

T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Scenedesmus regularis ve *Scenedesmus obliquus* Alg Türlerinde
Azota Bağlı Lipit İçeriğindeki Değişimlerin İncelenmesi

Gizem ÖZALIN

OCAK 2020

Biyoloji Anabilim Dalında Gizem ÖZALIN tarafından hazırlanan “*SCENEDESMUS REGULARIS VE SCENEDESMUS OBLIQUUS* ALG TÜRLERİNDE AZOTA BAĞLI LİPİT İÇERİĞİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ” adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Aysun ERGENE
Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Seyhan AKISKA

Üye (Danışman): Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Üye : Prof. Dr. Yusuf MENEMEN

/01/2020

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

Prof. Dr. Recep ÇALIN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

SCENEDESMUS REGULARIS ve SCENEDESMUS OBLIQUUS ALG TÜRLERİNDE AZOTA BAĞLI LİPİT İÇERİĞİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

ÖZALIN, Gizem

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Ocak 2020, 69 sayfa

Bu çalışma, model organizma olarak seçilen *Scenedesmus regularis* ve *Scenedesmus obliquus* mikroalg türlerinin, azot elementinin farklı konsantrasyonlarıyla hazırlanmış BBM (Basal Bold Medium) besiyerindeki 20 günlük inkübasyonları süresince, biyodizel hammaddesi olan nötral lipid değişikliklerinin izlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda; hücre büyümesi (biyomas), nötral lipid ve TAG (Triaçilgliserit) ölçümleri gerçekleştirilerek türlerin biyoyakıt potansiyelleri hakkında değerlendirmeler yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, *Scenedesmus regularis* ve *Scenedesmus obliquus* türlerinin her birinde azot açlığı ve azot tokluğu uygulamalarının büyüme üzerinde stres faktörü olduğu belirlenmiştir. Büyüme, her iki türde de kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde düşük bulunmuştur. Büyümedeki azalma azot açlığı uygulanan grupta daha belirgin iken azot tokluğu uygulanan grupta da büyümenin az miktarda baskılandığı gözlemlenmiştir.

Alg türlerinin yağ asidi profilleri, büyüme durağan faza geçtiğinde inkübasyonun sonlandırılması ve elde edilen alg biyomasının Gaz

Kromatografisi (GC) analizi ile belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre, azot açlığı ve azot tokluğu gruplarında SFA ve MUFA miktarları yüksek iken PUFA miktarları ise daha düşüktür. Her iki türün tüm manüplasyon gruplarında, SFA, MUFA ve PUFA değerleri, Avrupa birliği EN 14214 standartlarını karşılayacak aralıkta bulunmuştur.

Scenedesmus regularis'de SFA ve MUFA oranı toplamı kontrol grubunda yaklaşık %90,62 iken açlık grubunda %98,77, tokluk grubunda ise %95,51, *Scenedesmus obliquus*'ta ise kontrol grubunda %100 iken açlık grubunda %97,38 ve tokluk grubunda %95,69 olarak bulunmuştur.

FTIR analizleri sonucunda, azot açlığına cevap olarak mikroalglerin TAG miktarlarında önemli artışlar olduğu, azot tokluğunda ise kontrol ile yaklaşık değerlerde TAG miktarı gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan her iki türünde azot açlığı grubunda TAG miktarını karbohidrat ve protein gibi makro bileşiklere dönüştürmek suretiyle depolama yoluna gittiği sonucuna varılmıştır.

Flow ve Floresans cihazları ile mikroalglerin nötral yağ miktarları ve değişimleri gözlemlenmiştir. Nil-red ile nötral yağlar boyanarak yapılan ölçümler ışığında *Scenedesmus regularis* türünün nötral lipid miktarı kontrolde %27,2, açlık grubunda %77,4 ve tokluk grubunda %32,2 iken, *Scenedesmus obliquus* türünün nötral lipid miktarı kontrolde %10,4, açlık grubunda %44,1, tokluk grubunda %3 olarak saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyodisel, Mikroalg, *Scenedesmus regularis*, *Scenedesmus obliquus*, Yağ asitleri, Triaçilgliserol, Azot açlığı

Abstract

N-DEPENDENT LIPID VARIATIONS IN MICROALG SPECIES, *SCENEDESMUS REGULARIS* AND *SCENEDESMUS OBLIQUUS*

ÖZALIN, Gizem

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master's thesis

Supervisor: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

January, 69 Pages

In this thesis, changes on neutral lipids of microalgal species, *Scenedesmus regularis* and *Scenedesmus obliquus*, selected as model organisms for biodiesel feedstock, were aimed to be monitored within a 20 days of incubation period performed under different nitrogen concentrations of Basal Bold Medium (BBM). Within this scope, biomass, neutral lipids and Triacylglycerol measurements were carried out to evaluate the biofuel potentials of each species.

Our results revealed that a *priori* set for both N-starvation and N-enrichment were stress factors was confirmed; the growth was found to be markedly lower in N-manipulated groups compared to control. Decline on growth was pronounced much more in N-starved group than that in N-enriched group.

GC analysis was used to determine the fatty acid profiles of microalgal species, using the biomasses harvested at the stationary phase that was being the end of the incubation period. While the total amounts SFA and MUFA increased, the amount of PUFA decreased on manipulated groups

compared to control. The ratios of SFA, MUFA and PUFA recorded during the study met the requirements for biodiesel production validated by the European Union standards (EN 14214) for both species.

In *Scenedesmus regularis*, the total of SFA and MUFA 90,62% in control group, 98,77% in N-starved and 95,51% in N-enriched group. Corresponding values for *Scenedesmus obliquus* were found to be 100%, 97,38% and 95,69%, respectively.

FTIR analysis revealed that both microalg species responded to the N-starved conditions as to increase their TAG contents whereas N-enriched conditions resulted in TAG contents closely similar to the control group. The conversion of carbohydrates and proteins to the lipids during starvation was suggested to be the cause in lipid increments.

Both fluorescence spectrophotometry and flow cytometry were applied to determine changes in neutral lipids of microalg cells dyed with Nile red. In *Scenedesmus regularis*, the ratios of neutral lipids were found to be 27,2%, 77,4%, 32,2% in control, N-starved and N-enriched groups, respectively. Corresponding values for *Scenedesmus obliquus* were 10,4%, 44,1%, 3%, respectively.

Anahtar Kelimeler: Biodiesel, Microalgae, *Scenedesmus regularis*, *Scenedesmus obliquus*, FAMES, Triacylglycerol, N-starvation

İçindekiler

ÖZET	i
Abstract	iii
1.GİRİŞ	1
1.1. Alglerin Genel Özellikleri	1
1.1.1 Morfoloji ve Yaşam Döngüsü	2
1.1.2 Habitat.....	3
1.1.3. Algal Üretim Sistemleri.....	4
1.2. Alglerin Ekonomik ve Ekolojik Önemi	7
1.2.1. Alglerden Elde Edilen Ürünler	8
1.2.2. Lipidler	14
1.3. Mikroalglerin Büyümesi Üzerine Etkili Olan Faktörler.....	17
1.3.1. Işık.....	18
1.3.2. Sıcaklık.....	19
1.3.3. pH.....	20
1.3.4. Tuzluluk.....	20
1.3.5.Besin elementleri.....	20
1.4. Çalışmanın Amacı	23
2. MATERYAL ve YÖNTEM	24
2.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	24
2.2. Kültür Ortamları	25
2.2.1. Element manipülasyonu için besin ortamının hazırlanması... 25	
2.2.2. Ekim için hücre sayımı	26
2.3. Kültür üretim sistemi (Fotobiyoreaktör).....	26

2.4. Stok Kültür Hazırlanması.....	28
2.5. Türlerin Hasat İşlemi	29
2.6. Toplam nötral lipid tayini.....	30
2.7. FTIR analizi	30
2.8. FAMES analizi	31
2.9. Flow Sitometri analizi	32
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	33
3.1. Türlerin Optik yoğunluk (OD) miktarındaki değişim	33
3.2. Nötral lipid içeriğinde meydana gelen değişimler	36
3.2.1. Floresans spektroskopi cihazı ile elde edilen nötral lipid bulguları	36
3.2.2. Flow sitometri cihazı ile elde edilen nötral lipid bulguları.....	37
3.3. Yağ asidi profilinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi .	40
3.4. Alglerdeki organik bileşiklerin FTIR spektroskopisi ile izlenmesi	44
4. KAYNAKLAR.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

Çizelge 1.1. Alglerin ticari uygulamaları	13
Çizelge 1.2.Lipitlerin sınıflandırılması	14
Çizelge 1.3. Bold's Basal Medium.....	25
Çizelge 3.1. S.regularis ve S.obliquus türlerinin FAMEs içeriklerinde meydana gelen miktarsal değişimler.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

SEKİL

Sayfa

Şekil 1.1. a) Açık havuz üretim sistemi, b) kanallı havuz üretim sistemi, c) kaskatlı havuz üretim sistemi.	5
Şekil 1.2. a) Plastik torba üretim sistemi, b) Biocoil üretim sistemi, c) Düz levha üretim sistemi, d) Tübüler üretim sistemi.	7
Şekil 2.1. Kültürlerde kullanılan fotobiyoreaktör fotoğrafı	27
Şekil 2.3. İklim kabinindeki fotobiyoreaktörlerde alg üretimi.....	28
Şekil 2.4. Deneylerde kullanılan aşu kültür örnekleri.....	29
Şekil 3.1. <i>S.regularis</i> ve <i>S.obliquus</i> türlerinin 20 günlük OD grafiği	34
Şekil 3.5. <i>S.obliquus</i> 'a ait kontrol, azot açlığı ve tokluğu büyüme grafiği .	35
Şekil 3.3. <i>S.regularis</i> 'e ait kontrol, azot açlığı ve tokluğu büyüme grafiği ..	35
Şekil 3.4. <i>S.obliquus</i> ve <i>S.regularis</i> türlerinin kontrol, azot açlığı ve azot tokluğu gruplarına ait nötral lipid miktarları	37
Şekil.3.5. <i>S.regularis</i> kontrol, azot açlığı ve azot tokluğu gruplarına ait nötral lipid flow sitometri kromatogramı.....	38
Şekil 3.6. <i>S.obliquus</i> kontrol, azot açlığı, azot tokluğu gruplarına ait nötral lipid flow sitometri kromatogramı.....	39
Şekil 3.7. <i>S.regularis</i> ve <i>S.obliquus</i> türlerinin kontrol, azot açlığı ve azot tokluğu gruplarındaki MUFA, PUFA, SFA miktarları	43
Şekil 3.8. <i>S.regularis</i> kontrol grubuna ait FTIR spektrumu.....	44
Şekil 3.9. <i>S.regularis</i> azot açlığı uygulanan gruba ait FTIR spektrumu.....	45
Şekil 3.10. <i>S.regularis</i> azot yüklemesi yapılan gruba ait FTIR spektrumu	45
Şekil 3.11. <i>S.obliquus</i> kontrol grubuna ait FTIR spektrumu	46
Şekil 3.12. <i>S.obliquus</i> azot açlığına ait FTIR spektrumu.....	46
Şekil 3.13. <i>S.obliquus</i> azot yüklemesine ait FTIR spektrumu	47

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

M	Molar
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
rpm	Dakikadaki dönüş hız birimi
μ l	Mikrolitre
nm	Nanometre
μ m	Mikrometre
ppm	Milyonda bir birim(Parts per million)
ppb	Milyarda bir birim(Parts per billion)
μ mol	Mikromol
μ g	Mikrogram
A	Absorbans
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
ml	Mililitre
TAG	Triaçilgliserol
MUFA	Tekli doymamış yağ asidi
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi
SFA	Doymuş yağ asidi
DHA	Dokosaheksaenoik asit
BBM	Bold Basal Medium
FFA	Serbest yağ asitleri
FAMEs	Yağ Asidi Metil Esterleri
FTIR Spektroskopisi	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC-FID	Gaz Kromatografi-Kütle Spektroskopisi
ddH ₂ O	Çift distile su
EDTA	Edetik asit (Etilen diamin tetraasetik asit)

GİRİŞ

1.1. Alglerin Genel Özellikleri

Yosunlar, tek hücreli ve çok hücreli türleri bulunan; genellikle deniz ve tatlı su ortamlarında yaşayabilen canlı organizmalardır. Çok hücreli formları makroalg veya filamentli; tek hücreli formlarına mikroalg veya fitoplankton gibi farklı isimlerde verilmektedir (Demirbas, 2010; Bharathiraja vd., 2015; Sambusiti vd., 2015; Raheem vd., 2015). Plankton Yunanca'da hareketsiz anlamında kullanılan "planktos" kelimesinden türetilmiştir. Hala kullanılmakta olan fitoplankton tanımı ise özelleşmiş herhangi bir hareket organeli bulunmayan, bulunsu bile yalnızca pasif (su ile) hareket edebilen, basit klorofil ihtiva eden canlı grubu için kullanılır (Cirik ve Gökpınar, 2006). Fitoplanktonlar sucul canlıların temel besin maddesi olmalarından dolayı besin zicirinin ilk halkasını oluştururlar (Cirik vd.,2006). Yapılarında bulunan klorofil aracılığı ile güneş ışığı, su ve karbondioksiti fiske ederek fotosentez kabiliyetleri sayesinde biyokütlelerindeki çok farklı çeşitteki metabolit ve kimyasallara dönüştürebildikleri için organik maddelere ihtiyaçları yoktur. Bu sebeple sulak alan ekosisteminin primer üretici olma görevini üstlenirler. Ayrıca ototrof organizma oldukları için bitkilerin ilkel formu olarak kabul edilirler (Bat vd., 2008;Demirbas,2010; Bharathiraja vd., 2015; Sambusiti vd.,2015;Van den Hoek vd., 1995).

Çapları 1-30 nm arasında değişiklik gösteren mikroalgler; pigmentasyonlarına, yaşam döngülerine ve temel hücre yapılarına bakılarak (1) diatoms (Bacillariophyceae); (2) yeşil (Chlorophyceae); (3) mavi ve mavi-yeşil cyanobacteria (Cyanophyceae); (4) altın (Kriyophyceae); ve (5) kırmızı (Rhodophyceae) olarak sistematik sınıflara ayrılır (Ullah vd., 2015; Demirbas, 2010; Bharathiraja vd., 2015; Sambusiti vd., 2015; Raheem vd., 2015; Huber vd., 2006; Ziolkowska vd.,2014). Mikroalglerin; prokaryotik ve ökaryotik, fotosentetik, fotosentetik olmayan, ototrofik, heterotrofik, miksotropik, gibi farklı sınıflandırmalarında mevcuttur (Bharathiraja vd., 2015;

Sambusiti vd., 2015; Brennan vd., 2010). Yaklaşık 50000 türü bulunan alglerin tahmini 22.000-26.000 tanesi mikroalg olmasına rağmen sadece birkaç üyesi dünya çapında ticari olarak yetiştirilebilmiştir (Bharathiraja vd.,2015; Cirik,1993).

Alglerin pigment, büyüme oranı, boyutu, ağırlığı ve kimyasal bileşimi, özellikle taksonomik sınıflarına ve türlerine bağlı olarak, ışık, sıcaklık, pH, tuzluluk, besin, kirlilik ve hatta su hareketi gibi yaşam ortam koşullarına göre önemli ölçüde etkilenir (Sambusiti vd., 2015; Jung vd., 2013). Örneğin yaşamsal parametreler arasında yer alan ışık alglerin habitat dağılımlarını belirlemede önemli rol oynar. Türe uygun olan çevresel koşullar sağlandığı zaman belirlenen alg türünün tüm yıl boyunca devamlı olarak üretimi gerçekleştirilebilir (Sambusiti vd.,2015). Diğer taraftan çevresel koşulların bozulması ötrofikasyona da sebep olabilmektedir. Ötrofik bir gölde alglerin üretim hızının artarak organik ürün birikiminin meydana gelmesiyle bulanıklık oluşması ve ışığın suyun alt kısımlarına geçmesi engellenir. Işığın ulaşmadığı dip bölgede oksijen sınırlayıcı bir özellik kazanarak oksijen toleransı olmayan canlıların ölümüne sebep olabilir (Glombitza, 1970; Round, 1973; Şen ve Nacar, 1988; Güner, 2006).

1.1.1 Morfoloji ve Yaşam Döngüsü

Alglerin morfolojik çeşitliliği oldukça fazladır. Yaşam alanlarına olan adaptasyonları açısından hareketli, hareketsiz, kamçılı, kamçısız, mikroskobik, makroskobik gibi farklı formlara sahiptirler. Tek hücre formunda veya koloni halinde bulunabilirler. Koloni oluşturan alg türleri, ipliksi, yassı yapraksı, şeritsi, tüpsü, parankimatik tallus yapıları gösterirler (Altuner,1994).

Alglerin morfolojik farklılıkları fazla olmasına rağmen hücresel boyuttaki morfolojik durumlarına bakıldığı zaman genel itibari ile ortak yapılar gözlenmiştir. Bu yapılar:

Kloroplast: Biyoteknolojik olarak üretimleri gerçekleştirilen ürünlerin sağlanması açısından önem arz eden kloroplast alg hücrelerinde spesifik (spiral halinde bantlar ağ veya yıldız plaklar) şekillerde bulunmaktadır. Bunun

yanı sıra kloroplastlar stoplazma içinde homojen olarak dağılır veya nükleus etrafında ya da hücre çeperinin alt kısmında toplu halde ihtiva edilirler. (Reece., 2010; Özel, 2005).

Sitoplazma: Alglerin mevcut olan tüm organellerinin içerisinde dağılım gösterdiği ayrıca lipid ve protein taneciklerinin bulunduğu hücresel sıvı dolgu maddesidir(Reece, 2010; Özel, 2005).

Çekirdek: Bitkilerin ilkel formu kabul edilen algler çekirdek işlevselliği anlamında bitkiler ile aynıdır, fakat morfolojik olarak alglerin çekirdek boyutları daha küçüktür. Çekirdeklerin şekli hücrelerin şekillerine göre eliptik ya da oval olabilmektedir(Reece, 2010; Özel, 2005).

Hücre çeperi: Hücre çeperi kalınlığı alg türlerine bağlı olarak farklılık oluşturur. Ayrıca bazı alg türlerinde (kamçı bulunduranlarda) hücre çeperi stoplazmanın dışında oluşum gözlenirken bazı türlerde ise stoplazma zar içerisindeki dikensi yapılar şeklinde gözlenir(Reece vd.,2010; Özel, 2005).

Pirenoit: Plastitlere bağlı biçimdeki genellikle stromanın farklılaşmış bir kısmı olan renksiz granüllerdir (Reece, 2010; Özel, 2005).

Tüm canlı organizmalarda olduğu gibi alglerde soylarını devam ettirmek ve çoğalabilmek sebebiyle üremektedir. Aktif olarak üç farklı üreme yolunu tercih etmektedirler. Bunlardan birincisi, koloni halinde yaşayan alglerde yaygın olarak gözlemlenen “vejetatif üreme” yolu, ikincisi basit yapıları alglerde görülen kamçılı (zoosporlar) ve kamçısız (aplanosporlar) sporlar aracılığıyla gerçekleştirilen“eşeysiz üreme” yolu ve gelişmiş alg türlerinde görülen popülasyondakikalıtsal varyasyonların oluşmasına sebep olan, bireylerin ebeveynlerinin genotipinden farklı genotiplerde oluşmasını sağlayan “eşeyli üreme” yoludur (Akbulut,1995).

1.1.2 Habitat

Mikroalgler birçok farklı ekolojik koşula adapte olup yüzyıllardır varlıklarını çeşitlendirerek sürdürmeyi başarabilen mikroorganizmalardır. Yaklaşık olarak %70'i okyanus ve denizlerden oluşan sulak habitatlarda yaşarlar. Adaptasyon özelliklerinin gelişmiş olmasından dolayı, karlı ve

tamamen buzullarla kaplı alanlardan çöldeki sıcak su kaynaklarına kadar yayılım göstermektedirler (Van den Hoek vd., 1995).

Algler buldukları habitatlara ve habitatlarda bulunma şekillerine göre literatürdefarklı isimlerle tanımlanırlar. Yalnızca sucul ortama adaptasyon gerçekleştirmiş olan alglere “Rheophlic algler” denir. Kıyı bölgesinin güneş ışığını geçirebilen kısımlarında yaşamsal faaliyetlerini sürdüren alglere “Bentik algler”, bentik alglerin hiçbir yüzeye bağımlı olmayan formlarına “Epipelik algler”, herhangi bir cisme (taşlar, bitkiler) tutunur durumda yaşayan formlarına ise “Bağımlı algler” denir. Aynı zamanda bağımlı alglerin tutundukları yüzeylere göre isimlendirmeleri de değişmektedir. Bitkiler üzerine tutunmakta olan bağımlı alglere “Epifitik algler” denilirken, taşlar ve kaya üzerine tutunmuş formlarına ise “Epilitik algler” denilmektedir (Altuner,1994).

1.1.3. Algal Üretim Sistemleri

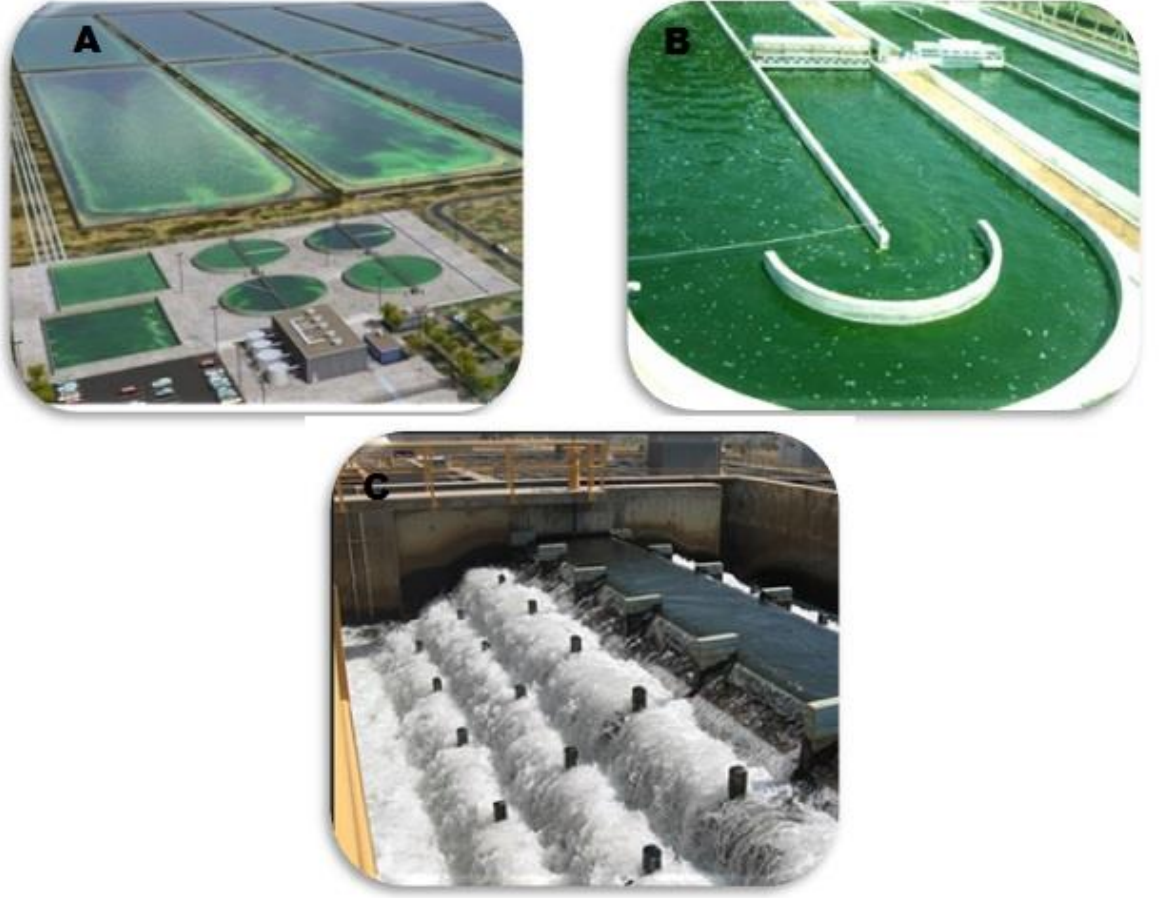
Doğal habitatları dışında ticari alanda kültüre alınan algler, çeşitli algal üretim sistemlerinde çoğaltılabilirler. Üretimi gerçekleştirilecek olan kültür dış etkilere açıksa açık sistemler, dış etkilere kapalıysa kapalı sistemler olarak adlandırılmaktadır (Sambusiti vd., 2015; Vonshak vd.,2003).

1.1.3.1. Açık Sistemler

Açık sistemler maliyetleri düşük basit sistemler olması açısından avantajlıdır. Bu sebeple günümüz endüstrisinde tercih edilmektedir (Becker,1995; Borowitzka,1999). Açık sistemleri temelde; açık havuzlar, kaskatlı havuzlar ve kanallı havuzlar şeklinde sınıflandırabilir (Şekil 1.1). Günümüzde ABD, Japonya, Tayvan ve Endonezya gibi ülkelerde açık sistemüretimi kullanılmaktadır (Borowitzka,1999; Lee,2001).

Açık sistemlerin dezavantajları olarak iklim koşullarından dolayı yıl içerisindeki verimliliğin değişiklik göstermesi, alg hücrelerinin ışık şiddetinden faydalanabilmesi amacıyla yapılan havuzların derin olamaması gerektiği için

havuzların çok geniş alanlar kaplaması sayılabilir. Ayrıca açık üretim sistemlerinde buharlaşma kayıplarının meydana gelmesi, karbondioksit absorpsiyonu, kontaminasyon riski gibi problemler de görülebilir. İlaç, gıda, kozmetik gibi endüstrilerde kullanılacak mikroalg türlerinin belirli saflık ve kalite standartlarında olması talep edildiği için bu alanlarda açık sistem üretimi tercih edilmemektedir (Lee,2001; Borowitzka vd.,1992; Fox, 1996; Moreas vd.,2002).



Şekil 1.1. a) açık havuz üretim sistemi, b)kanallı havuz üretim sistemi, c)kaskatlı havuz üretim sistemi

1.1.3.2. Kapalı Sistemler

Kültürün dış ortamla etkileşiminin engellendiği ve yaşaması için gerekli olan optimum koşulların oluşturulduğu, kontaminasyon riskini azaltarak saf ve kaliteli kültür eldesinin yapılabildiği sistemlerdir. Bu sistemlere

“fotobiyoreaktör” de denilmektedir. Fotobiyoreaktörlerin temel çalışma prensibi ışığın alg hücrelerinin tümüne homojen dağılımının sağlanması ve karıştırıcı aparatlar sayesinde gaz transferinin gerçekleştirilmesine dayanır. Ticari üretim için kullanılan tübüler sistemler ve panel sistemler olmak üzere iki çeşit biyoreaktör vardır (Borowitzka vd., 1999; Vonshak vd., 2003).

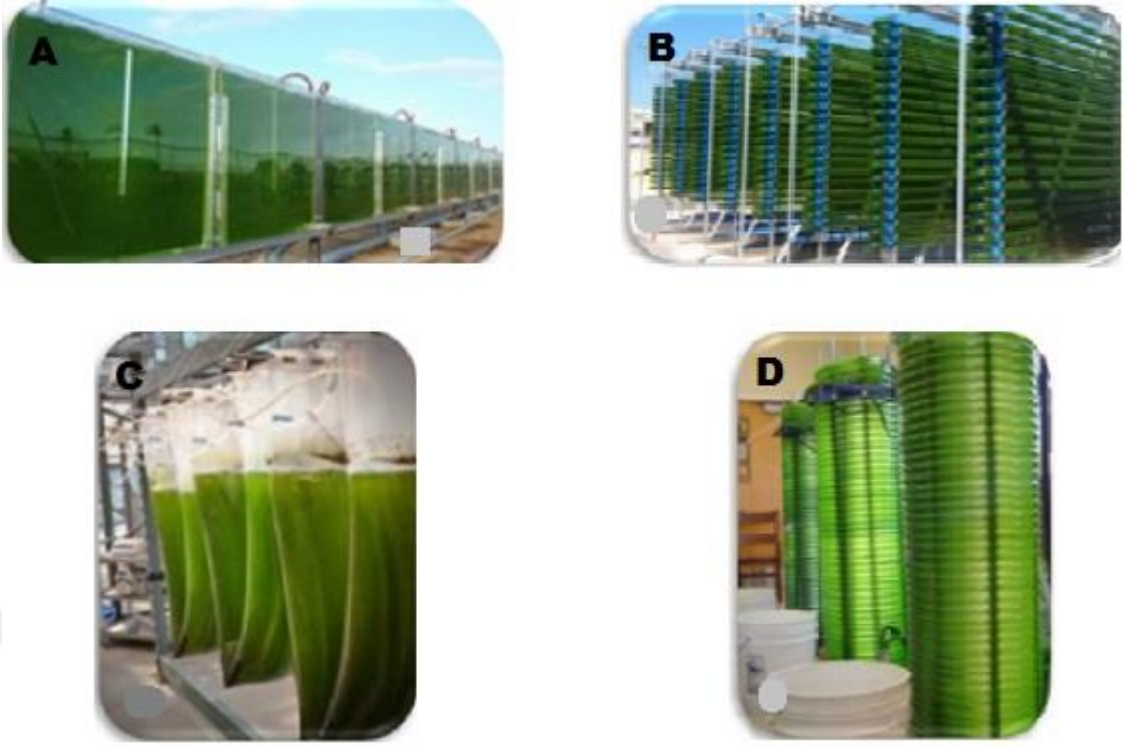
Şeffaf kaplarda ya da tanklarda mikroalg üretimi; yaklaşık 1000 L'den küçük plastik torbalarda ya da 20-40 litrelik kaplarda kesikli üretim yöntemi kullanılarak dışarıdaki güneş ışığından faydalanılan sistemlerdir. Üretim performansının garantisi olmaması açısından dezavantajlıdır (Kargın,2002;Yılmaz, 2006).

Plastik torbalarda mikroalg üretimi (Şekil 1.2.a); başlangıç kültürü ile doldurulmuş plastik torbalarda, iç veya dış mekânlarda kesikli yöntem kullanılarak gerçekleştirilir. Sistemin dezavantajları, üretimin kesikli yöntemle gerçekleştirilmesinden dolayı işçilik gerektirmesi, üretimin büyük ölçekte olmasından dolayı ışığın homojen dağılımının kısıtlanması ve bu sebeple istenilen kalitede üretimin gerçekleştirilememeye ihtimalidir (Kargın, 2002).

Biocoil mikroalg üretim sistemi (Şekil 1.2.b.); bir kuleyi küçük çaplı şeffaf plastik boruların sarması ile oluşturulmuş helozoik fotobiyoreaktör çeşididir. Santrifüj, diyafram, peristaltik pompalar veya hava kaldırımı olan pompalama sistemi bulundurur ve yarı sürekli kültür yöntemi kullanılarak birçok alg türünün üretimi gerçekleştirilir (Yılmaz, 2006).

Tübüler sistemde mikroalg üretimi (Şekil 1.2.d.), içerisinde alg kültürünün bulunduğu ışıktan optimum fayda elde edilebilmesi için eğimli konumlandırılan tüpler, sistemde biriken gazın atılımını gerçekleştiren degazör ve sirkülasyon oluşumunu sağlayan pompa olmak üzere üç ana üniteden oluşmaktadır (Pirt vd., 1983).

Düz-levha tip fotobiyoreaktörler (Şekil 1.2.c.); temel prensibi yüzey alanını artırarak ışığın etkili kullanımını sağlayabilmektir. Kültürün kalınlığı genellikle 2-4 cm arasındadır ve fotobiyoreaktör karışımının en iyi şekilde sağlayan sistemlerdir (Yılmaz, 2006; Pulz vd., 1994;Tredici, 1997).



Şekil 1.2. a) Düz levha üretim sistemi, b) Tübüler üretim sistemi, c) Plastik torba üretim sistemi, d) Biocoil üretim sistemi

1.2. Alglerin Ekonomik ve Ekolojik Önemi

Alglerin en önemli ekolojik görevi, su ekosistemlerinde ötrofikasyonu ve kirliliği önleyebilmeleridir(Sambusiti vd., 2015; Wang vd., 2008;Slade ve Bauen, 2013). Ötrofik deniz bölgelerinde, alg yetiştiriciliğinin yapılması ötrofikasyonun azaltılması, besin kontrolünün sağlanması ve okyanus ıslahı için önem arz etmektedir (Wang vd., 2008). Ayrıca algler, karbondioksit dönüşümünde rol alırlar (Demirbas, 2011) ve üstün karbondioksit fiksasyon kapasitesi ile karbondioksitin yakalayıp kalıcı olarak tutulmasını gerçekleştirerek bol miktarda oksijen üretilip sera gazı oluşumunu önlemeye yardımcı olurlar(Ullah vd., 2015; Noraini, 2014; Chen, 2015; Demirbas, 2010;Ross vd., 2010; Demirbas, 2011; Bharathiraja vd., 2015; Sambusiti vd., 2015; Raheem vd., 2015). Bu sayede algler küresel ısınmayı önlemededoğaya büyük orandanda katkı sağlarlar. Ayrıca atmosfere salınan

özgür oksijen üretimlerinin ormanların sağlamış olduğu katkıdan bile fazla olduğu gözlemlenmiştir (Demirbas, 2011).

Ekonomik alanda ise alglerenerji, tarım, kimya, ilaç, gıda, tekstil, kozmetik, cam, kağıt ve diğer endüstrilerde ticari hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır (Çizelge 1.1)(Ullah vd., 2015; Noraini vd., 2014; Chen vd., 2015; Trivedi vd., 2015; Abbasi ve Abbasi, 2010;Demirbas, 2010; Ross vd., 2010; Demirbas, 2011; Bharathiraja vd., 2015; Chen vd., 2015; Sambusiti vd., 2015; Raheem vd., 2015; Ziolkowska vd., 2014; Ruperez, 2002; Ververis vd., 2007;Ross vd., 2008;Pittman vd., 2011; Lill vd., 2012; Jung, 2013).

1.2.1. Alglerden Elde Edilen Ürünler

Algler yüksek seviyedeki protein, lipid ve karbonhidrat içeriğinden dolayı dünya ticaretinde kullanılan benzersiz bir hammadde kaynağıdır. Büyüme ve gelişimleri için uygun koşullar sağlandığında büyük miktarlarda ve kısa sürede organik (pigmentler, enzimler, antioksidanlar, yağ asitleri, vitaminler vb.) ve inorganik (alkali mineralleri) bileşenleri üretebilmektedir (Ullah vd., 2015; Chen vd., 2015; Demirbas, 2010 ,2011; Sambusiti vd., 2015; Raheem vd., 2015; Huber vd., 2006; Brennan, 2010).

Vitaminler, insan tüketimi ve hayvan beslenmesi amacı ile kullanılan ticari potansiyeli büyük ürünlerdendir. Algler tarafından B12 ve E vitaminleri üretilir. B12 vitamini sağlıklı yaşam için kullanılır. E vitamini ise antioksidan özelliğe sahip olmasından dolayı pazar potansiyeli yüksek vitaminlerdendir. Mikroalglerde ki vitamin verimliliği çoğalmayı ve metabolizmayı etkileyen birçok koşula bağlıdır. Bu nedenle suş seçimi ve kültür koşullarının değişimlerinin iyi yorumlanması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda alglerin çok çeşitli vitaminler sentezleyebildikleri gösterilmiştir (Hoppe, 1979; Glombitza ve Koch, 1989; Güner, 2006; Pabuçcu, 1998, 1999).

1.2.1.1. Pigmentler

Mikroalgler klorofil sentezine ek olarak bazı pigmentler (fikobiliprotein, karotenoid) de sentezlemektedir. Hatta bazı alg türlerinde fikobiliprotein ve karotenoid gibi pigmentler primer pigmentlere oranla daha yüksek konsantrasyonlarda bulunabilir.

1.2.1.2. Karotenoidler

Likopenden köken alarak türeyen, izoprenoid polien yapısındaki pigmentlerdir. Tüm fotosentetik mikroorganizmalarda bulunan bu pigmentler genellikle sarı ve kırmızı renkte görünmektedir. Alg hücrelerinde bulunan karotenoidlerin görevleri; fotosentez esnasında ışığın absorpsiyonunu sağlamak, oksijenin toksik etkilerine karşı koruyucu etki göstermek ve fototaksiye yardımcı olmaktır. Ayrıca karotenoid türevleri olan absisik asit ve A vitamini ise kanseri önlemede, görme ve üreme fizyolojisinde ve büyüme hormonu olarak işlev görürler. Karotenler somon balığının rengini pembeleşmesi ve yumurta sarısının renginin artması gibi doğal gıda renklendiricisi olarak da kullanılırlar.

Biliproteinler prostetik olarak bir safra pigmenti içeren kromoproteinlerdir. Biliproteinlerin miktarını özellikle ışık yoğunluğu, kalitesi ve azot miktarı etkilemektedir. Bir Japon firması kozmetik ve gıda alanlarında kullanmak amacıyla *Spirulina platensis* türünden, mavi fikosiyanini ekstrakte edip bunu doğal pigment olarak satmaktadır. Biliproteinlerin pazarı oldukça geniştir ve *Spirulina*, *Porphyridium* gibi alg türlerinden ticari üretimi gerçekleştirilmektedir (Hoppe, 1979; Glombitza ve Koch, 1989; Güner, 2006; Pabuçcu, 1998, 1999).

1.2.1.3. Fitoller

Tek doymamış diterpenoid primer alkol olup, klorofilin alkol kısmını meydana getiren maddedir. A vitamini, β karoten, E, K ve K2 vitaminlerinin sentezinde öncül maddedir. Klorofilin zayıf asidik koşullarda hidrolizi ile kolay bir şekilde fitol elde edilir (Hoppe, 1979; Glombitza ve Koch, 1989; Güner, 2006; Pabuçcu, 1998, 1999).

1.2.1.4. Aminoasitler

Özellikle gıda ve besin endüstrisinde geniş uygulama alanlarına sahiptir. Glutamik asit ve Metionin insan beslenmesi için, Triptofan, Lizin, Fenilalanin ve Aspartik asit ise hayvan beslenmesi için önemlidir. Aminoasitlerin kompozisyonu türler arasındaki çoğalma koşullarına ve fazına göre değişmektedir. Mikroalglerden diğer kimyasalların elde edilmesi sırasında yan ürün olarak protein ya da aminoasit elde edilebilmesi üzerine yapılan çalışmalarda *Chlorella* türünden L prolinin eldesi gerçekleştirilmiş ve ticari üretimi için patenti alınmıştır (Hoppe, 1979; Glombitza ve Koch, 1989; Güner, 2006; Pabuçcu, 1998, 1999).

1.2.1.5. Polisakkaritler

Alglerden elde edilen polisakkaritler genellikle vizkozite arttırıcı madde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca antikanser aktivitesine sahip oldukları bilinen polisakkaritlerin üretim miktarının azot kısıtlamaları ile artırılacağı gözlenmiştir. Ticari polisakkarit üretiminde *Porphyridium* türleri kullanılarak hektar başına yılda 20-25 ton ürün elde edilebilmektedir. Bazı yeşil ve mavi-yeşil alg türlerinden de yüksek oranda ekstraselüler polisakkarit üretildiği ve maksimum üretimin logaritmik fazın sonlarında gerçekleştiği araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Hoppe, 1979; Glombitza ve Koch, 1989; Güner, 2006; Pabuçcu, 1998, 1999).

1.2.1.6. Polioller ve diğerkarbohidratlar

Mikroalgler depo ürünleri (nişasta, glikojen) ve ozmotik düzenleyici (gliserol, mannitol, sorbitol) maddeler üretirler. Bu maddelerin hücre içerisindeki birikimi ortamın tuzluluk oranı ile doğru orantılıdır. Bu ürünler gıda kaynakları ya da etanol, metan üretimi için mikrobial substrat olarak ve yapay tatlandırıcı üretiminde kullanılmaktadır. *Dunaliella salina* türü, yüksek tuz konsantrasyonunda yaklaşık olarak kuru ağırlığının %50'si oranında gliserol biriktirebilmektedir (Hoppe, 1979; Glombitza ve Koch, 1989; Güner, 2006; Pabuçcu, 1998, 1999).

1.2.1.7. Farmasötikler ve antibiyotikler

Yeşil algler, diatomeler ve dinoflagellatların hücre ekstraktlarının in vitro yapılan testlerde geniş bir antifungal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Antifungal aktivitenin yanı sıra bazı algler farmasötik aktif bileşikler de salgılamaktadır. Mikroalg endüstrisine fayda sağlamak için doku ve mikrobiyal kültür alanlarında çalışmalar yapılmaktadır. Çalışma sonuçları *Chlorella* ve *Scenedesmus* gibi yeşil mikroalg ekstraktlarının, maya gibi mikroorganizmaların çoğalmasını ve veriminin arttırıldığını göstermektedir. *Scenedesmus* ve *Spirulina* türlerinden elde edilen ekstraktlar hayvan doku kültürlerinin üretiminde *Chlorella* türüne ait ekstraktlar ise bitki doku ve hücre kültürlerinde kullanılmaktadır (Hoppe, 1979; Glombitza ve Koch, 1989; Güner, 2006; Pabuçcu, 1998, 1999).

1.2.1.8. Katı, sıvı yağlar ve hidrokarbonlar

Mikroalglerin, kuru ağırlıklarının ortalama %20-40'ını katı ve sıvı yağlar oluşturur. Bünyelerinde bulunan yağlar bazı koşullarda kuru ağırlıklarının % 85'ini oluştururlar ki bu oran bitkilerin içerdiği lipitlerden daha fazla yağ ihtiva ettikleri anlamına gelir. Algal yağlar bitkisel yağ içeriği ile benzerlik gösterdiği

için endüstride kullanım potansiyeli oldukça fazladır. Alglerin ürettikleri sıvı yağlar petrol ürünleri yerine kullanılabilirler.

Dünya genelindeki yağ üretimi her geçen yıl artış göstermektedir ve toplam yağ üretiminin %73'ü bitkisel kaynaklıdır. Mikroalglerdeki hidrokarbonlar kuru ağırlıklarının ortalama % 5'inden daha az miktarda bulunmaktadır. *Botryococcus braunii*, kuru ağırlığının %90'ı kadar hidrokarbon üretme yeteneğine sahip tek türdür. Bu sebeple petrol rezervlerinin oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Steroller geniş ticari kullanım alanlarına sahiptir. Özellikle steroid hormonların sentezinde substrat görevi görürler. Günümüzde üretilen steroidlerin çoğu doğal sterollerin modifikasyonu ile sentezlenmektedir. Alg türleri arasında üretilen sterol bileşiminde farklılıkların bulunması bu sebeple önemlidir (Hoppe, 1979; Glombitza ve Koch, 1989; Güner, 2006; Pabuçcu, 1998, 1999).

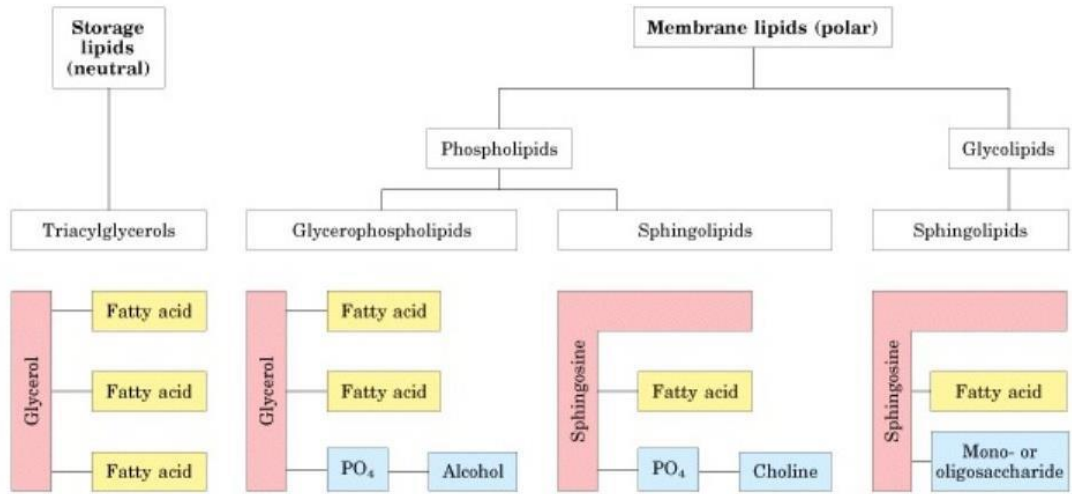
Çizelge 1.1. Alglerin ticari uygulamaları

ÜRÜN	KULLANIM ALANI
Agar	Gıda maddesi, hidrokolloidler, meyve konserveleri, kağıt endüstrisi ve diğer farmasötik ve biyolojik / mikrobiyolojik alanlarda kullanılır.
Aljinat	Gıda katkı maddesi, tekstil baskı, ilaç, medikal, kağıt, kozmetik ve gübre endüstrilerinde kullanılır.
Antioksidan	Gıda, ilaç, kozmetik ve kimya sanayinde koruyucu maddeler olarak kullanılır.
Astaksantin	Antioksidan ve gıda boyası katkısı maddesi olarak gıda takviyesi olarak kullanılır.
Beta karoten	A vitamini ve öncüsü, antioksidan ve renklendirici ajan olarak gıda katkı maddesi olarak kullanılır.
Biyoenjerji ve Biyoyakıt	Havacılık gazı, biyobütanol, biyodizel, biyoetanol, biyogaz, biyohidrojen, biyometan, biyoyakıt, biyosinaz, benzin, jet yakıtı ve katı yakıt olarak kullanılır.
Biyorafineri Ürünleri	Çeşitli biyo-yakıtlar ve kimyasallar şeklinde kullanılır.
Biyosorbentler	Kuvvetli ağır metal iyonlarını bağlayan iyon değiştirici malzemeler olarak kullanılır.
Carragen or carrageenan	Jeller, gıda katkı maddesi, evcil hayvan maması ve diş macunu yapımında kullanılır.
Kimyasallar	Tıbbi ve endüstriyel alanda kullanılırlar.
Kozmetik Ürünler	Cilt nemlendirisi, su bağlayıcı maddeler ve antioksidanlar olarak kullanılır.
Hidrokolloid ekstraksiyonu	Gıda endüstrisinde kullanılır.
Lipitlerin, karbonhidratların, nişasta ve selülozun ekstraksiyonu	Benzin, biyodizel, jet yakıtı, yenilenebilir hidrokarbonlar, alkoller ve biyogaz olarak kullanılır.
Minerallerin ve eser elementlerin ekstraksiyonu	Gıda takviyeleri, metalurji, cam üretiminde kullanılır.
Proteinlerin ekstraksiyonu	Hayvan / balık yemleri, gübreler, endüstriyel enzimler, biyoplastikler, yüzey aktif maddeler olarak kullanılır.
Posa	N, P ve K bakımından zengin gübrelere eldesinde ve hayvan yiyeceği olarak kullanılır.
Fitosterol	Besin takviyesi olarak kullanılır.
Pigmentler	Kağıt ve tekstil endüstrilerinde doğal renklendirici olarak kullanılır.
Terapötik Malzemeler	İlaç endüstrisinde kullanılır.

1.2.2. Lipidler

Yağlar, çift karbon atomuna sahip doymuş ve doymamış yağ asitlerinin gliserin triesterleridir. Suda çözünmediği halde yağ çözücülerini denilen eter, petrol eteri, kloroform ve benzen gibi solventlerde çözünendoğal ürünlerdir. İnsanların beslenmesinde önemli olan yağlar, bitki ve hayvanhücreleri ile mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Günümüzde insan gıdası olarak kullanılan yağların %95'i bitkisel kaynaklıdır. Yağlar; gliseritler, yağ asitleri, fosfatitler ve mumlar gibi sabunlaşma tepkimesi veren maddelerin dışında hidrokarbonlar, yüksek molekül ağırlıklı alkoller, renk maddeleri ve antioksidanlar gibi sabunlaşma tepkimesi vermeyen bileşikleride barındırır (Çiftçi, 2008). Lipitlerin sınıflandırma tablosu Çizelge 1.2.'de özetlenmiştir (Yazgan vd., 2007).

Çizelge1.2. Lipitlerin sınıflandırılması



1.2.2.1. Lipidlerin Kimyasal Yapısı

Trigliseritler, gliserin ile farklı uzunluktaki yağ asitlerinin oluşturduğu esterlerdir. Gliserin, yağ asitleri ile lipaz enziminin etkisinde ve uygun bir ortamda esterleşerek bir trigliserit oluşturur. Yağlarda trigliseritlerden başka farklı miktarlardamonogliseritler, digliseritler, fosfaditler, serebrositler,

steroller, yağ asitleri, yağda eriyen vitaminler (A, D, E, K), renk ve koku maddeleri bulunur.

Bir gliserole bir molekül yağ asidi bağlanması ile oluşan yapıya monogliserit, iki molekül yağ asidi bağlanması ile oluşan yapıya ise digliserit denilmektedir. Trigliseritler içerdikleri yağ asitlerine bakılarak iki gruba ayrılır: Her üç bağda da tek çeşit asit bulunduranlar (tek tip asitli gliseritler - basit gliseritler) ve her üç bağda da farklı çeşit asit bulunduranlar (çok asitli trigliseritler – karışık gliseritler).

Yağ asitleri, hidrokarbon zincirli monokarboksilik organik asitlerdir. Yapıları hidrokarbon zincirinin ucuna karboksil grubunun bağlanması ile oluşur (Lehninger vd., 2004). Doğada bulunan 200'den fazla yağ asidinin yapısı tanımlanmasına karşın tüm yağ asitlerinin sayısı ve yapısı hakkında net bilgiye ulaşılamamıştır. Yağ asitleri zincir yapılarındaki farklılıklara göre doymuş, doymamış veya halkalı olarak sınıflandırılmaktadır (Çiftçi, 2008).

Doymuş yağ asitleri, zincirinde genellikle çift sayıda karbon atomu bulundurur ve her karbon atomu birbirlerine tek bağla bağlanmıştır. Karbon sayısı 4 ve 8 arasında olan doymuş yağ asitleri oda sıcaklığında sıvı, 10 un üzerinde karbon içeren yağ asitleri ise katı haldedir (Başoğlu, 2006). Doymamış yağ asitleri ise zincirinde farklı karbon atomları arasında bir ya da birden fazla çift bağ içermektedir. Oda sıcaklığında genellikle sıvıdır, suda çözünmez ve uçucu değildir (Başoğlu, 2006). Bünyesinde bir çift bağ içeren yağ asitlerine monosature yağ asitleri (MUYA veya MUFA) denir. Bünyesinde birden çok çift bağ bulunduran yağ asitlerine ise poliansature yağ asitleri (PUYA veya PUFA) denir (Yazgan vd., 2007).

Dallanmış yağ asitleri, hidrokarbon zincirlerinde ek gruplar (hidroksil veya metil grubu) bulunan yağ asitleridir. Halkalı yapıya sahip yağ asitleri, hidrokarbon zincirleri halkalı yapı oluşturmuş olan yağ asitleridir (Lehninger vd., 2004).

1.2.2.2. Algal lipidler ve kompozisyonları

Mikroalgler tarafından üretilen lipidler, depo lipidler (non-polar lipidler) ve yapısal lipidler (polar lipidler) olmak üzere iki grupta toplanabilir. Depo lipidleri çoğunlukla Triaçilgliserol (TAG) formunda olup transesterifikasyon ile biyodizel ve gliserol üretiminde kullanılabilirler. Yapısal lipidler ise, çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindir ve hayvan besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Polar lipidlerden fosfolipidler ve steroller hücre ve organeller için seçici geçirgen zar olarak görev alır. Bazı polar lipidler ise hücre sinyal yollarında ara ürünler veya ara ürünlerin başlatıcısı olarak çevresel değişikliklere cevapta da kullanılırlar (Sharma vd., 2012).

Algler, non-polar lipidlerden TAG'leri enerji sağlamak amacıyla depo etmektedirler. (Gurr vd., 2002). Genellikle TAG'ler ışıkta sentezlenerek sitozolik lipid cisimleri içerisinde depo edilirler daha sonra karanlıkta polar lipid sentezlemek amacıyla kullanılırlar (Thompson, 1996). Bazı yağ zengini algler, uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin de TAG formunda fazlaca depolayabilmektedirler. Yeşil mikroalglerden *Parietochloris incisa* ile yapılan araştırmada azot açığında yüksek miktarda TAG biriktirdiği sonrasında azot kaynağı ilave edildiğinde ise kloroplastik lipid biriktirdiği gözlenmiştir. Araştırma sonucu, sitoplazmik TAG'lerin enerji depo maddeleri olmanın yanı sıra metabolik olarak aktif olduklarını ve spesifik yağ asitlerinin üretimi için rezervuar olarak kullanılabileceklerini göstermiştir (Bigogno vd., 2002; Khozin-Goldberg ve Cohen, 2006).

Total lipidin önemli bir kısmı nötral lipidlerdir (Tonon vd., 2002). Büyüme için olumsuz stres koşulları geliştiğinde algler, nötral lipidlerin TAG formunu sentez ve depo etmeye yönelirler (Thompson, 1996; Guschina ve Harwood, 2006).

Üretilen yağın kalitesinin yani yağ asitlerinin kompozisyonunun belirlenmesi önemlidir. Tüm yağlarda gliserol değişmeden kalır. Yağlar arasındaki farklılıklar sahip oldukları yağ asitleri kompozisyonunun sonucunda oluşur. Bu sebeple yağlarda meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi için onların yağ asitleri kompozisyonunun belirlenmesi gerekmektedir. Geçmişte yağ asiti kompozisyonunun belirlenmesi ciddi

soruniken kromatografik analizlerin geliştirilmesi ile birlikte daha doğru ve kolay sonuçlar elde edilmektedir (Yazgan vd., 2007). Özellikle gaz kromatografi analizleri birçok farklı yağın yağ asidi kompozisyonları ile ilgili ayrıntılı bilgi teminini sağlamaktadır. Böylece yağların kimliklerinin belirlenmesinde daha sağlıklı sonuç raporları elde edilmektedir. Ayrıca gaz kromatografi analizleri ile yağın bünyesinde bulundurduğu yağ asitlerinin konfigürasyonunda oluşan değişimlerin takibi ve tespiti de yapılabilmektedir (Yazgan vd.,2007).

Mikroalglerin ekstraksiyonu ile elde edilen yağın, yağ asidi profilinin bilinmesi, biyodizel üretimi için önem taşımaktadır. Biyodizelin kalitesini belirleyen ana unsurlar olan iodin numarası, setan numarası, yanma noktası, NOx emisyon değeri, oksidatif durgunluğu ve akışkanlığı gibi özellikler biyodizelin içindeki FAME profiline bağlıdır (Saraf ve Thomas, 2007; Francisco vd., 2010).

Biyodizel üretimi için kullanılacak olan yağlarda doymamış yağ asitleri hızlı şekilde okside oldukları için; doymuş yağ asitlerinin (SFA) ve tekli doymamış yağ asitlerinin (MUFA) yüksek oranda bulunması, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) ise düşük oranlarda bulunması aranan bir özelliktir. Rakamsal olarak MUFA ve SFA toplamının %75 den fazla olması ayrıca PUFA miktarının ise %3 den az olması öngörülmektedir. SFA çeşidi olan linolenik asit (C18:3) miktarının toplamda %12 den fazla olmaması da üretilecek olan biyoyakıtın uluslararası standartlarda olabileceği anlamını taşımaktadır. (European standard EN 14214).

1.3. Mikroalglerin Büyümesi Üzerine Etkili Olan Faktörler

Her canlı türünün kendine özgü yaşam koşulları olduğu gibi mikroalglerin de üreyebilmeleri ve varlıklarını devam ettirebilmeleri için bazı çevresel koşulların sağlanması gerekmektedir. Özellikle alglerin fotosentez kabiliyetlerini optimum seviyede gerçekleştirebilmeleri, fotosentez sonucu meydana getirdikleri ürün (karbohidrat, protein ve lipit) verimliliklerini artırabilmeleri ve kültüre alınabilmeleri için ışık, sıcaklık ve karbondioksit

yoğunluğu gibi parametrenin alg türüne uygun olması gereklidir. Kültüre alınacak alglerin besi ortamında ise toplam tuz konsantrasyonu, karbon kaynağı, uygun ve ekonomik azot kaynağı seçimi, diğer majör elementlerin (potasyum, magnezyum, sodyum, sülfat, fosfat vb.) konsantrasyonu, ortamın pH değeri, ortamda bulunması zorunlu iz elementler, organik bileşenlerin ve büyümeyi destekleyici maddelerin eklenmesi gereklidir (Demir,2011).Ancak bu koşullar dahilinde alg kültür ve izolasyonu gerçekleştirilebilir. Makro besin elementleri (azot, fosfor, sülfür, vs.), eser elementler (çinko, bor, bakır, vs.) ve toksik metaller de alglerin biyokimyasal yapısını, büyümesini ve metabolizmasını önemli derecede etkilemektedir (Juneja vd., 2013).

1.3.1. Işık

Fotosentetik canlıların büyüme, gelişme ve hatta canlılıklarını sürdürebilmeleri için ışığın varlığı zorunludur. Mikroalg kültürleri için doğal ışık kaynağının yanısıra yapay (floresan lambalar) kaynaklar da kullanılabilir. Tercih edilecek ışık kaynağının ortamı ısıtmamasına dikkat edilmelidir (Sukatar, 2002).

Mikroalg üretiminde ışığın homojen dağılımının sağlanmasında kültür kabının derinliği ve kültürün popülasyon yoğunluğunun dengesi iyi ayarlanmalıdır. Örneğin, derinliği ve hücre konsantrasyonu yüksek olan kültürde, ışık penetrasyonunu sağlamak için ışık yoğunluğu artırılır ve buna bağlı olarak organizmaların büyüme hızları da artar. Fakat belli bir noktadan sonra hücre artışı doygunluk seviyesine ulaşır, bu noktadan itibaren de hücreler ürettikleri enerjiyi ısı olarak açığa çıkartır. Yüksek ışık seviyelerinin devam etmesi durumunda ise organizmanın dengesi bozularak inhibisyon meydana gelebilir ve hücre yapılarında bozulmalar meydana gelerek organizmada geri dönülmez zararlar oluşabilir (Önal, 2010; Richmond, 2004)

Işık yoğunluğu mikroalglerin hücresel bileşiminde de farklı etkiler oluşturmaktadır. Düşük ışık yoğunluğunda, alglerde ekstraselüler polisakarit içeriğinde artış sağlandığı ve daha yüksek protein içeriği ihtiva ettiği gözlenirken, yüksek ışık yoğunluğunda hücresel lipit içeriği ve çoklu

doymamış yağ asitlerinin azalmasına neden olduğu gözlemlenmiştir (Juneja vd., 2013).

1.3.2. Sıcaklık

Mikroalgler biyokimyasal reaksiyonlarını, metabolik ve fizyolojik aktivitelerini doğrudan etkileyen sıcaklık değişimlerine hemen tepki vermektedir. Mikroalgler 16C ila 27C aralığındaki sıcaklık değerlerinde yaşayabilmektedir. Belirtilen sıcaklık değerlerinden daha düşük sıcaklıklarda bulduklarında üreme hızlarında yavaşlama gözlenirken daha yüksek sıcaklıklarda bulunan populâsyonlarda ise genellikle letal etki gözlemlenmiştir.

Sıcaklık azalması olan bir kültürde;

- Canlıların gelişimi optimum seviyenin altına düşer.
- Membran sisteminde bulunan doymamış lipidlerin derecesi artar.
- Membranların stabilitesi ve akışkanlığı artar.
- Tilakoid membranlar fotosentetik yapılarını korumak için fotoinhibisyonu gerçekleştirir (Richmond, 2004).

Sıcaklık artışı olan bir kültürde;

- Buharlaşıma artarak besiyerinde hacim kaybına neden olur kültür dengesi bozulur.
- Solunum hızı artar ve artan solunum sonucu biyokütle kayıpları olur.
- Üretilen nişastanın bozulmasına yol açar.
- Karbon ve azot kullanımının verimliliği artar (Cohen, 1999).

Bu sebeple kültüre alınan alg türlerine bakılarak üretilecek türe uygun ortam sıcaklığının sağlanmasına dikkat edilmelidir (Demirel, 2006; Sukatar, 2002; Vonshak ve Torzillo, 2003).

1.3.3. pH

Her mikroalg türü spesifik olarak belirli bir pH aralığında üreyebilir. Karbondioksit ve gerekli besinlerin çözünürlü ve kullanılabilirliği pH aracılığı ile belirlenerek alglerin metabolik faaliyetlerinin sorunsuz gerçekleşmesinde önemli etkiye sahiptir. Kültürü yapılacak mikroalgler için en uygun pH 7-9 aralığıdır ve alg türlerine göre farklılık gösterir. Kültür içerisindeki uygun pH'ın sağlanamaması, hücrelerin parçalanarak içeriklerinin ortama geçmesine ve sonuçta popülasyondaki bireylerin ölümüne yol açar. Çok yoğun üreme gösteren kültürlerde, zamanla pH artışı meydana gelebilmektedir (Önal, 2010). pH'ın yüksek olması karbon içeren kültürlerde kısmi konsantrasyon bozulmasına sebep olarak karbondioksit ve karbon kullanılabilirliğini sınırlayarak alg büyümesini sınırlandırır (Juneja vd., 2013).

1.3.4. Tuzluluk

Tuzluluk terimi, aksi belirtilmedikçe sodyum klorür (NaCl) konsantrasyonu için kullanılır ve alg hücrelerinin biyokimyasal yapısını değiştiren önemli çevresel faktörlerden birisidir. Doğal olarak büyüdükleri ortamlardan daha yüksek veya daha düşük tuzlu ortam koşullarına geçen alglerin büyüme hızı ve bileşimi değişmektedir. Örneğin yüksek tuz konsantrasyonuna sahip kültür ortamında algler *Dunaliella* türünde olduğu gibi lipit içeriğini artırabilir (Zhila vd., 2011; Fabregas vd., 1984; Xu ve Beardall, 1997). Bazı türlerde ise tuz konsantrasyonunda ki artış, algin büyüme hızı, karbonhidrat ve lipit içeriklerinde artışa sebep olurken, en büyük biyokütle konsantrasyonuna ise en düşük tuzluluk seviyesinde ulaşıldığı tespit edilmiştir (Roa vd., 2007).

1.3.5. Besin elementleri

Mikroalgler için gerekli olan besinler; makro elementler, mikro elementler ve vitaminlerdir. Her alg türü, farklı konsantrasyonlarda çeşitli

maddelere gereksinim duymaktadır. Alglerin büyüme hızı sıcaklı ve pH'ın optimum olduğu durumda en sınırlayıcı besin alım oranı ile orantılıdır (Titman, 1976).

Alglerde en az 56 element bulunmaktadır ve bu elementlerden çokca bulunanlar; Azot (N), Fosfor (P), Potasyum (K), Kükürt (S), Sodyum (Na), Magnezyum (Mg) ve Kalsiyumdur (Ca).

Alg hücresi ve metabolizması için azot ve fosfat en önemli elementlerdir. Azot nükleik asit ve proteinlerin oluşumunda temel element olarak bulunan makro elementlerden biridir. Alglerin kuru ağırlıklarının %7-10'u olması sebebiyle azot eksikliği sonucunda büyüme hızlı bir şekilde engellenir. Besiyerine nitrat, amonyak ya da organik kaynaklı üre formunda konulur. Araştırmacılar tarafından yapılan birçok çalışma azot kısıtlaması yapılan ve hiç azot konulmayan ortamlarda alglerin protein içeriğinde azalma olmasına karşın, yağ üretimi ve depolaması yaptığını göstermektedir (Chisti, 2007). Yağ biyosentezini azot kıtlığına bırakılan mikroalgler nötral yağ oranını artırarak gerçekleştirirken, besiyerinde azot bulunan mikroalgler ise polar yağları arttırmışlardır (Becker, 1995; Jayasankar ve Polywal, 2000; Sukatar, 2002; Richmond, 2004; Hu, 2004)

Fosfor mikroalglerin büyüme ve gelişme gösterebilmeleri için metabolik süreç içerisinde yapısal ve fonksiyonel maddelerin oluşumunda rol alan makro elementtir. Fosfolipitler, nükleotidler ve ATP gibi canlılık açısından önem teşkil eden moleküllerin parçası olmasından dolayı önemlidir. Besiyerine fosfor tuzları formunda konularak tampon özelliği ile pH dengesini korurlar (Sukatar, 2002; Richmond, 2004). Fosfor kısıtlaması halinde mikroalglerde lipid birikimi ve DHA (dokosaheksaenoik asit) üretimine neden olur (Sterner vd., 2004, Li vd., 2010).

Kükürt, hücre içerisinde protein bileşeni olarak görev alır, ayrıca vitaminlerin(tiamin, biotin vb.) yapısına girer. Kükürt protein sentezi için gerekli olup, ikincil hücre bileşenleri glukosinolat ve sülfolipidleri içeren kısmında bulunur (Leustek ve Saito, 1999). Eksikliğinde bazı alglerin hücre bölünmesinde yavaşlama gözlenmesi ile birlikte biyohidrojen üretiminde artış görülmüştür (Melis ve Happe, 2001).

Potasyum, organizma içerisinde birçok göreve sahiptir. Eriyik potasyum katyonu şeklinde bulunarak ozmotik basıncın düzenlenmesini sağlar. Solunum ve fotosentez enzimlerinin aktivasyonunu gerçekleştirir. Asit-baz dengesini sağlamaktan sorumludur ve hücre içi difüzyonda elektriksel potansiyel oluşturur (Taiz ve Zeiger, 2008).

Kalsiyum, hücre içerisinde Ca^{+2} iyonları formunda bulunur. Hücre çeperlerinin sentezlenmesi ve hücre zarının çalışmasında görev alır. Ayrıca organizmanın çevresel etkilere gösterdiği çeşitli tepkilerinin sekonder habercileridir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Magnezyum, hücre içerisinde Mg^{+2} iyon formunda bulunur. Solunum, fotosentez, DNA ve RNA sentezinde görevli enzimlerin aktivasyonunda görev alır. Ayrıca klorofil molekülünün bir kısmını oluşturur. Magnezyumun hücrelerdeki fazlalığı zehir etkisi yapmaktadır (Taiz ve Zeiger, 2008).

İz elementler, alg hücrelerinde 4ppm den daha az miktarda bulunan demir, mangan, kobalt, çinko, bakır, nikel, bor ve kurşun gibi elementlerdir. Çok az miktarlarda besiyeri içerisine konulmasına karşın alglerin büyümesi için çeşitli metabolik fonksiyonlarda görev alırlar (Bruland ve Donat, 1991; Jayasankar ve Polywal, 2000). Demir, redoks özelliğine sahip olmasından dolayı önemlidir. Enzimlerin komponenti olmasının yanı sıra klorofil üretimi için kullanılmaktadır. Bor, hücre yapısına desteklik sağlar. Bakır ve mangan, azot metabolizmasında görev alır. Ayrıca bakır karbohidrat metabolizmasında kullanılırken, mangan da fotosentez metabolizmasında kullanılmaktadır. Molibden, azot fiksasyonundaki enzim sistemlerinde, azot metabolizması, protein sentezi ve sülfür metabolizmasında yer alır. Çinko ise enerji üretimi, protein sentezi ve büyümeyi denetleyen enzim sistemlerinde kullanılır. Ayrıca klorofil biyosentezinde enzim kofaktörü olarak kullanılır (Richmond, 2004).

1.4. Çalışmanın Amacı

Yeryüzünün CO₂ ve O₂ dönüşümünü sağlayan mikroalgler önemli metabolik ürünler sağlamalarından dolayı değerli mikroorganizmalardır. Bu sebeple son yıllarda mikroalgler sanayinin birçok farklı dalında kullanım alanı bulmuştur. Bu yüksek lisans çalışması ile *Scenedesmus regularis* ve *Scenedesmus obliquus* türü kullanılarak ortam element (Azot) konsantrasyonunun değiştirilmesi ile mikroalglerden kaliteli biyolojik yakıt eldesi için uygulanabilecek en uygun stres şartlarının tanımlanabilmesi ve dayandıkları, fizyolojik süreçlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasında; büyüme ortamlarında Azot elementinin hiç bulunmadığı ve 5x konsantrasyonda bulunduğu ortamlarda 20 gün boyunca inkübasyona bırakılan mikroalgler her günlerinde örneklenmiştir. Örneklenen mikroalg hücrelerinin yoğunlukları kayıt edilmiştir. Ayrıca alınan bu örneklerin besi ortamındaki Azot konsantrasyonlarındaki değişiklik iyon kromatografi analizleri ile kontrol edilmiştir. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve GC-FID analizleri ile mikroalglerin ihtiva etikleri triaçilgliserol (TAG) miktarlarındaki değişim belirlenmiştir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Florasans spektrometre	: SpectraMax M5
Gaz Kromatografi- (GC-FID)	: ShimadzuOQ2000
Liyofilizatör	: Christ Alpha 1-2 LD
Fourier Transform Infrared Spektroskobu (FT-IR)	: Vertex V70
Işık Mikroskobu	: Leica
Santrifüj	: VWR Himac CT6E
Ultra mini santrifüj	: VWR Galaxy Ministar
Soğutmalı santrifüj	: VWR Himac CT15RE
Spektrofotometre	: Thermo scientific Genesys
pH metre	: VWR
Hassas terazi	: Precisa XB220A
Otomatik pipetler	: Eppendorf
İklim Dolabı	: Sanyo MLR- 351H
Orbital Çalkalayıcı	: VWR
Isıtıcıli manyetik karıştırıcı	: VWR
Derin Dondurucu (-20 °C)	: Liebherr profiline
Derin Dondurucu (-85 °C)	: Thermo scientific
Otoklav	: Tuttnauer 3870 ELV
Kimyasal kabin	:Köttermann
Bulaşık makinası	: Miele Professional
Çift distile su cihazı	: Sartorius Arium
Tekli su arıtma cihazı	:GFL 2008
VWR Tube Rotator	: VWR
Vortex	:VWR
Steril kabin	: Telstar, PMV
İyon kromatografi	: SHIMADZU
Flow sitometri	: BD FACs ARIA II

2.2. Kültür Ortamları

Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde *Scenedesmus regularis* ve *Scenedesmus obliquus* alg türleri için en uygun besiyerinin Bold's Basal Medium (BBM) olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sebeple yapılan çalışmada kullanılacak olan türlerin stok kültürleri BBM içerisinde hazırlanmıştır. Bu besiyerine ait ortam içerisindeki kimyasal maddeler ve miktarları Çizelge 2,1' de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bold's Basal Medium

<u>Makroelementler</u>		60ml	<u>Alkalın Edta Solüsyonu</u>		1ml
NaNO ₃			EDTA		0,025 g / 0,5ml
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,025 g/10ml		KOH		0,016 g / 0,5ml
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,075 g/10ml		<u>Asitli Demir Solüsyonu</u>		
K ₂ HPO ₄	0,075 g/10ml		FeSO ₄ 7H ₂ O		0,005 g / 1ml
KH ₂ PO ₄	0,175 g/10ml		H ₂ SO ₄		1ml
NaCl	0,025 g/10ml		<u>Boron Solüsyonu</u>		
H ₃ BO ₃	0,014 g/1ml		MoO ₃		0,071 g/100ml
<u>Trace Solüsyonu</u>		1ml	CuSO ₄ 5H ₂ O		0,157 g/100ml
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,882 g/100ml		Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O		0,049 g/100ml
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,144 g/100ml				
936 ml distile suya her solüsyondan yukarıda yazılı kadar eklenerek 1litreye tamamlanmış olup. pH. 6.6 olarak ayarlanmıştır.					

2.2.1. Element manipülasyonu için besin ortamının hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan *Scenedesmus* cinsine ait olan iki tür de içerisinde N makroelementinin hiç bulunmadığı veya 5x konsantrasyonda bulunduğu besiyeri ortamında 22 °C sıcaklık ve 100 PAR ışık şiddeti altında

20 gün süresince sıvı ortamda 120 rpm devirde çalışan çalkalayıcı kabin içerisinde inkübasyona bırakılmıştır.

Bu araştırmada mikroalglerde maksimum miktarda yağ sentezlenmesini sağlamak için üretimde kullanılacak olan BBM besi yeri içindeki azot miktarı değiştirilmiştir. Böylelikle N makro elementinin hiç bulunmadığı ve 5 kat fazla N ortamlar iki tekrarlı setler olacak şekilde büyüme ortamları hazırlanmıştır.

2.2.2. Ekim için hücre sayımı

Alglerin farklı sürelerde sayımı için kontrol ortamında inkübasyona bırakılan 4 günlük mikroalg kültüründen 100µl alg solüsyonu alınıp hücre sayım cihazı ile sayımları yapılmıştır. Dilüsyon oranı hesaba katılarak stok hücre konsantrasyonu hesaplanmıştır. Başlangıç hücre konsantrasyonu 3×10^4 olacak şekilde hesaplama yapılarak stok kültürden ne kadar hacimde hücre çözültisi alınacağı bulunmuştur ve stok ortamdan yeni hazırlanmış olan ortamların her birine çıkan değer kadar örnek aktarılmıştır. 20 günlük inkübasyon süresi boyunca örneklenen alglerin bölünme zamanlarının (büyüme hızlarının) belirlenmesi amacı ile spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbanları ölçülerek kaydedilmiştir.

2.3. Kültür üretim sistemi (Fotobiyoreaktör)

Kültürü yapılan alg türlerinin besiyerleri 20 litrelik otoklavlanabilen cam damacanalara içerisine hazırlanmıştır. Hava girişi sağlama ve örnek alma amacıyla 0,7 x 250 mm ve 0,7 x 400 mm' lik, hava çıkışını sağlamak için ise, 0,7 x 80 mm'lik iki adet cam boru eklenerek kültür kontaminasyonunu önlemek için uçlarına 0,2 µm'lik PTFE filtreler takılmıştır (Şekil 2.1). Çevresel kontaminasyon riski filtre yardımı ile engellenen besiyer ortamı içerisindeki kontaminasyonu engellemek için ise 121 °C'de 20 dakika süresince otoklav cihazı ile sterilizasyonu sağlandıktan sonra kültür aşılması

gerçekleştirilmiştir. Algal çoğalma aşaması iklimlendirme odası içerisinde sürdürülmüştür. Bu oda içerisinde üretimi besleyen hava yaklaşık 1L/dk ve sıcaklık ortalama 25 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde çift taraflı aydınlatma kullanılmıştır. Aydınlatmalar 16 saat açık 8 saat kapalı olacak şekilde oluşturulan iklim kabininde üretim sağlanmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Kültürlerde kullanılan fotobiyoreaktör fotoğrafı



Şekil 2.1. İklim kabinindeki fotobiyoreaktörlerde alg üretimi

2.4. Stok Kültür Hazırlanması

Kapulukaya Baraj suyundan örnek (5 litre) alınıp 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu süpernatant kısmı dökülerek elde edilen dip pelleti 1ml gölet suyu eklenip karıştırılarak süspansiyon edilmiştir. Daha sonra alevde steril edilmiş öze yardımcı ile petrilere hazırlanan katı besiyerlerine çizgi ekim yapılmıştır. Kenarları hava almayacak şekilde parafilmle kapatılıp iklim kabinine alınan petrilere uygun sıcaklık ve yeterli ışık altında üremeye bırakılmıştır. Bu işlemler monoalgial ve aksenik koloniler elde edilene kadar devam ettirilmiştir. Bu şekilde elde edilen türler sterilizasyonu yapılmış olan ve ağzları pamuk üzerine alüminyum folyo sarılarak kapatılmış 250 ml'lik erlenler içerisinde ki sıvı besiyer ortamına aktararak deneylerde kullanılacak aşıkültürleri oluşturulmuştur (Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Deneylerde kullanılan aşı kültür örnekleri

2.5. Türlerin Hasat İşlemi

Üreme grafiği oluşturulan kültürler durgun faz durumuna geçtiklerinde 3000 rpm'de 4 dakika süresince santrifüj edilerek üstte kalan besiyeri dökülüp elde edilen dip çöküntüsü 1,33 Pa altında -83°C'de 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyonu sağlanan numuneler deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir (Richmond, 2004).

2.6. Toplam nötral lipid tayini

Mikroalglerde toplam nötral lipid içeriğinin miktarsal olarak belirlenmesi için 750 nm dalga boyunda tüm numunelerin absorbansı 0,2 olacak şekilde hacimlendirilmiştir. Daha sonra bir miktar alg çözeltisi alınıp son konsantrasyonu 0,26 μ M olacak şekilde Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one) boyası ile 15 dk boyunca inkübe edilip, 5000 rpm'de 3dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Süpernatan kısmı atılıp örneklerin her biri BBM mediumla yıkanıp vortekslenmiştir. Nile red ile boyanan örneklerin her biri 490 nm eksitasyon ve 585 nm emisyon değerleri kullanılarak floresans özelliği bulunan spektrofotometre cihazı ile absorbans değerlerine bakılarak lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler tayin edilmiştir (Fedorov vd., 2005).

2.7. FTIR analizi

Bu yöntem, moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçer ve kızıl ötesi (IR) radyasyonun absorpsiyonu ile moleküldeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi verir. Bu araştırmada, FTIR ölçümü Dean vd. (2010), tarafından tarif edildiği şekilde yapılmıştır.

FTIR ölçümü için deney süresince Azot elementinin hiç bulunmadığı veya 5x konsantrasyonda bulunduğu ortamlarda inkübasyona bırakılan ve inkübasyonun 20. gününde örneklenen mikroalglerin yoğunlukları 750 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerlerine bakılarak absorbans değeri 0.2'den düşük olanlardan daha fazla (1 ml'nin üzerinde) ve 0.2'den yüksek olanlardan daha düşük (1 ml'nin altında) hacimde olacak şekilde eşitlenmiştir. Eşit yoğunlukta alınan mikroalgler 3 kez 4°C' de ve 5000 rpm devir hızında 3dk boyunca santrifüjlenip süpernatan atılarak yıkama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra içerisi 45°C'ye ayarlanmış vakumlu inkübatörde mikroalglerin buldukları ependoflardaki su tamamen buharlaşınca kadar inkübe edilip FTIR cihazına yerleştirilmiştir. Cihaza yerleştirilen örneklerden 4000-400 cm^{-1} arası absorbans ölçümü ile elde edilen değerler toplanmıştır. Her bir örneğin

ölçümü için 32 tarama ortalaması kullanılmıştır. Çevresel koşullardan en az etkilenen absorpsiyon bandı olan Amid 1 (1652 cm^{-1}) değeri doğrulama değeri olarak seçilmiştir. Triaçilgliserol (1744 cm^{-1}) değerleri Amid 1 değerlerine bakılarak mikroalglerdeki triaçilgliserol konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikler tespit edilmiştir (Movasaghi vd., 2008).

2.8. FAMEs analizi

Azot konsantrasyon değişikliğine cevapta mikroalglerin yağ asidi profillerinde meydana gelen değişimin belirlenebilmesi amacıyla FAMEs analizi gerçekleştirilmiştir. Yağ asidi ekstraksiyonu, metilleştirilmesi ve analizi için Xu vd. (2010), tarafından önerilen yöntemin modifiye edilmiş hali uygulanmıştır.

- a. Büyüme ortamından sürekli çöktürerek elde edilen yaklaşık 0.1 g mikroalg örneği vida kapaklı eppendorf tüplerine alınmıştır, saf su ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra üzerine 300 μl ekstraksiyon solüsyonu (metanol içerisinde hazırlanmış %2'lik H_2SO_4 çözeltisi) eklenmiştir.
- b. Örnekler 2 saat boyunca $80 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta sonikasyon işlemine tabi tutularak hücrelerin parçalanması ve lipidlerin açığa çıkması sağlanmıştır
- c. İnkübasyon sonrasında örnekler 10 dk oda şartlarında bekletilmiş ve sıcaklığın düşmesi sağlanmıştır
- d. Tüplerin içerisine 300 μl %0.9 konsantrasyonda NaCl ve 300 μl hekzan ilave edilmiştir ve bu sayede metanolde bulunan lipidlerin hekzan fazına geçmesi için örnekler 1'er dakika boyunca vortekslenmiştir.
- e. Daha sonra örnekler 3 dk boyunca $20 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 5000 g devir hızında santrifüjlenmiştir.
- f. İşlem sonucunda oluşan üstteki hekzan tabakası GC-FID tüplerine aktarılmıştır. Tüplere aktarılan örneklerin analizi GC-FID

cihazında yapılmıştır. Ölçüm için cihaza 130°C başlangıç sıcaklık, 240°C ye kadar her 5°C de 5 dk beklenmesi talimatı işlenmiştir.

- g. Ölçüm sonucu elde edilen pikler analiz edilmiş, alan hesaplaması yapılarak belirlenen metil esterlerin yüzdeleri oransal olarak sunulmuştur.

2.9. Flow Sitometri analizi

Flow sitometri, süspansiyon halindeki hücre veya partiküllerin lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilip hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyallerin toplanması prosesine dayalı analizdir. Flow sitometri cihazı nötral lipid miktarındaki değişimi gözlemlemek için lipid bağımlı floresanı (nile red floresans) takip etmek amacıyla kullanılmıştır.

Numuneler, 1.0 ve 1.2 arasında hücre yoğunluğu olacak şekilde seyreltildi ve daha sonra % 0.35 etanol içinde seyreltilmiş 0.4 ug / ml'de Nile Red kullanılarak nötral lipidler boyanmıştır. Beş dakikalık karanlık inkübasyondan sonra, örnekler flow sitometri'de analiz edilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

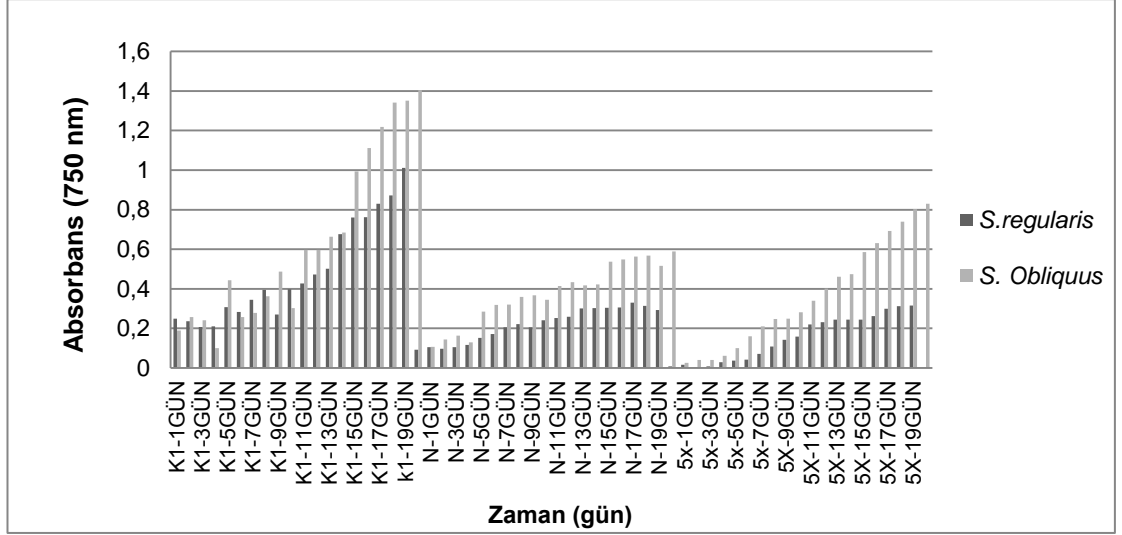
Bu çalışmada besiyeri içerisindeki makro moleküllerden olan azotun konsantrasyonudeğiştirilerek *Scenedesmus obliquus* ve *Scenedesmus regularis* türlerinde stres oluşturulmuştur. Stres sonucunda iki türün büyüme miktarları, yağ asidi içerikleri, yağ asidi miktarları ve nötral lipit miktarında meydana gelen farklılıklar grafiklerle açıklanmıştır.

3.1. Türlerin Optik yoğunluk (OD) miktarındaki değişim

Bu çalışmada *Scenedesmus obliquus* ve *Scenedesmus regularis* türlerine azot açlığı ve azot artırımı olmak üzere iki farklı muamele uygulanmıştır. Yirmi gün boyunca inkübasyona bırakılan ve her gün örneklenen mikroalglerin büyüme miktarları 750 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerlerine göre ölçülmüştür. *S.regularis* ve *S.obliquus* kültürlerine uygulanan bu muamelelerin büyüme miktarının izlenmesinde kullanılan OD üzerinde önemli etkisinin olduğu gözlemlenmiştir.

Algal büyüme grafiklerinde dört ayrı evre görülmesi gerekir. Bunlardan birincisi hücrelerin ortama alıştığı üremenin olmadığı ya da çok az miktarlarda olduğu lag fazı, ikincisi üremenin hızla artış gösterdiği log fazı, üçüncüsü çoğalan hücre miktarı ile ölen hücre miktarının eşit olduğu duraklama fazı, dördüncüsü ise hızlı hücre ölümlerinin görüldüğü ölüm fazıdır.

Çalışılan iki tür için de büyüme grafiklerine bakıldığında türlerin kontrol gruplarında ilk beş gün içerisinde lag fazında olduğu, beşinci günden itibaren log fazına, on sekizinci günden itibaren ise durgun faza geçtiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.2., Şekil 3.3.).

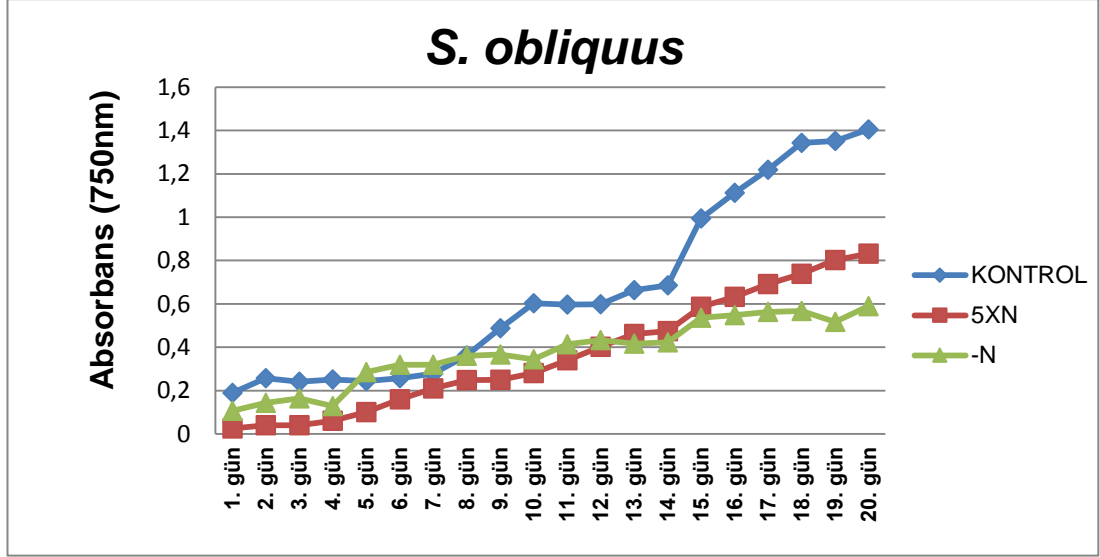


Şekil3.1. *S.regularis* ve *S.obliquus* türlerinin 20 günlük OD grafiği

Şekil 3,1’de görüldüğü üzere *S.regularis* ve *S.obliquus* türlerinde, kontrol grubuna göre azot açlığı ve azot tokluğu grubunda farklılıklar meydana gelmiştir. İncelenen iki türünde kontrol grubuna göre azot açlığı ve azot artırımı muamelelerinin büyüme miktarlarında baskılanmaya neden olduğu gözlenmiştir.

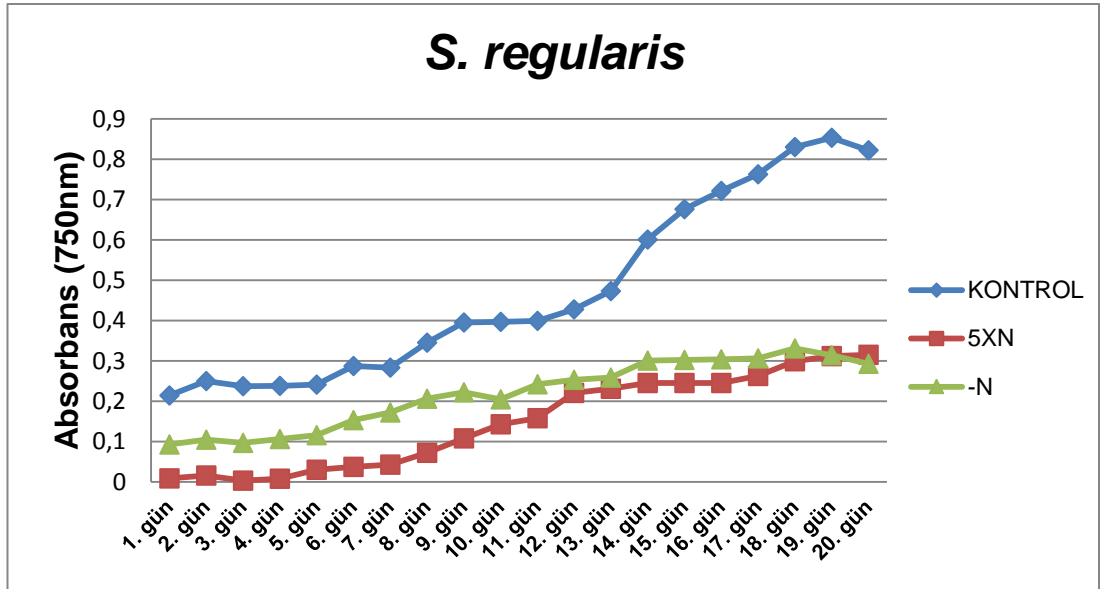
Çalışılan tüm gruplarda *S.regularis* türünün, *S.obliquus* türüne göre daha hızlı büyüme gerçekleştirdiği ve biyokütle miktarının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.1.).

S.regularis ve *S.obliquus* türlerine uygulanan muamelelerde büyüme değerleri diğer gruplar ile karşılaştırıldığında en az büyümenin açlık grubunda olduğu görülmüştür (Şekil 3.2., Şekil 3.3.).



Şekil 3.2. *S.obliquus* türüne ait kontrol, azot açlığı ve azot tokluğu büyüme grafiği

S.obliquus türünün kontrol grubunda büyüme miktarı 0,2-1,4 aralığında, azot açlığı uygulanan grupta 0,1-0,5 aralığında, azot artırımı uygulanan grupta ise 0-0,8 aralığında büyüme sergilediği gözlemlenmiştir (Şekil.3.2.).



Şekil 3.3. *S.regularis* türüne ait kontrol, azot açlığı ve azot tokluğu büyüme grafiği

S.regularis türünün kontrol grubunda büyüme miktarı 0,2-0,9 aralığında, azot açlığı uygulaması olan grupta 0-0,35 aralığında, azot artırımını uygulanan grupta 0-0,3 aralığında büyüme sergilemiştir (Şekil.3.3.).

S.regularis'in azot açlığı ve azot tokluğu gruplarında duraklama fazında absorbans değeri yaklaşık olarak aynı iken, *S.obliquus* türünde azot açlığı uygulanan gruptaki büyüme miktarının azot tokluğu uygulanan gruptan daha az olduğu görülmektedir (Şekil.3.2, Şekil 3.3.).

3.2. Nötral lipid içeriğinde meydana gelen değişimler

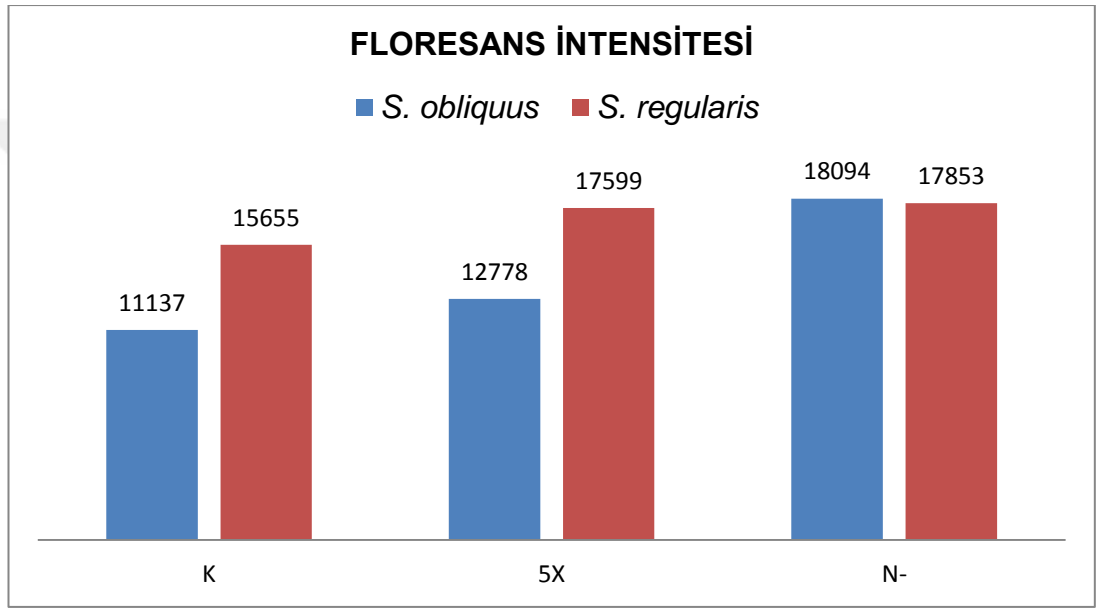
Mikroalgler stres koşullarına metabolik cevap olarak bünyelerindeki yağ miktarını özellikle de depo lipitler olarak bilinen nötral lipid formunda biriktirdikleri bilinmektedir. Bu sebeple nötral lipid miktarında meydana gelen değişimler floresans spektroskopisi ve flow sitometri cihazları ile gözlemlenmiştir.

3.2.1. Floresans spektroskopisi cihazı ile elde edilen nötral lipid bulguları

Besiyeri içeriğinde yüksek konsantrasyonlarda Azot bulunması, azotun rol aldığı protein metabolizması, iyon taşınımı ve fotosentez gibi olayların hızlanmasına bunun sonucunda hücreler redoks homeostazisinin dengede kalması için gerekenden fazla enerji formunun (nişasta, lipid) depolanmasıyla da mikroalglerde lipid içeriğinin artmasına sebep olduğu literatürdeki çalışmalarla öngörülmüştür (Çakmak, 2014).

İnkübasyonun yirminci gününde örneklenen mikroalglerin nötral lipid içeriğine bakıldığı zaman azot açlığı ve azot tokluğu uygulanan gruplarda kontrole nazaran daha fazla miktarda nötral lipid olduğu gözlemlenmiş ve bu sonucun literatür ile uyumlu olduğu göstermiştir (Çakmak,2014).*S.obliquus* türünde kontrol, azot açlığı, azot tokluğu gruplarındaki nötral lipid miktarı sırasıyla 11137nm, 18094nm, 12778nm iken, *S.regularis* türünde 15655nm, 17853nm, 17599nm olarak ölçülmüştür (Şekil 3.4).

S.regularis ve *S.obliquus* türlerinin ikisinde de en çok nötral lipid miktarı azot açlığı uygulanan grup iken nötral lipitin en az miktarda olduğu grup kontrol grubu olarak bulunmuştur. Nötral lipid miktarındaki azot açlığı ve azot tokluğu arasındaki fark *S.regularis* türünde düşük seviyelerde görülürken, *S.obliquus* türünde ise azot açlığı grubu kontrol ve azot tokluğu arasındaki fark yaklaşık %30 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.4). Türler arasında ki bu farklılık türlerin metabolik ve sitokiyometrik özelliklerinin çeşitliliğinden kaynaklandığı öngörülmektedir.



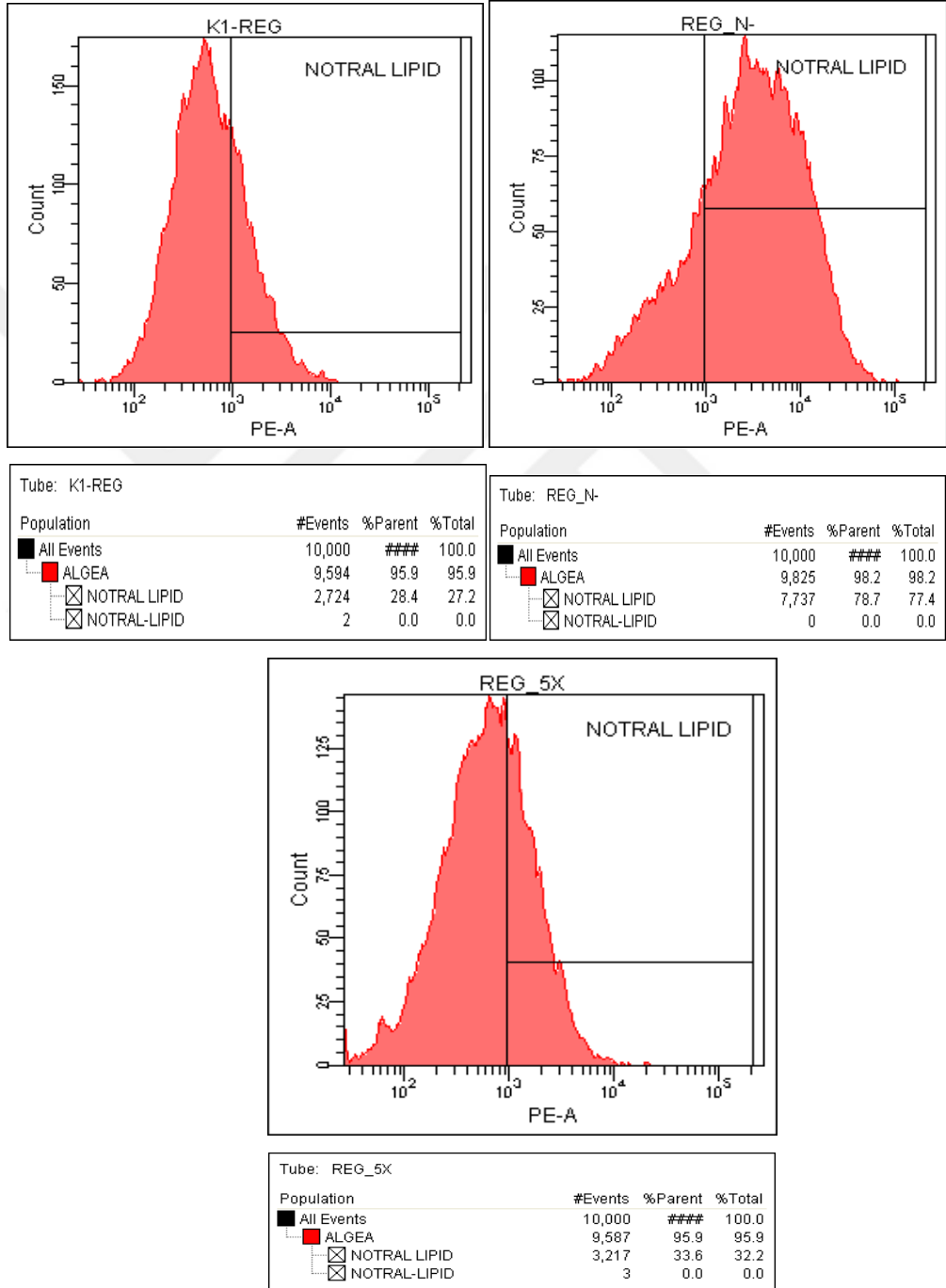
Şekil 3.4. *S.obliquus* ve *S.regularis* türlerinin kontrol, azot açlığı ve azot tokluğu gruplarına ait nötral lipid miktarları

3.2.2. Flow sitometri cihazı ile elde edilen nötral lipid bulguları

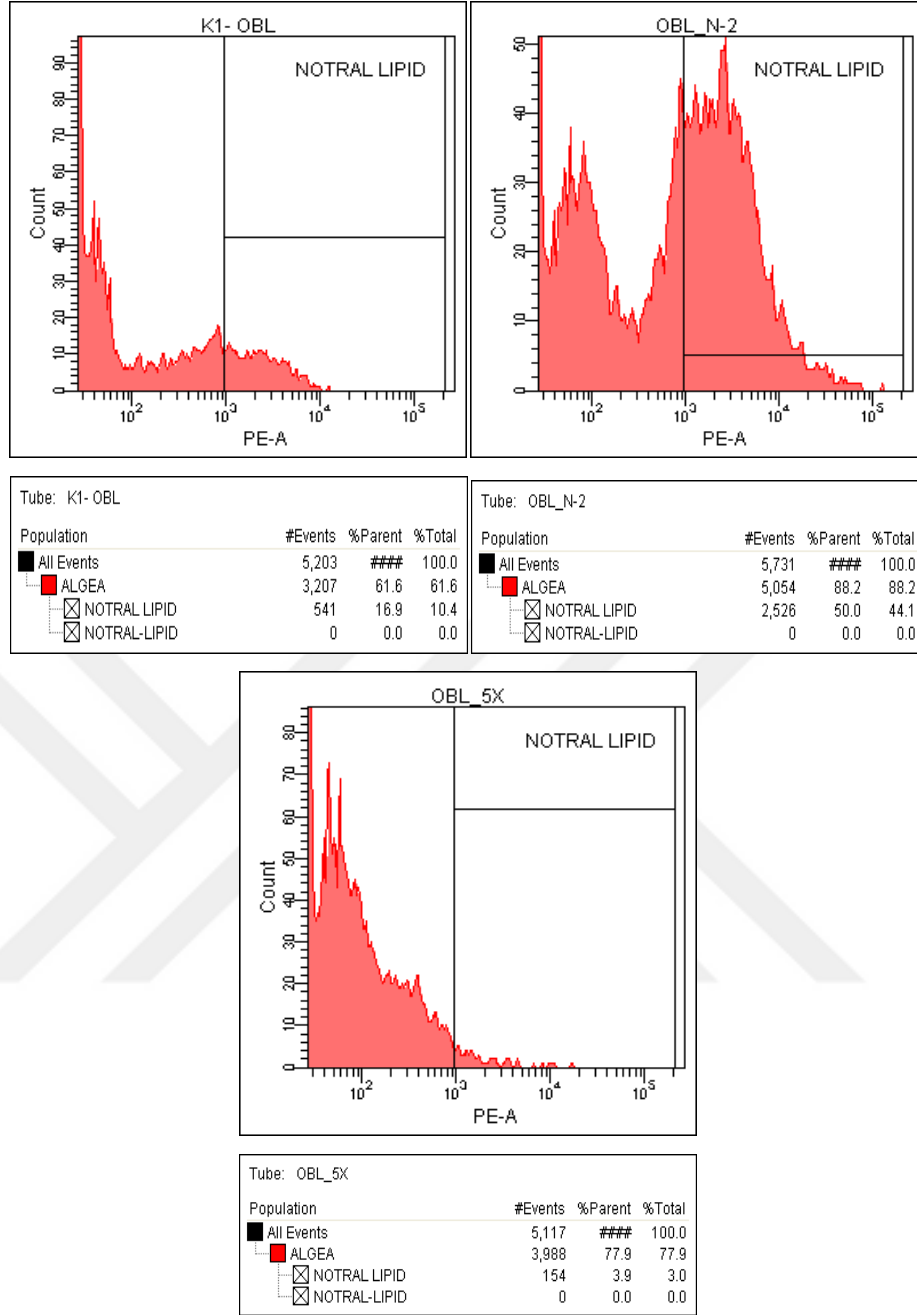
Flow sitometri cihazı nile red floresans boyası ile boyanan nötral lipid miktarındaki değişimi takip etmek amacıyla kullanılmıştır (Cabanelas vd., 2016).

Flow sitometri verileri incelendiğinde *S.regularis* ve *S.obliquus* türlerinde en çok nötral lipid miktarı azot açlığı grubunda gözlemlenmiştir (Şekil 3.6, Şekil 3.7.).

S.regularis türünün kontrol, azot açlığı grubu ve azot tokluğu gruplarında nötral lipit miktarları sırasıyla %27.2, %77.4, %32.3 bulunmuştur. *S.regularis* türünün azot açlığı ve azot tokluğu uygulanan gruplarında kontrol grubuna göre nötral lipit oranında artış olduğu (Şekil.3.6)'da gösterilmiştir. *S.obliquus* türünün kontrol grubunda nötral lipit oranı %10.4, azot açlığı grubunda %44.1, azot tokluğu grubunda %3.0 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.7.).



Şekil 3.5. *S.regularis* kontrol, azot açlığı ve azot tokluğu gruplarına ait nötral lipit flowsitometri kromatogram



Şekil 3.6. *S.obliquus* kontrol, azot açlığı, azot tokluğu gruplarına ait nötral lipid flowsitometri kromatogramı

Floresans spektroskopisi ile tüm gruplarda tespit edilen nötral lipit miktarları flow sitometri cihazında da benzer değerlerde ölçülmüştür. Yalnızca *S.obliquus* türünün azot tokluğu grubundaki nötral lipit miktarı, kontrol grubuna göre düşük değerde bulunmuştur (Çakmak,2014).

Floresans spektroskopisi ve flow sitometri cihazları metod olarak karşılaştırıldığında iki cihazında nötral lipit miktarı ölçümlerinin birbirleri ile tutarlı sonuçlar verdiği literatürde bilinmekle olup, yapılan çalışma ile de tespit edilmiştir.

Nötral lipit boyaması için kullanılan Nile red boyası floresans spektroskopisi cihazı için önerilmiş olmasına karşın çalışmamızda flow sitometri analizi için de kullanılmış ve benzer sonuçlar elde edilmesinden dolayı flow sitometri cihazında nötral lipit bakılması için uygun olabileceği öngörülmüştür.

3.3. Yağ asidi profilinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi

Azot elementinin hiç bulunmadığı ve Azot elementinin 5x konsantrasyonda bulunduğu ortamlarda inkübasyona bırakılan mikroalglerin yağ asidi profillerinde meydana gelen değişimlerini belirlemek amacı ile inkübasyonun 20.gününde alınan örnekler GC-FID cihazı ile incelenmiştir.

S.regularis ve *S.obliquus* türlerine ait çalışılan grupların yağ asidi profili çizelge 3,1'de verilmiştir. Ayrıca bu gruplara ait toplam SFA, MUFA, PUFA sonuçları ek olarak gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre *S.regularis* türüne ait FAME profilinin çalışılan gruplara göre meydana gelen değişimleri, kontrol grubunda kaprilik asit (SFA) gözlenmezken, tokluk grubunda yaklaşık %4,98 oranında artışla gözlenmiştir. Palmitoleik asit (MUFA) kontrol grubunda gözlenmezken, tokluk grubunda yaklaşık %7,53 oranında artışla gözlenmiştir. Elaidik asit (MUFA) kontrol grubunda gözlenmezken azot açlığı uygulanan grupta %0,16 oranında artış göstermiştir. Cis-11 eikosanoik asit (MUFA) kontrol grubunda gözlenmezken açlık grubunda %8,26, tokluk grubunda ise %5,50 oranında artış gözlemlenmiştir. Behenik asit (SFA) kontrol ve Azot açlığı uygulanan gruplarda gözlenmezken Azot artırımı uygulanan grupta %8,77 oranında artış gözlemlenmiştir. Tikosanoik asit (SFA) kontrol grubunda gözlenmezken açlık grubunda %2,86, tokluk grubunda ise %3,79 oranında artış göstermiştir. Laurik asit (SFA) tokluk grubunda gözlenmezken açlık grubunda %7,68 oranında gözlemlenmiştir. Pentadekanoik asit (SFA)

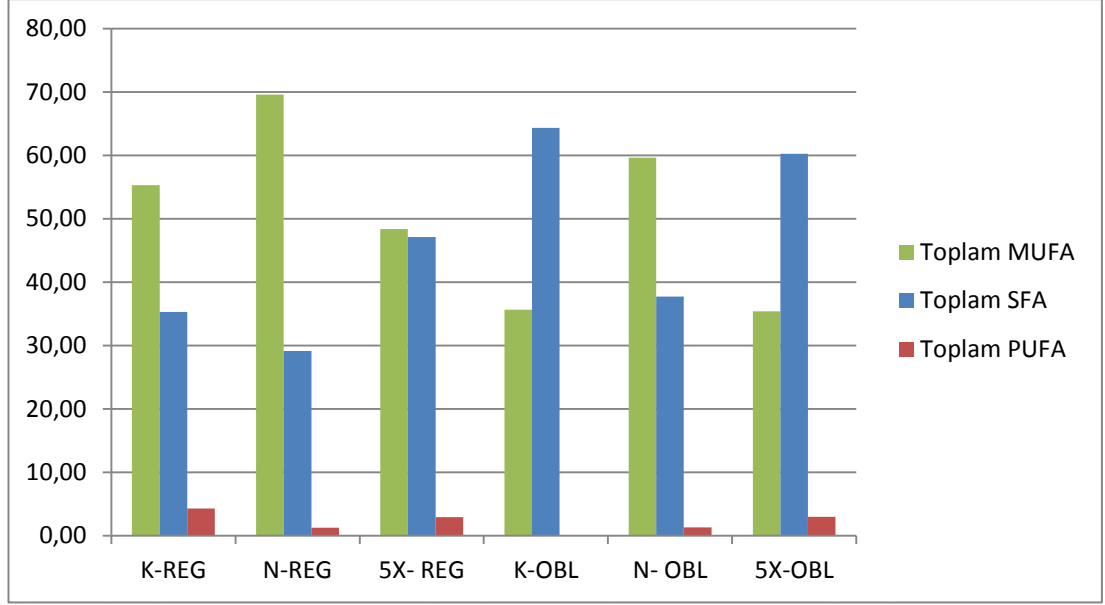
azot açlığı uygulanan grupta görlümezken tokluk grubunda %4,48 oranında artmıştır. Cis-10-heptadecanoik asit (MUFA) kontrolde gözlenmezken açlıkta eser miktarda toklukta ise %4,48 oranında artış göstermiştir.

S.obliquus türünde tridekanoik asit (SFA) kontrol grubunda gözlenmezken tokluk grubu ve açlık grubunda sırasıyla %6,69, %0,31 oranlarında artış göstermiştir. Myristik asit (SFA) miktarı kontrol ve açlık gruplarında bulunmazken azot tokluğu uygulanan grupta %3,07 oranında oluşum göstermiştir. Cis-10-heptadecanoik asit (MUFA) kontrol grubunda gözlenmezken, açlık ve tokluk gruplarında sırasıyla %1,38, %2,31 oranında oluşum göstermiştir. Ayrıca stearik asit, elaidik asit, oleik asit, linoleik asit, linoleaidik asit, arakidik asit, gamalinolenik asit, henekosanoik asit miktarları açlık ve tokluk grubunda eser miktarda oluşum göstermiştir. Nervonik asit (MUFA) miktarı kontrol grubunda gözlenmezken açlık grubunda %35,77 oranında artış sergilemiştir (Çizelge 3.1.).

Çalışılan iki türün kontrol grubu dahil deney gruplarının hepsinde SFA ve MUFA değerleri PUFA değerinden fazla bulunmuştur. Ayrıca tüm gruplarda SFA ve MUFA toplamının %75'den yüksek olduğu, PUFA değerlerinin ise %4'den az olduğu gözlemlenmiştir. Linolenik asit miktarı çalışılan tüm gruplarda %12'den az bulunmuştur (Çizelge 3.1.). Bu sebeple *S.regularis* ve *S.obliquus* türlerinin tüm gruplarının biyodizel kalitesi açısından kullanılabilirliği öngörülmüştür.

Çizelge 3.1. S.regularis ve S.obliquus türlerinin FAMEs içeriklerinde meydana gelen miktarsal değişimler.

	YAPISI	K-REG	N-REG	5X- REG	K-OBL	N- OBL	5X-OBL
butyric acid	SFA	0,93	0	0	2,23	1,28	2,07
caprylic acic	SFA	0	0	4,98	55,37	30,2	39,63
capric acid	SFA	0	0	0	1,59	0	0
undecanoic acid	SFA	1,85	0	1,7	0	0	0
lauric acid	SFA	6,43	7,68	0	5,14	5,39	5,54
tridecanoic acid	SFA	1,51	1,12	1,58	0	0,31	6,69
myristic acid	SFA	0,61	0	0	0	0	3,07
myristoleic acid	MUFA	9,32	23,53	7,22	26,12	16,56	19,33
pentadecanoic acid	SFA	0,99	0	4	0	0	0
cis-10-pentadecanoic acid	MUFA	0	0,18	4,48	0	0	0
palmitic acid	SFA	1,76	0	0,57	0	0	0
palmitoleic acid	MUFA	0	0	7,53	9,55	3,98	8,34
heptadecanoic acid	SFA	3,78	0,12	5,34	0	0,16	0
cis-10-heptadecanoic acid	MUFA	2,12	0	6,14	0	1,38	2,31
stearic acid	SFA	5,16	6,21	4,82	0	0,07	0
Elaidic acid	MUFA	0	0,16	0	0	0,85	1,48
oleic acid	MUFA	5,57	7,71	6,19	0	0,13	0,79
linolelaidic acid	PUFA	1,48	0	0,62	0	0,51	1,2
linoleic acid	PUFA	0,21	0	0	0	0	0,2
arachidic acid	SFA	7,61	9,1	4,58	0	0,33	3,15
gama-linolenic acid	PUFA	5,12	0	0,09	0	0,79	1,33
cis-11eicosenoic asid	MUFA	0	8,26	5,5	0	0,96	3,17
linolenik asit	PUFA	0	0	0	0	0	0,92
heneicosanoic acid	SFA	4,65	2,04	7,01	0	0	0,11
behenic acid	SFA	0	0	8,77	0	0	0
cis-8,11,14-eicosatrienoic acid	PUFA	0	0	1,49	0	0,52	0
erucic asid	MUFA	4,37	5,69	6,09	0	0	0
arachidonic asid	PUFA	0	0	0	0	0	0
Cis-11,14,17-eicosatrienoic acid	PUFA	0	0	0	0	0	0
tricosanoic asid	SFA	0	2,86	3,79	0	0	0
cis-13,16- docosadienoic acid	PUFA	0	0,62	0,17	0	0,06	0
cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoicate	PUFA	2,58	0	1,19	0	0,74	0,67
nervonic asid	MUFA	33,94	24,09	5,22	0	35,77	0
cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoicate	PUFA	0	0,61	0,94	0	0	0
	Toplam SFA	35,28	29,14	47,14	64,34	37,74	60,28
	Toplam PUFA	4,27	1,23	2,91	0	1,31	2,99
	Toplam MUFA	55,34	69,63	48,37	35,66	59,64	35,41



Şekil.3.7. *S.regularis* ve *S.obliquus* türlerinin kontrol, azot açlığı ve azot tokluğu gruplarındaki MUFA, PUFA, SFA miktarları

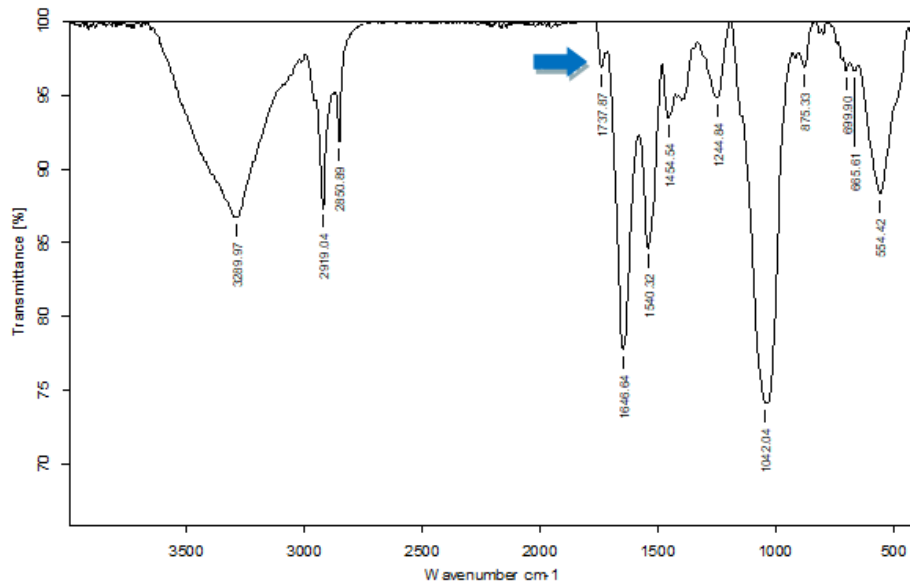
Araştırma sonucunda *S.regularis* türünün SFA ve MUFA toplamaları kontrol grubu, azot açlığı grubu ve azot tokluğu grubunda sırasıyla %90,62, %98,77, %95,51 olarak ölçülmüştür. *S.obliquus* türünün SFA ve MUFA toplamaları kontrol grubu, azot açlığı grubu ve azot tokluğu grubunda sırasıyla %100, %97,38, %95,69 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.3., Şekil 3.4.). *S.regularis* türünün Azot açlığı ve Azot tokluğu gruplarındaki SFA ve MUFA toplamı, kontrol gruplarına göre artış gözlenirken; PUFA oranı azalma göstermiştir. *S.obliquus* türünün Azot açlığı ve Azot tokluğu gruplarındaki SFA ve MUFA toplamı kontrol gruplarına göre azalma gösterirken; PUFA oranı artış göstermiştir (Şekil 3.4).

3.4. Alglerdeki organik bileşiklerin FTIR spektroskopisi ile izlenmesi

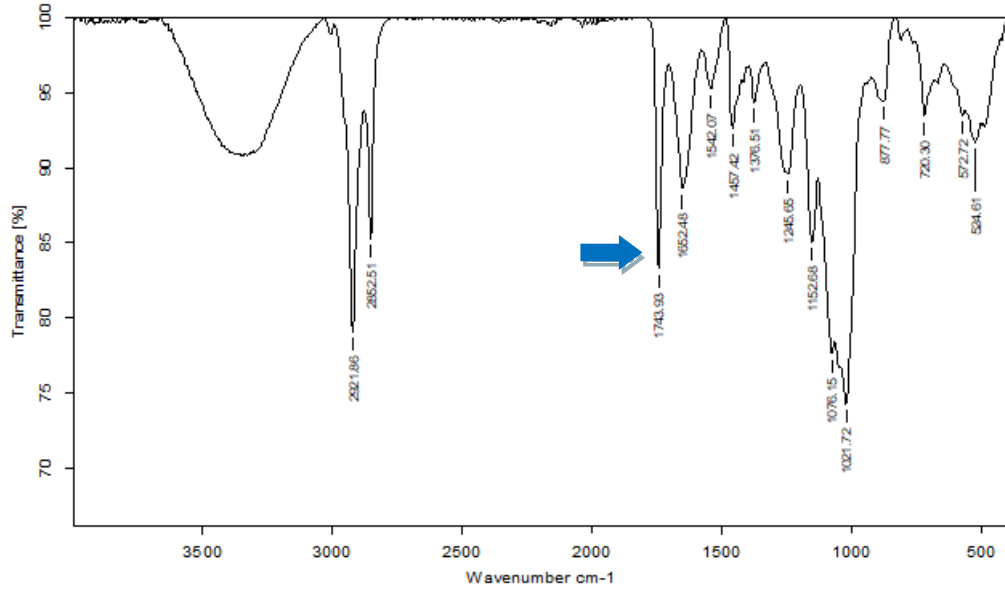
Alglerdeki organik bileşiklerin izlenmesi, özellikle de TAG değişimlerini gözlemlemek için FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. FTIR spektroskopisi ile yapılan ölçümlerde elde edilen spektrumlarda 1700 ve 1750 cm⁻¹ arasındaki bölge lipid esterleri, 1477 ve 1590 cm⁻¹ arasındaki bölge protein moleküllerini (amid I ve amid II), 1000 ve 1200 cm⁻¹ arasındaki bölge ise karbonhidrat molekülleri hakkında bilgi verdiği bilinmektedir. Lipid esterleri bölgesinin spesifik TAG piki 1744 cm⁻¹'dir (Pictorius vd., 2008).

Biyodizel için önemli olan manüplasyon uygulanan gruplardaki TAG pikinin değişimi izlenmiştir. Çalışılan iki tür içinde kontrole göre manüplasyon gruplarında değişimler olduğu gözlenmektedir.

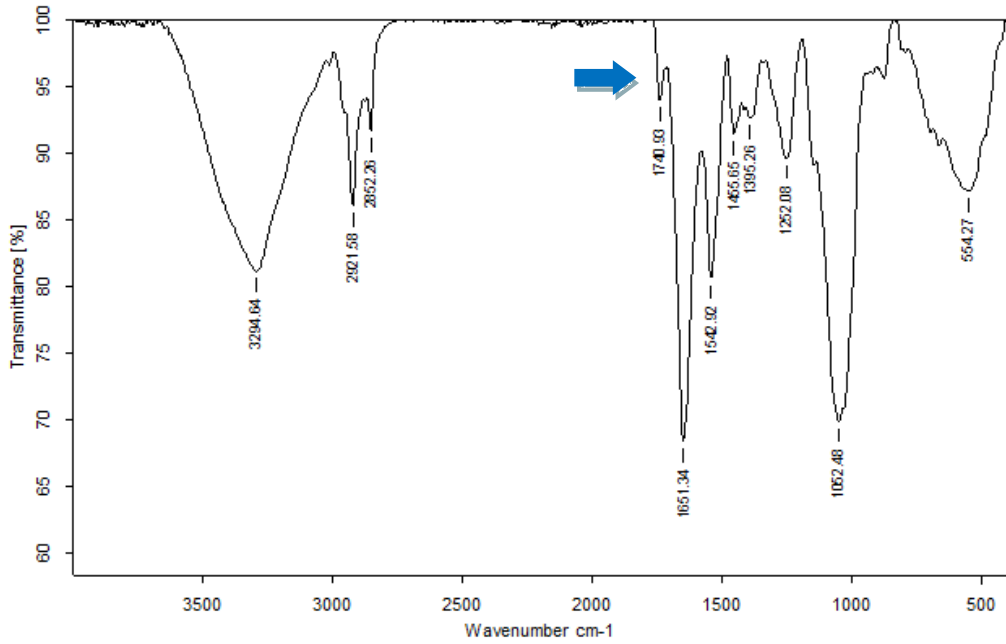
S.regularis ve *S.obliquus* türlerinin kontrol gruplarındaki TAG pik şiddeti azot açlığı uygulanan gruplarda en fazla artışı gösterirken, azot tokluğu uygulanan gruplarda ciddi bir fark göstermemiştir (Şekil.3.8., Şekil 3.9., Şekil.3.10., Şekil 3.11., Şekil 3.12., Şekil 3.13.).



Şekil3.8. *S.regularis* kontrol grubuna ait FTIR spektrumu

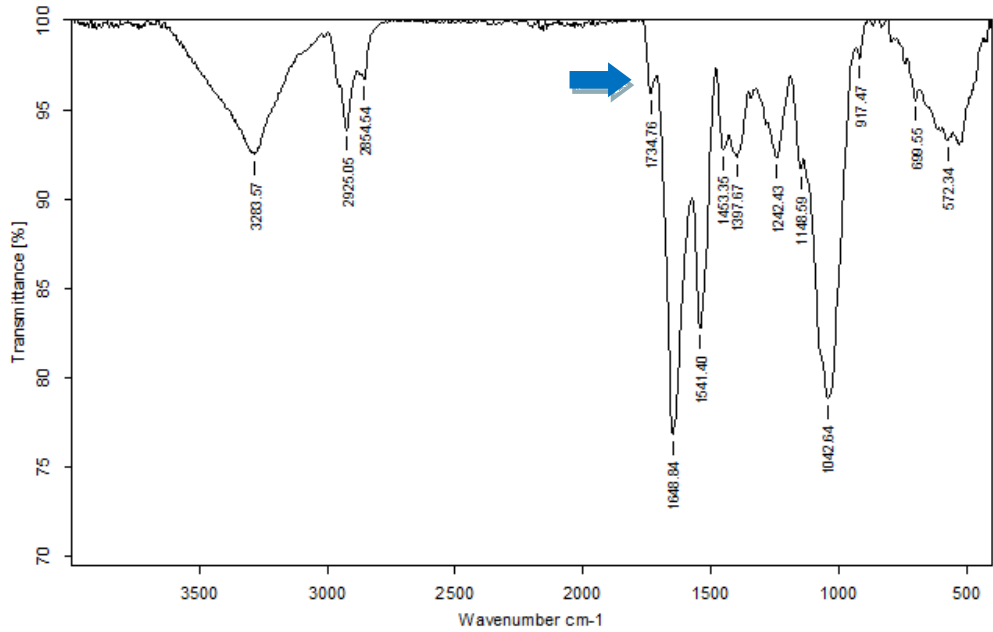


Şekil 3.9. *S.regularis* azot açlığı uygulanan gruba ait FTIR spektrumu

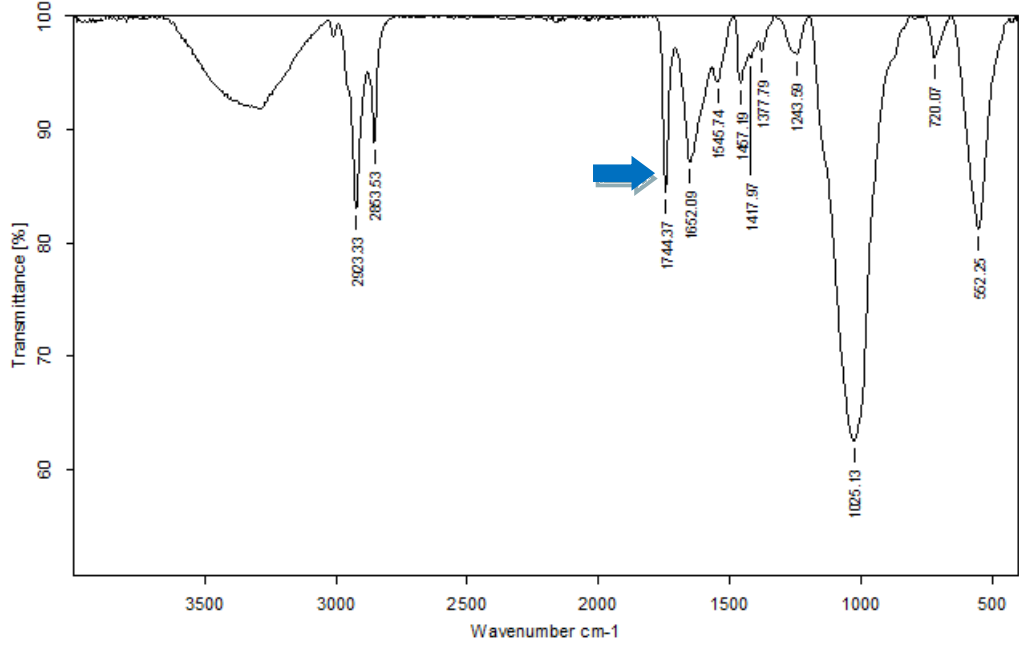


Şekil 3.10. *S.regularis* azot yüklemesi yapılan gruba ait FTIR spektrumu

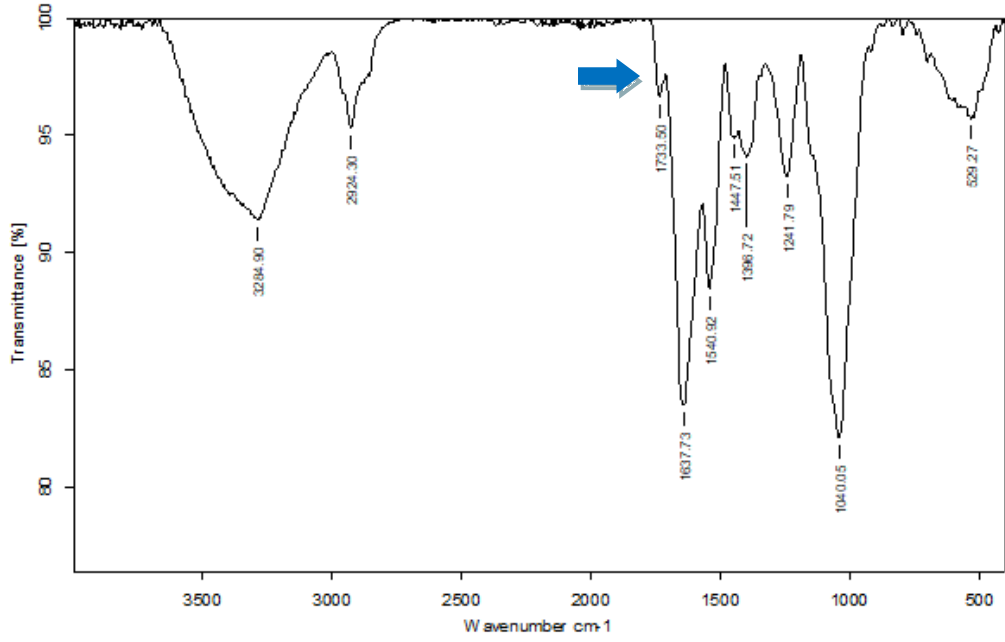
Tezin giriş bölümünde de belirtildiği gibi algler protein içeriği bakımından zengin canlılardır ve *S.regularis* türünün kontrol grubunda protein piklerini belirten 2 ile işaretlenmiş bölgedeki pik şiddeti bu sebeple yüksek görülmektedir (Şekil 3.8). *S.regularis* türünün azot açlığı uygulanan grubunda ise strese maruz bırakılan canlının savunma mekanizması olarak protein miktarında azalma gösterdiği fakat 1744 cm⁻¹ de gözlenen TAG pik şiddetinin kontrol grubuna göre yaklaşık %10 luk artış oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.9.). *S.regularis* türünün azot tokluğu uygulanan grubunda ise kontrole nazaran TAG pik şiddetinde anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak alglerin bünyesinde bulunan karbohidrat ve proteinleri azot açlığı uygulandığında öncelikli olarak kullandığı ve TAG formunda yağ asidi olarak depoladığı söylenebilir.



Şekil 3.11. *S.obliquus* kontrol grubuna ait FTIR spektrumu



Şekil 3.12. *S.obliquus* azot açlığına ait FTIR spektrumu



Şekil 3.13. *S.obliquus* azot yüklemesine ait FTIR spektrumu

S.obliquus türünün azot açlığı uygulanan grubunda TAG piki olan 1744 cm⁻¹ pik şiddeti yaklaşık olarak %13 oranında artış göstermiştir (Şekil 3.12.). Azot tokluğu uygulanan grupta ise kontrole göre TAG miktarında anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir (Şekil 3.13.). Çalışılan iki türün azot açlığı gruplarında 3 ile işaretlenmiş protein piki absorbanslarının azalması alglerdeki stres sonucu büyümenin ve çoğalmanın baskılanmasından dolayı yapı taşı olan protein miktarında azalma olduğu öngörülmektedir (Şekil 3.12., Şekil 3.13.).



4. KAYNAKLAR

Abbasi T, Abbasi S.A., Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization: A Review. *Renew Sustain*, 14:919–37, 2010.

Akbulut, A. Sultan Sazlığı Fitoplanktonik Organizmaların Tespiti Ve Ekolojik Açıdan Değerlendirilmesi, Ankara Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara, 1995; 84s.

Altuner, Z. Tohumuz Bitkiler Sistematiği. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Özyurt Matbaacılık, 194s., 1994.

Anonim., Tas ve bitkiler üzerinde yaşayan alg topluluğu. G. Ü. Fen-Ed. Fak. Fen. Bil. Derg. 4: 147-155, 2009.

Başoğlu, F., Yemeklik Yağ Teknolojileri ,1. Baskı, Nobel Yayınevi, Ankara, 43-97, 2006.

Bat, L., Satılmış H., Şahin F., Özdemir Z., Ersanlı E. Plankton Bilgisi ve Kültürü. Nobel Bilim Ve Araştırma Merkezi, Nobel Basımevi,248s, 2008.

Becker, E.W., *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. P: 293. Cambridge University Press, 1995.

Bharathiraja, B., Chakravarthy, M., Ranjith Kumar, R., Yogendran, D., Yuvaraj, D., Jayamuthunagai, J., Praveen Kumar, R., Palani, S., Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Elsevier, 47:634-653, 2015.

- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. Accumulation of arachidonic acid-rich triacylglycerols in the microalga *Parietochloris incisa* (trebuxiophyceae, chlorophyta). *Phytochemistry*. 60:135–143, 2002.
- Borowitzka, M.A. ve Borowitzka, L.J. *Microalgal biotechnology*, Cambridge University press, 1: 477, 1992
- Borowitzka, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes, and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70: 313-321, 1999.
- Brennan, L., Owende, P., Biofuels from microalgae A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14,557–577, 2010.
- Bruland, K.W., Donat, J.R. Hutchins, D.A. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1555–1577, 1991.
- Cabanelas, I.T.D., van der Zwart, M., Kleinegris, D.M.M., Wijffels, R.H., and Barbosa, M.J., *Biotechnology for Biofuels*, Sorting cells of the microalga *Chlorococcum littorale* with increased triacylglycerol productivity, 219, 576–582, 2016.
- Chen H, Zhou D, Luo G, Zhang S, Chen J., *Macroalgae for biofuels production: progress and perspectives*. *Renew Sustain Energy Rev.* 47:427–37, 2015.
- Chisti, Y., *Biodiesel from microalgae*. *Biotechnology Advances*, 25(3): 294-306, 2007.
- Cirik, S., Gökpinar Ş. *Plankton Bilgisi ve Kültürü*. Ege Üniversitesi, Ege Üniversitesi Basımevi, 274s, 2006.

- Cohen, Z., Chemicals From Microalgae, British Library Cataloguing-in-Publication Data, pg:419, 1999.
- Çakmak, Z. E., Ölmez, T. T., Çakmak, T., Menemen, Y., Tekinay, T., Induction of triacylglycerol production *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparative analysis of different element regimes, Bioresource Technology, 155 379–387, 2014.
- Çiftçi, Y., “Bitkisel Ve Hayvansal Katı Ve Sıvı Yağlar 2. Baskı”, Nobel Yayınevi, Ankara, 3-44, 2008.
- Dean, A.P., Sigee, D.C., Estrada, B., Pittman, J.K., Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. Bioresour. Technol. 101(12):4499-4507, 2010.
- Demir, Ö., *Neochloris pseudoalveolaris* Deason-Bold'de Biyomas Artışı Ve Yağ Üretiminin Araştırılması, Fen Bilimleri Enstitüsü -Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 60s,2011.
- Demirbas, A., Use of algae as biofuel sources. Energy Conversion and Management, 51(12), 2738-2749, 2011.
- Demirel, Z., Eğirdir Gölünden İzole Edilen Yeşil Mikroalg (Clorophyta) *Scenedesmus protuberans* Fris.'in Antimikrobiyal Ve Antioksidan Özelliğinin Araştırılması, Fen Bilimleri Enstitüsü -Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 146s, 2006.
- Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B., Veiga, M. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations, Aquaculture, 42, 207–215,1984.
- Fedorov, A.S., Kosourov, S., Ghirardi, M.L., Seibert, M., Continuous H₂ photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel two-

- stage, sulfate-limited chemostat system. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121-124:403–12, 2005.
- Fox, R., “Spirulina: production and potential”, EDISUD publication, 231, Aix-en-Provence, 1996.
- Francisco, E.C., Neves, D.B., Jacob-Lopes, E., Franco, T.T., Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbondioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J Chem Technol Biotechnol.* 85(3):395-403, 2010.
- Glombitza, K.W., Antimicrobial constituents in algae. Quantitative determination of acrylic acid in sea-algae. *Planta Med.*, 18: 210-221, 1970.
- Glombitza, K.W. and Koch, M., Secondary metabolites of pharmaceutical potential. In *Algal and Cyanobacterial Biotechnology* ed. Cresswell, R.C., Ress, T.A.V and Shah, N. Pp. 161-238, 1989.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., Frayn, K.N., *Lipid Biochemistry: An Introduction*, p. 320. 5th ed., Blackwell: Oxford, UK, 2002.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L., Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45:160–186, 2006.
- Güner, H., ve Aysel A., *Tohumuz Bitkiler Sistematiği*. no:108 VI. Baskı, 1.cilt, 117-120., Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar serisi, 2006.
- Hu, Q., Environmental effects on cell composition. In *handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*; Richmond, A., Ed.; Blackwell: Oxford, UK, 83–93, 2004.

- Huber G.W., Iborra S, Corma A. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chem Rev* 106:4044–98, 2006.
- Jayasankar, R., and Polywal, K., Seasonal variation in the essential micro-nutrients of *Gracilaria* spp. of Tamil Nadu coast. *Indian J. Fish.* 47(4):359-363, 2000.
- Juneja, A., Ceballos, R.M., Murthy, G.S., Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies*, 6, 4607-4638, 2013.
- Jung, K.A, Lim S-R, Kim Y, Park J.M., Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresour Technol*;135:182–90, 2013.
- Kargin, H., Mikroalg-Rotifer Kültür Sistemleri ve Tasarımları, Yardımcı Ders Kitabı, MEÜ. Yayınları No.5, Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, 3: 15-16 , 2002.
- Khozin-Goldberg, I.,Cohen, Z., The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67:696–701 ,2006.
- Lee, Y.K., Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and Potential. *Journal of Applied Phycology*, 13: 307-315, 2001.
- Lehninger, L. A., Cox, M. M., Nelson, D. L., *Lehninger Principles of Biochemistry* 4th ed.,W. H. Freeman, USA, 2004.
- Leustek T. and Saito K., Sulfate transport and assimilation in plants,*Plant Physiology*, 120:637-643, 1999.
- Lill J-O, Salovius-Lauren S, Harju L, Rajander J, Saarela K-E, Lindroos A., Temporal changes in elemental composition in decomposing

filamentous algae (*Cladophora glomerata* and *Pilayella littoralis*) determined with PIXE and PIGE. *Sci Total Environ*, 414:646–52, 2012.

Melis, A., and Happe, T., Hydrogen production: green algae as a source of energy. *Plant Physiol*. 127: 740–748, 2001.

Moreas, I.O., Pelizer, L.H., Carvalho, J.C.M. ve Sato, S. *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivation conditions, *Electronic Journal of Biotechnology*, 5: 3,17-18, 2002.

Movashagi, Z., Rehman, S. and Rehman, I. U., Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, 43:2, 134-179, 2008.

Noraini M.Y., Ong H.C., Badrul M.J., Chong W.T., A review on potential enzymatic reaction for biofuel production from algae. *Renew Sustain Energy Rev*, 39:24–34, 2014.

Önal, T. Bazı Mikroalglerin Yağ İçeriğine Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 80s,2010.

Özel, İ., Plankton Ekolojisi Ve Araştırma Yöntemleri, Planktonoloji 1. Ege Üniversitesi, Ege Üniversitesi Basımevi. 271s,2005.

Pabuçcu, K. and Altuner, Z., Planktonic algal flora of Yeşilırmak River (Tokat-Turkey). *Bulletin of Pure and Applied Science* 17, 101-112,1998.

Pabuçcu, K., Altuner, Z. and Gör, M.Ö., Yeşilırmak Nehri (Tokat) bentik alg florası. In: 1st Int. Symp. on Protection of Natural Environmental and Ehami Karaçam, 23-25th September 1999, Kütahya, 251-258,1999.

Pirt, S.J., Yuan, K.L., Walach, M.R., Pirt, M.W., Balyuzi, H.H.M. ve Bazin, M.J. A Tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from

carbon dioxide: design and performance. *Journal Chem. Tech. Biotechnology*, 33: 33-58,1983.

Pistorius, Arthur M.A., Willem J. DeGrip, Tatjana A. Egorova-Zachernyuk, Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy, *Biotechnology and Bioengineering*, 103:123-129, 2008.

Pittman J.K., Dean A.P., Osundeko O., The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour Technol*, 102:17–25, 2011.

Pulz, O., Phang, S.M., Lee, K., Borowitzka, M.A. ve Whitton, B., Open air and semi-closed cultivation systems for the mass cultivation of microalgae. *Algal Biotechnology in the Asia-Pasific Region*, Institute of Advanced Studies, University of Malaya, Kuala Lumpur, 113-117,1994.

Raheem A., Azlina W.W., Taufiq Yap Y.H, Danquah M.K, Harun R. Thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuel production. *Renew Sustain Energy Rev*, 49:990–9, 2015.

Reece A., Campbell, *Biology*. Benjamin Cummings, Person Education, Sixth Edition, 1247s., 2010.

Richmond A., *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd, 2004.

Ruperez P., Mineral content of edible marine seaweeds. *Elsevier, Food Chemistry*. 79:3, 23-26, 2002.

Ross A.B., Jones J.M., Kubacki M.L., Bridgeman T., Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour. *Bioresour Technol*; 99:6494-504, 2008.

- Ross A.B., Biller P, Kubacki ML, Lea-Langton A, Jones JM. Hydrothermal processing of microalgae using alkali and organic acids, 89:2234–43, 2010.
- Round, F.E., The Biology of Algae, 2 nd. Ed., Edward Arnold, London,1973.
- Sambusiti C, Bellucci M, Zabaniotou A, Beneduce L, Monlau F., Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: a comprehensive review. Renew Sustain Energy Rev,44:20–36, 2015.
- Saraf, S., Thomas, B., Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality. Process Saf Environ. 85:360-364, 2007.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., and Schenk, P. M., High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production Energies. 5:1532-1553, 2012.
- Slade R, Bauen A. Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. Biomass Bioenergy, 53:29–38, 2013.
- Sukatar, A., Alg Kültür Yöntemleri. Ege Üni. Fen Fak. Kitapları Serisi No:184, syf: 104, 2002.
- Şen, B. ve Nacar,V., Su Kirliliği ve Algler. Fırat Havzası Birinci Çevre Sempozyumu, 405-419,1988.
- Taiz, L., and Zeiger, E., Bitki Fizyolojisi. Mineral beslenme. 67-84. Ed: by İ. Türkan. Palme yayıncılık, Ankara, 2008.
- Thompson, Jr. G. A., Lipids and membrane function in green algae. Biochim. Biophys. Acta. 1302:17–45,1996.

Titman, D., Ecological competition between algae: Experimental confirmation of resource-based competition theory. *Science*, 192, 463–465,1976.

Tanon, T., Harvey, D., Larson, T.R., Graham, I.A., Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*. 61(1): 15–24,2002.

Tredici, M.R., Zitelli, G.C. ve Vonshak, A. Cultivation of *Spirullina* (Arthrospira) platensis in flat plate reactors, *Spirullina platensis* (Arthrospira): Physiology. Cell Biology and Biotechnology, 117-130,1997.

Trivedi J, Aila M, Bangwal D.P., Kaul S, Garg M.O., Algae based biorefinery – how to make sense? *Renew Sustain Energy Rev*, 47:295–307, 2015.

Ullah K, Ahmad M, Sofia Sharma V.K., Lu P, Harvey A, Zafar M, Assessing the potential of algal biomass opportunities for bioenergy industry: a review. *Fuel*,143:414–23, 2015.

URL-9: <http://www.egebiyoteknoloji.com/> (Erişim Tarihi: 5 Ekim 2018).

Van den Hoek, C., Mann, D.G. and Jahns, H.M., *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK,1995.

Ververis C., Celulose, hemiceluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements, *Bioresource Technology*, 98:2-296-301, 2007.

Vonshak, A.,and Torzillo, G. International workshop and training course on photobioreactors, *Ebiltem Yayınları*, 1: 66,71-77,2003.

Wang S, Jiang X.M., Han X.X., Wang H. Fusion characteristic study on seaweed biomass ash. *Energy Fuels*, 22(4):2229–35, 2008.

- Xu, X.Q., Beardall, J. Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an Antarctic hypersaline lake, *Phytochemistry*, 45, 655–658,1997.
- Xu, Z., Harvey, K., Pavlina, T., Dutot, G., Zaloga, G., Siddiqui, R.,. An Improved Method for Determining Medium- and Long-Chain FAMES Using Gas Chromatography. *Lipids*, 45: 199-208, 2010.
- Yazgan, O., Cufadar, Y., Olgun, O., Hayvan Besleme Biyokimyası. Basılmamış Ders Notu, Konya,2007.
- Yılmaz, K.H., Mikroalg Üretimi İçin Fotobiyoreaktör Tasarımları, E. Ü. Su Ürünleri Dergisi, 23(1/2): 327-332,2006.
- Zhila, N.O., Kalacheva, G.S., Volova, T.G. Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *J.Appl.Phycol*, 23, 47–52,2011.
- Ziolkowska J.R., Simon L., Recent developments and prospects for algae-based fuels in the US. *Renew Sustain Energy Rev*, 29:847–53, 2014.