

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI BESİ ORTAMLARINDA YETİŞEN *CHLORELLA VULGARIS*
BEYERİNCK [*BEİJERİNCK*] 1890 TÜRÜNE AİT PROTEİN VE AMİNO ASİT
KOMPOZİSYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

MERVE KAVASBAŞIOĞLU

KKÜ 2020

Biyoloji Anabilim Dalında Merve KAVASBAŞIOĞLU tarafından hazırlanan
FARKLI BESİ ORTAMLARINDA YETİŞEN *Chlorella vulgaris* Beyerinck
[Beijerinck] 1980 TÜRÜNE AİT PROTEİN VE AMİNO ASİT
KOMPOSİZYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI
adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Aysun ERĐENE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin Yüksek Lisans Tezi olarak bütün gereklilikleri
yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜRÜN

Başkan : (Prof. Dr. Tamer KEĞELİ)
Üye (Danışman) : (Prof. Dr. İlhami TÜRÜN)
Üye : (Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ)

11/09/2020

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek
Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Recep ÇALIN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

FARKLI BESİ ORTAMLARINDA YETİŞEN *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] 1890 TÜRÜNE AİT PROTEİN VE AMİNO ASİT KOMPOSİZYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

KAVASBAŞIOĞLU, Merve

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi

Danışman: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Eylül 2020, 62 Sayfa

Bu çalışmada, üçüncü nesil hammadde kaynağı olarak bilinen mikroalglerden *Chlorella vulgaris* türünün biyokütlesi, amino asit- değerli biyobileşikleri- içeriği ve kompozisyonu açısından endüstriyel kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi amacıyla incelenmiştir. Biyokütle üretimi esnasında atık su kullanılmasıyla üretim maliyetlerinin düşürüleceği öngörülmüştür.

Kırıkkale Kapulukaya barajından izole edilen ve TAP (Tris-Acetate-Phosphate) besiyeri, Nitrat eklemeli TAP medium (N-TAP), Kırıkkale Üniversitesi kampüs gölü (GÖL), Makina ve Kimya Endüstrisi Kurumu (MKEK) atık suyu olmak üzere 4 farklı besi ortamında yetiştirilen mikroalg *Chlorella vulgaris*'in büyüme parametreleri (hücre sayımı, Optik Dansite ve Klorofil-*a*) takip edilmiştir.

Hızlı büyüme evresi boyunca olan besin tuzlarından azotun besi yeri konsantrasyonları tedrici olarak azalmasına rağmen, büyümede kullanılan diğer temel element olan fosforun azalmayıp yatay şekilde değerler gösterdiği saptanmıştır. Alglerin kimyasal strateji olarak ortamda baskın bulunduğu düşünülen $H_2PO_4^-$ formunun kullanılmasına öncelik verdiği, bu formun tükenmesini takiben HPO_4^{2-} formunu (besi yerlerine göre MKEK ve GÖL için 8. gün, TAP ve N-TAP için 12. gün) kullanmaya başladıkları tahmin edilmektedir. Durağan evrede, MKEK ve GÖL besi yerine ait alg biyokütle

değerleri TAP ve N-TAP besi yerine göre belirgin derecede yüksek olarak tespit edilmiştir. Onbeşinci günden itibaren ölüm fazına geçen ve hasatı gerçekleştirilen alglerin protein miktarları sırasıyla; N-TAP (2,17 mg/BSA), TAP (1,96 mg/BSA), MKEK atık suyu (0,87 mg/BSA) ve GÖL besi ortamı (0,69 mg/BSA) olarak saptanmıştır. Bu durum, mikroalglerin hücre kültürü süresince en iyi hayatta kalma yöntemlerini seçerken, makroelementler arasındaki dönüşümlere başvurduğu ve hasat sonunda nihai bir sonuç olarak ortaya çıktığı şeklinde değerlendirilmiştir. İyon kromatografi kullanılarak yapılan besi ortamı anyon ölçümleri değerlendirildiğinde, MKEK ve GÖL SUYU besi ortamında yetişen *Chlorella vulgaris* türünde fosfat sınırlamasının diğer TAP ve N-TAP ortamlarına göre daha erken oluştuğu sonucuna varılmıştır. Makromoleküller arasındaki değişimlerin besi yeri ortamına göre ortaya çıkan farklılıkları göz önüne alındığında (FT-IR analizi), besin tuzu (N veya P veya her ikisi aynı anda) açlığına dayalı stres koşullarının büyümeyi yavaşlattığı buna karşın metabolik karbon ihtiyacının karbohidratlardan sağlandığı anlaşılmıştır.

Amino asit ölçümleri HPLC cihazında C18 ODS-4 kolonu kullanılarak, 0,6ml/dk akış hızında ve mobil faz A, 0.1 mol Na/Asetonitril (97:3, v/v; pH 6.5) ve mobil faz B, asetonitril-su (4:1, v/v) olarak yapılmıştır. Gradient metod; 0-13 dakika, % 100-93 A; 13-23 dk, % 93-77 A; 23-29 dak, 77-65% A; 29-35 dk, % 65-60 A; 35-40 dak; % 60-0 A; 40-45 dakika, % 100 B olarak ayarlanmıştır. Amino asit ölçüm sonuçlarında tüm besi ortamlarında Arjinin amino asidi en yüksek olarak bulunmuştur. Amino asit ölçüm sonuçlarında tüm besi ortamlarında Arjinin amino asidi en yüksek olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan atık su ve doğal su ortamları, N-TAP ve TAP besi yeri kontrol ortamlarıyla rekabet eder seviyede bulunmamıştır. Bunun sebebi, yeterli azot konsantrasyonlarına karşın fosforun sınırlayıcı rolünün daha belirgin olmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Mikroalg, *Chlorella vulgaris*, Amino asit, Protein, HPLC analizi

ABSTRACT

COMPARISON OF TOTAL PROTEIN AND AMINO ACID COMPOSITIONS OF MICROALGAE *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] 1890 GROWN IN DIFFERENT GROWTH MEDIA

KAVASBAŞIOĞLU, Merve

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

September 2020, 62 pp

In this study, microalgae *Chlorella vulgaris* biomass, considered to be a member of third generation feedstock, was utilized to explore the amino acid potential for a probable industrial application of value added bio-compounds. It was assumed that the use of waste water integrated to the study would alleviate the cost of biomass production.

The microalgae species, *Chlorella vulgaris*, isolated from Kapulukaya Reservoir (Kırıkkale), were subjected to four different growth media, being (i) Tris-Acetate-Phosphate (TAP), (ii) Tris-Acetate-Phosphate enriched with N (N-TAP), (iii) Kırıkkale University Campus Lake Water (LW) and (iv) Waste Water from Mechanical and Chemical Industry Company (MKEK) in order to compare its growth by monitoring the parameters, cell count (CC), Optical density (OD) and Chlorophyll-a (Chl-*a*).

During the log phase, gradual decreases detected at nitrogen concentrations in all media except for N riched medium (N-TAP) were not pronounced at phosphorus concentrations. This was speculated that $H_2PO_4^-$, being one of the two species of phosphorus applied for growth, was used preferably until exhaustion, and then the other species HPO_4^{2-} was resorted to utilize on day 8 for MKEK and LW, and day 12 for TAP and N-TAP medium. During the stationary phase, microalg biomasses of MKEK and LW were found to be notably higher than those of TAP and N-TAP growth medium. Following the end of the experiments, amounts of total protein measured on the harvested biomass were found to be 2,17 mg/BSA (N-TAP), 1,96 mg/BSA (TAP),

0,87 mg/BSA (MKEK) and 0,69 mg/BSA (LW), respectively. Results from anion measurements in the media suggested the idea that phosphate (P) limitations occurred during growth but being onseted earlier in the MKEK and LW medium than that in the TAP and TAP-N medium.

When the differences on the respective amounts of macromolecules occurring as a results of different media and the algal growth on them were analysed, stress conditions due to either P or N starvation or both caused declines at growth but evoked the use of carbohydrates as a carbon source for metabolic demand. The greater biomasses found in MKEK and LW media corresponded with similarly lower lipid values according to Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR analysis).

Amino acids were identified and their content measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with C18 ODS-4 colon at 0,6ml/min flow rate and in a mobile phase A of 0.1 mol NaAcasetonitril (97: 3, v/v; pH 6.5) followed by mobile phase B asetonitril-water (4: 1, v/v) was used fort he elusion of amino acids. A gradient method was applied as 0-13 min. 100-93% A; 13–23 min. 93-77 % A; 23-29 min. 77-65% A; 29–35 min. 65-60 % A; 35-40 min. 60-0 % A; 40-45 min. 100 % B. The amount of arginine was profoundly higher amongst amino acids. Both essential and non-essential amino acids were five-fold higher in N-TAP and TAP media compared to waste water (MKEK) and LW. This suggested a general conclusion that the used natural waters (MKEK and LW) were not compatible enough with the controlled media (TAP and TAP-N media) due mainly to that in natural waters phosphorus limited the growth despite efficient N levels.

Key words: Microalgae, *Chlorella vulgaris*, Amino acid, Protein, HPLC analysis

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımını esirgemeyen ve bilimsel deney imkanlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine veren, danışman hocam, Sayın Prof. Dr. İlhami TÜZÜN'e teşekkür ederim. Hem laboratuvar çalışmaları hem de tez yazım aşamasında ki büyük katkılarından dolayı Dr. Yaşar ALUÇ'a, destek ve katkılarından dolayı Dr. Gökben BAŞARAN KANKILIÇ'a ve FT-IR çalışmasındaki yardımları için Uzman Kimyager Ogün BOZKAYA'ya teşekkür ederim.

Tez yazım aşamam da, bilimsel deneylerimin yapım aşamasında ve hayatımın her anında her konuda bana her türlü desteği veren ve varlıklarını hep arkamda hissettiğim kız kardeşim Tuğba KAVASBAŞIOĞLU, annem Mualla KAVASBAŞIOĞLU ve babam Mehmet KAVASBAŞIOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Bana hep destek olan arkadaşlarım Seda KİBAROĞLU, Fatmanur ÖZEN ve Esmâ BÖLÜK'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikroalgler ve Gıda.....	8
1.2. Proteinler	9
1.3. Alternatif Protein Kaynakları	13
1.3.1. Karasal Yaprak Proteinleri	13
1.3.2. Bakteriyel Proteinler	14
1.4. Alglar	14
1.4.1. Mikroalgler	15
1.4.2. Makroalgler	16
1.5. Alg Yetiştirme Ortamları	17
1.6. Alglerin Amino Asit Kompozisyonu	19
1.7. <i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck Taksonomisi	20
2. MATERYAL-METOD	22
2.1. Mikroalg Kültür Ortamları	22
2.2. Deneysel Prosedürler	24
2.2.1. Klorofil- <i>a</i> Ölçümü	24
2.2.2. Optik Yoğunluk (OD) Ölçümü.....	25

2.2.3.	Hücre Sayım İşlemi	25
2.2.4.	Toplam Protein Alg Ekstraksiyonu	26
2.2.5.	Amino Asit Tayini Alg Ekstraksiyonu	26
2.2.6.	Besiyerinde Nitrat Ölçüm.....	27
2.2.7.	Alglerde Toplam Protein Miktarı Tayini	28
2.2.8.	Amino Asitlerin Teşhis ve Miktarlarının Belirlenmesi (HPLC Analizi).....	29
2.2.9.	Organik Makromoleküllerin Teşhisi Değişimlerinin Belirlenmesi (FT-IR Analizi)	29
3.	BULGULAR.....	30
3.1.	Büyüme: OD, Chl- <i>a</i> ve Hücre Sayımı	30
3.2.	Besiyerinde Tespit Edilen Anyon (NO_3^{1-} ve HPO_4^{2-}) Miktarları (IC Analizi).....	32
3.3.	Toplam Protein Miktarı.....	34
3.4.	<i>Chlorella vulgaris</i> Son Ürününde Makromoleküllerin Belirlenmesi (FT-IR Analizi).....	35
3.5.	<i>Chlorella vulgaris</i> 'te Bulunan Amino Asitlerin Teşhisi (HPLC Analizi) ...	36
4.	TARTIŞMA.....	39
	KAYNAKLAR.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

1.1. Bitkisel yağlardan ürüne bağlı biyo-yakıt verimliliği ve gerekli arazi karşılaştırması.....	4
1.2. Farklı bitki kaynaklarının fotosentez orijinli CO ₂ uzaklaştırma oranları.....	6
1.3. Farklı alglerin genel bileşimi (% kuru ağırlık).....	20
2.1. Alg yetiştirme besi ortamı içerikleri.....	23
2.2. Atık su besi ortamları ağır metal ölçümleri.....	24
2.3. İyon kromatografisi cihazı analitik koşulları.....	29
3.1. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in farklı besi ortamlarındaki makromolekül değişimleri sayısal değerleri.....	36
3.2. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in farklı besi ortamındaki amino asit yüzdeleri.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Avrupa Komisyonu Biyoekonomi Stratejisi.....	2
1.2. Biyokütlenin biyoyakıtlara dönüştürülmesi ve teknolojik yolları	5
1.3. Mikroalg biyokütle üretiminde bütünleşik yaklaşım.....	7
1.4. Polar ve nonpolar amino asitler ve formülleri.....	10
2.1: Tez aşamasında aşılama yapılan besiyerleri ve deneysel uygulamalar. Belirtilen tüm ölçümler inkübasyonun 1, 3, 6, 8, 10, 12, 14, ve 15. günlerinde örneklenen mikroalgler kullanılarak yapılmıştır. Tüm deneysel ölçümler üç biyolojik tekrar grubu kullanılarak alınmıştır.....	25
2.2: OD ölçümünde kullanılan cihaz.....	26
2.3: Sayım işlemi hazırlık aşaması.....	27
2.4: Amino asit tayini alg ekstraksiyonu aşaması.....	28
3.1: <i>Chlorella vulgaris</i> gün aşırı OD değerleri ortalamaları.....	31
3.2: <i>Chlorella vulgaris</i> gün aşırı sayım sonuçları ortalamaları.....	31
3.3: <i>Chlorella vulgaris</i> klorofil-a ortalamaları.....	32
3.4: İyon kromatografisi cihazından elde edilen fosfat takibi sonuçları.....	33
3.5: İyon kromatografisi cihazından elde edilen nitrat takibi sonuçları.....	34
3.6: Farklı besi ortamlarında <i>Chlorella vulgaris</i> 'teki toplam protein miktarı.....	35
3.7 <i>Chlorella vulgaris</i> 'in farklı besi ortamlarındaki makromolekül değişimleri.....	36
3.8: Farklı besi ortamlarında <i>Chlorella vulgaris</i> 'te bulunan amino asit miktarı.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Å	Angstrom
α	Alfa
mg	Miligram
g	Gram
dw	Kuru ağırlık
m	Metre
mm	Milimetre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
mM	Milimolar
M	Mol
rpm	Dakikadaki dönüş hız birimi
dk	Dakika
L	Litre
ha	Hektar
yr	Yıl
°C	Santigrad derece
v/v	Hacimce yüzde
N	Azot
K	Potasyum
Na	Sodyum
Mg	Magnezyum
Ca	Kalsiyum
P	Fosfor
S	Kükürt
Fe	Demir
Ag	Gümüş
Sr	Stronsiyum
Pb	Kurşun

ppm	Milyonda bir birim(Parts per million)
ppb	Milyarda bir birim(Parts per billion)
Ala	Alanin
Arg	Arjinin
Asn-Asp	Aspartik asit
BSA	Sığır serum albümin
Cys	Sistein
DOE	Design of Experiment- Deney tasarımı
EAA	Ekosistem Yaklaşımları Su Ürünleri Yetiştiriciliği
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
Gln	Glutamin
GÖL SUYU	Kırıkkale Üniversitesi kampüs göl suyu
Glu	Glutamik asit
Gly	Glisin
His	Histidin
Ile	İzolösin
Lag	Gecikme fazı
Leu	Lösin
Log	Logaritmik artış fazı
Lys	Lizin
Met	Metiyonin
MKEK	Kırıkkale Makine Kimya Fabrikası atık suyu
N-TAP	Nitrat eklemeli Tris Asetat Fosfat çözeltisi
Phe	Fenil alanin
Phe	Fenil alanin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Ser	Serin
TAP	Tris Asetat Fosfat çözeltisi
Thr	Treonin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
Val	Valin

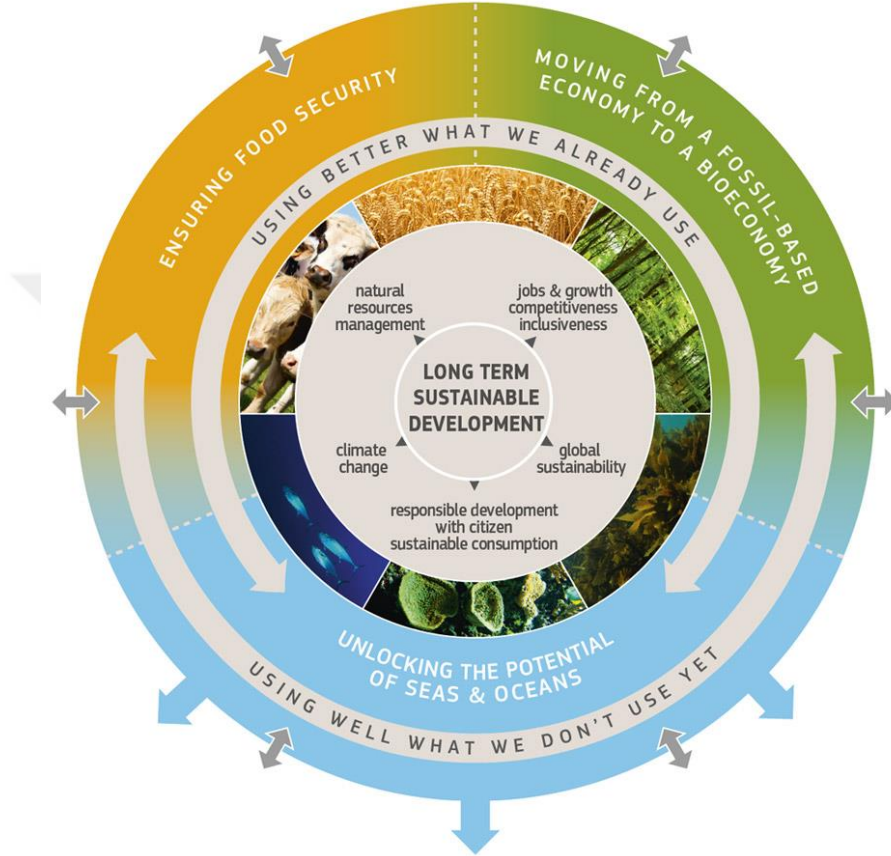
1. GİRİŞ

Genel Yaklaşım ve Kavramlar:

Özellikle son çeyrek yüzyılda gerek bilimsel çalışmaların gerekse bunların uygulamaya aktarılması konusunda ortaya çıkan olumlu sonuçları neticesinde; mikrolagler önemli biyokütle hammaddesi olarak kabul edilmiş durumdadır. Mikrolagleri önemli bir sanayi ürünü haline getiren gelişmeler genel bir yaklaşımın parçasıdır. Bu genel yaklaşım, dünyada halihazırda hakim olan ve petrol ve ürünlerine (kimyasal) dayalı bir yaşam şeklinin organik-kökenli (biobased) bir yaşam şekline dönüştürme gayret ve çabalarını ifade etmektedir. Kimyasal kökenli ürünler, insan yaşamında olumsuz sonuçlar ortaya çıkartmakla kalmayıp, yeryüzü kaynaklarının sürdürülebilir kullanımına da izin vermemektedir. Bu nedendir ki, alternatif kaynakların acil bir şekilde insan yaşamında yerini alabilmesi için küresel çabaların artan bir şekilde gündemde kaldığı, gelecek plan ve stratejilerine yön verdiği bilinen bir gerçektir. Avrupa Birliği'nin 13 Şubat 2012 tarihinde yürürlüğe koyduğu "Biyoeкономи Stratejisi" (Şekil 1.1.) buna örnek olarak verilebilir (Anonymous^a, 2012). 2018 yılında güncel hale getirilen bu strateji, sürdürülebilir ve döngüsel (Sustainable and Circular: Bioeconomy the European Way) kavramlarını esas alarak, fosil kaynakların dışındaki hayvan, bitki, mikroorganizmalar ve bunlardan üretilen biyokütle ve hatta organik atıklar gibi biyolojik kaynaklara dayalı sektörler, sistemler ve onların işleyiş ve prensiplerini hayata geçirmeyi esas almaktadır. Daha açık bir deyişle, enerjiden, tıp, eczacılık, tarım hayvancılık, gıda ve kozmetik gibi tüm alanlarda organik kökenli ürünlerin eldesi ve döngüye katılabilmesini neticesinde, küresel iklim değişikliğinin durdurulması, kirlilik problemleri ve sağlık sorunlarının giderilerek sürdürülebilir bir yaşamın tesis edilmesini amaçlar. Bu amaçlar, bir bakıma fosil kaynaklar öncesine teknolojik bir yaklaşımla dönüşü ifade etmektedir (Anonymous^b, 2018).

Sürdürülebilirlik ve döngüsellik kavramlarının hayata geçirilmesine yardımcı olacak farklı alanlar ve kullanılan farklı ajanlar (Örneğin: güneş enerjisi vb. gibi) bulunmakla birlikte, biyokütle üretimine dayalı araştırma ve uygulamalar özel bir önem taşımaktadır. Çünkü fosil hammaddesinden enerji temini dışında, elde edilen binlerce sayıda kimyasal ürünün organik olanlarıyla değiştirilmesi biyokütle (yeşil) kimya veya

teknolojisiyle mümkün olabilecektir (Anonymous^c, 2017). Avrupa Biyoekonomi Stratejisi raporunda, Avrupa'nın biyo-ekonomik faaliyet ve üretiminin yıllık 674 milyar Euro olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, biyo-temelli biyo-kütle yaklaşımının sadece Avrupa'da değil diğer kıtalarda da eşdeğer veya daha fazla yoğunlukta benimsendiği not edilmelidir. Aslında, bu yaklaşımın öncüsü ve tarihi temeli güçlü uygulamaları olan kıtanın Uzak Doğu-Asya olduğu belirtilmelidir.



Şekil 1.1. Avrupa Komisyonu Biyoekonomi Stratejisi (Anonymous^a, 2012)

Biyokütle yaklaşımı ve stratejilerinin dünya ülkeleri tarafından benimsenmesi ve sistematik-kurumsal hale getirilmesinde, biyokütlenin özellikle enerji üretiminde fosil yakıtlara alternatif olup olamayacağına ilişkin girişimler tetikleyici olmuştur. Tarihsel sürecin en başında, birinci nesil biyokütle hammaddesi olarak şeker kamışı, şeker pancarı, mısır, soya ve kanola gibi tarım ürünleri kullanılmıştır. Yağlı tohumlar, tahıllar ve şekerli ürünler gibi temel kategoriler altındaki farklı ürünler, enerji (biyoyakıtlar) eldesinde kullanılmış ancak dezavantajları nedeniyle gelişimi sınırlı kalmıştır (Şekil 1.2.), (Pena ve Sheenan, 2007). Bu dezavantajlardan en önemlisi,

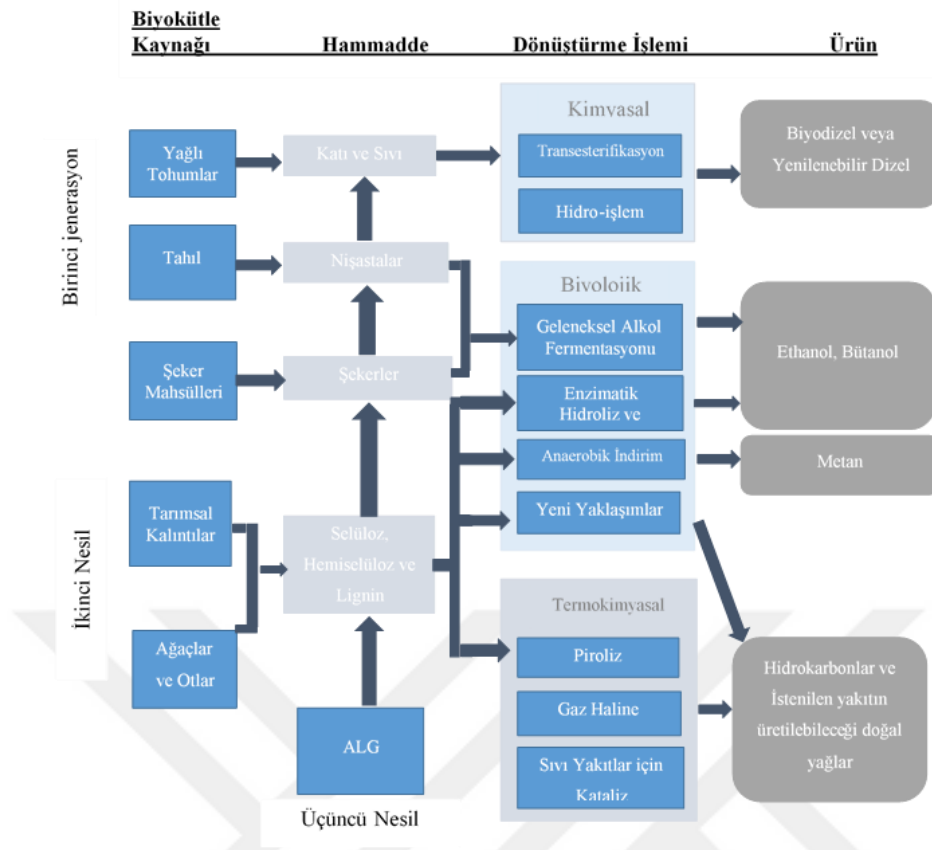
enerji eldesi amaçlı üretim için (karşılanamaz büyüklükte) geniş topraklara ihtiyaç duyulması, tarımsal ürünün gıda sektörüyle rekabete girmesi ve ayrıca tarım arazilerini de yok etme tehdidini ortaya çıkarmasıdır (Çizelge 1.1) (Doshi vd., 2016). İkinci nesil biyokütle ajanları evsel, tarımsal atıklar ve orman (lignosellüloz) artıkları olarak kullanılmaya başlanılmış ancak, biyoyakıt prosesleri esnasında ortaya çıkan teknolojik problemler halen uygulamada çözülmeye devam etmektedir. Her iki nesil hammadde için geçerli olan dezavantaj ise, kullanılan hammaddelerin gıda sektörüyle olan bağlantısı nedeniyle gittikçe artan fiyatlarıdır ve dolayısıyla elde edilen biyoyakıtın ekonomik özelliği gittikçe azalmaktadır. Üçüncü nesil biyoyakıt ise hammadde olarak mikroalglerin kullanılmasını öngörür. Yapılan araştırma ve saha uygulamaları neticesinde, mikroalglerin önceki iki nesil hammaddeye göre oldukça önemli üstünlüklerinin olduğu ortaya çıkmıştır. Şekil 1.2.'de gösterildiği gibi, alglerin birim zamanda birim alanda biyoyakıt miktarı, 1. nesil ürünlere göre 10 kat fazladır (Tsai vd., 2017).

Yeşil algler tatlı su, deniz, kara ve hava habitatlarında yaşayabilmektedirler ancak diğer organizmalarla simbiyotik ilişki ile özel ekolojik nişlerde de yaşayabilirler. Liken oluşturan mantarların ve hem tatlı su hem de deniz habitatlarında yaşayan omurgasızların ortaklarıdır. Çoğu simbiyotik yeşil alg, *Chlorophyceae*'ye aittir ve yalnızca birkaç prasinophyceae ve euglenophyceae taksonları vardır. *Chlorophyceae* arasında simbiyotik formların çoğu kokoiddir ve tatlı su habitatlarından konakçılarda yaşarlar. Deniz ortamında *Chlorophyceae* dışındaki algler, çoğunlukla "zooxanthellae" olarak adlandırılan simbiyotik partnerler olarak baskındır. *Foraminifera* haricinde sadece birkaç denizel birliğinde endosimbiyotik olarak yaşayan yeşil algler vardır. Özgür yaşamın yani aposimbiyotik, yeşil alglerin aksine, simbiyotik formların mevcut taksonomik tanımı temeldir ve çoğu zaman çelişkilidir. Genellikle simbiyotik sistemlerin konakçıları iyi bilinir oysa yeşil algal partner basitçe "zoochlorella" olarak tanımlanır. Bu terim, taksonomik değeri olmadığı için mevcut kafa karışıklığı durumunun karakteristiğidir. Alglerin sınıflandırılmasına büyük ölçüde fizyolojik özelliklerin ek kullanımıyla yardımcı olunur. Ancak fizyolojik çalışmalar, tanımlanmış ortamlarda aksenik kitle kültürlerini gerektirir. Bu önkoşullar, endosimbiyotik olarak yaşayan *Chlorophyceae*'nin en yaygın üyelerinden bazıları için artık karşılanmıştır (Reisser, 1984).

Alg üretimi için gerekli üretim alanı karşılanmayacak şekilde düşüktür. Diğer önemli bir konu ise, alglerin üretimi esnasında kullanılan ve dolaylı olarak küresel ısınmayı engelleyici etki yapacak olan CO₂ kullanımını birim biyokütle başına diğer ürünlerle karşılaştırıldığında alglerde neredeyse 100 katından daha fazladır (Çizelge 1.2.) (Tsai vd., 2017). Böylelikle, alglerin fosil yakıtların yerini almasıyla, bir taraftan fosil yakıtlardan atmosfere olan küresel gaz CO₂'nin salınımı azaltılırken, alg biyokütlesi üretimi esnasında fotosentez ile CO₂ atmosferde artışı söz konusu olabilecektir.

Çizelge 1.1. Bitkisel yağlardan ürüne bağlı biyo-yakıt verimliliği ve gerekli arazi karşılaştırması (Doshi vd., 2016)

Bitki kaynağı	Bio-dizel L/ha/yr	Biyoyakıt üretimi için alan ihtiyacı (10 ⁶ ha)
Pamuk	325	15,002
Soya fasülyesi	446	10,932
Hardal	572	8524
Tohum	952	5121
Ayçekirdeği	1190	4097
Koza tohumu	1892	2577
Hint fıstığı	5950	5819
Palmiye yağı	12,000	406
Alg (50 gm ⁻² gün ⁻¹ %50 TAG)	98,500	49



Şekil 1.2. Biyokütlenin biyoyakıtlara dönüştürülmesi ve teknolojik yolları (Tsai vd., 2017).

Çizelge 1.2. Farklı bitki kaynaklarının fotosentez orijinli CO₂ uzaklaştırma oranları (Tsai vd., 2017)

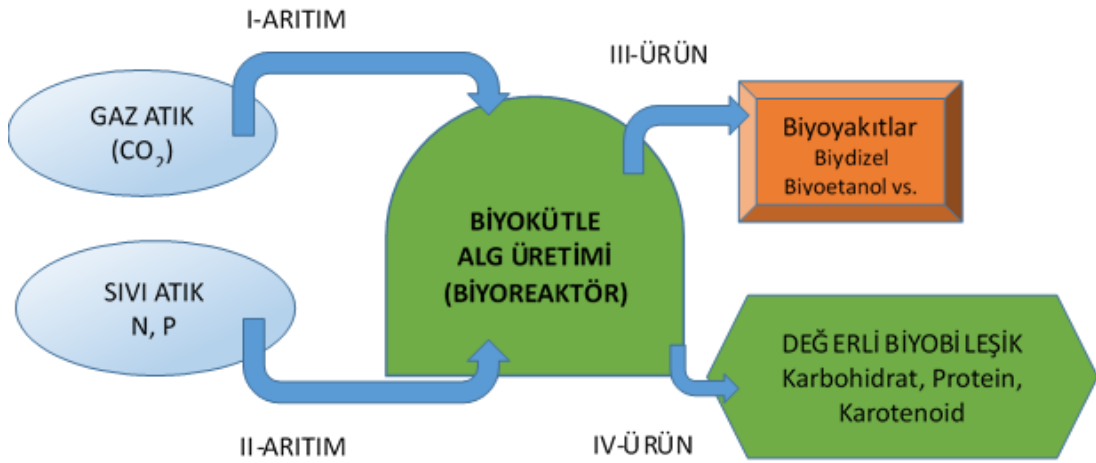
Sınıflandırma		Alım oranı (mg ⁻² gün ⁻¹)	Karasal bitki/yosun alım oranı
Mikroorganizma	Alg	23859	100%
Odunsu olmayan	Otlaklar	0	0%
	Pirinç	0	0%
Odunsu	Hindistan cevizi	4802	20,1%
	Çalılar	4310	18,1%
	Filipinlerdeki doğal ormanlar	924	3,9%
	Filipinlerdeki <i>Swietenia macrophylla</i>	3295	13,8%
	Filipinlerdeki <i>Acacia mangium</i>	18856	79,0%
	Filipinlerdeki <i>Gmelina arborea</i>	8247	34,6%
	Danimarka'da meşe (31 yıl)	2371	9,9%
	Danimarka'da Norveç ladin (32 yıl)	4480	18,85%
	Danimarka'da Norveç ladin (41 yıl)	4862	20,4%
	Hollanda meşe ve Norveç ladin (29 yıl)	7173	30,1%
	İsveç'te Norveç ladin (92 yıl)	2371	9,9%
	İtalya'da Norveç ladin (62 yıl)	3195	13,4%
	İtalya ve Almanya'da Norveç ladin (93-112 yıl)	2763	11,6%
	Amerika Rode adasında beyaz çam (115 yıl)	2110	8,8%
	Amerika Hampshire'de karışık yaprak dökken/iğne yapraklı (65 yıl)	1959	8,2%
	Amerika'da güney Carolina'da loblolly çamı (35 yıl)	5264	22,1%

Alg biyokütlesinin hammadde olarak kullanıldığında öne çıkan bu üstünlüklerinin yanı sıra ve belki de daha önemlisi, alg hücrelerinin biyolojik değerli bileşikler adı verilen ve kabaca lipit, karbohidrat, proteinler ve karotenoit gibi makromolekül sınıflarına ait çok çeşitli bileşiklerin kullanımına elverişli olmasındandır. Tıp ve eczacılıktan (antioksidan maddeler, ilaç ve ilaç bileşenleri), gıdaya (doğrudan gıda ve gıda bileşenleri), tarım (biyogübre), hayvancılıktan (yem ve yem katkı maddeleri) eczacılığa kadar geniş bir yelpazedeki sayısız biyobileşik; kimyevi muadillerinin aksine, döngüsel ve tekrar kullanılabilir, atık oluşturmeyen ve böylelikle sürdürülebilir bir ekonomi ve yaşam biçimine geçişin temelini oluşturmaktadır.

Mikroalglerin endüstriyel-biyoteknolojik kullanım potansiyellerine ilişkin bu genel çerçeveye, bir çok çevre probleminin çözümü ya da iyileştirmesini sağlayan

uygulamaları da entegre etmek mümkün olmaktadır. Daha açık bir deyişle, fosfor ve azot yüklü evsel ve bazı endüstriyel atıkların sucul sistemlere verilmesiyle oluşan ötrofikasyon problemleri, atıklardaki bu elementlerin alg üretiminin dayandığı temel biyolojik proses olan fotosentez esnasında kullanılması suretiyle engellenmekte ya da arıtıma ihtiyacın kalmaması nedeniyle arıtım maliyetleri azaltılmaktadır. Aynı durum, fotosentez esnasında ihtiyaç duyulan CO₂'in, sanayi ve evsel baca gazı atıklarından karşılanarak, sera gazlarının azaltılması ve CO₂ arıtım maliyetlerinin düşürülmesi için de söz konusu olup, diğer bir entegre (bütünleşik) yaklaşımı temsil etmektedir. Şekil 1.3 bu bütünleşik yaklaşımı şematik olarak göstermektedir.

Bu çalışmada, yukarıda anlatılan genel çerçeveye uygun olarak, Kırıkkale ili çevresinde bulunan sucul ekosistemlerden (Kızılırmak, Kapulukaya Barajı) elde edilen ve genetik olarak tanımlaması yapılan mikroalg, *Chlorella vulgaris*'in biyokütle olarak kullanılması hedeflenmiştir. Çalışmada, biyokütle üretimi için atık sudan faydalanılmış olması ise, yukarıda anlatılan entegre yaklaşımı temsil etmektedir. Üretilen alg biyokütlesinin insan ve hayvan gıda-katkı ürünü olarak kullanılabilme potansiyeline ilişkin ihtimallerin değerlendirilmesi, bu çalışmanın nihai amacını oluşturmuştur.



Şekil 1.3. Mikroalg biyokütle üretiminde bütünleşik yaklaşım

1.1. Mikroalgler ve Gıda

Küresel nüfusun 2050 yılına kadar üçte bir oranında artması beklenmektedir. Bu hızlı nüfus yükselişi gıda üretimine olan ihtiyacın %70 artacağı anlamına gelmektedir. Bu yüksek artış ile birlikte gıda üretiminde yetersiz kaynak ve hammadde gibi bir takım sorunların oluşmasına neden olabileceği öngörülmüştür. Alternatif kaynaklara olan ihtiyacın, özellikle protein ihtiyacının kısa sürede tedarik edilmesi beklenen ana besinlerden olduğu bilinmektedir (Becker, 2007).

Tarımsal ürünlerden elde edilmekte olan proteinin, gelecekte, ekilebilir arazi daralması, sentetik gübrelerin neticesinde tatlı su ve denizel kirlilik (ötrofikasyon) vb. nedenlerden dolayı ihtiyacı karşılayamayacağı tahmin edilmektedir. Günümüzde, alg biyokütlesi, hayvan yemi ve biyoyakıt üretimi için potansiyel bir kaynak haline gelmiş ve mikroalgler en önemli alternatif protein kaynaklarından biri olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (Saito vd., 2008; Angell ve Raymond, 2016). Bazı deniz yosunu ve mikroalg türlerinin geleneksel protein kaynakları olan et, süt, yumurta, balık gibi gıdalarla benzer protein seviyeleri içermektedir (Angell ve Raymond, 2016). Su yosunlarının (algler), ek gıda üretimi veya diğer endüstriyel gıda, hayvan yemi ve katkı maddeleri üretimi için kullanılabilir 3. nesil hammadde kaynağı olarak kullanılması politikaları da gündeme alınmıştır (Otten vd., 2006). Deniz alglerinin protein içeriği türlere göre değişebildiği ve kuru ağırlığın %9-26'sı proteinden oluştuğu tespit edilmiştir (Bleakly ve Hayes, 2017). Mikroalglerin ise, kuru ağırlığının %6-71'i proteinden oluştuğu gösterilmiştir (Richmond, 2004; Becker, 1994). Ayrıca; vitamin, mineral açısından da zengin olduğu bilinen bazı alg türlerinin bu özellikleri sayesinde insan sağlığı için önemli faydalarının olduğu bildirilmiştir (Bleakly ve Hayes, 2017). Mikroalglerin sağlıkla ilişkili katkıları çok sayıda araştırmaya konu edilmiş durumdadır (Md. Asraful vd., 2020; Clemens ve Steven, 2016).

Biyokütlenin üretim maliyetini azaltmak için, mikroalg üretiminde atık su arıtma ve/veya atık su kullanılması, sıklıkla başvurulan yöntemlerden birisi olmuştur. Alglerin atık su arıtımında kullanılmalarında başarılı sonuçlar sağladığı, yapılan pek çok çalışmayla kanıtlanmıştır. (Richmond, 2004; Becker, 1994). Organik maddece zengin sulara algler, fotosentez yaparak serbest oksijen üretir ve bu şekilde organik maddenin aerobik bakteriyel oksidasyonunu desteklerken aynı zamanda oksidasyonla

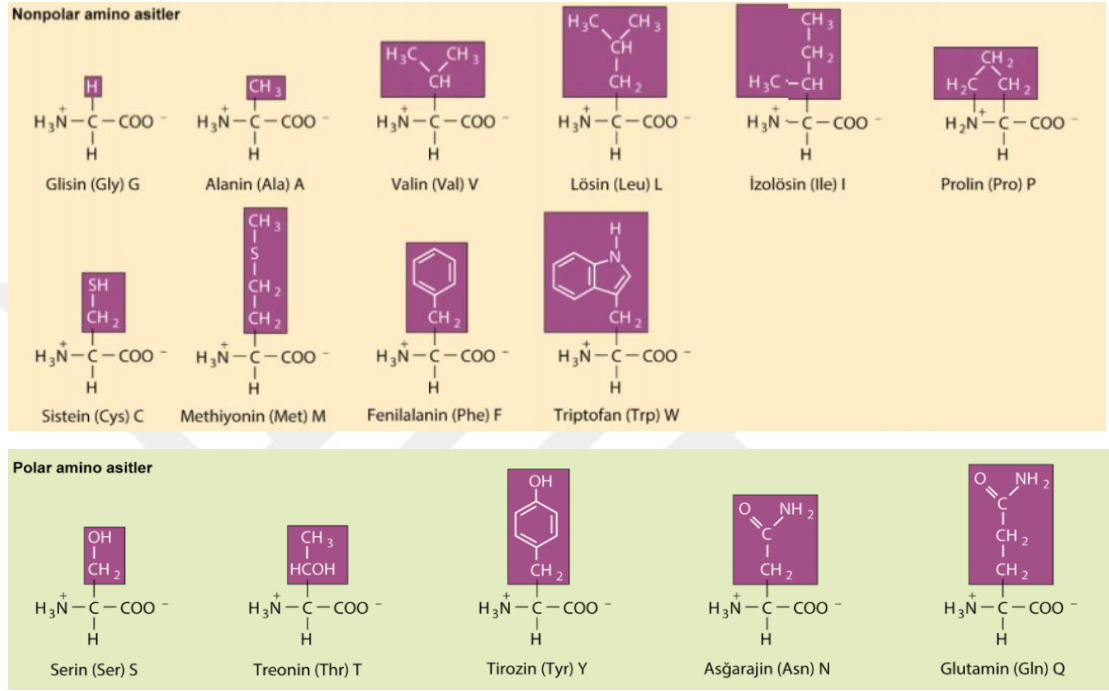
açığa çıkan karbondioksit ve nutrientler, algler tarafından yeni biyomas üretiminde kullanılmaktadır (Monfet vd., 2017; Lu vd., 2016).

1.2. Proteinler

Proteinler, vücudun ana bileşenlerindedir. Enzimler, hücre zarları, taşıyıcılar ve hormonlarda işlev görürler. Proteinin monomerleri olan amino asitler, nükleik asitler, hormonlar, vitaminler ve diğer önemli moleküllerde ayrıca fonksiyonel görevler üstlenirler. Bu nedenle, hücresel bütünlüğü ve işlevi korumak, sağlık ve üreme için yeterli proteini almak gereklidir. Vücudun protein yapması mümkün olmadığı için dışarıdan hazır alınmaları gerekir (Otten vd., 2006).

Proteinler insan ve hayvan beslenmesinin temelini sağlar. Protein çoğunluğunu tarım ve hayvansal üretimden sağlanır. Tarım için toprakların yaklaşık % 30'u, mevcut tatlı suyun % 70'i ve enerjinin %20'si kullanılır. Nüfus artışı, gittikçe azalan ekilebilir alan ve azalan tatlı su kaynakları göz önüne alındığında alternatif protein kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Algler, alan ve kaynaklar için geleneksel gıda ürünleri ile rekabet etmemektedir. Enzimatik hidroliz, fiziksel işlemler ve kimyasal ekstraksiyon da dahil olmak üzere algere uygulanan protein ekstraksiyon yöntemleri ve ultrason destekli ekstraksiyon, darbeli elektrik alanı ve mikrodalga destekli ekstraksiyon gibi yeni metotlar tartışılmaktadır. Ayrıca, süt endüstrisinde kullanılan mevcut protein zenginleştirme yöntemleri ve bu yöntemlerin, biyoaktif peptitler ve fonksiyonel bileşenler gibi alglerden yüksek değerli içerikler oluşturma potansiyeli tartışılmaktadır. Alglerin insan beslenmesinde, hayvan yemi ve su ürünlerindeki uygulamaları da incelenmektedir (Angell ve Raymond, 2016). Protein, insan vücudundaki her hücrenin yapısal bileşenidir. Tüm enzimler, hücre içi matrisler, saç, tırnaklar, serum albümin, keratin, kolajen, birçok hormon ve hücre zarlarının büyük bir kısmı proteindir. Amino asitler ise birçok koenzim, hormonlar, nükleik asitler ve diğer önemli moleküller için öncü görevi görür. Proteinin beslenme açısından en önemli ve belirleyici özelliği amino asit bileşimidir. Amino azot, protein ağırlığının yaklaşık %16'sını oluşturur ve bu nedenle azot metabolizmasının sıklıkla protein metabolizması ile eşanlı olduğu kabul edilir. Amino asitler, yukarıda belirtildiği

gibi vücut proteinlerinin ve diğer önemli azot içeren bileşiklerin sentezi için gereklidir. Amino asitler, bir α -imino asit olan prolin hariç α -amino asitlerdir (Otten vd., 2006). Yirmi (20) amino asidin, polipeptit dizisindeki komşu amino asitlerin α -amino ve α -karboksilik asit grupları arasında oluşturulan peptit (amid) bağlarıyla bağlandığı, çoğu proteinin yapı taşlarını oluşturduğu bilinmektedir.



Şekil 1.4. Polar ve nonpolar amino asitler ve formülleri (Demiralp vd., 2014)

Bu 20 amino asidin 19'u, sadece yan zincir olarak adlandırılan R grubunda farklılık gösterir. Yan zincirin bir hidrojen atomu olduğu amino asit glisin hariç, α -karbon atomu kiralite gösterir. Amino asitlerin D-enantiomerleri, bazılarının bakterilerin hücre duvarlarında bulunanlar da dahil olmak üzere birkaç peptitte bulunur. Bu amino asitler yan zincir türlerine göre yedi ana sınıfta gruplandırılabilir:

Aromatik (Phe, Trp, Tyr),

Polar olmayan (Şekil 1.4),

Alifatik (Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Val),

Polar (Şekil 1.4),

Yüksüz (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr),

Pozitif yüklü (Arg, His, Lys) ve

Negatif yüklü (Asp, Glu).

Bununla birlikte, bu sınıflandırma mutlak olarak düşünülmemelidir, çünkü bazı amino asitler, özellikle Gly, His ve Cys, belirli bir gruba mükemmel şekilde uymamaktadır. Proteinlerde en yüksek frekansta meydana gelen iki amino asit tortusu, alifatik yan zincirlere (Leu ve Ala için sırasıyla %10.3 ve %8.1) sahipken, Gly %7.2'de en sık görülen üçüncü amino asittir. His hariç, proteinlerdeki pozitif ve negatif yüklü amino asit kalıntılarının %80-90'ından fazlası genellikle öncelikle solvante maruz kalacakları şekilde bulunur. Benzer şekilde, polar yan zincirlere (Ser, Thr, Asn, Gln) sahip amino asit kalıntılarında da öncelikle çözücü tarafından erişilebilir. Tersine, bir aromatik fenolik grup içeren Tyr hariç, alifatik ve aromatik grupların %50'sinden azı 30Å'dan daha büyük çözücüye maruz kalan alanlara sahiptir. Bununla birlikte, alifatik ve aromatik kalıntıların sadece %40-%50'sinin gömülü olduğu ve solvante maruz kalan alanların 10Å'dan az olduğu düşünülecektir. Bu gözlemler, yüklü kalıntıların hemen hemen her zaman protein moleküllerinin yüzeyine veya çözücüye erişilebilir bölgelerine yakın konumdayken, muhtemelen molekülün iç kısmındaki yetersiz kapasiteye bağlı olarak polar olmayan alifatik veya aromatik kalıntılar için varsayılmayacağını gösterir. Dolayısıyla, hem yüklü hem de hidrofobik gruplar protein moleküllerinin yüzeyinde veya çözücüye erişilebilir bölgelerinde bulunurken yüksüz gruplar protein moleküllerinin gömülü iç kısmında çok daha az bulunur. Aslında, monomerik proteinlerin ortalama çözücüye erişilebilir yüzeyinin veya dışının yaklaşık %58'inin polar olmayan veya hidrofobik olduğu bildirilirken, yüzeyin %29 ve %13'ünün polar ve yüklü olduğu düşünülebilir.

Deniz alglerinin ise protein içeriği türlere göre değişir. Genellikle kahverengi yosunlar için düşük (kuru ağırlığın %3 ± 15'i), yeşil algler için orta (kuru ağırlığın %9 ± 26'sı) ve kırmızı yosunlar için yüksektir (kuru ağırlığın maksimum %47'si). Kuru ağırlıkta %11-24 protein içeriğine sahip türler hariç *Undaria pinnatifida* (*Wakame*), deniz sebzeleri veya kolloid ekstraksiyonu için kullanılan kahverengi deniz yosunlarının çoğu kuru ağırlık bazında %15'ten daha az protein içerir. Durum *Ulva* cinsine ait yenilebilir yeşil yosunlar için farklıdır, çünkü protein konsantrasyonları bitki kuru kütlelerinin %9-33'ünü temsil edebilir. Bazı çalışmalar *Ulva lactuca*'nın protein içeriği için %32'lik bir değer vermektedir ancak bu oran mevsimsel olarak yüksek bir değer gibi görünebilir. Bununla birlikte, bazı kırmızı deniz yosunları için daha yüksek protein içerikleri kaydedilmiştir. Örneğin, *Pyropia yezoensis* kuru kütleyle göre eksprese edilen proteinlerin %47'sine kadarını içerebilir. Bu seviye, soya fasulyesi gibi

yüksek proteinli bakliyalarda bulunanlardan daha yüksektir. Başka bir kırmızı deniz yosunu olan *Rhodomenia palmata*, proteinlerin %35'ini (kuru kütle) içerebilir. Alg protein içeriğinin mevsimsel değişimleri, yeşil veya kahverengi deniz yosunlarına ait diğer türler için de rapor edilmiştir. Örneğin, yeşil yosun *Ulva lactuca*, ağustos ayında en yüksek değere (kuru ağırlığın %32.7'si) ve nisan ayında da en düşük değere (%8.7) ulaşan bir protein seviyesine sahiptir. *Laminaria digitata* (kuru ağırlığın %6.5-%14.5'i) yenilebilir kahverengi deniz yosunları için mevsime göre protein içeriğindeki değişiklikler de gözlemlenmiştir.

Alglerin amino asit bileşimi, genellikle baklagiller veya yumurta gibi diğer gıda proteinlerininle birlikte incelenerek karşılaştırılmıştır. Çoğu deniz yosunu için, amino asit fraksiyonunun büyük bir kısmı aspartik ve glutamik asitlerden oluşur. Yüksek protein seviyesine sahip (kuru ağırlığın %24'üne kadar) kahverengi bir deniz yosunu olan *Undaria pinnatifida* (Wakame) türü, nabız proteinleri açısından yüksek düzeyde metiyonin (2 mg / 100 g protein) ile karakterizedir. Bu deniz yosunu için en bol esansiyel amino asitler sırasıyla arginin (çocuklar için esansiyel bir amino asit), lösin, lizin ve valindir. Esansiyel olmayan amino asitlerle ilgili olarak, *Undaria pinnatifida* ayrıca yüksek seviyelerde glutamik asit, aspartik asit, alanin ve glisin içerir. Yeşil deniz yosunu proteinleri ayrıca büyük oranda glutamik asit ve aspartik asitle karakterize edilir. Bu amino asitlerin seviyesi birlikte *Ulva rigida* ve *Ulva rotundata* türleri için toplam amino asitlerin sırasıyla %26 ve %32'sini temsil edebilir. Japonya'da sıklıkla tüketilen *Ulva pertusa*, arginin (14.9 mg / 100 g protein) veya lösin (6.9 mg / 100 g protein) gibi esansiyel amino asitlerde yüksek konsantrasyon ile karakterize edilen bir amino asit profili gösterir. Bu arginin seviyesi (toplam amino asit fraksiyonunun yaklaşık %18'i) ovalbumin seviyesini aşmaktadır. Kırmızı deniz yosunu proteinlerinin, diğer alg gruplarından kaydedilenlerden daha düşük miktarlarda glutamik asit ve aspartik asit olduğu görülmektedir. İki *Pyropia tenera* amino asiti, toplam amino asit fraksiyonunun sadece %15'ini oluşturur, bununla birlikte *Ulva* cinsinin yeşil yosunu için %13-35'dir. Mevsimine göre aspartik asit seviyesinde büyük bir varyasyonun kaydedildiği *Palmaria palmata* ile durum daha az açıktır (toplam amino asit fraksiyonuna % 8.5 -% 18.5). Esansiyel amino asitler, *P. palmata*'nın toplam amino asit fraksiyonunun yaklaşık %46'sını oluşturabilir bu ovalbumin için kaydedilene oldukça benzer bir miktardır. Çoğu deniz yosunu, özellikle yeşil ve kırmızı algler, insan ve hayvan yemi için ilginç ve uygun bir protein kaynağı gibi

görülmektedir. Bununla birlikte, alg proteini sindirilebilirliği genellikle polisakaritler veya tripsin inhibitörleri gibi çeşitli anti-beslenme bileşiklerinin varlığı ile sınırlı görülmektedir (Yada, 2019).

1.3. Alternatif Protein Kaynakları

1.3.1. Karasal Yaprak Proteinleri

Yapraklar, yüksek bitkilerin fotosentetik organlarıdır ve az kullanılmış bir protein kaynağını temsil etmektedir. Geleneksel mahsullerin yaprakları, ekin üretiminin odağını oluşturan tohumların veya diğer tarımsal ürünlerin üretimi ile birlikte bir yardımcı ürün olarak kullanılabilir. Bu anlamda, yaprak proteininin üretimi, soya fasulyesi unu gibi bitkilere sürdürülebilir bir ektir çünkü yaprak üretimi ek tarımsal kaynaklar gerektirir. Yapraklardaki protein konsantrasyonu göreceli olarak tutarlıdır (%10-20 dw) ve tohum bitkileriyle karşılaştırılabilir esansiyel amino asitlerin sınırlandırılması ile belirlenen kalitededir. Bununla birlikte, yapraklardaki sindirilebilir enerji ve sindirilebilir protein konsantrasyonları, yüksek selülozik madde konsantrasyonları nedeniyle mono-gastrik hayvancılık için çok düşüktür. Bu nedenle, yapraklardan elde edilen proteinlerin daha konsantre bir formda çıkarılması gerekir. Proteinlerin yapraklardan ekstraksiyonu, bir kaç on yıl boyunca % 70'e varan verim ve soya fasulyesi unu ile karşılaştırılabilir yüksek kalitede bir protein ile araştırılmıştır. Bununla birlikte, yaprak proteininin ekstraksiyonu son zamanlarda enerji üretiminden önce proteinlerin başlangıçta biyoyakıt ürünlerinden ekstrakte edildiği biyolojik rafineri konsepti bağlamında incelenmiştir. Birden fazla ürün, mahsulün genel değerini artırır ve kısmen gıda ve yakıtlar arasındaki rekabeti azaltabilir (Angell ve Raymond, 2016).

1.3.2. Bakteriyel Proteinler

Mantar ve bakteriyel protein kaynakları, tek hücreli mantarları, filamentli mantarları ve bakterileri içerir. Geleneksel ve hatta alternatifin aksine, ototrofik, fungal ve bakteriyel protein bitkileri olan ürünler çoğunlukla heterotroftir ve büyüme için bir karbon ve azot kaynağı olarak çok çeşitli substratları kullanabilir. Bu substratlar, ucuz ve bol olan lignoselülozik atık akışlarını içerir. Bu anlamda, mantar ve bakteri bitkileri, atık kullanarak mevcut tarımsal üretim sistemlerine entegre edilebildiklerinden, ek kaynak olmadan protein üretme yeteneğine sahiptir. Bu, örneğin, işleme sırasında pirinç tanesinden ayrılan ve kuru ağırlık temelinde hasat edilen pirinç tanesinin %20-25'ini temsil eden atık ürün olan pirinç kabuğunu içerir. Hem mantarlar hem de bakteriler yüksek biyokütle üretkenliğine sahip olabilir ve her ikisi de yüksek konsantrasyona (%30-80 dw) ve protein kalitesine sahiptir. Bununla birlikte, insan ve hayvancılık diyetlerinde mantar ve bakteri proteinlerinin kullanımını kısıtlayan bir takım sorunlar vardır. Bu konular, substrattan köken alan toksik ve kanserojen bileşikler veya organizma tarafından biyosentezi sonucu ortaya çıkan potansiyel toksisitelerini içerir. Diğer bir sorun, ürik asitin nükleik asit bozulmasından birikmesi nedeniyle, gut ve böbrek taşları gibi insanlarda bir dizi sağlık sorunuyla ilişkilendirilen yüksek nükleik asit içeriğidir. Ayrıca, küçük bakteri ve mantar büyüklüğü de yüksek bir geri kazanım maliyeti doğurur. Sonuç olarak, mantar ve bakteriyel proteinin daha da gelişmesini engelleyen en belirgin sorun, soya unu gibi günümüzde kullanılan kaynaklarla rekabet etmeyen üretim maliyetidir (Angell ve Raymond, 2016).

1.4. Algler

Alglerin 30,000 ile 1 milyondan arasında türü içerdiği tahmin edilmektedir. Bu türlerin içinde yer alan yeşil algler ağırlıklı olarak tatlı suda, %10'u da okyanuslarda yaşamaktadır. Küresel olarak dağılmış ve Kuzey Kutbu ve Antarktika bölgelerinden okyanuslara ve tatlı su göllerine, ayrıca ılıman ve kurak bölgelerde toprakta geniş bir habitatta bulunurlar. Deniz ekosistemlerinde, yeşil deniz yosunları genellikle sığ kıyı sularında yaşamaktadır. Yeşil yosunların bazı ortak özellikleri; önemli morfolojik çeşitliliğe sahip olmaları, çok hücreli olmaları, çekirdek, mitokondri, kloroplast, golgi

aparatu ve endoplazmik retikulum gibi organellere sahip olmaları, klorofil (a, b), karotenoid ve ksantofil içermeleri olarak sayılabilir. Çok eski tarihi zamanlardan beri tüketilen deniz yosunları, günümüzde de bir hayli önem kazanmış durumdadırlar. Protein, mineral ve vitaminlerin sağlıklı kaynaklarına olan artan talebi karşılayan deniz yosunu deniz kültürü, değişen alg tüketim uygulamalarını karşılamak için genişletilebilir. Günümüzde dünyadaki gıda arzının %1'inden daha azı deniz yosunlarından gelmektedir. Besin açısından zengin ve çok sayıda sağlık yararı sağlayan deniz yosunlarının tüketilmesi küresel olarak kabul edilmektedir. Günümüzde lezzet, doku veya mutfak çok yönlülüğü için kullanılan yaygın yenilebilir yosunlar arasında *Ulva intestinalis*, *Monostroma*, *Caulerpa*, *Laminaria*, *Undaria*, *Sargassum fusiforme*, *Palmaria* ve *Porphyra* bulunur. Bu taksonlara ek olarak, besin değerleri nedeniyle çok sayıda deniz yosunu bir gıda kaynağı olarak kullanılabilir. 10.000'e yakın deniz yosunu türünden sadece 145 türü gıda kaynağı olarak kullanılmaktadır. Vücudun fizyolojik işlevleri için gerekli olan deniz yosunlarında yaklaşık 56 farklı mineral ve eser element bulunmaktadır. Alglerde yüksek seviyelerde kalsiyum, demir, iyot, vitaminler, doğal antioksidanlar, proteinler (%48'e kadar) ve azaltılmış lipit seviyeleri (%1-5) bulunur. Mineraller ve vitaminler dışında, deniz yosunları da %50-60'a kadar sayılabilen polisakkaritler içerir. Vücut tarafından sindirilmediği takdirde bu polisakkaritler, diyet lifleri olarak işlev görebilir. Yosunlar ayrıca, omega 3 ve omega 6 asitleri ile ilgili çoklu doymamış yağ asidi bileşimi içerir (Fleurence vd., 2016).

1.4.1. Mikroalgler

Mikroalgler zengin protein, karbonhidrat ve yağ asidi içeriğine sahiptir. Besin değeri yüksek olan bu organizmalar, sucul hayvanlar için büyük monomerli besin, vitamin ve iz elementlerin en önemli kaynağıdır. Mikroalglerin bileşiminde bulunan ana madde proteindir. Ayrıca mikroalglerin vitamin bakımından zengin olduğu, özellikle vitamin B12 miktarının çokluğu dikkat çekmektedir. Proteince zengin mikrobik algler bol miktarda K, Na, Mg, Ca, P, S, Fe gibi mineral maddeleri ihtiva etmektedir. Bu mineral maddelerin oranı mevsimlere göre az ya da çok değişiklikler göstermektedir. Bu

alglerin içerdikleri nükleik asit miktarları da ihmal edilmeyecek değerlerdedir. Açık sahalarda mikroalglerin kültürü yalnız sıcak aylarda ya da belirli sıcaklık derecesine eriştiğinde mümkün olmaktadır. Soğuk ve uzun kış mevsimine sahip iklimlerde verim dar bir alanda kalmaktadır (Kaba ve Çağlak, 2006).

1.4.2. Makroalgler

Makro algler, insanların denize, okyanusa kıyısı olan yerleşkelere yerleşmesinden itibaren önemi artan bitkisel canlılardır. Makro algler gıda, ilaç, kozmetik, tarım ve hayvancılık, hayvan yemi, kozmetik ve sanayi alanlarında kullanılmaktadır. Ayrıca yatıştırıcı, kas gevşetici ve ödem giderici olarak kullanılmaktadır. Avrupa'da hammadde, İrlanda ve İngiltere'de M.S. 563'de besin olarak, Vikingler'de 9. ve 10. yy.larda besin olarak kullanılmıştır. Eski çağlarda daha çok besin olarak kullanılan algler aynı zaman da renk verici ve kıvam arttırıcı, hayvan yemi ve gübre olarak da kullanılmıştır. Deniz yosunları, günümüzde gelişen teknolojiyle birlikte tarım gübresi, insan ve hayvan gıdası, biyoyakıt, aljinat ve agar gibi polisakkaritlerin eldesinde kullanılmaktadır. Deniz sebzesi de denilen makro algler amino asit kompozisyonu baklagillere yakın, yağ asitleri düşük, vitamin ve mineral düzeyi yüksektir. Bazı alglerde protein sindirebilirliği %80, karbonhidrat sindirilebilirliği ise %50'dir. Algler aljinat, karragen, agar-agar gibi polisakkaritlerin de kaynağıdır. Deniz yosunları absisik asit, sitokinin, mikro ve makro besin maddeleri içerdikleri için gübre olarak kullanımı çok yaygındır. Aynı zaman da özütleri fide oluşumu, çimlenme, köklenme, meyve oluşumu ve zararlılara karşı dayanıklılık gibi faydalar sağlamaktadır. Agar-agarın jel oluşturma özelliği nedeniyle mikrobiyolojik çalışmalarda, parfümlü kol altı ürünlerinde, penisilin içeren dermatolojik kremlerde, güneş kremlerinde, mobilya ve film endüstrisinde kullanılmaktadır. Aljinatın kayganlaştırıcı özelliği sabunlarda, traş kremlerinde, saç losyonlarında ve yara bantlarının yapışkan özelliğini kazanmasında, boya, tekstil, kauçuk ve deri endüstrisinde kullanılır. Karragenler akıcı özelliği sayesinde ilaç ve kozmetik sanayiinde, şampuanlarda, yüz maskelerinde, deodorantlarda, yangın söndürücülerde, ayakkabı cilalarında ve oda kokularının içeriğinde kullanılır (Ak, 2015).

1.5. Alg Yetiştirme Ortamları

Çok az sayıdaki bazı türlerinin dışında algler sucül ortamlarda yaşarlar. Biyoteknolojik uygulamalarda, alternatif alg yetiştirme ortamlarından biri de atık sulardır. Atık sular çok çeşitli evsel, endüstriyel, ticari veya tarımsal faaliyetlerin yan ürünüdür ve sonuç olarak çok değişken kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir.

Atık sularda azot ve fosfor içeriği en çok çevresel açıdan ilgilidir ve atık sulardan uzaklaştırılmaları yönünde kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Bir seçenek, besinlerin alg veya mikroalg ile geri kazanılması ve ayrıca biyoürünler ve biyoyakıt üretmektir (Monfet vd., 2017). Alg biyokütlesi, hayvan yemi ve biyoyakıt üretimi için potansiyel bir kaynak haline gelmiştir. Biyokütlenin üretim maliyetini azaltmak için, yosun ekimi genellikle atık su arıtma ile birleştirilir. Algler, bira atık sularında, kentsel atık sularda, hayvan gübresi, et işleme atık sularında başarıyla yetiştirilmiştir. Atık su ile yetiştirilen alglerin biyokütle verimini arttırmak için havalandırma, asit sindirimi, fermantasyon gibi farklı teknolojiler geliştirilmiştir. Düşük maliyetle veya düşük maliyetle mevcut olan atık sular, yosun yetiştiriciliği ve biyokütle üretimi için maliyet etkin ve sürdürülebilir bir yol sağlamıştır (Lu vd., 2016).

Atık su arıtma metotları genel olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtma olarak üç metoda ayrılır. Bu üç arıtma metodunun aralarındaki kombinasyonlarla ön arıtma, birincil arıtma ve ikincil arıtma gerçekleştirilir. Ön arıtma, büyük partiküllerin atık sudan ayrıldığı ve katı atık haline dönüştürüldüğü fiziksel arıtma metodudur. Ön arıtma işleminden çıkan atık suyun içerdiği süspanse ve kolloidal katılar ile yağ gibi yüzücü maddeler, kimyasal ve biyolojik işlemlerle çöktürülerek ve ayrıştırılarak birincil arıtma gerçekleştirilir. İkincil arıtmada ise, çözünmüş haldeki maddeler çeşitli kimyasal ve biyolojik işlemlerle tutulur, ayrıştırılır ve patojen organizma içeriği dezenfeksiyonla giderilirler. Tüm bu arıtma adımlarının kullanıldığı bir atık su arıtma tesisinin maliyeti ve enerji gereksinimi oldukça fazladır. Algler fotosentez yaparak sürekli olarak oksijen kazandırdıkları için doğal suların kendi kendine arıtması işleminde de önemli bir role sahiptir. Bununla birlikte, alglerin su ve atık sularda azot ve fosfor başta olmak üzere sucül ortam için tehlikeli olan kirleticileri hücre ve hücrelerinde yapı maddesi olarak kullanmaları veya biriktirmeleriyle giderdikleri, çok sayıda araştırmacı tarafından belirlenmiştir. Alglerin bu yeteneklerinden yararlanılarak atık su arıtımında kullanılmalarında başarılı sonuçlar sağladığı, yapılan

pek çok çalışmayla kanıtlanmıştır. Organik maddece zengin sularda algler, fotosentez yaparak serbest oksijen üretir ve bu şekilde organik maddenin aerobik bakteriyel oksidasyonunu desteklerken aynı zamanda oksidasyonla açığa çıkan karbondioksit ve nutrientler, algler tarafından yeni biyomas üretiminde kullanılmaktadır. Birçok arıtma sistemine kıyasla, etkili nutrient arıtımı sağlayan algal atık su arıtma sistemlerinde yaygın olarak *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Cyclotella*, *Cosmarium* türlerine rastlanır. Fotosentez süresince havuz suyunda oksijen miktarının artmasıyla pH'da yükselir buna bağlı olarak fosfor çökelir, amonyak giderilir ve hidrojen sülfür miktarı azalır. pH'ın yükselmesi birçok patojen organizma için öldürücüdür. Atık sulardaki ağır metal miktarı da alg biyoması tarafından giderilebilir. Laboratuvar düzeyinde bir çalışma da, atık su havuzundaki kadmiyum ve bakırın, alg biyoması tarafından %70-90 oranında giderildiğini belirtmiştir. Ağır metalleri sulardan uzaklaştırma etkinliği, alg türlerine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin *Oscillatoria sp.* iyi bir krom gidericidir, *Chlorella vulgaris* asıl olarak kadmiyum, bakır ve çinko, *Chlamydomonas sp.* kurşun, *Scenedesmus chlorelloides* molibden giderme yeteneğine sahip bulunmuştur. Öldürücü dozun altında ağır metal içeren sularda alglerin metal kirliliğine adapte olacağı belirtilmekle beraber, alg hücrelerindeki ağır metal birikimi, besin zincirindeki diğer halkalar için potansiyel olarak toksiktir. Atık sularda alg yetiştirmek için havuz sistemleri kullanılmaktadır. Bunlar; algal-bakteriyel havuz sistemleri, fakültatif havuzlar, yüksek oranlı algal havuz sistemleri ve ileri entegre havuz sistemleridir. Atık su arıtımı için tesis edilen ileri entegre havuzlar, anaerobik havuz, fakültatif havuz, yüksek oranlı algal havuz ve çöktürme havuzundan oluşan bir sistemdir. DOE tarafından inşa edilen bu havuz sisteminin kuruluş sermayesi ve bakım masrafları, aynı fonksiyonu sağlayacak olan bir ikincil arıtma sistemine oranla çok düşüktür ve mekanik araçların kullanımı da en aza indirgenmiştir. Arıtma sisteminin diğer bir önemli avantajı, havuzda çok az miktarda kalıntı çamur birikmesidir. Yaklaşık 30 yıllık uygulama süresince atık su arıtma tesisinde henüz kalıntı uzaklaştırma işlemi yapılmamıştır. Bu sürede sistemin ilk bileşeni olan fakültatif havuzda, henüz 1 m'den az çamur birikmiştir (Şen vd., 2003).

1.6. Alglerin Amino Asit Kompozisyonu

Daha önce kullanılan tarımın yoğunlaştırılmasına yönelik yöntemler, doğal yaşam alanlarının parçalanması ve biyolojik çeşitliliğin tehdit edilmesi, arazi temizliğinden sera gazı üretimi, gübre ve hayvancılık üretimi de dahil olmak üzere çevre üzerinde sahip oldukları yüksek etkili değişimler nedeniyle yakında bir seçenek olamayacaktır. Özellikle, protein gelecekte kısa sürede tedarik edilmesi gereken ana besinlerden biridir. Tüketicilerin talebini karşılamak ve öngörülen küresel protein gereksinimlerini de karşılamak için alternatif protein kaynakları ve üretim yöntemleri gereklidir. Deniz yosunu ve mikro algler canlı bir protein kaynağı olarak kabul edilir (Çizelge 1.3). Bazı deniz yosunu ve mikroalg türlerinin et, yumurta, soya fasulyesi ve süt gibi geleneksel protein kaynaklarına benzer protein seviyeleri içerdiği bilinmektedir. Protein üretimi için alg kullanımı, üretkenlik ve besin değeri açısından geleneksel yüksek proteinli mahsul kullanımına göre çeşitli faydalara sahiptir. Karasal tarım, hayvansal proteine sahip toplam küresel tatlı suyun yaklaşık %75'ini, özellikle bitki kaynaklarından eşdeğer miktarda protein üretilenden 100 kat daha fazla su gerektirmektedir. Deniz yosunları, ek gıda üretimi veya diğer nakit ürünler için kullanılabilir kaynakları en üst düzeye çıkarmak için tatlı su veya ekilebilir arazinin büyümesini gerektirmez. Ayrıca, sert ortamları ve fototropik ömürleri nedeniyle algler sıklıkla yüksek oksidatif ve serbest radikal streslerine maruz kalmaktadır. Bu, yenildiği takdirde tüketiciye sağlık yararları sağlayabilen pigmentlerin (örn. Karotenler, klorofiller ve fikobiliproteinler) ve polifenollerin (örn., Kateşinler, flavonoller ve florotaninler) üretimi gibi doğal koruyucu sistemlerin evrimine yol açmıştır. Bununla birlikte, deniz yosununun ve mikroalglerin yaygın kullanımı; alglerin erişimini ve haklarını, mevsimsellik ve alglerin coğrafi konumlarının yanı sıra alglerden protein izolasyonu için ölçeklenebilir üretim yöntemlerinin mevcuttur. Algler genellikle EAA bileşimi FAO gerekliliklerini karşılayan uygun bir protein kaynağı olarak kabul edilir ve genellikle soya fasulyesi ve yumurta gibi diğer protein kaynakları ile eşittir. Deniz yosunlarının yaygın olarak tüketilmemesi, alglerin ideal sindirimi ile ilgili in vivo araştırma eksikliğine yol açmış, böylece farklı alg türleri ile diğer protein kaynakları arasındaki alg protein kalitesinin karşılaştırılmasını sınırlandırmıştır. Bununla birlikte, triptofan ve lizin çoğu alg türünde sıklıkla amino asitleri sınırlandırmaktadır. Ayrıca lösin ve izolösin, kırmızı alg türlerinde genellikle düşük konsantrasyonlarda

bulunurken, metiyonin, sistein ve lizin genellikle kahverengi alg türlerinde sınırlıdır. Sistein tipik olarak birçok deniz yosunu türünde düşük seviyelerde görülür ve genellikle saptanamaz. Aspartik asit ve glutamik asit, birçok deniz yosunu türündeki toplam amino asitlerin nispeten büyük bir kısmını oluşturur (Bleakley ve Hayes, 2017).

Çizelge 1.3. Farklı alglerin genel bileşimi (% kuru ağırlık) (Becker, 2007)

ALG	PROTEİN	KARBONHİDRAT	YAĞ
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-46	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21
<i>Arthrospira maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

1.7. *Chlorella vulgaris* Beyerinck Taksonomisi

Kingdom	Plantae – plantes, Planta, Bitkiler
Subkingdom	Viridiplantae – Yeşil Bitkiler
Infrakingdom	Chlorophyta – green algae Yeşil Algler
Division	Chlorophyta – green algae, algues vertes
Subdivision	Chlorophytina
Class	Trebouxiophyceae
Order	Chlorellales
Family	Oocystaceae
Genus	<i>Chlorella</i> Beijerinck, 1890
Species	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck, 1890

Yukarıda taksonomisi verilen *Chlorella* Beijerinck, 1890, (NODC Taxonomic Code, Database, version 8) dünya çapında en bilinen mikroalg cinslerinden biridir. Cinsin üyeleri, morfolojik karakterlerin azlığından muzdarip olsa da, 1890'da *Chlorella vulgaris* Beijerinck türünün tanımından bu yana 100'den fazla *Chlorella* türü adlandırılmıştır. Bu taksonlar farklı bir simbiyoz oluşumunu da gündeme getirmiştir. Bu cinsin sistematüğini gözden geçirmek için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar temel olarak beslenme gereksinimleri, morfolojik ve yapısal özellikleri, serolojik çapraz reaksiyonlar, hücre duvarının ultrastrüktürel ve kimyasal bileşimi, pyrenoid üst yapı, biyokimyasal ve fizyolojik karakterler ve moleküler filogenetik özelliklerdir. Tüm bu çalışmalar, cinsin heterojen bir tür topluluğu olduğunu ve cinsin tekrar gözden geçirilmeye ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Biyokimyasal ve moleküler verilere dayanarak, cins şu anda yalnızca beş *Chlorella* türünden oluşmaktadır: *Chlorella vulgaris*, *C. lobophora*, *C. sorokiniana*, *C. heliozoae* ve *C. variabilis*'tir. *Chlorophyta* cinsinin ve türlerinin ayrılması geleneksel olarak morfolojik ve sitolojik karakterlere dayanmaktadır. Bununla birlikte, benzer morfolojinin yakın bir filogenetik ilişkiye yol açtığı hipotezinin çoğu kez yanlış ve yanıltıcı olduğu kanıtlanmıştır. Son filogenetik çalışmalar, tipik *Chlorella* morfolojisinin diğer *Trebouxiophyceae* ve *Chlorophyceae* soyları ile paylaşıldığını göstermiştir. *Chlorella* cinsinin üyeleri geleneksel olarak Chlorellaceae'ye aittir ve son zamanlarda farklılıklar iki isim altında incelenmiştir: Bunlar *Parachlorella-clade* ve *Chlorella*. Dictyosphaerium morfotipine (hücreler ve jelatinimsi zarf arasında bağ iplikleri olan) odaklanan araştırmalar, bu morfotipin *Chlorellaceae* ile bir bağlantısı olduğunu göstermiştir. Son araştırmalar, Dictyosphaerium benzeri suşların *Chlorellaceae*'den bağımsız olarak kümелendiğini, bazı taksonların *Chlorella* cinsinin üyeleri arasında olduğunu göstermiştir. Bu cinsin çalışmasındaki mevcut zorluk, *Chlorella* benzeri türlerin son derece yüksek filogenetik çeşitliliği ışığında, sınırlı sayıda morfolojik karakterin uygun tanımlanmasını ve ayırt edilmesini engelleyen küçük boyutlarıdır (Bock vd., 2011).

2. MATERYAL-METOD

2.1. Mikroalg Kültür Ortamları

Chlorella vulgaris'in kültüründe kullanılan TAP besi yerinin kompozisyonu Çizelge 2.1.'de verilmektedir.

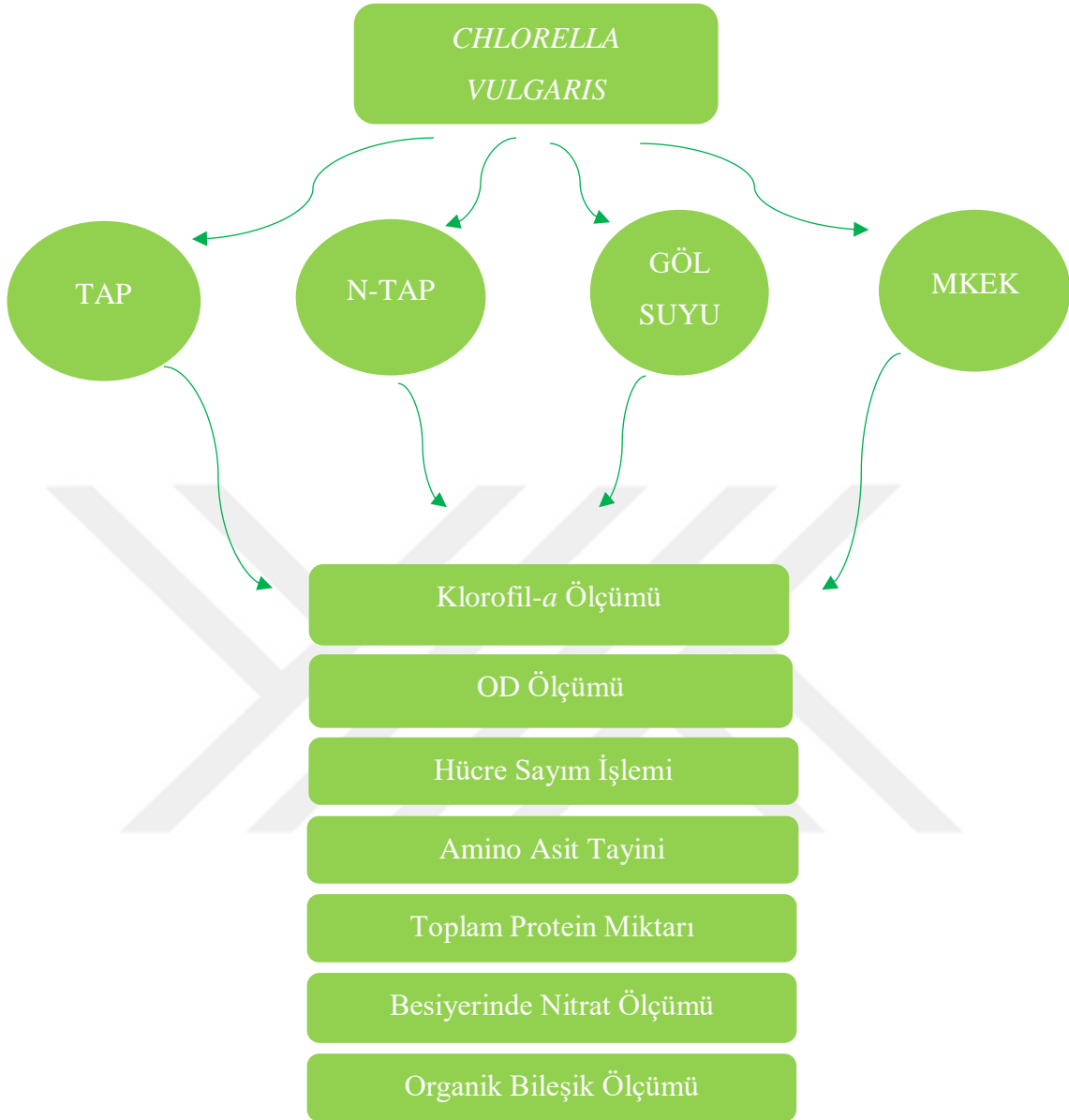
Çizelge 2.1. Alg yetiştirme besi ortamı içerikleri

Kimyasallar/ Besi Ortamı	TAP Besiyeri	Nitrat Eklemeli TAP (N-TAP)
TAP SALT		
NH ₄ Cl	2 g	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	0,5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,25 g	0,25 g
PHOSPHATE SOL.		
K ₂ HPO ₄	2,88 g	2,88 g
KH ₂ PO ₄	1,44 g	1,44 g
TRIS SOL.		
TRIS	0,484 g	0,484 g
Glacial asetik asit	0,2 mL	0,2 mL
TRACE		
EDTA disodium salt	5 g	5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2 g	2,2 g
H ₃ BO ₃	1,14 g	1,14 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,506 g	0,506 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,161 g	0,161 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,157 g	0,157 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,110 g	0,110 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,499 g	0,499 g
NO ₃	-	10 g

Çizelge 2.2. Atık su besi ortamları ağır metal ölçümleri

Ağır metaller(ppb)/Besi ortamları	MKEK	GÖL
Cr	0,223	0,093
Cu	10,739	2,632
Ni	0,135	0,165
Pb	0,696	1,501
Co	0,118	0,106
Al	0,112	1,213
Zn	2,427	0,391
Cd	0,032	0,045
Fe	0,011	0,654
B	4,482	7,032
Sr	7,640	17,314
Ba	0,091	0,094
Ca	822,017	1027,26
Mg	11,041	20,617
K	361,299	47,603
Mn	0,087	0,037
Ag	0,161	0,276
Bi	0,044	0,070
Ga	0,567	0,321
In	4,593	0,446
Li	1,160	0,537
Tl	0,198	0,343

2.2. Deneysel Prosedürler



Şekil 2.1. Aşılama yapılan besiyerleri ve deneysel uygulamalar. Belirtilen tüm ölçümler inkübasyonun 1, 3, 6, 8, 10, 12, 14, ve 15. günlerinde örneklenen mikroalgler kullanılarak yapılmıştır. Tüm deneysel ölçümler üç biyolojik tekrar grubu kullanılarak alınmıştır

2.2.1. Klorofil-*a* Ölçümü

İki mL olarak alınan alg numuneleri 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısımda kalan besi yeri uzaklaştırılmıştır. İki mL aseton ile muamele edilerek

vortekslenen numune 15 dakika 80 °C’de sonikatöre konulmuş ve 5 dakika olmak üzere 15000 rpm’de santrijüf edilmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant kısmı alınarak pellet kısmı atılmıştır. Süpernatant kısmı ELISA’da ölçerek Chl-*a* hesaplamaları yapılmıştır (Jeffrey ve Humphrey, 1975).

2.2.2. Optik Yoğunluk (OD) Ölçümü

AquaPen-C AP-C 100 marka cihaz kullanılarak Optik Yoğunluk (OD) ölçümü yapılmıştır (Şekil 2.2). OD680 nm, OD720 nm, QY ve OJIP parametreleri bir gün ara ile ölçülmüştür (AquaPen Operation Manual).



Şekil 2.2. OD ölçümünde kullanılan cihaz

2.2.3. Hücre Sayım İşlemi

Alglerin farklı sürelerde sayımı için kontrol ortamında inkübasyona bırakılan mikroalg kültüründen gün aşırı alınan 30 µl alg solüsyonu örnekleri sedimentasyon tüplerinde 2970 µL distile su ile seyreltilmiş ve fiksasyon için 30 µL lügol çözeltisi ilave

edilmiştir (Şekil 2.3). İki saat bekleddikten sonra inverted mikroskop altında her bir görüntü alanındaki bireyler 30 görüntü alanına ulaşınca kadar sayılmış ve ortalamaları alınmıştır.



Şekil 2.3 Sayım işlemi hazırlık aşaması

2.2.4. Toplam Protein Alg Ekstraksiyonu

Ön muamele için 10 mg alg 10 mL lizis tamponu içinde çözdürülen alg örnekleri bir dakika boyunca homojenize edilmiştir. Ardından sıvı azot içinde dondurularak oda sıcaklığında erimeye bırakılmıştır. Tekrar sıvı azot içinde dondurulan ve on dakika sonike edilen alg örnekleri yirmi dakika 15000 rpm'de +4°C sıcaklıkta santrifüj edilmiştir (López vd., 2010).

2.2.5. Amino Asit Tayini Alg Ekstraksiyonu

Stok alg solüsyonundan 50 mg olarak tartılan alg örneği 24 saat 110°C'de 10 mL 6 mol HCl ile hidrolize edilmiştir. Hidrolizat 55°C'de vakum pompası ile kurutulmuş ve 5 mL distile su ile tekrar çözdürülmüştür. Ön işlem sonucu çözdürülen numuneden ve amino asit standartlarından 1 mL'lik ependorflara alındıktan sonra, 500 µL asetonitril ve 24 µL fenilzotiyosiyanat eklenerek vortekslenmiştir. Daha sonra 278µL

trimetilamin eklenerek tekrar vortekslenmiştir. Yarım saat boyunca 70°C’de degas yapılarak oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir. 198 µL HCl eklenerek vortekslenmesinden beş dakika sonra, 15000 rpm’de 5 dk süresince santrifüj edilmiştir. 0,22 µm filtreden geçirilen numune analiz için saklanmıştır (Şekil 2.4.) (Xie vd., 2017).



Şekil 2.4. Amino asit tayini alg ekstraksiyonu aşaması

2.2.6. Besiyerinde Nitrat Ölçüm

İnkübasyona bırakılan besi ortamlarından gün aşırı 2 mL besiyeri örnekleri alınmıştır. Alınan besiyeri örneklerinin iyon kromatografisi cihazında nitrat ve fosfat takibi yapılmıştır. Çizelge 2.3.’teki analitik koşullar sağlanarak ölçümler yapılmıştır.

Çizelge 2.3. İyon kromatografisi cihazı analitik koşulları

Mobil faz (anyon)	Sodyum Bikarbonat/Sodyum Karbonat karışımı (12mM/6mM)
Kolon (anyon)	Shimpack ICSEA2 (250 mm x 4.0 mm, 9µm)
Mobil faz (katyon)	Nitrik Asit (5mM)
Kolon (katyon)	Shimpack ICSC1 (150 mm x 4.6 mm, 6µm)
Kolon fırın sıcaklığı	30°C
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Akış hızı	1 mL/dk
Dedektör	CDD-10Asp
Süre	20 k

2.2.7. Alglerde Toplam Protein Miktarı Tayini

Ön muamele edilmiş biyokütlenin toplam protein miktarını ölçmek için Lowry yöntemi uygulanmıştır. Standartların hazırlanmasında 0,2-10 mg arası BSA 10 mL lizis tamponu içinde çözdürülmüştür. Daha önce toplanan süpernatantlardan ve hazırlanan standartlardan 100'er µL alınmış ve üzerine 100 µL %10'luk SDS solisyonu eklenmiştir. Daha sonra 100 µL reaktif A eklenerek vortekslenmiştir. Karışımın 50 µL'sine 200 µL reaktif C eklenerek 10 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir ve 20 µL reaktif C solisyonu eklenmiştir. 45 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilen örneklerin 750 nm'de ELISA'da ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Analiz kapsamında kullanılan kimyasalların hazırlanışı aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

Reaktif A: 40 mg NaOH 10 mL distile su içinde çözdürüldü 0,2 g Na₂CO₃ eklendi,

Reaktif B: 0,1 g NaKTartarat 10 mL distile su içinde çözdürüldü 50 mg CuSO₄ eklendi,

Reaktif C: 20 µL reaktif B 1980 µL reaktif A,

Folin reaktifi (1 N), % 10 SDS (5 mg SDS 100 mL distile su), Lizis tamponu (5 mL lizis tamponu 50 mL distile su) yapılmıştır (López vd., 2010).

2.2.8. Amino Asitlerin Teşhis ve Miktarlarının Belirlenmesi (HPLC Analizi)

Amino asitlerin ayrıştırılması C18 kolonu (250 4,6 mm, 5 lm, Grace, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz, 1.0 ml dk⁻¹ akış hızında, Mobil faz A, 0.1 mol NaAcasetonitril (97: 3, v/v; pH 6.5) ve mobil faz B, asetonitril-su (4: 1, v/v) olarak yapılmıştır. Gradyan koşullar : 0-13 dakika,% 100-93 A; 13–23 dk,% 93-77 A; 23-29 dak, 77-65% A; 29–35 dk,% 65-60 A; 35-40 dak; % 60-0 A; 40-45 dakika,% 100 B olarak uygulanmıştır. Amino asitler, UV dalga boyu detektörü kullanılarak tespit edilmiş ve tutma sürelerinin gerçek standartlarla karşılaştırılmasıyla tanımlanmıştır. Teşhis, harici standart yöntemine göre yapılmıştır (Xie vd., 2017).

2.2.9. Organik Makromoleküllerin Teşhisi Değişimlerinin Belirlenmesi (FT-IR Analizi)

FTIR spektrumları, ortam sıcaklığında, Bruker Vertex 70 V marka model cihaz ile 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında (MIR bölge) ATR ataşmanı kullanılarak elde edilmiştir (Pistorius vd., 2009).

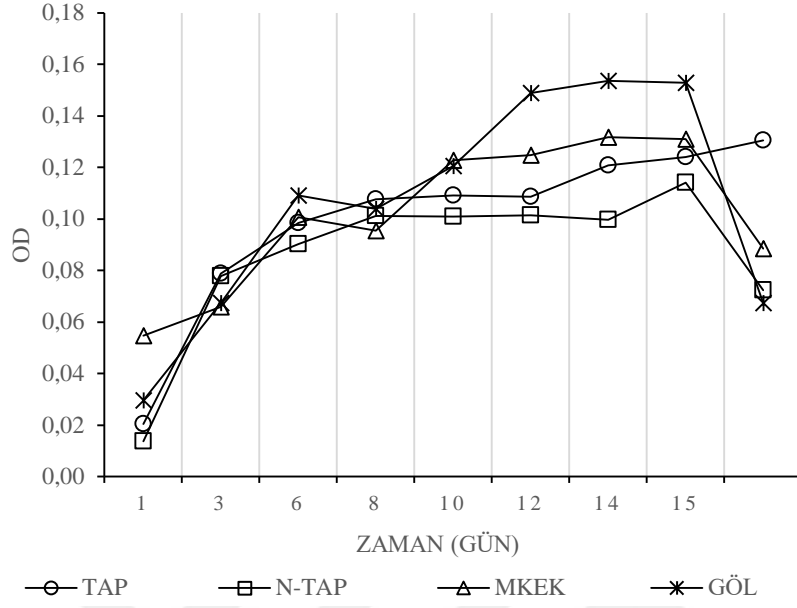
3. BULGULAR

3.1. Büyüme: OD, Chl-*a* ve Hücre Sayımı

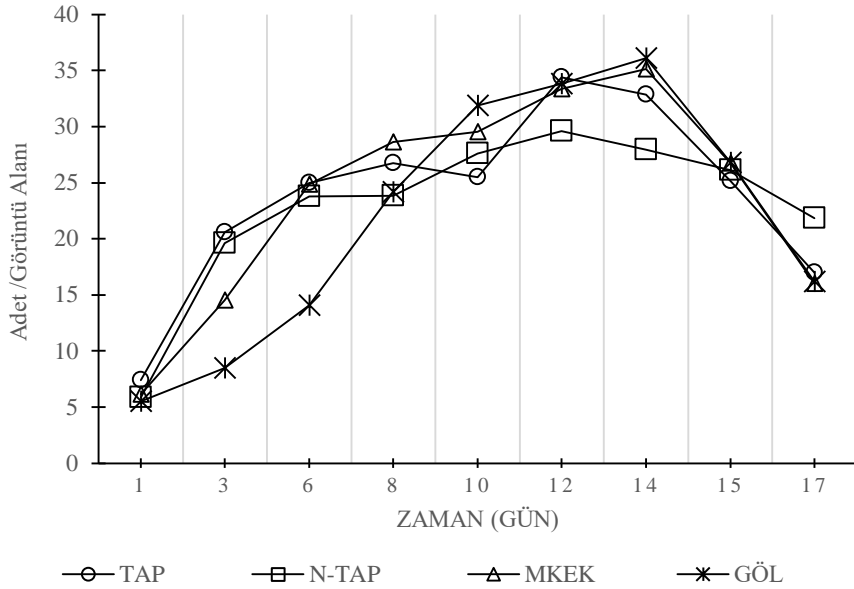
Farklı besi ortamlarında kültüre alınan *Chlorella vulgaris*'e ait büyümenin takibinde başvurulan parametrelerden ilki optik yoğunluk ölçümüdür. Alg uyumlu OD cihazı ile gün aşırı olarak yapılan ölçümlere ait optik yoğunluk değerleri Şekil 3.1.'de görülmektedir. Buna göre, *Chlorella vulgaris* popülasyonunun, 1. gün ilk örneklemede gecikme (lag) evresinde olduğu görülmektedir. Bu evre muhtemelen ikinci günde de devam etmiş olabilir ancak örnekleme gün aşırı gerçekleştirilmesi nedeniyle bu yakalanamamıştır. Üçüncü günden itibaren hızlı bir büyüme evresine giren *Chlorella* kümelerinin söz konusu büyüme davranışı genel olarak 8. güne (veya 10. güne) kadar devam etmiştir. Bu evrede büyüme hızı en yüksektir. Bu evreyi, 8. ve 14. günler arasında tespit edilen, doğrusal ya da durağan faz adı verilen büyüme davranışı takip etmiştir. Bu dönemde, mikroalg miktarları maksimum seviyesine ulaşmış ve nispeten yatay bir büyüme davranışına geçmiştir. 14. günden itibaren ise, düşüş veya ölüm fazı olarak adlandırılan evreye geçildiği görülmüştür (Şekiller 3.1, 3.2 ve 3.3). Log fazı süresince, hızlı bir büyümenin işareti olarak OD değerlerinde saptanan artışlar, besin ortamlarına göre çok az farklılık göstermiştir. Bu dönemde, MKEK ve GÖL SUYU'na ait OD değerleri TAP-Kontrol ve N-TAP besi ortamlarına göre ihmal edilebilir derecede olmasına rağmen daha fazladır. Sekizinci günden sonra ortaya çıkan durağan fazı süresinde ise, MKEK ve GÖL SUYU besi ortamlarına ait biyokütlenin diğerlerine oranla fark edilir derecede daha yüksek miktarlara ulaşmış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.1).

Diğer büyüme parametreleri olan Birey Sayısı (adet) ve Chl-*a* µg/L değerlerinin, yine durağan fazın bitimini gösteren 14. güne kadar artan eğilimde, ancak artış hızının log fazında belirgin bir şekilde yüksek olduğu durağan fazda ise nispeten çok düşük olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Besi yerleri arasındaki farklar açısından, log fazı boyunca, (OD değerlerinin aksine) Chl-*a* ve Birey Sayısı, MKEK ve GÖL SUYU besi ortamında diğer besi ortamlarına göre daha düşük değerlerle temsil edilmiştir. Ancak, 8. günden sonra girilen Log fazında, tıpkı OD değerlerinde olduğu gibi MKEK ve GÖL SUYU besi ortamlarında diğerlerine göre fark edilir şekilde daha yüksek değerler

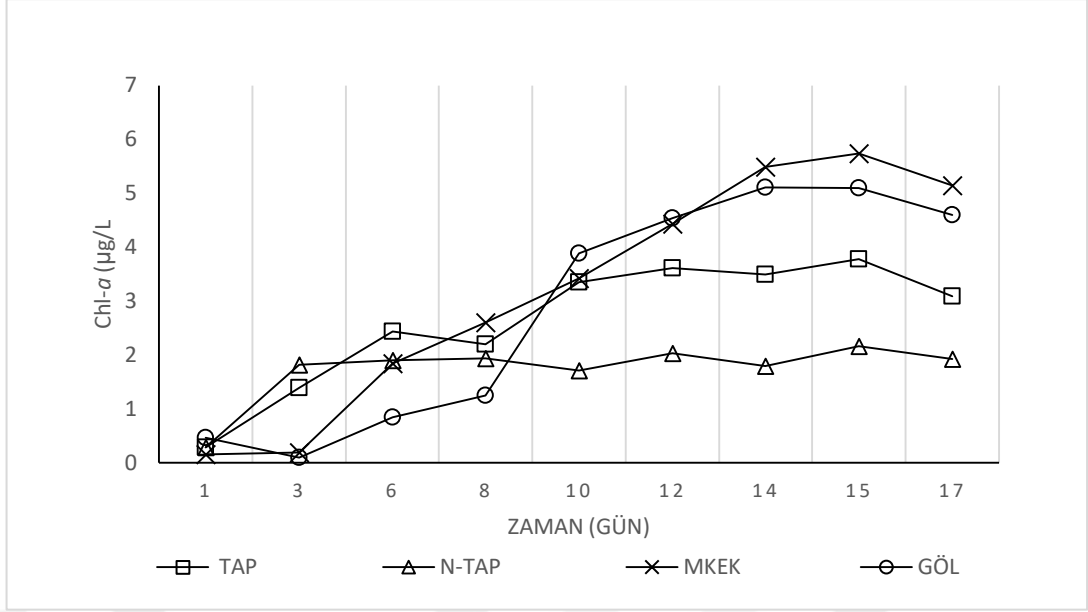
bulunmuştur. Besi ortamları arasındaki bu fark Chl-*a*'da, birey sayısı'na göre çok daha belirgindir.



Şekil 3.1. Farklı besi ortamlarında yetişen *Chlorella vulgaris*'e ait OD değerleri



Şekil 3.2. Farklı besi ortamlarında yetişen *Chlorella vulgaris*'e ait hücre sayımı değerleri



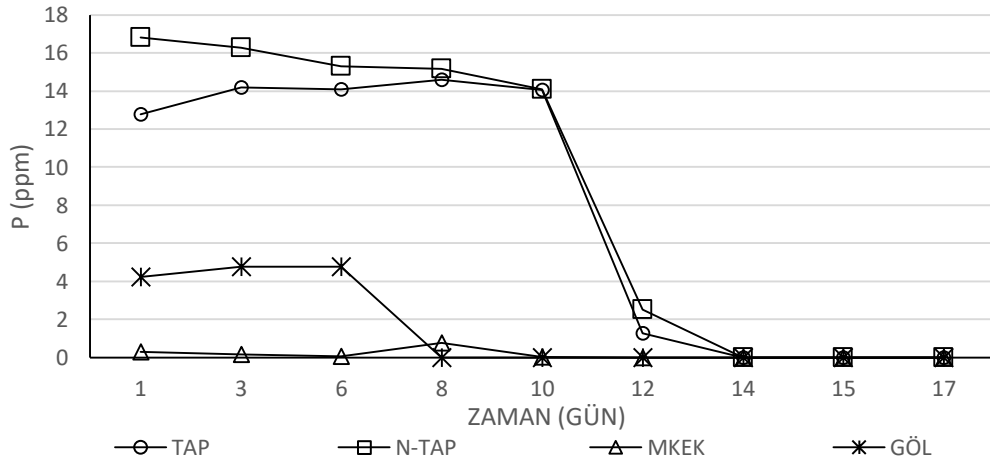
Şekil 3.3. Farklı besi ortamlarında yetişen *Chlorella vulgaris*'e ait Chl-a değerleri

3.2. Besiyesinde Tespit Edilen Anyon (NO_3^{1-} ve HPO_4^{2-}) Miktarları (IC Analizi)

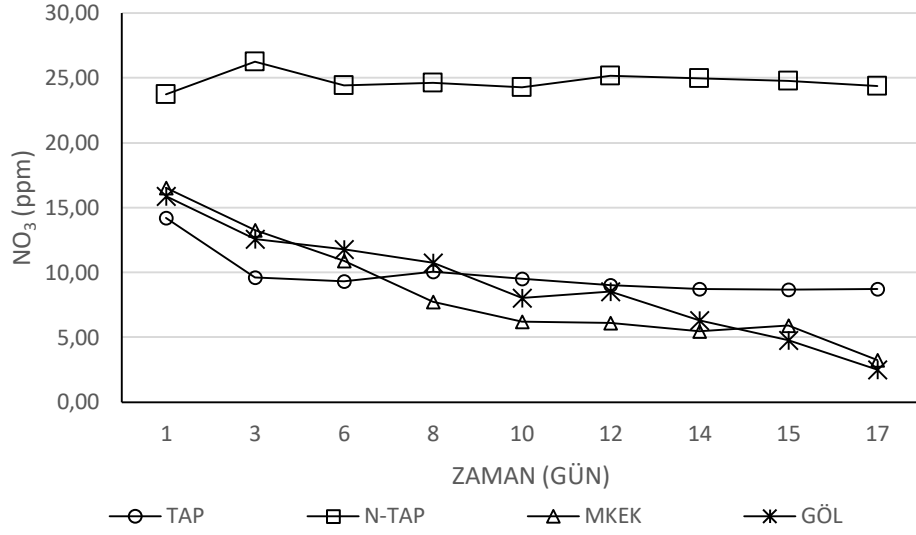
Gün aşırı olarak alınan besiyeri örnekleri üzerinde, iyon kromatografisi kullanılarak yapılan ölçümler, *Chlorella vulgaris*'in fotosentez esnasında kullandığı fosfat (PO_4^{2-}) ve nitrat (NO_3^{1-}) bileşiklerini ortamdan uzaklaştırma kabiliyetini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Tap-Kontrol besi yeri incelendiğinde, ortamdaki besin tuzu derişimlerinin mikroalg büyümesiyle ters bir ilişki içerisinde olduğu doğrulanmıştır. Tipik büyüme eğrilerinde görülen bu durum, özellikle azot ve fosforun gerek miktar ve gerekse birbirlerine olan oranlarıyla belirlenmektedir. Nitekim, TAP-KONTROL besi yerinde azot derişimlerinin, büyümenin başından sonuna kadar tedrici olarak azaldığı görülmüştür. Özellikle 8. güne (lag fazının sonuna) kadar olan bu azalma oldukça belirgindir ve durağan evrede yatay bir seyir izleyerek devam etmiştir. Bu besi yerinde, fosforun başlangıçtaki yüksek derişimleri log fazının sonuna (8.gün) kadar bir azalma göstermemiştir. Bu tarihten sonraki yeni durağan evrede önce yavaş ve sonrasında keskin bir düşüş göstermiştir. Lag evresinde ortofosfat miktarlarında azalma görülmemesi, fotosentetik büyüme esnasında fosfor kullanılmadığı şeklinde yorumlanmamıştır. Bu durumun, sekonder ortofosfat halindeki fosforun ortamdan

alınmış olunabileceği, çalışmada ölçümü yapılan primer ortofosfatların ise bu nedenle sekonder ortofosfat bitinceye kadar azalmadığı şeklinde bir davranış ortaya çıkardığı ihtimali üzerinde daha fazla durulmaktadır. Azot zengini (N-TAP) besi ortamı, kontrol grubu ile benzer şekilde patern ortaya koymuş, ancak farklı olarak lag fazında fosforun nispeten kullanıldığına işaret eden azalmalar sergilemiştir.

MKEK ve GÖL SUYU besi yerlerinde ise, tahmin edildiği üzere, besin tuzu derişimlerindeki değişimler özellikle fosfor açısından nispeten farklı bir senaryo sergilemiştir. İlk olarak, MKEK ve GÖL SUYU besi ortamlarının fosfor başlangıç konsantrasyonları, TAP ve N-TAP besi yerlerine göre oldukça düşüktür. GÖL SUYU besi ortamındaki fosfor değerleri log fazı sonuna kadar yatay bir seyir gösterdikten sonra, 8. günden itibaren (durgunluk fazında) keskin bir düşüş göstermiş ve 10. günden itibaren tamamen tüketilmiştir. En düşük başlangıç konsantrasyonlarına sahip MKEK atık suyunda ise, aynı şekilde durağan faza gelindiğinde ve devamında neredeyse tamamen tüketilmiş olduğu tespit edilmiştir.



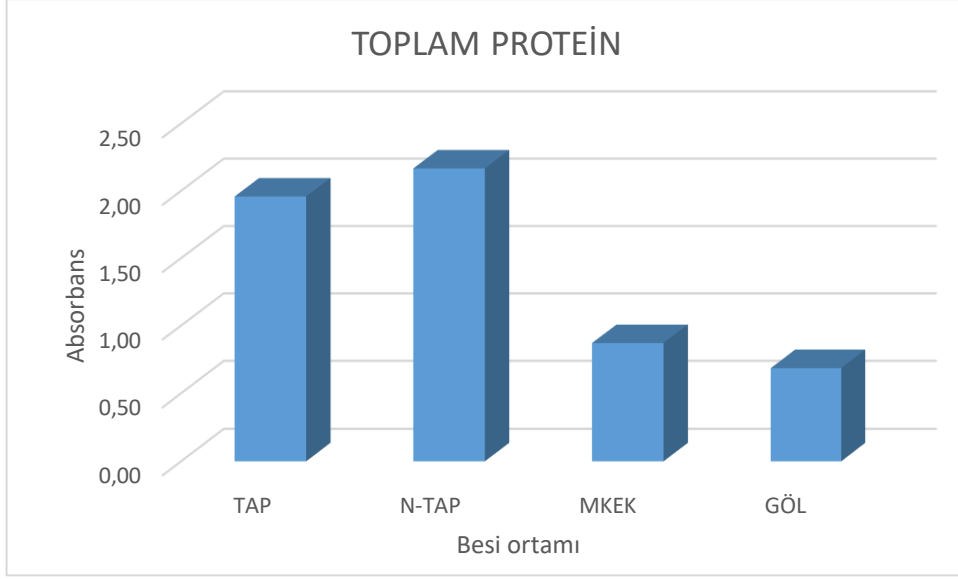
Şekil 3.4. Besi yerindeki Fosfat (P) İyonu Değişimi (IC Analizi)



Şekil 3.5. Besi yerindeki Nitrat (NO_3^-) İyonu Değişimi (IC Analizi)

3.3. Toplam Protein Miktarı

Farklı besi ortamlarında yetiştirilen *Chlorella vulgaris* biyoması, büyümenin düşüş evresine geçmesiyle birlikte hasat edilmiş ve bu son ürünlerde toplam protein miktarları belirlenerek karşılaştırılmıştır. Buna göre, TAP-KONTROL besi yeri ve N-TAP (nitrat eklemeli) besi yerine ait biyokütlede, diğer besi yerlerine göre daha yüksek toplam protein miktarları tespit edilmiştir (Şekil 3.6.). Nitratın toplam protein miktarını etkileyen en önemli faktör olduğu not edilmiştir.

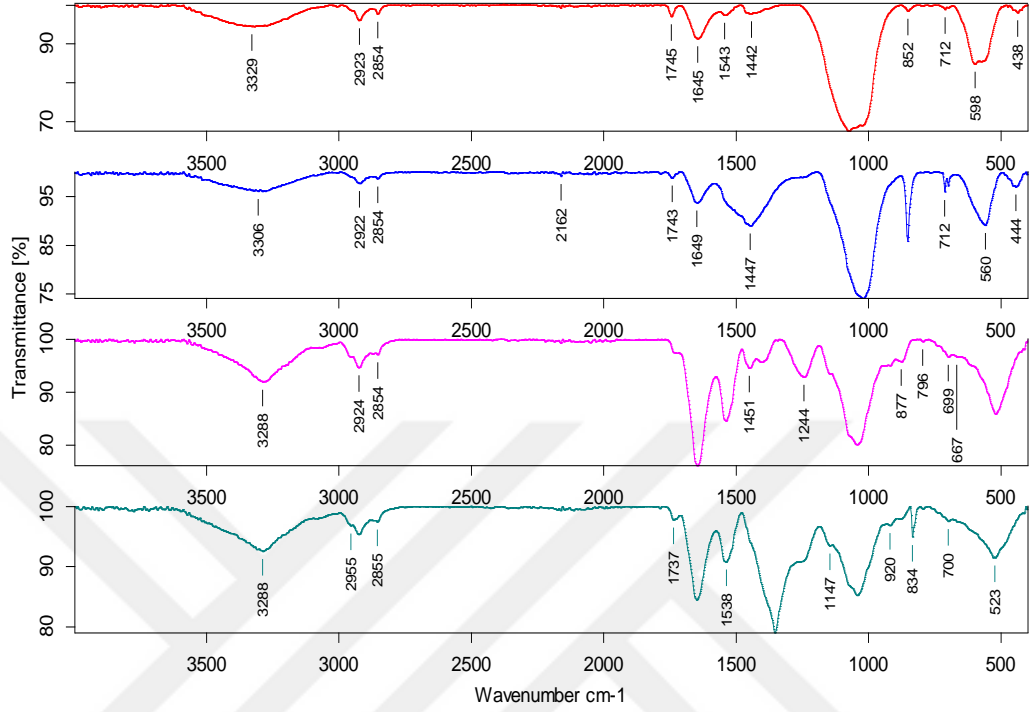


Şekil 3.6. Farklı besi ortamlarında *Chlorella vulgaris*'teki toplam protein miktarı

3.4. *Chlorella vulgaris* Son Ürününde Makromoleküllerin Belirlenmesi (FT-IR Analizi)

Farklı besi yerlerinde büyümesini tamamlayan *C. vulgaris*'in hasat edilen biyomasları içerisindeki makromoleküllerin (Karbohidrat, lipid ve proteinler) teşhisleri ve miktarları FT-IR analizi ile belirlenerek karşılaştırılmıştır. Şematik olarak Şekil 3.7.'de görüldüğü üzere, turuncu renkle gösterilen Kırıkkale MKE'den alınan atık su (MKEK), mavi renkle gösterilen Kırıkkale Üniversitesi gölünden alınan su (GÖL), mor renkle gösterilen kontrol grubu (TAP), yeşil renk ile gösterilen nitrat eklemeli TAP (N-TAP) besi ortamıdır. Titreşim batlarına bakıldığında amid I (C – O germe titreşimleri), amid II (N – H bükülme titreşimleri) titreşim bandları esas alındığında, 1740-1542 cm^{-1} civarında protein bandı, 3015-2854 cm^{-1} civarında lipid (C=O) bandı, 1080 cm^{-1} civarında karbohidrat bandına (C-O germe titreşimleri) işaret etmektedir. FT-IR analiz sonuçları (Şekil 3.7) incelendiğinde; GÖL ve MKEK atık sularında protein miktarının TAP ve N-TAP besi ortamlarına göre daha az olduğu görülmektedir. Bu sonucun, GC-MS analizi ile belirlenen toplam protein miktarlarının farklı besi yerlerinde bulunan sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir. Buna karşılık, farklı besiyerlerindeki karbohidrat miktarlarının MKEK>GÖL

SUYU>TAP>N-TAP olarak bir sıralama gösterdiği tespit edilmiştir. Lipidler için ortaya çıkan sıralama ise GÖL SUYU<MKEK<TAP<N-TAP olarak ortaya çıkmıştır.



Şekil 3.7. *Chlorella vulgaris*'in farklı besi ortamlarındaki makromolekül değişimleri

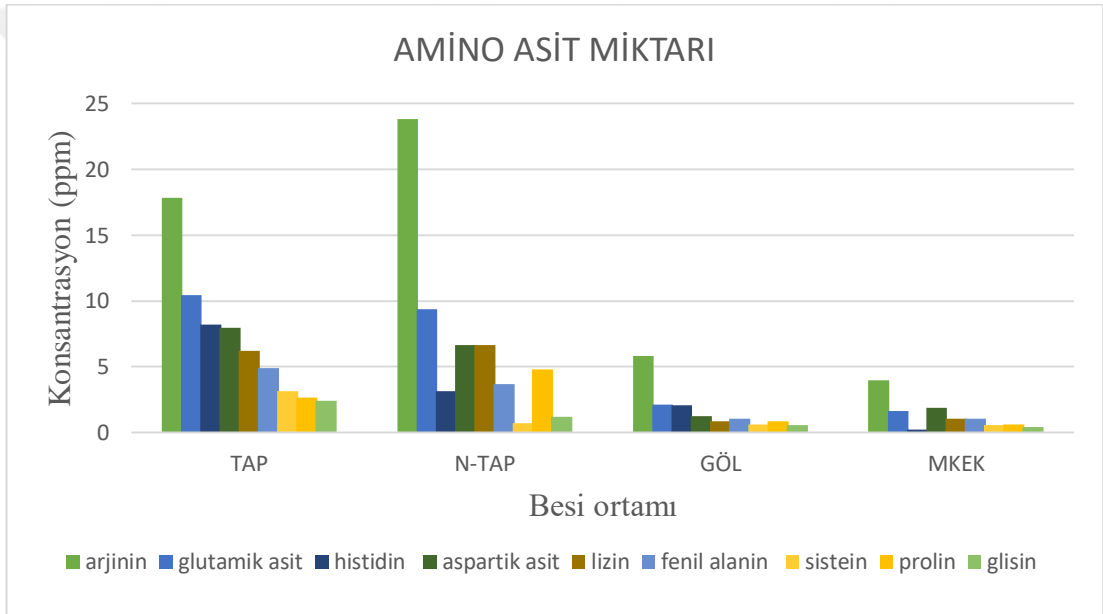
Çizelge 3.1. *Chlorella vulgaris*'in farklı besi ortamlarındaki makromolekül değişimleri sayısal değerleri

Besi ortamı /% Makromolekül	MKEK	GÖL SUYU	TAP	N-TAP
Karbonhidrat	67	74	80	85
Lipid	95	97	93	94
Protein	85	75	92	94

3.5. *Chlorella vulgaris*'te Bulunan Amino Asitlerin Teşhisi (HPLC Analizi)

Hasadı yapılan alg biyomaslarında, HPLC cihazı kullanılarak amino asit kompozisyonu ve miktarları belirlenmiş ve besi yerleri arasında karşılaştırmaları yapılmıştır. *C. vulgaris*'in azot bileşiklerinin daha fazla olduğu TAP ve N-TAP besi

yerlerinde diğerlerine göre daha yüksek olarak bulunan amino asit miktarları, toplam protein miktarları ile uyumluluk göstermektedir. *Chlorella vulgaris*'te arjinin amino asidinin bütün besiyerlerinde en fazla olduğu görülmektedir. Arjinin'in analizi yapılan toplam biyokütle içerisindeki oranları, TAP, N-TAP, GÖL SUYU ve MKEK besi yerlerinde sırasıyla %17.8, %23.8, %5.8 ve %4.0 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1.). Glutamik asit, en bol miktarda bulunan ikinci amino asittir ve TAP N-TAP GÖL SUYU ve MKEK besi ortamlarındaki yüzdeleri azalan bir şekilde sırasıyla %10.4, %9.4, besi ortamında %2.1 ve %1.9 olarak bulunmuştur. Diğer amino asitlerin miktar ve yüzdelerinin besi ortamları arasında dağılımı yine aynı sıralamaya göre ortaya çıkmıştır (Çizelge 3.1.).



Şekil 3.8. Farklı besi ortamlarında yetişen *Chlorella vulgaris*'e ait amino asit miktarı

Çizelge 3.2. *Chlorella vulgaris*'in farklı besi ortamındaki amino asit yüzdeleri

Amino asit türü	Besi Yeri			
	TAP	N-TAP	GÖL	MKEK
Arjinin	17,8	23,8	5,8	4,0
Glutamik asit	10,4	9,4	2,1	1,9
Histidin	8,2	6,6	2,1	1,6
Aspartik asit	7,9	6,6	1,3	1,1
Lizin	6,2	4,8	1,1	1,1
Fenil alanin	4,9	3,7	0,9	0,6
Sitozin	3,2	3,1	0,9	0,6
Prolin	2,7	1,2	0,6	0,4
Glisin	2,4	0,7	0,6	0,3

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, endüstriyel olarak bir çok alanda kullanım potansiyeline sahip olan *Chlorella vulgaris* mikroalg türünün, özellikle gıda ve yem sektörü hedef alınarak amino asit kompozisyonu hakkında ilk bulgular elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, kontrollü şartlarda bir nesil boyunca yetiştirilen alg kümesinin büyümesi süresince ortaya koyduğu davranışlarını besi yeri içeriğiyle ilişkilendirerek hedef moleküllerin (amino asitler) oluşumuna nasıl etki ettiğini inceleme temeline dayandırılmıştır. Başka deyişle, istenen hedef molekülün maksimum üretimi için optimum büyüme şartlarının belirlenmesi temel amaçtır.

Çalışmada elde edilen sonuçlardan ilki, *Chlorella*'nın farklı besi yerlerinde aynı şartlar altında yetiştirilen popülasyonlarının ortaya koyduğu nispeten farklı büyüme eğrileri ve son ürün biyokütlesinin makromoleküller açısından kayda değer farklılıkların ortaya çıkmış olmasıdır. Kontrol grubu olarak adlandırılan TAP besi yeri, mikroalg kültüründe en çok başvurulan ortamlardan birisidir. TAP besi yerinin bu anlamda mikroalg büyümesini destekleyen en ideal besin tuzu karışımına sahip olacağı ve optimum büyümeyi ortaya çıkaracağı beklenir. Ancak, bu çalışmadaki sonuçlar değerlendirildiğinde, MKEK ve GÖL SUYU olarak adlandırılan, sırasıyla, atık su ve doğal su niteliğindeki besi yeri ortamları, TAP besi ortamlarına göre daha yüksek biyokütle değerlerine ulaşılmasını sağlamıştır. Bu sonuç, iki farklı açıdan tartışılması gerekmektedir. Birincisi, her mikroalg üretimi çalışmasında olduğu gibi bu çalışmada da son ürün (biyokütle) verimliliği çok önemli olmakla birlikte, büyümenin en başından son ürüne gelinceye kadar bütün aşamalarda üretimi istenen makromolekül (Karbohidrat, Protein, Lipit, Karotenoit vs.) değişimleri ve bunların optimum noktadaki miktarlarının hedeflenen ürün eldesindeki verimliliğe ulaşma açısından da aynı öneme sahiptir. Nitekim, bu çalışmanın sonuçlarına göre, MKEK ve GÖL SUYU besin ortamları TAP ve azot ile zenginleştirilmiş N-TAP besi yerlerine göre daha yüksek biyokütle üretmiş olmalarına rağmen, daha düşük miktarlarda protein içeriğine sahiptir. Her besi yerindeki alg kültürleri, son aşamaya gelinceye değin, moleküller arasında yoğun değişimler yaşamış olabileceği düşünüldüğünde, son ürünlerdeki makromolekül dağılımı, hedef molekül üretimindeki verimliliği açıklayabilmek için yeterli olmayabilir. Başka deyişle, büyümenin herhangi bir aşamasında protein miktarı

MKEK, GÖL SUYU besi yeri ortamlarında diğerlerine göre daha yüksek olmuş olabilir. Bu nedenle, teknik yetersizlikler nedeniyle ölçülemeyen, büyümenin her evresindeki makromoleküllerin miktar ve değişiklikleri bu çalışmadaki eksikliklerden biri olarak not edilmelidir. Literatürdeki çok sayıda araştırma, mikroalg kültür ortamında bulunan besin tuzlarının (özellikle N ve P) miktar ve değişimlerini alg biyokütlesinin büyüme esnasındaki biyokimyasal dönüşmelerle birlikte değerlendirmektedir (Lai vd., 2011; Kamalanathan vd., 2015; Arora vd.,2016; Santhakumaran vd., 2020).

Bu çalışmada, alg büyümesine ilişkin sonuçlar incelendiğinde, her bir besiyerinde tipik mikroorganizma büyüme eğrisinin oluştuğu görülmektedir. OD, Chl-*a* ve hücre birey sayıları ile takip edilen büyümede, gecikme (lag), hızlı büyüme (Log fazı) ve durağan evreleri ayrt edilir bir şekilde ortaya çıkmıştır. Ancak, her bir evredeki alg biyoması veya spesifik büyümesi seçilen besi yerine göre farklılık göstermiştir. Bu farklılıkların, her bir ortamın besin tuzu başlangıç miktarlarına ve kompozisyonuna bağlı olarak ortaya çıktığı genel bir kural olarak kabul edilmelidir (Saito vd., 2008). Nitekim, büyümenin ortam kompozisyonuna ve miktarına bağlı olduğu, mikroalg kültürasyonu kullanarak yapılan diğer çalışmalarda da doğrudan veya dolaylı olarak ifade edilmiştir (Ajala ve Alexander, 2020). Ancak, bu çalışmada, lag evresi boyunca olan hızlı büyüme esnasında besin tuzlarından azotun besi yeri konsantrasyonları tedrici olarak azalmasına rağmen, büyümede kullanılan diğer temel element olan fosforun azalmayıp yatay şekilde değerler göstermesi enteresandır. Lag evresinde ortofosfat miktarlarında azalma görülmemesi, fotosentetik büyüme esnasında fosfor kullanılmadığı şeklinde yorumlanmamıştır. Bu durumun, sekonder ortofosfat halindeki fosforun ortamdan alınmış olunabileceği, çalışmada ölçümü yapılan primer ortofosfatların ise bu nedenle sekonder ortofosfat bitinceye kadar azalmadığı şeklinde bir davranış ortaya çıkardığı ihtimali üzerinde daha fazla durulmaktadır (Solovchenko vd., 2016). Besi yerinde bulunan fosfatın alg bireyleri tarafından alınması karmaşık bir dinamiğe sahiptir. Bu konudaki en önemli faktörlerden birisi, fosfatın ortamdaki türüdür. Ortofosfatın HPO_4^{2-} veya $H_2PO_4^-$ şeklindeki serbest bileşikleri fotosentezde kullanılan formlarıdır. Her ikisi arasındaki dinamik ve sürekli kimyasal dönüşümleri kültür ortamlarında da gerçekleşir ve bu değişimde en önemli kontrol edici faktör pH olarak ifade edilmiştir. Düşük pH'larda $H_2PO_4^-$ formu dominanttır (Ullrich-Eberius, 1973). Çalışmamızda, *Chlorella*'nın bütün besi ortamlarında tespit edilen lag fazındaki büyüme esnasında,

ortamdaki dominant fosfor türünün $H_2PO_4^-$ olma ihtimali yüksektir. Ortamın pH ölçümleri gerçekleştirilmemiş olmasına rağmen, büyümenin başındaki pH genellikle daha düşüktür ve biyomas artışıyla birlikte ortamdaki karbon miktarının artmasıyla artar. Durgunluk fazına gelindiğinde ise $H_2PO_4^-$ tüketildiğinden alg hücrelerinin HPO_4^{2-} türünü tüketmeye başladığı düşünülebilir. Fosforun alg hücreleri tarafından alınmasını etkileyen diğer bir faktör de, besi yeri ortamında bulunan fosfor başlangıç konsantrasyonunun çok yüksek olmasıdır. Özellikle, alg bireylerinin fosforca zengin kültüre alınmadan önce fosfor açlığı seviyesine göre fosfor alımını fizyolojik olarak yavaşlattığı söylenmiştir (Cembella vd., 1984). Hangi faktörün fosfor alınma dinamiklerinde baskın olduğunun anlaşılabilmesinin daha detaylı bir çalışma ile mümkün olabileceği ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmaya temel teşkil eden konulardan birisi de alg büyümesinde atık su kullanımının verimliliğinin incelenmesidir. Bu amaçla kültür ortamlarındaki mikroalgin büyümesi ve besin tuzları arasındaki ilişkiye ait elde edilen bulgular, diğer bir konu hakkında da yorum yapılabilmesine olanak sunmuştur. Mikroalg büyümesine ait denemelerde kullanılan atık sulardaki fosfor ve azot, büyümenin durgunluk evresinde tamamen ortamdan uzaklaştırılmış olup, atık su arıtımında alglerin kullanılabilmesi sonucuna ilişkin önemli işaretler ortaya çıkarmıştır. Atık sular, genellikle azot ve fosfor elementlerince zengindir ve doğaya bırakıldığında ötrofikasyon gibi çok önemli bir probleme yol açmaktadır. Bu nedenle arıtılması gereklidir ki, arıtımın da önemli bir maliyeti beraberinde getirdiği bilinmektedir. O halde, çalışmamızda kullanılan *Chlorella vulgaris*'in gıda amaçlı kullanımını hedeflenerek yapılması muhtemel bir üretim faaliyeti sırasında arıtım amaçlı da kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceği söylenebilir. Nitekim, dünya üzerinde hem araştırma hem de uygulama ölçeğinde başarılı sonuçların alındığı bu tür çalışmaların sayısı oldukça fazladır ve artan bir ilgiye de sahiptir (Delgadillo-Mirqueza vd., 2016; Monfet vd., 2017; Brar vd., 2019; Abdul Hamid vd., 2019).

Bu çalışmada elde edilen bulgulardan bir diğeri ise, büyüme sonunda ortaya çıkan protein ve amino asit miktarlarının besi yerleri arasında farklılık göstermesidir. Özet olarak, daha yüksek biyokütle oranlarının elde edildiği MKEK atık suyu ve GÖL SUYU ortamlarında daha düşük miktarlarda protein ve amino asit olduğu belirlenmiştir. Ortamdaki N ve P besin element değişimlerine göre üç temel makromolekülün birbirlerine dönüşümleri ve dolayısıyla büyümenin evreleri boyunca

salınımlarının da değiştiği bilinmektedir (Cheng vd., 2014). Mikroalglerin biyodizel amaçlı azot açlığına maruz bırakıldıklarında lipid miktarlarını artırdıkları birçok çalışmada elde edilen yaygın sonuçlardan birisidir (Vassilev ve Vassileva, 2016). Bizim çalışmamızda, lipid miktarları kültür evrelerinin tamamında değil sadece deney sonlandırıldığında FT-IR analiziyle ölçölmüş ve sadece besi ortamları arasındaki makromoleküllerin farklılıkları ortaya konulabilmiştir. Buna göre, bütün besi yeri ortamlarında son durgunluk evresinde, azot, ortamda tüketilerek azaltılmış ve hücreler azot açlığına maruz kalmış olmasına rağmen, MKEK ve GÖL SUYU besi ortamının daha fazla lipid moleküllerine sahip oldukları görölmüştür. Bu durumun, diğer ortam şartları aynı olmasına rağmen, besi yerlerinin azot (ve de fosfor) elementi başlangıç konsantrasyonlarına bağlı olduğu düşünölmektedir. Cheng ve ark. (2016) yaptıkları araştırmada, başlangıç konsantrasyonları daha fazla olan alg kümelerinin lipid miktarlarındaki artışın çok daha düşük olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılara göre, azot açlığına maruz kaldıktan sonra mikroalglerin metabolik enerji açığı diğer karbon içeren bileşiklerin lipitlere dönüştürölmesiyle sonuçlanırken, başlangıç azot konsantrasyonu yüksek olduğunda bu dönüşüme daha az ihtiyaç duyulmakta ve bu da nispeten daha düşük lipid miktarlarıyla sonuçlanmaktadır. Benzer sonuçlar diğer bazı araştırmacılar tarafından da tespit edilmiştir (Klok vd., 2013; Li vd., 2011). Diğer karbon kaynağı olarak ortamdaki karbohidratların, dönüşümde daha az kullanılmasına bağlı olarak da, MKEK ve GÖL SUYU besi yerindeki miktarları daha fazla bulunmuştur. *C. vulgaris*'deki toplam protein miktarı değerlendirildiğinde ise; kontrol (TAP) ve nitrat eklemeli (N-TAP) gruplarının toplam protein miktarları, beklenildiği gibi, diğer besiyerlerine göre daha fazladır. Bu durum NO₃ bakımından zengin besi yeri ortamlarının daha yüksek protein oluşumundan sorumlu olduğunu göstermektedir. GÖL SUYU ve MKEK ortamlarında NO₃ ve P'nin alg hücreleri tarafından daha yoğun kullanılıp tüketilmesine ve biyokötle olarak daha fazla artışlar ortaya çıkarmış olmasına rağmen, makromoleküller arasındaki miktarsal dağılımda (ortamdaki başka elementlerin bulunuşu da dahil) diğer bazı faktörlerin etkili olacağını göstermiştir (Şekil 3.6). Bu çalışmada kullanılan *Chlorella vulgaris*'e ait toplam amino asit miktarlarının yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında kantitatif olarak daha fazla olduğu görölmüştür (Richmond, 2004; Becker, 1994).

Hasadı yapılan alglerden, HPLC cihazında amino asit kompozisyonu ölçümü yapılmıştır (Şekil 3.8). Sonuçlara değerlendirildiğinde *Chlorella vulgaris*'te arjinin amino asidinin bütün besiyerlerinde en fazla olduğu görülmüştür (Xie vd., 2017). Heterotrofik mikroalg örneklerinde en bol bulunan amino asit olan arjinin nitrik oksidin öncüsü ve antiaterojenik özelliklere sahip önemli bir vazodilatör olarak önemlidir (Taboada ve ark., 2010). Tüm besi ortamlarında en fazla miktar arjinine aittir. TAP besi ortamı %17,8, N-TAP besi ortamında %23,8. GÖL besi ortamında %5,8, MKEK besi ortamında %4,0'dır. Lezzet hissini ana bileşeni olan glutamik asit, en bol miktarda bulunan ikinci amino asittir (Bocanegra vd., 2009). TAP besi ortamında %10,4, N-TAP besi ortamında %9,4, GÖL besi ortamında %2,1'dir. Yüksek glutamik ve aspartik asit seviyeleri deniz yosunu ürünlerinin karakteristik özel aroma özelliklerinden sorumludur (Bocanegra vd., 2009), MKEK besi ortamında da glutamik asit (%1,6) ve aspartik asit (%1,9) %1,5-2,0 arasındadır. N-TAP ve MKEK besi ortamlarında histidin miktarında GÖL ve TAP besi ortamlarına bakıldığında çok az miktarda olduğu gözlenmiştir. N-TAP ve GÖL besi ortamında %0-3,5 arasında iken GÖL ve TAP besi ortamında %2-8,5 arasında seyrettiği gözlemlenmiştir. Tüm besi ortamlarında glisin en az yüzde de gözlemlenmiştir. Glisin değeri %0,1-2,5 arasında seyretmektedir.

SONUÇ:

1. Yerel olarak izole edilen *Chlorella vulgaris* türüne ait protein ve amino asit değerleri literatürde aynı türün farklı suşları için elde edilen sonuçlarla rekabet edebilecek düzeydedir ve üretim verimliliği potansiyeline sahiptir.
2. Denemesi yapılan atık su ve doğal göl sularının biyokütle açısından daha yüksek verimliliğe sahip olduğu ortaya çıkmaktadır
3. Ancak, hedef makromolekül olan protein ve amino asitler açısından düşük değerler sergilemişlerdir. Bu durum, denemesi yapılan bu iki besi ortamının N ve P içerikleriyle yakından ilişkili olduğu düşünülmüştür.
4. Gerek P ve N, gerekse diğer elementlerin optimizasyonu neticesinde hedef moleküllerin artışı sağlayacak araştırmaların planlanması ihtiyacı ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdul Hamid, N., Lim, S., Evaluation of processing route alternatives for accessing the integration of algae-based biorefinery with palm oil mill. *Journal of Cleaner Production*. 212: 1282-1299, 2019.
- Ajala, A., Assessment of *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Oocystis minuta* for removal of sulfate, nitrate, and phosphate in wastewater. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*. 11, 311–326, 2020.
- Ak İ., Sucul Ortamın Ekonomik Bitkileri; Makro Algler (in Turkish). *Dünya Gıda Dergisi* 12(December 2015): 88–97, 2015.
- Angell, R., Seaweeds as an Alternative Crop for the Production of Protein. PhD Thesis. James Cook University. Chapter 1, 2016.
- Anonymous^a., Directorate-General for Research and Innovation (European Commission)A bioeconomy for Europe Innovating for Sustainable Growth, A Bioeconomy for Europe. Isbn 978-92-79-25376-8., pp.64., 2012.
- Anonymous^b., Camia, N., Jonsson, R., S.G., R.L., Van der Velde, T., P.G., Mubarek, T., Fiore, H., Dos Santos Fernandes de Araujo, L., Giuntoli J., Biomass production, supply, uses and flows in the European Union: First results from an integrated assessment. (Eds.). European Commissions. JRC Science for Policy Report. Publications Office of the European Union. 978-92-79-77237-5, 2018.
- Anonymous^c., Position paper on Bioeconomy Strategy and Action Plan Review and Revision. Document date: 14/08/2017 - Created by GROW.DDG1.D.1 Pp 13,

2017. Link: <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/25042>. (Erişim tarihi: 15.07.2020).

Arora, N., Patel, A.P., Pruthi A., Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 213 79–87, 2016.

Becker E.W., Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 25 207–2,2007.

Becker E.W., *Microalgae-Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

Bleakly, H., Algal Proteins: Extraction, Application and Challenges Concerning Production. A Review. *Foods*. 6(5), 33;, 2017.

Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Ródenas, S., Sánchez-Muniz, F.J., Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J. Med. Food*. 12. 236–258, 2009.

Bock, K., Pröschold T., Pröschold, Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*) using molecular signatures (barcodes). including description of seven new species. *Fottea* 11(2): 293–312, 2011.

Brar, M., Pareek N., Comparative Appraisal of Biomass Production, Remediation, and Bioenergy Generation Potential of Microalgae in Dairy. Wastewater. *Front. Microbiol*. 10:678, 2019.

Cembella, J.A., Harrison P.J., The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part I. *Crit Rev Microbiol*. 10:317–91, 1984.

- Cheng, H., Huang, L.K., R, Junhu, C., Enhancing growth rate and lipid yield of Chlorella with nuclear irradiation under high salt and CO₂ stress. *Bioresource Technology*. 203: 220–227, 2016.
- Cheng, J., Huang, R., Li, T., Zhou, J., Cen, K., Biodiesel from wet microalgae: Extraction with hexane after the microwave-assisted transesterification of lipids. *Bioresource Technology*. 170: 69–75, 2014.
- Clemens, S., *Microalgae Biotechnology*. 19-188. Springer, Switzerland, 2016.
- Delgadillo-Mirqueza, F., Taidi, P., Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*. 11, 18–26, 2016.
- Demiralp, İ., Peker, A., *Temel Proteomik Stratejiler*. Ankara Üniversitesi Yayinevi. 978-605-136-148-2, 2014.
- Doshi, A., Pascoe, S., Coglean, L., Rainey, T., Economic and policy issues in the production of algae-based biofuels: a review. *Renewable and Sustainable Energy. Reviews*. 64: 329–337, 2016.
- Fleurence, J., Levine I., *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Chapter 4. Academic Press Publication. London, 2016.
- Jeffrey, F.H., New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in Higher Plants. *Algae and Natural Phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen (BBP)*. 167, S. 191-194, 1975.
- Kaba, Ç., Deniz Alglerinin İnsan Beslenmesinde Kullanılması. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*. 23(1/2): 243–46, 2006.

- Kamalanathan, M., Pierangelini, M., Shearman, L.A., Gleadow, R., Beardall, J., Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol*, 28: 1509-1520, 2015.
- Klok, A.J., Martens, D.E., Wijffels, R.H., Lamers, P.P., Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. *Bioresour. Technology*. 134. 233–243, 2013.
- Lai, J., Yu, Z., Song, X., Cao, X., Han, X., Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 405. 6–17, 2011.
- Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., Hu, Q., Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresour. Technology*. 102. 123–129, 2011.
- López, C.G., Fernández, S.B., Chisti, F.S., Protein Measurements of Microalgal and Cyanobacterial Biomass. *Bioresource Technology*. 101(19): 7587–91, 2010.
- Lu, Z., Min, M., Ma, C., Zheng, T.T.D., Liu, C., Urriola, C.S., Ruan R., Mitigating Ammonia Nitrogen Deficiency in Dairy Wastewaters for Algae Cultivation. *Bioresource Technology*. 201: 33–40, 2016.
- Md. Asraful, A., Alam, J.L., Xu, W., Zhongming, Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products. Chapter 13, China, 2020.
- Monfét, E., Unc, A., Defining Wastewaters Used for Cultivation of Algae. *Algal Research*. 24: 520–26, 2017.
- Otten, P.H., Meyers L.D., Dietary Reference Intakes The Essential Guide to Nutrient Requirements. 144-156..Institute of Medicine of The National Academies. Washington,D.C., 2006.

- Pena, S., Biofuels for Transportation. CDM Investment Newsletter. 3/2007. A Joint Initiative of BEA International and Climate Business Network, 2007.
- Pistorius, A.A., DeGrip, E.Z., Monitoring of Biomass Composition from Microbiological Sources by Means of FT-IR Spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*. 103(1): 123–29, 2009.
- Reisser W., The taxonomy of green algae endosymbiotic in ciliates and a sponge. *British Phycological Journal*. 19: 309-318, 1984.
- Richmond A., *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004.
- Saito, J.G., Ritt J.T., Some thoughts on the concept of colimitation: three definitions and the importance of bioavailability. *Limnol Oceanogr*. 53:276, 2008.
- Santhakumaran, K., Mathew, J.G., Ray L., Experimental evaluation of the culture parameters for optimum yield of lipids and other nutraceutically valuable compounds in *Chloroidium saccharophilum* (Kruger) comb. Nov. 1082-1097. *Renewable Energy*, 2020.
- Şen, K., Alp, S., Yıldırım V., *Alglerin Atık Su Arıtımında Kullanılması. XII. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Eylül 2004, Elazığ, s. 98-105, 2003.*
- Solovchenko, M.V., Jablonowski, N., Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. *Biotechnology Advances*. 34,(5): 550-564, 2016.
- Taboada, C., Millán, R., Míguez, I., Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *J. Sci. Food Agric*. 90: 445–449, 2010.

Tsai, D.W., Chen, P.H., Ramaraj, R., The potential of carbon dioxide capture and sequestration with algae. *Ecological engineering*. 98: 17-23, 2017.

Ullrich-Eberius C., Nitrat, Nitrit und Phosphat zur 1250 photosynthetischen Reduktion von Nitrat und Nitrit und zum ATP-Spiegel bei *Ankistrodesmus braunii*., *Planta*, 115: 25–36, 1973.

Vassilev, G.V., Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application. An overview. *Fuel*. 181:1–33, 2016.

Xie, X., Zeng Y., L., Zhang, Nitrate Concentration-Shift Cultivation to Enhance Protein Content of Heterotrophic Microalga *Chlorella Vulgaris*: Over-Compensation Strategy. *Bioresource Technology*. 233: 247–255, 2017.

Yada R.Y., *Proteins in Food Processing*. Second edition. Woodhead Publishing. 245-259, 2019.