



T.C.

KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KÜLTÜR KOŞULLARINDA BESİN TUZU
EKSİKLİĞİNİN ALG GELİŞİMİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Ayça KOŞAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR / 2020



T.C.

KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KÜLTÜR KOŞULLARINDA BESİN TUZU EKSİKLİĞİNİN
ALG GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ayça KOŞAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Tülay ÖZER

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Bu çalışma Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri biriminin PYO-KMY.A4.19.002 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Ayça KOŞAR

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım kapsamında, tüm laboratuvar deneyimlerimde, kavramsal ve literatürel araştırmalarımnda çalışmalarına aktif olarak katılan, bulgular ve tezin sunumu dahil her aşamasında beni yönlendiren danışman hocam sayın Doç. Dr. Tülay ÖZER'e, aynı alanda çalışan ve deneysel sürecin başlamasında ve sürdürülmesinde gerekli donanım ve uygulama konusunda kendi laboratuvar ortamından yararlanmamı sağlayan sayın Doç. Dr. İlkey AÇIKGÖZ ERKAYA'ya, teknik ve idari desteğini esirgemeyen hocam sayın Doç. Dr. Mahmut YILMAZ' a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tez yazım aşamalarımnda bana yardımcı olan arkadaşım Ali İhsan KARAYEL'e teşekkürlerimi sunarım. Analizlerin yapılmasında Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje Yönetim Ofisi' ne teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2020

Ayça KOŞAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	ixii
SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ	i
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	1
1.2. Önem.....	2
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. Mikroalgler ve Yağ İçeriği.....	5
2.2. Mikroalglerde Yağ İçeriğinin Artırılması.....	5
2.3. Mikroalglerde Besin Sınırlamalarına Yönelik Uygulamalar.....	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	10
3.1. Kültüre Alınan Mikroalg Türü ve Kültür Ortamı.....	10
3.2. Metod	
3.2.1. Ekim Koşulları	12
3.2.2. Laboratuvarında Kültüre Alınan Mikroalg Üretimi	13
3.2.3. Deneme Süresince Yapılan Analizler	15
3.2.3.1. Optik Yoğunluk	15
3.2.3.2. Klorofil a Analizi	15
3.2.3.3. Hücre Sayımları	16
3.2.4. Deneme Sonrasında Yapılan Analizler	16
3.2.4.1. Hasat İşlemi	16
3.2.4.2. Toplam Lipid Tayini	16
3.2.4.3. Toplam Fatty Asid Konsantrasyonu ve Kompozisyonu	17
3.2.4.4. FTIR Analizi	18

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	19
4.1. Optik Yoğunluk.....	19
4.2. Klorofil a	20
4.3. Hücre yoğunluğu	21
4.4. Biomas ve Toplam Lipid.....	22
4.5. Toplam Fatty Asid Konsantrasyonu ve Kompozisyonu.....	23
4.6. FT-IR analizi	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	27
6. KAYNAKLAR	29
7. ÖZGEÇMİŞ	34



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1.	Deneyde Kullanılan Işık Zaman Ayarlayıcı.....	13
Şekil 3.2.	<i>Chlamydomonas</i> sp. Türünün Deney Ortamındaki Gelişimi	13
Şekil 3.3. a,b,c.	<i>Chlamydomonas</i> sp. Türünün Mikroskopik Görüntüleri.....	14
Şekil 4.1.	<i>Chlamydomonas</i> sp. Suşunun Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Hücre Yoğunluğu (OD ₆₈₀).....	20
Şekil 4.2.	<i>Chlamydomonas</i> sp. Suşunun Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Klorofil _a Değerleri.....	21
Şekil 4.3.	<i>Chlamydomonas</i> sp. Suşunun Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Toplam Hücre Yoğunlukları (Hücre/mL)	22
Şekil 4.4.	<i>Chlamydomonas</i> sp. Suşunun Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Toplam Biomass ve Toplam Lipid Miktarı.....	23
Şekil 4.5.	<i>Chlamydomonas</i> sp. Suşuna Ait FT-IR Spektrum Grafiği.....	26

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. BG 11 Medium (Modifiye edilmiş BG 11 Kültür Ortamı).....	11
Tablo 4.1. Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Toplam FAMEs Konsantrasyonu ve Kompozisyonu.....	23



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

°C	Santigrat derece
FAs	Yağ asitleri
TAG	Triaçil gliserit
MUFA	Tekli doymamış yağ asitleri
SFA	Doymuş yağ asitleri
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
FAMES	Yağ asidi metinesterleri
TFA	Toplam fatty asidi
C,N,P	Karbon, azot, fosfor
μE/m²/s	Saniye ve metrekare başına Mikroeinstein (Işık ölçü birimi)
mg/L	Miligram litre
μg/L	Mikrogram litre
pH	H iyonu derişiminin 10 tabanında (-) logaritması
Chl a	Klorofil a
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi- MS Kütle Spektrometresi
N (-)	Azot eksikliği (azot açlığı)
P (-)	Fosfor eksikliği (fosfor açlığı)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜLTÜR KOŞULLARINDA BESİN TUZU EKSİKLİĞİNİN ALG GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayça KOŞAR

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Tülay ÖZER

Bu araştırma kapsamında, bir mikroalg türü olan *Chlamydomonas* sp. laboratuvar ortamında BG 11 modifiye besiyerinde besin açlığı koşullarında yetiştirilmiştir. Mikroalgal TAG'ların büyük ölçekli üretimi şu anda ekonomik değildir. Alan fiyatı ve hacimsel TAG verimliliğini ve kalitesini artırarak maliyet fiyatı düşürülebilir. Bu özellikleri geliştirmek için Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi-Mikroalg Kültür Koleksiyonu (KAEU-MAK)' ndan temin edilen *Chlamydomonas* sp. suşunun azot ve fosfor açlıklı koşullar altında üreme yeteneği, toplam lipid, fatty asidi bileşimi ve kompozisyonu yönünde vereceği tepkiler araştırılmıştır. 22 gün sonra, numunelerin dondurularak kurutulmuş biyokütle, toplam lipid ve yağ asidi analizleri dış merkezli bir laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. %50 N (-) ve %100 N (-) eksikliklerinde hücrelerin optik yoğunluk ve klorofil a değerlerinde kısmen daha başarılı bir gelişim gözlenmektedir. Toplam lipid yoğunlukları %18,9-19,7 arasında değişmiştir ancak kontrol grubu en yüksek orandaydı. En yüksek TAG birikimi C16: 0 (SFA), C18: 1 (MUFA) ve C18: 3 (PUFA) yağ asitlerinden oluşmuştur. En yüksek fatty asidi bileşimi %50 N (-) koşulunda linoleic asid (C18: 3)'de kaydedilmiştir.

Haziran 2020, 34 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Mikroalg, *Chlamydomonas* sp., büyüme, besin açlığı, toplam lipid, fatty asidi.

ABSTRACT

Master's Thesis

KÜLTÜR KOŞULLARINDA BESİN TUZU EKSİKLİĞİNİN ALG GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayça KOŞAR

Kirsehir Ahi Evran University

Institute of Science

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Tülay ÖZER

In this research, a microalgae species (*Chlamydomonas* sp.) was grown in the laboratory conditions under nutrient-starvation conditions on BG 11 modified medium. Large-scale production of microalgal TAGs is currently not economical. The cost price can be reduced by increasing the area price and volumetric TAG efficiency and quality. In order to improve these properties, *Chlamydomonas* sp. was obtained from Kirsehir Ahi Evran University-Microalgae Culture Collection (KAEU-MAK) Center. This strain was investigated in terms of reproductive ability under nitrogen and phosphorus deprived conditions, total lipid, fatty acid composition and composition. After 22 days, the freeze-dried biomass, total lipid and fatty acid analyzes of the samples were carried out in an eccentric laboratory. After twentytwo days, freeze-dried biomass, total lipid and fatty acid analyzes were performed in an external laboratory. In the 50% N (-) and 100% N (-) deficiencies, a more successful development was observed in the optical density and chlorophyll a values of the cells. Total lipid concentrations ranged from 18.9 to 19.7%, but the control group had the highest rate. The highest TAG deposition composed of C16: 0 (SFA), C18: 1 (MUFA) and C18: 3 (PUFA) fatty acids. The highest fatty acid composition was recorded in linoleic acid (C18: 3) at 50% N (-).

June 2020, 34 Pages

Key Words: Microalgae, *Chlamydomonas* sp., growth, nutrient starvation, total lipid, fatty acid.

1. GİRİŞ

Mikroalgler, tüm akuatik ekosistemlerde en bol ve yaygın bulunan, ışık enerjisi ve inorganik besinleri tüketen ve lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve pigmentler gibi biyokütle açısından zengin katma değerli ürünler üreten foto-ototrofik organizmalardır (Markou and Nerantzis, 2013). Mikroalgler acı ve sodalı sulardan, termal su kaynaklarına, karasal habitatlardan, çöl ekosistemine kadar ekstrem koşullarda da üreyebilen ve buldukları ortamlarda serbest oksijen üretimine en büyük katkıyı sunan organizmalardır. Dünyada şu ana kadar 40000'den fazla mikroalg türü tanımlanmış ancak daha tanımlanamamış çok sayıda mikroalg türünün de bulunduğu tahmin edilmektedir. Sucul ortamlarda serbest azotu kullanabilmeleri açısından da madde döngüsüne katkıları önemli boyuttadır. Dolayısıyla, sucul ortamlardaki iklimsel faktörler başta olmak üzere, her türlü evsel ve endüstriyel atıklar, tarımsal girdiler ve termal kirlenme gibi birçok faktör suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişikliklere yol açar ve bu değişikliklere en hassas organizmalar mikroalglerdir.

Prokaryot ve ökaryot yapıları ve dolayısıyla çok fazla tür çeşitliliğine sahip olmaları mikroalgler üzerine sistematik, ekolojik, fizyolojik ve biyoteknolojik çalışmaları da çeşitlendirmektedir. Fotosentetik pigment dağılımları, hücre duvarı, kamçı gibi hücre yapılarındaki çeşitliliğin yanısıra, hücrelerin biyokimyasal içerikleri ve makromoleküler kompozisyonlarında özellikle, üretim ve depolama ürünlerindeki çeşitlilikten dolayı da mikroalgler bilimsel araştırmalarda güncel ilgi odağı olabilmektedir. Mikroalgler, hızlı büyümeleri, yüksek üreme hızları ile biyoteknoloji alanında ilaç ve kozmetik sanayi, su ürünleri yetiştiriciliği, atık suların arıtımı gibi birçok alanda hammadde olarak kullanılmaktadırlar (Stephens ve diğ., 2010).

1.1. Amaç

Mikroalgal türler hem biyoyakıtların hem de yüksek değerli metabolitlerin potansiyel kaynağıdır ve üretimleri uygun koşullardaki büyüme parametrelerine bağlı olarak belirlenebilir. Mikroalglerde lipid miktarlarının değiştirilmesi bazında geliştirilen stratejiler, fiziko-kimyasal stres faktörlerinin mikroalglerin metabolizmaları üzerindeki etkilerine dayalıdır. Çevresel stresin yönetilmesi, laboratuvar ve pilot ölçekte mikroalg bazlı lipid üretiminin rafine edilmesinde kullanılan tipik bir yaklaşımdır. Lipid üretimini

arttırmak için kullanılan en yaygın stres faktörleri sıcaklık, ışık yoğunluğu, azot ve fosfor kaynaklarıdır. Sıcaklık, mikroalgal türlerin büyüme hızını, net lipid verimliliğini ve FA (Fatty acid) profillerini büyük oranda etkileyen bir stres faktörüdür. Normalde daha yüksek bir büyüme hızı için optimum sıcaklık seviyesinin uygulanması gerekir. Işık mikroalglerin kimyasal bileşiminde önemli değişikliklere neden olabilir. Fotosentez ve beraberinde fotoperiyodla mikroalglerin büyümesi için kritik bir faktördür. 100–200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ arasındaki ışık şiddetleri mikroalg üretimi için yaygın olarak kullanılır. Işık yoğunluğunu 200'den 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 'ye çıkarmak mikroalglerde büyüme oranını artırır. Örneğin, ışık yoğunluğundaki artışla *Chlorella vulgaris* ve *Scenedesmus* sp. türlerinde lipid verimliliği düşükten yükseğe doğru artmıştır (Minhas ve diğ., 2016).

Lipid verimliliğini arttırmak için iki aşamalı bir yetiştirme yöntemi önerilir: Birinci aşamada, alglerin önce maksimum hücre yoğunluğunu elde etmek için besinin yeterli bir koşulda olması gerekir, ikinci aşamada lipid birikimini tetiklemek için besin açlık fazları ile modüle edilen koşullarda yetiştirilir (Belotti ve diğ., 2013). *Chlamydomonas* türlerinin birçoğunda lipid miktarı yüksektir ve biyodizel eldesi çalışmalarında da bu türler üzerine ileri düzeyde araştırmalar mevcuttur. Bu tür çalışmaları planlayabilmek ve yürütebilmek için uygun alg türlerini belirlemek asıl problemdir. Bu araştırmada, yağ içeriğinin yüksek olma ihtimali olduğunu düşündüğümüz aynı cinse ait iki türün mikroalg büyümesini takip etmek, özellikle lipitlerin ve katma değerli ürünlerin üretimini arttırmak için uygulanan çevresel stres faktörlerinden nutrient (besin tuzu) azatlımı yöntemini kullanarak lipid içeriğinde olası değişimlerin ön araştırmasını yapmak istedik. Bu çalışmanın amacı, modifiye BG11 besin ortamında, farklı azot ve fosfor oranları altında *Chlamydomonas* suşlarının büyüme ve lipid üretkenlik tepkisini araştırmaktır. Bu amaçla, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Mikroalg Alg Kültür Koleksiyonu'ndan seçilen *Clamydomonas* suşlarının N ve P sınırlamalarında lipid miktarı ve fatty asidi (serbest yağ asitleri) kompozisyonunun analizi planlanmıştır.

1.2. Önem

Birçok mikroalg türü TAG üretme yeteneğine sahiptir. Optimal büyüme koşulları altında çok düşük miktarlarda TAG üretirler, ancak azot açlığına maruz kaldıklarında TAG birikimi indüklenir ve kuru ağırlığın %40'ına kadar yüksek içeriklere ulaşılabilir (Breuer ve diğ., 2012). Siyanobakterilerle karşılaştırıldığında, alglerin iki benzersiz özelliği,

kloroplastlar dışında hücrelerin diğer kısımlarında yağ damlacıkları şeklinde büyük miktarlarda lipit saklama ve elektron taşıma sistemini hidrojen üretimine bağlama yeteneğidir (Radakovits ve diğ., 2010). Hücrede nötr lipidlerin birikmesinin, nişasta veya karbonun lipitlere dönüştürülmesi yoluyla gerçekleştiğini, ancak dönüşümün mikroalgal suşlara bağlı olduğunu, farklı suşların, lipidlerin sentezlenmesi için karbon akışını karbonhidrat yolundan iletmek için farklı bir mekanizmaya sahip olduğu belirtilmektedir (Minhas ve diğ., 2016). Lipid biyosentezi karmaşık bir süreç olduğundan, sadece spesifik lipitlerin üretimini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda mikroalglerdeki toplam lipid üretimini de artırır.

Bazı mikroalg türleri, bazı pigmentlerin yanı sıra, dokosaheksaenoik asit ve eikosapentaenoik asit gibi çok uzun zincirli poli doymamış yağ asitlerini (VL-PUFA, $>20C$) sentezleyebilir, bunlar gıda ve sağlıkta önemli uygulamalara sahiptir. Biyoyakıtlara, yağ asidi metilesterlerine (FAME) ve lipitlere ek olarak katma değerli yan ürünler üretmek, biyoteknolojinin kapalı bir ateşi olabilen ototrofik veya heterotrofik modu kullanarak mikroalg bazlı biyo rafinerileri geliştirme potansiyeline sahiptir (Minhas ve diğ., 2016). Yüksek oranda lipid içerikleri için son zamanlarda yoğun olarak araştırılan Mikroalgler ayrıca, besin katkı maddeleri olarak nutrasötik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan karotenoidler (lutein, zeaksantin, andastaksantin), vitaminler (Priyadarshani and Rath, 2012) gibi metabolitler üretir.

Yüksek yağ içeriği ve değerli metabolitlerin zengin rezervleri olan mikroalg biyokütlenin büyük ölçekli yetiştirilmesine olan ilgi artmaktadır, bununla birlikte optimal ve ekonomik olarak daha sürdürülebilir üretimi hakkında ayrıntılı literatür bulunmamaktadır. Ancak mikroalglerin bir dizi ürün üretme potansiyelleri göz önünde bulundurulursa, gelecekteki araştırma yönlerinin, biyolojik olarak elde edilen mikroalglerin gen havuzunu kullanarak elde edilen yeni izolatları seçmek ve yüksek oranda biyokütle üretebilmek için uygun kriterler geliştirmek olduğu aşıkardır.

Mikroalg kültürleri, değerli kimyasal bileşikleri nedeniyle çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılır. Günümüzde mikroalgler bilimsel araştırmalarda, öğrenciler için öğrenme kaynakları ve endüstri için hammadde olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bilim dünyası ve endüstri, bu alanlarda kullanılabilmek için saf ve tüm özellikleri ile tanımlanmış kültürlerle ihtiyaç duyar. Bu nedenle, tüm dünyada mikroalg

kültürlerini izole eden ve koruyan mikroalg kültürü koleksiyonlarına ihtiyaç vardır. Kültürel koleksiyonların bu önemli işlevleri göz önüne alındığında, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi'nde (KAEU-MAK) Mikroalg Kültür Koleksiyonu oluşturma çabaları bir süreden beri devam etmektedir. Kültür koleksiyonunda Cyanobacteria, Chlorophyta, Charophyta ve Bacillariophyta filumlarına ait toplam 19 mikroalg türü bulunmaktadır. Tatlı su kaynaklarından mikroalg toplanması, bunların tanımlanması, izolasyonu ve kültür koşullarının düzenlenmesi halen devam eden bir süreçtir. Bu çalışmada kullanılan *Chlamydomonas* sp. suşu da mevcut kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. *Chlamydomonas* türleri biyomaslarında lipitler, yağ asitleri, vitaminler, karotenoidler ve diğer hücresel bileşikleri biriktirir ve algal biyohidrojen ile biyofuel üretiminde değerlendirilmektedir (Gross ve diğ., 1988; Scholz ve diğ., 2011). *Chlamydomonas* türleri genetik çalışmalar, hücre etkileşimi, çevresel koşulların değişimi ile tepki mekanizması çalışmaları, hücre ve moleküler biyoloji araştırmaları için güçlü bir model sistemi oluşturmaktadırlar (Scholz ve diğ., 2011). Ayrıca, biyoteknoloji ve çeşitli endüstri alanlarında kullanılan değerli hammaddelerin üretimi ve biodizel üretimi için biyokütle üretiminde kullanılmaya başlanmıştır (Duong ve diğ., 2012; Çakmak Elibol, 2013; Yalçın Duygu ve Özer, 2018). Bundan dolayı, yağ içeriği yüksek suşları cazip hale gelmiştir. Önümüzdeki on yıllarda bir kazan-kazan stratejisi olacak aynı tür veya Mikroalg türlerinden elde edilen ürünler tarafından biyoyakıt, biyokütle ve diğer katma değer üretimi olacağı için, mikroalgler üzerine yapılan araştırmalara daha çok ihtiyaç duyulacak ve ekonomik değeri yüksek türlerin veya suşlarının araştırmaları daha da artış gösterecektir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. Mikroalgler ve Yağ İçeriği

Mikroalglerin yağ içeriği %1-40 arasında değişmektedir ve hatta belirli koşullar sağlandığında %80'lere kadar ulaşmaktadır (Çakmak Elibol, 2013). Yeşil algler, metabolik mekanizmalar ve fotosentetik pigmentler açısından daha yüksek bitkilerle benzerdir. Mikroalgler tarafından üretilen lipit, 14-20 karbonlu olan ve biyo-yakıt eldesi için kullanılan depolama lipitleri (polar olmayan lipitler) ve 20 karbonlu olup gıda olarak kullanılan, membran lipidleri olarak bilinen yapısal lipitler (polar lipitler) olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Depolama lipitleri esasen, ağırlıklı olarak doymuş yağ asitleri (FAs) ve biyodizel ve gliserol üretmek için transesterleştirilebilen bazı doymamış FA'lardan yapılan TAG (Triaçil gliserit) formundaki nötral lipidlerdir. Yapısal lipidler tipik olarak sudaki hayvanlar ve insanlar için gerekli besin maddeleri olan yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) içerir. Polar lipitler (fosfolipidler) ve steroller, hücre zarlarının, hücreler ve organeller için seçici bir bariyer görevi gören önemli yapısal bileşenleridir (Sharma ve ark. 2012; Jacob-Lopes ve diğ., 2015; Wong ve diğ., 2017).

2.2. Mikroalglerde Yağ İçeriğinin Artırılması

Kültür ortamındaki tüm makro besinler içinde, mikroalglerdeki toplam kuru maddenin %1-10'unu oluşturan azot (Wijffels ve diğ., 2010), nicel olarak çeşitli alglerde büyüme ve lipit birikimini etkileyen en önemli besindir. Amonyum, nitrat, maya, pepton ve üre olarak farklı şekillerde azot kaynağı bir besin takviyesi olarak kullanıldığında, hücre metabolizması oranını önemli ölçüde değiştirir ve lipit sentezinde önemli bir rol oynar (Minhas ve diğ., 2016). Birkaç mikroalgde azot açlık koşulları altında artan lipit birikimi iyi belgelenmiştir. Örneğin, azot açlığı altında lipit üretimi *Neochloris oleoabundans*'da iki kat ve *Nannochloropsis* sp. F & M-M24'te bir kat artmıştır (Li ve diğ., 2008). Nitrojen eksikliği de karbonhidratların biyosentetik yolunu etkiler (Cheng ve He, 2014). Örneğin, karbonhidrat içeriği *Tetraselmis subcordiformis*'te dört kat artmış ve azot noksanlığı koşullarında *Scenedesmus obliquus* CNW-N'de %29 artmıştır (Ji ve diğ., 2011; Ho ve diğ., 2012). Düşük azot, diğer taraftan, hem karotenoidlerin hem de proteinlerin sentezi için gerekli olan karbon için daha fazla rekabete yol açar (Minhas ve diğ., 2016). Sınırlı

azot ve fosfor arzı, lipid sentezini membran lipidlerinden nötr lipitlere kaydırır. Mikroalglerin stres koşulları altında depoladıkları lipidler çoğunlukla nötral lipidlerdir ve bunların büyük bir kısmı TAG'lerdir ve bu moleküller de günümüzde biyodisel ham maddesi olarak kullanılırlar (Çakmak Elibol, 2013).

Fosfor toplam algin biyokütlesinin %1'inden çok daha azını oluşturur (~0,03–0,06) ve yine de mikroalglerin sürdürülebilir büyümesi ve gelişimi için şarttır (Hannon ve diğ., 2010). Bir fosfor yokluğu ortamı, fotosentezin baskılanmasına neden olur ve mikroalglerin büyümesini etkiler. Dolayısıyla fosfor büyümesi ve metabolizması mikroalgler üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Doğal fitoplankton için, besinlerin doymuş büyüme hızlarının yakınında büyüyen hücreler 106:16:1 atom oranında tipik olarak C, N ve P içerir, Redfield oranı olarak da bilinir (Goldman ve diğ. 1979). Bu nedenle, biyokütle C:N:P oranındaki değişimde olası besin sınırlamasını ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hem azotla zenginleştirilmiş hem de yetersiz ortamın yüksek ışık yoğunluğu varlığında kullanıldığı iki fazlı bir sistem, biyokütle zenginleşmesi ile birinci fazda mikroalg büyümesini uyarır ve ikinci faz olan azotça fakir ortam, karotenoid zenginleştirmesini artırır. Bu gözlemler, gelecekteki uygulama stratejilerinin tanımlanmasında hayati öneme sahip konular olabilir (Minhas ve diğ., 2016). Azot ve fosfor alg büyümesinde önemli bir rol oynar. Azot, protein ve klorofil sentezindeki ana bileşendir (Karan ve diğ., 2015). Azot açlığı düşük biyokütle verimliliği ve fotosentetik oran ile ilişkilidir. Azotun tükenmesi, protein sentezinden lipid sentezine hücrel karbon akısını değiştirir (Wong ve diğ., 2017). Azot açlığı durumunda lipidlerin birikim gösterdiği, (özellikle TAG) birçok mikroalg türü ve soylarında belirlenmiştir. Besin açlığı uygulamaları, mikroalg TAG üretiminde en fazla başvurulan yollardan birisidir ve çoğu türde de çalışılmıştır (Çakmak Elibol, 2013). Örneğin bir diatom türü olan *Stephanodiscus minutulus* silikon, nitrojen veya fosfor sınırlaması altında yetiştirildiğinde, TAG birikiminde bir artış ve polar lipidlerde bir azalma (total lipidlerin yüzdesi olarak) besinle sınırlanan kültürlerin çoğunda belirlenmiştir (Lynn vd., 2000). Yeşil alg türü olan *Chlamydomonas moewusii* 'de besin sınırlamasının PUFA C16:3, C16:4 ve C18:3 miktarlarında azalmaya, oysa C16:1 ve C18:1 yağ asitlerinin tüm seviyelerinde ise artışa yol açtığı rapor edilmiştir (Arisz vd., 2000; Çakmak Elibol, 2013). Radolfii ve diğ. (2009)'nin yaptığı bir çalışmada, 4 deniz türünden yalnızca ikisinin %50 N ve P eksikliği ve yüksek ışık şiddeti

uygulanmasında, fatty asid içeriğinde kuru biyomasın %32 kadar artış olduğu kaydedilmiştir. Bu araştırmada, azot açlığında, *Dunaliella* sp. ve *Tetraselmis suecica* gibi bazı türlerin yağ içeriğinin azaldığı ancak karbohidrat miktarlarında artışlar olduğu not edilmiştir. Bu durumda besin sınırlaması altında, yağ içeriği yüksek olmayan türlerin büyümeyi durdurduğu veya asimile karbonu depo polisakkaritlerine tersine çevirdiği vurgulanmıştır.

Yağ içeriği ve metabolit üretimini arttırmak için stres faktörlerine ek olarak, mikroalg türleri, bunların seçimi ve kullanımı da önemlidir. Çeşitli fiziko-kimyasal streslerin etkisi altında mikroalglerin, lipidlerin yanı sıra katma değerli ürünler (özellikle karotenoidler) üretme kabiliyetinin olduğu da kanıtlanmaktadır. Lipidlerin, karotenoidlerin ve alg biyokütlesinin üretimi çevresel stres faktörleri altında arttırılabilir (Mata et al., 2010; Minhas ve diğ., 2016). Bu nedenle, mikroalglerin daha geniş ve daha çeşitli bir gen havuzunun araştırılması gerekmektedir. Ekonomik üretim için, bir büyüme döngüsünde aynı biyokütleden lipitler ve yüksek değerli ürünler gibi birden fazla ürünün türetilmesi bir yoldur (Minhas ve diğ., 2016). Ortam koşullarının simüle ettiği sınırlamayı aşabilecek organizmaları seçerek ve yüksek lipit içeriği üreten suşların kültür koşullarını daha da optimize etmek, mikroalg bazlı biyoyakıtların birim maliyetini de düşürebilir (Wijffels ve diğ., 2010). Mikro üretim, laboratuvar ölçekli biyo rafinerilerde lipitlerin ve diğer katma değerli ürünlerin üretimi için en elverişli ototrofik veya heterotrofik yetiştirme stratejileri geliştirmeye odaklanmıştır.

Nötral lipid içeriğinin araştırılması ve arttırılmasına yönelik çalışmalar pratikte kullanılabilir mi? Bu soruya cevap vermeden önce şunu vurgulamakta fayda var; Dünyanın biyodisel üretiminde kullandığı makro ürünlerden mısır, soya fasülyesi, kolza, hindistan cevizi ve Afrika palmyesi gibi ürünler için, kabaca yıllık toplam 109610 bin hektar alandan, 12.339 litre/ hektar yağ verimi gerçekleşir. Oysa, %30 yağ içeriğine sahip mikroalgler için bu alan toplam 187 bin hektar, 58.700 litre/ hektar yağ verimi, %70 yağ içeriğine sahip mikroalgler için ise, toplam 80 bin hektar ve 136.900 litre/ hektar yağ verimidir. Tabii ki, yağ içeriği yüksek *Neochloris* gibi cinslerin bölünme hızının düşük, yağ içeriği düşük türlerin ise bölünme hızının yüksek olabildiği dikkate alınmalıdır. Örneğin, *Schizochytrium* sp. kuru lipid içeriği %50-77 iken, ikiye katlanma süresi 60-80 sa., *Chlorella* sp.'nin kuru lipid içeriği %28-32, ikiye katlanma süresi 5-25 sa., *Chlamydomonas reinhardtii*'nin kuru lipid içeriği %21-30 iken, ikiye katlanma süresi 5-

24 sa. arasındadır (Çakmak Elibol, 2013). Mikroalg kültür ortamlarının içerdiği nutrientler ve metal iyonları kompozisyonlarını oluşturan kimyasalların maliyeti de düşünüldüğünde; hem lipid içeriği kısmen yüksek, ikiye katlanma süresi düşük olabilecek türlerin arayışı hem de elde edilecek biyodisel ürününün miktarını arttırıp hem de üretim maliyetini düşürecek türlerin arayışı her zaman güncel bir sorun olmaya devam edecektir.

2.3. Mikroalglerde Besin Sınırlamalarına Yönelik Uygulamalar

Bhamawat (2010), biyoreaktörlerde nutrient sınırlamaları altında *Chlamydomonas reinhardtii* türünün büyümesini yüksek lisans tez konusu olarak araştırmıştır. Çalışmasında, *Chlamydomonas reinhardtii* için uyguladığı N sınırlaması sonrasında C:N oranlarının kontrol grubu için 5,01, N sınırlamasında 16,47, P sınırlamasında ise, 9,6 olduğu görülmektedir.

C. reinhardtii üzerine bir başka çalışmada, N-sınırlaması altında, N-sınırlaması sonrasında sınırlı hücre bölünmesi ve artan hücre boyutu gözlenmiş ve ayrıca büyüme aşaması ve besin mevcudiyeti ile hücresel karbon tahsisinde hızlı ve ayırt edici değişiklikler ortaya çıkmıştır (Dean ve diğ., 2010). C içeriğindeki artış zengin karbohidrat veya lipidlerdeki hücre içi depolamadan kaynaklandığı şeklinde açıklanmaktadır (Dean ve diğ., 2010; Becker, 1994). Ayrıca N-yoksunlu *C. reinhardtii* hücrelerinin alkol ve biyodizel üretimi için kullanılabilir nişasta ve lipitleri aşırı biriktireceği de bildirilmiştir (Mus ve diğ. 2007).

Elibol-Çakmak (2013) doktora tezinde, *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard türünün CC-124 soyu ve bu mikroalgin büyüme ortamı olarak Tris-Asetat-Fosfat besiyerini kullanmış, büyüme ortamlarında çok sayıda makro ve mikroelementin hiç bulunmadığı veya 5x konsantrasyonda buldukları ortamlarda 10 gün boyunca inkübasyona bırakılan mikroalglerin nötral lipid üretimi ve büyüme ile ilgili parametreler irdelenmiştir. Bu araştırmada, *C. reinhardtii*'ye uygulanan N, S, P ve Mg açlığı ile N ve Zn fazlalığı gibi stress faktörleri nedeniyle hücre sayısındaki artışın baskılanması sonucunda, hücre hacminde, karbohidrat, nötral lipid ve TAG içeriğinde artış gibi ortak cevapların ortaya çıktığı belirlenmiştir. Büyüme ile ilgili parametreler ile TAG ve nötral lipid üretimindeki artışlar dikkate alındığında, mikroalglerde lipid üretimini artırmak için S, P ve Mg açlığı uygulamalarının, N açlığına kıyasla daha etkili yollar olduğu, diğer

tarafından mikroalglerin içerdikleri FAME profilleri değerlendirildiğinde N, S ve P açılığının biyodizel eldesi için uluslararası standartları karşılayacak nitelikte yağ asidi üretimini teşvik ettikleri vurgulanmıştır.

Başka bir çalışmada, bir mikroalg türü olan *Chlorella vulgaris*, modifiye Bold bazal ortamında (BBM) farklı konsantrasyonlarda nitrat (NaNO_3) ve fosfat (K_2HPO_4 ve KH_2PO_4) kimyasalları kullanılarak besin sınırlaması ve besin açılığı uygulaması ve kontrollü koşullar altında yetiştirildi. Farklı nutrient ortamlarına biyokütle ve lipid üretim cevapları optik yoğunluk, hücre yoğunluğu, kuru biyokütle ve lipid üretkenliği açısından incelenmiş; 12 günlük kesikli kültür döneminde, elde edilen en yüksek biyokütle verimliliği BBM- $\text{N}_{\text{kontrol}}\text{P}_{\text{sınırlı}}$ koşulunda $72.083 \text{ mg L}^{-1} \text{ gün}^{-1}$ olmuştur. Elde edilen en yüksek lipid içeriği, lipid konsantrasyonu ve lipid verimliliği, BBM- $\text{N}_{\text{kontrol}}\text{P}_{\text{yoksun}}$ koşulu altında sırasıyla %53,202, 287.291 mg/L ve $23,449 \text{ mg L}^{-1} \text{ gün}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Azot, *C. vulgaris*' in biyokütle konsantrasyonunda önemli bir etkiye sahipken, fosfor için önemli bir etki bulunmamıştır. Azot ve fosfor açılığı, lipid birikimini etkileyen ve *C. vulgaris* kültürlerinin lipid kompozisyonunu etkileyen strateji olarak bulunmuştur (Wong ve diğ., 2017). Ayrıca, BBM ($\text{N}_{\text{yoksun}}\text{P}_{\text{yoksun}}$) ayrıca tüm kültür koşulları arasında en düşük hücre sayısına yol açtı, bu da besinlerin birlikte açılığının *C. vulgaris* ekimi için en sert büyüme koşullarını sunduğunu düşündürmektedir.

Breuer ve diğ. (2013), *Scenedesmus obliquus* UTEX 393 için azot açıklı koşullar altında ışık yoğunluğunun etkisi ile pH ve sıcaklığın TAG birikimi üzerindeki kombine etkisi araştırmışlar. Maksimum TAG içeriği ışık yoğunluğundan bağımsızdı ancak en düşük ışıkta ($0,263 \text{ g/mol foton}$), pH 7 ve sıcaklığın $27,5^\circ\text{C}$ 'de farklı kombinasyonlarında kuru ağırlığın %18 ila %40'ı arasında değiştiği kaydedilmiştir.

Ak (2013), yüksek lisans tez çalışmasında, azot eksikliğine bağlı stresin, fotobiyoreaktörde kültüre alınan *Phaeodactylus tricoratum*'un (Bacillariophyceae) lipid miktarına etkisini araştırmıştır. Çalışmada azot sınırlamasının kuru madde, klorofil *a*, toplam karoten ve protein miktarını azalttığı, ancak lipid oranını artırdığı belirlenmiştir. Kontrol grubunda lipid oranı %16,93, protein %31,05 oranında belirlenirken, azot eksikliği uygulanan grupta lipid oranı %35,04, kuru madde miktarı protein oranı %8,87 olarak belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kültüre Alınan Mikroalg Türü Ve Kültür Ortamı

Tek hücreli, yeşil ve bir kamçılı mikroalg türü olan *Chlamydomonas* sp.1 ve *C. sp.2* suşları önceki çalışmalarda Ankara ilindeki (Türkiye) çeşitli tatlısu birikintilerinden toplanan örneklerden izole edilmişlerdir. Suşların izolasyonlarında tek hücreden üretme yöntemi kullanılmış (Duygu ve diğ. 2018; Parvin ve diğ., 2007) ve iki suş izole edilmiştir. Her iki suşun sistematik kategorizasyonu aşağıdaki gibidir;

Empire: Eukaryota

Alem: Plantae

Bölüm: Chlorophyta

Sınıf: Chlorophyceae

Takım: Chlamydomonadales

Familya: Chlamydomonadaceae

Cins: Chlamydomonas

Tür: *Chlamydomonas* sp.1

Chlamydomonas sp.2

Bu suşlar, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi-Mikroalg Kültür Koleksiyonu'nda (KAEU-MAK) kültür koleksiyonunda muhafaza edilmekte olup, *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Ch101) ve *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Ch102) olarak kodlanmıştır. Işık kaynağı ($50 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) kültürlere 22 cm uzaklıkta yatay olarak yerleştirilmiş, 16 aydınlık: 8 karanlık ışık periyodu uygulanmış ve 22-25°C'de oda sıcaklığında kültüre edilmişlerdir. Besi ortamlarının pH'ı 6,5-7'ye ayarlanmıştır. Kültürlerin yetiştirilmesinde kesikli kültür sistemi kullanılmaktadır. Her iki *Chlamydomonas* sp.1 ve *Chlamydomonas* sp.2 suşları yoğunlaştırmak amacı ile aşamalı olarak (250, 500, 750, 1000, 1500 mL'lik erlenlerde) BG 11 modifiye besiyerinde çoğaltılmıştır. Çalışmanın hücre yoğunluğunu artırma aşamasında, başlangıçta laboratuvar koşullarının sıcaklık parametresinde uzun süre oda sıcaklığının altında bir sıcaklık derecesi söz konusu olduğundan, suşlardan birinde çoğaltım aşamasının başlarında üreme başarısı çok düşük olduğu için araştırma tek suş üzerinden yürütülmüştür. 1500 mL'lik besiyerlerinde yaklaşık $4,0 \times 10^5$ hücre yoğunluğuna gelen bir suş ile deney yürütülmeğe devam edilmiştir. Yoğunlaştırma

çalışmaları devam ederken sıcaklık, oda sıcaklığı koşullarına (22-25°C) geldiği için deneyi etkileyen bir faktör durumunda olmamıştır.

Tablo 3.1. BG 11 Medium (Modifiye edilmiş BG 11 Kültür Ortamı)

	Bileşenler	Miktarı	Stok solüsyon konsantrasyonu	Final konsantrasyon
1	NaNO ₃ (Fisher BP360-500)	10 mL	30 g./200 mL dH ₂ O	17,6 mM 18 g/120 mL
2	K ₂ HPO ₄ (Sigma P 3786)	10 mL	0,8 g/200 mL dH ₂ O	0,22 mM 0.48 g/120 mL
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma 230391)	10 mL	1,5 g/200 mL dH ₂ O	0,03 mM 0.9g/120 mL
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma C-3881)	10 mL	0,72 g/200 mL dH ₂ O	0,2 mM 0.432 g/120 mL
5	Citric Acid·H ₂ O (Fisher A 104)	10 mL	0,12 g/200 mL dH ₂ O	0,03 mM 0.072 g/120 mL
6	Ammonium Ferric Citrate	10 mL	0,12 g/200 mL dH ₂ O	0,02 mM 0.072 g/120 mL
7	Na ₂ EDTA·2H ₂ O (Sigma ED255)	10 mL	0,02 g/200 mL dH ₂ O	0,002 mM 0.012 g/120 mL
8	Na ₂ CO ₃ (Baker 3604)	10 mL	0,4 g/200 mL dH ₂ O	0,18 mM 0.24 g/120 mL
9	GB 11 Trace Metal Solusyonu*	1 mL		

*Trace Metal Solusyonu (1 L)

Tablo 1'in devamı

	Bileşenler	Miktarı
1	H ₃ BO ₃ (Baker 0084)	2,86 g/L

2	MnCl ₂ ·4H ₂ O (Baker 2540)	1,81 g/L
3	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma Z 0251)	0,22 g/L
4	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (J.T. Baker 3764)	0,39 g/L
5	CuSO ₄ ·5H ₂ O (MCIB 3M11)	0,079 g/L
6	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (Mallinckroft 4544)	49,4 mg/L

3.2. Metod

3.2.1. Ekim Koşulları

1 L. Modifiye BG 11 kültür ortamı için, her stok solüsyonundan 10'ar mL ve 1 mL metal solüsyonu eklenerek 1 L'lik besiyeri hazırlanır. N ve P eksikliği için stok solüsyonlar hazırlanırken;

1. Kontrol grubu; Normal stok solüsyon konsantrasyonları,
2. %50 N (-) ve P_{normal}; 1 no'lu stok solüsyonunda (NaNO₃) %50 eksiltme,
3. %50 P (-) ve N_{normal}; 2 no'lu stok solüsyonunda (K₂HPO₄) %50 eksiltme,
4. %50 N (-) ve %50 P (-); 1 (NaNO₃) ve 2 (K₂HPO₄) no'lu stok solüsyonlarında %50 eksiltme,
5. %100 N (-); 1 no'lu stok solüsyonunda %100 eksiltme,
6. %100 N (-) ve %100 P (-); 1 ve 2 no'lu stok solüsyonlarında %100 eksiltme yapılmıştır.

3 L'lik kavanozlar içerisine son hacim olarak; 2250 mL besi ortamı + 25'şer mL her besiyeri stoğundan + 2.5 mL metal stoktan eklenerek, 1 M HCL ile pH düzeyi 6,7-6,9 arasında ayarlanmıştır. 250 mL (1500 mL'lik yoğunlaştırılmış kültürden alınarak) hücre ekimleri yapılmıştır.

3.2.2. Laboratuvarda Kültüre Alınan Mikroalg Üretimi

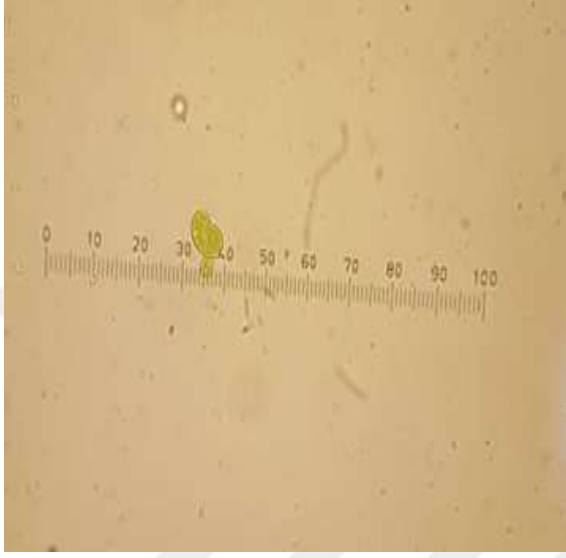
Oda sıcaklığı 20-25 °C olabilen kapalı bir ortamda kontrol grubu ile deney grubu olmak üzere 3'er L'lik kavanozlarda başlangıç seviyesi 2,5 L olacak şekilde, ışık kaynağına yaklaşık 20 cm. uzaklıkta olacak şekilde, havalandırma tertibatı basit akvaryum motorları ile sağlanarak inkübasyona bırakılmıştır. Birinci gün ve sonrasında 2 günde bir olmak üzere, optik yoğunluk, klorofil a ve hücre sayımları için steril koşulları sağlayarak yaklaşık 20 mL örnek alınmıştır.



Şekil 3.1. Deneyde kullanılan ışık zaman ayarlayıcı (16 aydınlık:8 karanlık ışık ayarı)



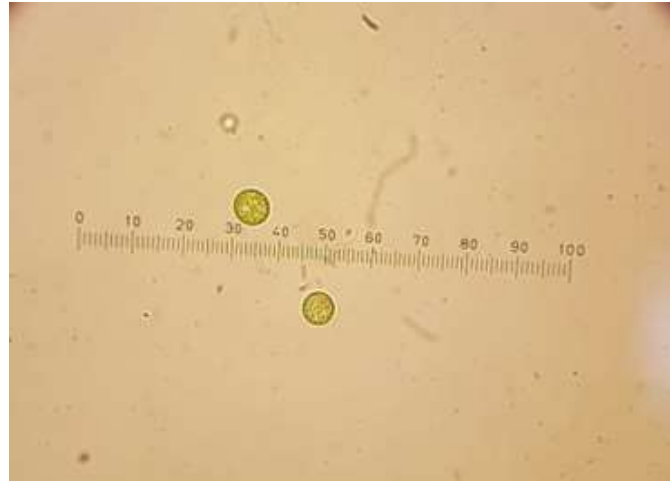
Şekil 3.2. *Chlamydomonas* sp. türünün deney ortamındaki gelişimi



a



b



c

Şekil 3.3. a,b,c. *Chlamydomonas* sp. türünün mikroskopik görüntüleri (Büyütme oranı: 10x40)

3.2.3. Deneme Süresince Yapılan Analizler

Chlamydomonas sp. suşunun toplam üreme miktarı optik yoğunluk, klorofil-a ve hücre sayımları tayini ile tespit edilmiştir.

3.2.3.1. Optik Yoğunluk

Mikroalgler için maksimum absorbans değeri, optik yoğunluk (OD) ile büyüme eğrisini elde etmek için kullanılır (Santos-Ballardo ve ark. 2015). Optik yoğunluk için her örneklemede yaklaşık 3 mL'lik örnek, homogen halde 400-400 nm dalga boyunda Thermo Scientific marka spektrofotometrede tarama yapılarak maksimum absorbans değerlerine 680 nm'de rastlandığı için, her örneklemede 680 nm'de optik yoğunluk değeri kaydedilmiştir.

3.2.3.2. Klorofil a Analizi

Mikroalg örneklerinin biyokütlesinin klorofil-a analizleri metanol metodu kullanılarak yapılmıştır (Hipkins ve Baker, 1986). Bunun için, her seferinde, 15 mL'lik örnek Whatman GF/C kağıdından bir su trompu yardımı ile süzüldü. Kağıt üzerinde kalan süzüntü, hücrelere değdirilmeden bir makas yardımı ile örnekli kağıt kesilerek, 50 mL'lik erlenlere alındı. Üzerlerine 14 mL %96'lık metanol eklenerek, 70 °C'de, yeşil renkleri beyazlaşmaya kadar ısıtıldı. Daha sonra 5 dk. karanlıkta bekletildi ve Whatman GF/A kağıdından tekrar süzülerek, süzüntü hacmi ölçüldü ve elde edilen süzüntünün 665 ve 750 nm dalga boylarında okumaları gerçekleştirildi.

Klorofil miktarı ise;

$$\mu\text{gr. Chl } a/L = 13,6x(A_{xv}/dxV)$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

V= Başlangıçta süzülen numune miktarı

V= Son olarak elde edilen süzüntü miktarı

A= Absorbans (Not: Eğer 750 nm'de okunan değer 0'dan büyükse, bu değer 665 nm'deki değerden çıkarılarak A elde edilir.)

3.2.3.3. Hücre Sayımları

Hücre yoğunlukları için 1'er mL'lik örnekler, 0,1 mL %4'lük formaldehit eklenerek tespit edildi ve ileriki aşamalarda hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. Hücre yoğunlukları aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır (Guillard ve Sierachiki, 2005);

$$HY = T \times 400016 \quad (T: 16 \text{ kareye düşen toplam hücre sayısı; } 4000: \text{ bir karenin hacmi})$$

Hücre yoğunluğu (hücre/mL) Nauaber sayım kamarasında 16 kareye düşen hücrelerin sayılmasıyla yapılmıştır.

3.2.4. Deneme Sonrasında Yapılan Analizler

Logaritmik artış fazından sonra, kontrol ve deney gruplarına ait her biri yaklaşık 2 L yoğunlaştırılmış 6 adet örnek, hasat ve sonrası analizler için kültür kavanozları ile birlikte soğuk karanlık taşıma aparatları ile dış merkezli bir laboratuvara (Kırıkkale Üniversitesi-KUBTUAM) götürülmüştür. Önce liyofilize edilen örneklerden kurutulmuş biyomas elde edildi. Ardından yine bu laboratuvarlarda, toplam lipid miktarları ile fatty asidi kompozisyonu çalışılmıştır. Ayrıca, karbohidrat miktarları FTIR (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi) ile ortalama grafik elde edilerek değerlendirilmeğe çalışılmıştır.

3.2.4.1. Hasat İşlemi

Durgun faz durumuna gelen numuneler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen çöküntü kısmı, -80 °C'de bir gece bekletildikten sonra 0,056 mPa altında -58 °C'de 48 saat boyunca liyofilizatörde (Alpha 1-2 LD plus) liyofilize edilmiştir. Daha sonra deneylerde kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.4.2. Toplam Lipid Tayini

1. Farklı ortamlarda inkübasyona bırakılan mikroalglerden 40 ml örnek, ağırlığı önceden tartılarak kaydedilmiş olan falkon tüpüne alınarak 5000 rpm devir hızında 3 dk santrifüjlendi, sıvı atıldı ve tüp tartıldı. Tüp içerisinde 1g Mikroalg örneği oluncaya kadar aynı şekilde mikroalg örnekleri tüp içerisine alınarak santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
2. Tüp içerisinde bulunan mikroalgler ddH₂O ile iki kez yıkandı.
3. Tüp içerisine 10 ml metanol ilave edildi ve 30 sn vortekslendi.

4. Daha sonra 5 ml kloroform ve 1 ml ddH₂O ilave edilip 30 sn vortekslendi.
5. Tüpler 3500 g devir hızında, 20 °C sıcaklıkta 15 dk boyunca santrifüjlendiler.
6. Üst kısımda bulunan metanol/su tabakası uzaklaştırıldı.
7. Alt kısımda bulunan metanol/kloroform tabakası bir pastör pipeti yardımı ile önceden tartılmış temiz bir tüpe aktarıldı.
8. Arta kalan katılar 4-7. basamaklar tekrar uygulanarak katılarda bulunan lipidler de alınmış oldu.
9. Elde edilen lipid sıvısı Whatmann no 1 filtre kağıdı kullanılarak filtrelendi ve rotary evaporator (Heidolph 4000) kullanılarak (40°C sıcaklık ve düşük basınç altında) metanol ve kloroformun buharlaştırılması sağlandı.
10. Tüpler tekrar tartılarak lipid miktarı ağırlıksal olarak hesaplandı. Örnekte bulunan lipid miktarının yüzde olarak hesaplanmasında ise aşağıdaki formül kullanıldı (Sivaprakash ve diğ., 2019);
Lipid yüzdesi = (ekstrakt edilen lipid miktarı (gr) / Mikroalg örnek ağırlığı (g)) x 100

3.2.4.3. Toplam Fatty Asidi Konsantrasyonu ve Kompozisyonu (FAMEs analizi)

Element manipölasyonlarına cevapta mikroalglerin yağ asidi profillerinde meydana gelen değişimin belirlenmesi için FAMEs analizi gerçekleştirilmiştir.

Büyüme ortamından sürekli çöktürerek sağlanan yaklaşık 0,5 g mikroalg örneği vida kapaklı eppendorf tüplerine alınmış, saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra üzerine 300 µl ekstraksiyon solüsyonu (metanol içerisinde hazırlanmış %2'lik H₂SO₄ çözeltisi) ilave edilmiştir.

1. İnternal standart olarak, kör numune dahil her tüpe 30 µg nonadecanoic acid ilave edilmiştir.
2. Örnekler 2 saat boyunca 80 °C sıcaklıkta termomikser yardımı ile 750 rpm devir hızında sürekli çalkalanarak hücrelerin parçalanması ve lipidlerin açığa çıkması sağlanmıştır.
3. İnkübasyon sonrasında örnekler 10 dk oda şartlarında bekletilmiş ve sıcaklığın düşmesi sağlanmıştır.
4. Tüplerin içerisine 300 µl %0,9 konsantrasyonda NaCl ve 300 µl hekzan ilave edilmiştir.

5. Böylece metanolde bulunan lipidlerin hekzan fazına geçmesi için örnekler 30 sn boyunca vortekslenmiş ve 10 dk boyunca da nutating mikser üzerinde çalkalanmıştır.
6. Daha sonra örnekler 3 dk boyunca 20 °C sıcaklıkta 3000 g devir hızında santrifüjlenmiştir.
7. Son olarak üstteki hekzan tabakasından 150 µl örnek alınarak GC-MS tüplerine aktarılmıştır.
8. Tüplere aktarılan örnekler analiz için Shimadzu marka GC-FID (Shimadzu GC-2010) cihazına yerleştirilmiştir. Ölçüm için cihaza 130°C başlangıç sıcaklık, 240°C ye kadar her 5°C de 5 dk beklenmesi talimatı işlenmiştir.
9. Ölçüm sonucu elde edilen pikler analiz edilmiş, alan hesaplaması yapılarak belirlenen metil esterlerin yüzdeleri oransal olarak sunulmuştur (Çakmak ve diğ., 2014).

3.2.4.4. FTIR Analizi

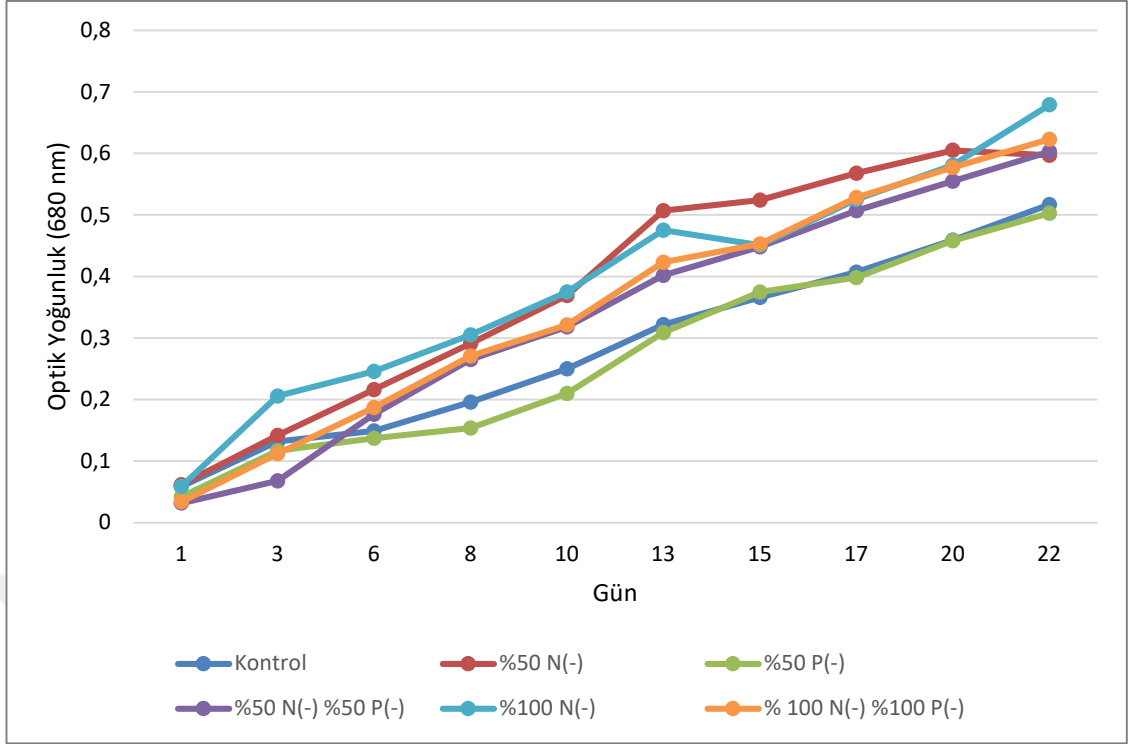
Chlamydomonas sp. suşunun kuru biyomass kütlesi kullanılarak, Bruker VERTEX 70v FTIR spektrometresi kullanılarak 400-4000 nm dalga boyu aralığında FTIR analizi yaptırılmıştır.

4. BULGULAR

Chlamydomonas sp. suşuna ait deneme süresince ekim günü ve iki günde bir alınan örneklerin optik yoğunluk, klorofil a ve hücre sayımları her örneklemede, 22. gün sonrasında ise, örneklerin liyofilizasyon işleminden sonra, dondurularak kurutulan biyomas, toplam lipid ve fatty asidi analizleri dış merkezli bir laboratuvarlarda yapılmış ve sonuçlar bu sıralama ile sunulmuştur.

4.1. Optik Yoğunluk

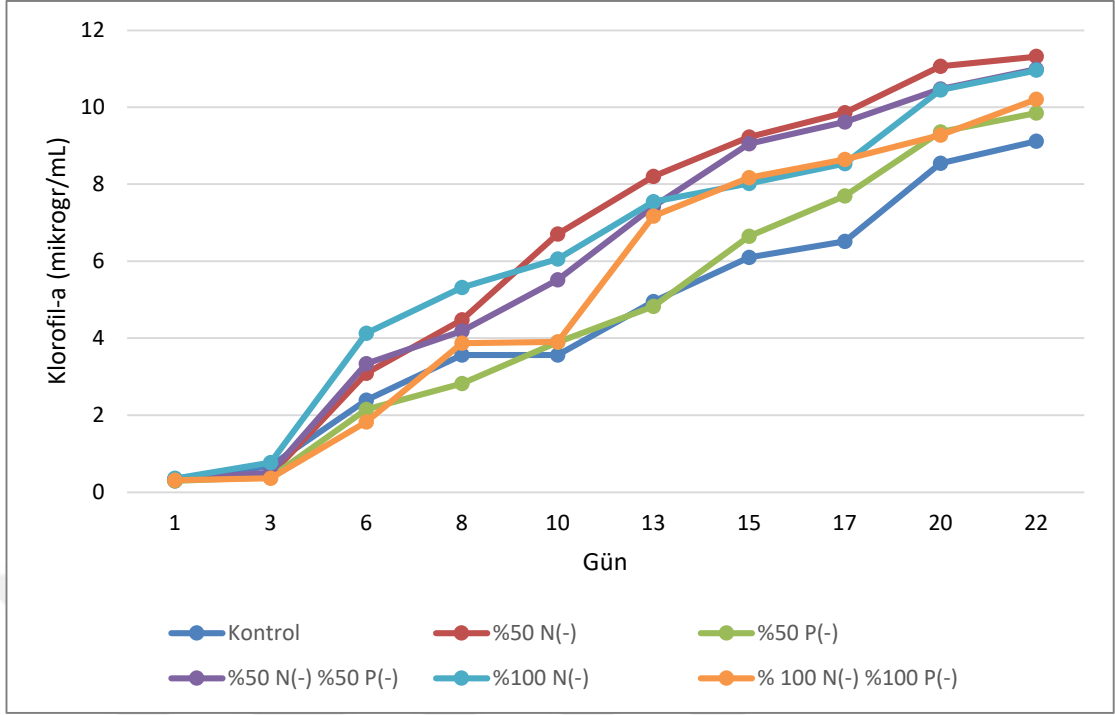
Ekimlerin yapılmasından sonra, 1. gün optik yoğunluk ölçümlerinde değerler sırasıyla; kontrol grubu $0,059\pm0,002$, %50 N (-) grubu $0,062\pm0,002$, %50 P (-) grubu $0,042\pm0,003$, %50 N (-) ve %50 P (-) grubu $0,032\pm0,001$, %100 N (-) grubu $0,059\pm0,002$, %100 N (-) ve %100 P (-) grubu ise, $0,034\pm0,001$ olarak kaydedilmiştir. Maksimum hücre yoğunlukları (OD olarak) ise, gruplara göre sırasıyla, $0,517\pm0,004$, $0,605\pm0,005$, $0,503\pm0,006$, $0,603\pm0,006$, $0,676\pm0,005$ ve $0,623\pm0,006$ olarak kaydedilmiştir. 13. günden itibaren artışlarda azalmalar kaydedilmiştir. 22. günden itibaren uygulamalar sonlandırılmış ve örnekler hasat edilmiştir. Hücre yoğunluklarında çok önemli farklar görülmemekle birlikte %50 N (-) ve %100 N (-) eksikliklerinde hücrelerin yoğunluklarında kısmen daha başarılı bir gelişim gözlenmektedir. Buna karşılık kontrol grubu ve %50 P (-) grubu uygulamalarında hücre yoğunluklarındaki değişim diğerlerine göre, daha düşük bir artışla devam etmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Chlamydomonas* sp. Suşunun Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Hücre Yoğunluğu (OD₆₈₀)

4.2. Klorofil a

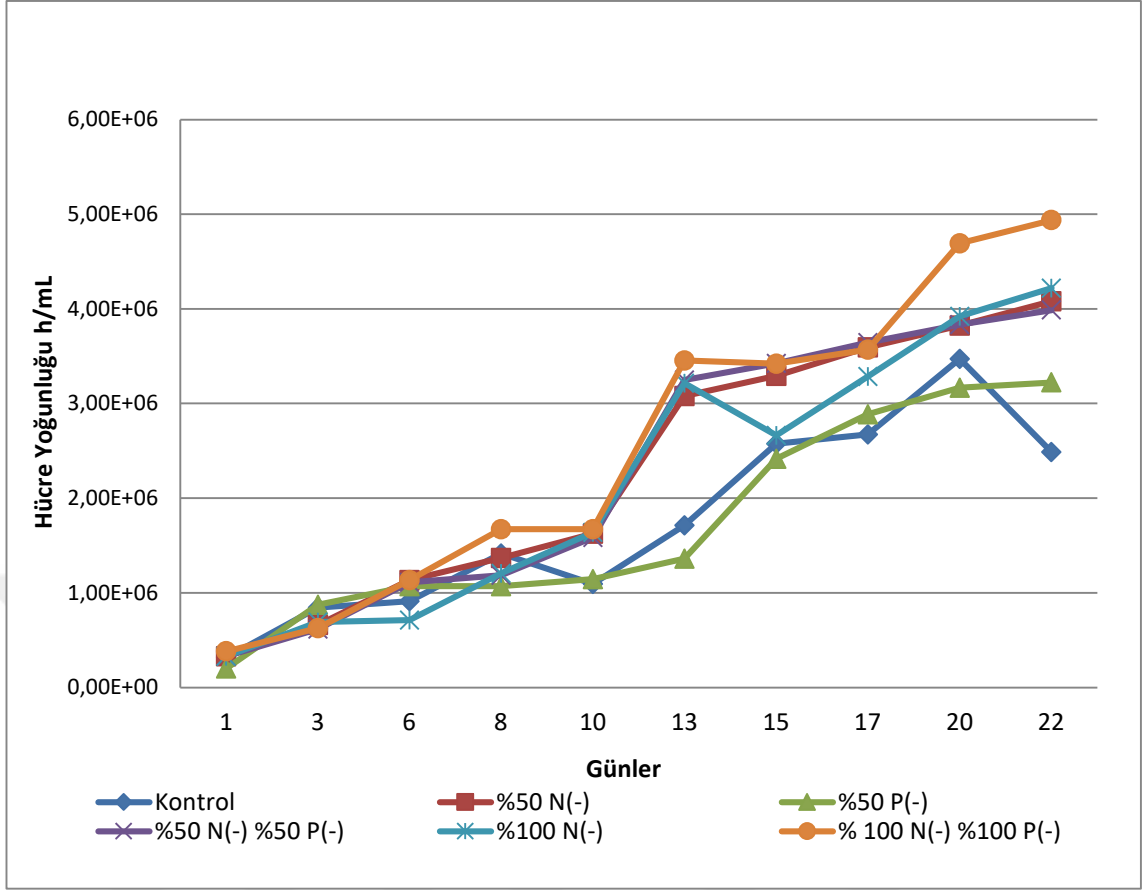
Klorofil a değerleri de yaklaşık olarak optik yoğunluk değerlerinde olduğu gibi tüm uygulama gruplarında deneme süresince benzer bir değişim sergilemektedir (Şekil 4.2). Minimum ve maksimum değerler $\mu\text{gr/mL}$ olarak sırasıyla; Kontrol grubunda $0,292\pm0,001-9,121\pm0,004$, %50 N (-) grubunda $0,306\pm0,003-11,32\pm0,005$, %50 P (-) grubunda $0,294\pm0,001-9,356\pm0,003$, %50 N (-) ve %50 P (-) grubunda $0,348\pm0,003-10,99\pm0,004$, %100 N (-) grubunda $0,357\pm0,002-10,96\pm0,004$ ve %100 N (-) ve %100 P (-) grubunda $0,31\pm0,001-10,21\pm0,004$ olarak ölçülmüştür. Optik yoğunluk değerlerinde olduğu gibi, %50 N (-) ve %100 N (-) eksikliklerinde klorofil a değerleri diğerlerine göre daha yüksek yoğunluklarda seyrederken, yine kontrol grubu ve %50 P (-) eksikliklerinde daha düşük yoğunluklar kaydedilmiştir.



Şekil 4.2. *Chlamydomonas* sp. Suşunun Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Klorofil a Değerleri

4.3. Hücre Yoğunluğu

Hücre yoğunluğu mL'deki hücre sayıları olarak, tüm uygulama gruplarında deneme süresince optik yoğunluk ve klorofil a değerlerine benzer bir değişim sergilemektedir (Şekil 4.3). Minimum ve maksimum değerler $\times 10^6$ hücre/mL olarak sırasıyla; Kontrol grubunda $0,32 \pm 0,032 - 3,47 \pm 0,52$, %50 N (-) grubunda $0,33 \pm 0,11 - 4,08 \pm 0,059$, %50 P (-) grubunda $0,2 \pm 0,032 - 3,22 \pm 0,023$, %50 N (-) ve %50 P (-) grubunda $0,33 \pm 0,08 - 3,99 \pm 0,034$, %100 N (-) grubunda $0,33 \pm 0,07 - 4,22 \pm 0,06$ ve %100 N (-) ve %100 P (-) grubunda $0,38 \pm 0,07 - 4,94 \pm 0,06$ olarak kaydedilmiştir. Optik yoğunluk ve klorofil a değerlerinde olduğu gibi, kontrol grubu ve %50 P (-) eksikliklerinde daha düşük hücre yoğunlukları kaydedilmiştir. %100 N (-) ile %100 N (-) ve %100 P (-) gruplarında ise, özellikle son üç sayımda daha çok optik yoğunlukla benzer bir gelişim göstermiştir.

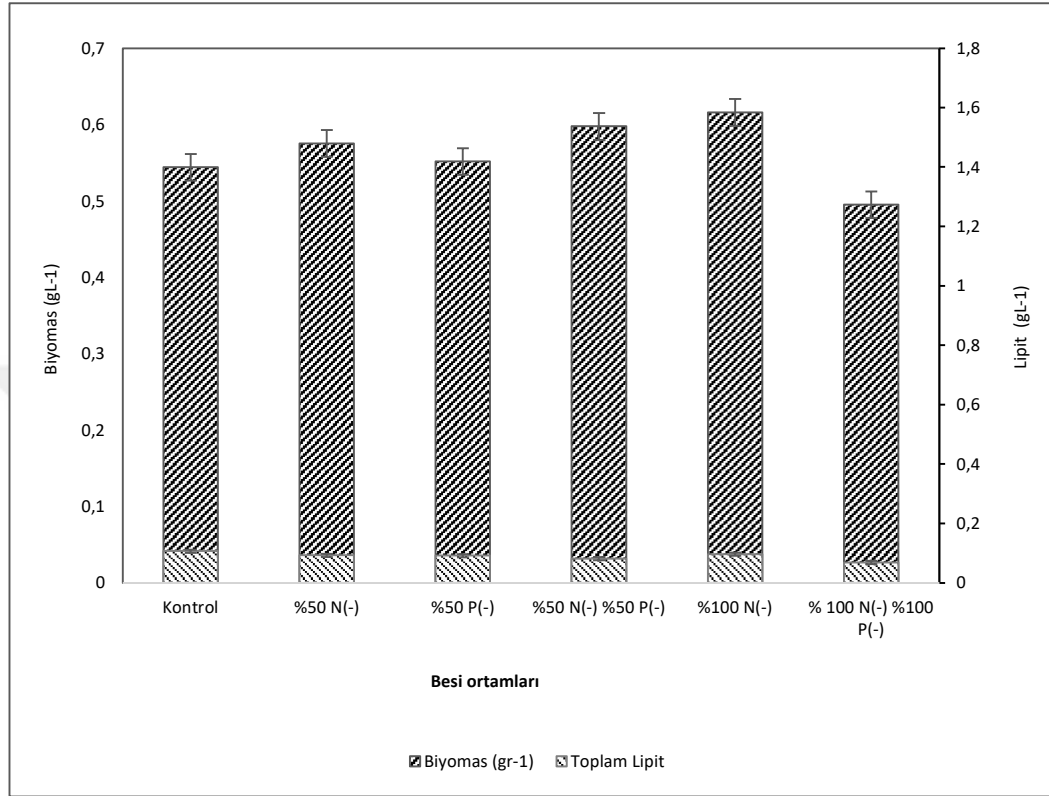


Şekil 4.3. *Chlamydomonas* sp. Suşunun Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Hücre Yoğunluğu Değerleri

4.4. Biyomas ve Toplam Lipid

Dondurularak kurutulmuş biyomas ve içerdiği toplam lipid değerleri incelendiğinde (Şekil 4.4.) gL^{-1} olarak, kontrol grubu 0,5442-0,107, %50 N (-) grubu 0,5753-0,093, %50 P (-) grubu 0,5517-0,092, %50 N (-) ve %50 P (-) grubu 0,5977-0,082, %100 N (-) grubu 0,616-0,097 ve %100 N (-) ve %100 P (-) grubu 0,4952-0,069 olmak üzere kaydedilmiştir. Gruplara göre toplam lipid dağılım oranları sırasıyla %19,7, %16,2, %16,8, %13,8, %15,8 ve %13,9 olarak hesaplanmıştır. Yapılan çoğu araştırmada, mikroalglerin azot yoksunluğu durumunda, lipid miktarlarında artışlar olduğu kaydedilmiştir (Dean ve diğ., 2008; Ak, 2013; Ağırman ve Çetin, 2017). Ancak, bazı çalışmalarda da tam tersine azot yoksunluğunun lipid miktarı üzerinde azalmalara neden olduğu ve bu durum, besin sınırlaması altında, yağ içeriği yüksek olmayan türlerin büyümeyi durdurduğu veya asimile karbonu depo polisakkaritlerine tersine çevirdiği şeklinde açıklanmıştır (Rudolfi ve diğ., 2009). Dean ve diğ. (2010)'nin, *Chlamydomonas*

reinhardtii ve *Scenedesmus subspicatus* türleri üzerinde uyguladıkları N açlığında, FTIR analizi ile lipid:amid I ve karbohidrat:amide I oranlarında artış olduğu kaydedilmiştir.



Şekil 4.4. *Chlamydomonas* sp. Suşunun Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Toplam Biomass ve Toplam Lipid Miktarı

4.5. Fatty Asidi

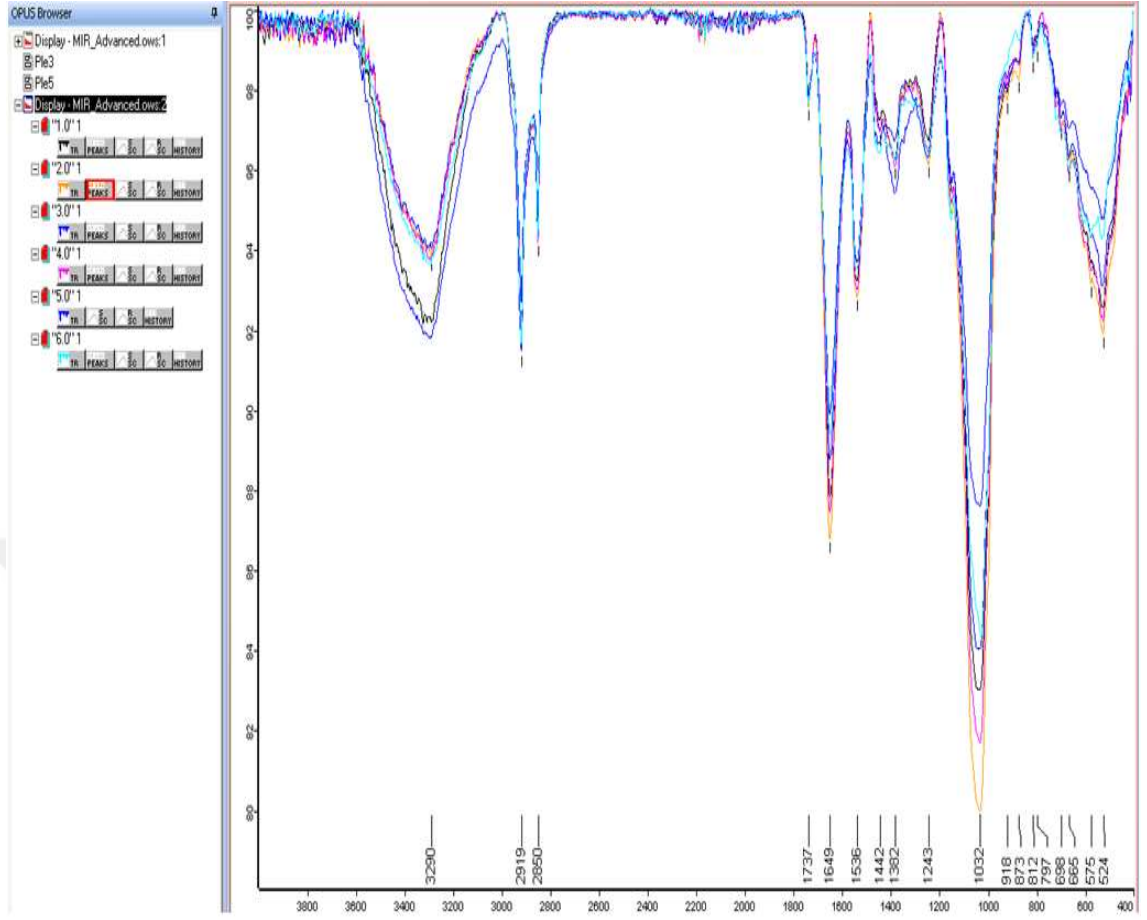
Tablo 4.1. Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Toplam FAMES Konsantrasyonu ve Kompozisyonu

No	Bileşen İsmi	Kontrol	%50 N (-)	%50 P (-)	%50 N (-) %50 P (-)	%100 N (-)	%100N (-) P (-)
1	Caproic acid (C6:0)	0,0343	0,000	0,1678			
2	Lauric acid (C12:0)	0,7009	0,7063	0,6529	0,6373	0,6780	0,6992
3	Tridecanoic acid (C13:0)	0,1176	0,2511	0,1007	0,1878	0,1051	0,1185
4	Myristic acid (C14:0)	0,2114	0,2515	0,1767	0,1407	0,1723	0,2284
5	Myristoleic acid (C14:1)	0,9175	1,5424	0,9548	1,0720	0,8521	0,7283

6	Pentadecanoic acid (C15:0)	1,6340	2,6824	1,6683	2,1082	1,5134	1,3604
7	Palmitic acid (C16:0)	18,8745	23,0598	18,1726	18,3683	18,9808	20,8426
8	Palmitoleic acid (C16:1)	0,3444	0,4775	0,3670	0,3362	0,3822	0,3812
9	Heptadecanoic acid (C17:0)	0,1599	0,2738		0,1024	0,1127	0,2116
10	Cis-10-heptadecanoic acid (C17:1)	0,3377	0,6769	0,2373	0,4228	0,3137	0,0928
11	Stearic acid (C18:0)	0,3778	0,6976	0,3251	0,2786	0,2201	0,7930
12	Elaidic acid (C18:1n9t)	15,3428	20,5651	15,0679	16,4662	14,9108	14,1687
13	Oleic acid (C18:1n9c)	14,5596	21,3427	13,7824	14,6093	16,3151	19,1400
14	Linoleic acid	18,6564	22,6117	19,0886	17,2891	17,7727	17,3718
15	Gama-linolenic acid (C18:3n6)	1,1751	0,0977	0,3757	0,0510	0,1501	0,0457
16	Arachidic acid (C20:0)	0,0645	0,0287	0,1836	0,0350	0,0137	-0,0261
17	Cis-11-eicosenoic acid (C20:1)	23,5011	0,0267	25,5365	24,9094	24,1273	19,2505
18	Linolenic acid (C18:3n6)	0,1748	0,3616	0,1799	0,2622	0,2869	0,5163
19	Heneicosanoic acid (C21:0)	2,4555	3,7178	2,5363	2,6412	2,8551	3,5332
20	Cis-,11,14 eicosadienoic acid (C20:2)	0,0894	0,0856	0,1149	0,000	0,1215	0,0940
21	Behenic acid (C22:0)	0,1393	0,1690	0,1543	0,0825	0,1166	0,1567
22	Cis-8,11,14-eicosatrienoic acid (C20:3n6)	0,0288	0,0364				
23	Erucic acid (C22:1n9)	0,0093					
24	Cis-11,14,17-eicosatrienoic acid (C20:3n3)	0,0188	0,3670				
25	Arachidonic acid (C20:4n6)	0,0748	0,0880	0,3670			
26	Lignoceric acid		0,1903	0,1567			
27	Capric acid (C10:0)						0,2932
Toplam		100,000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000

4.6. FTIR Analizi

Chlamydomonas sp.'ye ait FT-IR spektrumları yeşil alglerin karakteristik özelliklerini açıkça göstermiştir (Murdock ve Wetzel, 2009; Miglio ve diğ., 2013). Özellikle nişasta ve selüloz (hücre duvarı ve enerji depolama ürünleri) olarak polisakkaritlerin v C-O-C gerilmesinden dolayı 1.200-1.000 cm^{-1} dalga boylarının arasında kalan ortalama 1032 cm^{-1} 'deki nispi yüksek yoğunluktaki üst üste binen bant grubu görülmektedir (Özer ve diğ., 2016). Burada özellikle, %50 N (-) ve %50 N (-) ve %50 P (-) uygulanan koşullarda karbohidrat nisbi bolluklarının daha yüksek olduğu görülmektedir. TAG içeriği ile ilgili olarak, FT-IR spektrumlarında TAG'lerin ester gruplarına karşılık gelen v C=O gerilme emiliminin 1763-1712 cm^{-1} aralığında ($\sim 1,745\text{cm}^{-1}$) bant karakteristiği $\sim 1,737\text{cm}^{-1}$ 'deki piklerde de açıkça görülmektedir. Başka bir doğrulama olarak, *Chlamydomonas* sp. ekstraksiyonundan elde edilen yağ asidi analizinin C18 üzerinde yoğunlaşması gösterilebilir (Tablo 4.1).



Şekil 4.5. *Chlamydomonas* sp. Suşuna Ait FT-IR Spektrum Grafiği (2900 cm⁻¹ pikler (lipit piki) eşitlendi)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

%50 P (-) eksikliğinin hücre büyümesi üzerine optik yoğunluk, klorofil a ve hücre sayıları açısından olumsuz etki gösterdiği açıkça görülmektedir. Bu değerler diğer besin sınırlamalarına göre, hasat sonunda sırasıyla 0,5, 9,85 μgrL^{-1} ve $3,22 \times 10^6$ hücre/mL olarak en düşük değerler olarak kaydedilmiş ve deneme süresi boyunca da en düşük değerlerde seyretmiştir. Bu durumda %50 P (-) kültür ortamının, fotosentezin baskılanmasına yol açtığı ve *Chlamydomonas* sp. suşunun büyümesini olumsuz yönde etkilediği görülmektedir. Buna karşılık, kontrol grubundan sonra, en yüksek toplam lipid %16,8 ($0,092 \text{ gL}^{-1}$) ile %50 P (-) koşulları altındaydı. *Chlamydomonas reinhardtii* ile yürütölen bir çalışmada düşük fosfor uygulamasında, hücre büyümesinin azaldığı, buna karşılık lipid/protein ve karbohidrat/protein depolama ürünlerinin artışı ile hücre hacimlerinde artışlar olduğu gözlenmiştir (Dean ve diğer., 2008).

%100 N (-) ve %100 P (-) ortamında büyüyen hücrelerin ise, optik yoğunluk, klorofil a ve hücre sayıları, hasat sonunda sırasıyla 0,623, 10,21 μgrL^{-1} ve $4,94 \times 10^6$ hücre/mL ve deneme süresince de nispeten yüksek değerlerde seyretmiştir. Ancak, toplam biomass ($0,495 \text{ gL}^{-1}$) ve lipid ($0,069 \text{ gL}^{-1}$) olarak en düşük değerler ölçölmüştür. Ayrıca, bu grubun hücre morfolojisi incelendiğinde de, hücrelerin daha şekilsiz ve küçük oldukları gözlenmiştir. N ve P açlığı *C. vulgaris* ile yürütölen başka bir çalışmada (Wong ve diğer., 2017) ise, tüm kültür koşulları arasında en düşük hücre sayısına yol açmıştır. %100 N (-) ve %100 P (-) ortamında büyüyen *Chlamydomonas* sp. suşuna ait hücrelerin her iki besin yokluğunda ciddi strese girdikleri, sonuçta azalan enerjilerini daha çok bölünmede harcadıkları ve karbon çevrimini karbohidratların lehine kullandıkları düşünölebilir.

Endüstriyel biyodizel üretiminde yüksek seviyede TAG birikimi olan algler tercih edilir (Wong ve diğer., 2017). TAG, araştırılan tüm yetiştirme koşulları altında esas olarak C16: 0 (SFA), C18: 1 (MUFA) ve C18: 3 (PUFA) yağ asitlerinden oluşur. Bir çalışmada, tüm yetiştirme koşulları arasında, bu yağ asitlerinin TAG havuzundaki nispi bolluğu sırasıyla %14-27, %32-53 ve %12-21 arasında değişmiştir (Breuer ve diğer., 2013). Bizim çalışmamızda da, SFA olarak, palmitik asid % 18-23 arasında, MUFA'lardan elaidic acid ve oleik asid %14-21 arasında, cis-11-eicosenoic asid %19-26, PUFA'lardan linoleic asid %17-22 arasında değişmiştir (Tablo 4.1). Bunlardan, palmitik asid %50 N (-) ve %100 N (-) koşullarında (%23,0598 ve %20,8426), elaidic asid %50 N (-) koşulunda (%20,5651),

oleik asid %50 N (-) ve %100 N (-) koşullarında (%21,3427 ve %19,1400) ve linoleic asid %50 N (-) koşulunda (%22,6117) en yüksek değerlere ulaşmışlardır. Yani, en yüksek fatty asidi bileşimleri azot ağlığı koşullarında gözlenmiştir. Yaygın olarak, azot tükendikten sonra TFA'nın yağ asidi bileşiminde büyük bir değişiklik olduğu diğer çalışmalarda da belirtilmiştir (Breuer ve diğerleri, 2012; Griffiths ve diğerleri, 2011).

Çalışmamızda en yüksek lipid içeriği (% verim) %19,7 (0,107 gL⁻¹) ile kontrol grubu ve %16,8 (0,092 gL⁻¹) ile %50 P yoksunluğu koşulları altındaydı ancak bu deney grupları incelenen kültür ortamı koşullarına göre en yüksek kuru biyokütle üretimine sahip değildi. Aynı Şekilde, %50 N (-) ve %50 P (-) grubunda 0,5977 gL⁻¹ kuru biyomasa karşılık %13,8 (0,082 gL⁻¹) oranında toplam lipid miktarı kaydedilmiştir. %100 N (-) grubunda ise, en yüksek kuru biyomas elde edilmesine rağmen %15,8 (0,097 gL⁻¹) lipid içeriği tespit edilmiştir. Yine, ikinci en düşük kuru biyomas (0,5442 gL⁻¹) elde edilen kontrol grubunda, toplam lipid oranı %19,2 ile en yüksek (0,107 gL⁻¹) değere ulaşmıştır. Benzer bir sonuç Wong ve diğ. (2017)'nin *Chlorella vulgaris* ile yaptıkları bir araştırmada görülmektedir. Bu araştırmada da, en yüksek lipid içeriği (% verim) kontrollü ve fosfor yoksunluğu koşulları altında, ancak incelenen kültür ortamı koşullarına göre en yüksek kuru biyokütle üretimine sahip olmadığı sonucuna varılmıştır. Fosfor açlığının daha çok hücre gelişimi olarak hücre yoğunluğu ve klorofil a içeriğinde azalmaya, besinin azaldıkça, özellikle %50 N (-) ve %50 N (-) ve %50 P (-) koşullarında, *Chlamydomonas* sp. hücrelerinin fatty asidi içeriklerinde C18 üzerinde yoğunlaştıkları gözlenmiştir ki, bu durumda karbonhidrat depolamaya yöneldiği söylenebilir. *Chlamydomonas* sp. suşunun nutrient azaltımı karşısında verdiği karbohidrat ve protein depolama koşullarının da araştırılması ile daha ayrıntılı tanımlanabileceğini düşünmekteyiz. Ancak, Şu anki veriler kapsamında, normal koşullarda besin içeriği yüksek olmayan ancak, stres koşullarında verimli olabilecek TAG bileşimleri üretebileceği sonucuna varılmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Agirman, N. and Cetin, A.K., 2017, Effect of nitrogen limitation on growth, total lipid accumulation and protein amount in *Scenedesmus acutus* as biofuel reactor candidate, *Natural Science and Discovery*, 3(3): 33-8. DOI: 10.20863/nsd.322614

Ak, B., 2013, *Azot eksikliğine bağlı stresin, fotobiyoreaktörde kültüre alınan Phaeodacylum tricoratum'un (Bacillariophyceae) lipid miktarına etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Becker, E. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology*, Cambridge Univ Pr.

Belotti, G., Bravi, M., de Caprariis, B., de Filippis, P. and Scarsella, M., 2013, Effect of nitrogen and phosphorus starvations on *Chlorella vulgaris* lipids productivity and quality under different trophic regimens for biodiesel production, *Am J Plant Sci*, 4:44-51

Bhamawat, P.M., 2010, *Growth of Chlamydomonas reinhardtii under nutrient-limited conditions in steady-state bioreactors*, Thesis (Master), Cornell University

Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B. and Wijffels, R.H., 2012, The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains, *Bioresour. Technol.* 124, 217–226.

Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B. and Wijffels, R.H., 2013, Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*, *Bioresour. Technol.* 143, 1–9.

Cheng, D., and He, Q., 2014, Assessment of environmental stresses for enhanced microalgal biofuel production—anoverview, *Front.EnergyRes.* 2: 26.doi:10.3389/fenrg.2014.00026

Çakmak Elibol, Z., 2013, *Mikroalglerde Nötral Lipid İçeriğinin Artırılması Üzerine Bir Araştırma*, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s. 1–168.

Çakmak, Z.E., Olmez, T.T., Çakmak, T., Yusuf M. and Tekinay, T. 2014, Induction of triacylglycerol production in *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparative analysis of different element regimes, *Bioresource Technology*, 155: 379–387.

Dean, A.P., Nicholson, J.M. and Sigeo, D.C., 2008, Impact of phosphorus quota and growth phase on carbon allocation in *Chlamydomonas reinhardtii*: an FTIR microspectroscopy study, *Eur. J. Phycol.*, 43(4): 345–354.

Dean, A., Sigeo, D., Estrada, B., and Pittman, J. K., 2010, Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource technology*, 101: 4499-4507.

Duong, V.T., Li, Y., Nowak, E. and Schenk, P.M., 2012, Microalgae isolation and selection for prospective biodiesel production, *Energies*, 5, 1835–1849. Doi:10.3390/en5061835.

Duygu Yalçın, D., Erkaya Açıkgöz, İ. And Özer, T., 2018, Investigating the effect of different growth media on biomass production of *Pseudopediastrum boryanum* (Turpin) E. Hegewald isolates, *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 4, 6–12.

Goldman, J., McCarthy, J. and Peavey, D., 1979, Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters, *Nature*, 279, 210-215.

Gross, C.H., Ranum, L.P.W. and Lefebvre, P.A., 1988, Extensive restriction fragment length polymorphisms in a new isolate of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics*, 13, 503–508.

Guillard, R.R.L., Sierachiki, M.S., 2005, Counting cells in cultures with the light microscope. Pp. 239-252. In: Andersen, R.A. (eds) *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, London, 589 pp.

Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B. and Mayfield, S., 2010, Biofuels from algae: challenges and potential, *Biofuels* 1, 763–784. doi:10.4155/bfs.10.44

Hipkins, M.F. and Baker, N.R., 1986, *Photosynthesis: Energy Transduction: A Practical Approach*, Oxford University Press, London, 212 pp.

Ho, S.H., Chen, C.Y. and Chang, J.S., 2012, Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalgae

Scenedesmus obliquus CNW-N, *Bioresour.Technol.* 113, 244–252.
doi:10.1016/j.biortech.2011.11.133

Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q. and Queiroz, M.I., 2014, Cyanobacteria and carbon sequestration, in *Cyanobacteria An Economic Perspective*, eds, N. Sharma, A.Rai and L.Stal (Chichester:WileyBlackwell), 65–71.

Ji, C.-F., Yu, X.-J., Chen, Z.-A., Xue,S., Legrand,J. And Zhang, W., 2011, Effects of nutrient deprivation on biochemical compositions and photo- hydrogen production of *Tetraselmis subcordiformis*, *Int.J. Hydrogen Energy*, 36, 5817–5821.doi:10.1016/j.ijhydene.2010.12.138

Karan, Z., Suárez-Alvarez, S., Urreta, I. and Castañón, S., 2015, The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3, *Algal. Res.* 10:134–144

Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q. and Dubois-Calero, N., 2008, Biofuels from microalgae, *Biotechnol.Prog.* 24, 815–820. doi:10.1021/bp070371k

Markou, G. and Nerantzis, E., 2013, Microalgae for high-value compounds and biofuels production: are view with focus on cultivation under stress conditions, *Biotechnol. Adv.* 8,1532–1542.doi:10.1016/j.biotechadv.2013. 07.011

Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S., 2010, Microalgae for biodiesel production and other applications: areview. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14, 217–232.
doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020

Miglio, R., Palmery, S., Salvalaggio, M., Carnelli, L., Capuano, F. And Borrelli, R., 2013, Microalgae triacylglycerols content by FT-IR spectroscopy, *J Appl Phycol*, 25:1621–1631 DOI 10.1007/s10811-013-0007-6

Minhas, A.K., Hodgson, P., Barrow, C.J. and Adholeya, A., 2016, A Review on the assessment of stres conditions for simultaneous production of microalgal lipid and carotenoids, *Frontiers in Microbiology Review*, 7 (546), 1–19.

Mus, F., Dubini, A., Seibert, M., Posewitz, M. and Grossman, A., 2007, Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Journal of Biological Chemistry*, 282 (35), 25475.

Murdock, J.N., Wetzel, D.L., 2009, FT-IR microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae. *Appl Spectrosc Rev*, 44:335–361

Özer, T., Yalçın, D., Açıkgöz Erkaya, I, Udoh, A.U., 2016, Identification and Characterization of Some Species of Cyanobacteria, Chlorophyta and Bacillariophyta Using Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy *Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 11(6): 20–17

Parvin, M., Zannat, M.N. and Habib, M.A.B., 2007, Two important technique for isolation of microalgae, *Asian Fisheries Science*. 20, 117–124.

Priyadarshani, I. and Rath, B, 2012, Commercial and industrial applications of micro algae–A review, *J.Algal Biomass Utiln.* 3, 89–100.

Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A. and Posewitz, M.C., 2010, Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryot.Cell.* 9, 486–501.doi:10.1128/EC.00364-09

Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. and Tredici, M. R., 2009, Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnol.Bioeng.*, 102:100–112.

Santos-Ballardo, D.U., Rossi, S., Hernández, V., Gómez, R.V., Rendón-Unceta, M.C., Caro- Corrales, J. and Valdez-Ortiz, A. 2015, A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture, *Aquaculture*, 448: 87-92.

Scholz, M., Hoshino, T., Johnson, D., Riley, M.R. and Cuello, J. (2011). Flocculation of wall-deficient cells of *Chlamydomonas reinhardtii* mutant cw15 by calcium and methanol, *Biomass and Bioenergy*, 35, 4835–4840. Doi: 10.1016/j.biombioe.2011.08.020.

Sharma, K.K., Schuhmann, H. and Schenk, P.M., 2012, High lipid induction in micro algae for biodiesel production, *Energies*, 5: 1532–1553.

Sivaprakash, G., Mohanrasu, K., Ananthi, V., Jothibasu, M., Dinh Duc Nguyen, Ravindran, B., Soon Woong Chang, Phuong Nguyen-Tri, Ngoc Han Tran, Sudhakar, M., Gurunathan, K., Arokiyaraj, S. and Arun A., 2019, Biodiesel production from *Ulva linza*, *Ulva tubulosa*, *Ulva fasciata*, *Ulva rigida*, *Ulva reticulate* by using Mn_2ZnO_4 heterogenous nanocatalysts, *Fuel*, 255: 115744. DOI 10.1016/j.fuel.2019.115744

Stephens, E., Ross, I.L., Mussgnug, J.H., Wagner, L.D, Borowitzka, M.A., Posten, C., Kruse, O. And Hankamer, B., 2010, Future prospects of microalgal biofuel production systems, *Trends Plant Science*, 15, 554–564.

Wijffels, R.H., Barbosa, M.J. and Eppink, M.H.M., 2010, Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels.Bioprod.Biorefin.*, 4, 287–295.doi:10.1002/bbb.215

Wong, Y.K., Ho, Y.H., Ho, K.C., Leung, H.M. and Yung, K.K.L., 2017, Maximization of cell growth and lipid production of freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by enrichment technique for biodiesel production, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24: 9089–9101. DOI 10.1007/s11356-016-7792-9

Yalçın Duygu, D., Özer, T., 2018, *Chlamydomonas* Suşlarının Farklı Kültür Besi Ortamları ve Doğal Mineralli Su Kullanılarak Biyomas ve Üreme Oranlarının Artırılması, *Fırat Üniv. Fen Bilimleri Dergisi*, 30 (2), 63–71.

Zhao, B., and Su, Y., 2014, Process effect of microalgal-carbondioxide fixation and biomass production: a review. *Renew.Sust.Ener.Rev.* 31, 121–132. doi: 10.1016/j.rser.2013.11.054

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ayça KOŞAR
Doğum Yeri	Keçiören/ANKARA
Doğum Tarihi	16.09.1992
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0555 1520605
E-Posta Adresi	Ayca-talih@hotmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Ahi Evran Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	2016