oluşturulur. Süreç, oksijenin varlığıyla zenginleştirilebilir (Shafizadeh ve Bradbury 1979). Çinko

klorür veya sodyum karbonat, bir katalizör olarak eklendiği zaman, saf selülozun ayrışması, daha düşük bir sıcaklıkta meydana gelebilir (Shafizadeh ve Lai 1975).

### 2.5.2 Fizikokimyasal ön işlemler

Buhar patlaması; materyallere uygulanan en yaygın ön işlemdir (McMillan 1994). Küçük parçalara ayrılmış biyokütle yüksek basınçtaki doymuş buhar ile muamele edilir. Sonrasında basınç süratle azaltılarak materyallerin patlayıcı dekompresyonu sağlanır. Bu işlem sonrasında yüksek sıcaklıktan dolayı hemiselülozun parçalanmasına ve ligninin dönüşümüne sebep olur ve böylece selüloz hidrolizi artar. Buhar patlaması ön işleminin etkinliği zamana, sıcaklığa, biyokütle parçacıklarının büyüklüğüne ve nem içeriğine bağlı olarak değişir. Optimal hemiselüloz solubilizasyonu ve hidrolizi ya yüksek sıcaklık-kısa zaman (270°C, 1 dk) ya da düşük sıcaklık-uzun zaman (190°C, 10 dk) uygulaması yapılarak sağlanabilir. Yapılan çalışmalar düşük sıcaklık-uzun zaman koşullarının daha etkili olduğunu göstermiştir. Buhar patlaması ön işleminin avantajları, mekanik parçalama ile karşılaştırıldığında % 70 daha az enerji gerektirmesidir (Holtzaple vd.1989). Bu yöntem, en ekonomik ön işlem olarak ziraai atıklara ve sert odunlara başarıyla uygulanmış ancak yumuşak odunlarda daha az etkin hidroliz elde edilmiştir (Clark ve Mackie 1987).

Amonyak ile muamele AFEX, belli bir zaman periyodunda biyokütlenin yüksek sıcaklık ve basınçta sıvı amonyağa maruz bırakılıp ardından basıncın hızlıca azaltıldığı fizikokimyasal ön işlemlerin bir çeşididir. AFEX ön işlemini çeşitli otsu bitkilerin sakkarizasyon işlemini önemli derecede hızlandırmıştır. Alfalfa, arpa-buğday-pirinç samanı, tahıl kabuğu, mısır koçanı, şehirselle katı atıklar gibi çeşitli lignosellülozik materyaller bu yöntemle hidroliz edilebilmiştir (Vlasenko 1997, Mes-Hartree 1988). AFEX, asitli ön işlemlere göre hemisellülozü daha az çözündürür. Yapılan bir çalışmada, buğday samanı ve alfalfa yapraklarının enzimatik hidrolizi için buhar ve amonyak ön işlemleri karşılaştırılmış ve bu biyokütlerdeki hemiselüloz fraksiyonlarının AFEX ile çözünmediği ancak buhar patlamasında çözündüğü görülmüştür (Mes-Hartree vd. 1988). Öte yandan %5 oranında lignin içeren bermuda otuna AFEX uygulaması ile

selüloz ve hemiselülozun %90'nı hidroliz edilmiştir (Holtzaple vd. 1991). AFEX prosesi lignin içeriği yüksek olan biyokütlelere uygulandığında düşük hidroliz verimi elde edilmiş. Hemiselülozun yeterli düzeyde çözünmemesi ve amonyağın geri kazanımındaki zorluklar nedeniyle fazla tercih edilmeyen bir yöntemdir.

CO<sub>2</sub> ile muamele, buhar ve amonyak ile muamele yöntemlerine benzerdir. CO<sub>2</sub> ile muamele de lignoselülozik maddelerin ön işlemlerinde kullanılır. Bu yöntemde karbonik asit oluşumuyla hidroliz hızı artırılır. Dale ve Moreira (1982) alfalfa bitkisine karbondioksit patlaması ön işlemini (5,62 MPa basıncında 4 kg CO<sub>2</sub>/kg lif) uygulamışlar ve enzimatik hidrolizde 24 saat boyunca serbest bırakılan teorik glikozun %75'i'ni elde etmişlerdir. Ürün verimliliği göreceli olarak buhar ve amonyak patlamaları ön işlemleri ile karşılaştırıldığında düşük, enzimatik hidroliz ön işlemi ile karşılaştırıldığında yüksektir. Hidroliz verimi buhar ve amonyak ile muamele yöntemlerine göre düşüktür. Geri dönüşümü sağlanmış kağıt karışımı ve şeker kamışı biyokütlelerinin CO<sub>2</sub> ile hidrolizi yönteminin, buhar ve amonyak ile muamele yöntemleri ile karşılaştırıldığında amonyaktan daha maliyetli olduğu ve biyolojik işlemleri inhibe edecek ürünlerin buhar ile muamele sonrasında oluşurken CO<sub>2</sub>'de oluşmadığı gözlenmiştir (Zheng 1998).

### **2.5.3 Kimyasal ön işlemler**

Ozonlama ön işleminde, lignin etkili olarak bozundurulur sonrasında uygulanacak biyolojik süreçler için zehirli artıklar üretmez, tepkimeler oda sıcaklığı ve basıncında tamamlanır (Vidal ve Molinier 1988). Ozon, buğday samanı (Ben-Ghedalia ve Shefet 1981), küspe, yeşil ot, fıstık, çam (Neely 1984), pamuk samanı (Ben-Ghedalia ve Shefet 1983), kavak talaşı (Vidal ve Molinier 1988) gibi birçok lignoselülozik materyallerden lignin ve hemiselülozu ayrıştırmada kullanılmıştır. Bu ayrıştırma aslında lignin ve hemiselüloza karşı sınırlıdır, selülozu etkilemesi daha zordur.

Ozon ön işlemi; ligninin etkili uzaklaştırılması, toksik atıkların oluşmaması ve reaksiyonun oda sıcaklığında ve atmosfer basıncında gerçekleşmesi açısından

avantajlıdır ancak yüksek miktarda ozon kullanımını gerektirmesi prosesi pahalı yapmaktadır.

Asit ile hidroliz; biyokütlerin işlenmesinde konsantre  $H_2SO_4$  ve  $HCl$  kullanılmaktadır. Bunlar selüloz hidrolizinde etkili kimyasallardır ancak toksik, korozif, tehlikeli olmaları ve korozyona dayanıklı reaktörlerin kullanılma zorunluluğu dezavantaj oluşturur. Ekonomik açıdan hidrolizden sonra kuvvetli asit geri kazanılmalıdır. Seyreltik asit hidrolizi uygulaması ile de selüloz hidrolizi önemli derecede sağlanabilmektedir. (Esteghlalian 1997). Ancak, selülozun glukoza makul derecede dönüşüm hızını elde etmek için yüksek sıcaklıklar gerekmektedir (McMillan 1994).

Hidroliz reaksiyonunun asidik ortamda gerçekleşmesi, asit tarafından ortama salınan protonların, hemiselüloz ve selüloz zincirlerindeki şeker monomerlerinin yapısındaki heterosiklik eter bağlarını kırabilme esasına dayanır.

Seyreltik asit uygulaması selüloz hidrolizini önemli derecede artırır ancak buhar ve amonyak uygulamasından daha pahalıdır ve enzimatik hidroliz ve fermentasyon prosesinden önce pH'ın nötral yapılması gerekmektedir.

Alkali ile hidroliz biyokütlenin ön işlemleri için kullanılabilir ve bazik ön işlemin etkisi kullanılan materyalin içeriğine bağlıdır (Fan vd. 1987, McMillan 1994). Alkali ile hidroliz mekanizmasında çapraz bağlı ksilan hemiselülozlardaki ve diğer bileşenlerdeki (lignin ve diğer hemiselülozlar) intermoleküler ester bağlarının sabunlaştığı düşünülmektedir. Seyreltik  $NaOH$  uygulaması, lignoselülozik materyallerin şişmesine, iç yüzey alanının artmasına, polimerizasyon derecesinin azalmasına, kristalliğin azalmasına, lignin-karbohidrat arasındaki yapısal bağların kırılmasına ve lignin yapısının bozulmasına sebep olmaktadır (Fan vd.1987).

Oksidatif yolla biyokütlenin muamelesinde,  $H_2O_2$  lignoselülozik materyallerin ön işleminde enzimatik hidrolizin hassasiyetini oldukça artırmaktadır. Ligninin biyolojik

bozunması  $H_2O_2$  varlığında peroksidaz enzimi ile katalizlenir (Azzam 1989). Sıcaklık, ön işlem uygulama süresi ve  $H_2O_2$  derişimine bağlı olarak verim değişmektedir.

#### **2.5.4 Enzimatik hidroliz**

Biyokütlelerin enzimatik hidrolizi oldukça spesifik olan enzimler tarafından gerçekleştirilir (Beguin ve Aubert 1994). Enzimatik hidrolizin asidik ve bazik hidroliz ile karşılaştırıldığında verimi düşüktür. Enzim hidrolizi genellikle ılımlı koşullarda (pH 4.8 ve sıcaklık 45-50°C) yürütülür ve bir korozyon problemi oluşturmaz (Duff and Murray 1996). Selüloz zincirleri selüloz enzimleri tarafından glikoz moleküllerine kırılabilir. Yöntemin en büyük avantajı enerji tüketiminin az olmasıdır. Ancak uygulamanın çok yavaş olması ve spesifik enzimlerle gerçekleştirilmesi, bu yöntemin endüstriyel olarak kullanılmasını zorlaştırmaktadır (Cardona vd. 2010)

### **2.6 Mikroalglerden Biyoetanol Üretimi İle İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar**

#### **2.6.1 Mikroalglerin biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanımı**

Biyoetanol genellikle mısır, şeker kamışı ve pancar gibi karbonhidrat açısından zengin farklı hammaddelerin fermantasyonu ile ticari ölçekte üretilmektedir. Bu tür tarım ürünlerinin çokça yetiştirildiği Amerika Birleşik Devletleri ve Brezilya'da üretimi ve kullanımı yaygındır.

Ancak, gıda güvenliği ve insanların gıda ihtiyaçlarının karşılanması üzerindeki kaygılar tarım stoklarının kullanılmasıyla ilgili önemli bir sorun teşkil etmektedir. Biyoetanol gıda kaynakları dışında tarımsal atıklardan elde edilen şekerlerin fermentasyonu ile de üretilmektedir. Daha sürdürülebilir yakıt üretim alternatifleri bu sorunların üstesinden gelmek için gereklidir.

Mikroalgler yüksek lipit ve karbonhidrat içerikleri nedeniyle biyodizel ve biyoetanol üretimi için potansiyel hammadde olarak kabul edilmektedir.

Güneş ışığının biyokütleye çevriminin en etkin yolu olan alglerin yakıt olarak kullanımı günümüzde oldukça önem kazanmıştır. Mikroalgler, yüksek gelişme hızları; hücrelerinde yüksek miktarda lipit ve karbohidrat biriktirmeleri bakımından biyodizel ve biyoetanol üretimine önemli hammadde olmaktadır (Karatay ve Dönmez 2011).

Gerçekten de, algler yüksek bitkiler ile karşılaştırıldığında potansiyel bir çok avantaj sunar. Mikroalglerin güneş ışığını biyokimyasal enerjiye dönüştürmede karasal bitkilerden on kat daha yüksek verimli olduğu gösterilmiştir.

Mikroalglerin, tarım arazilerini işgal etmeden, deniz ve atıksularda bile gelişebiliyor olması, açlık sıkıntısı yaşanan ülkeler düşünüldüğünde biyoyakıt üretimi için ne kadar üstün hammaddeler olduğunu göstermektedir. Tüm bunlara ilaveten, karbondioksiti tutabilme özellikleri mikroalglerin çevre için ne kadar önemli organizmalar olduğunu da göstermektedir (Lam ve Lee 2012).

Üretimi için kullanılan ham maddenin temelinde, biyoetanol birinci, ikinci ve üçüncü nesil biyoetanol olarak ayrılmıştır. Mikroalgler son yıllarda biyoyakıt üretiminde üçüncü nesil hammadde olarak kabul edilmiştir (Nigam ve Singh 2011).

Fermantasyon işlemi için hammadde olarak mikroalglerin kullanılması ile ilgili çok az çalışma vardır (Harun, 2010 ve John, 2011). Mikroalglerin şeker verimliliklerinin yüksek olması hücrelerinin hızlı büyüme oranından kaynaklanmaktadır (Wargacki 2012).

Mikroalglerden yüksek biyokütle ve karbohidrat üretimi ile ilgili çalışmalara literatürde sıklıkla rastlanmaktadır (Rodjaroen 2007, Tan vd. 2013). Yüksek karbohidrat içerikleri,

hızlı ve ekonomik şekilde gelişmeleri sebebiyle mikroalgal biyokütlenin biyoetanol üretiminde gelecek vadeden hammaddeler olduğu düşünülmektedir.

Bazı mikroalg türleri nişasta ve selüloz bakımından, yüksek karbonhidrat içerdiklerinden biyoetanol üretimi için mükemmel substratlardır. Biyoetanol üretimi için karbonhidrat açısından zengin mikroalgal biyokütle kullanımının avantajları, karasal bitkilere göre mikroalglerin daha hızlı büyümeleri ve daha yüksek oranda CO<sub>2</sub> tutmalarıdır. Buna ek olarak, nişasta ve selüloz yapıdaki mikroalg bazlı karbonhidratların lignoselülozik materyallerle karşılaştırıldığında monosakkaritlere dönüştürülmesi, çok daha kolaydır (Harun 2010, John vd. 2011 ve Ho 2012). Chlorella, Chlamydomonas , Dunaliella , Scenedesmus ve Tetraselmis gibi mikroalglerin büyük miktarda karbonhidrat biriktirdiği gösterilmiştir ( > kuru ağırlığının % 40) (John vd. 2011).

Mikroalg biyokütlesinin ön muamelesi sülfürik asit ya da asetik asidin yardımı ile gerçekleştirilebilir. Bir mikroalg biyokütle bulamacı içindeki glikozun % 50'den fazlası, ön muamele işlemi boyunca sülfürik asit kullanılarak serbest bırakılabilir (M.T. Nguyen,2009). Mikroalg biyokütlesinden etanol verimini değerlendirildiğinde 1 g kadar mikroalg biyokütlesinden 0.26 g etanol verimi ile etanol elde edilebilir (Harun 2011).

Mikroalglerden etanol verimi ayrıca, hidroliz ayırma işlemi ile birleştirilmesiyle geliştirilebilir. Bir araya getirilen hidroliz ve fermentasyon yöntemi kullanarak, 1 g mikroalg biyokütlesinden yaklaşık 0.235 g etanol üretilebilir (Y. Liang 2009).

Hem mikroalglerden biyoetanol üretimi hem de mikroalglerin içerdikleri kompleks karbohidratların, maya hücrelerinin fermente edebilecekleri substratlar olan basit şekerlere dönüştürülmesi için gerekli ön işlemlerle ilgili literatürde son yıllarda artan sayıda çalışma mevcuttur.

Biyoeanol üretmek için hücre duvarı (selüloz ve hemiselüloz) içinde tutulan karbonhidratların veya hücre içinde nişasta şeklinde depolanan enerjinin açığa çıkarılması için hücre duvarında bir bozulma gerçekleştirilmelidir.

Bir başka aşama da, polisakkaridlerin hidroliz edilerek monosakaritlere serbest bırakılması gerekir. Biyokütlenin ön işleme maruz bırakılması, aynı zamanda, yüzey alanını artırmak için ve şeker çözünürlüğünü arttırmak için önemli bir basamaktır. Ön işlemler biyokütlenin fermente olabilen şekerlere dönüşüm aşamasındaki en önemli ve pahalı işlemlerden biri olarak görülmektedir.

Hücre duvarını bozmak ve hidroliz etmek için farklı metodlar test edilmiştir. Bunların arasında, yüksek basınçlı homojenleştirme, mikrodalga, sonikasyon ve ısıyı içeren fiziksel yöntemler bulunur. İlave olarak, kimyasal lizis alkalın ya da asit reaktifleri kullanılarak mikroalg biyokütlesini monosakaritlere hidrolize etmek için uygulanmıştır. Enzimatik ön işlemlerin bazı mikroalglerin hücre duvarını hidroliz etmek için etkili bir araç olduğu gösterilmiştir.

Bunlar fiziksel, kimyasal ve enzimatik ön-işlemlerin ekonomik maliyetleri uygulanacak yöntemlerin parametrelerine bağlıdır. Ön işlemler fermantasyon verimliliğini artırmak, araştırma ve geliştirme boyunca maliyetleri düşürmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Bu nedenle, hücre parçalanmasından ve şeker özütleme yöntemlerinin belirlenmesi düşük maliyetli ve sürdürülebilir şekilde biyoeanol üretilmesi için esastır.

Guo vd. (2013) gerçekleştirdikleri çalışmada *Chlorellaceae*, *Scotielloccystoidaceae*, *Neochloridaceae*, *Selenastraceae* familyalarına ait izole ettikleri 13 mikroalgin karbohidrat biriktirme ve etanol üretme kapasitelerini incelemişlerdir. İzole ettikleri mikroalgler arasından *Mychonastes afer* PKUAC 9 ve *Scenedesmus abundans* PKUAC 12 mikroalglerini biyokütle ve etanol üretim özellikleri bakımından seçmişler ve biyokütleden etanol üretmek amacıyla seyreltik asit ve selülaz enzimi ile muamele etmişlerdir. Algal biyokütlenin sakkarifikasyonu sonucunda, *Scenedesmus abundans* PKUAC 12 mikroalgin gelişiminin erken durgun fazında, toplamda 10.752 g/l şekerden



5.730 g/l glukoz elde edilmiştir. Araştırmacılar, bu hammaddenin *S. cerevisiae* mayası ile fermentasyonu sonucunda bir gram kuru alg başına 0.103 gram etanol oluştuğunu bulmuşlardır.

Ho vd. (2012) gerçekleştirdikleri çalışmada, *Chlorella vulgaris* FSP-E mikroalginin biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanımını araştırmışlar, çeşitli hidroliz ve fermantasyon stratejileri üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile muamele ettikleri mikroalg biyomasını biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanmış ve 12 saat inkübasyon sonucunda 11.66 g/l etanol elde edilmiştir.

Harun ve Danquah (2011) çalışmalarında, *Chlorococcum humicola* mikroalginden en yüksek biyoetanol konsantrasyonu 15 g/l mikroalg biyokütlesi 140 °C de %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 30 dakika muamele edildikten sonra 7.20 g/l olarak elde edilmiştir. Yine aynı araştırmacılar, yaptıkları diğer bir çalışmalarında aynı mikroalgi kullanarak asit yerine alkali ile muamelenin biyoetanol üzerine etkisini incelemiştir. Çalışmada %0.75 NaOH varlığında 120 °C'de 30 dakika muameleden sonra en yüksek glukoz konsantrasyonu 350 mg/g ve en yüksek etanol konsantrasyonu 0.26 g etanol/ g alg olarak bulunmuştur (Harun ve Danquah 2011).

Harun ve Danquah (2011) yaptıkları diğer bir çalışmada *Chlorococcum sp.* mikroalginin sakkarifikasyon sürecini *Trichoderma reesei*, ATCC 26921 'den elde ettikleri selüloz enzimi ile enzimatik olarak hidroliz ederek gerçekleştirmişlerdir. En yüksek glukoz miktarı 40 °C'de, pH 4.8 de ve 10 g/l mikroalg konsantrasyonunda %64.2 olarak bulunmuştur.

*Scenedesmus obliquus* mikroalginin biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanım kapasitesinin belirlendiği bir çalışmada, biyokütledeki fermente edilebilir basit şekerlerin ortaya çıkması için yapılan ön muamele işlemlerinin optimizasyonu araştırılmıştır. Denenen fiziksel ve fizikokimyasal testler arasında en iyi sonuçlar kurutulmuş biyokütlenin 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 120 °C de 30 dakika boyunca hidroliz edildikten sonra elde edilmiştir (Miranda vd. 2012).

Son yıllarda *Dunaliella* cinsinin biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılabilirliğine ilişkin çalışmalar da literatürde mevcuttur. Örneğin, *Dunaliella tertiolecta* LB999 biyokütlesinin enzimatik sakkarifikasyon sonucunda oluşan ürünleri *S. cerevisiae* YPH500 mayası tarafından kullanılmış ve 0.14 g etanol/ g biyokütle oranında alkol elde edilmiştir (Lee vd. 2013).

Yine *Dunaliella tertiolecta* mikroalgi ile yapılan diğer bir çalışmada ise bu mikroalgin ürettiği eksopolisakkaritlerin amiloza benzer yapıda  $\alpha$ -D-glukan içermesi sebebiyle biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılabilceği gösterilmiştir (Goo vd. 2013).

Biyoetanol üretmek için karbonhidrat fermantasyonu mikroalglerden biyoyakıt üretme yollarından biridir. Bu sürecin şu anda karmaşık ve enerji tüketen birçok aşamadan geçmeye ihtiyacı var. Karbonhidratların çoğu, hücre içinde veya hücre duvarı içinde nişasta formunda enerji için tutulabilir, bu yüzden hücre duvarı bozulması ve hidroliz gerçekleştirilmesi gereken aşamalardan ikisidir. (Hernandez vd. 2015)

Hernandez vd. (2015) çalışmalarında, fiziksel, kimyasal ve enzimatik ön işlemlerle üç mikroalg türü üzerinde biyoetanol üretilmesi için başlangıç aşaması olan, kompleks karbonhidratların bölünmesi ve basit şekerlere parçalanmasını gerçekleştirmişlerdir. Ön işlemler tek başına ve her bir diğeri ile bir araya getirilerek uygulanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, mikroalg kuru ağırlığının gramı başına monosakarit konsantrasyonu; *Chlorella sorokiniana* ve *Nannochloropsis gaditana* için enzimatik hidroliz ve ardından asit hidrolizi kombinasyonu sırasıyla, 128 ve 129 mg / g'dır. Elde edilen sonuçlar, mikroalg biyokütlesinden biyoetanol üretim sürecinde kompleks karbonhidratları basit şekerlere yıkmak için asit ön-işlem ve enzimatik hidroliz kombinasyonunun etkili olduğunu göstermektedir.

Bir mikroalg biorafinerisinde mikroalgden tam yararlanmak için, lipidler ve karbohidratların biyodizel ve biyoetanole dönüştürülmesinden sonra kalıntı biyokütle piroliz ile biyo-yağ haline dönüştürülebilir. *D. tertiolecta* kalıntı biyokütlesi 5.20 °C / dak ısıtma hızlarında 200 °C ile 550 °C arasında esas olarak ayrıştırılmıştır. Aktivasyon

enerjisi artan piroliz dönüşümü ile 163,12 kJ mol<sup>-1</sup> 'den 670,24 kJ mol<sup>-1</sup>'e belirgin şekilde yükselmiştir. Deneysel sonuçlar önerilen toplu kinetik modeli ile uyumlu bulunmuştur (Seung\_Soo Kim vd. 2014).

Alglerden biyoyakıt üretimi mikroalgal biyokütle üretim hızı ve lipid içeriğine bağlıdır. Hem biyokütle üretimi ve hem de lipid birikimi besinin önemli bir rol oynadığı çeşitli faktörlere ile sınırlıdır. Araştırmada, deniz mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* bir model organizma olarak kullanılmıştır ve besin gereksinimleri profili belirlenmiştir. Çalışmaya göre inorganik fosfat MathML görüntüleme kaynağı ile belirlenen eser elementler: su, en çok büyüme için gerekli olan kobalt (Co 2<sup>+</sup>), demir (Fe 3<sup>+</sup>), molibden (Mo 2<sup>+</sup>) ve manganez (Mn 2<sup>+</sup>) tanımlanmıştır. Lipidler azot yoksunluğundaki büyüme koşullarında birikmiştir ve bu zamana bağımlı gerçekleşmiştir. Bu araştırmanın sonuçları optimal olarak dizayn edilmiş fotobiyoreaktörler içinde mikroalg lipid üretimini maksimize etmek için uygulanabilir (Meng Chen vd. 2010).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

Gerçekleştirilen tez çalışmasında biyoetanol üretimi için hammadde olarak kullanılması amaçlanan mikroalgler Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan alınmıştır. Halofil özellikteki *Dunaliella* cinsine ait dört izolat kullanılmıştır.

Biyoetanol üretiminde fermantasyonu gerçekleştirmek için kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan alınmıştır.

#### **3.2 Yöntem**

##### **3.2.1 Üretim koşulları**

Tez çalışmasında yapılan tüm deneylerde *Dunaliella* hücreleri 250 ml'lik erlenlerde , 100 ml sıvı Johnson's Besiyeri'ne 680 nm'de yaklaşık 0.25 OD değerinde hücre ekimi yapılarak, 25 °C'de, 2400 lux ışık şiddetinde sürekli flöresan ışık ile ototrofik olarak geliştirilmiştir. İnkübasyon süresince erlenler manuel olarak günde iki kez karıştırılmıştır.

##### **3.2.2 Besiyeri bileşimi**

Tez çalışmasında, *Dunaliella* hücreleri daha önce gerçekleştirilen çalışmalarla belirlenmiş optimum gelişme gösterdikleri koşullarda geliştirilmiştir. *Dunaliella* hücreleri için hazırlanan Johnson's Besiyeri bileşimi kullanılmıştır. Besiyerinin pH'sı 6 olup % 15 tuzluluk oranına sahiptir (Johnson vd. 1968).

## Modifiye Johnson Kültür Ortamı

980 ml distile suya aşağıdaki maddeler eklenir:

Madde	Miktar
NaCl.....	150 g/l
MgCl <sub>2</sub> x6 H <sub>2</sub> O .....	1.5 g/l
MgSO <sub>4</sub> x7 H <sub>2</sub> O .....	0.5 g/l
KCl.....	0.2 g/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0.2 g/l
KNO <sub>3</sub> .....	1 g/l
NaHCO <sub>3</sub> .....	0.043 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.035 g/l
Fe solüsyonu.....	10 ml/l
Eser element solüsyonu.....	10 ml/l

### Fe solüsyonu (1litre için)

Madde	Miktar
Na <sub>2</sub> EDTA.....	189 mg
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	244 mg

### Eser element solüsyonu (1litre için)

Madde	Miktar
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	61 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	38 mg
CuSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	5.1 mg
ZnCl <sub>2</sub> .....	4,1 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	4,1 mg

### 3.2.3 *Dunaliella* hücrelerinden biyokütle elde edilmesi

Tez çalışmasında *Dunaliella* hücrelerinin inkübasyon süresinin 18. gününde biyokütle elde etmek için santrifüj işlemi yapılmıştır. Çalışmada 10. 000 x'de 5 dakika santrifüj yapılarak Johnson's Besiyeri steril olarak uzaklaştırılmış ve *Dunaliella* hücrelerinden biyokütle elde edilmiştir.

### 3.2.4 Biyokütlenin ön işlenmesi ve sakkarifikasyonu

Sakkarifikasyon işlemi için *Dunaliella* hücrelerinin içerdikleri fermente edilebilir, temel monosakkaritler gibi substratların ekstraksiyonunun yapılması amacıyla biyokütleye farklı ön muamele yöntemleri uygulanmıştır. Bu amaçla hücreler sonikasyon (Sonic Vibra Cell, 60W, 20kHz, 5 dakika), 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavlama , %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varlığında 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavlama ve %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gibi ön işlem süreçlerine tabi tutulmuştur. Bu ön muamele yöntemleri uygulanarak biyokütlerdeki fermente edilebilir substratları ortaya çıkarmadaki etkinlikleri belirlenmiştir.

### 3.2.5 Johnson's Besiyeri pH değerinin etkisi

Johnson's Besiyeri'nin başlangıç pH değerinin hücrelerin içerdiği şeker miktarını arttırmadaki etkisini araştırmak amacıyla pH'sı (6, 7, 8 ve 9) değerlerine ayarlanmıştır.

### 3.2.6 Besin limitasyonunun etanol üretiminde etkisinin belirlenmesi

**Azot Limitasyonunun Etkisi:** Besiyerinin farklı azot konsantrasyonlarının hücrelerin içerdiği şeker miktarını arttırmadaki etkisini araştırmak amacıyla standart Johnson's Besiyeri (0 g/L KNO<sub>3</sub>, 0.25 g/L KNO<sub>3</sub>, 0.5 g/L KNO<sub>3</sub>, 1 g/L KNO<sub>3</sub>) dört farklı azot konsantrasyonuyla hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonların etkisi araştırılmıştır.

**Sülfat Limitasyonunun Etkisi:** Besiyerinin farklı sülfat konsantrasyonlarının hücrelerin içerdiği şeker miktarını arttırmadaki etkisini araştırmak amacıyla standart Johnson's Besiyeri (0 g/L MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 0.125 g/L MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O) dört farklı sülfat konsantrasyonuyla hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonların etkisi araştırılmıştır.

**Fosfat Limitasyonunun Etkisi:** Besiyerinin farklı fosfat konsantrasyonlarının hücrelerin içerdiği şeker miktarını arttırmadaki etkisini araştırmak amacıyla standart Johnson's Besiyeri (0 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.75 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17.5 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 35 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) dört farklı fosfat konsantrasyonuyla hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonların etkisi araştırılmıştır.

### 3.2.7 Fermantasyonda kullanılan mikroorganizma ve üreme koşulları

Yapılan tez çalışmasında mikroalglerden elde edilen biyokütleden ön işlem sonrasında fermantasyonla biyoetanol üretiminde *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılmıştır. Maya ilk olarak, glikoz, pepton ve maya özütü içeren ve pH'ı 5.5 olan steril YPG besi yerinde geliştirilmiştir (Nikolaou vd. 2006).

#### YPG Besiyeri Bileşimi

Madde	Miktar (g/l)
Glukoz.....	20
Pepton.....	10
Maya özütü.....	3

%1 maya ekilmiş olan erlenler 25 °C'de 100 rpm karıştırma hızında çalışan çalkalamalı inkübatöre (New Brunswick Scientific Innova 4230) konularak 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonraki deneylerde mikroalgin içerdiği fermente edilebilir şekerler ile hazırlanan besiyerine transfer edilmiştir.

### **3.2.8 Fermantasyon**

Fermentasyon aşamasında ise, *Dunaliella* biyokütlesinin sakkarifikasyonu sonucu oluşan fermente edilebilir şekerlerden hazırlanan anaerobik besi ortamlarında *Saccharomyces cerevisiae* mayası geliştirilerek, mikroalg hücrelerinin içerdiği şekerlerin etanole dönüştürülmesi sağlanmıştır. Fermentasyon sonucu oluşan etanol gaz kromatografi cihazı ile belirlenmiştir.

### **3.3 Analiz Yöntemleri**

#### **3.3.1 *Dunaliella* spp.'nin gelişiminin belirlenmesi**

*Dunaliella* spp.'nin gelişiminin belirlenmesi için hücre kültürlerinden alınan örneklerle yapılan inceleme sonucunda en yüksek absorbans değerinin 680 nm'lik dalga boyunda olduğu bulunmuştur. Belirli aralıklarla Johnson's Besiyeri'nde geliştirilen kültürlerden alınan örneklerle hücrelerin gelişmesi spektrofotometrik ölçüm (Shimadzu UV – 1201V) ile takip edilmiştir.

#### **3.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişiminin belirlenmesi**

*S. cerevisiae*'nin gelişiminin belirlenmesi için anaerobik tüplerden fermantasyon için ilk ekim yapıldığında ve fermantasyon sonrası ölçüm esnasında alınan örnekler 5000 rpm çevirme hızında 10 dakika santrifüjlenmiştir. Gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra yaş maya derişimi g/l cinsinden spektrofotometrik olarak 600 nm dalga boyunda (Shimadzu UV – 1201V) belirlenmiştir.

#### **3.3.3 Şeker konsantrasyonunun belirlenmesi**

Ön işleme tabi tutulmuş biyokütleden hazırlanan besiyeri ve fermantasyon ortamlarından alınan örneklerdeki toplam şeker derişimi Fenol Sülfirik asit



yöntemiyle spektrofotometrik olarak (Shimadzu UV – 1201V) 575 nm’de absorbanans değerleri hesaplanarak belirlenmiştir (Dubois vd. 1956).

### **3.3.4 Etanol konsantrasyonunun belirlenmesi**

Fermentasyon süresince oluşan etanolü belirlemek için, örnekler 10 000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve supernatant kısmı analiz için kullanılmıştır. Etanol konsantrasyonu FID dedektör kullanılarak Gaz Kromatografi cihazında belirlenmiştir (Shimadzu, GC 14B). Bir mikrolitre örnek, iç çapı 2mm ve 2 m uzunluğundaki cam kolona (chromosorb 101 - 80/100 mesh) enjekte edilmiştir. Enjeksiyon ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 220 °C ve 250 °C’dir. Fırın sıcaklığı 160 °C olup, taşıyıcı gaz olarak azot kullanılmıştır (Avcı ve Dönmez 2006).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında halofil özellikteki *Dunaliella sp.* mikroalglerinin biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanım kapasitelerinin belirlenebilmesi amacıyla hücre içinde en yüksek karbohidrat biriktirdiği ve fermantasyon sürecinin en iyi gerçekleştiği koşullar belirlenerek, oluşan biyoetanol gaz kromatografi cihazında ölçülerek tespit edilmiştir.

### 4.1 *Dunaliella spp.* Seçimi

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan alınan halofil özellikteki *Dunaliella* cinsine ait dört farklı tür tez çalışmasında kullanılmıştır. *Dunaliella* hücreleri 250 ml'lik erlenlerde, %15 NaCl konsantrasyonunda, pH 6'da 100 ml sıvı Johnson's Besiyeri'ne yaklaşık 10 milyon hücre ekim yapılarak, 25 C'de, 2400 lux ışık şiddetinde sürekli flöresan ışık ile ototrofik olarak geliştirilmiştir. 18 günlük inkübasyon süresince erlenler manuel olarak günde iki kez karıştırılmıştır. Hücrelerin gelişimleri spektrofotometrik olarak belirli aralıklarla kültürden alınan örneklerle takip edilmiştir.

Yapılan deney sonucunda gelişme özelliği göz önünde bulundurularak 3 numaralı izolat daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir.



Şekil 4.1 *Dunaliella* cinsine ait izolatların 18 günlük inkübasyon süresi sonunda gösterdikleri gelişimleri (%15 NaCl, pH 6, 25 °C, 2400 lux ışık şiddeti)

#### 4.2 Mikroalg Hücrelerine Uygulanan Ön İşlem Yöntemlerinin Etanol Konsantrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddenin içerdiği kompleks yapılı şekerlerin basit monomerlere dönüştürülmesi amacıyla mikroalgal biyokütle ön işlemlere tabi tutulmuştur. Biyokütlenin kristal yapısının bozulup, parçalanmaya karşı yüzey alanı genişletmek için mikroalgal biyokütleye bir takım fiziksel ve fizikokimyasal ön işlem yöntemleri uygulanarak fermentasyon süreci için gerekli şekerlerin açığa çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla hücreler sonikasyon (Sonics Vibra Cell, 60 W, 20 kHz, 5 dakika), 121 °C’ de 15 dakika süre ile otoklavlama, %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 121°C’de 15 dakika süre ile %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varlığında otoklavlama gibi ön işlem süreçlerine tabi tutulmuştur. Ek olarak mikroalgal hücreler herhangi bir fiziksel ya da fizikokimyasal işleme tabi tutulmadan sadece yıkanmak suretiyle de biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılmıştır.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında uygulanan ön işlem yöntemlerinin etanol üretimine etkisi çizelge 4.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2 Mikroalg hücrelerine uygulanan ön işlem yöntemlerinin etanol konsantrasyonuna etkisinin belirlenmesi (inkübasyon süresi: 18 gün, mikroalg miktarı: 30g/L, fermentasyon pH: 6, fermentasyon süresi: 72 saat T: 25±1°C)

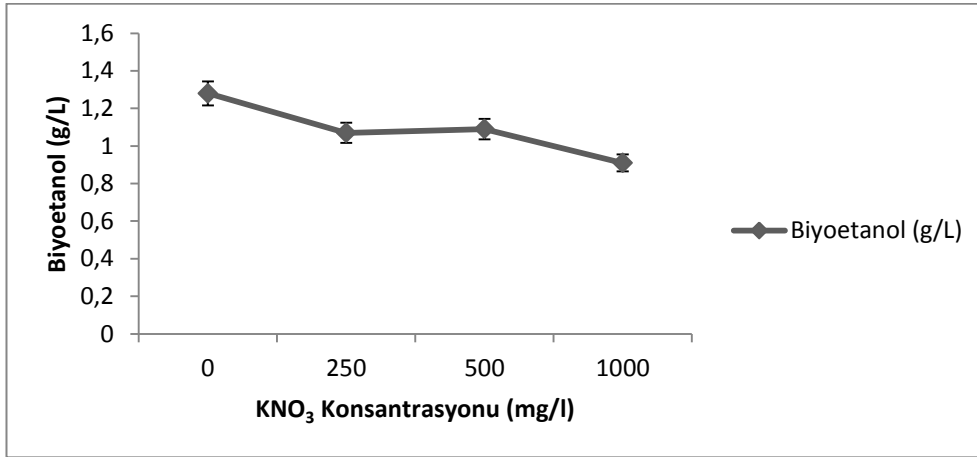
Ön işlem yöntemi	Etanol (g/L)
121 °C' de 15 dakika basınç	0.78 ± 0.1
%1 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.70 ± 0.06
Sonikasyon 5 dakika	0.70 ± 0.13
121 °C' de 15 dakika basınç +%1 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.91 ± 0.05
ön işlem uygulanmadan	0.68 ± 0.04

Gerçekleştirilen deneyler sonucunda en yüksek etanol konsantrasyonuna mikroalgalbiyokütle %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varlığında 121 °C' de 15 dakika basınca maruz bırakıldığında 0.91 g/L olarak ulaşılmıştır.

### 4.3 Besin Limitasyonunun Etanol Konsantrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

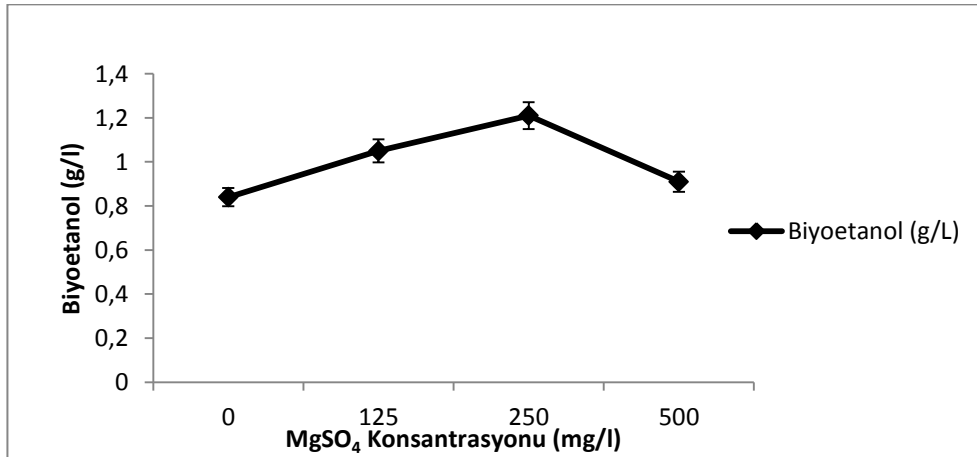
Litaratürde yer alan çalışmalar mikroalglerin geliştirildikleri ortamda birtakım besinlerin miktarında sınırlandırılmaya gidilmesinin onların biriktirdikleri karbonhidrat miktarlarında artışa neden olduğunu göstermektedir (Dragone vd. 2011). Buradan yola çıkarak gerçekleştirilen tez çalışmasında, mikroalg hücrelerinin geliştirildiği ortamda bulunan besin maddelerinin farklı konsantrasyonlarının hücrel karbohidrat birikimini araştırmak amacı ile Johnson's Besiyeri'nde bulunan KNO<sub>3</sub> (0 g/L KNO<sub>3</sub>, 0.25 g/L KNO<sub>3</sub>, 0.5 g/L KNO<sub>3</sub>, 1 g/L KNO<sub>3</sub>) dört farklı azot konsantrasyonuyla, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.75 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17.5 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 35 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) dört farklı fosfat konsantrasyonuyla, MgSO<sub>4</sub> (0 g/L MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 0.125 g/L MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O) dört farklı sülfat konsantrasyonuyla denenmiştir.

Buna göre, en yüksek etanol üretimi ortamda KNO<sub>3</sub> miktarında kısıtlamaya gidilince elde edilmiştir. Besiyerine hiç azot konulmadığında 1.28 g/l etanol elde edilmiştir.



Şekil 4.2 KNO<sub>3</sub> sınırlandırmalarının *Dunaliella* sp. biyokütlesinden biyoetanol üretimine etkisi (inkübasyon süresi: 18 gün, mikroalg miktarı: 30g/L, fermentasyon pH: 6, fermentasyon süresi: 72 saat)

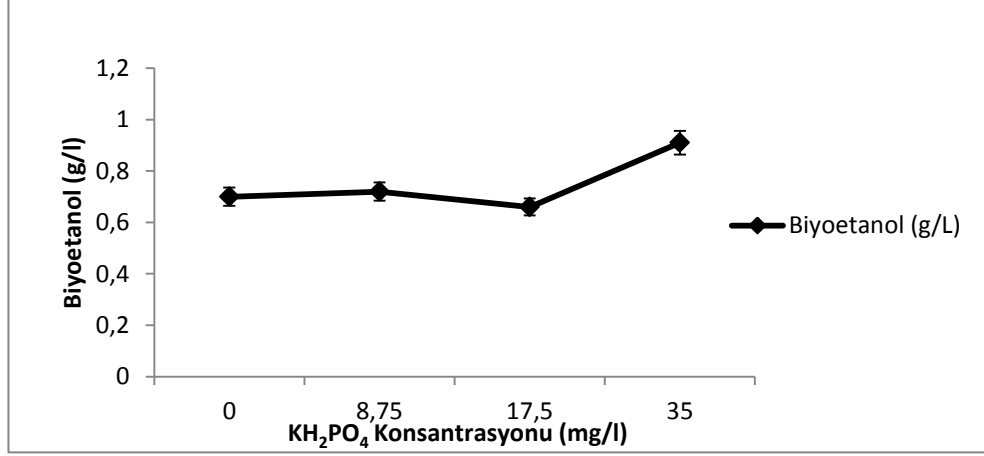
Besiyerine konulan MgSO<sub>4</sub> miktarında sınırlandırma gerçekleştiğinde, 250 mg/l MgSO<sub>4</sub> ile hazırlanan besiyerinden 1.21 g/l etanol elde edilmiştir.



Şekil 4.3 MgSO<sub>4</sub> sınırlandırmalarının *Dunaliella* sp. biyokütlesinden biyoetanol üretimine etkisi (inkübasyon süresi: 18 gün, mikroalg miktarı: 30g/L, fermentasyon pH: 6, fermentasyon süresi: 72 saat)

Besiyerine konulan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> miktarında sınırlandırma gerçekleştiğinde, etanol veriminde azalma meydana gelmiştir. Bu sebeple standart şartlarda besiyerine eklenen

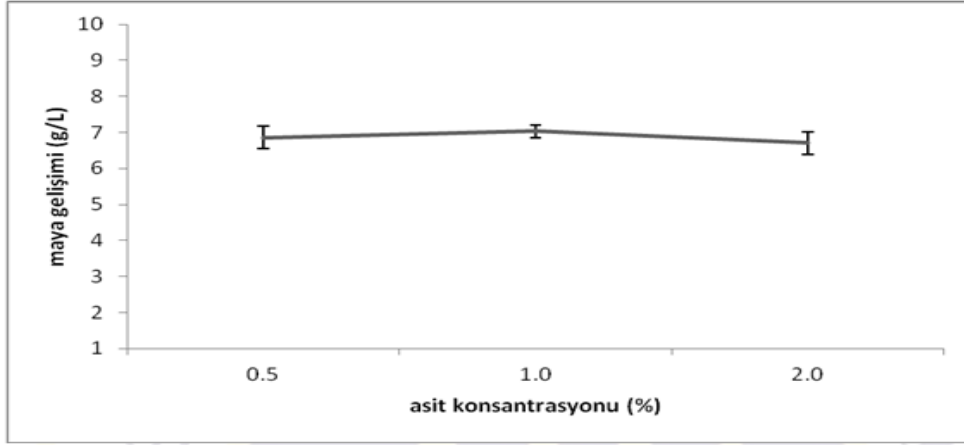
miktar olan 35 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ile hazırlanan besiyerinden en yüksek etanol 0,91 g/l olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , sınırlandırmalarının *Dunaliella* sp. biyokütlesinden biyoeetanol üretimine etkisi (inkübasyon süresi: 18 gün, mikroalg miktarı: 30g/L, fermentasyon pH: 6, fermentasyon süresi: 72 saat)

#### 4.4 Hidroliz İşleminde Kullanılan Asit Konsantrasyonunun Hücrelerinin Maya Gelişimine Etkisinin Belirlenmesi

Gerçekleştirilen tez çalışmasında biyokütlenin ön muamele işlemi için gerekli en etkin asit miktarının bulunması amacıyla %0.5, 1 ve 2 olmak üzere üç farklı  $\text{H}_2\text{SO}_4$  konsantrasyonu denenmiştir. Azot kaynağının minimum olduğu besiyerinde pH 6'da 30 gün süre ile geliştirilen 30 g/L mikroalgin farklı asit konsantrasyonlarına muamelesi ile elde edilen şekerlerden hazırlanan besi ortamında geliştirilen *S. cerevisiae* mayasına ait gelişme verileri şekil 4.5'de gösterilmektedir. Buna göre en yüksek maya gelişimi, algal biyokütle %1  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile hidroliz edildiğinde 7.03 g/L olarak gözlenmiştir.

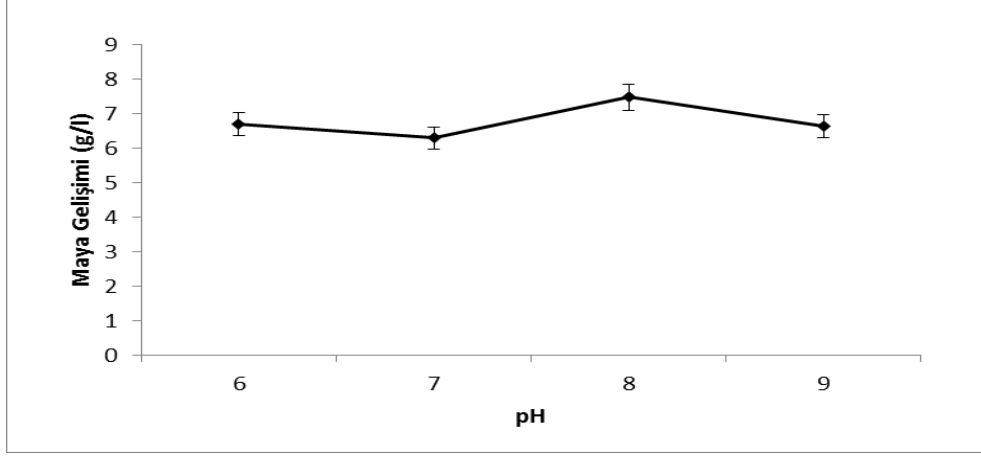


Şekil 4.5 Asit konsantrasyonunun maya hücrelerinin gelişimine etkisinin belirlenmesi (inkübasyon süresi: 18 gün, mikroalg miktarı: 30g/L, fermentasyon pH: 6, fermentasyon süresi: 72 saat)

#### 4.5 Johnson's Besiyeri'nin pH Değerinin Maya Hücrelerinin Gelişimine Etkisinin Belirlenmesi

Mikroorganizmaların besinlerden yararlanma verimleri üzerinde besiyerinin pH değeri önemlidir. Hücre zarından besin transferini sağlayan enzimlerin optimum bir pH değeri vardır ve pH değerinin optimum değerden düşük ya da yüksek olması enzim aktivitelerini düşüreceği için hücre büyümesi de yavaşlayacaktır.

Besiyeri pH değerinin bu hücrelerdeki şekerler ile hazırlanan besiyerlerinde geliştirilen maya hücrelerinin gelişimine etkisini belirlemek amacıyla 6, 7, 8 ve 9 olmak üzere dört farklı pH değerine sahip Johnson's besiyerinde mikroalg hücreleri ototrofik olarak geliştirilmiştir. Bu ortamlardan toplanan mikroalg hücrelerinin şekerleri ile hazırlanan besiyerlerinde geliştirilen maya hücrelerinin gelişimleri Tablo 4'de gösterilmiştir. Algin geliştirildiği besiyeri pH değerinin, maya hücrelerinin gelişiminde önemli bir etkiye sahip olmadığı gözlenirse de pH 8'de geliştirilen alg hücreleri ile hazırlanan besiyerinde en yüksek maya gelişimi 7.47 g/L olarak gözlenmiştir.



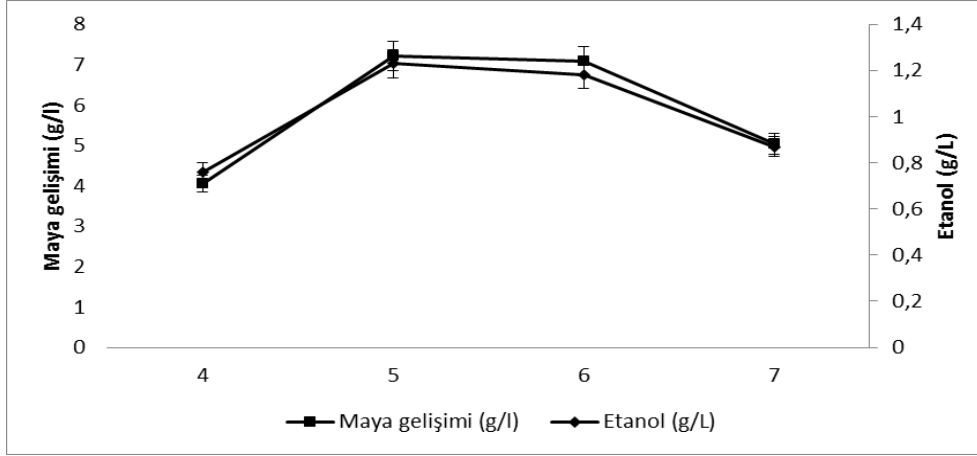
Şekil 4.6 Besiyeri pH değerinin maya hücrelerinin gelişimine etkisi (inkübasyon süresi: 18 gün, mikroalg miktarı: 30g/L, fermentasyon pH: 6, fermentasyon süresi: 72 saat, 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

#### 4.6 Fermentasyon Ortamının pH Değerinin Maya Hücrelerinin Gelişimine ve Etanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Mikrobiyel gelişme ve fermentasyon süreçleri besiyerinin pH değeri ile yakından ilişkilidir. Literatürde yer alan çalışmalarda maya hücrelerinin gelişimi için optimum pH değerinin 5.0-6.5 arasında olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda gerçekleştirilen proje çalışmasında fermentasyon ortamının hücre gelişimine ve etanol üretimine etkisini belirlemek amacıyla 4, 5, 6 ve 7 pH değerleri test edilmiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında en düşük hücre gelişimi ve etanol üretimi pH 4'de gözlemlenirken, pH 5 ve 6 değerlerinde elde edilen hücre gelişimi ve etanol konsantrasyonları arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir. En yüksek etanol konsantrasyonu ve hücre gelişimi sırasıyla 1.23 ve 7.21 g/L olarak pH 5 değerinde elde edilmiştir.

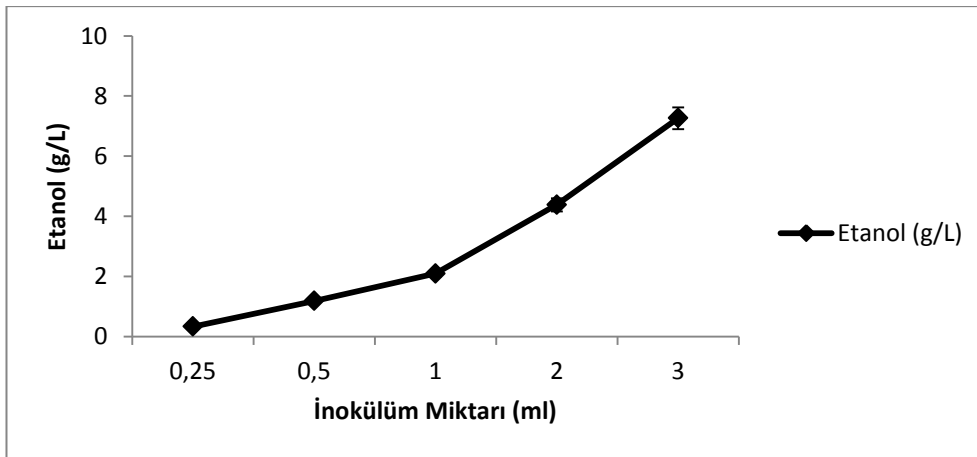




Şekil 4.7 Fermentasyon ortamının pH değerinin maya hücrelerinin gelişimine ve etanol üretimine etkisi (inkübasyon süresi: 18 gün, besiyeri pH:8, mikroalg miktarı; 30 g/L, fermentasyon süresi 72 saat, 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

#### 4.7 İnokülüm Miktarının Maya Hücrelerinin Etanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada fermentasyon ortamına eklenen maya miktarının etanol üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 ve 3 ml inokülüm miktarları denenmiştir. Deneyle sonuçunda en yüksek etanol konsantrasyonu en yüksek inokülüm miktarının bulunduğu ortamda 7.26 g/L olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.8 İnokülüm miktarının maya hücrelerinin etanol üretimine etkisi (inkübasyon süresi: 18 gün, besiyeri pH:8, mikroalg miktarı; 30 g/L, fermentasyon pH:5, fermentasyon süresi 72 saat, 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

## 5. TARTIŞMA

Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddenin çeşidi ticari ölçekte biyoetanol üretimini doğrudan etkilemektedir. Günümüzde biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmalarda öne çıkan en umut vaadedici biyokütle mikroalgelere ait biyokütlelerdir. Mikroalgelerin karbonhidrat açısından zengin olmaları, karasal bitkilere kıyasla çok daha hızlı büyümeleri, lignin içermemeleri ve yüksek oranda CO<sub>2</sub> tutabilme özellikleri en önemli avantajlarıdır. Karbonhidrat açısından zengin bir mikroalg olan *Dunaliella spp.* halofilik bir mikroalg olması ve ekstrem koşullarda yaşayabilme kabiliyeti ile mikroalgler içerisinde öne çıkmaktadır.

Tarım alanlarını işgal etmeden, çok yüksek tuzluluk oranlarında bile hayatta kalabilme kabiliyeti olan *Dunaliella* mikroalginin, ekstrem koşullarda yaşayabilmesi kontaminasyon riskini en aza indirerek üretiminde de avantaj sağlamaktadır.

Tez kapsamında daha önceki çalışmalarda Tuz Gölü'nden izole edilmiş ve kültür koleksiyonumuzda var olan *Dunaliella* cinsine ait yerel türlerin biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaçla hammadde olarak kullanılan mikroalg biyokütlesine %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varlığında 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavlama ön işlemleri uygulanmış daha sonra mikrobiyel üremeye uygun bir ortam elde edilerek *S. cerevisiae* mayasıyla bu ortamda etanol fermantasyonu gerçekleştirilmiştir.

### 5.1 *Dunaliella spp.* Seçimi

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan alınan halofil özellikteki *Dunaliella* cinsine ait dört farklı tür, en iyi gelişim gösteren türü belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. *Dunaliella* cinsine ait dört tür aynı koşullarda (250 ml'lik erlenlerde , %15 NaCl konsantrasyonunda, pH 6 'da 100 ml sıvı Johnson's Besiyeri'ne yaklaşık 10 milyon hücre ekim yapılarak, 25 °C'de, 2400 lux ışık şiddetinde sürekli flöresan ışık ile) ototrofik olarak geliştirilmiştir. İnkübasyon süresince hücrelerin

gelişimleri spektrofotometrik olarak belirli aralıklarla kültürden alınan örneklerle takip edilmiştir.

Daha önce *Dunaliella* cinsine ait türlerin kültüre edilmesi ile ilgili yapılmış olan çalışmalarda % 15 – 20 NaCl tuzluluk oranındaki besiyerleri kullanılmış olup pH 6- 9 arsında en iyi gelişim gösterdikleri ortaya konulmuştur. *Dunaliella* cinsine ait türlerden en iyi üreme gösteren türün seçilmesinde maliyetin düşük tutulmasının öneminden dolayı % 15 tuzluluk oranında besiyeri kullanılmıştır. Gelişme ortamının pH'sı Johnson's Besiyeri % 15 tuzluluk oranında hazırlandığında hali hazırda pH 6 civarında olması maya hücrelerinin gelişimine uygun bir değer olduğundan dolayı pH 6 olarak belirlenmiştir.

Daha önce *Dunaliella* hücrelerinin inkübasyon süresi ile ilgili yapılan çalışmalarda ekim yapılan hücre sayısı referans alındığında en iyi canlı hücre gelişimine 15 – 20 günlük inkübasyon süresi sonrasında ulaşılmıştır (Borowitzka 1999). Bu sebeple 18 günlük inkübasyon süresi sonrasında deney sonuçlandırılmıştır. Belirtilen besiyeri şartlarında en düşük hücre gelişimi 4 numaralı suşta saptanmıştır. Yapılan deney sonucunda 3 numaralı izolatin aynı koşullarda en iyi hücre gelişimi gösterdiği, canlı biyokütlenin en fazla arttığı mikroskobik olarak da gözlemlenmiş ve gelişme özelliği göz önünde bulundurularak daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

## **5.2 Mikroalg Hücrelerine Uygulanan Ön İşlem Yöntemlerinin Etanol Konsantrasyonuna Etkisinin Belirlenme**

Biyometanol üretim sürecinde ilk adım biyokütleyle uygulanan ön işlemdir. Kullanılan hammaddenin içerdiği kompleks yapıları şekerlerin basit monomerlere dönüştürülmesi işlemi şüphesiz ki üretim sürecindeki en önemli basamaktır. Mikroalg hücrelerinin farklı karbonhidrat içerikleri sıklıkla hücrenin farklı kısımlarında depolanmakta olup karbonhidratın önemli bir kısmı genellikle mikroalg hücrelerinin içerisinde bulunmaktadır. Bu nedenle, bir ön işlem aşaması genellikle mikroalg hücrelerinin parçalanarak karbonhidratın serbest bırakılması için gereklidir. Karbonhidrat karmaşık

bir bileşiktir ve fermantasyon işleminin gerçekleşmesi için karbonhidratın fermente edilebilir şekerlere dönüşmeleri gerekmektedir.

Bu dönüşümün gerçekleşmesi için de mikroalgelere çeşitli ön işlem yöntemleri uygulanmaktadır. Biyoetanol üretiminin genel sürecindeki kritik rolü nedeniyle, mikroalgal biyokütleyle uygulanan ön işlem yöntemlerinin çeşitliliği hakkında birçok çalışma mevcuttur (Miranda vd. 2012, Ho vd. 2013). Ön işlem aşaması ile biyokütlenin kristal yapısı bozulur ve parçalanmaya karşı yüzey alanı genişletilmiş olur (Harun ve Danquah 2011).

Mikroalglerdeki kompleks yapıları karbon kaynaklarının basit fermente edilebilir monomere dönüşürmesi için uygulanan ön işlemler içerisinde fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal yöntemler bulunmaktadır. Biyokütleyle uygulanacak olan ön işlemin etkinliği karbonhidratların bozunmasına engel olması, mümkün olduğunca az miktarda yan ürün ve inhibitör oluşturması ve maliyetin düşük olmasına bağlıdır (Sun ve Cheng, 2002).

Fiziksel ön işlemler, biyokütlenin daha küçük boyutlarda parçalanarak daha sonra uygulanacak işlemler için yüzey alanının genişletilmesi esasına dayanır. Bunun için biyokütleyle mekanik olarak öğütme, parçalama, ezme gibi fiziksel muameleler yapılmaktadır. Şimdiye kadar, bu ön işlem yöntemi makroalgler dışında mikroalg biyokütlesi için nadiren de olsa hala araştırılmaktadır (Schultz-Jensen vd.2013 ve Tedesco vd.2014). Bu durum, , mikroalg biyokütlesinin biyoetanol üretimi için nispeten yeni bir hammadde olması, ticari biyokütle üretiminin hala çok sınırlı olması ve mekanik ön işlem için büyük miktarda biyokütle gerektirmesinden dolayıdır.

Fizikokimyasal ön işlemlerde biyokütleyle buhar ile muamele, amonyak ile muamele ve karbondioksit ile muamele edilir. Buhar ile muamelede biyokütle yüksek basınçlı doymuş buharla muamele edilerek kompleks yapıları karbon kaynaklarının bozunarak hidrolizin kolaylaştırılması temeline dayanır (Grous vd. 1986).Amonyak ile muamelede biyokütle yüksek basınç ve sıcaklıkta sıvı amonyakla muamele edilir. Hem kompleks yapıları karbon kaynaklarının yeterli oranda indirgenememesi hem de amonyağın geri

kazanım işleminin zoluğu açısından sık tercih edilen bir yöntem değildir.Yüksek basınçta karbondioksit ile muamele metodu ile diğer iki yönteme göre daha düşük verimle hidroliz gerçekleşmektedir. Ancak geri dönüşüm gerektirmemesi ve inhibitör oluşumunun gerçekleşmemesi nedeniyle daha avantajlı bir yöntemdir.

Kimyasal ön işlemden asit (örneğin, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl ve HNO<sub>3</sub>) veya alkali (NaOH, KOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) kullanımı biyoetanol üretiminde lignoselülozik biyokütle için ön muamele etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Bensah ve Mensah, 2013 ve Sun ve Cheng, 2002). Bu yöntem, genellikle, hızlı ve nispeten ucuzdur. Bununla birlikte bu işlemden, yüksek sıcaklık ve basınç ile oluşturulan aşırı reaksiyon koşullarına bağlı olarak, karbonhidrat bozunması genellikle görülmektedir.

Furfural (2-furaldehid), 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF), asetik asit, alçı, vanilin ve aldehitler (4-hidroksi-benzaldehit), gibi bozunmuş karbohidratlar, doğrudan maya fermentasyonunu inhibe edebilir ve daha sonra biyoetanol verimini azaltabilecektir (Bensah ve Mensah, 2013 Chen vd.2013). Bu durumda, reaksiyon koşullarının optimizasyonu (sıcaklık, basınç, nem, ve reaksiyon madde konsantrasyonu) kimyasal ön muamelede işlevsel etkinliği artırmak ve inhibisyon etkisini azaltmak için anahtar faktördür (Chen vd. 2013).

Mikroalg biyokütlesinden şeker üretmek için kimyasal ön işlem yönteminin kullanılmasıyla ilgili son zamanlarda birçok araştırma yapılmıştır (Harun ve Danquah, 2011b, Ho vd. 2013a ve Miranda vd. 2012b). Mikroalglerin ligninden yoksun olması ve basit hücresel yapısı nedeniyle sadece aynı anda, hücre içindeki karbonhidratı serbest bırakmak için hafif reaksiyon koşulları ve kompleks karbonhidrat moleküllerini basit fermente şekerlere hidrolize etmek için hidroliz reaksiyonu uygulanır (Ho vd. 2013a).

Harun ve Danquah (2011b) tarafından, % 1-3 h / h arasında seyreltilmiş H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonu, 140-160 °C arasında reaksiyon sıcaklığı ve 15-30 dakika tepkime süresinin *Chlorococcum humicola* hücre duvarının parçalanıp biyoetanol üretimi için karbonhidratın serbest bırakılmasında yeterli olduğu bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca, optimum noktanın ötesinde reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresinin artırılmasıyla,

ağırlıklı nedeniyle karbonhidrat bozulmasındaki artışa bağlı olarak biyoetanol veriminin azalabileceğini bildirilmiştir.

Benzer bulgular da Ho ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (2013a). *Chlorella vulgaris* biyokütlesinden seyreltilmiş % 1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonu, 121 °C’de tepkime sıcaklığı, ve 20 dakika reaksiyon süresi sonrasında % 96 verimle glukoz elde edilmiştir.

Asitlerin yanı sıra, mikroalg karbonhidratlarının hidrolizi için alkali kullanımı da başarı göstermiştir (Harun vd. 2011a). Harun vd. 2011a ve Harun vd. 2011b *Chlorococcum infusionum*’ den 0.35 g biyokütleyle 30 dakika boyunca 120 °C’de % 0,75 ağırlık / hacim NaOH optimum glukoz verimi elde etmek için uygulanmıştır. Sonuçlar NaOH’ın hücre duvarı bütünlüğünü yitirmesine ve karbonhidratı serbest bırakmak için mikroalg hücre duvarının yırtılmasına neden olduğunu göstermiştir. Daha sonra, NaOH varlığında karbohidratın basit fermente şekere (glukoz) doğru indirgeniği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Miranda vd. (2012b) tarafından yapılan çalışmada NaOH kullanımının *Scenedesmus obliquus*’dan yüksek glukoz verimi elde edilemediği rapor edilmiştir. Çalışmada kullanılan yüksek alkali konsantrasyonu ciddi şeker bozunmasını neden olmuştur. Bu sonuçlara göre, mikroalg karbonhidratının hidrolizinde alkali katalizörün potansiyelini keşfetmek için daha fazla araştırma yapılması gereklidir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, farklı fiziksel (sonikasyon, basınç ile sıcaklık) ve fiziko-kimyasal yöntemler (asit hidrolizi olan ve olmayan otoklav) *Dunaliella* hücreleri için en uygun ön işlem yöntemini araştırmak için test edilmiştir. Bu amaçla hücreler sonikasyon (Sonics Vibra Cell, 60 W, 20 kHz, 5 dakika), 121°C’de 15 dakika süre ile otoklavlama, %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 121°C’de 15 dakika süre ile %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varlığında otoklavlama gibi ön işlem süreçlerine tabi tutulmuştur. Ek olarak mikroalgal hücreler herhangi bir fiziksel ya da fizikokimyasal işleme tabi tutulmadan sadece yıkanmak suretiyle de biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılmıştır.

Literatüre göre sonikasyon yaygın olarak kavitasyon etkisi nedeniyle hücre duvarını ve membranını çatlatarak mikrobiyal hücreleri parçalamak için kullanılır. Fiziksel parçalama yöntemleri siyanobakteri, mikobakteri, spor ve mikroalg hücreleri için başarıyla çalışır. Bu bağlamda, Miranda vd. (2012), sonikasyon ve fizikokimyasal yöntemler de dahil olmak üzere farklı fiziksel yöntemleri *Scenedesmus obliquus* için ön işlem yöntemi olarak denemişlerdir. Araştırmacılar parçalama yöntemlerinin verimliliklerini karşılaştırdıklarında, sonikasyon gibi fiziksel yöntemlerin otoklav ve asit hidroliz gibi fizikokimyasal yöntemlere göre hücre duvarı bozulmasında daha ileri olmadığını kaydetmişlerdir (Miranda vd. 2012) .

Biyokütleye uygulanan ön işlem yöntemleri arasında en yaygın olanı otoklavlama öncesinde biyokütlenin asit hidrolizine maruz bırakılmasıdır. Ho vd. (2013), *Scenedesmus obliquus* CW-N mikroalginin primer hidrolizi için % 2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanmışlar ve daha sonra hidrolizatı sekonder hidroliz için 121 ° C'de 20 dakika inkübe etmişlerdir. Başka bir hidroliz stratejisi de, seyreltik asit hidrolizidir. Aynı araştırmacılar farklı bir çalışmalarında (2013), fermantasyon çalışmalarında *Zymomonas mobilis* kullanarak *Chlorella vulgaris* FSP-E mikroalg biyokütlesinin sakarifikasyonunda % 1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ün çok etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mikroalgere uygulanan ön işlem yöntemlerine ilişkin literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında otoklavda asit hidrolizi gibi fizikokimyasal yöntemlerin sonikasyon gibi fiziksel yöntemlere oranla daha başarılı olduğu dikkat çekmektedir.

Gerçekleştirilen deneyler sonucunda en yüksek etanol konsantrasyonuna mikroalg biyokütle %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varlığında otoklavlandığında 0.91 g/L olarak ulaşılmıştır. Denenen diğer ön işlem yöntemleriyle elde edilen etanol konsantrasyonu ile, biyokütle herhangi bir ön işleme maruz bırakılmadan elde edilen etanol konsantrasyonu arasında önemli bir fark görülmemiştir. Bu durum, kullanılan mikroalgten ticari ölçekte etanol üretiminde avantaj sağlayacak niteliktedir.

### 5.3 Besin Limitasyonunun Etanol Konsantrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

Çevresel stres faktörlerinin mikroalglerin kompozisyonunu değiştirdiği bilinmektedir ve mikroalglerin karbohidrat içeriğini maksimize etmek için dikkate alınmalıdır. Yetiştiriciliğinde besin, ışık ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin kontrolü, alg büyümesini ve biyokütle kompozisyonunu etkilediği kaydedilmiştir.

Besin kısıtlamasının mikroalglerin karbohidrat biriktirmesine etkisinin belirlendiği bir takım çalışmalar da literatürde mevcuttur. En iyi koşullarda mikroalg ve siyanobakterilerin en önemli türleri % 15-25 karbohidrat ihtiva etmektedirler. Ancak farklı çalışmalar ortaya koymuştur ki mikroalgler yüksek tuzluluk ,besin kıtlığı, ışık şiddeti gibi stres koşullarına maruz kaldıklarında yüksek karbohidrat içeriğine sahip olarak biyoetanol üretimi için uygun karbohidrat kaynaklarıdır.

Biyoetanol üretimi için hammadde olarak mikroalglerin biyokütlesini kullanmak için yeterli miktarda karbohidrat içeriği gereklidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda mikroalglerin yetiştirilirken besin stresine maruz kaldığında karbohidrat içeriğinde belirgin artışlar olduğu kaydedilmiştir (Singh ve Gu 2010, Ho vd. 2012b ve Dragone vd. 2011).

Son çalışmalarda (örneğin, kükürt, azot ve fosfat gibi), besin sınırlaması içeren stratejiler protein ya da peptidleri karbohidrata dönüştürmek için zorlayarak mikroalglerin karbohidrat birikimini geliştirmek için kullanılmıştır (Dragone vd. 2011, Harun ile Danquah 2011).

Besin kısıtlamasının mikroalglerin karbohidrat biriktirmesine etkisinin belirlendiği çalışmalardan birisi 2011'de yapılmıştır. Dragone vd. yaptıkları çalışmada *Chlorella vulgaris* P12 mikroalginin karbohidrat birikiminin üzerine azot ve demir limitasyonunun etkisini belirlemişlerdir. Çalışmada en yüksek karbohidrat konsantrasyonu azotun olmadığı, başlangıç FeNa-Edta konsantrasyonunun ise 0.04, 0



ve 0.08 g/l olduğu ortamda sırasıyla %41.0, %40.5 ve %39.8 olarak bulunmuştur. Bu yolla araştırmacılar algin karbohidrat içeriğini 8 kat arttırmışlardır.

Besin kısıtlamasının etkisinin araştırıldığı diğeri bir çalışmada araştırmacılar, *Chlorella vulgaris* mikroalginin karbohidrat birikiminin üzerine azot limitasyonunun etkisini araştırmışlardır. Kuru ağırlığa göre normalde %16 olan karbohidrat içeriği azot sınırlamasına maruz bırakıldığında % 22.4 olmuştur ( Kyoung vd. 2013 )

Mikroalglerin azot stresi ile muamelesi sonucunda, depolayıcı bileşen olarak nişasta şeklinde hücre içinde karbohidrat miktarı artmıştır (Miranda vd. 2012).

Mikroalgler özellikle, azot sınırlaması altında proteinler gibi azot ihtiva eden makro molekülleri indirgeme eğilimindedir. Bu nedenle, azot limitasyonu mikroalglerin büyük miktarlarda karbohidrat ve yağ biriktirmesine yol açar (Kromkamp 1987).

Buradan yola çıkarak gerçekleştirilen tez çalışmasında, mikroalg hücrelerinin geliştirildiği ortamda bulunan besin maddelerinin farklı konsantrasyonlarının hücrel karbohidrat birikimini araştırmak amacı ile Johnson's besiyerinde bulunan  $KNO_3$ ,  $KH_2PO_4$  ve  $MgSO_4$  besinlerinin farklı konsantrasyonları denenmiştir. Buna göre, litaratürle uyumlu olarak en yüksek etanol ortamda  $KNO_3$  miktarında kısıtlamaya gidilince besiyerine 0 g/l  $KNO_3$  eklendiğinde 1.28 g/l değerinde elde edilmiştir.

#### **5.4 Hidroliz İşleminde Kullanılan Asit Konsantrasyonunun Etanol Konsantrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi**

Mikroalglerden biyoetanol üretimini arttırmak amacıyla, fermentasyon işleminden önce mikroalg hücre duvarında hapsedilmiş karbohidratları basit şekerlere dönüştürmek için bir ön-muamele yöntemi olarak asitle muamele çalışmalarda kullanılmıştır. Biyoetanol üretiminde asit, diğeri ön muamele yöntemlerine göre maliyet etkinliği ve düşük enerji tüketimi gibi avantajlar sağlamaktadır.

Seyreltilmiş asit hidrolizi yöntemi çok yaygın kullanılan bir yöntemdir. Seyreltilmiş asit hidrolizi yoluyla elde edilen yüksek şeker (glükoz) verimi mikroalg bazlı karbonhidratların kimyasal yapılarına bağlıdır. Nişastanın , seyreltik asitler ile kolayca hidrolize edilebilir olduğu bilinmektedir (John vd. 2011) . Temel olarak, mikroalglerde lignin olmadığı için mikroalg selüloz seyreltilmiş asit ile kolayca hidrolize edilebilir gibi görünmektedir. Bu lignoselülozik malzemelere göre çok daha kolay bir biyokütle sakkarifikasyonu sağlar ve fermentasyon için mikroalglerden elde edilen şekerin kullanılması açık bir avantajdır. Fermentasyon işlemi için şeker hammaddesi olarak mikroalglerin kullanımına odaklanılmış az sayıda çalışma vardır. ( Harun vd. 2010 ve John vd. 2011).

Harun vd. (2010) yaptıkları çalışmada, ön-muamele işlemi sırasında, % 10 (h / h) ile % 1 asit konsantrasyonunun değiştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan en küçük asit miktarı,% 1 (h / h) ile en yüksek biyoetanol konsantrasyonu elde edilmiştir. Ön-muamele, 25 dakika boyunca sülfürik asit içinde, 140°C ve % 1 (h / h) 15 g / mikroalg L kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve 7.20 g / L olarak yüksek biyo-etanol konsantrasyonu göstermiştir.

*Tribonema* sp. mikroalginin biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanıldığı çalışmada 50 g/L mikroalg biyokütlesine % 3 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 121°C 45 dakika uygulanmıştır.*Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak hidrolizattan elde edilen 14.5 g/l glukozdan maksimum % 56.1 oranında etanol verimi elde edilmiştir ( Wang vd. 2014).

Ön muamele sırasında daha düşük asit konsantrasyonlarının kullanımı, toksik, paslandırıcı ve tehlikeli kimyasal maddelerin miktarının azaltılması anlamına gelmektedir. Bu reaktör korozyonu azaltır ve çevresel sürdürülebilirliği korur.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında azot kaynağının minimum olduğu besiyerinde pH 6'da 30 gün süre ile geliştirilen 30 g/L mikroalg farklı asit konsantrasyonlarına muamelesi ile elde edilen şekerlerden hazırlanan besi ortamında geliştirilen *S. cerevisiae* mayasına

ait gelişme verilerine göre en yüksek maya gelişimi, algal biyokütle %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile hidroliz edildiğinde 7.03 g/L olarak gözlenmiştir.

### **5.5 Johnson's Besiyerinin pH Değerinin Maya Hücrelerinin Gelişimine Etkisinin Belirlenmesi**

Besin ortamındaki hidronyum iyonu derişimi olan pH, mikroorganizmaların besinlerden yararlanma verimleri üzerinde etkili bir parametredir. Hücre zarından besin transferini sağlayan enzimlerin optimum bir pH değeri vardır. Düşük ve yüksek pH değerleri bu enzimlerinin aktivitelerinin düşmesine sebep olduğu için hücre büyümesini de yavaşlatmaktadır. Ayrıca dış ortamın asidik olması hücre çevresine hidronyum iyonu transferine; bazik olması ise hidroksit iyonu transferine neden olduğu için hücredeki organellerin çalışması olumsuz etkilenir ve hücre gelişimi yavaşlar.

Alglerin bulunduğu ortamın pH'ı alglerin gelişmesine etki ettiği gibi metabolizmalarını da etkilemektedir. Bir deniz türü olan *D. tertiolecta*'nın optimum büyümesi için gerekli olan pH 6'dır. Halofilik türler olan *D. salina* ve *D. tertiolecta*'nın optimum büyümesi yaklaşık olarak pH 9'da gerçekleşmektedir (Borowitzka ve Borowitzka 1988, Kaçka ve Dönmez 2008).

Borowitzka ve Borowitzka 1988'a göre Wegmann ve Metzner (1971)'in yaptığı araştırmada *D. tertiolecta*'nın optimum olarak büyümesi için gerekli olan pH'ın 6 olduğu görülmüştür. Birçok *Dunaliella* türü ise çok geniş pH aralıklarına toleranslı olabilmektedir. Thakur (2000) tarafından yapılan denemelerde pH'ın *Dunaliella salina* türünün gelişimine etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonunda en iyi gelişmenin pH 8'de olduğu görülmüştür.

*Scenedesmus obliquus* kullanılarak yapılan biyoetanol üretiminin araştırılmasına dayalı çalışmada mikroalgin besiyeri pH 7'ye ayarlanmıştır (Miranda vd. 2011).

*D. tertiolecta* (UTEX#: LB999) ile makro ve mikro elementlerin bu mikroalgin gelişimine olan etkisinin araştırıldığı çalışmada besiyeri pH 7.8'e ayarlanmıştır (Chen vd. 2010).

Besiyeri pH değerinin bu hücrelerdeki şekerler ile hazırlanan besiyerlerinde geliştirilen maya hücrelerinin gelişimine etkisini belirlemek amacıyla 6, 7, 8 ve 9 olmak üzere dört farklı pH değerine sahip Johnson's besiyerinde mikroalg hücreleri ototrofik olarak geliştirilmiştir. Algin geliştirildiği besiyeri pH değerinin, maya hücrelerinin gelişiminde önemli bir etkiye sahip olmadığı gözlenirse de pH 8'de geliştirilen alg hücreleri ile hazırlanan besiyerinde en yüksek maya gelişimi 7.47 g/L olarak gözlenmiştir.

### **5.6 Fermentasyon Ortamının pH Değerinin Maya Hücrelerinin Gelişimine ve Etanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi**

Mikrobiyel gelişme ve fermentasyon süreçleri besiyerinin pH değeri ile yakından ilişkilidir. Literatürde yer alan çalışmalarda maya hücrelerinin gelişimi için optimum pH değerinin 5.0-6.5 arasında olduğu gösterilmiştir.

Literatürde, bir mikroalg olan *Chlorella vulgaris*'in hammadde olarak kullanıldığı çalışmada araştırmacılar immobilize maya hücrelerini kullandıkları besi ortamlarının pH değerini %5'e ayarlamışlardır (Kim vd. 2014).

*Dunaliella tertiolecta* ile yapılan başka bir çalışmada ise *S. cerevisiae* hücreleri için enzimatik sakkarifikasyon işleminden sonra besiyerinin pH değeri 6.5'e ayarlanmıştır (Lee vd. 2013).

*Chlorella vulgaris* ile yapılan bir çalışmada ise *S. cerevisiae* hücreleri için besiyerinin pH değeri 4.8'e ayarlanmıştır (Harun vd. 2010).

*Tribonema sp.* mikroalgi ile yapılan biyoetanol üretimi çalışmasında *S. cerevisiae* hücreleri öncelikle pH 5.4'teki besiyerinde geliştirilmiş olup asit hidrolizi sonrasında *S.*

*cerevisiae* hücreleri için besiyerinin pH'sı CaCO<sub>3</sub> kullanılarak 5.5-6 olarak ayarlanmıştır (Hui vd. 2014).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında en düşük hücresel gelişim ve etanol üretimi pH 4'de gözlemlenirken, pH 5 ve 6 değerlerinde elde edilen hücresel gelişim ve etanol konsantrasyonları arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir. En yüksek etanol konsantrasyonu ve hücresel gelişim sırayla 1.23 ve 7.21 g/L olarak pH 5 değerinde elde edilmiştir.

### **5.7 İnokülüm Miktarının Maya Hücrelerinin Etanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi**

Fermantasyon ortamına eklenen maya inokülüm miktarının etanol üretimine etki etmesi beklenmektedir. İnokülüm miktarı arttıkça etanol konsantrasyonu da artacaktır. Buradan yola çıkarak gerçekleştirilen tez çalışmasında fermantasyon ortamına eklenen maya miktarının etanol üretimine etkisinin araştırılması amacıyla 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 ve 3 ml inokülüm miktarları toplam hacim 5 ml olacak şekilde denendiğinde en düşük etanol üretimi 0.25 ml inokülüm miktarında 0.33 g/l iken, en yüksek etanol verimine 3 ml inokülüm miktarında 7.26 g/l etanol elde edilerek ulaşılmıştır.

*Phormidium* sp. İle yapılan siyanobakteriyel fermentasyon çalışmasında *S. cerevisiae* ve *P. stipitis* mayaları kullanılmıştır. 5 ml siyanobakteriyel şeker içeren distile su ile pH 4'te hazırlanmış olan anaerobik fermantasyon ortamına % 10 maya süspansiyonu transfer edilmiştir (Karatay 2014 )

Tek hücreli, yağlı, iplikli mikroalg *Tribonema* sp'den elde edilen hidrolize edilmiş biyokütle ile *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak biyoetanol üretilmiştir. Çalışmada sterilize edilmiş hidrolizat solüsyonuna transfer edilen mayanın inokülüm miktarı % 10'dur.

Ho vd. 2013'te yaptıkları çalışmada, *Chlorella vulgaris* FSP-E mikroalginin biyokütlesinden fermantasyon çalışmalarında *Zymomonas mobilis* kullanarak etanol

üretimi gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada kullanılan *Zymomonas mobilis*'in inokülüm miktarı mikroalgden elde edilen besiyeri miktarı ile 1: 10 v/v oranında transfer edilmiştir (Ho vd. 2013).

Gerçekleştirilen araştırma sonucunda elde edilen verilerden anlaşıldığı üzere inokülüm miktarındaki artış etanol üretiminde de artışa neden olmaktadır.

## 6. SONUÇ

Son yıllarda mikrobiyel biyokütlenin yenilenebilir enerji üretiminde hammadde olarak kullanımına ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar arasında dikkat çeken kısmı “ üçüncü nesil biyoyakıtlar” olarak da tabir edilen fotosentetik mikroorganizmalardan enerji eldesi oluşturmaktadır. Üçüncü nesil biyoyakıtlar arasında da denizler gibi tuzlu ortamlarda gelişebildikleri için halofil özellikteki mikroalgler ön plana çıkmaktadır.

Gerçekleştirilen tez çalışması sonucunda elde edilen veriler, yerli izolat olan halofil özellikteki *Dunaliella* türlerinin biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılabilmesini göstermektedir. Tez çalışması kapsamındaki deneyler laboratuvar ölçeğinde gerçekleştirilmiştir. *Dunaliella* mikroalginin deniz suyu içeren ortamda büyük çapta geliştirilebilmesi için katkı sağlayan bir çalışma olmuştur.

Türkiye'nin enerji ve yakıt ihtiyacı bakımından dışarı bağımlı bir ülke olduğu ve bunun azaltılmasının ülkemizin stratejik politikası olduğu da dikkate alınır, yerel kaynaklardan biyoetanol üretiminin bu bağımlılığı azaltmaya yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışması ile, tarımsal atıklara alternatif olarak yerli *Dunaliella* izolatlarından elde edilen şekerlerin biyoetanol üretiminde kullanılması, tarım için ayrılan alanlar kullanılmadan, üçüncü nesil biyoetanol üretiminde alternatif olarak halofil alglerden olan ve gıda olarak tüketilmeyen söz konusu mikroalgin hammadde olarak kullanımı hem ülke ekonomisine hem de literatüre katkı sağlamıştır.

Gerçekleştirilen bu tez çalışması ile halofil *Dunaliella* alginin denizlerle çevrili ülkemizde pratik ve ekonomik bir şekilde büyük çapta geliştirilebileceği için ticarileşme potansiyelinin olduğunun gösterilerek, ülkemiz ekonomisine katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Agbogbo, F.K. and Coward-Kelly, G. 2008. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett* 30(9); 1515-1524.
- Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., and Negro M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review *Bioresour. Technol.*, 101; 4851–4861
- Avcı A. and Dönmez S. 2006. Effect of zinc on ethanol production by two *Thermoanaerobacter* strains. *Process Biochemistry*. 41; 984–989. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/07/20120707.htm>, Erişim tarihi: 30.01.2013
- Bala, M. and Balat, H. 2009. Bioethanol as a vehicular fuel: a critical review *Energy Sources Part A*, 31; 1242–1255
- Ben-Amotz, A. and Avron M. 1973. Role of glycerol in osmotic regulation of halophilic alga *Dunaliella parva* *Plant Physiol*, 51; 875–878
- Bensah, E.C. and Mensah M. 2013. Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: technologies and innovations *Int. J. Chem. Eng.*, 2013; 1–21
- Biller, P. and Ross, A.B. 2011. Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content *Bioresour. Technol.*, 102; 215–225
- Bondioli P., Della Bella, L., Rivolta, G., Chini Zittelli, G., Bassi N., Rodolfi L., Casini, D., Prussi, M., Chiaramonti, D. and Trevisan M.R. 2012. Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33 *Bioresour. Technol.*, 114; 567–572
- Brown, M.R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 145; 79–99
- Cardona, C.A. and Sánchez O.J. 2007. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities *Bioresour. Technol.*, 98; 2415–2457
- Chen, C.-Y., Zhao X.-Q., Yen H.-W., Ho S.-H., Cheng C.-L., Lee D.-J., Bai F.-W. and Chang J.-S. 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production *Biochem. Eng. J.*, 78: 1–10



- Choi, J.A., Hwang, J.H., Dempsey, B.A., Abou-Shanab, R.A.I., Min, B., Song, H., Lee, D.S., Kim, J.R., Cho, Y., Hong, S. and Jeon, B.H. 2011. Enhancement of fermentative bioenergy (ethanol/hydrogen) production using (ethanol/hydrogen) production using ultrasonication of *Scenedesmus obliquus* YSW15 cultivated in swine wastewater effluent Energy Environ. Sci., 4; 3513–3520
- Choi, S.P., Nguyen M.T. and Sim S.J. 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production Bioresour. Technol., 101; 5330–5336
- Colucci, J.A., Borrero, E.E. and Alape, F. 2005. Biodiesel from an alkaline transesterification reaction of soybean oil using ultrasonic mixing J. Am. Oil Chem. Soc., 82; 525–530
- Dale, B.E. 2007. Thinking clearly about biofuels: ending the irrelevant ‘net energy’ debate and developing better performance metrics for alternative fuels Biofuels, Bioprod. Biorefin., 1; 14–17
- Demirbaş, A. 2000. Conversion of biomass using glycerin to liquid fuel for blending gasoline as alternative engine fuel Energy Convers. Manage., 41; 1741–1748
- Demirbaş, A. 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass Energy Sources, 27; 327–337
- Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A. and Teixeira, J.A. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae, Applied Energy 88; 3331–3335
- Fidalgo, J.P., Cid, A., Torres, E. S and Ukenik, A. 1198. Herrero 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; 105–116
- Goh, C.S. and Lee, K.T. 2010. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development Renewable Sustainable Energy Rev., 14; 842–848
- Goo, B.G., Baek, G., Choi, D.J., Park, Y., Synytsya, A., Bleha, R., Seong, D.H., Lee, C.G. and Park, J.K. 2013. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta* Bioresource Technology, 129; 343-350.

- Gunesakaran, P. and Raj K.C. 1999. Ethanol fermentation technology: *Zymomonas mobilis*. *Curr Sci India* 77; 56-68
- Guo, H., Daroch, M., Liu, L., Qiu, G., Geng, S. and Wang, G. 2013. Biochemical features and bioethanol production of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta. *Bioresource Technology*, 127; 422-428
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G. Zacchi, G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.*, 24; 549–556
- Harun, R. and Danquah, M.K. 2011. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chem. Eng. J.*, 168; 1079–1084
- Harun, R. and Danquah, M.K. 2011. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production, *Process Biochemistry* 46; 304–309
- Harun, R., Jason, W.S.Y., Cherrington, T. and Danquah, M.K. 2011. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production, *Applied Energy* 88; 3464–3467
- Ho S.H., Huang S.W., Chen C.Y., Hasunuma T., Kondo A. and Chang J.S. 2012. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock, *Bioresource Technology*, article in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.10.015>
- Huang, C.F., Lin, T.H., Guo, G.L. and Hwang, W.S., 2009. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. *Bioresource Technol* 100(17); 3914-3920.
- Jaime, L., Mendiola, J.A., Ibáñez, E., Martín-Álvarez, P.J., Cifuentes, A., Reglero, G. and Señoráns, F.J. 2007.  $\beta$ -Carotene isomer composition of sub- and supercritical carbon dioxide extracts. Antioxidant activity measurement. *J. Agric. Food Chem.*, 55; 10585–10590
- Jeon, B.H., Choi, J.A., Kim, H.C., Hwang, J.H., Abou-Shanab, R.A.I., Dempsey, B.A., Regan, J.M. and Kim J.R. 2013. Ultrasonic disintegration of microalgal biomass and consequent improvement of bioaccessibility/bioavailability in microbial fermentation. *Biotechnol. Biofuels*, 6; 37
- Karatay, S. E. 2014 Usage of thermophilic cyanobacterial biomass for bioethanol production, *Sustainable Energy*, 10; 1002
- Karatay, S.E. and Dönmez, G. 2011. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. *Applied Energy*, 88; 3632-3635.

- Kim, K.H., Choi, I.S., Kim, H.M., Wi, S.G. and Bae, H.J. 2014. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation *Bioresour. Technol.*, 153; 47–54
- Kim, N.J., Li, H., Jung, K., Chang, H.N and Lee, P.C. 2011. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11 *Bioresour. Technol.* 102; 7466–7469
- Kitada, K., Machmudah, S., Sasak,i M., Goto, M., Nakashima, Y., Kumamoto, S. and Hasegawa, T. 2009. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris* *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84; 657–661
- Lam, M.K. and Lee, K.T. 2012. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnology Advances* 30; 673–690.
- Lee, S., Oh, Y., Kim, D., Kwon, D., Lee, C. and Lee J. 2011, Converting Carbohydrates Extracted from Marine Algae into Ethanol Using Various Ethanolic *Escherichia coli* Strains, *Appl Biochem Biotechnol* 164; 878–888
- Lee. T.Y., Kim. M.D., Kim. K.Y., Park. K., Ryu. Y.W. and Seo. J.H. 2000. A parametric study on ethanol production from *Pichia stipitis*, *Biotechnol. Bioprocess*, 5; 27-31.
- Liang, Y., Sarkany, N. and Cui, Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions *Biotechnol Lett*, 31; 1043–1049
- Lin, Y. and Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects *Appl Microbiol Biotechnol*, 69; 627–642
- Luo, J., Fang, Z. and Smith, Jr. R.L. 2014. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels *Prog. Energy Combust. Sci.*, 41; 56–93
- Luque, R., Herrero-Davila, L., Campelo, J.M., Clark, J.H., Hidalgo, J.M. and Luna, D. 2008. Biofuels: a technological perspective *Energy Environ Sci*, 1; 542–564
- Markou, G., Angelidaki, I. and Georgakakis, D. 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 96; 631–645

- Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 14; 217–232
- Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P. and Palavra, A.F. 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae *Inorganica Chimica Acta*, 356; 328–334
- Miranda, J.R., Passarinho, P.C. and Gouveia, L. 2012, Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 104; 342-348.
- Miranda, J.R., Passarinho, P.C. and Gouveia, L. 2012. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96; 555–564
- Montesinos, T. and Navarro, J.M. 2000. Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae* Enzyme. *Microb. Technol.* 27; 362–370
- Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K. Dalai, A.K. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 14; 578–597
- Navarro, A.R., Sepulveda, M.C. and Rubio, M.C. 2000. Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses *Waste Manage*, 20; 581–585
- Nguyen, M.T., Choi, S.P., Lee, J., Lee, J.H. and Sim, S.J. 2009. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production *J Microbiol Biotechnol*, 19; 161– and 166
- Nigam, P.S. and Singh, A. 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources *Prog. Energy Combust. Sci.*, 37; 52–68
- Olofsson, K., Bertilsson, M. and Lidén, G. 2008. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks *Biotechnol. Biofuels*, 1; 1–14

- Phukan, M.M., Chutia, R.S., Konwar, B.K. and Kataki, R. 2011. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock Appl. Energy, 88; 3307–3312
- Piškur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A. and Compagno, C. 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? Trends Genet., 22 (2006), pp. 183–186
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A. and Posewitz, M.C. 2010. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production Eukaryot. Cell, 9; 486–501
- Richardson, S., Nilsson, G.S., Bergquist, K.E., Gorton, L. and Mischnick, P. 2000. Characterisation of the substituent distribution in hydroxypropylated potato amylopectin starch Carbohydr. Res., 328; 365–373
- Rodjaroen, S., Juntawong, N., Mahakhant, A. and Miyamoto, K. 2007. High Biomass production and starch accumulation in native green algal strains and cyanobacterial strains of Thailand Kasetsart. J. Nat. Sci. 41; 570–575.
- Sawangkeaw, R., Bunyakiat, K. and Ngamprasertsith, S. 2010. A review of laboratory-scale research on lipid conversion to biodiesel with supercritical methanol (2001–2009) J. Supercrit. Fluids, 55; 1–13
- Schultz-Jensen, N., Thygesen, A., Leipold, F., Thomsen, S.T., Roslander, C., Lilholt, H and Bjerre, A.B. 2013. Pretreatment of the macroalgae *Chaetomorpha linum* for the production of bioethanol – comparison of five pretreatment Technologies Bioresour. Technol., 140; 36–42
- Song, D., Fu, J. and Shi, D. 2008. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel Chin. J. Biotechnol., 24; 341–348
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review Bioresour. Technol., 83; 1–11
- Taherzadeh, M.J. and Karimi, K. 2007. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol BioResources, 2; 707–738
- Tedesco, S., Marrero, Barros, T. and Olabi, A.G. 2014. Optimization of mechanical pretreatment of *Laminariaceae* spp. biomass-derived biogas Renew. Energy, 62; 527–534

- Tengborg, C., Galbe, M., and Zacchi, G. 2001. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood Enzyme Microb. Technol., 28; 835–844
- Tredici M.R. 2010. Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution Biofuels, 1; 143–162
- Van Der Maarel, M.J.E.C., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family J. Biotechnol., 94; 137–155
- Vyas, A.P., Verma, J.L. and Subrahmanyam, N. 2010. A review on FAME production processes Fuel, 89; 1–9
- Wang H. and Ji C., Chen L. 2014. Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp., Bioresource Technology, 172; 169-173
- Xiros, C., Topakas, E. and Christakopoulos, P. 2013. Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production WIREs Energy Environ., 2; 633–654
- Zhao, X. Chen, L. Wang, S. Zhou, H. Feng, W.N. Chen and R. Lau. 2013. Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation Bioresour. Technol., 128; 337–344

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Meltem ERDOĞAN

Doğum yeri : Afşin

Doğum Tarihi : 19.05.1984

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

### **Eğitim Durumu ( Kurum ve Yıl )**

Lisans : Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2008)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı ( 2015 )