



CO₂ DERİŞİMİNİN VE AZOT STRESİNİN CHLORELLA VULGARİS MİKROALG KÜLTÜRÜNÜN CO₂ TUTMA VERİMİNE ETKİSİ

Gamze AKGÜL, Murat VAROL*, Ayça ERDEM ÜNŞAR

Akdeniz Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 07058, Antalya, Türkiye

Anahtar Kelimeler

CO₂ Tutma,
Mikroalg,
Baca Gazı,
Azot Stresi,
Biyodizel.

Öz

Baca gazındaki CO₂ gazının mikroalglerle tutulması küresel ısınmayla mücadele bakımından önemlidir. Bu çalışmada; farklı CO₂ derişimlerinin (hacimce 400 ppm, %15 ve %90) ve azot stresinin Chlorella vulgaris mikroalg kültürünün CO₂ tutma verimine etkisi incelenmiştir. Çalışmada, 5 cm iç çapa sahip, 100 cm yüksekliğinde pleksiglastan yapılmış fotobiyoreaktör kullanılmıştır. CO₂ tutma verimi açısından en iyi sonucu veren CO₂ derişimi belirlenmiş ve bu şartlar altında, mikroalg kültürü azot stresine maruz bırakılarak bünyesindeki lipit oranının nasıl değiştiği incelenmiştir. Mikroalg kültürü için en iyi büyüme değerleri %15 CO₂ içeren gaz karışımı altında elde edilmiştir. Fotobiyoreaktöre verilen gaz karışımındaki CO₂ oranı %90'a çıkarıldığında alg hücrelerinin inhibe olduğu gözlemlenmiştir. Yüksek CO₂ derişimlerinde ortamın tamponlanması ve ortama verilen CO₂ derişiminin kademeli olarak artırılması gerekmektedir. %15 CO₂ derişiminde %100 azot stresinde fotobiyoreaktörde büyüme gerçekleşmemiştir. Bu nedenle azot stresi (%100 ve %75) deneylerine erlenmeyerde 400 ppm_v CO₂ derişimi altında devam edilmiştir. %75 azotsuz ortamda %100 azotsuz ortama göre 1,3 kat daha iyi büyüme verimi elde edilmiştir. Ayrıca, %75 azotsuz deneyde %100 azotsuz ortama göre 2,5 kat daha yüksek RuBisCO oranı belirlenmiştir. %100 azotsuz deneyde ise %75 azotsuz ortama göre 1,2 kat daha yüksek lipit oranı elde edilmiştir.

EFFECT OF CO₂ CONCENTRATION AND NITROGEN STRESS ON CO₂ CAPTURE EFFICIENCY OF CHLORELLA VULGARIS MICROALGAE CULTURE

Keywords

CO₂ Capture,
Microalgae,
Flue Gas,
Nitrogen Stress,
Biodiesel.

Abstract

CO₂ capture in the flue gas by microalgae is important in terms of global warming. The effect of CO₂ concentration and nitrogen stress on CO₂ capture efficiency of Chlorella vulgaris microalgae culture in this study. A photobioreactor with 5 cm inner diameter and 100 cm height was used for the tests. CO₂ concentration that gives the best results in terms of CO₂ capture efficiency was determined and under this condition, microalgae culture was exposed to nitrogen stress and the lipid ratio in its structure was examined. The maximum growth was achieved at 15% CO₂. The growth was hindered when CO₂ was increased to 90%. At high CO₂, the medium should be buffered and CO₂ should be gradually increased. The growth was inhibited at 15% CO₂ under nitrogen stress in the photobioreactor. Therefore, nitrogen stress tests (100% ve 75%) were conducted in an erlenmeyer flask at 400 ppm_v CO₂. It was determined that there was a better growth under 75% nitrogen stress (1.3 times higher) compared to 100% nitrogen stress. Moreover, RuBisCO for 75% nitrogen stress was 2.5 times higher than %100 nitrogen stress. However, lipid content was 1.2 times higher for 100% nitrogen stress compared to the 75% nitrogen stress.

Alıntı / Cite

Akgül, G., Varol, M., Erdem-Ünşar, A. (2022). CO₂ Derişiminin ve Azot Stresinin Chlorella Vulgaris Mikroalg Kültürünün CO₂ Tutma Verimine Etkisi, Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi, 10(2), 698-721.

* İlgili yazar / Corresponding author: mvarol@akdeniz.edu.tr, +90-242-310-6332

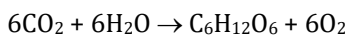
Yazar Kimliği / Author ID (ORCID Number)	Makale Süreci / Article Process	
G. Akgül, 0000-0003-0119-6845	Başvuru Tarihi / Submission Date	14.11.2021
M. Varol, 0000-0002-4869-3315	Revizyon Tarihi / Revision Date	09.12.2021
A. Erdem Ünşar, 0000-0003-3296-1247	Kabul Tarihi / Accepted Date	17.12.2021
	Yayın Tarihi / Published Date	30.06.2022

1. Giriş (Introduction)

Dünya enerji ihtiyacının çok büyük bir kısmı fosil yakıtlardan sağlanmakta ve bunun sonucunda atmosfere başta CO₂ olmak üzere birçok kirlenici gaz salınmaktadır. CO₂ emisyonlarının yaklaşık olarak %85'i fosil yakıtların kullanılmasından kaynaklanmaktadır (Menteşe ve Çotuker, 2021). Sera gazları arasında CO₂, atmosferdeki derişimi insan faaliyetleri sonucu en çok artan gazdır. 1980 yılında 340 ppm düzeyinde olan atmosferdeki küresel CO₂ derişimi, Haziran 2021 itibariyle 419,05 ppm seviyelerine çıkmıştır (NOAA 2021). Dünya genelinde fosil yakıtların yakılmasından kaynaklanan CO₂ emisyonları 1973 yılında 15,5 Giga ton (Gt) iken 46 yıllık bir zaman diliminde %100'ün üzerinde bir artışla 2018 yılında 35 Gt'a ulaşmıştır (IEA 2017). Türkiye'nin toplam sera gazı emisyonları (CO₂ eşdeğeri-2019 yılı) 506,1 Milyon ton'dur (TÜİK 2021). Bu emisyonların %72'si enerji sektöründen kaynaklanmakta, CO₂ ise toplam sera gazı emisyonlarının %78,9'unu oluşturmaktadır (TÜİK 2021). Ülke özelinde olmakla birlikte küresel anlamda da, gelecek nesillere sağlıklı ve yaşanabilir bir dünya bırakmak adına içinde yaşadığımız yüzyılın en önemli konusu atmosfere verilen başta CO₂ olmak üzere küresel ısınmaya neden olan sera gazlarıdır. Gerek nüfus artışı gerekse refah düzeyindeki artış özellikle ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerin enerji ihtiyacını arttırmaktadır. Enerji talebindeki artışa rağmen sera gazı emisyonlarının azaltılmasına yönelik stratejilerin ve teknolojilerin geliştirilmesi küresel ısınma ile mücadelede hayati bir önem taşımaktadır. CO₂ emisyonlarının azaltılması küresel ısınmanın etkilerinin asgari düzeyde tutulması için oldukça önemlidir. Bu durum, mevcut tesislerden kaynaklanan ya da yeni kurulacak tesislerden kaynaklanacak olan CO₂ emisyonlarını azaltmak için gelecek vadeden teknolojilerin kullanılmasını zaruri kılmaktadır.

Atmosfere verilen CO₂ emisyonlarının azaltılması için 3 temel seçenek mevcuttur. Bunlardan ilki enerjinin verimli kullanılması, ikincisi enerji üretiminde fosil yakıtlar yerine alternatif ve yenilenebilir kaynakların tercih edilmesi, üçüncü seçenek ise baca gazında CO₂ gazını tutacak ve ayrıştırarak teknolojilerin geliştirilmesidir. Baca gazındaki CO₂ emisyonlarının azaltılmasını amaçlayan stratejilerden birisi Karbon Tutma ve Depolama (KTD) teknolojisinin geliştirilmesi ve yaygınlaştırılmasıdır (Míguez vd. 2018). KTD teknolojileri, güç santralleri ve endüstriyel tesisler gibi noktasal kaynaklardan kaynaklanan CO₂ emisyonlarının azaltılmasında önemli bir rol oynayabilir. CO₂ gazının baca gazından ayrıştırılması; soğurma (absorption), bir yüzey üzerinde tutma (adsorption), membrane filtre ile ayırma (membrane separation), kriyojenik damıtma (cryogenic distillation) ve biyolojik olarak tutma (mikroalglerin kullanımı) gibi uygulamaları içermektedir (Míguez vd. 2018).

Biyolojik olarak baca gazındaki CO₂ gazını tutma uygulamalarında mikroalglerin kullanılması biyoyakıt üretimi yönünden yeni bir yöntemdir. Özellikle biyodizel ve biyoetanol gibi biyoyakıtların üretiminde, diğer kaynaklara kıyasla mikroalgler daha dikkat çekici bir konumdadır. Günümüzde kullanılan biyoyakıt üretim yöntemlerinin, yüksek miktarda arazi alanlarına ihtiyaç duymasının yanısıra tarımsal yönden kullanılmayan arazilerde bile alg üretim tesislerinin kurulma imkanının olması ve tarımsal üretimin engellenmemesi mikroalgleri bu konuda benzersiz bir alternatif olarak öne çıkarmaktadır (Ullah vd. 2014). Mikroalgler, doğal su kaynaklarında ya da tuzlu sularda yaşayabilen tek hücreli ve klorofil içeren canlılardır. Kökleri, gövdeleri ve yaprakları yoktur. Mikroalgler, fotoototrof beslenme yoluyla atmosferdeki CO₂ gazını enerji kaynağı olarak kullanırlar. Fotosentez, klorofil içeren organizmaların besin ihtiyaçlarını karşılamak için güneş ışığını kullanarak CO₂ ve H₂O gibi inorganik bileşiklerden organik bileşiklerin üretilmesi olayıdır (Tepkime 1). Fotosentez yoluyla organizmalar güneş enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürürken, CO₂ gazını da bünyelerine dahil ederek atmosferden uzaklaştırırlar. Bu prensipten yola çıkarak, baca gazının doğrudan klorofil içeren organizmalara verilmesiyle baca gazındaki CO₂ gazının uzaklaştırılması mümkündür. Fakat karasal bitkiler tarafından gerçekleştirilen fotosentez yoluyla CO₂ gazının bacadan uzaklaştırılması işlemi oldukça yavaştır, çünkü karasal bitkilerin fotosentez için güneş enerjisini kullanabilme verimliliği sadece %0,2 civarındadır (Nakamura vd. 2003). Mikroalgler ve fotosentez yapabilen bakteriler (cyanobacteria) yüksek büyüme hızları nedeniyle karasal bitkilere oranla atmosferdeki karbonu bünyelerine daha hızlı alabilmektedirler (Goli vd. 2016). Birçok mikroalg bünyesinde karbonik anhidraz enzimi barındırır. Bu enzim, yavaş bir tepkime olan CO₂ gazının bikarbonata (HCO₃⁻) dönüşümü tepkimesini hızlandırır (Míguez vd. 2018). Bu sayede, güneş enerjisini kullanabilme verimliliği dış ortamda bulunan bazı mikroalgler için %5'lere kadar çıkabilmektedir (Nakamura vd. 2003).



(Tepkime 1)

Besin ihtiyacının ve ışık gereksiniminin kapalı sistemlerde sağlandığı kontrollü şartlarda (fotobiyoreaktörlerde) mikroalglerin CO₂ gazını tutma oranının bir ağaca göre 10 kat daha fazla olduğu belirtilmektedir (Usui ve

Ikenouchi 1997). Mikroalg kütlelerinin yaklaşık olarak %50'si (kuru bazda) karbondur. Mikroalg kütleindeki karbonun tamamı atmosfer kaynaklı olmak üzere CO₂ gazından gelmektedir. 100 kg mikroalg üretimi esnasında atmosferden yaklaşık 183 kg CO₂ gazı uzaklaştırılabilmektedir (Chisti 2007).

2. Kaynak araştırması (Literature survey)

Literatürde farklı CO₂ derişimine sahip gaz karışımlarının kullanıldığı mikroalg kültürleri kullanılarak gerçekleştirilen CO₂ giderimi çalışmaları mevcuttur. Morais ve Costa (2007) bir güç santralinin atık havuzundan izole ettikleri iki mikroalg türünün (*Scenedesmus obliquus* ve *C. vulgaris* kessleri) farklı CO₂ derişimindeki (%6, 12 ve 18) büyüme davranışlarını araştırmışlardır. Chiu vd. (2011) bir çelik fabrikasının baca gazı (%25 CO₂ içeren) ile yüksek sıcaklığa ve yüksek CO₂ gazına toleransı fazla olan bir *C. vulgaris* türü (*C. vulgaris* sp. MTF-7) yetiştirmişler, türün CO₂, SO₂ ve NO giderimini incelemişlerdir. Taştan vd. (2013) çalışmalarında bir siyanobakteri (*Phormidium* sp.) ve bir mikroalg (*C. vulgaris* sp.) kültürlerinin egzoz emisyonuna maruz bırakıldığında, TRIA ve salisilik asit kimyasallarının kültürlerin büyüme oranlarına nasıl etki ettiğini incelenmiştir. Taştan vd. (2016) *C. vulgaris* sp. kültürünün TRIA ve NaHCO₃ kullanılarak büyüme veriminin iyileştirilmesi üzerine bir inceleme yapmışlardır. Aslam vd. (2017) kömür yakan bir termik santralin %11 CO₂ içeren baca gazını doğrudan karışık bir mikroalg kültürüne vererek, kültürün adaptasyonunu incelemişlerdir. Sadeghizadeh vd. (2017) bir fotobiyoreaktörde yetiştirilen *C. vulgaris* mikroalg kültürünün farklı gaz hızlarında havadan CO₂ tutması üzerine bir araştırma yapmışlardır. Dukarte vd. (2017), mikroalg *Chlorella fusca* LEB 111'i %10-12 CO₂ derişimi altında yetiştirmişlerdir. Sistemde gaz akış hızı 0,05 vvm (vvm: sisteme verilen toplam gaz debisinin çözeltili hacmine oranı) olarak ayarlanmıştır. Kömür baca gazı biyofiksasyonundan elde edilen maksimum günlük CO₂ tutma verimi ve spesifik büyüme oranı, sırasıyla, 360,12±0,27 mg L⁻¹ gün⁻¹ ve 0,17 ±0,01 gün⁻¹ olarak rapor edilmiştir. García-Cubero vd. (2017), çalışmalarında *C. vulgaris* UAM 9-88 suşunu %1, 3, 6, 8, 10 ve 12 CO₂ içeren baa gazında yetiştirmişlerdir. Fotobiyoreaktör yüzeyindeki aydınlatma şiddeti maksimum 3000 µmol m⁻² s⁻¹ (222 000 lux) olarak ölçülmüş ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık aydınlatma süresinde deneyler gerçekleştirilmiştir. pH'ın sabitlenmediği %1 ile %10 CO₂ derişimlerinin tümünde kararlı bir duruma ulaşılmış ve kültürlerden 0,4-0,5 g L⁻¹ gün⁻¹ aralığında biyokütle değerleri elde edilmiştir. CO₂ tutma veriminin 0,8-1 g L⁻¹ gün⁻¹ olduğu belirlenmiştir. %12 CO₂ derişimlerinde yapılan deneylerde büyüme inhibe olmuştur. %1 ile %10 CO₂ derişimlerinde elde edilen biyokütleden ≥%40 oranlarında protein ve ≥%25 oranında lipit bileşimleri elde edilmiştir. Literatürde incelenen çalışmalarda ortam havası (400 ppm_v CO₂) ya da geleneksel baca gazı (%10-15 CO₂ içeren baca gazı) başta olmak üzere %0,04-25 aralığında CO₂ içeren gaz karışımlarının araştırıldığı görülmüştür. Ancak, yüksek oranda CO₂ içeren Oksi-Yanma şartlarının (%90 CO₂ içeren baca gazı) denendiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Mikroalglerin fotosentez verimleri, dolayısıyla büyüme hızları yüksektir. Ayrıca ürettiği lipit miktarı nedeniyle de biyodizel eldesi için alternatif bir yakıt olarak görülmektedir (Ahmad vd. 2011; Chen vd. 2011, Mata vd. 2010). Mikroalglerin ürettikleri lipitlerin kimyasal yapıları bitkisel yağların kimyasal yapılarına benzemektedir. Bu benzerlik biyodizel yönünden alternatif bir kaynak olarak görülmektedir. Biyodizelin yanması sonucunda meydana gelen CO₂ yine biyodizelin elde edildiği mikroalgler tarafından tekrar kullanılma avantajına sahiptir. Bu önemli avantajın etkisiyle, atık oluşumunda ciddi oranda azalma olmakta ve üretilen biyodizelin sürdürülebilir enerji kaynağı yönünden çevre dostu ve alternatif bir enerji kaynağı olduğu ortaya çıkmaktadır (Öğüt ve Oğuz 2006). Mikroalg kaynaklı lipitlerden biyodizel üretimi, gelecekte petrol kaynaklı yakıtlara sürdürülebilir bir alternatif oluşturduğu için enerji üretiminde önemli bir yer tutma potansiyeline sahiptir. Biyodizel, dizel bir yakıtta göre, yandığında %78 daha az CO₂, %98 daha az SO₂ ve %50 daha az parçacık madde emisyonları oluşmaktadır (Brown ve Zeiler 1993). Düşük emisyonları nedeniyle biyodizel kullanımı sürdürülebilir çevre bakımından önemli bir seçenek olarak görülmektedir (Yıldız ve Çalışkan, 2020). Lipit ihtivasi mikroalg türüne göre çeşitlilik göstermekle birlikte, stres şartlarında belirli türlerde lipit değeri %90 seviyesine çıkabilmektedir (Amaro vd. 2011).

Mikroalg gelişimi açısından azot, karbondan sonra biyokütle üretimini artırma yönünden en önemli ikinci besin kaynağı olarak görülmektedir. Biyokütlenin yaklaşık olarak %10'undan fazlası azottan oluşabilmektedir. Mikroalglerde lipit birikimi genellikle mikroalgler stres koşulları altında (örneğin azot sınırlaması/azot açlığı/azot azlığı (azot stresi), besin eksikliği, pH varyasyonları, vb.) yetiştirildiğinde meydana gelir. Bu stres koşulları arasında azot stresi, mikroalglerde lipit birikimini arttırmak için en etkili ve yaygın olarak kullanılan bir stratejidir. Kültür ortamında oluşturulan azot stresi nedeniyle biyokütle üretiminde azalma olurken, lipit üretiminde artış gerçekleşmektedir (Yaakob vd. 2021). Stres ortamında bu artışın temel sebebi; çoğunlukla mikroalg hücrelerinde depolama molekülleri olarak görev yapan triasilgliserol (TAG) birikiminin gerçekleşmesidir (Miranda vd. 2015).

C. vulgaris mikroalgi oldukça yüksek oranda klorofil pigmenti içermektedir. Her bir klorofil molekülünün yapısında 4 azot atomu içeren, azot yönünden zengin bir bileşik bulunmaktadır. Kültür ortamında azot tükendiğinde ya da alg yetiştirme öncesinde besiyerindeki azot kaynağı azaltıldığında, alg kültüründe azot stresi meydana gelir. Alg hücreleri, hücre bölünmelerini sağlayabilmeleri için azota ihtiyaç duyarlar. Azot stresi yaşanan

ortamda büyüebilmek için, mikroalgler yapılarında bulunan azot havuzunu (klorofil molekülündeki azotları) tüketmeye başlarlar. Yapılarındaki azotu kullandıkça, fotosentez sonucunda protein yerine lipid üretimi gerçekleşir. Bu strese uyum gösterme özellikleri, lipid üretiminin temel işlevini oluşturmaktadır (Li vd. 2008).

Baca gazından CO₂ gazının mikroalg kullanılarak, biyolojik olarak uzaklaştırılmasında elde edilecek verim; kullanılan mikroalg kültürü, reaktör tipi (açık havuz, fotobiyoreaktör), CO₂ gazı derişimi, gaz akış hızı, aydınlatma şiddeti, pH, sıcaklık, besiyeri gibi farklı parametrelere bağlıdır (Sadeghizadeh vd. 2017). Baca gazından CO₂ gazının uzaklaştırılması için farklı alg türleri kullanılmıştır. Alg türleri arasında *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) yüksek CO₂ derişimlerini tolere edebilme ve yüksek büyüme hızı gibi özellikleri nedeniyle CO₂ tutmak için kullanılabilir iyi bir tür olarak görülmektedir (Sadeghizadeh vd. 2017). *C. vulgaris*, *Chlorella* türleri (*C. vulgaris* sp. H84, *C. vulgaris* sp. A2, *C. vulgaris* sorokiniana UTEX 1230, *C. vulgaris* ve *Pyrenoidosa*) arasında en yüksek büyüme oranı göstermiştir (Jeong vd. 2003). *C. vulgaris* mikroalginin sadece klorofil-a ve klorofil-b içermesi, fotosentez sonucunda yapısında çoklu doymuş lipid asitlerini biriktirmesini sağlamaktadır. Biyodizel üretiminde doymamış yağlar, yağlanma ortamına ilave edilerek ortamın polimerizasyonu arttırdığı için motoru tahrip edip, viskoziteyi arttırıcı etki yaratmaktadır (Yusuf vd. 2011). Bu durumun önlenmesi açısından ise doymamış yağların doymun hale getirilmesi gerekir, ki bu da oldukça maliyetli bir işlemdir. Bu nedenlerden dolayı *C. vulgaris*'ten elde edilen doymuş lipid asitleri hem maliyet hem de verim açısından avantajlı bir biyodizel kaynağı olarak ön plana çıkmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, çalışmada mikroalg olarak *C. vulgaris* kullanılmasına karar verilmiştir.

Çalışmada dikey bir fotobiyoreaktörde yetiştirilen *C. vulgaris* mikroalg kültürünün CO₂ tutma veriminin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çalışma kapsamında CO₂ gazı derişiminin (hacimce 400 ppm, %15 ve %90) *C. vulgaris* mikroalg kültürünün büyüme verimine etkisinin incelenmesi ve kültürün büyüme verimi bakımından en iyi değerin belirlenmesi hedeflenmektedir. Büyüme verimi bakımından en iyi sonuçları veren değışken parametre şartlarında *C. vulgaris* mikroalg kültürü azot stresine maruz bırakılarak azot stresinin lipid üretimine etkisinin incelenmesi de çalışmanın bir diğere hedefidir. Bu kapsamda, her bir deney için fotobiyoreaktörden 24 saatte bir numune alınmıştır. Alınan numunelerde pH, sıcaklık, optik yoğunluk, kuru ağırlık (g/L), klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid ölçümleri yapılmıştır. Yapılan analizler neticesinde her bir deney için mikroalg üreme verimliliği (P_t, g (kuru ağırlık)/L/gün), maksimum spesifik büyüme oranı, (μ_{max} , 1/gün) ve CO₂ tutma verimi (R_{CO2}, g CO₂/L/gün) hesaplanmıştır.

3. Materyal ve metot (Material and method)

3.1. Mikroalg Kültürü ve Yetiştirme Koşulları (Microalgae Culture and Growth Conditions)

Çalışmada kullanılan *C. vulgaris* alg kültürleri, Çukurova Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir. Çukurova Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü alg kültürünü, Texas Üniversitesi Alg Kültür Koleksiyonundan (UTEX 2019) satın almaktadır.

3.1.1. Besiyeri (Growth medium)

Mikroalg kültürünü yetiştirmek için içeriği Tablo 1'de verilen besiyeri kullanılmıştır (Bogless 2014). Bu besiyeri, Bold's Basal Medium (BBM) olarak adlandırılmaktadır ve ilk olarak 1963 yılında Bischoff ve Bold (Bischoff ve Bold 1963) tarafından oluşturulmuştur. BBM besiyeri hazırlamak için 1 nolu stok çözeltisinden 10 mL; 2, 3, 4 ve 5 nolu stok çözeltilerinin her birinden 1 mL alınır ve toplam hacim 1 L'ye distile su ile tamamlanır (Bogless 2014). Besiyeri bu oranlarda hazırlandığında alg büyümesinin yavaş olduğu görülmüştür. Bu nedenle, 1 L besiyeri hazırlamak için stok çözeltilerden alınan miktarlar 2 katına çıkarılmıştır. 1 nolu stok çözeltisinden 20 ml, 2, 3, 4 ve 5 nolu stok çözeltilerinin her birinden 2 mL alınmış ve toplam hacim 1 L'ye distile su ile tamamlanarak besiyeri hazırlanmıştır. İyi netice alındığı görülmüş ve bu oranlarla alg üretimine devam edilmiştir. Hazırlanan sıvı besiyeri, 1 L'lik şişelerin yarısı kadar (yaklaşık 500 mL) doldurularak, ağızları kapakla kapatılmadan sadece alüminyum folyo ile kapatılıp, 1 atmosfer basınçta, 121 °C'de sterilizasyon işlemi için otoklava (Hirayama Hv50-L) konur. Otoklavlama sonrasında 1 gün boyunca besiyeri soğumaya bırakılıp, sterilizasyonu tamamlanan besiyeri kullanım için karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmek üzere, kapalı bir dolap içerisine ağızına otoklavlanmış kapak kapatılarak kullanıma hazır halde bekletilir.

Tablo 1. Alg kültürü için hazırlanan Bolds Basal Besiyeri (1 L) içeriği (Bogless 2014) (Bolds Basal Medium (1 L) for the algal culture (Bogless 2014))

Stok 1: (20 mL)	Stok 2: (2 mL)	Stok 3: (2 mL)	Stok 4: (2 mL)	Stok 5: (2 mL)
25 g/L NaNO ₃	50 g/L EDTA anhidro	4,98 g/L FeSO ₄ .7H ₂ O	11,42 g/L H ₃ BO ₃	8,82 g/L ZnSO ₄ .H ₂ O
2,5 g/L CaCl ₂ .2H ₂ O	31 g/L KOH	1,0 mL H ₂ SO ₄		1,44 g/L MnCl ₂ .4H ₂ O
7,5 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O				0,71 g/L MoO ₃
7,5 g/L K ₂ HPO ₄				1,57 g/L CuSO ₄ .5H ₂ O
17,5 g/L KH ₂ PO ₄				0,49 g/L Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O
2,5 g/L NaCl				

3.1.2. *C. vulgaris* Mikroalg Kültürünün Çoğaltılması (Growth of *C. vulgaris* Microalgae Culture)

C. vulgaris alg kültürleri 1 000 mL'lik erlenmayerlere son hacimleri, büyümelerinde en önemli parametre olan hava almalarını sağlamak amacıyla, 500 mL olacak şekilde (50 mL alg kültürü ve 450 mL besiyeri) aktarılıp, 24 saat aydınlık (aydınlık şiddeti: yaklaşık 7 500 lux, ışık rengi: 4 300 K) ortamda erlenmayerlerin ağzı daha önceden otoklavda sterilizasyonu yapılan pamuk tıkaçlarla kapatılarak, 27±1 °C sıcaklıkta orbital çalkalayıcı üzerinde sürekli olarak 80 rpm'de karıştırılarak inkübe edilmiştir. Gün içerisinde orbital çalkalayıcı haricinde 2-3 defa elle çalkalama yapılması alg üretimini hızlandırmada etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca, gün içinde 2-3 defa pamuk tıkaçlar açılıp kapatılarak alglerin hava alması sağlanmıştır. Ortalama 4 gün sonunda istenilen popülasyon yoğunluğuna (yaklaşık 10⁴ hücre/mL) ulaşıldıktan sonra fotobiyoreaktöre aktarılmış ve CO₂ gazı tutma çalışmaları başlatılmıştır. Alg üretiminin sürekliliği, 2 günde bir spektrofotometrede (HACH Lange DR 6000 UV-Vis Spectrophotometer) yapılan optik yoğunluk (OD) okumalarına göre 684 nm (Rodrigues vd. 2011) ve 750 nm (Griffiths vd. 2011) dalga boyunda elde edilen veriler ile takip edilmiş, ölüm fazına geçişin başladığı OD değeri tespit edildiğinde erlenmayer içerisindeki hava payı azaltılmayacak şekilde besiyeri eklenip, tazeleme yapılarak büyüme fazında alg yetiştirmeye devam edilmiştir. Belli bir noktadan sonra besiyeri eklendikçe erlenmayer içerisinde hacim daraldığı için önce 2 L'lik (max. 1 L alg kültürü) daha sonra 4 L'lik şişelere (max. 2 L alg kültürü) alg kültürleri alınarak alg üretiminin sürdürülebilirliği sağlanmıştır. Yoğun alg üretimi olduğunda hacmi daha fazla büyütmemek adına fazla alg kültürü dökülerek, dökülen miktar kadar besiyeri eklenmiş ve alglerin ölüm fazından tekrar büyüme fazına geçişi sağlanıp, alg üretimi sürekliliği korunarak devam ettirilmiştir.

3.2. Laboratuvar-ölçekli fotobiyoreaktör (Lab-FBR) sistemi (Laboratory-scaled photobioreactor (Lab-FBR) system)

Proje kapsamında yapılan deneyler laboratuvar ölçekli fotobiyoreaktör (Lab-FBR) sisteminde gerçekleştirilmiştir. Lab-FBR sistemi, iç hacmi 2 L olan 3 adet fotobiyoreaktörden oluşmaktadır. 2 L'lik hacmin 1,5 L'sinde mikroalg kültürünün olacağı sulu çözelti bulunmaktadır (çalışma hacmi 1,5 L). Bu tasarım için, 5 cm iç çapa sahip 101,9 cm yüksekliğinde pleksiglastan yapılmış fotobiyoreaktör kullanılmıştır. Lab-FBR sisteminin genel görünümü Şekil 1'de verilmiştir. Lab-FBR sisteminde gaz karışımını sağlamak için kullanılan 4 adet rotametre, sıcaklık kontrol sistemi ve ışık akısı ayarlama ünitesi bulunmaktadır. Sıcaklık kontrol sistemi, sıcaklık kontrol paneli, ısı kabloları ve sıcaklık ölçerlerden oluşmaktadır. Sıcaklık ölçer kolonun üst tarafına monte edilmiştir. Sıcaklık ölçer kolonun üstünden sarkıtılarak deney esnasında her zaman mikroalg kültürünün olduğu besiyeri içinde olacak şekilde ayarlanmıştır. Kolon içindeki sulu çözeltiyi istenilen sıcaklıkta tutmak için kolonun dışına ısı kabloları sarılmıştır. Önce kolonun, ardından kolon içindeki sulu çözeltinin ısıtılması, mikroalglerin doğrudan ısı kaynağına maruz kalmaması için yapılmıştır. Sıcaklık ölçer, sulu çözelti sıcaklığını ölçmektedir. Sulu çözelti istenilen sıcaklığa gelene kadar ısı kabloları sistemi ısıtmaktadır. İstenilen sıcaklığa gelindiğinde ısı kablolarına verilen güç kesilmektedir. Bu işlemi yapan sıcaklık kontrol devreleri de kontrol panelinin içinde bulunmaktadır.



Şekil 1. Lab-FBR sisteminin genel görünümü (Pictures of the Lab-FBR system)

Lab-FBR sisteminin yanında CO₂, O₂, N₂ ve 400 ppm_v CO₂ içeren kuru hava tüpleri sisteme bağlı bir şekilde yer almaktadır. Sistemin sağ alt kısmında bulunan rotametreler aracılığıyla sisteme verilen gaz karışımı ve gaz debisi ayarlanabilmektedir. Sistemin sağ üst kısmında ışık akısını istenilen yoğunlukta ayarlamaya yarayan bölüm bulunmaktadır. Her bir fotobiyoreaktörün her iki yanında toplam ışık akısı 5 800 lm olan iki adet LED lamba kullanılmıştır. Lab-FBR sistemi otomatik aydınlatma sistemine sahiptir. Işık akısı istenilen değerde ayarlanabilmektedir. Lab-FBR sistemindeki mikroalg kültürü günün farklı zaman dilimlerinde aydınlık ve karanlık evrelerde olmaktadır. Bunu sağlamak için sisteme aydınlatmayı otomatik açıp kapayabilen zaman ayarlı mekanik bir ekipman temin edilmiştir. Doğrudan prize takılabilen bu ekipman ile sistemin kaç saat ışığa maruz kalacağı ve kaç saat karanlıkta kalacağı otomatik olarak ayarlanabilmektedir. Aydınlık/karanlık döngülerinde aydınlatma süreleri bu ekipman mekanik zaman saati ile ayarlanarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında yapılan deneylerde farklı aydınlatma süreleri denenmektedir. Bazı durumlarda gündüz vaktinde mikroalglerin karanlık bir ortamda olmaları gerekmektedir. Bu karanlık ortamı sağlamak için Lab-FBR sistemi etrafına siyah, kalın kumaştan bir perde temin edilmiştir. Perde kapandığında sistem ortam ışığından tamamen arındırılmış olmaktadır.

Alg kültürü, büyüme için ihtiyaç duyduğu karbonu fotobiyoreaktöre verilen CO₂ gazından temin etmektedir. CO₂ gazının algler tarafından kullanılabilmesi için öncelikle CO₂ gazının suda çözünmesi gerekmektedir. CO₂ gazının gaz fazından sıvı faza transferinde gaz debisi, gazın fotobiyoreaktörde geçirdiği süre, gaz karışımındaki CO₂ derişimi ve sulu çözelti sıcaklığı gibi parametrelerin oldukça önemi vardır. Transferi mümkün kılabilmek adına gazın fotobiyoreaktörde geçirdiği süreyi uzun tutmak için gaz debisi 100 mL/dak olarak belirlenmiştir. Daha yüksek bir gaz debisi, gaz moleküllerinin fotobiyoreaktördeki alıkonma sürelerini kısaltacak, bu da gazdan sıvaya transferi azaltacaktır. Gazdan sıvıya transferi etkileyen bir diğer parametre de sıcaklıktır. *C. vulgaris* mikroalg kültürü ile ilgili laboratuvarında edinilen tecrübe bu alg kültürünün en iyi büyümeyi ortalama 28 °C sıcaklıkta sağladığını göstermektedir. Her ne kadar daha soğuk çözeltilerde gazdan sıvıya geçiş daha kolay olsa da alglerin büyüme şartlarının optimum düzeyde tutulması için fotobiyoreaktör içindeki sulu çözelti sıcaklığı kablolu ısıtıcı vasıtasıyla sürekli 28 °C sıcaklıkta tutulmuştur.

Çalışma hacmi için belirlenen mikroalg aşılama derişimi minimum 0,16 g (kuru ağırlık)/L'dir. Mikroalglerin CO₂ gazı tutma verimlerini belirlemek amacıyla fotobiyoreaktörlere üç farklı derişimde CO₂ gaz karışımı (400 ppm_v CO₂, %15 CO₂ gazı içeren CO₂+N₂+O₂ gaz karışımı ve %90 CO₂ gazı içeren CO₂+O₂ gaz karışımı) verilmiştir. 400 ppm_v CO₂ içeren gaz karışımı havayı temsil etmektedir. Bu gaz karışımı ile yapılacak olan deneyler (havadan CO₂ tutma/air capture) referans deneyler olarak değerlendirilecektir. Hacimce %15 CO₂ gazı içeren CO₂+N₂+O₂ gaz karışımı kömürle çalışan termik santrallerinden kaynaklanan baca gazı kompozisyonunu temsil etmektedir, karışımındaki O₂ gazı yüzdesi hacimce %3 olacaktır. Hacimce %90 CO₂ gazı içeren CO₂+O₂ gaz karışımı Oksi-Yanma teknolojisi kullanan ve kömürle çalışan termik santrallerinden kaynaklanan baca gazı kompozisyonunu temsil etmektedir. Gaz karışımı fotobiyoreaktörlerin alt kısmından verilmektedir. Her bir fotobiyoreaktöre verilecek gazı debisi 100 mL/dk olarak belirlenmiştir. Bu debi miktarı fotobiyoreaktör içinde hem karışımı sağlayacak hem de mikroalglerin fotobiyoreaktör tabanına çökmesini engelleyecektir. Çalışma kapsamında gerçekleştirilecek deneyler, istatistiki olarak değerlendirilebilmesi adına, üç paralel olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu amaçla; proje kapsamındaki deneylere 3 reaktör kullanarak başlangıç yapılmıştır. Fakat sisteme verilen toplam 300 mL/dk'lık

debinin 3 reaktöre de eşit dağılmadığı gözlemlenmiştir. Deney başlangıcından itibaren gaz akışı her saat başı kontrol edilmiş fakat sadece ortadaki fotobiyoreaktöre gaz girdisinin olduğu, diğer iki tarafta yer alan fotobiyoreaktörlerde gazın tamamen kesildiği ve bu nedenle alglerin ilk iki gün içerisinde inhibe olup, yaşayamadıkları gözlemlenmiştir. Bu yüzden 300 mL/dk'lık toplam debinin 3 reaktöre dağıtılması yerine 100 mL/dk'lık debiyi tek bir reaktöre besleyerek deneylerin yapılmasına karar verilmiştir. Tek bir fotobiyoreaktörde yapılan deneylerin istatistiki olarak değerlendirilebilmesi açısından, fotobiyoreaktörden 5'er dakika arayla alınan 2 ayrı alg numunesinin sonuçlarının ortalaması alınarak deney parametreleri hesaplanmıştır. Bir önceki deneyde kullanılan hava taşının gözeneklerinde oluşabilecek tıkanmaların sisteme verilen gaz debilerini olumsuz etkilememesi adına her deney başlangıcında, yeni bir hava taşı kullanılarak çalışmalara devam edilmiştir. Yapılan düzenlemeler doğrultusunda, fotobiyoreaktör sisteminde gerçekleştirilen deneylere düzenli bir şekilde, sorun olmadan devam edilebilmiştir.

3.3. Deney parametreleri ve deney listesi (Test parameters and test list)

3.3.1. Aydınlatma şiddeti (Illumination intensity)

C. vulgaris mikroalginin gelişiminde en iyi verim sağlayan aydınlatma şiddetinin tespiti açısından üç farklı aydınlatma şiddetinde altında (7 000 lux, 11 000 lux ve 15 000 lux) deneyler gerçekleştirilmiştir (SET-I). Deneylerde fotobiyoreaktöre %15 CO₂ içeren gaz karışımı (%15 CO₂+ %3 O₂+ %82 N₂) verilmiştir. Gaz debisi 100 mL/dk olarak belirlenmiştir. SET-I kapsamında yapılan deneyler ve deney şartları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Deney listesi (Set-I) (Test list (Set-I))

SET-I	Aydınlatma Şiddeti (lux)	Aydınlatma Süresi (saat)	% CO ₂
1.1	7 000	24	15
1.2	11 000	24	15
1.3	15 000	24	15

3.3.2. Aydınlatma süresi (Illumination duration)

SET-I sonunda, en iyi CO₂ giderim verimine sahip aydınlatma şiddeti belirlenmiş, SET-II deneyleri bu aydınlatma şiddetinde gerçekleştirilmiştir. SET-II deneylerinde aydınlatma süresinin mikroalg kültürünün büyümesi üzerine etkisi incelenmiştir. Deneylerde %15 CO₂ içeren gaz karışımı (%15 CO₂+ %3 O₂+ %82 N₂) 7 000 lux aydınlatma şiddetinde fotobiyoreaktöre verilmiştir. Gaz debisi 100 mL/dk olarak belirlenmiş olup, SET-II kapsamında yapılan deneyler ve deney şartları Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Deney listesi (Set-II) (Test list (Set-II))

SET-II	Aydınlatma Şiddeti (lux)	Aydınlatma Süresi (saat)	% CO ₂
2.1	7 000	12	15
2.2	7 000	16	15
2.3	7 000	24	15

3.3.3. CO₂ derişimi (CO₂ concentration)

SET-II sonunda, en iyi CO₂ giderim verimine sahip aydınlatma süresi belirlenmiştir. SET-III deneyleri bu aydınlatma süresinde gerçekleştirilmiştir. SET-III deneyleri süresince fotobiyoreaktöre 100 mL/dk debide gaz karışımı verilmiştir. Deneyler 7 000 lux aydınlatma şiddetinde, 24 saatlik aydınlatma süresinde yapılmıştır. SET-III kapsamında yapılan deneyler ve deney şartları Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Deney listesi (Set-III) (Test list (Set-III))

SET-III	Aydınlatma Şiddeti (lux)	Aydınlatma Süresi (saat)	% CO ₂
3.1	7 000	24	0,04*
3.2	7 000	24	15
3.3	7 000	24	90

* 400 ppm_v

3.3.4. Azot stresi (Nitrogen stress)

SET-IV deneyleri, fotobiyoreaktör sisteminde en iyi CO₂ giderim veriminin elde edildiği %15 CO₂ derişimi, 7 000 lux aydınlatma şiddeti ve 24 saat aydınlatma süresi altında hem azot stresi olmayan koşulda hem de %100 azot stresi olan koşulda gerçekleştirilmiştir. %100 azot stresi koşulunda mikroalgler inhibe olup büyüyemedikleri için 2. günde deney sonlandırılmıştır. Bunun üzerine %100 azot stresi deneyi 400 ppm_v CO₂ derişiminde tekrarlanmıştır. Bu deneyin sonunda da mikroalgler inhibe olmuş ve 2. günde deney sonlandırılmıştır. Azot stresi olmayan koşullarda yapılan deneylerde iyi bir büyüme sağlayan mikroalglerin, aynı koşullarla azot stresi altında büyüyememelerinin temel sebebinin; sistemdeki gaz akışının fazla olması ve büyümeyi olumsuz etkilemesi düşünülmüştür. Bu görüşün doğruluğunu teyit etmek amacıyla, fotobiyoreaktör sisteminin dışında deneylerin yapılmasına karar verilmiştir. Ayrıca, kıyas yapabilmek adına, %75 azot stresi deneyi de yapılacak deneyler arasına dahil edilmiş ve toplamda üç deney gerçekleştirilmiştir. 28 °C sabit sıcaklığın olduğu steril bir odada, 400 ppm_v CO₂ derişiminde ve 7 000 lux aydınlatma şiddetinde sürekli aydınlatma şiddetinde azot stresi olmayan, %75 azot stresi ve %100 azot stresi içeren koşullarda deneyler gerçekleştirilmiştir. Her bir deney ortamında, mikroalgler yaklaşık olarak 12 gün iyi bir büyüme sergilemişlerdir. %100 azot stresi için besiyerinden azot içeren tüm bileşenler (NaNO₃, EDTA ve Co(NO₃)₂.6H₂O) çıkarılmıştır. Üçüncü deney de ise %75 azot stresi uygulanmıştır. Bunun için besiyerinden EDTA ve Co(NO₃)₂.6H₂O bileşenleri çıkarılmış, azot kaynağı olarak besiyerinde sadece NaNO₃ kullanılmıştır. Mikroalg kültüründe %75 azot stresi oluşturacak besiyerinin hazırlanmasında NaNO₃'ün Stok 1 çözeltisindeki derişimi 4,505 g/L olarak belirlenmiştir. SET-IV kapsamında yapılan deneyler ve deney şartları Tablo 5'te gösterilmiştir. Deneyler sonunda toplanan/hasat edilen mikroalg biyokütlesinde RuBisCO ve lipid analizleri yapılmıştır.

Tablo 5. Deney listesi (Set-IV) (Test list (Set-IV))

SET-IV	Aydınlatma Şiddeti (lux)	Aydınlatma Süresi (saat)	% CO ₂	Azot Stresi
4.1	7 000	24	0,04*	-
4.2	7 000	24	15	%100
4.3	7 000	24	90	%75

* Deneyler erlenmayerde hava atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Havadaki CO₂ derişiminin kuru bazda 400 ppm_v olduğu kabul edilmiştir.

3.4. Analizler ve hesaplamalar (Analyses and calculations)

Her bir deney için fotobiyoreaktörden 24 saatte bir numune alınmıştır. Alınan numunelerde pH, sıcaklık, optik yoğunluk, kuru ağırlık (g/L), klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid ölçümleri yapılmıştır. Yapılan analizler neticesinde her bir deney için mikroalg üreme verimliliği (P_t, g (kuru ağırlık)/L/gün), maksimum spesifik büyüme oranı, (μ_{max}, 1/gün) ve CO₂ tutma verimi (R_{CO2}, g CO₂/L/gün) hesaplanmıştır.

Çalışmada kullanılan *C. vulgaris* mikroalginin optimum büyüme sıcaklığı 28 °C olarak belirlenmiştir. Deneyler esnasında fotobiyoreaktörün iç sıcaklığı 28 °C'de sabit olacak şekilde ayarlanmıştır. Her deneyde, fotobiyoreaktörden 24 saatte bir alınan numunelerde sıcaklık ve pH ölçümü Hanna Instruments HI 2210 pH metre kullanılarak yapılmıştır. pH ölçüm değerlerine göre, mikroalg büyümesi üzerinde olumlu ve olumsuz yönde etkileyen parametrelerin ve optimum pH değerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Kültürün hücre yoğunluğunun arttığına bir delil olması bakımından alg kültüründen alınan numunede ışık soğurma (**optik yoğunluk**) ölçümü yapılmıştır. Optik yoğunluk, soğurmaya ilave olarak ışığın dağılması ya da yansımaları olaylarını da kapsar. Her ne kadar soğurma, ışığın dağılması ve yansımaları olaylarını dikkate almıyor olsa da optik yoğunluk hakkında fikir verir. Bu nedenle, bu noktadan itibaren soğurma, "optik yoğunluk" terimi ile ifade edilecektir. Mikroalg gibi renk veren hücrelere sahip biyokütlelerin bir sulu çözeltideki derişimi dolaylı olarak optik yoğunluk tespiti ile yapılmaktadır. Fakat mikroalg kültürün yaşına ve büyüme şartlarına göre renk veren/boyar madde içeriği değişiklik gösterdiği için optik yoğunluk ölçümleri ciddi hatalara neden olabilmektedir. Hatayı en düşük seviyede tutabilmek için optik yoğunluk ölçümü renk veren/boyar maddenin soğurabileceği dalga boyu aralığının dışındaki bir dalga boyunda yapılmalıdır. Rodrigues vd. (2011) yaptıkları çalışmada *C. vulgaris* mikroalg kültürü için optik yoğunluk ölçümünün 684 nm dalga boyunda, Griffiths vd. (2011) 750 nm dalga boyunda yapılmasını önermektedirler. Buradan hareketle, deneyler süresince mikroalg kültürü numunesinin hem 684 nm hem de 750 nm dalga boylarındaki optik yoğunluğu spektrofotometre (Hach Lange DR 6000) kullanılarak belirlenmiştir. Her iki dalga boyundaki ölçümler birbiriyle uyumlu olduğu için burada sadece 684 nm dalga boylarındaki optik yoğunluk değerleri paylaşılmıştır.

Kuru ağırlık (X) için; filtre kağıdı (selüloz asetat membran filtre 0,45 μm) 105 °C'de 2 saat boyunca fırınında bekletip kurutulur. Kurutulan filtre kağıdı desikatörde soğutulduktan sonra hassas terazi (Pioneer Ohaus PA214C;

Okunabilirlik: 0,0001g) ile darası (m_1) alınır. Mikroalg kültüründen alınan 10 mL örnek, filtre kağıdından geçirilerek süzülür. Örneğin süzüldüğü filtre kağıdı 3 saat boyunca etüvde 105 °C'de kurutulur. Kurutulan filtre kağıdı desikatörde ortam sıcaklığına getirildikten sonra yapılan tartım sonuçlarıyla (m_2) litredeki kuru ağırlık gram cinsinden tespit edilir (1).

$$X = \frac{\Delta m}{V} \quad (1)$$

X; g (kuru ağırlık)/L cinsinden mikroalg derişimini vermektedir. Δm , $m_2 - m_1$ kuru ağırlığını g cinsinden, V ise toplam numune hacmini mL cinsinden ifade etmektedir.

Klorofil fotosentez sürecinin bir göstergesi olduğundan dolayı, mikroalg kültüründe fotosentezin gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek ve biyokütle artışını tayin etmek için kültürden alınan numunelerde **klorofil-a**, **klorofil-b** ve **karotenoid** tayini yapılmıştır. Fotobiyoreaktörden alınan 10 mL alg numunesi 0,45 μm gözenek çaplı selüloz asetat filtre kağıdından süzümüştür. Süzülme işleminin son aşamasında ortamının pH'sının asidik koşullara gelmemesi (ortam pH'sının 7-7,5 civarında tutulması), klorofil pigmentlerinin zarar görmemesi için filtre kağıdına son aşamada 200 μL MgCO_3 ilave edilerek beraber süzdürümüştür. Filtre kağıdı santrifüj tüpüne yerleştirilerek, üzerine 5 mL %90'lık aseton eklenmiştir. Filtre kağıdı çözünene kadar yaklaşık bir dakika boyunca vortekslenmiş ve 4 °C'de 24 saat süreyle buzdolabında alüminyum folyoya sarılarak, karanlık ortamda bekletilmiştir. 24 saatin sonunda örnekler daha konsantre bir numune eldesi için 6 000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen üst sıvının 480, 630, 645 ve 665 nm dalga boylarında OD ölçümleri yapılmış ve (2), (3) ve (4) eşitlikleri kullanılarak örneklerin klorofil ve karotenoid içerikleri tespit edilmiştir (Parsons ve Strickland 1972). 480 nm dalga boyunda karoten, 645 nm'de klorofil-b ve 665 nm'de ise klorofil-a pigmenti ışığı en yüksek seviyede soğurabilmektedir. Hem klorofil-a hem de klorofil-b 630 nm dalga boyundaki ışığı düşük bir seviyede soğurabildikleri için 630 nm'deki ölçümler, hesaplamalarda düzeltme faktörü olarak kullanılmaktadır.

$$\text{Klorofil-a } (\mu\text{g}/10 \text{ mL}) = (11,6 * E_{665} - 1,31 * E_{645} - 0,14 * E_{630}) * \left(\frac{V}{L}\right) \quad (2)$$

$$\text{Klorofil-b } (\mu\text{g}/10 \text{ mL}) = (20,7 * E_{645} - 4,34 * E_{665} - 4,42 * E_{630}) * \left(\frac{V}{L}\right) \quad (3)$$

$$\text{Karotenoid } (\mu\text{g}/10 \text{ mL}) = 4,0 * E_{480} \quad (4)$$

E: Her bir dalga boyunda okunan OD değeri

V: Kullanılan aseton miktarı, mL

L: Işığın aldığı yolu (küvet genişliği), cm

Mikroalg numunelerinin **RuBisCO** analizine başlamadan önce, RuBisCO test kitinde bulunan standart çözeltiler kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kullanılan kitin içeriğinde yer alan kalibrasyon eğrisi verileri ile ölçülen veriler arasındaki hata payının çok düşük olduğu görülmüş ve güvenli bir şekilde temel deneylere başlanılmıştır. Mikroalg kültürünün RuBisCO oranını belirlemek ve deneyler sonrasında RuBisCO oranı ile kıyas yapabilmek adına deney setlerine başlamadan önce kültürde RuBisCO analizi yapılmıştır. Daha sonra Set-IV kapsamındaki deneyler sonrasında hasat edilen mikroalg kültüründe RuBisCO analizi yapılmış ve RuBisCO enzim aktivitesinin azot stresi koşullarına göre nasıl değiştiği ve mikroalg kültürünün CO_2 tutma verimini nasıl etkilediği tespit edilmiştir. RuBisCO analizi aşağıda belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiştir:

- Deney sonunda fotobiyoreaktördeki sulu çözelti (mikroalg kültürünün de içinde olduğu) toplanmış ve 5 dk boyunca 5 000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı faz (süpernant) alındıktan sonra kalan mikroalg biyokütlesinin (alg keki) yaklaşık 1 mL'si pastör pipeti ile alınmış ve RuBisCO analizi için ayrılmıştır. Geriye kalan alg kekinin tümü lipid analizi için muhafaza edilmiştir.
- 1 L saf suda ham enzim ekstraksiyon çözeltisi (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 50 mM NaHCO_3 , 2 mM DTT ve 10 mM MgCl_2) hazırlanmıştır. RuBisCO analizi için ayrılan 1 mL alg keki üzerine ham enzim ekstraksiyon çözeltisinden 1 mL eklenmiş ve alg keki 3 dakika boyunca 160 W'lık ultrasonik prob altında parçalanmıştır.
- Parçalanmış hücre süspansiyonu tekrar 5 dakika boyunca 3 000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernant RuBisCO aktivitesinin belirlenmesi için toplanmıştır (Huang vd. 2016).

RuBisCO aktivitesi, RuBisCO test kiti kullanılarak mikropilaka absorban okuyucuda 450 nm'de yapılan okuma ile belirlenmiştir. Analiz, RuBisCO seviyesini belirlemek için çift antikorlu sandviç yöntemine dayanmaktadır (Huang vd. 2016). RuBisCO test kitinde bulunan mikrotitre plakası RuBisCO antijeni ile önceden kaplanmıştır.

Standart/numune RuBisCO'ya özgü antikor ile birlikte uygun mikrotitre plaka oyuklarına eklenmiş, 37 °C'de 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandıktan sonra, antikor-antijen etiketli enzim kompleksi oluşturmak için HRP (Horseradish peroksidaz) etiketli RuBisCO antikor çözeltisi standarda/numuneye ilave edilmiş, standart/numune 37 °C'de 60 dakika boyunca tekrar inkübe edilmiştir. Standart/numune yıkama çözeltisi ile 5 kez daha yıkanmıştır. Ardından standarda/numuneye tetrametil benzidin (TMB) ilavesi yapılmıştır. TMB enzimatik bir tepkimenin gerçekleşmesini sağlar. Böylece mavi renkli bir ürün elde edilir. HRP tarafından katalize edilen raportör substrat tetrametil benzidin (TMB) ilavesiyle bir enzimatik reaksiyon gerçekleşmiştir. TMB eklendiğinde, analiz aşamaları hassas bir şekilde uygulanmışsa eğer, nihai rengin maviye dönüşümü gerçekleşir. Yeşil bir renk elde edilirse, analiz aşamalarının uygulanmasında sorun var anlamına gelmektedir. TMB ilavesinin ardından standart/numune 37 °C'de 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda çözelti mavi renk almıştır. Enzimatik aktiviteyi etkisiz hale getirmek için 50 µL durdurma tamponu ilave edilmiş, mavi rengin sarıya dönmesi gözlenmiştir. Sarı renklenme yoğunluğu, 5 dakika içinde mikrolaka absorban okuyucusu tarafından 450 nm'de absorban okunarak ölçülmüştür. Ölçüm değeri, numunede tutulan HRP-Konjuge RuBisCO miktarı ile nicel olarak doğru, numune veya standart içinde bulunan RuBisCO miktarı ile ise ters orantılı olmaktadır (Aviva Systems Biology 2005).

Mikroalg numunelerinde **lipit** ekstraksiyonu, kloroform/metanol (CHCl₃/CH₃OH) kullanımı içeren ve gravimetrik tanımlamaya dayanan Bligh ve Dyer metoduna (Bligh ve Dyer 1959) göre yapılmıştır. Bu metot ile %80 sıvı içeriğine sahip biyolojik materyallerden, CHCl₃/ CH₃OH/su (1:1:0,5 v/v) içeren ekstraksiyon çözeltisi (çözücü) kullanılarak lipit ekstraksiyonu sağlanmaktadır. Set-IV kapsamındaki deneyler sonrasında hasat edilen ve kurutulan (40 °C etüvde 2 gün süre ile) mikroalg biyokütlesinde lipit eldesi aşağıdaki yöntem (Bligh ve Dyer (1959)) kullanılarak sağlanmıştır.

"25 mg kuru biyokütle 50 mL'lik falkon tüpüne alınmış ve üzerine CHCl₃/CH₃OH/su (1:1:0,5 v/v) çözücülerini toplam hacim 25 mL olacak şekilde birkaç adımda eklenmiştir. Her çözücü ilavesinden sonra biyokütle-çözücü karışımı 1 dk hızlıca vorteks cihazında karıştırılmış ve ardından su banyosunda 75 °C sıcaklıkta 5 dk bekletilmiştir. Biyokütle-çözücü karışımı 6 000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek faz ayrımı sağlanmıştır. Altındaki faz (kloroform-lipit karışımı) pastör pipeti ile dikkatlice çekilmiş ve darası alınan numune şişesine konulmuştur. 80 °C'de çözücüsü uçurulan numunenin son tartımı alınmıştır. İlk ve son tartım arasındaki fark, kuru ağırlık bazında % lipit içeriğini vermiştir." (Gürol vd. 2014)

Mikroalg üreme verimliliği (P_t) (5) eşitliğine göre hesaplanmıştır (Aslam vd. 2017).

$$P_t = \frac{(X_t - X_0)}{(t_t - t_0)} \quad (5)$$

P_t, deneyin başlamasıyla t süresi arasında mikroalg üreme verimliliğini g (kuru ağırlık)/L/gün cinsinden vermektedir. X_t ve X₀ sırasıyla t_t ve t₀ zamanlarındaki fotobiyoreaktördeki mikroalg derişimlerini (g (kuru ağırlık)/L cinsinden) ifade etmektedir. t₀ aşılamanın yapıldığı ilk günü, t_t ise aşılama sonrası herhangi bir zamanı temsil etmektedir.

Maksimum spesifik büyüme oranı (µ_{max}) 1/gün cinsinden (6) eşitliğine göre hesaplanmıştır (Taştan vd. 2016).

$$\mu_{max} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (6)$$

X₂ ve X₁ sırasıyla t₂ ve t₁ zamanlarındaki fotobiyoreaktördeki mikroalg derişimlerini (g (kuru ağırlık)/L cinsinden) ifade etmektedir. t₁ mikroalg kültüründe görülen büyümenin en fazla olduğu zaman diliminin başlangıcını, t₂ ise bu zaman diliminin sonunu temsil etmektedir.

CO₂ tutma verimi (R_{CO2}) (7) eşitliğine göre hesaplanmıştır (Tang vd. 2011).

$$R_{CO_2} = C_c * P_{max} * \frac{(MA_{CO_2})}{(MA_C)} \quad (7)$$

Formüldeki R_{CO2}, CO₂ tutma verimini g CO₂/L/gün cinsinden vermektedir. C_c mikroalg kuru ağırlığının C içeriğini (kütlece %; g C/ g (kuru ağırlık)), P_{max} maksimum mikroalg üreme verimliliğini (g (kuru ağırlık)/L/gün) temsil etmektedir. MA_{CO2} (g/mol) ve MA_C (g/mol), sırasıyla, CO₂ gazının ve C elementinin moleküler ağırlıklarını göstermektedir. C_c, her numunenin değil sadece hasat sonrası toplanan mikroalg kültüründen alınan numunenin kuru ağırlığının C içeriğidir. Bu çalışmada C_c 0,5 olarak kabul edilmiştir (Pegallapati ve Nirmalakhandan 2013).

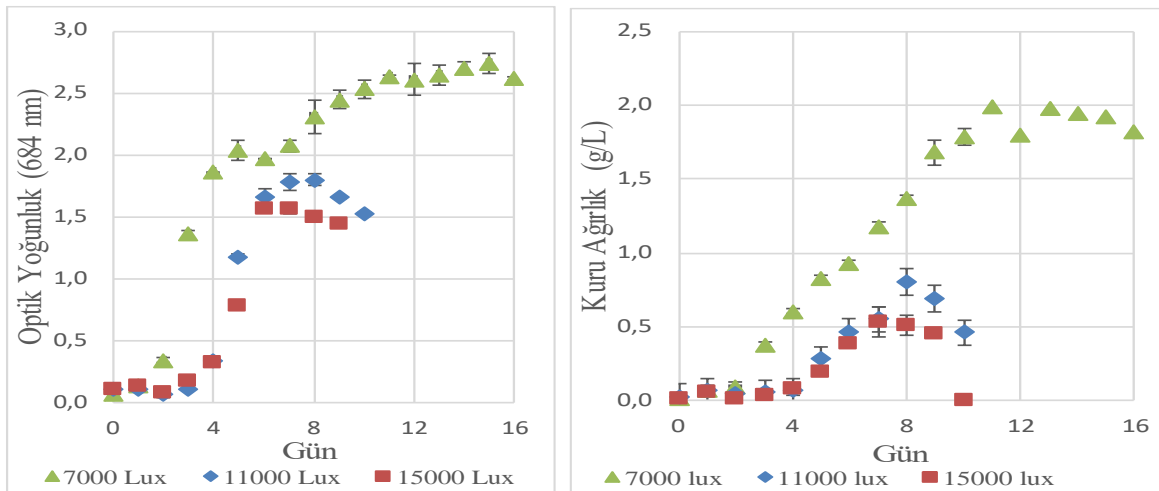
4. Bulgular ve tartışma (Results and discussion)

4.1. Aydınlatma şiddetinin mikroalgal biyokütle büyüme verimine etkisi (Effect of illumination intensity on microalgal growth)

C. vulgaris mikroalg kültürünün büyümesine aydınlatma şiddetinin etkisini belirlemek için mikroalg kültürü 7 000, 11 000 ve 15 000 lux aydınlatma şiddetinde Lab-FBR sisteminde 24 saat boyunca sürekli ışık altında yetiştirilmiştir. Mikroalg kültürüne deney süresince %15 CO₂ içeren gaz karışımı verilmiştir. Deneyler süresince fotobiyoreaktörden alınan mikroalg numunelerinin (24 saatte bir, 5 dakika arayla iki numune) optik yoğunluk (OD) değerleri ölçülmüş ve kültürün büyümesi takip edilmiştir. Mikroalg numunelerinin OD ve kuru ağırlık değerlerinin zamanla değişimi Şekil 2'de verilmiştir. Şekil 2'de görüldüğü üzere 7 000 lux (94,6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 11 000 lux (148,6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ve 15 000 lux (202,7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) aydınlatma şiddetlerinde yapılan deneyler sonucunda 684 nm dalga boyunda ölçülen en yüksek OD değerleri sırasıyla 2 738, 1 794 ve 1 566 olmuştur. Deney sonuçlarına göre 24 saat sürekli aydınlatma ile en iyi büyümenin 7 000 lux aydınlatma şiddeti altında olduğu tespit edilmiştir. Benzer bir sonuç Han vd. (2015) tarafından %0,04 CO₂ derişiminde yapılan bir çalışmada elde edilmiş, 2 000, 4 000, 6 000, 8 000 ve 10 000 lux aydınlatma şiddetlerinde gerçekleştirilen deneylerde 6 000 ve 8 000 lux değerlerinde daha yüksek büyüme oranının elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, Wahidin vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada göre 6 000 lux aydınlatma şiddetinin 10 000 lux aydınlatma şiddetine kıyasla, biyokütlenin keskin bir şekilde azalmasına neden olan fotosentetik reseptör sistemine zarar verebilecek yüksek aydınlatma kaynaklı fotoinhibisyon riskini azaltabileceği belirtmişlerdir. Bu çalışmada 7 000 lux aydınlatma şiddetinde elde edilen yüksek büyüme verimi bu bilgiyi desteklemektedir.

Sutherland vd. (2012) aydınlatma şiddetinin 8 880 lux'ten (120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) az olduğu yetiştirme koşullarında mikroalglerin kendi kendilerine gölgeleme etkisi yaratarak ışık sınırlaması etkisi yaratabilecekleri ve bu nedenle klorofilin elektron transferi yapmasının sınırlanması ile mikroalglerin CO₂ tutabilme özelliklerinin azalabileceği belirtilmiştir. Aşırı ışık altında mikroalg yetiştirme durumunda ise, fotonların fotosistem I'e (PS I) girişinde engel oluşabileceği ve mikroalg hücreleri içindeki PS I'den PS II tepkime merkezlerine elektron transfer verimliliğinin azalmasına söz konusu olabileceği belirtilmiştir (Sutherland vd. 2013).

Chávez-Fuentes vd. (2018) çalışmalarında azot sınırlaması olan kültürlerde 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (5 180 lux) ile 140 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (10 360 lux) aydınlatma şiddeti ve farklı ışık kalitesi (beyaz, mavi, sarı ve mor) altında *C. vulgaris* mikroalginin yağ asidi profilini ve mikroalgden elde edilen biyodizelin kalitesini incelemişlerdir. Mor ve sarı ışık kaynaklarına kıyasla beyaz (0,69 g/L) ve mavi ışık (0,65 g/L) altında 10 360 lux aydınlatma şiddetinde maksimum hücre ve biyokütle derişimi gözlemlenmiştir. Fakat elde ettikleri biyokütle derişimi (0,69 g/L) bu çalışma sonucunda elde edilen biyokütle oranına (1,99 g/L) göre yaklaşık 2,5 kat daha azdır. Bu sonuç, en iyi büyüme verimi elde edilen 7 000 lux aydınlatma şiddetinin daha iyi verim sağladığını ortaya koymaktadır.



Şekil 2. Farklı aydınlatma şiddetlerinde fotobiyoreaktörden alınan mikroalg numunelerinin OD ve kuru ağırlık değerlerinin zamanla değişimi (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂; 24 saat aydınlık) (Change of OD and dry weight values of microalgae samples taken from photobioreactor at different illumination intensities (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂; 24-hour illumination))

7 000, 11 000 ve 15 000 lux aydınlatma şiddetleri için en yüksek kuru ağırlık değerleri sırasıyla 1,99 g/L, 1,61 g/L ve 0,45 g/L olarak hesaplanmıştır. Mikroalg kültürü 7 000 lux aydınlatma şiddeti altında daha iyi bir büyüme göstermiştir. 11 000 ve 15 000 lux aydınlatma şiddetleri altında *C. vulgaris* mikroalginde hızlı bir büyüme ve ölüm fazına daha kısa sürede geçiş olmuştur. Bu kısa süreden dolayı biyokütle oluşumundaki artış durmuştur. 7 000 lux

aydınlatma şiddetinde yavaş bir büyüme gerçekleşmiş ve daha uzun sürede büyüme devam ettiği için biyokütle oranında artış olmuştur. Montoya vd. (2014), *C. vulgaris* kültürünü %8 CO₂ derişiminde ototrofik tübüler bir fotobiyoreaktörde yetiştirerek maksimum mikroalg derişimini 6,8 g/L olarak elde etmişlerdir. %8 CO₂ derişiminde 6,8 g/L olarak elde ettikleri maksimum kuru ağırlık değerinin, bu çalışmada %15 CO₂ derişiminde elde edilen 1,99 g/L oranına göre oldukça yüksek olması, yüksek CO₂ derişiminin büyüme oranını azaltıcı etki yaratması ile açıklanabilir. Farklı bir çalışma (Khoeyi vd. 2012) kapsamında; farklı aydınlatma şiddetlerinde (37,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 775 lux), 62,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4 625 lux) ve 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (7 400 lux)) ve farklı aydınlatma sürelerinde (8:16 saat, 12:12 saat ve 16:8 saat aydınlık: karanlık) yetiştirilen *C. vulgaris*'in 2 775 lux ve 4 625 lux aydınlatma şiddetlerinde biyokütlede artış olduğu, ancak 7 400 lux aydınlatma şiddetinde yetiştirildiğinde biyokütlesinde azalma olduğu belirlenmiştir. Maksimum biyokütlenin 4 625 lux ve 16:8 aydınlatma süresinde 2,05 \pm 0,1 g/L ve minimum biyokütlenin 2 775 lux'te ve 8:16 aydınlatma süresinde 0,6 \pm 0,07 g/L olduğu belirtilmiştir (Khoeyi vd. 2012). 7 000 lux aydınlatma şiddetinde elde edilen 1,99 g/L biyokütle oranının Khoeyi vd. (2012) çalışma sonuçlarına göre daha az elde edilmesinin, aydınlatma sürelerindeki farklılıktan ve düşük (<7 000 lux) aydınlatma şiddetinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü 8 saatlik karanlık döngüde mikroalgler solunum reaksiyonları için fazla fotonlarını enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Bunun sonucunda 16 saat aydınlatma şiddetinde yeni baştan foton soğurmaları büyümeyi olumlu yönde etkilemekte ve büyümede artış gerçekleştirebilmektedir.

%15 CO₂ derişiminde ve 24 saat aydınlatma süresi boyunca; 7 000 lux aydınlatma şiddetinde ölçülen pH değerleri 4,38-6,04 aralığında, 11 000 lux aydınlatma şiddeti altında ölçülen pH değerleri 6,16-6,86 aralığında ve 15 000 lux aydınlatma şiddeti altında ölçülen pH değerleri ise 5,28-6,90 aralığında değişim göstermiştir. Farklı CO₂ derişimleri altında yetiştirilen *C. vulgaris* mikroalg kültürü için pH değerleri yaklaşık olarak %12 CO₂ için 5,7-7 arası, %4 CO₂ için 5,8-7,5 arası ve %0,04 CO₂ için 6,4-10,5 arasında olduğu belirtilmiştir (Hulatt ve Thomas 2011). Çalışmanın sonuçları ile kıyaslandığında, *C. vulgaris* mikroalginin Hulatt ve Thomas (2011)'in %12 CO₂ derişiminde belirledikleri pH (5,7-7) aralığında, 11 000 lux aydınlatma şiddetindeki verilerin %15 CO₂ derişiminde belirlenen pH (6,16 - 6,86) değerleri ile yakın oldukları görülmektedir. Her iki veride yüksek CO₂ derişimlerinden dolayı pH'nın 5-7 aralığında olduğu görülmektedir. Yeh vd. (2010) tarafından *C. vulgaris* ESP-31 suşu ile farklı karbon kaynağı derişimlerinde (NaHCO₃: 100- 1 600 mg/L) ve farklı aydınlatma şiddetleri altında (370 lux-2 960 lux) 5-10 pH aralığında türün önemli ölçüde inhibe olmadığı ve geniş pH tolerans aralığının (özellikle alkali pH toleransı için), *C. vulgaris* ESP-31 yetiştiriciliğinde iyi bir durum olduğu belirlenmiştir. Fakat çalıştıkları aydınlatma şiddetleri 7 000 lux aydınlatma şiddetine göre oldukça düşük seviyede kalmaktadır. Kong vd. (2010) genel olarak mikroalglerin yetiştirilme koşullarını inceledikleri çalışmada, sürekli olarak kültür ortamına yüksek derişimde CO₂ verildiğinde, mikroalg büyümesinin olumsuz etkilenmesi durumunda pH'nın büyük ölçüde düşebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada %15CO₂ derişiminde en iyi verimin elde edildiği 7 000 lux aydınlatma şiddeti için belirlenen 4,38- 6,04 pH aralığı bu bilgiyi doğrular niteliktedir. Fakat bu çalışmada pH aralığının büyüme üzerinde olumsuz bir etki yarattığı gözlemlenmemiştir.

24 saatlik aydınlatma süresinde 7 000 lux aydınlatma şiddeti altında yetiştirilen *C. vulgaris* mikroalgine ait maksimum spesifik büyüme oranı (μ_{max}); maksimum mikroalg derişimi (X_{max}) ve maksimum mikroalg üreme verimliliği (P_{max}) olarak hesaplanan büyüme parametreleri Tablo 6'da verilmiştir. Morais ve Costa (2007) farklı fotobiyoreaktörlerde, 12 saat aydınlatma süresinde ve 3 200 lux aydınlatma şiddetinde, %0,038, %6, %12 ve %18 CO₂ derişimlerinde *Chlorella kessleri* ile deneyler yapmışlardır. Çalışmada *Chlorella kessleri* için en iyi büyüme parametreleri %6 CO₂ derişiminde elde edilmiştir. Bu derişimde elde edilen maksimum spesifik büyüme oranı 0,267 gün⁻¹ ve maksimum biyokütle derişimi 0,087 g/L olarak belirlenmiştir. SET-I deneyleri sonucunda 24 saat aydınlatma süresi ve 7 000 lux aydınlatma şiddeti altında maksimum spesifik büyüme oranı 0,33 gün⁻¹ ve maksimum mikroalg derişimi 3,98 g/L olarak belirlenmiştir. Belirlenen değerler, Morais ve Costa (2007)'in çalışmalarında %6 CO₂ derişimde elde edilen değerlere kıyasla daha yüksektir. Morais ve Costa (2007)'in çalışmalarında 12 saatlik aydınlatma süresine göre kullanılan yüksek CO₂ derişimi (%6) büyümeyi azaltıcı etki yaratmış olabilir.

Tablo 6. Farklı aydınlatma şiddetlerinde *C. vulgaris* mikroalg kültürü için belirlenen kinetik parametreler (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂; 24 saat aydınlık) (Kinetic parameters for *C. vulgaris* microalgae culture at different illumination intensities (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂; 24-hour illumination))

Aydınlatma Şiddeti, lux	μ_{max} , 1/gün	X_{max} *, g/L	P_{max} , g/L/gün	R_{CO_2} , g/L/gün
7 000	0,33	3,98	0,37	11,96
11 000	0,36	1,61	0,19	5,57
15 000	0,45	1,06	0,15	4,84

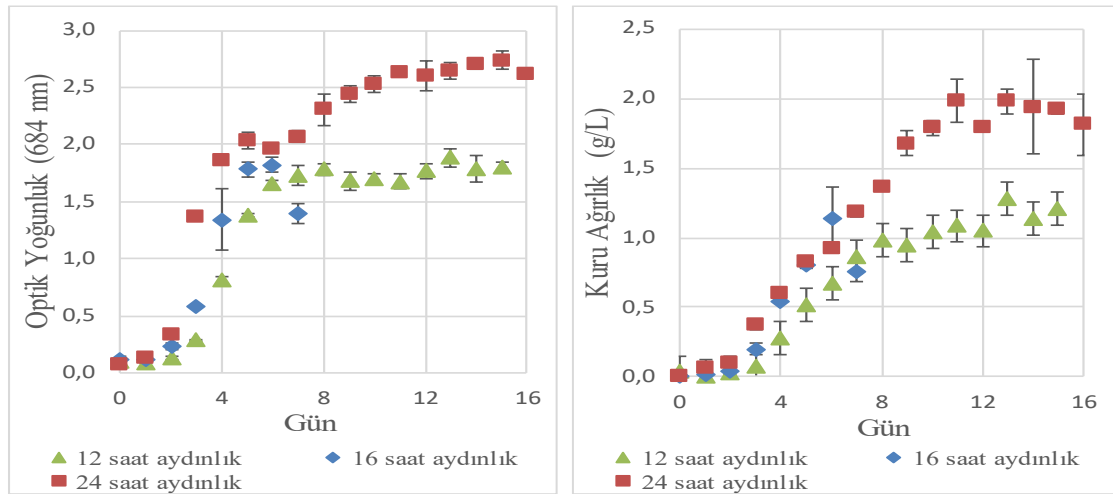
* X_{max} : maksimum biyokütle derişimi, g (kuru ağırlık)/L

4.2. Aydınlatma süresinin mikroalgal biyokütle büyüme verimine etkisi (Effect of illumination duration on microalgal growth)

SET-II deneyleri kapsamında fotobiyoreaktöre %15 CO₂ içeren gaz karışımı (%15 CO₂+ %3 O₂+ %82 N₂) 7 000 lux ışık akısı altında sisteme verilmiş ve 12 saat, 16 saat ve 24 saat aydınlatma sürelerinin mikroalg kültürünün büyümesi üzerine etkisi incelenmiştir. %15 CO₂ içeren gaz karışımının kullanıldığı, 12 saat, 16 saat ve 24 saat aydınlatma sürelerinin test edildiği deneyler için fotobiyoreaktörden alınan mikroalg numunelerinin OD ve kuru ağırlık değerlerinin zamanla değişimi Şekil 3'te verilmiştir. Kültürün başlangıç OD değerleri 684 nm dalga boyunda 12 saat, 16 saat ve 24 saat aydınlatma süreleri için sırasıyla 0,10, 0,12 ve 0,10 olarak ölçülmüş ve 2 gün boyunca kültürün OD değerlerinde ciddi bir artış görülmemiştir. Bu süre mikroalg kültürü için %15 CO₂ içeren gaz karışımına adaptasyon süresi olarak değerlendirilmiştir. İki günlük adaptasyon süresinin ardından mikroalg kültürü popülasyonu artmaya başlamıştır. En yüksek OD değerlerine 12 saat, 16 saat ve 24 saat aydınlatma süreleri için sırasıyla 13., 6. ve 15. günde ulaşılmıştır. 12 saat, 16 saat ve 24 saat aydınlatma süreleri için 684 nm dalga boyunda ölçülen en yüksek OD değerleri sırasıyla 1 885, 1 819 olmuştur. Deney sonuçlarına göre 7 000 lux aydınlatma şiddeti altında en iyi büyümenin 24 saat sürekli aydınlatma süresinde gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Nautiyal vd. (2014), normal hava ortamında 2 000 lux aydınlatma şiddetinde ve 25 ± 1 °C'de *Spirulina*, *Chlorella* ve havuz suyu algi ile yaptıkları çalışma sonucunda elde ettikleri maksimum biyokütle oranlarının sırasıyla *Chlorella* için 1,35 g/L, *Spirulina* için 0,94 g/L ve havuz suyu algi için 0,82 g/L olduğu belirtmişlerdir. Nautiyal vd. (2014) çalışma sonuçlarına göre maksimum biyokütle veriminin (1,35 g/L) sağlandığı aydınlatma şiddeti ile çalışmada belirlenen maksimum biyokütle veriminin (1,99 g/L) arasında ciddi bir fark gözlenmemiştir. Nautiyal vd. (2014) hem düşük aydınlatma şiddeti hemde düşük CO₂ derişiminde çalıştıkları için optimum büyüme sağlandıkları düşünülmektedir. Aynı şekilde, yapılan çalışmalar sonucunda yüksek aydınlatma şiddetine paralel olarak (7 000 lux) yüksek CO₂ derişiminde (%15) çalışılmasıyla optimum büyüme veriminin sağlandığı, inhibe etkisinin azaltıldığı ve yakın biyokütle değerlerinin elde edildiği tahmin edilmektedir.

Wong vd. (2016), farklı tür fotobiyoreaktörlerde (kabarcıklanma, hava kaldırma, gözenekli hava kaldırma) kullanılarak *C. vulgaris* mikroalgini, biyokütle ekimi ve lipit üretimini incelemek için 9 000 lux aydınlatma şiddetinde ve normal hava koşulları altında 16:8 aydınlatma süresinde yetiştirmişlerdir. Yetiştirme sonuçlarına göre elde edilen Kabarcıklı PBR'deki maksimum biyokütle konsantrasyonu 0,78 g/L iken, hava kaldırmalı PBR'nin değeri 0,09 g/L olarak belirlenmiştir. Wong vd. (2016), çalıştıkları yüksek aydınlatma şiddetine kıyasla oldukça düşük CO₂ derişiminde çalışmalarında, 16 saatlik aydınlatma süresinin optimum ışık yoğunluğunun elde edilememesinden dolayı büyüme üzerinde olumsuz etki yarattığı ve buna bağlı olarak belirlenen maksimum biyokütle değerinin de oldukça düşük olduğu görülmektedir. 7 000 lux altında iyi bir büyüme sağlanması ile elde edilen 1,99 g/L maksimum biyokütle oranının çok daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 3. Farklı aydınlatma sürelerinde fotobiyoreaktörden alınan mikroalg numunelerinin OD ve kuru ağırlık değerlerinin zamanla değişimi (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂; 7 000 lux) (Change of OD and dry weight values of microalgae samples taken from photobioreactor at different illumination durations (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂; 7 000 lux))

12 saat, 16 saat ve 24 saat aydınlatma süreleri için başlangıç kuru ağırlık değeri 0,01 g/L'dir. 12 saat aydınlatma süresinde 13. günün sonunda alg kültürü derişimi yaklaşık 130 kat artarak en yüksek seviyesine (1,28 g/L) ulaşmıştır. 16 saat aydınlatma süresinde ise en yüksek derişim (1,14 g/L) 6. günün sonunda elde edilmiştir. Bu değer 24 saat aydınlatma süresinde 11. günde 1,99 g/L (başlangıç kuru ağırlık değerine oranla yaklaşık 200 kat artışla) olarak belirlenmiştir.

12 saat aydınlatma süresi boyunca 13 468 lux ($182 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) aydınlatma şiddetinde yetiştirilen *C. vulgaris* mikroalginin kuru ağırlık değeri 0,27 g/L olarak hesaplanmıştır (Scarsella vd. 2010). Scarsella vd. 2010, 12 saatlik aydınlatma süresinde 13 468 lux altında 0,27 g/L kuru ağırlık oranı elde etmişlerdir. En iyi verim sağlanan 24 saat sürekli aydınlatmada ve 7 000 lux aydınlatma şiddetinde belirlenen 1,99 g/L değerine göre düşük olduğu görülmektedir. 12 saatlik aydınlatma periyoduna göre aydınlatma şiddetinin yüksek olması, aydınlatma süresinin kısa olması ile foton enerjisinin düşük seviyede kalmasının fotosentetik gelişimi inhibe ettiği ve biyokütle verimini azalttığı düşünülmektedir.

Rendon vd. (2013), *C. vulgaris*'in beyaz, mavi, kırmızı ve kırmızı-mavi ışıklar altında %0,04 CO₂ derişimi ile başlayıp, %8,5'e yükselen CO₂ derişimleri altında ve 7 622 lux aydınlatma şiddetinde büyümesini incelemişlerdir. Tüm ışık kaynakları altında artan CO₂ derişimine paralel olarak biyokütle üretiminde de artış görülmüştür. Maksimum biyokütle üretimi (1,59 g/L) %8,5 CO₂ derişiminde beyaz ışık altında elde edilmiştir. Sırasıyla, kırmızı ve kırmızı+mavi ışık altında biyokütle üretimi sırasıyla 1,53 g/L, 0,45 g/L ve 1,27 g/L olarak belirlenmiştir. Rendon vd. (2013), çalışmalarında elde ettikleri 1,59 g/L oranındaki biyokütle değerinin 1,99 g/L değerinden düşük olduğu görülmektedir. Birbirine yakın aydınlatma şiddetlerine rağmen, benzer aydınlatma şiddetlerine kıyasla çalışmada yüksek CO₂ derişiminin (>%8,5) olduğu ortamda daha iyi bir büyüme verimi sağlandığı düşünülmektedir.

Sung vd. (1998) *C. vulgaris* KR-1 türünü %10 ile %70 arasında değişen farklı derişim oranlarında CO₂ ile 25 °C' de, 24 saat aydınlatma süresinde 14 800 lux ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) aydınlatma şiddetinde çalışmışlardır. Maksimum büyüme oranı %10 CO₂ içeren kültürde bulunmuş, ancak yüksek büyüme oranları ve hücre konsantrasyonları %30 ve %50 CO₂ derişimlerinde de devam etmiştir. Ayrıca, mikroalg büyümesinde adaptasyon süresinin daha yüksek CO₂ derişimleri altında daha uzun sürdüğü gözlemlenmiştir. %70 CO₂ derişiminde büyüme oranının çok az olmasına rağmen, büyümenin devam ettiği ve 6. günün sonunda 0,71 g /L' ye ulaştığı; bu değer başlangıç hücre biyokütlesine göre yedi kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlardan yola çıkarak; *C. vulgaris* KR-1'in yüksek CO₂ derişimlerine karşı oldukça dayanıklı bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. %10 CO₂ ile kültürlenen KR-1'in doğrusal büyüme oranı yaklaşık 1,15 g/L/gün den 6 günlük kültürasyonun sonunda 5,7 g/L'ye ulaşması da *C. vulgaris* sp'nin yüksek yoğunluklu kültür için uygun olduğunu ortaya koymuştur. Sung vd. (1998) sonuçlarının 6. günün sonunda %10 CO₂ derişimi için 5,7 g/L seviyesine çıkması, deneyler sonucunda elde edilen büyüme değerlerinin üstündedir. Bu duruma sebep olan etkenin *C. vulgaris* KR-1 türünün laboratuvar ortamında izole edilmesi olabilir.

SET-II kapsamında yapılan deney sonuçlarına ait büyüme parametreleri Tablo 7'de verilmiştir. En iyi verim sağlayan 24 saat aydınlatma süresinde elde edilen maksimum spesifik büyüme oranı (μ_{max}) 0,45 gün⁻¹, maksimum biyokütle derişimi 3,98 g/L ve maksimum biyokütle üreme verimliliği 0,19 g/L/gün olarak elde edilmiştir. Kao vd. (2014) çalışmalarında bir çelik fabrikasının baca gazını kullanarak fotobiyoreaktörlerde *Chlorella* sp MTF-15 suşu yetiştirip, algal biyokütle ve lipit verimliliğini incelemişlerdir. 22 200 lux aydınlatma şiddetinde, % 25 CO₂ derişimi altında yapılan deneyde elde edilen maksimum spesifik büyüme hızı (0,49 gün⁻¹) bu çalışmada elde edilen maksimum spesifik büyüme hızına (0,45 gün⁻¹; Tablo 7) oldukça yakındır.

Tablo 7. Farklı aydınlatma sürelerinde *C. vulgaris* mikroalg kültürü için belirlenen kinetik parametreler (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂; 7 000 lux) (Kinetic parameters for *C. vulgaris* microalgae culture at different illumination durations (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂; 7 000 lux))

Aydınlatma Süresi, saat	μ_{max} , 1/gün	X_{max} , g/L	P_{max} , g/L/gün	R_{CO_2} , g/L/gün
12	0,29	1,28	0,12	3,95
16	0,45	1,14	0,19	5,90
24	0,45	3,98	0,19	10,26

%15 CO₂ derişimi ve farklı aydınlatma süreleri altında (12:12, 16:8 ve 24:0 aydınlık/karanlık) yapılan deneyler süresince ölçülen pH değerleri; 12 saat aydınlıkta 4,62– 6,83, 16 saat aydınlıkta 5,97– 6,90 ve 24 saat aydınlıkta 6,04– 4,54 aralığında değişim göstermiştir. Daliry vd. (2017) *C. vulgaris*'ten biyoyakıt elde etmek amacıyla yaptıkları çalışmada biyokütle ve lipit açısından en iyi verimi sağlayan yetiştirme parametrelerini incelemişlerdir. pH 9-10 aralığında, 16 saat aydınlatma süresinde, 5 000 ile 7 000 lux aydınlatma şiddeti ve 200 mL/dk havalandırma debisinde en iyi fiziksel koşulların sağlandığını belirlemişlerdir. Daliry vd (2017), en iyi büyümenin pH 9-10 aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise en iyi büyümenin pH 6,04– 4,54 aralığında olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında, farklı aydınlatma sürelerinin ve gaz akış oranlarının pH seviyelerinde farklılık yarattıkları ve bu yüzden verilerde uyuşma sağlanmadığı düşünülmektedir.

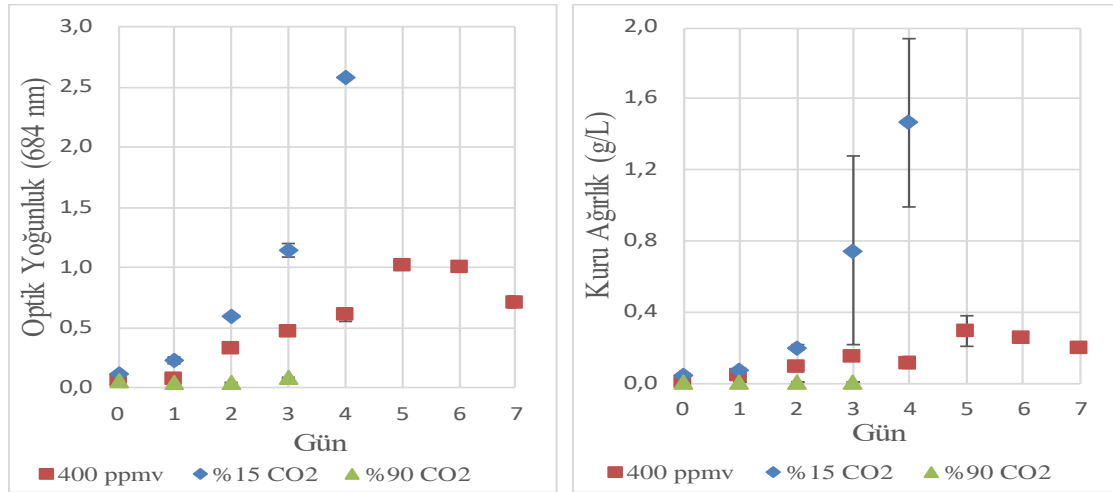
4.3. CO₂ derişiminin mikroalg biyokütle büyüme verimine etkisi (Effect of CO₂ concentration on microalgal growth)

Fototrofik mikroalgler, fotosentez prosesinin gerçekleşebilmesi için karbon kaynağının tedarğini ve biyokimyasal olarak bir nihai ürün oluşumunu sağlamaktadırlar. Bu noktada optimum gelişim göstermeleri ise, ortamda yeterli miktarda çözünmüş madde bulunmasına bağlıdır. Çözünmüş madde miktarının optimal seviyeye yükselmesiyle birlikte, mikroalglerin gelişebilmeleri ve buna bağlı olarak lipit üretme kapasitelerinde artış oranı da yükselmektedir. Sisteme verilen gazın ortamda sağladığı türbülans etkisi ortamdaki mikroalglerin çözünmüş maddeleri, verilen gazları ve ışığı eşit alabilmelerine imkan sağladığı için gelişmeyi olumlu yönde etkileyici unsur olarak ortaya çıkmaktadır. Fakat ortamdaki gaz miktarının yüksek seviyelere çıkması büyümeyi inhibe edici bir etki yaratmaktadır. Bunun nedeni olarak, kültür içerisinde kullanılmayan CO₂'nin karbonik aside (H₂CO₃) dönüşmesi ve buna bağlı olarak kültürün pH değerinin düşmesi öne sürülebilir (Zhu vd. 2016; Sibi vd. 2016). Bu nedenle, en iyi verim alınacak şekilde gelişmiş biyokütle ve lipit üretiminin elde edilebilmesi için optimum seviyelerde CO₂ ve çözünmüş madde miktarının sağlanabilmesi gerekmektedir.

SET-III kapsamında yapılan deneylerde 7 000 lux aydınlatma şiddetinde, sürekli aydınlatma ile en iyi verimi sağlayan CO₂ derişiminin tespitine yönelik hacimce 400 ppm, %15 ve %90 CO₂ içeren gaz karışımları altında deneyler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4). 400 ppm_v CO₂ içeren gaz karışımı altında *C. vulgaris* mikroalg kültürünün başlangıç kuru ağırlık değeri 0,01 g/L'dir. 5. günün sonunda kuru ağırlık derişimi 29 kat artarak yaklaşık 0,3 g/L olmuştur. 7. gün sonunda 5. gün OD değerine göre bir düşüş gerçekleşmiş ve kültür ölüm fazına geçmiştir. 7. günün sonunda elde edilen kuru ağırlık derişimi 0,2 g/L olarak belirlenmiştir. Deneye pH 5,2 civarında başlanılmış ve deney sonuna kadar pH değeri 10,5 (alkali) seviyesine doğru yükselmiştir. pH koşullarının iyi olmasına rağmen fotobiyoreaktöre verilen 400 ppm_v CO₂ derişimi yüksek mikroalg üretimi için yeterli olmamıştır. %15 CO₂ içeren gaz karışımı altında *C. vulgaris* mikroalg kültürü iyi bir büyüme eğrisi yakalamıştır. %15 CO₂'de kuru ağırlık değeri (max 1,47 g/L) 400 ppm_v'e göre 5 kat fazla verimle elde edilmiştir. Fotobiyoreaktöre verilen gaz karışımındaki CO₂ oranı %90'a çıkarıldığında ortam pH'sının 6'nın altına düştüğü, 2. günün sonunda alg hücrelerinin topaklaşmaya başladığı ve fotobiyoreaktörün dibine çöktüğü gözlemlenmiştir. Bu durum, fotobiyoreaktöre verilen yüksek oranda CO₂ gazının mikroalgler tarafından kullanılmadığını göstermektedir. Suda çözünen CO₂ gazı karbonik aside dönüşerek ortam pH'sını düşürmüş, düşük pH nedeniyle de asidik ortam mikroalg kültürünün inhibe olmasına neden olmuş olabilir. Yüksek oranda CO₂ içeren gaz karışımlarının fotobiyoreaktöre verildiği deneylerde ortamın tamponlanması ve mikroalg hücrelerinin daha fazla çözünmüş CO₂ gazını bünyelerine alıp kullanabilmeleri için optimum pH değerinde bir ortamın sağlanması gerekmektedir. Mikroalg kültürünü doğrudan yüksek düzeyde CO₂ içeren gaz karışımına maruz bırakmanın büyümeyi engellediği görülmüştür. Bu durumun alg kültürüne verilen gaz karışımındaki CO₂ gazının kademeli olarak artırılması ile önlenebileceği düşünülmektedir.

Literatür çalışmalarında belirtilen optimum CO₂ derişimlerinin (Hu vd., 2016; Kitaya vd. 2005; Morais ve Costa 2007; Sung vd. 1998) oldukça üst sınırında olan %90 CO₂ derişiminin büyümeyi inhibe edici bir etki yarattığı görülmüştür. %90 CO₂ derişiminde 3 gün boyunca deneye devam edilmiş, fakat hücreler sağlıklı bir yeşil renge dönüşmek yerine OD değerlerinin 0,08 seviyelerinde kalması nedeniyle büyümenin inhibe olmasından dolayı saf suya yakın bir renge dönüşmüş ve bu durumda deneye son verilmiştir. Şekil 4'te verilen kuru ağırlık deney sonuçlarına bakıldığında en iyi kuru ağırlık değerinin önemli bir farkla %15 CO₂ derişimi altında elde edildiği görülmektedir. Maksimum kuru ağırlık değerleri 400 ppm_v derişiminde, %15 CO₂ derişiminde ve %90 CO₂ derişiminde sırasıyla; 0,3 g/L, 1,5 g/L ve 0,12 g/L olarak hesaplanmıştır.

Kitaya vd. (2005), sıcaklığın etkilerini araştırdıkları çalışmaları kapsamında mikroalglerin hücresel çoğalmasında CO₂/O₂ derişimleri ve aydınlatma şiddetini incelemişlerdir. Mikroalgleri, 25°C ile 33°C arasında beş sıcaklık seviyesi, %10 ile %30 arasında üç seviye CO₂ derişimi ve 20 µ mol m⁻² s⁻¹ (1 480 lux) ile 200 µ mol m⁻² s⁻¹ (14 800 lux) aydınlatma şiddetlerinde kültürlemişlerdir. Sonuçlar, mikroalg hücrelerinin en yüksek çoğalma oranının 27-31°C sıcaklıkta, %4 CO₂ derişiminde, %20 O₂ derişiminde ve yaklaşık 7 400 lux (100 µ mol m⁻² s⁻¹) aydınlatma şiddetinde olduğunu göstermiştir. Anjos vd (2013) *C. vulgaris* ile %2, %6 ve %10 CO₂ derişimlerinde ve 5 180 lux (70 µ mol m⁻² s⁻¹) aydınlatma şiddeti altında deneyler gerçekleştirmişlerdir. En iyi büyümenin %6 CO₂ derişiminde ve 5 180 lux aydınlatma şiddetinde olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada %15 CO₂ ve 7 000 lux aydınlatma şiddeti altında yapılan deneylerden elde edilen verilerle net bir şekilde kıyas yapılamamaktadır çünkü %15 CO₂ derişiminde 5 180 lux aydınlatma şiddeti altında yapılan bir çalışmada ışık kaynağının yeterli olmayabileceği ya da inhibe etkisi yaratabileceği düşünülmektedir. Ryu vd. (2009), *Chlorella sp. AG10002* suşu ile %0,5 - %5 aralığında CO₂ derişimini kademeli arttırarak, 2 960 lux aydınlatma şiddeti altında çalışmışlardır. Çalışmalarının sonucunda maksimum üreme verimliliği (0,34 g/L/gün), maksimum kuru ağırlık (2,02 g/L) ve maksimum CO₂ fiksasyon oranının (0,35 g CO₂/gün) %5 CO₂ derişimde sağlandığı belirlenmiştir. Elde edilen biyokütle derişiminin (2,02 g/L), bu çalışmada elde edilen 1,99 g/L ile çok yakın değerlerde oldukları görülmektedir. Benzer oranlarının elde edilmesinin sebebi olarak, seçilen aydınlatma süreleri ve aydınlatma şiddetlerinin optimum büyümeyi sağladıkları düşünülmektedir.



Şekil 4. Farklı CO₂ derişimleri altında fotobiyoreaktörden alınan mikroalg numunelerinin OD ve kuru ağırlık değerlerinin zamanla değişimi (7 000 lux; 24 saat aydınlatma) (Change of OD and dry weight values of microalgae samples taken from photobioreactor at different CO₂ concentrations (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂; 7 000 lux; 24-hour illumination))

400 ppm_v CO₂ derişiminde ölçülen pH değerleri 5,18 ile 10,46 aralığında; %15 CO₂ derişiminde ölçülen pH değerleri 6,02 ile 6,83 aralığında ve %90 CO₂ derişiminde ölçülen pH değerleri 5,55 ile 5,88 aralığında değişim göstermiştir. Çalışılan CO₂ derişimlerine göre ölçülen pH aralıkları; Kong vd. (2010), Hulatt ve Thomas (2011) ve Yeh vd. (2010) tarafından elde edilen bulgular ile paralellik göstermektedir. Ortam havasını temsilen 400 ppm_v CO₂ derişimi deneylerinde ölçülen pH değerleri ve %15 CO₂ ile %90 CO₂ derişimlerinde (>%5 CO₂) yapılan deneylerde ölçülen pH değerlerinin bu çalışmada belirtilen pH aralıklarına oldukça yakın oldukları görülmektedir.

SET-III kapsamında en iyi verim eldesi 24 saat aydınlatma süresinde, %15 CO₂ derişiminde ve 7 000 lux aydınlatma şiddetinde gözlenmiştir. Deney sonuçlarına göre belirlenen büyüme parametreleri Tablo 8'de verilmektedir. Barahoei vd. (2020) yaptıkları çalışmada %7 CO₂ derişimi altına kabarcık boyutlarının küçük olduğu koşullarda biyokütle derişimini 4 244 mg/L olarak elde etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen maksimum biyokütle derişimi (1,46 mg/L; Tablo 8) ile kıyaslandığında, elde edilen yüksek biyokütle derişimi Barahoei vd. (2020) çalışmalarında kullanılan küçük kabarcık çapının CO₂ tutma verimliliği üzerindeki olumlu etkisi ile açıklanabilir.

Tablo 8. Farklı CO₂ derişimleri altında *C. vulgaris* mikroalg kültürü için belirlenen kinetik parametreler (7 000 lux; 24-hour illumination) (Kinetic parameters for *C. vulgaris* microalgae culture at different CO₂ concentrations (7 000 lux; 24-hour illumination))

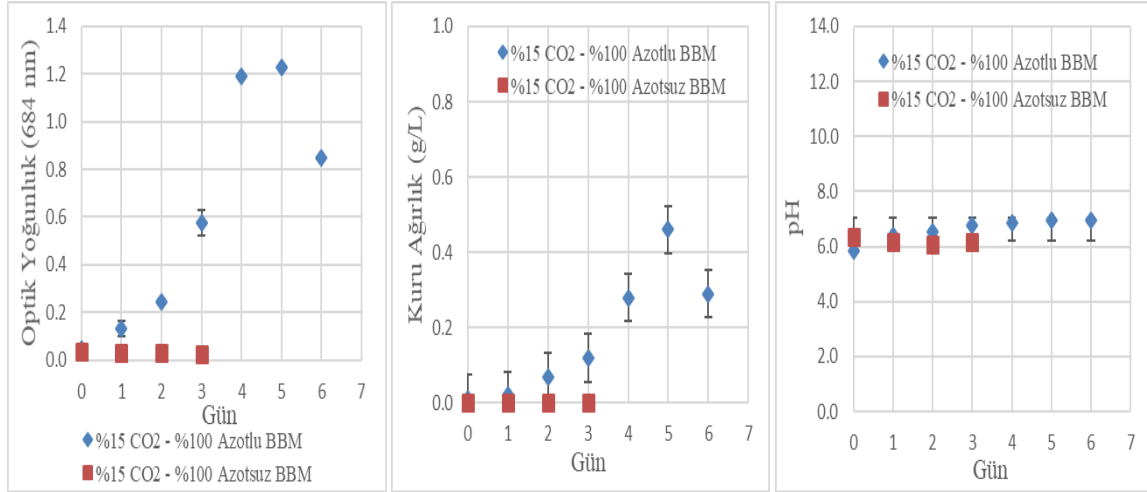
CO ₂ , %	μ_{max} , 1/gün	X_{max} , g/L	P_{max} , g/L/gün	R_{CO_2} , g/L/gün
0,04*	0,39	0,29	0,06	10,63
15	0,31	1,46	0,35	53,72
90	-	0,01	0,00	0,37

* 400 ppm_v

4.4. Azot stresinin mikroalgal biyokütle büyüme verimine etkisi (Effect of nitrogen stress on microalgal growth)

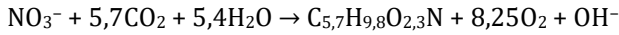
SET-I, SET-II ve SET-III deneyleri sonucunda elde edilen en iyi CO₂ giderim parametreleri (7 000 lux aydınlatma şiddeti, 24 saat süre aydınlatma şiddeti ve %15 CO₂ oranı) ile SET-IV deneyleri gerçekleştirilmiştir. "SET-IV: Azot Stresi" kapsamında ilk aşamada, %100 azotlu (BBM besiyeri ile) ve %100 azotsuz (besiyerindeki tüm azot içeren bileşenler (NaNO₃, EDTA ve Co(NO₃)₂.6H₂O) çıkarılmıştır) ortamlarda mikroalg yetiştirme deneyleri tamamlanmış olup, deneyler sonunda alınan numunelerde RuBisCO ve lipid ölçümleri yapılmıştır.

Şekil 5'te verilen OD ve kuru ağırlık (biyokütle) değerleri incelendiğinde %15 CO₂ derişimi altında %100 azotlu ortamda mikroalglerde normal bir büyüme eğrisinin olduğu görülürken, %100 azotsuz (%100 azot stresi) ortamda yetiştirilen mikroalglerin inhibe olup, büyümedikleri gözlemlenmiştir. Biyokütle derişimi, artan azot miktarı ile doğru orantılı bir ilişki içerisinde (Markou vd. 2017, Yodsuwan vd. 2017). Azotsuz ortam deneyinde azalan azot miktarına karşılık olarak OD değerlerinde ve biyokütle derişiminde azalma gerçekleşmesi stres ortamındaki yetiştirme sonucunda beklenen bir durumdur.



Şekil 5. %15 CO₂ derişiminde %100 azotlu ve %100 azotsuz ortamda fotobiyoreaktörden alınan mikroalg numunelerin OD, kuru ağırlık ve pH değerlerinin zamanla değişimi (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂) (Change of OD, dry weight and pH values of microalgae samples taken from photobioreactor at 15% CO₂ concentration under 100% nitrogen and 100% nitrogen stress conditions (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂))

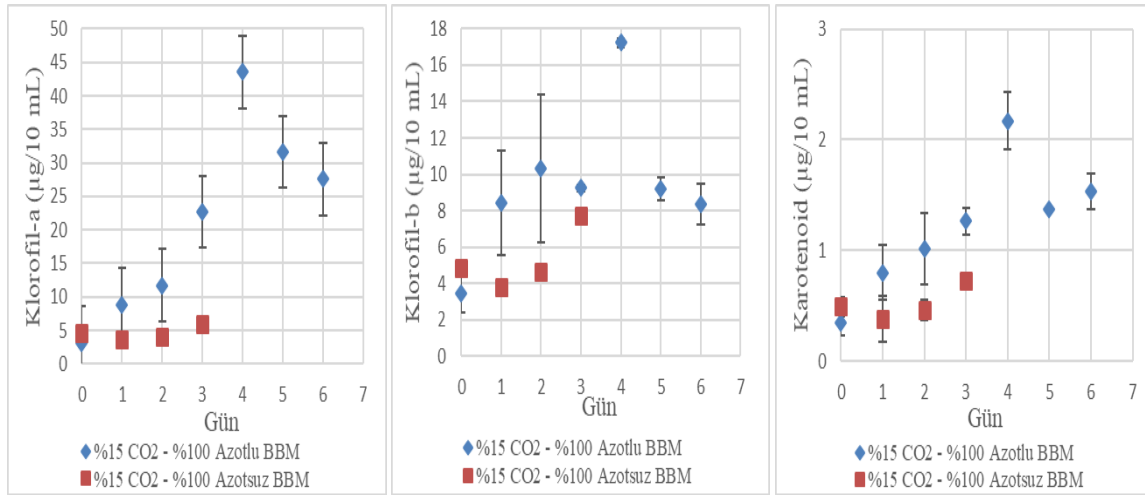
%15 CO₂ derişimi altında yapılan %100 azotlu ve %100 azotsuz deneylerde ölçülen pH değerlerine ait grafik Şekil 5'te verilmiştir. Azotsuz ortamın pH değerlerinin optimum alg büyümesini sağlayacak değerlere ulaşmadığı ve tam tersine bir düşüş gerçekleştiği ve alglerin büyümediği görülmektedir. Nitrat (NO₃⁻) kullanımı ile kültür ortamının pH değeri ve mikroalg büyümesi arasında doğrusal bir ilişki vardır. Fotosentez aşamasında alglerin nitratı bünyelerine alıp kullanmaları sonucunda ortam pH'sında artış gözlenmektedir (Markou vd. 2017). Teorik olarak bir mol NO₃⁻ kullanımı karşılığında, 1 mol hidroksit (OH⁻) üretimi gerçekleşmektedir (Rashid vd. 2014; Song vd. 2011). Gerçekleşen tepkime Tepkime 2'de gösterilmektedir.



(Tepkime 2)

Fazla NO₃⁻ kullanımı sonucunda fazla OH⁻ üretilmesi ile pH değeri 10'un üzerine çıkabilmektedir. pH 10'un üzerinde alglerin büyümelerini inhibe edici etki gösterebilmektedir. Bunun yanısıra NO₃⁻ eksikliğine bağlı olarak da pH değerinde düşüş gerçekleşmektedir. NO₃⁻ miktarına bağlı olarak, optimum değerlerde büyümeyi sağlayabilmek için pH dengelenmesi daha iyi bir verim eldesi sağlayabilmektedir (Elcik ve Çakmakçı 2017).

%15 CO₂ derişiminde %100 azotlu ve %100 azotsuz ortamda fotobiyoreaktörden alınan mikroalg numunelerin klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid değerlerinin zamanla değişimi Şekil 6'da verilmiştir. Şekil 6'da verilen klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid değerlerinin Şekil 5'te verilen OD değerleri ile paralellik gösterdikleri net bir şekilde görülmektedir. İyi bir büyüme, iyi bir OD ve iyi bir klorofil değeri eldesi demektir. SET-IV deneylerinin ilk aşaması olan %15 CO₂ derişimi altında %100 azotlu ortamda hızlı bir büyüme ve hızlı bir ölüm ile deney sonuçlandırılırken, azotsuz ortamda alglerin inhibe olması nedeniyle deney kısa sürede sonlandırılmıştır. Azotsuz ortamda algler büyütüldüklerinde; protein, karotenoid ve klorofiller gibi azot bakımından zengin biyomoleküllerin üretiminde azalma meydana gelmektedir. Tam tersi olarak da, karbonhidrat ve lipitler gibi karbon bakımından zengin biyomoleküllerin birikiminde stres ortamında artış gerçekleşmektedir. Fakat azot stresi ortamında istenilen (örneğin lipit) bileşiğın miktarında artış gerçekleşse de biyokütle oranında azalma olması yapılan çalışmalar neticesinde ortaya konulmuştur (Markou vd. 2017; Münkel vd. 2013; Stephenson vd. 2010). SET-IV kapsamında yapılan azotlu ve azotsuz ortamda yetiştirilen alglerden elde edilen OD, kuru ağırlık (biyokütle), klorofil ve lipit değerleri bu verileri doğrulamaktadır.



Şekil 6. %15 CO₂ derişiminde %100 azotlu ve %100 azotsuz ortamda fotobiyoreaktörden alınan mikroalg numunelerin klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid değerlerinin zamanla değişimi (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂) (Change of chlorophyll-a, chlorophyll-b and carotenoid values of microalgae samples taken from photobioreactor at 15% CO₂ concentration under 100% nitrogen and 100% nitrogen stress conditions (%15 CO₂+%3 O₂+%82 N₂))

Fotosentetik hücrelerde soğurulan ışık miktarı optimum doğunluk seviyesini aştığı zaman adaptasyon işlemi bu noktada kritik bir hal alabilmektedir. Fotosentez süresince hücrelerde devam eden enerji akışını düşürmek amacıyla klorofil ve karotenoid gibi hücresel pigmentlerin içerik ve bileşimlerinde değişimler meydana gelmektedir. Karotenoidler, fotosentez esnasında fotonların yakalanması ve ışığın zararlı etkilerinden hücrenin korunması yönünden iki temel fonksiyona sahiptir (Kendirlioğlu 2012). Karotenoidler ayrıca, klorofiller gibi ışığın soğurularak klorofil-a'ya aktarılması ve ışık ve O₂ karşısında klorofillerin parçalanmasının (fotooksidasyon) önlenmesinde önemli etki sağlamaktadır. Bunu yanında azot stresi altında karotenoidler kloroplast yüzeyinde birikim yapıp, alge turuncu-kırmızı rengini vererek, azot yetersizliğinin fiziksel yönde etkisinin bilinmesine yardımcı olmaktadır (Kendirlioğlu 2012). Bu nedenle ortamdaki büyümenin iyi olduğu koşullarda klorofil-a ve klorofil-b pigmentlerine göre karotenoidler de paralel olarak değişim göstermektedir.

Pigment tarafından soğurma, ışık spektrumunun belirli kısımlarında daha yoğun olmaktadır. Pigmentin maksimum absorbans aralığı içinde bir dalga boyunun seçilmesinde, en büyük sinyali vermesi beklenir, ancak aynı zamanda hücrelerin pigment içeriği değiştğinde en büyük hatayı da yine seçilen bu dalga boyu aralığında vermektedir. Healey (1975) yaptığı bir çalışma kapsamında; klorofil-a'nın kuru ağırlığa oranlarının tür kompozisyonundaki, sıcaklığındaki, besleyicideki ve ışık mevcudiyetindeki değişikliklerle 30 kattan fazla değiştğini bildirmiştir. Bu çalışmada elde edilen pigment verileri bu görüşü doğrular niteliktedir. Büyüme parametrelerinde mikroalg gelişim fazlarına göre elde edilen veriler, klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid değerlerinde görülememiştir. Fotobiyoreaktörde sıcaklık ayarı olmasına rağmen ısı değişimi olabilmekte ve gaz derişimleri değişim gösterebilmektedir. Bunların etkisiyle hassas olan pigmentlerin yapısında olan değişikliklerin, diğer parametrelere kıyasla daha çok etkilendiği ve değişim gösterdiği düşünölmektedir.

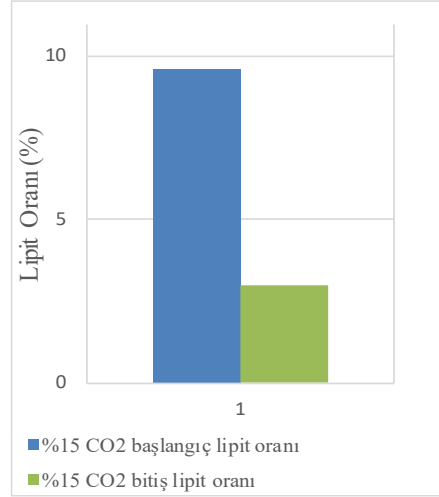
Kendirlioğlu vd. (2015) farklı aydınlatma sürelerinin (16:8, 17:7, 18:6, 19:5 ve 20:4 saat aydınlık/karanlık) *C. vulgaris* mikroalginin 2 000 lux aydınlatma şiddeti altındaki büyüme sürecinde hücre sayısı, klorofil ve protein miktarları üzerindeki etkisini incelemiştir. Maksimum toplam klorofil (klorofil-a ve klorofil-b) miktarı 235,53 µg/mL olarak 20:4 saatlik aydınlatma süresinde elde edilmiştir. Elde edilen maksimum toplam klorofil-a ve klorofil-b değerinin (235,53 µg/mL), bu çalışmada belirlenen toplam klorofil-a ve klorofil-b değerinden (140 µg/10 mL) yüksek olduğu görölmektedir. Bunun nedeni olarak, bu çalışmada kullanılan yüksek CO₂ derişiminin ve yüksek aydınlatma şiddetinin pigment değerlerinin azalmasında olumsuz etki yarattığı düşünölmektedir.

Hu vd. (2016) %10 CO₂ altında, pH 7,8 değerinde ve 4 070 lux aydınlatma şiddetinde, 12:12 aydınlık/karanlık periyodunda yetiştirilen on farklı *C. vulgaris* suşlarına ait klorofil-a verileri içerisinde en yüksek derişimin *FACHB-729* (*C. vulgaris regularis* var. *minima*), *FACHB-484* (*C. vulgaris* sp.), *FACHB-752* (*C. vulgaris* 64.01) ve *ESP-6* (*C. vulgaris*) kültürleri için sırasıyla 6,67 mg/L, 5,42 mg/L, 4,20 mg/L ve 4,05 mg/L olduğunu belirlemiştir. Hu vd. (2016) çalışmalarında elde edilen pigment değerlerinin bu çalışmada elde edilenlerden daha fazla olmasının sebebi pH'ın 7,8 seviyesinde olması ve bu durumun büyümei inhibe etmemiş olması olabilir.

Nautiyal vd. (2014), %0,04 CO₂ derişiminde, 12 saatlik aydınlatma süresinde ve 2 000 lux aydınlatma şiddeti altında, 25 ± 1 °C'de *Spirulina*, *Chlorella* ve havuz suyu algi ile yaptıkları çalışmada, en yüksek klorofil-a içeriğine *Chlorella*'nın (3,88 µg/mL) sahip olduğu belirlenmiştir. Nautiyal vd. (2014) tarafında elde edilen klorofil-a değerlerinin, bu çalışmada elde edilenlere kıyasla daha yüksek olmaların da yüksek aydınlatma şiddetine göre

seçilen düşük CO₂ derişiminin daha iyi çözünürlük sağlarnasının ve yüksek foton enerjisini bünyesine alan mikroalglerin 12 saatlik karanlık sürede solunuma geçerek inhibe etkisini azaltmasını etkili olduğu tahmin edilmektedir.

C. vulgaris mikroalgi yapısındaki lipit oranı, alg kültürü fotobiyoreaktöre aktarılmadan önce ve fotobiyoreaktörde %15 CO₂ derişiminde ve %100 azotlu ortamda yetiştirildikten sonra ayrı ayrı belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 7'de verilmiştir. Görüldüğü üzere; %15 CO₂ derişimindeki gelişim sonucunda mikroalg kültürünün lipit içeriğinde düşüş gerçekleşmiştir. Biyokütle artışına ters orantılı olarak, kültürün lipit üretiminde azalma meydana gelmektedir (Stephenson vd. 2010).



Şekil 7. %15 CO₂ derişiminde %100 azotlu ortamda fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen deney öncesinde ve sonrasında *C. vulgaris* mikroalg kültürüne ait lipit oranları (Lipit percentages of *C. vulgaris* microalgae culture before and after cultivation at 15% CO₂ concentration under 100% nitrogen condition)

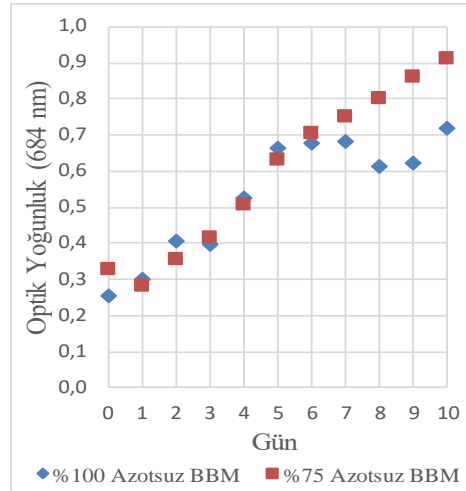
%15 CO₂ derişiminde, azot stresi altında yapılan deneylerde algler büyümemiş ve deneyler sonlandırılmıştır. Bu duruma, mikroalg kültürüne yüksek derişimde CO₂ verildiğinde mikroalg büyümesini etkileyen ağırlıklı olarak iki faktörün neden olduğu düşünülmektedir:

- 1) Mikroalglerin CO₂ alım kapasitesi (hücreye karbon tedariki) ve
- 2) pH

Yüksek gaz akışının sistemde yüksek bir oranda hızlı karışıma sebep olması neticesinde, CO₂ gazının fotosentez için hücre içine alınmasını engellediğine dair literatür çalışmaları bu bilgiyi doğrulamaktadır (Chisti 2007; Münkel vd. 2013; Stephenson vd. 2010). Azot stresi koşullarında mevcut besin yetersizliğinin yanısıra 100 mL/dk gaz akış oranında fotobiyoreaktöre yüksek CO₂ (%15) içeren gaz karışımının verilmesi büyüme üzerinde inhibe edici etki yaratabilmektedir. Bu koşullar, büyüme ortamının tipik olarak algler tarafından tolere edilemeyen asitleşmesine yol açabilmektedir. Ortamın pH değerinin düşmesi hücre dışı karbonik anhidrazın aktivitesini azaltmakta ve hücre büyümesini engellemektedir (Aslam vd. 2017; Tang vd. 2011). Birçok mikroalg türü ortamda CO₂'nin çözünmesiyle oluşan karbonik asitten kaynaklanan asidik koşullara dayanamamakta ve besin yetersizliğinin de etkisiyle büyüme gerçekleşmemektedir (Lam ve Lee 2011; Tang vd. 2011).

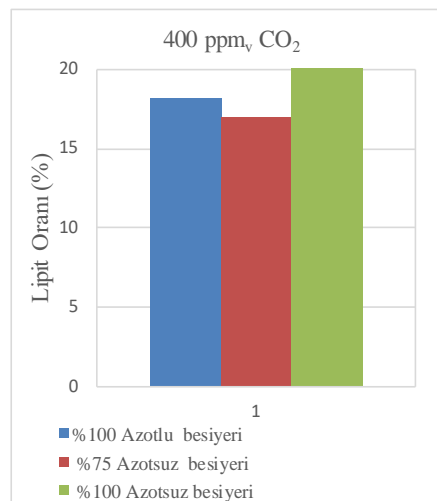
%15 CO₂ derişiminde %100 azot stresi şartlarında *C. vulgaris* mikroalg kültürünün fotobiyoreaktörde büyümemesi üzerine gaz karışımındaki CO₂ yüzdesinin büyümenin önünde bir engel oluşturup oluşturmadığını görmek amacıyla gaz karışımındaki CO₂ yüzdesi düşürülerek (400 ppm_v) deney tekrarlanmıştır. Fakat ikinci günden itibaren OD değerlerinde tekrar düşüş görülmüş ve bu durumu takiben büyüme inhibe olmuş ve sistem kapatılarak, deneye son verilmiştir. Kültürün bu şartlarda da büyümemesi üzerine kültürün erlenmeyerlerde üretilmesi aşamasına geçilmiştir. SET-IV deneylerinde ikinci aşama olarak, erlenmeyerler içerisinde 400 ppm_v CO₂ derişimi altında %100 azotsuz ve %75 azotsuz (sadece 4,505 g/L NaNO₃ var) ortamda mikroalg yetiştirme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler sonunda alınan numunelerde RuBisCO ve lipit ölçümleri yapılmıştır. Yaklaşık 10 gün boyunca alg büyümesi ve alg kültürünün lipit üretim potansiyeli gözlemlenebilmiştir. Şekil 8'de 400 ppm_v CO₂ derişimi altında erlenmeyer içerisinde farklı azot stresi ortamlarında yetiştirilen mikroalgler için ölçülen OD değerlerine yer verilmiştir. %100 azotsuz ortamda 8. günün sonunda OD değerinde net bir düşüş gözlemlenmiştir. Fakat 9. günden itibaren OD değerinde tekrardan küçük miktarlarda artışlar ölçülmeye devam edilmiştir. İyi bir biyokütle eldesinde mikroalgin koyu yeşil renge ulaştığı yapılan deneyler kapsamında kazanılan bir deneyim olmuştur. %100 azot stresi ortamında yetişen mikroalgin yapısında artan lipit etkisiyle biyokütle

oranında azalma meydana gelmiş ve mikroalgin rengi sarı-yeşil tonunda bulanık ve partiküllü bir görüntüye ulaşmıştır. Bu sebeple; mikroalgin yapısında biriken lipid artışı ile OD değeri ölçümünde karanlık nokta oluştuğu ve yansıtıcı bir OD değeri ölçüldüğü düşünülmektedir. %75 azot stresi deneyin de ise, istikrarlı ve yavaş bir şekilde yaklaşık on iki günlük bir büyüme gerçekleşmiş ve mikroalgin rengi %100 azotsuz ortamda yetişen mikroalgin rengine göre daha koyu bir yeşile dönüşmüştür. %75 azot stresinin (%75 azotsuz) uygulandığı deneyde %100 azot stresinin (%100 azotsuz) uygulandığı deneye kıyasla 6. günden itibaren daha yüksek OD değerleri elde edilmiştir. OD değerlerine paralel olarak %100 azotsuz ortamda elde edilen biyokütle oranı, %75 azot stresi ortamında yetiştirilen mikroalglerin biyokütle eldesine oranla daha düşük olmuştur.



Şekil 8. 400 ppm_v CO₂ derişimi altında erlenmeyer içerisinde farklı azot stresi ortamlarında yetiştirilen mikroalglerin optik yoğunluk değerlerinin zamanla değişimi (Change of OD values of microalgae samples taken from an erlenmeyer flask at 400 ppm_v CO₂ concentration under 100% and 75% nitrogen stress conditions)

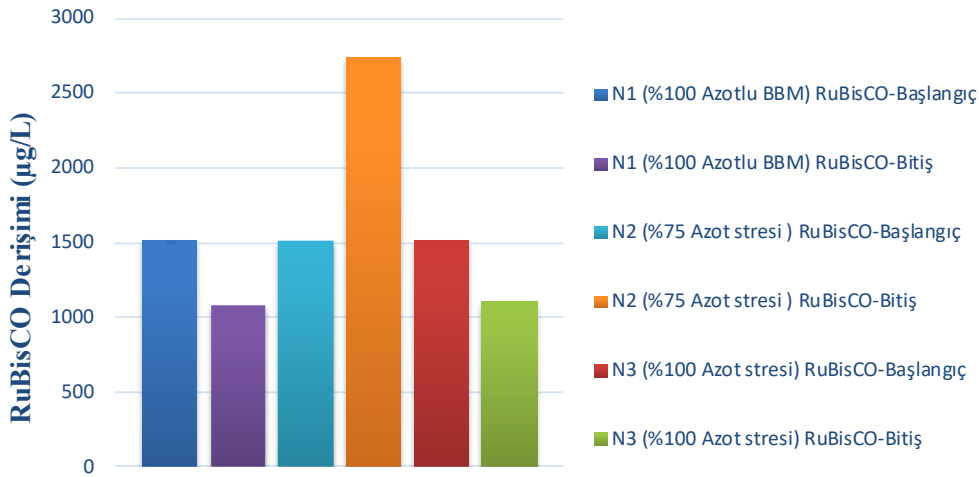
%100 azotsuz ortamda lipid yüzdesinin normal BBM besiyerinde ve %75 azotsuz ortamda büyüyen alglerden elde edilen lipid yüzdesinden daha fazla olduğu Şekil 9'da görülmektedir. Düşük CO₂ oranlarında daha iyi lipid eldesi sağlandığına dair çalışmalar mevcuttur (El-Sheekh vd. 2019, Miranda vd. 2015). Azot stresi, fotosentez prosesinde hücrel karbonun işlevinin protein üretiminden %20 ile %40 arasında değişen değerlerde lipid üretimine doğru yönelimi noktasında uyarıcı bir etki yapmaktadır. Bu durumda alg hücreleri klorofillerini hücre içi azot kaynağı olarak kullanarak daha fazla lipid üretimi gerçekleştirmektedir (Liu vd. 2008; Markou vd. 2017). Benzer sonuçlar içeren bir çalışmada (Miranda vd. 2016); mikroalglerin lipid üretimi için en uygun N, P ve tuz oranlarını belirlemek amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda en iyi lipid üretimi sağlayan değerlerin 0,04 g/L NO₃⁻ (%75 azot stresi), 0,01 g/L P (%75 fosfor stresi) ve 5,0 g/L sodyum klorür (NaCl) olduğu tespit edilmiştir. Bu optimal koşulları karşılayan değerlerde *Ankistrodesmus sp.* ve *Chlamydomonas sp.* ile gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre lipid asitleri verimi sırasıyla 2,1 ve 2,4 kat oranında artış göstermiştir. Ayrıca lipid üretim oranında gerçekleşen artışa ters olarak besin sınırlaması sebebiyle biyokütle eldesinde azalış görülmesi de daha önce yapılan literatür çalışmalarıyla desteklenmektedir (Li vd. 2008; Markou vd. 2017; Stephenson vd. 2010).



Şekil 9. 400 ppm_v CO₂ derişimi altında erlenmeyer içerisinde farklı azot stresi ortamlarında yetiştirilen mikroalglerin lipid oranları (Lipid percentages of microalgae samples taken from a Erlenmeyer flask at 400 ppm_v CO₂ concentration under 100% and 75% nitrogen stress conditions)

Şekil 10'da erlenmeyerler içerisinde farklı azot stresi koşullarında yapılan deneylerin başlangıç ve bitiş aşamalarında gerçekleştirilen RuBisCO analiz sonuçları verilmektedir. %100 azotlu ortamda yetiştirilen alglerin fotobiyoreaktöre aşılmanadan önce ve büyümeleri tamamlandıktan sonra yapılan RuBisCO ölçüm analiz sonuçlarına bakıldığında, enzim miktarında büyük bir oranda düşüş olduğu görülmektedir. Aynı deney kapsamında OD değerlerinin değişimi incelendiğinde kısa sürede hızlı bir büyüme sonrasında ölüm fazına geçiş olduğu ve yapılan tüm deney setlerinin sonuçları ile kıyaslandığında düşük bir biyokütle eldesinin mevcudiyeti tespit edilmiştir. İyi bir fotosentetik verim, iyi bir RuBisCO enzimi-CO₂ fiksasyon oranı ve buna bağlı olarak iyi bir biyokütle eldesi demektir. Düşük biyokütle oranına paralel olarak düşük RuBisCO miktarı elde etmek beklenen bir durum olarak değerlendirilmektedir. Protein üretimi yerine lipid üretiminde gerçekleşen artışla beraber RuBisCO miktarında azalış söz konusu olmaktadır.

Erlenmeyerde 400 ppm_v CO₂ derişimi altında %75 azot stresi ortamında yetiştirilen alglerin başlangıç RuBisCO miktarına (~1500 µg/L) göre deney sonunda ölçülen RuBisCO miktarında ~1,8 kat artış görülmüştür. %75 azotsuz ortamda büyüme %100 azotsuz ortama göre daha uzun süre devam etmiş ve biyoküttele artış olmuştur. Buna bağlı olarak RuBisCO oranında artış elde edilmiştir. Benzer artışın %100 azotlu ortamda da elde edilmesi beklenmiş, fakat %100 azotlu ortamda 5 günlük hızlı büyüme süresi ve 6. günde ani bir düşüşle kısa sürede ölüm fazına geçilmesi sebebiyle RuBisCO oranının beklenenden daha düşük seviyede ölçüldüğü tahmin edilmektedir. Deney kapsamındaki OD değerleri incelendiğinde yavaş oranlarda artan OD değerleri ile yavaş bir büyüme gerçekleştiği ve buna bağlı olarak biyoküttele bir artış olduğu belirlenmiştir. 400 ppm_v CO₂ derişimi altında %100 azotsuz ortamda yetiştirilen alglerin RuBisCO enzimlerine bakıldığında, %100 azotlu ortamda yetiştirilme öncesi ve sonrasındaki gibi enzim miktarında büyük bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni, OD değerlerinde iyi bir artış olmaması, iyi bir büyümenin gerçekleşmemesi ve buna bağlı olarak iyi bir biyokütle verimi elde edilememesidir.



Şekil 10. Farklı azot kaynaklarında RuBisCO enzim miktarındaki değişimler (Concentrations of RuBisCO enzyme under different nitrogen sources)

5. Sonuçlar (Conclusions)

CO₂ derişiminin *C. vulgaris* mikroalg büyüme verimine etkisini incelemek amacıyla hacimce 400 ppm, %15 ve %90 CO₂ içeren gaz karışımları altında deneyler gerçekleştirilmiştir (7 000 lux; 24 saat aydınlık). %15 CO₂'de kuru ağırlık değeri (max 1,47 g/L) 400 ppm_v'e göre 5 kat fazla verimle elde edilmiştir. %15 CO₂ içeren gaz karışımı için mikroalg üreme verimliliği ve CO₂ tutma verimi sırasıyla 0,14 g/L/gün ve 0,25 g/L/gün olarak belirlenmiştir. Fotobiyoreaktöre verilen gaz karışımındaki CO₂ oranının %90'a çıkarılması büyümeyi engellemiştir. Bu durumun alg kültürüne verilen gaz karışımındaki CO₂ gazının kademeli olarak arttırılması ile önlenebileceği düşünülmektedir.

Azot stresi kapsamında, ilk aşamada; fotobiyoreaktöre aşılana *C. vulgaris* mikroalgi, %15 CO₂ derişimi altında ve %100 azotlu ortamda büyümeye bırakılmıştır. Başlangıç kuru ağırlık değeri 0,01 g/L iken 5. gün sonunda alg kültürü derişimi 46 kat artarak 0,46 g/L olmuştur. %100 azotlu ortamda lipid oranı başlangıçta %10 iken, deney sonunda %3 oranında belirlenmiştir. Fotobiyoreaktör içerisinde %15 CO₂ derişimi altında ve %100 azotsuz ortamda üç gün boyunca yapılan OD değerlerinde hiçbir artış gerçekleşmemiş, büyüme inhibe olmuştur. %100 azotsuz ortamda fotobiyoreaktöre verilen CO₂ derişiminin yüksek olması ve ortamdaki besin yetersizliği büyümeyi engellemiş olabilir. %15 CO₂ derişimi altında azot stresi ortamında iyi bir büyüme verimi elde edilememesi üzerine, *C. vulgaris* mikroalgi bir erlenmeyer içerisinde 400 ppm_v CO₂ derişiminde %75 ve %100 azot stresi şartlarında büyümeye bırakılmıştır. %100 azotsuz ortamda yetişen mikroalgin yapısında artan lipid etkisiyle

biyokütle oranında azalma meydana gelmiştir. %75 azotsuz ortamda %100 azotsuz ortama göre 1,3 kat daha iyi büyüme verimi elde edilmiştir. Ayrıca, %75 azotsuz deneyde %100 azotsuz ortama göre 2,5 kat daha yüksek RuBisCO oranı belirlenmiştir. %100 azotsuz deneyde ise %75 azotsuz ortama göre 1,2 kat daha yüksek lipit oranı elde edilmiştir.

Çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, kömürle çalışan termik santrallerin baca gazını temsil eden gaz karışımında (%15 CO₂ içeren CO₂+N₂+O₂ karışımı) fotobiyoreaktörde yetiştirilen mikroalgelerde 7 000 lux aydınlatma şiddetinde ve 24 saat aydınlatma süresince azot stresinin uygulanmadığı durumda iyi bir büyüme verimi elde edilmiştir. Azot stresi deneylerinde ise, yüksek CO₂ derişimine (%15) kıyasla düşük CO₂ derişimi (400 ppm_v) altında lipit üretim veriminde artış elde edilmiştir. 400 ppm_v CO₂ derişiminde biyokütle ve klorofil oranında kademeli bir azalma söz konusuyken, lipit üretiminde bir artış meydana gelmiştir. Lipit verimindeki artışa paralel olarak RuBisCO enziminde düşüş gerçekleşmiştir. Bu bilgiler, azot stresi ile elde edilecek lipit oranını arttırmak için RuBisCO aktivitesini azaltıcı koşulların oluşturulmasına yönelik çalışmalara bir alt yapı niteliği taşımaktadır.

Teşekkür (Acknowledgement)

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2019-4865 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması (Conflict of Interest)

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir. No conflict of interest was declared by the authors.

Kaynaklar (References)

- Ahmad, A.L., Yasin N.H., Mat C.J.C., Derek Lim, J.K. 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 15: 584-593.
- Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy*, 88: 3402-3410.
- Anjos, M., Fernandes, B.D., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Dragone, G. 2013. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella Vulgaris*. *Bioresource Technology*, 139: 149-154.
- Aslam, A., Thomas-Hall S.R., Mughal, T.A., Schenk, P.M. 2017. Selection and adaptation of microalgae to growth in 100% unfiltered coal-fired flue gas. *Bioresource Technology*, 233: 271-283.
- Aviva Systems Biology 2005. RuBisCo ELISA Kit (Plant) (OKCA00374) Instructions for use. <https://www.avivasysbio.com/pub/media/pdf/products/OKCA00374.pdf>. [Son erişim tarihi: 19.04.2021].
- Barahoei, M., Hatamipour, M.S., Afsharzadeh, S. 2020. CO₂ capturing by *C. vulgaris* in a bubble column photo-bioreactor; Effect of bubble size on CO₂ removal and growth rate. *J. CO₂ Util*, 37: 9-19.
- Bischoff, H.W., Bold, H.C. 1963. Phycological studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycol. Stud. (University of Texas)* 4 (6318): (1)-95.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917.
- Bogless, C.D. 2014. Optimization of Growth Parameters for Algal Regrowth Potential Experiments. M.Sc. Thesis, California Polytechnic State University, San Luis Obispo/CA-USA.
- Brown, M.L., Zeiler, K.G. 1993. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Convers. Manage*, 34: 1005-1013.
- Chávez-Fuentes, P., Ruiz-Marin, A., Canedo-López, Y. 2018. Biodiesel synthesis from *C. vulgaris* under effect of nitrogen limitation, intensity and quality light: estimation on the based fatty acids profiles. *Mol Biol Rep*, 45, 1145-1154.
- Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J., Chang, J.S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource technology*, 102: 1, 71-81.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25 (3): 294-306.
- Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Huang, T.T., Lin, C.J., Ong, S.C., Chen, C.D., Chang, J.S. and Lin, C.S. 2011. Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella sp.* Cultures. *Bioresource Technology*, 102: 9135-9142.
- Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi, Roshandeh, J., Nouri, H., Golzary, A. 2017. Investigation of optimal condition for *C. vulgaris* microalgae growth. *Global J. Environ. Sci. Manage.*, 3 (2): 217-230.
- Dukarte, J.H., de Moraes, E.G., Radmann, E.M., Costa, J.A.V. 2017. Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina sp.* *Bioresource Technology*, 234, 472-475.
- Elcik, H., Çakmakçı, M. 2017. Mikroalglerden Yenilenebilir Biyoyakıt Üretimi. *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 32 (3).
- El-Sheekh, M.M., Gheda, S.F., El-Sayed, A.E.K.B., Abo Shady, A.M., El-Sheikh, M.E., Schagerl, M. 2019. Outdoor cultivation of the green microalga *C. vulgaris vulgaris* under stress conditions as a feedstock for biofuel. *Environmental Science and Pollution Research*, 26 (18): 18520-18532.
- García-Cubero, R., Moreno-Fernández, J., García-González, M. 2017. Potential of *Chlorella vulgaris* to Abate Flue Gas. *Waste and Biomass Valorization*. DOI: 10.1007/s12649-017-9987-9.
- Goli, A., Shamiri, A., Talaiekhosani, A., Eshtiagh, N., Aghamohammadi, N., Aroua, M.K. 2016. An overview of biological processes and their potential for CO₂ capture. *Journal of Environmental Management*, 183: 41-58.

- Griffiths, M.J., Garcin, C., Hille, R.P., Harrison, S.T.L. 2011. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85: 119-123.
- Gürol, M.D., Soydemir, G., Şen, Ü.K., Say, N., Şen Ü. 2014. Mikroalglerden biyoyakıt üretim potansiyeli. *Enerji Tarımı ve Biyoyakıtlar 4. Ulusal Çalıştayı*, 69-78.
- Han, F., Pei, H., Hu, W., Song, M., Ma, G., Pei, R. 2015. Optimization and lipid production enhancement of microalgae culture by efficiently changing the conditions along with the growth-state. *Energy Conversion and Management*, 90: 315-322.
- Healey, F.P. 1975. Physiological indicators of nutrient deficiency in algae. Tech. Rep. 585. Department of the Environment, Fisheries and Marine Service Research and Development Directorate, Winnipeg, Man.
- Hu, X., Zhou, J., Liu, G., Gui, B. 2016. Selection of microalgae for high CO₂ fixation efficiency and lipid accumulation from ten *C. vulgaris* strains using municipal wastewater, *Journal of Environmental Sciences*, 46: 83-91.
- Huang, G., Wang, J., Kuang, Y., He, H. 2016. Effects of SO₂ and NO₂ in Flue Gas on CO₂ Sequestration and Intracellular Microstructures Analysis of *Chlorella sp.* Research & Reviews: *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 5 (3): 60-67.
- Hulatt, C.J., Thomas, D.N. 2011. Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. *Bioresource Technology*, 102 (10): 5775-5787.
- IEA 2017. Key World Energy Statistics. Sayfa 54. Paris: OECD/IEA.
- Jeong, M.J., Gillis, J.M., Hwang, J.Y. 2003. Carbon dioxide mitigation by microalgal photosynthesis. *Bulletin- Korean Chemical Society*, 24: 1763-1766.
- Kao, C.Y., Chen, T.Y., Chang, Y.B., Chiu, T.W., Lin, H.Y., Chen, C.D., Lin, C.S. 2014. Utilization of carbon dioxide in industrial flue gases for the cultivation of microalga *Chlorella sp.* *Bioresource Technology*, 166, 485-493.
- Kendirlioğlu, G. 2012. *Chlorella Vulgaris*'in Hücre Sayısı, Klorofil Miktarı ve Büyüme Hızına Aydınlanma Süresinin Etkisi. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Elazığ.
- Kendirlioğlu, G., Agrıman, N., Cetin, A.K. 2015. The effects of photoperiod on the growth, protein amount and pigment content of *Chlorella Vulgaris*. *Turkish Journal of Science & Technology*, 10 (2): 7-10.
- Khoeyi, Z.A., Seyfabadi J., Ramezanpour, Z. 2012. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella Vulgaris*. *Aquacult. Int.*, 20 (1): 41-49.
- Kitaya, Y., Azuma, H., Kiyota, M. 2005. Effects of temperature, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis*. *Advances in Space Research*, 35 (9): 1584-1588.
- Kong, Q.X., Li, L., Martinez, B., Chen, P., Ruan, R. 2010. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Appl Biochem Biotechnol*, 160: 9-18.
- Lam, M.K., Lee, K.T. 2012. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30 (3): 673-690.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81 (4): 629-636.
- Liu, Z., Wang, G., Zhou, B., 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella Vulgaris*. *Bioresour Technol*, 99: 4717-4722.
- Markou, G., Dao, L.H.T., Muylaert, K., Beardall, J. 2017. Influence of different degrees of N limitation on photosystem II performance and heterogeneity of *Chlorella Vulgaris*. *Algal Research*, 26: 84-92.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 217-232.
- Menteşe, S., Çotuker, O., 2021. Partikül madde, karbon monoksit ve karbondioksit seviyelerinin iç ve dış ortamlarda değişimi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 9 (3), 723-734. DOI: 10.21923/jesd.811053.
- Miranda, C.T., Pinto, R.F., Lima, D.V.N., Viegas, C.V., Costa S.M., Azevedo, S.M.F.O. 2015. Microalgae Lipid and Biodiesel Production: A Brazilian Challenge. *American Journal of Plant Sciences*, 6: 2522-2533.
- Miranda, C.T., Lima, D.V.N., Atella, G.C., Aguiar, P.F., Azevedo, S.M.F.O. 2016. Optimization of Nitrogen, Phosphorus and Salt for Lipid Accumulation of Microalgae: Towards the Viability of Microalgae Biodiesel. *Natural Science*. 8: 557-573.
- Míguez, J.L., Porteiro, J., Pérez-Orozco, R., Patiño, D., Rodríguez, S. 2018. Evolution of CO₂ capture technology between 2007 and 2017 through the study of patent activity. *Applied Energy*. 211: 1282-1296.
- Montoya, O., Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Perego, P., Converti, A., de Carvalho, J.C.M. 2014. Production of *Chlorella Vulgaris* as a source of essential fatty acids in a tubular photobioreactor continuously fed with air enriched with CO₂ at different concentrations. *Biotechnology Progress*, 30 (4): 916-922.
- Morais, M.G., Costa, J.A.V. 2007. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Conversion and Management*, 48: 2169-2173.
- Münkel, R., Schmid-Staiger, U., Werner, A., Hirth, T. 2013. Optimization of outdoor cultivation in flat panel airlift reactors for lipid production by *Chlorella Vulgaris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (11): 2882-2893.
- Nakamura, C.E., Whited, G.M. 2003. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (5): 454-459.
- Nautiyal, P., Subramanian, K.A., Dastidar, M.G. 2014. Production and characterization of biodiesel from algae. *Fuel Processing Technology*, 120, 79-88.
- NOAA 2021. Trends in Atmospheric Carbon Dioxide, Monthly Average Mauna Loa CO₂. National Oceanic and Atmospheric Administration. <https://gml.noaa.gov/ccgg/trends/>. [Son erişim tarihi: 05.06.2021].
- Öğüt, H., Oğuz, H. 2006. Üçüncü Milenyum Yakıtı Biyodizel, *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara, 190 s.
- Parsons, T.R., Strickland, J.D.H. 1972. A practical handbook of seawaters analysis. *Bull Fish Res Bd Can*, 167: 1-20.
- Pegallapati, A.K., Nirmalakhandan, N. 2013. Internally illuminated photobioreactor for algal cultivation under carbon dioxide-supplementation: Performance evaluation. *Renewable Energy*, 56: 129-135.
- Rashid, N., Rehman, M.S.U., Sadiq, M., Mahmood, T., Han, J.I. 2014. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 40: 760-778.

- Rendon, S.M., Roldan, G.C.J.C., Paul Voroney, R. 2013. Effect of carbon dioxide concentration on the growth response of *Chlorella vulgaris* under four different led illumination. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 2013, 2, 125-131.
- Rodrigues, L.H.R., Arenzon, A., Raya-Rodriguez, M.T., Fontoura, N.F. 2011. Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3 (8): 225-228.
- Ryu, H.J., Oh, K.K., Kim, Y.S. 2009. Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate. *J. Ind. Eng. Chem.*, 15: 471-475.
- Sadeghizadeh, A., Farhad, F., Moghaddasi, L., Rahimi, R. 2017. CO₂ capture from air by *Chlorella Vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor. *Bioresource Technology*, 243: 441-447.
- Scarsella, M., Belotti, G., De Filippis, P., Bravi, M. 2010. Study on the optimal growing conditions of *Chlorella Vulgaris* in bubble column photobioreactors. *Chemical Engineering Transactions*, 20: 85-90.
- Sibi, G., Shetty, V., Mokashi, K. 2016. Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels – A review. *Journal of the Energy Institute*, 89 (3): 330-334.
- Song, W., Rashid, N., Choi, W., Lee, K. 2011. Biohydrogen production by immobilized *Chlorella sp.* using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis. *Bioresour. Technol.*, 102 (18): 8676-8681.
- Stephenson, A.L., Dennis, J.S., Howe, C. J., Scott, S.A., Smith, A.G. 2010. Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella Vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels*, 1 (1): 47-58.
- Sung, K.D., Lee, J.S., Shin, C.S., Park, S.C. 1998. Enhanced cell growth of *sp. KR-1* by the addition of iron and EDTA. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8: 409-411.
- Sutherland, D., Craggs, R., Campbell, H. 2012. Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. *J. Appl. Phycol.*, 24: 329-337.
- Sutherland, D.L., Howard-Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J. 2013. Seasonal variation in light utilisation, biomass production and nutrient removal by wastewater microalgae in a full-scale high-rate algal pond. *J. Appl. Phycol.*, 26: 1317-1329.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., Zhong, J. 2011. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*, 102 (3): 3071-3076.
- Taştan, B.E., Duygu, E., İlbaş, M., Dönmez, G. 2013. Utilization of LPG and gasoline engine exhaust emissions by microalgae. *Journal of Hazardous Materials*, 246-247: 173-180.
- Taştan, B.E., Duygu, E., İlbaş, M., Dönmez, G. 2016. Enhancement of microalgal biomass production and dissolved inorganic C fixation from actual coal flue gas by exogenous salicylic acid and 1-triacontanol growth promoters. *Energy*, 103: 598-604.
- TÜİK 2021. Sera Gazı Emisyon İstatistikleri 1990-2019. Türkiye İstatistik Kurumu. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Sera-Gazi-Emisyon-Istatistikleri-1990-2019-37196> [Son erişim tarihi: 14.06.2021].
- Ullah, K., Ahmad, M., Sharma, V.K., Lu, P., Harvey, A., Zafar, M., Sultana, S., Anyanwu, C.N. 2014. Algal biomass as a global source of transport fuels: Overview and development perspectives. *Progress in Natural Science: Materials International*, 24: 329-339.
- Usui, N., Ikenouchi, M. 1997. The biological CO₂ fixation and utilization project by RITE (1) Highly-effective photobioreactor system. *Energy Convers. Manag.* 38, S487-S492.
- Utex 2019. Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. <https://utex.org/>. [Son erişim tarihi: 25.12.2019].
- Wahidin, S., Idris, A., Shaleh, S.R. 2013. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis sp.* *Bioresource Technology*, 129: 7-11.
- Wong, Y.K., Ho, K.C., Tsang, Y.F., Wang, L., Yung, K.K.L. 2016. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in column photobioreactor for biomass production and lipid accumulation. *Water Environment Research*, 88 (1), 40-46.
- Yaakob, M.A., Mohamed, R.M.S.R., Al-Gheethi, A., Aswathnarayana Gokare, R., Ambati, R.R. 2021. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*, 10, 393.
- Yeh, K.L., Chang, J.S., Chen, W. 2010. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella Vulgaris ESP-31*. *Engineering in Life Sciences*, 10 (3): 201-208.
- Yıldız, İ., Çalışkan, H., 2020. Motor yüküne bağlı olarak biyodizel yakıtlı bir dizel motorun enerji ve ekserji analizi sonuçlarının değerlendirilmesi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 8 (3), 833-843. DOI: 10.21923/jesd.775787.
- Yodsuwan, N., Sawayama, S., Sirisansaneeyakul, S. 2017. Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Agriculture and Natural Resources*, 51 (3): 190-197.
- Yusuf, N.N.A.N., Kamarudin, S.K., Yaakub, Z. 2011. Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 52 (7): 2741- 2751.
- Zhu, L.D., Li, Z.H., Hiltunen, E. 2016. Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. *BioMed Research International*, 1-8.