

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DEKİ FARKLI VOLKANİK GÖLLERDEN İZOLE EDİLMİŞ BİR
CHLORELLA TÜRÜNÜN BİYODİZEL VE HAMMADDE ÜRÜN
VERİMLİLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Emmanuel Clarence YOUNG

TEMMUZ 2015

Biyoloji Anabilim Dalında Emmanuel Clarence YOUNG tarafından hazırlanan TÜRKE'DEK FARKLI VOLKAN KÖLLERDEN ZOLE EDİLMİŞ BE *CHLORELLA* TÜRÜNÜN BİYODİZEL VE HAMMADDE ÜRÜN VERİMLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. İhami TÜZÜN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. İhami TÜZÜN
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Tahir ATICI _____
Üye (Danışman) : Prof. Dr. İhami TÜZÜN _____
Üye : Doç. Dr. Mustafa TÜRK _____

___/___/2015

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

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

TÜRK YE'DEK FARKLI VOLKANİK GÖLLERDEN İZOLE EDİLEN BEŞ
CHLORELLA TÜRÜNÜN BİYODİZEL VE HAMMADDE ÜRETİM
VERİMLİLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

YOUNG, EMMANUEL CLARENCE

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. İhami TÜZÜN

TEMMUZ 2015, 83 sayfa

Güneş enerjisini kullanarak hedef biyomoleküllerin daha verimli üretimine olanak sağlama amacıyla, mikroalgler, fosil yakıt kaynaklı petrol ürünleri karşısında en uygun ve yenilebilir alternatif enerji kaynağı olarak yerini almış durumdadır. Mikroalgler geniş bir çeşitliliğe sahiptirler ve farklı türlerinin çevresel faktörlere duyarlılıklarında cevap veriyor olmaları sebebiyle, hedeflenen ürünlerin en yüksek düzeyde verimine ulaşabilmek için en iyi tür ya da suyun seçilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada; Türkiye'deki farklı volkanik göllerden izole edilen 5 *Chlorella* türünün biyodizel ve hammadde üretim verimliliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bunun için; *Chlorella* sp. ArM0029B, *Chlorella vulgaris* C-27, *Chlorella vulgaris* ESP-31, *Chlorella* sp. ESP-6, ve *Chlorella variabilis* mikroalg türleri, hücre metabolitlerinin üretimini maksimize etmek üzere başvurulan en yaygın yöntemlerden olan azot açlığına bırakılması ve her bir türün verdiği cevaplar, kontrol grubuyla birlikte, lipid üretimi, protein konsantrasyonları, klorofil ve karotenoid seviyeleri ve karbohidrat birikim miktarları üzerinden iki farklı karşılaştırmaya olanak sağlayacak şekilde ölçülmüştür: İlk olarak, hangi mikroalgin en yüksek miktarda metabolit üreteceği sorusuna cevap verebilmek için, aynı koşullar altında beş türün her birinin toplam

biyomolekül verimliliği karışılma tır. İkinci olarak, kontrollü ortarlarda azot açılına bırakılma türlerin toplam biyomolekül miktarlarında ortaya çıkan farklılıklar türler arasında karışılma tır. Böylelikle, her bir mikroalgin verimlilik derecesi belirlenerek, incelenen 5 mikroalgden biyoteknoloji uygulamalarında kullanımına imkan veren en iyi türün seçilmesi konusunda değerlendirme yapılmı tır.

Azot açılında kontrollü grup ile karışıldıında, her bir mikroalgin büyüme hızında dü ü ya anımı, *Chlorella vulgaris* C-27 ve ESP-31 en yüksek büyüme oranı göstermi tır. Lipit açısından bakıldında; 4 *Chlorella* türünün lipit içeriği % 26-50 oranında artımı, fakat *Chlorella* sp. ESP-6 %13 oranında dü ü ya amı tır. Genel olarak en yüksek lipit birikimi *Chlorella vulgaris* C-27 ve ESP-31’de mevcut oldu u gözlemlenmi tır. Azot açılı altında büyümede 4 mikroalgin protein konsantrasyonu %14-20 oranında azalmı, fakat *Chlorella variabilis*’de %27 oranında artımı tır. Kontrollü ortarlarda büyümede *Chlorella vulgaris* ESP-31 en yüksek protein konsantrasyonuna sahiptir. Klorofil ve karotenoid düzeyi klorofil/karotenoid oranı olarak bildirilmi tır. Azot açılında kontrollü grupla karışıldıında bu oran azalmı tır. Bu azalma klorofil düzeyindeki azalmayı, karotenoid düzeyindeki artıyı gösterir. *Chlorella vulgaris* C-27’nin en düşük klorofil/karotenoid oranına sahip mikroalg oldu u bulunmu tur. Lipit ve karbohidrat içeriğini ölçmek için FTIR kullanılmı tır. Nile Red method’unda oldu u gibi, FTIR’dan elde edilen sonuçlar azot aç ortamda büyüyenlerin normal büyüme ortamındakilere göre TAG miktarlarında bir azalma oldu unı göstermi tır. En yüksek TAG birikiminin *Chlorella vulgaris* C-27 ve ESP-31’de oldu u bulunmu tur. Ayrıca azot açılında *Chlorella vulgaris* ESP-31’de karbohidrat seviyesinde bir artı oldu u da gözlemlenmi tır. Bu çalışmanın sonucu; kullanılan 5 mikroalgden; *Chlorella vulgaris* C-27 ve ESP-31’in en yüksek miktarda istenilen ürünleri verdi i, böylece bu türlerin en yüksek biyodizel ve hammadde üretim verimliliğine sahip oldu u ve biyoteknolojik uygulamalarda maksimum fayda için en iyi adaylar olarak öne çıktı nı göstermi tır.

Anahtar kelimeler: Mikroalg, biyodizel, hammadde, biyomolekül, azot açılı, TAG

ABSTRACT

EVALUATION OF THE BIODIESEL AND FEEDSTOCK PRODUCTION EFFICIENCY OF FIVE *CHLORELLA* SPECIES ISOLATED FROM DIFFERENT VOLCANIC LAKES IN TURKEY

YOUNG, EMMANUEL CLARENCE

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. İhami TÜZÜN

July 2015, 83 pages

Because they are more efficient at harvesting the energy of the sun to produce desirable biomolecules, microalgae have garnered the position as the most valuable candidate to serve as a renewable alternative energy source to our present fossil-fuel derived petroleum. Since microalgae are immensely diverse and different species/strains respond to environmental stress at varying degrees, in order to obtain the highest yield of desired products, it is essential to select the best species/strain that is able to synthesize the highest amount of these biomolecules.

The objective of this study was to make a comparative evaluation of the biodiesel and feedstock production efficiency of five *Chlorella* species/strains isolated from different volcanic lakes in Turkey. The *Chlorella*, namely *Chlorella sp.* ArM0029B, *Chlorella vulgaris* C-27, *Chlorella vulgaris* ESP-31, *Chlorella sp.* ESP-6, and *Chlorella variabilis*, were subjected to nitrogen deprivation, a commonly employed approach for maximizing the production of certain metabolites in microalgae, measured against a controlled group, and their responses, mainly in terms of growth, lipid production, protein concentration, chlorophyll and carotenoids level, and carbohydrates accumulation, were analyzed; two sets of comparisons were made: a

comparison of the total yield of biomolecules of each of the five species (an answer to the question: which microalga produces the highest amount of metabolites), and comparison of the total yield of biomolecules as a result of growth under controlled conditions and nitrogen deprivation (an answer to the question: how does the total yield of biomolecules differ when microalgae are grown under controlled conditions and nitrogen deprivation?); by so doing, the extent of the efficiency of each microalga would be determined, thus, the selection of the best species/strain of the five to serve as the subject of biotechnological exploits would be possible.

Under nitrogen deprivation compared to controlled conditions, each of the five microalgae experienced a decrease in their growth rate; of the five, *Chlorella vulgaris* C-27 and ESP-31 displayed the highest growth rate. In terms of lipids, four *Chlorella* experienced an increase in their lipid content (26-50% increase), but *Chlorella sp.* ESP-6 experienced a 13% decrease. Overall, the highest lipid accumulation was present in *Chlorella vulgaris* C-27 and ESP-31. The protein concentration of four microalgae decreased (by 14-20%) when grown under nitrogen deprivation, but the concentration of proteins in *Chlorella variabilis* increased by 27%, something that had not been reported previously. The microalga that had the highest protein concentration is *Chlorella vulgaris* ESP-31 when grown under controlled conditions. The chlorophyll and carotenoids level was reported as a ratio of chlorophylls to carotenoids; under nitrogen deprivation compared to controlled conditions, there was a decrease in this ratio, an indication of a decrease in the chlorophyll level and an increase in carotenoids. The microalga that had the lowest ratio, indicating the sharpest balance between chlorophylls and carotenoids, is *Chlorella vulgaris* C-27. FTIR was employed to quantify the lipids and carbohydrates content. Like the Nile Red method, the results obtained from FTIR showed a decrease in relative TAGs when microalgae were grown in nitrogen deprived media compared to those grown in normal media. Also, the highest TAGs accumulation was present in *Chlorella vulgaris* C-27 and ESP-31. There was also an increase in the relative carbohydrates level in the microalgae under nitrogen deprivation with the highest accumulation present in *Chlorella vulgaris* ESP-31.

Clearly then the results of this study indicate that of the five microalgae, *Chlorella vulgaris* C-27 and ESP-31 yield the highest amount of desired products, thus, they can be considered as having the highest biodiesel and feedstock production efficiency, making them the best candidates for biotechnological exploitation.

Key Words: Microalgae, biodiesel, feedstock, biomolecules, nitrogen deprivation, TAGs

TE EKKÜR

Kırıkkale Üniversitesi biyoloji bölümündeki yüksek lisans eğitimim süresince beni desteklediği ve bana yardımcı olduğu için danışmanım sayın Prof. Dr. İlhami TÜZÜN'e teşekkür etmek istiyorum. Sayın TÜZÜN, sabırlı, anlayışlı ve çok değerli bir akademisyendir. Onunla çalışmayı büyük bir zevkle tekrar isterdim. Ayrıca İstanbul Medeniyet Üniversitesi Algoloji Laboratuvarı'nda bu araştırmayı yapmama izin verdiği, araştırma prosedürleri ve yazma süresi boyunca yaptığı teknik ve rehberlik için Dr. Turgay Çakmak'a teşekkür ederim. Sürekli destek ve yardımları için İstanbul Medeniyet Üniversitesi Algoloji Laboratuvarı'ndaki benim yardımcı araştırmacılara da teşekkür ediyorum. Bu araştırmayı yürütmek için gerekli olan bilgi ve dokümanları sağladığı için Kırıkkale Üniversitesi'nde tüm öğretim ve diğer öğretim üyelerine ve bu projeyi Burs NO. 112Y029 olarak finanse ettiği için TÜB TAK'a teşekkür ediyorum.

Ç NDEK LER D Z N

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TE EKKÜR	vi
Ç NDEK LER D Z N	vii
Ç ZELGELER D Z N	ix
EK LLER D Z N	x
S MGE VE KISALTMALAR D Z N	xii
1. G R	1
1.1. Sebep	1
1.2. Mikroalgler	1
1.3. Mikroalg Yeti tirme artları	2
1.3.1. I ık ve Karı tırma	2
1.3.2. Sıcaklık	3
1.3.3. Karbondioksit ve Besinler	3
1.3.4. PH ve Tuzluluk	4
1.4. <i>Chlorella</i> Cinsi	4
2. L TERATÜR ÖZET	5
2.1. Neden Mikroalgler?	5
2.2. Geçmi e Bakılı nda Mikroalg Biyodizeli	6
2.3. Microalg Lipitleri	7
2.4. Ara tırmanın Amacı	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM	10
3.1. Malzeme ve Cihaz Listesi	10
3.2. Kimyasal Listesi	11
3.3. Göller	12
3.4.1. Nemrut Gölü ve Iligöl	12
3.4.2. Aygır Gölü	13
3.4.3. Meke Gölü ve Acıgöl	14
3.4.4. Narlıgöl	15

3.4.5. Gölcük Gölü	15
3.4. Mikroalglerin izolasyonu, Saflaştırılması, ve Tanımlanması	17
3.5. Proje için Mikroalglerin Seçilmesi	17
3.6. Büyüme Etkileri	18
3.7. Azot Yoksunluğu	18
3.8. Büyüme ve Lipit İçeriğinin Belirlenmesi	19
3.9. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi	19
3.10. Klorofil ve Karotenoid Düzeylerinin Belirlenmesi	20
3.11. Protein Konsantrasyonu	20
3.11.1. Protein Ekstrasyonu	21
3.11.2. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	21
3.12. İstatistiksel Analiz	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1. Büyüme	22
4.2. Lipit İçeriği	25
4.3. Proteinler	30
4.4. Klorofil ve Karotenoidler	33
4.5. TAG ve Karbohidratlar	38
5. SONUÇ	47
KAYNAKLAR	49
EKLER	63

Ç ZELGELER D Z N

Ç ZELGE

Sayfa

- 2.1. Alglerle kar ıla tırıldı ında bazı yaygın ya lı tohum bitkilerinin ortalama verimlilikleri 5
- 4.1. 5 *Chlorella* türünün kontrollü artlar (A) ve azot aç ortamda (B) 10 günlük inkübasyon sürecinde klorofiller ve karotenoidlerinin düzeyleri 34

EK LLER D Z N

<u>EK L</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Mikroalglerin Büyüme Evreleri.....	2
1.2. 100 kat büyütülmü Chlorella hücreleri	4
3.1. Nemrut Gölü'nün haritadaki yeri	13
3.2. Aygır Golü'nün haritadaki yeri	14
3.3. Meke ve Acıgöl'ün haritadaki yeri	15
3.4. Narlıgöl'ün haritadaki yeri	16
3.5. Gölcük Gölü'nün haritadaki yeri	16
4.1. 5 <i>Chlorella</i> türünün kontrollü artlar (A) ve azot aç ortamda (B) 15 günlük inkübasyon sürecinde büyümesi	22
4.2. Kontrollü ve azot yoksun ko ullaarda, 15 günlük inkübasyon süresince 5 <i>Chlorella</i> türünün büyümesi; <i>Chlorella sp.</i> ArM0029B (A) <i>Chlorella vulgaris</i> C-27 (B) <i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31 (C) <i>Chlorella sp.</i> ESP-6 (D) ve <i>Chlorella variabilis</i> (E).....	24
4.3. 5 <i>Chlorella</i> türünün kontrollü artlar (A) ve azot aç ortamda (B) 10 günlük inkübasyon sürecinde lipit içeri i.....	26
4.4. Kontrollü ve azot yoksun ko ullaarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 <i>Chlorella</i> türünün lipit içeri i; <i>Chlorella sp.</i> ArM0029B (A) <i>Chlorella vulgaris</i> C-27 (B) <i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31 (C) <i>Chlorella sp.</i> ESP-6 (D) ve <i>Chlorella variabilis</i> (E).....	28
4.5. 5 <i>Chlorella</i> türünün kontrollü artlar (A) ve azot aç ortamda (B) 10 günlük inkübasyon sürecinde protein konsantrasyonu	31
4.6. Kontrollü ve azot yoksun ko ullaarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 <i>Chlorella</i> türünün protein konsantrasyonu; <i>Chlorella sp.</i> ArM0029B (A) <i>Chlorella vulgaris</i> C-27 (B) <i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31 (C) <i>Chlorella sp.</i> ESP-6 (D) ve <i>Chlorella variabilis</i> (E)	32
4.7. 5 <i>Chlorella</i> türünün kontrollü artlar (A) ve azot aç ortamda (B) 10 günlük inkübasyon sürecinde klorofiller/karotenoidlerinin oranı	36
4.8. Kontrollü ve azot yoksun ko ullaarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 <i>Chlorella</i> türünün klorofil/karotenoidlerinin oranı; <i>Chlorella sp.</i> ArM0029B	

	(A) <i>Chlorella vulgaris</i> C-27 (B) <i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31 (C) <i>Chlorella sp.</i> ESP-6 (D) ve <i>Chlorella variabilis</i> (E).....	37
4.9.	5 <i>Chlorella</i> türünün kontrollü artlar (A, C, E) ve azot aç ortamda (B, D, F) 10 günlük inkübasyon sürecinde TAGlar (A,B), oligosakkaritler (C,D), ve polisakkaritler/proteinler (E,F) oranı	40
4.10.	Kontrollü ve azot yoksun ko ullaarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 <i>Chlorella</i> türünün TAG/proteinler oranında de i iklik; <i>Chlorella sp.</i> ArM0029B (A) <i>Chlorella vulgaris</i> C-27 (B) <i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31 (C) <i>Chlorella sp.</i> ESP-6 (D) ve <i>Chlorella variabilis</i> (E)	42
4.11.	Kontrollü ve azot yoksun ko ullaarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 <i>Chlorella</i> türünün oligosakkaritler/proteinler oranında de i iklik; <i>Chlorella sp.</i> ArM0029B (A) <i>Chlorella vulgaris</i> C-27 (B) <i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31 (C) <i>Chlorella sp.</i> ESP-6 (D) ve <i>Chlorella variabilis</i> (E)	44
4.12.	Kontrollü ve azot yoksun ko ullaarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 <i>Chlorella</i> türünün polisakkaritler/proteinler oranı de i iklik; <i>Chlorella sp.</i> ArM0029B (A) <i>Chlorella vulgaris</i> C-27 (B) <i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31 (C) <i>Chlorella sp.</i> ESP-6 (D) ve <i>Chlorella variabilis</i> (E)	45

S MGE VE KISALTMALAR D Z N

S MGELELER

L/m ² /yr	Yılda metre karede litre
<i>B</i>	Beta
US\$	ABD Doları
mg/L	Litrede miligram
m	Metre
km ²	Kilometre kare
km	Kilometre
g	Gram
+	Artı/positif
-	Eksi/negatif
ml	Mililitre
rpm	Dakikada dönmeler
nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
cm ⁻¹	Santimetrede
µg	Mikrogram
mM	Milimol
±	Artı veya eksi
°C	Santigrat
µm	Mikrometre
µg/ml	Mililitrede mikrogram

KISALTMALAR

CO ₂	Karbondioksit
CoA	Coenzim
TAG	Triaçilgliseroller

C	Karbon
H ₂ O	Su
N	Azot
C.	Chlorella
sp.	Tür
BG-11	Blue-Green 11
TAP	Tris-Asetat fosfat
FW	Final Wash
DM	Diatoms Medium
BBM	Bold's Basal Medium
OD	Optik Yo unluk
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic asit
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glikoz
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
H	Hidrojen
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
BSA	Bovin Serum Albümini
A.U.	Absorbans Birimleri
IR	Infrared
ATP	Adenozin Trifosfat
NADPH	ndirgenmi Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
ADP	Adenozin Difosfat
NADP+	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
RNA	Ribonükleik Asit
O ₂	Oksijen
%T	Yüzde geçirgenlik
pH	Potansiyel hidrojen
F	Demir
Mg	Magnezyum
B	Bor
Mo	Molibden

Co

Kobalt

Zn

Çinko

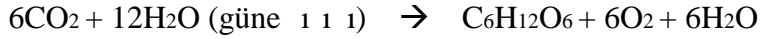
1. G R

1.1. Sebep

Enerji, insan toplumlarının geli imi için çok önemlidir. Ancak fosil yakıtlardan elde edilen ve yenilebilir olmayan temel enerji kayna ımız olan petrol yakın bir gelecekte tükenme tehlikesiyle kar ı kar ıya kalacaktır. Bu sorunun çözümüne alternatif bir enerji kayna ı olarak biyoyakıt sunulabilir. Sayısız ara tırmalar ve deneyler mikroalglerin alternatif biyoyakıt enerji kayna ı olarak en de erli adaylar oldu unu göstermi tir.

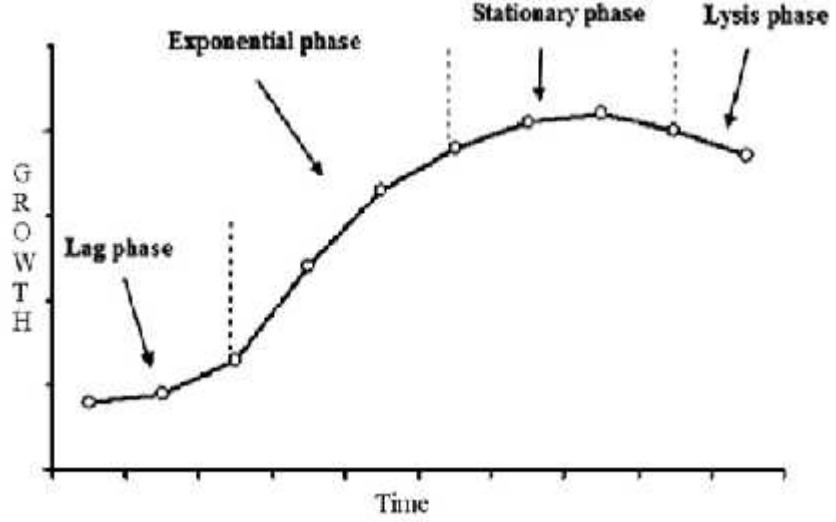
1.2. Mikroalgler

Mikroalgler, klorofil *a* içeren, belirli bir kök ve yaprakları olmayan organizmalardır (Lee, 1989). Su ve toprakta ya ayabilirler. Bitkiler gibi su, güne ı ı ı ve karbondioksiti kullanarak, fotosentez yolu ile biyokütle ve gıda sentezleyebilirler.



Mikroalgler birincil fotosentetik organizmalardır (Becker, 1994). Gezegendeki tüm atmosferik oksijenin yarısını üretirler (Wolkers, 2011). Mikroalgler tarafından üretilen biyokütle; biyoyakıt, suni gübre ve di er yararlı ürünlere dönü türülebilir. Mikroalglerin yakla ık 400.000 farklı türü vardır (Fuentes-Grunewald et al., 2009). Ayrıca bunların ço u yüksek lipit içeri ine sahiptir.

Mikroalglerin büyümeleri için güne ı ı ı, su ve karbondioksit ile birlikte, azot ve fosfora da ihtiyaçları vardır (Benemann & Oswald, 1996). Mikroalglerin genellikle dört büyüme a aması vardır, lag fazı, üstel faz, dura an faz ve parçalanma ya da ölüm fazı.



ekil 1.1. Mikroalgelerin büyüme evreleri

1.3. Mikroalg Yeti tirme artları

Mikroalgleri ba arıyla yeti tirmek için dikkate alınması gereken belirli çevresel ko ullar vardır. Mikroalg geli imini etkileyen faktörler; kontrol olarak pH ve tuzluluk, nitrat, fosfat ve iz metalleri gibi besinler, karı tırma, optimum sıcaklı ın bakımı ve ık sa lanmasını da içerir (Becker, 1994; Grobbelaar, 2000, Mata et al., 2010).

1.3.1. I ık ve Karı tırma

I ık fotosentez için bir enerji kayna ıdır. I ık eri ilebilirli i ve yo unlu u büyüme yi etkileyen anahtar parametrelerdir. Fotosentez verimi dü ük ık yo unlu unda en yüksek düzeydedir (Griffiths, 2011). Fotosentezin yüksek ık seviyelerinde daha hızlı olabilmesi ihtimaline ra men, emilmi ı ın daha az etkin kullanımı vardır. Mikroalg, doyma noktasının üzerinde fotoinhibisyondan zarar görmü olabilir (Scott et al., 2010). I ık yo unlu u oldukça dü ük seviyede oldu u zaman net bir büyüme yoktur (Long et al., 1994; Alabi et al., 2009; Ye et al., 2012).

Verimli bir alg biyokütlesinin üretilmesi için, 1 ık kültür içindeki tüm hücelere yayılmalıdır. Emilim ve gölgeleme nedeniyle 1 ık yo un bir alg kültürü içine sadece birkaç santimetre nüfuz edebilir (Richmond, 2004).

Do rudan güne 1 1 ina maruz kalan yo un kültür ortamının yüzeyinde hüceler fotoinhibisyondan zarar görebilirler. Bununla birlikte, ortamın merkezinde hüceler karanlıkta kalabilir, böylece büyümeleri azalabilir. Bu nedenle, karı tırma hücre hasarının önlenmesi ve büyümenin geli tirilmesi için önemlidir (Griffiths, 2011).

1.3.2. Sıcaklık

Genellikle, mikroalglerin büyümesi optimal sıcaklık noktasına gelene kadar artar. Optimal büyüme sıcaklıkları normalde 20 ile 30 °C arasındadır (Christi, 2008). Birçok tür, dü ük büyüme oranları ile optimum sıcaklıkların 15°C altına kadar tolerans gösterebilir, ancak optimal nokta üzerinde sadece birkaç derecelik bir sıcaklık artı 1 hücre ölümüne neden olabilir (Mata et al., 2010).

1.3.3. Karbondioksit ve Besinler

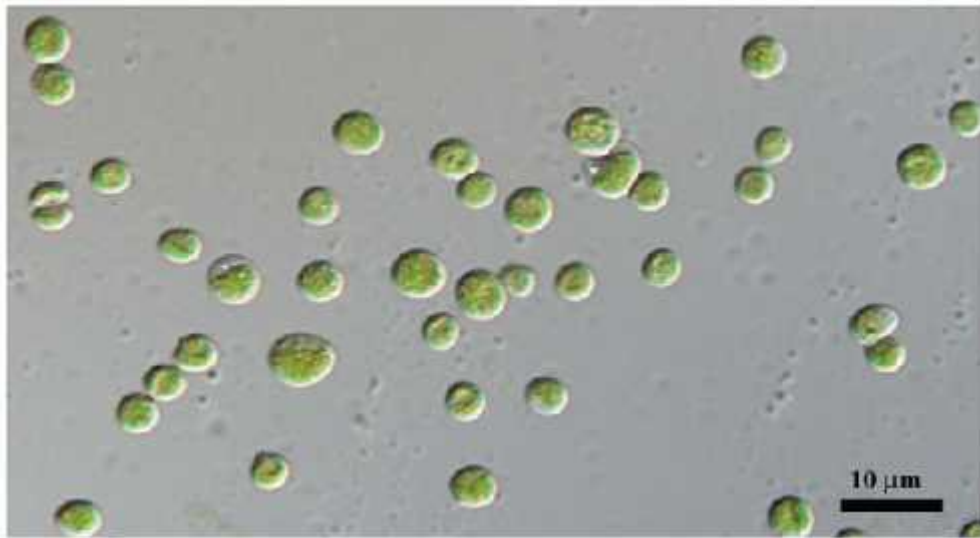
Karbondioksit kolayca bir hava pompası üzerinden veya kültür ortamı içinde çözülebilir bir biçimde toplu kültürlerle temin edilebilir. Mikroalg büyümesi için, önemli besin maddeleri azot ve fosfordur (Anderson, 2005). Bunlara ek olarak Fe, Mg, Mn, B, Mo, K, Co ve Zn gibi metallere de ihtiyaç vardır (Mata et al., 2010). Tüm temel besinin yeterli miktarı verimli fotosentez ve büyüme için bir ön ko uldur. Fakat nitrat, fosfat ve silika gibi önemli besinlerin sınırlaması, lipitler gibi istenen ürünlerin birikimine sebep olabilir.

1.3.4. PH ve Tuzluluk

Alg kültürleri için uygun pH de eri 6 ile 8 arasındadır (Zeng et al., 2011); ancak *Chlorella vulgaris* gibi alg türleri pH 3, 4 , 5, 6 , 7, 8 , ve 9 de erlerinde de büyüeyebilir (Lam& Lee, 2012). Üretim sırasında buharla ma nedeni ile tuzluluk artabilir. Yüksek tuzluluk seviyesi alg hücrelerinin ekil ve yapısını de i tirebilir (Mata et al., 2010). Böylece optimal düzeyde sapmalar, biyokütle verimlili inin azalmasına neden olabilir. Aynı zamanda yüksek tuzluluk oranıyla kontaminasyonu sınırlayarak fayda da sa layabilir (Griffiths et al., 2011).

1.4. *Chlorella* Cinsi

Chlorella, filum Chlorophyta sınıfında tek hücreli ye il algdir ve flagella olmayan ekli küreseldir (ek. 1.2.) ve yaklaşık 2-10 µm arasında bir çapa sahiptir. *Chlorella* türleri kloroplastlarında ye il fotosentez pigmentleri olan klorofil *a* ve *b* içerir. Kuru a ırlı mın % 60'ını proteinler olu turur (Safi et al., 2013). pH ve sıcaklı ı geni bir aralıkta tolere edebilirler (Ahn et al., 2012; Lam & Lee, 2012). Fotosentez yoluyla hızla ço alırlar (Scheffler & John, 2007).



ekil 1.2. 100 kat büyütülmü *Chlorella* hücreleri (Willard, 2013)

2. L TERATÜR ÖZET

2.1. Neden Mikroalgler?

Son on yılda alternatif yeni yakıt kaynakları bulmak için yoğun araştırmalar yapılmıştır. Biyokütleden elde edilen yenilenebilir bir enerji kaynağı olarak biyodizel en iyi adaydır (Ahn et al., 2012; Tran et al., 2012). Biyodizel halen hayvansal yağlar, bitkisel yağlar, ayciceği yağı, hurma yağı, kolza tohumu yağı ve atık yağlardan esas olarak üretilir (Tran et al., 2012; Ahn et al., 2012). Fakat biyodizel üretimine arz edilenden daha fazla talep olduğundan, alternatif biyokütle kaynakları gerekmektedir. Mikroalgler biyodizel üretimi için en değerli alternatif hammadde kaynağıdır.

Mikroalglerin petrol üretimi açısından diğer toprak kökenli bitkilere göre çeşitli avantajları vardır. Yüksek büyüme oranlarına sahiptirler ve onların basit tek hücreli yapısı ve yüksek fotosentez verimi, yağlı tohumdan daha yüksek yağ verimini sağlar. (Lardon et al., 2009). Bununla birlikte sadece tohum hasat edilen kara esaslı yağ bitkilerinin aksine, her bir alg hücresi lipit içerir. Dolayısıyla biyokütleden elde edilen ürün verimi çok daha yüksektir (Becker, 1994).

Çizelge 2.1. Alglerle karşılaştırıldığında bazı yaygın yağlı tohum bitkilerinin ortalama verimlilikleri

Yağ Kaynağı	Verim (L/m ² /yıl)	Kaynak
Algler	4.7 - 14	Sheehan et al., 1998
Paalmiye	0.54	Mata et al., 2010
Jatropha	0.19	Sazdanoff, 2006
Kolza Tohumu	0.12	Sazdanoff, 2006
Ayçiçeği	0.09	Sazdanoff, 2006
Soya	0.04	Sazdanoff, 2006

Mikroalgler acı veya tuzlu suyu kullanarak marjinal tarım arazisi üzerinde yeti ebilir (Hodaifa et al., 2008), böylece geleneksel tarımla kaynak rekabetine girmezler. Bunların herbisitlere veya pestisitlere ihtiyaçları yoktur ve yeti tirilmeleri endüstriyel atıklardan karbondioksit alımı ve atıklardaki fazla besin maddelerinin birle mesi ile olur. (An et al., 2003; Hodaifa et al., 2008).

2.2. Geçmi e Bakıldı nda Mikroalg Biyodizeli

Mikroalgler tarafından üretilen lipitler toprak bazlı ya lı tohum bitkilerine benzer bir ya elde etmek için ekstrakte edilebilir. Bitkisel ya dan biyodizel dönü üümü için uygulanan prosedürler, alg ya ı üretimi içinde uygulanabilir (Griffiths et al., 2011). Ula ımda yakıt kayna ı olarak mikroalg kullanımı yeni bir dü ünçe de ildir.

1950 yılından bu yana bu alanda sayısız ara tırma ithaf edilmi tir (Oswald & Golueke, 1960). 1970'lerde ABD, Avustralya ve Japonya'da, kamu tarafından finanse edilmi büyük ara tırma programları kurulmu tur (Regan & Gartside, 1983; Sheehan et al., 1998). ABD Enerji Bakanlı ı alglerden biyodizel üretimini geli tirmek için Sucul Türler Programına 1978 ve 1996 yılları arasında 25 milyon dolardan fazla yatırım yapmı tur (Sheehan et al., 1998). Programın amacı, kömür santrallerinin atık karbondioksitleri kullanılarak, havuzlarda yeti tirilen lipit içeri i yüksek alglerden biyodizel üretmekti. 3000'den fazla tür toplandı ve birço u lipit içeri i için tarandı. (Griffiths et al., 2011).

Programın erken evre süresi boyunca çevresel stresin, özellikle de besin sınırlamasının, lipit birikiminde artı a neden oldu u tespit edilmi tir. Programın sonuç raporuna göre (Sheehan et al., 1998) alglerin geleneksel ürünlere nazaran yeti tirilmesinde daha az toprak ve su kullanılması ve yeterli kaynak bulunmasına ra men alg yakıtının tamamen geleneksel dizelin yerini alması için, mikroalglerin yüksek üretim maliyeti bir engel olmu tur.

Petrol fiyatlarındaki artı (Griffiths et al., 2011), sınırlı fosil yakıt kaynaklarına alternatifler bulmadaki artan istek (Dang Thuang et al., 2012) ve karbon emisyonunu

azaltarak küresel ısınmaya sağladığı avantajdan dolayı acil bir enerji kaynağı olarak algilere ilgiyi artırmıştır.

2.3. Mikroalg Lipitleri

Proteinler, karbohidratlar, ve lipitler alg hücrelerinin ana bileşenleridir (Becker, 1994). Mikroalgler; hayvanlarda ve insanlarda yağ depolarına benzer bir depo bileşen olarak (Tsukahara & Sawayama, 2005) sinyal proteinleri ve hücre zarlarında olduğu şekilde de hücre yapılarının bir parçası olarak lipitleri üretir (Griffiths et al., 2011).

Lipitler, esterleri, mumları ve kolesterolü içerir. En yaygın lipitler triaçilgliserol yani TAG (nötr lipitler)'dir. Bunlar üç yağ asidi, bağımsız bir gliserol molekülünden ya da iki yağ asidi bir fosfat (fosfolipitler) ya da karbohidrat (glikolipitler) grubundan (polar lipitler) oluşurlar (Piorreck et al., 1984; Griffiths et al., 2011).

Depo lipitler, genellikle TAG biçiminde, yağ gövdeleri olarak adlandırılan lipit veziküllerinde birikir. Yüksek bir büyüme oranına sahip olan çoğu tür nispeten düşük lipit içeriğine sahiptir (Griffiths et al., 2011). Stres koşullarında, lipit içeriği (çoğunlukla TAG içeren) hücre kuru ağırlığının % 60'ı üzerine çıkabilir (De la Pena, 2007; Sheehan et al., 1998; Becker 1994). Lipit birikimini arttıran ana stres faktörü besin yoksunludur (Griffiths et al., 2011). Azot konsantrasyonunun azalması, lipit birikiminin *Nanochloropsis oculata*'da %7.90 den %15.31'e ve *Chlorella vulgaris*'de %5.90'den %16.41'e kadar arttığını bildirilmiştir (Converti et al., 2009). Aynı şekilde, Yeh & Chang (2011) *Chlorella vulgaris* ESP-31 lipit içeriğinde %20'den %53'e kadar daha yavaş bir büyüme ile artı olduğunu bildirdi. Dahası, Piorreck et al. (1984) ye il alg lipit içeriğinin düşük azot seviyelerinde kuru ağırlığının %33-63'ü olduğunu bildirdi.

Biyodizel üretimi için en uygun lipit sınıfı TAG'dır (Griffith et al., 2011). Fosfolipitler katalizör tüketimini artırıp emülgatör gibi davranımdan tercih edilmezler (Van Gerpen. 2005; Mittelbach & Remschmidt, 2004). Ayrıca, kükürt içeren fosfolipitler ve glikolipitler yakıttaki fosfor ve sülfür içeriğini artırırlar. Avrupa biyodizel standardı

EN14214'E göre bu değerler 10 mg/L altında olmalıdır (Bux, 2013). Çift bağ sayısı ile belirlenen yağ asidi zincir uzunluğu ve doymunluk derecesi, yakıtın viskozitesi ve oksidatif stabilitesi gibi özelliklerini etkiler. Bu nedenle, biyodizel üretimi için toplam lipit üretimi, TAG içeriği ve yağ asidi profilini maksimize etmek önemlidir (Ramos et al., 2009).

Algler düşük azot konsantrasyonunda büyüyünce nötr lipit miktarı, yüksek azot konsantrasyonlarında büyünce ise polar lipit miktarı daha fazladır (Piorreck et al., 1984; Darzins et al., 2008; Yeh & Chang, 2011). Ayrıca, düşük azot konsantrasyonlarında yeşil algler çoğunlukla doymun ve monodoymun yağ asitlerini üretirken yüksek azot konsantrasyonlarında ise büyük oranda çoklu polidoymun yağ asitlerini üretir. Depo lipitlerin üretimi daha fazla enerji ve kaynak gerektirir (Dennis et al., 1998; Roessler, 1990). Bu yüzden düşük azot konsantrasyonlarında lipit üretimi artarken büyüme de azalır. Bu durum, biyodizel için mikroalglerin endüstriyel seri üretimini engelleyen kalıcı bir problemdir ve hala ticari kullanılabilir formu bulunamamıştır.

2.4. Araştırmanın Amacı

Yenilenebilir kaynaklardan biyoyakıt üretimi petrol kaynaklı yakıtlara göre en yaygın, çevresel ve ekonomik sürdürülebilir alternatiflerden biri olarak kabul edilir (Dragone et al., 2010). Ancak, biyoyakıt alma süreci istenen ürünlerin verimi düşük olduğundan zaman alıcı ve pahalı bir işittir. Dolayısıyla alg biyoteknolojisi araştırma amaçları, üreme oranını arttırmak, girdilerin metabolizmasını iyileştirmek ve faydalı türlerde istenen yağların ya da proteinlerin üretimini arttırmak için yeni yollar bulmayı amaçlar (Hossain et al., 2008; Grima et al., 2003; Cuello, 2005).

Son zamanlarda, yeni bir *Chlorella sp.* türü arktik deniz buzundan izole edilip ArM0029B olarak adlandırılmıştır. *C. vulgaris* ile karşılaştırıldığında bu mikroalg daha geniş bir sıcaklık aralığında daha hızlı bir büyüme göstermiş ve azot açlığı altında yağ asitleri daha yüksek seviyelerde birikmiştir (Ahn et al., 2012). Bu sonuçlar biyodizel üretimi için umut verici bir aday olduğuna işaret etmektedir. Buradan yola

ıkarak Türkiye’de volkanik gl olan Meke’den *Chlorella sp.* ArM0029B izole edilmi tir. Amacımız *Chlorella sp.* ArM0029B, *Chlorella vulgaris* C-27, *C. vulgaris* ESP-31, *Chlorella sp.* ESP-6, ve *C. variabilis* adlı be tane izole edilen *Chlorella* türünü azot açlı ına bırakıp büyüme oranını, lipit, protein, klorofil ve karotenoid, karbohidrat birikim yanıtlarını inceleyip, bu yanıtları kar ıla tırmaktır. Bu kar ıla tırmalar ile her mikroalgin verimlili inin ölçüsü belirlenip, 5 mikroalgden en iyi türün seçimi biyoteknoloji için en iyi kullanımını mümkün kılacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Malzeme ve Cihaz listesi

Allegra X-15R Centrifuge Beckman Coulter®
Autoclave OT90L Nuve Stream Art®
Ultra Low Temperature Freezer Haier Biomedical®
FTIR Spectrometer Perkin Elmer®
Fluorescence Spectrophotometer Cary Eclipse®
Wiseven Vacuum Oven Wisd Laboratory Instruments®
Centrifuge NF800R Nuve Stream Art®
Certomat BS-T Incubation and Shaking Chamber Satoriusstedim Biotech®
Advanced Digital Shaker VWR®
Growth Chamber Fitotron®
Laminar Air Chamber Nuve Stream Art®
Light Microscope DM500 Leica®
Optizen Spectrophotometer Mecasys®
Refrigerator Inoksan®
1ml Pipette Eppendorf Research Plus®
20ml Pipette Eppendorf Research Plus®
1.5 ml Disposable Cuvettes ISO Certified Brand®
Multivortex V-32 Biosan®
Sonicator Bandelin Sonorex®
Wisemix Rotator Wisd Laboratory Instruments®
Magnetic Motion Stirrer Mix 15eco®
Magnetic Stirrer IKA RCT Classic®
Orion Star A211 pH Meter Thermoscientific®
Gram Balance Shimadzu®
1l Glass Bottle ISO Lab®
2l Glass Bottle ISO Lab®
Micropipette Tips Eppendorf Research Plus®
1ml Microcentrifuge Tubes VWR®

15ml Microcentrifuge Tubes VWR®

50ml Microcentrifuge Tubes VWR®

250ml Erlenmeyer Flasks ISO Lab®

Petriplates ISO Lab®

3.2. Kimyasal Listesi

Tüm kimyasallar SIGMA®'dan satın alınmıştır.

Sodyum nitrat (NaNO_3)

Magnezyum Sülfat Heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Potasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4)

Kalsiyum Klorür Dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Sitrik Asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)

Ferrik amonyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{FeNO}_7$)

Sodyum Etilendiamintetraasetik Asit (Na_2EDTA)

Sodyum Karbonat (NaCO_3)

Borik Asit (H_3BO_3)

Manganez (IV) Sülfat Hidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Çinko Sülfat Heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Bakır (II) Sülfat Pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Amonyum Heptamolibdat Tetrahidrat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

B1 Vitamini (Thiamine HCl)

H Vitamini (Biotin)

B12 Vitamini (Cyanocobalamin)

Bitki Agarı

Tris-Base ($\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)

Amonyum Klorid (NH_4Cl)

Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)

Sodyum Etilendiamintetraasetik Asit Dihidrat ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Manganez (II) Klorid Tetrahidrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Kobalt (II) Klorid Heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Konsantre Asetik Asit (CH₃COOH)
Saf Su
%90 Aseton
Tris-HCl
Sodyum Sülfat Laryl
EDTA
Sıvı Nitrojen
Bakır (II) Sülfat (CuSO₄)
Bicin Coninic Asit Çözelti
Sıvı Serum Albümini (Protein Standart)
Nile Red
Potasyum Hidroksit (KOH)
Hidroklorik Asit (HCl)

3.3. Göller

Numuneler Türkiye'de a a ıdaki volkanik göllerden sonbaharda toplanmı tır.

3.3.1. Nemrut Gölü ve Iligöl

Van Gölü batısında yer alan Nemrut Stratovolkan deniz seviyesinden 2.935 m'dir. 680 m ortalama derinli i ve 40 km² yüzölçümüne sahiptir. +42 ° 15 '25 " - 42 ° 24 ' 48 " kuzey enlemi +38 ° 31 '11 " - 38 ° 36 '12 " do u boylamında bulunmaktadır (ekil. 3.1.). Nemrut gölü yakla ık 15 km² bir yüzey alanına ve yakla ık 100 m derinli e sahiptir. Nemrut Gölü, Iligöl'den su, zayıf yaylar ve yüzey akımlar ile beslenen bir tatlı su gölüdür. Gölde sıcak buhar ve gaz çıkı ları görülmektedir.

Nemrut kaplıcaları ile beslenen Iligöl, Nemrut Caldera kuzeydo u kesiminde yer alan yakla ık 120 hektarlık bir alanı kapsamaktadır. Iligöl 600 m uzunlu unda ve 500 m geni li indedir. Kı mın gölün su sıcaklı ı 15-20°C arasında iken yaz aylarında yakla ık 45-50°C'dır. Iligöl suyu sodyum ve bikarbonatı içerir ve karbondioksit bakımından

zengindir. pH de eri 6.2 ve toplam mineral yo unlu u litrede 1g'dır. Nemrut kıyısında bulunan seyrek bitki aksine Iligöl, yo un sazlar ile kaplıdır. Ayrıca, Nemrut Gölünün yüzey suyu kı ın katıla sa da Iligöl asla donmaz. Numuneler bitki örtüsünün nispeten daha zengin oldu u bölgelerden toplandı.



ekil 3.1. Nemrut Gölü'nün haritadaki yeri

3.3.2. Aygır Gölü

Aygır Gölü, Van Gölü'nün kuzeyinde yer almaktadır. 350 hektarlık bir alana sahiptir. Göl 30 m derinli inde ve erimi kar ve yeraltı kaynar suları ile beslenmektedir. 42° 48' 8"-42° 51' 1" kuzey enlemi 38 ° 47 ' 31 " - 38 ° 47 ' 31 " do u boylamında Bitlis ili sınırları içerisinde Adilcevaz bölgesinde bulunmaktadır (ekil. 3.2.).



ekil 3.2. Aygır Gölü'nün haritadaki yeri

3.3.3. Meke Gölü ve Acıgöl

Meke Gölü, Konya ili Karapınar ilçesinin 94 km doğusunda yer almaktadır. Koordinatları $37^{\circ} 40' 32''$ - $37^{\circ} 41' 33''$ kuzey enlemi ve $33^{\circ} 38' 36''$ - $33^{\circ} 38' 61''$ doğu boylamıdır (ekil 3.3). Göl 800 m uzunluğunda ve 500 m genişindedir; deniz seviyesinden 981 m yüksekliğinde ve 12 m derinliğindedir. Göl erimi kar, mevsimlik akımlar, ve magnezyum ve sodyum sülfat bakımından zengin yeraltı suları ile beslenmektedir.

Acıgöl Konya'da şehir merkezinden 102 km uzaklıktadır. Karapınar 9 km doğusunda yer almaktadır; $37^{\circ} 42' 25''$ - $37^{\circ} 43' 45''$ kuzey enlemi ve $33^{\circ} 39' 18''$ - $33^{\circ} 40' 30''$ doğu boylamındadır (ekil 3.3.). Acıgöl, sırasıyla 1.750 m ve 1.250 m olan kuzeybatı - güneydoğu yönünde en uzun ve en kısa ölçümlerin bir alanını kaplamaktadır ve yaklaşık 120 hektardır. Kıyısının uzunluğu yaklaşık 5.700 m'dir. Göl 70 m derinlikte fakat doğu kesiminde sıdır.



ekil 3.3. Meke Gölü ve Acıgöl'ün haritadaki yeri

3.3.4. Narlıgöl

Narlıgöl, $38^{\circ} 20' 50''$ kuzey enlemi ve $34^{\circ} 29' 28''$ do u boylamındadır (ekil 3.4.) Ni de ili Çiftlik ilçesinin 75 km do usunda yer almaktadır. 500 m çapında bir krater gölüdür. Krater derinli i 50 m kadardır. Narlıgöl deniz seviyesinden 1.246 m yüksekliktedir. Yarı kurak bir iklimi olan bu alanda ya ı ların yıllık ortalama miktarı 389 mm'dir. Ortalama yaz sıcaklı ı 29.5°C ve kı aylarında 10.9°C 'dir.

3.3.5. Gölcük Gölü

Gölcük Gölü, Akdeniz bölgesinde Isparta ili Merkez ilçe sınırları içerisinde bulunmaktadır. Çalı ma alanı Isparta merkezinden 12 km uzaklıkta ve ehrin güneybatısındadır. $37^{\circ} 41' 04''$ - $37^{\circ} 45' 03''$ kuzey enlemi ve $30^{\circ} 27' 40''$ - $30^{\circ} 35' 33''$ boylamındadır (ekil 3.5.). Gölcük 2.200 m çapında ve 76 hektarlık bir alana sahiptir. Göl ve çevresinde yıllık ortalama hava sıcaklı ı 12.1°C 'dir. Sıcaklık tipik Akdeniz Bölgesi'ne benzer. En yüksek sıcaklıklar 23.2 ve 22.9°C aylık ortalamalarla sırasıyla Temmuz ve A ustos aylarında meydana gelirken en dü ük 1.7 ve 2.8°C aylık

ortalamalarla sırasıyla Ocak veubat aylarında bulunmaktadır. Çalıma alanında yıllık ortalama yağış 5.587 mm ve buharlaşma oranı yılda 3.635 mm'dir.



ekil 3.4. Narlıgöl'ün haritadaki yeri



ekil 3.5. Gölcük Gölü'nün haritadaki yeri

3.4. Mikroalglerin zolasyonu, Safla tırılması, ve Tanımlanması

Numuneler BBM, BG11, TAP, FW, DM ve CHU agar kültür ortamına sürüldü ve 2 hafta süreyle inkübe edildi. Bu ilk inkübasyon süresinden sonra, görünür alg kültürleri plakalarından çıkarıldı ve yeni bir kültür ortamına sürüldü ve daha 2 hafta süreyle kuluçkalandı. Alg numuneleri gözle saf görünene kadar bu yenileme işlemi dört kez gerçekleştirildi.

Saf alg kültürleri agar plakalarından çıkarıldı, sıvı ortamı içine aktarıldı ve 2 hafta süreyle bırakıldı. Daha sonra, sıvı ortamı içinde büyüyen mikroalgler mikroskop altında gözlemlendi. Saf olmayanlar kendi agar ortamına yine kaplandı ve 2 hafta daha kuluçkalandı ve aksenik kültürler santrifüj edildi. Santrifüj edilen aksenik kültürler, üstte kalan sıvı kısmın çıkarılmasından sonra -86°C'de saklandı. Tüm kültürler aksenik olana kadar sıvı ortamı içine aktarılması, mikroskop altında gözlenmesi, aksenik kültürlerin santrifüj edilmesi ve -86°C'de saklanması ve saf olmayanların yeniden kaplanması defalarca yapıldı. -86°C'de depolanan saf alg kültürleri Gazi Üniversitesi'ne belirlenmesi için gönderildi.

3.5. Proje için Mikroalglerin Seçilmesi

Chlorella sp. ArM0029B olan en bol bulunan türler ile toplam 23 farklı mikroalg türü tespit edildi. Bu çalışmada için Yeterli literatür desteği olmamasından dolayı öncelikle Meke Gölü'nden izole edilen tür incelenmiştir. Mevcut kaynaklar bu türün Arktik bölgesinden izole edilip biyoteknolojik amaçlar için çok önemli olduğunu ileri sürmektedir. Karayla tırılmalı özneler olarak seçilen diğer mikroalg türleri, biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan en yaygın mikroalglerdir: Narlıgöl'den *Chlorella vulgaris* C-27 ve *Chlorella vulgaris* ESP-31, Ilıgöl'den *Chlorella sp.* ESP-6, ve Narlıgölden *Chlorella variabilis*.

3.6. Büyüme E rileri

Literatüre göre (Therien et al., 2014; Crofcheck et al., 2013), mikroalglerin hızlı büyümesi için en iyi ortam standart tris - asetat - fosfat (TAP) ortamıdır. Büyümesi için en iyi olsa da, TAP aynı zamanda kolayca ve hızlı bir ekilde kirlenmeye e ilimlidir. Bu nedenle, stok kültürleri için Blue-Green (BG11) sıvı ortamı kullanıldı. TAP ve BG11 ortamı Harris'in (1989) ve Stanier'in (1971) sırasıyla protokollerine göre laboratuvarında hazırlandı. Agar plakalarından her türden bir numunesi otoklavlanmı 100 ml BG11 içeren ayrı 250 ml'lik erlenmeyer flasklara a ılandı ve 2 hafta boyunca oda sıcaklı ında suni ı ık altında 90 rpm'de çalkalama cihazında bırakıldı. Bu sürenin sonunda, bir sterilize edici akı kabininde mikroalg hücrelerinin sayılması için kullanılacak olan 1 ml sıvı numune her BG11 i esinden alındı. Thoma hemositometre kullanıldı. Sayma ve gerekli hesaplamaları yaptıktan sonra, ba langıç hücre sayısı olan yaklaşık 3×10^4 hücre/ml, otoklavlanmı 100 ml TAP içeren 15 erlenmeyer i elerine a ılandı. Bunlar oda sıcaklı ında suni ı ık altında 90 rpm'de bir çalkalayıcıda inkübe edildi.

Büyüyen mikroalg absorbans de erleri 680nm'de inkübasyondan 1 gün ve 15 gün boyunca her 2 günde bir ölçüldü. Absorbans de erleri mikroalg büyüme temsili olarak kullanıldı. Böylece, her mikroalg için bir büyüme e risi çizildi. Bu grafikler literatüre göre (Fogg & Thake, 1987), *Chlorella sp.* üstel fazı 5. günde ba lamı tır. Bu sürekli çalı ma için önemli bir gözdür.

3.7. Azot Yoksunlu u

Otoklavlanmı 100 ml sıvı TAP içeren 15 erlenmeyer i esi ba ka bir yı nı hazırlandı ve yaklaşık 3×10^4 hücre/ml yine a ılandı ve aynı ko ullar altında inkübe edildi. Absorbans de erleri bir kez daha önce oldu u gibi 1. günde ve di er her 2 günde bir ölçüldü. 5. günde OD de erleri ölçüldükten sonra her bir erlenmeyer i esi içinde mikroalgler içeren sıvı TAP ortamı aynı ekilde iki 50 ml'lik santrifüj tüplerine bo altılıp santrifüjlendi. Süpernatant çıkarıldıktan sonra, her alg türlerinden alg kalıntısının miktarları iki ayrı sıvı TAP setine (üçlü ve e it olarak) yeniden süspansiyon

haline getirildi; bir set normal sıvı TAP'tır ve di eri azot yoksun sıvı TAP'tır (toplam 30 erlenmeyer i esi).

3.8. Büyüme ve Lipit içeri i zlenmesi

Alg kalıntısının transferinden sonra (kalan 8 gün) her 2 günde bir 10 ml örnek her erlenmeyerden alındı ve 15 ml'lik santrifüj tüplerine bo altıldı. 1 ml ile OD de erleri 680 ve 720 nm 'de ölçüldü. Cooper et al. (2010) ve Cooksey et al. (1987) tarafından tarif edilen ya içeri inin belirlenmesi için Nile Red boyaması kullanıldı. Nile Red okumaları için 720 nm'de de erlerini kullanarak 1 ml numunelerin OD de erleri, microlagler içinde mevcut ya içeri inin bir temsili olarak 0.2'ye ayarlandı. 5µl Nile Red, ölçülecek örneklerini içeren folyo ile kaplı her ependorf tüpü içine eklendi. Bunlar karanlık bir odada 20 dakika süre ile inkübe edildi. Nispi floresan birimleri 486 nm'lik bir eksitasyon dalga boyunda ve 574 nm'lik bir emisyon dalga boyunda bir flüoresan spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü. Ölçümler olası teknik farklılıklar dikkate alındı nda üç kez tekrarlandı. Bu sırada kalan sıvı örnekleri santrifüjlendi, süpernatantlar çıkarıldı, alg kalıntıları 1 ml'lik ependorf tüplerinde tutuldu, tartıldı ve karbonhidrat, proteinler ve klorofil ve karotenoidlerin di er analizleri için -86°C'de saklandı.

3.9. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR)

-86°C'de saklanmı microlag biyokütleleri 1 ml saf su içinde yeniden süspansiyon haline getirildi ve santrifüjlendi. Süpernatantlar atıldı ve biyokütle 6 saat süre ile 40°C'lik vakumda kurutuldu. Perkin Elmer FT-IR Spektrometresi kullanılarak FTIR okumaları kontrol ve azot yoksun mikroalglerin 1, 3, 5, 7, 10. gününde alındı. Spektrumlar 4000-600 cm⁻¹ bir dalga sayısı aralı ı üzerinde 64 tarama ile toplanmı tır. Movasaghi et al. (2008) tarafından daha önce tarif edilen biyokimyasal standartları kullanılarak trigliseritlerin ester grubu titre imleri, amid I absorpsiyonu, C-N gemesi ve CHN proteinlerinden amidlerin e ilme titre imlerine sırasıyla atfedilen 1744, 1652, 1544, 1145 ve 1045 cm⁻¹ bantları analiz edildi.

3.10. Klorofil ve Karotenoid Düzeylerinin Belirlenmesi

Jeffrey Humphreys'in (1975) klorofil *a*, *b*, *c* ve karotenoidler belirlenmesi için protokolü küçük de i iklikler yapılarak kullanıldı. 30 mg kurutulmuş mikroalg biyokütlesine 1.5 ml %90 aseton eklendi. Çözelti vortekslendi ve 15 dakika süre ile bir döndürücü üzerinde ters pozisyonda karıştırıldı. Numuneler 5 dakika boyunca 15000 rpm'de santrifüjlendi ve her bir numuneden 1.5 ml süpernatant 1.5 ml'lik spektroküvette pipetlendi ve süpernatantların absorbanları % 90 aseton bolu a karışımı 750, 664, 647, 470, 630 nm'de ölçüldü.

Aşağıdaki denklemler klorofil *a*, *b*, *c* ve karotenoidler ($\mu\text{g/ml}$) konsantrasyonu hesaplamak için kullanıldı:

$$\text{Klorofil } a = (11.85 * (E_{664} - E_{750}) - 1.54 * (E_{647} - E_{750}) - 0.08 * (E_{630} - E_{750})) / \text{seyreltme oranı}$$

$$\text{Klorofil } b = (-5.43 * (E_{664} - E_{750}) + 21.03 * (E_{647} - E_{750}) - 2.66 * (E_{630} - E_{750})) / \text{seyreltme oranı}$$

$$\text{Klorofil } c = (-1.67 * (E_{664} - E_{750}) - 7.60 * (E_{647} - E_{750}) + 24.52 * (E_{630} - E_{750})) / \text{seyreltme oranı}$$

$$\text{Toplam karotenoidler} = (1000 * E_{470} - 1.86 * \text{Klorofil } a - 74.08 * \text{Klorofil } b) / 206$$

E belirli bir dalga boyunda absorbanıdır.

3.11. Protein Konsantrasyonu

Küçük de i ikliklerle Weis'in (2002) protokolü *Chlorella* türünün protein konsantrasyonu belirlemek için kullanıldı.

3.11.1. Protein Ekstraksiyonu

Dondurulmuş hücre topakları (70 µg), 50 mM Tris-HCl, pH 8, % 2 SDS, 10 mM EDTA olan 500 µl lizis tamponu içinde yeniden süspansiyon haline getirildi. Numuneler 1 dakikadır sonikatörde kaldı. Sonra numuneler 1 dakika süre ile sıvı azot içinde donduruldu. Daha sonra, numuneler 20 dakika boyunca ters döndürücüde oda sıcaklığında inkübe edildi ve daha sonra bir kere daha sonikatöre koyuldu. Ondan sonra numuneler 4°C'de 20 dakika süre ile 13000 g'de santrifüjlendi; pelletler atıldı ve süpernatantlar protein konsantrasyonu belirlemek için kaydedildi.

3.11.2. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Deneye geçmeden önce ısı kabinesi 60°C'e kadar ısıtıldı. 1 kısım % 4 bakır sülfat ve 50 parça Bicinchoninic asit solüsyonu (Sigma) içeren çalınma reaktifi karıştırıldı. Bu karışım karanlık bir odada oda sıcaklığında saklandı. Standart protein numuneleri ve 1, 3, 5, 7, 10 günde hasat edilen *Chlorella* türünün bilinmeyen protein konsantrasyonu bir 96'lık kuyu plaka içinde hazırlandı. Standart numuneler, 0, 1.5, 3, 5, 7.5 ve 10 µl 0.5 mg/mL konsantrasyonu olan bovin serum albüminiyle sırasıyla 10, 8.5, 7, 5, 2.5, 0 µl saf suda içerdi. Bilinmeyen numuneler ayıklanmış 4 µl protein ve 6 µl suyu içerdi. Daha sonra 200 µl çalınma reaktifi her bir örneğe eklendi. Plaka 60°C'de 30 dakika süre ile inkübe edildi ve daha sonra oda sıcaklığına soğumaya bırakıldı. 562 nm'de absorbans değeri alındı. Standart bir eğri (ek olarak verilen) çizildi ve her bir mikroalg bilinmeyen protein konsantrasyonu değeri kullanılarak belirlendi.

3.12. Statistiksel Analiz

Ekilde sunulan veriler farklı zamanlarda yapılmış iki deneyin sonucu elde edilen değerlerin ortalaması olarak değerlendirilmiştir. 0.01 ve 0.001 önem ile iki uçlu t-testi kullanılarak bütün deneysel hesaplamalar ve istatistiksel karşılaştırmalar MS-Excel programı kullanılarak yapıldı. Her veri için kendi içindeki farklılıklar \pm Standart Hata çubukları şeklinde sunulmuştur.

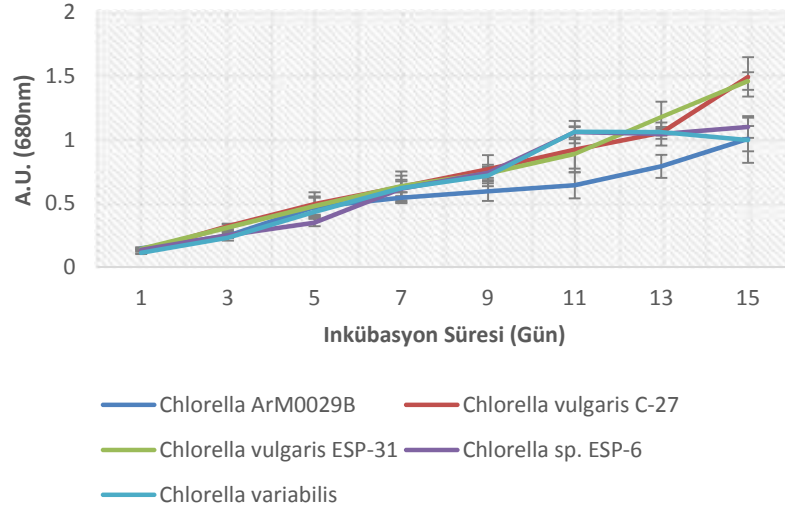
4. BULGULAR VE TARTI MA

Türkiye’de farklı volkanik göllerden izole edilen 5 farklı *Chlorella* türü oda sıcaklığında TAP büyüme solüsyonu içinde 15 günlük büyüme sürecine bırakılmış, yapılan her ölçüm için; iki karışılma grubu kullanılmıştır. Bunlar aynı koşullar altında yetiştirilen beş *Chlorella* türünün biyomoleküllerinin toplam verimi arasındaki karışılma ve azotsuz kontrollü artlar altında yetiştirilen tek türlerin biyomoleküllerinin toplam verim karışılmaları.

4.1. Büyüme

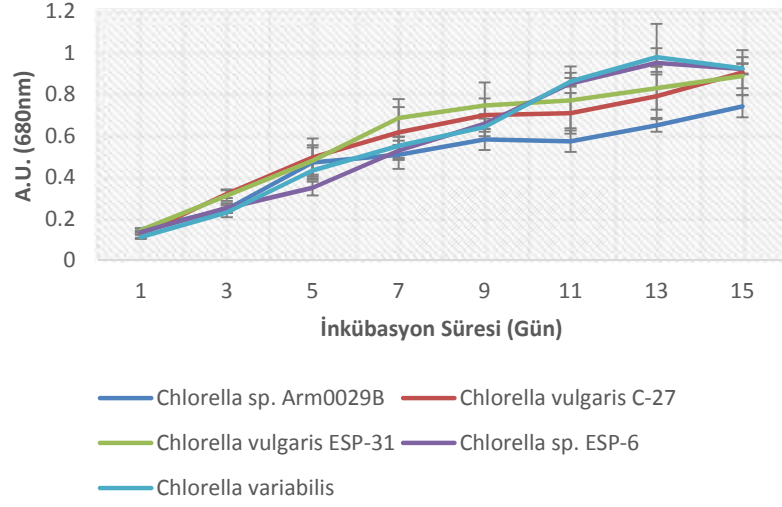
Mikroalglerin büyüme miktarlarının belirlenebilmesi için absorbans değeri olarak 680 nm kullanılmıştır. Azot açığı ve normal koşullar altında mikroalglerdeki büyüme miktarları ekil 4.1.’de gösterilmiştir.

A



ekil 4.1. 5 *Chlorella* türünün kontrollü artlar (A) ve azot aç ortamda (B) 15 günlük inkübasyon sürecinde büyümesi.

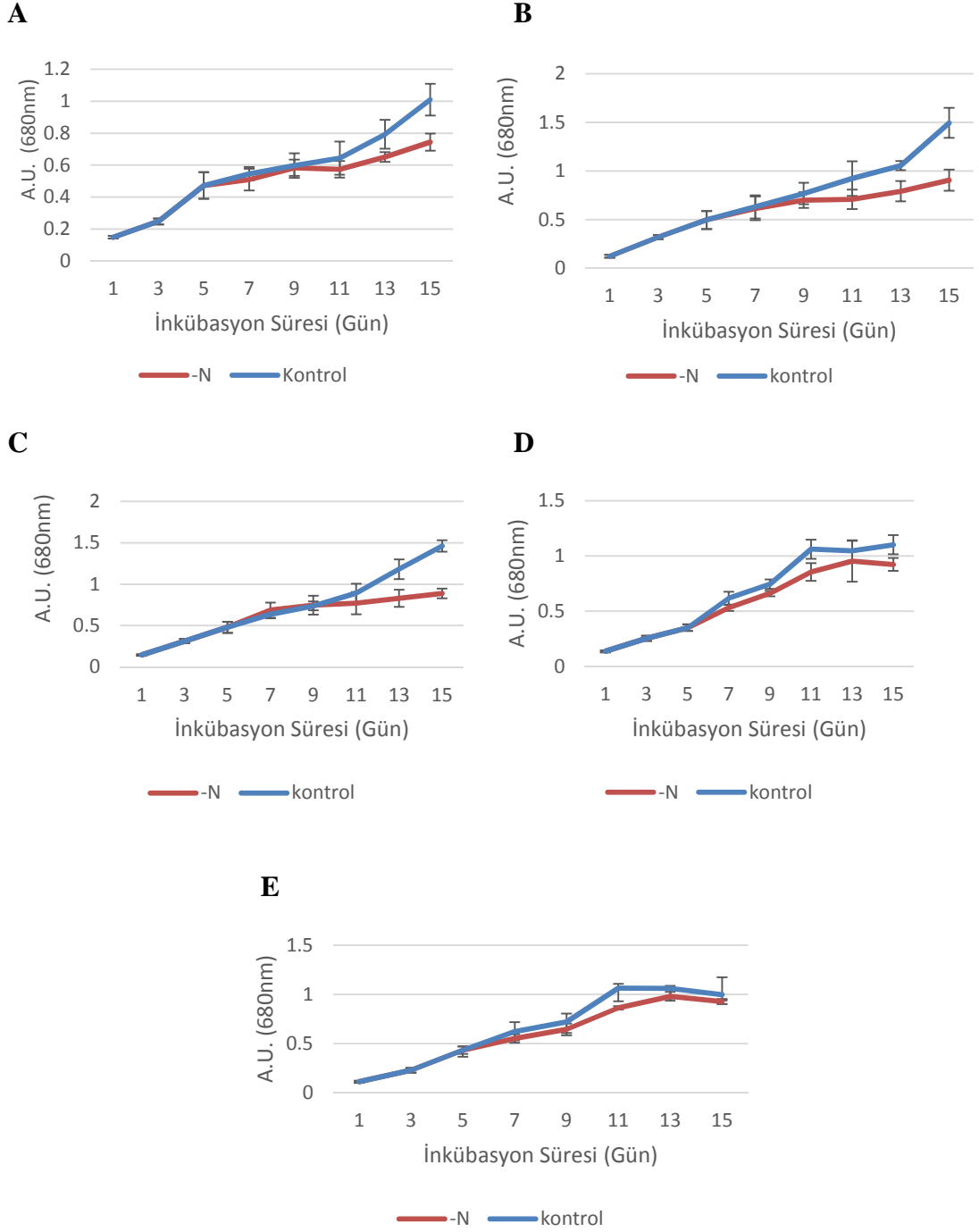
B



ekil 4.1. Devamı

Kontrollü artlar altında, *Chlorella vulgaris* C-27 ve ESP-31 inkübasyon sonunda en yüksek büyüme oranına sahiptir, daha sonra sırasıyla genellikle aynı büyüme oranı görülen *Chlorella sp.* ArM0029B, ESP-6 ve *Chlorella variabilis*'dir. Sonuçların aksine Ahn (2012)'nin bildirdiğine göre kontrollü artlar altında ve oda sıcaklığında *Chlorella sp.* ArM0029B'nin büyüme oranı *C. vulgaris*'indekinden daha yüksektir, en yüksek büyümenin doğal ortamından, buzullardan, izole edildiği için *Chlorella sp.* ArM0029B'de mümkün olduğu gösterilmiştir. Bu duruma rağmen, volkanik göller (sıcaklık 25-30°C) *C. vulgaris* türleri için daha iyi doğal ortamdır (Sharma et al., 2012).

Normal TAP ortamında büyüyen mikroalgler inkübasyonun üssel fazın başlangıcı olan 5. gününde, yeni normal TAP'a ve azot yoksun TAP'a transfer edilmiştir. Burada diğer dört tür genellikle aynı büyüme oranına sahip olmasına rağmen, *Chlorella sp.* ArM0029B en düşük büyüme oranına sahiptir. Ayrıca, ekil 4.2. be ayrı *Chlorella* türünün kontrollü ve azot yoksun ortamlarda nasıl büyüdüğünü gösterir.



ekil 4.2. Kontrollü ve azot yoksun ko ullarda, 15 günlük inkübasyon süresince 5 *Chlorella* türünün büyümesi; *Chlorella sp.* ArM0029B (A) *Chlorella vulgaris* C-27 (B) *Chlorella vulgaris* ESP-31 (C) *Chlorella sp.* ESP-6 (D) ve *Chlorella variabilis* (E).

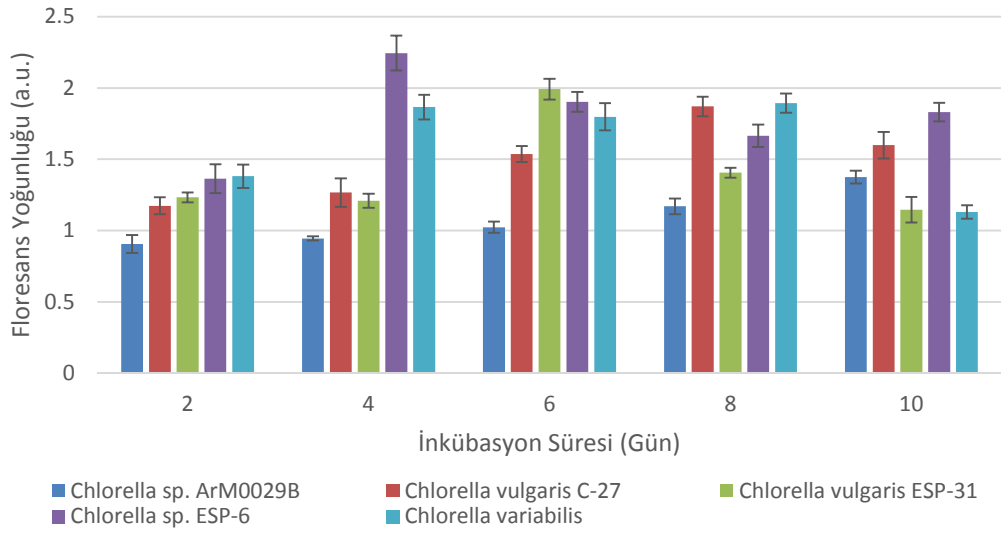
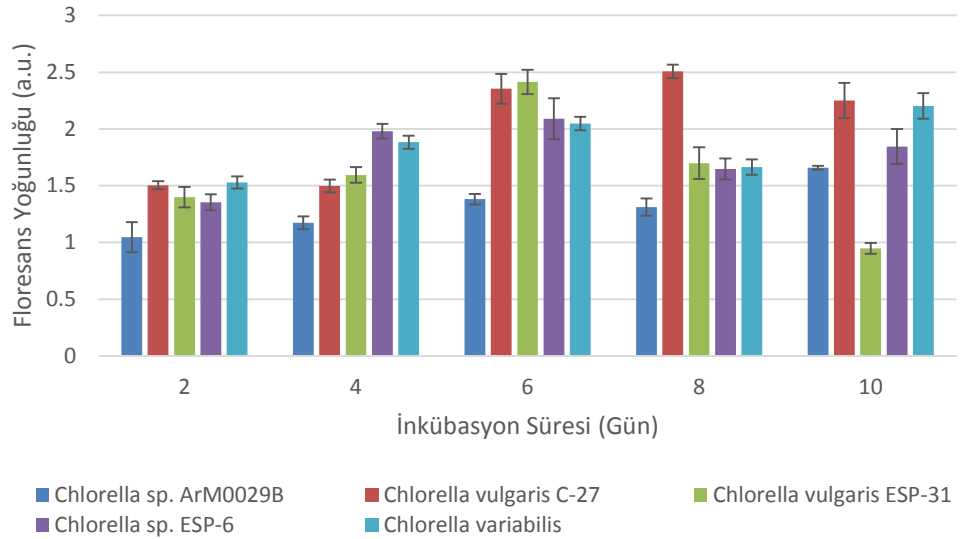
Azot, bitki ve alglerin büyümesi için gerekli olan en önemli besinlerden biridir. Birçok çalı maya göre, Converti et al. (2009), Çakmak et al. (2012), Piorreck et al. (1983), azot yoksunlu u mikroalg büyümesinde dramatik bir azalmaya yol açar, ba ka bir deyi le büyüme, büyüme ortamındaki azot konsantrasyonu ile do ru orantılıdır. Aynı ekilde, inkübasyon süresi sonunda a artılan mikroalg kültürü ve üstteki grafikte belirgin olarak görülmü türki, bu çalı ma mikroalglerin kontrollü artlar altında büyümesi ile ilgili olarak her *Chlorella* türlerinin azot açlı ı altında büyümesinin azaldı mını göstermi tir. nkübasyon süresinin sonunda büyümede *Chlorella sp.* ESP-6 ve *C. variabilis*'de yakla ık %10'a kadar azalma görülmesine ra men, *Chlorella sp.* ArM0029B, *C. vulgaris* C-27 ve ESP-31'de daha büyük azalma görülmü tür (%39'a kadar).

4.2. Lipit içeri i

letilmesi gereken mikroalglerin en önemli biyokimyasal bile imi lipit içeri idir. Normal ko ullarda en yüksek miktarda lipitleri üretebilen en iyi mikroalglerin seçilmesi de önemlidir. Bu çalı mada, yeni kontrollü ve azot yoksun TAP içine mikroalg hücrelerinin transferinden sonra biyokütle, on gün süre ile her iki günde bu iki büyüme ko ullarında be *Chlorella* türünün lipit içeri ini analiz etmek için hasat edildi.

ekil 4.3. kontrollü ve azot yoksun ko ullarda on günlük inkübasyon süresince be *Chlorella* türünün lipit içeri ini gösterir.

Cooksey et al. (1987) tarafından geli tirilen Nil Red protokolünü kullanarak floresan boyama teknikleri lipit içeri ini belirlemek için kullanıldı. Nil Red, biyolojik uygulamalarda mikroalglerin lipit organlarını vurgulamak ve ölçmek için sıkça kullanılmaktadır. Nil Red maksimum emisyon de erleri, polar lipitler 637 nm veya nötr lipitler içinde 580 nm'dır (Greenspan et al., 1985; Cooksey et al., 1987). kinci olan, amaç biyodizel ürünlerine dönü türülecek nötr lipitleri ölçmek oldu u için daha sıklıkla kullanılmaktadır.

A**B**

ekil 4.3. 5 *Chlorella* türünün kontrollü ortamlar (A) ve azot aç ortamda (B) 10 günlük inkübasyon sürecinde lipit içeriği.

Kontrollü ortamlarda, *Chlorella sp.* ArM0029B'in en yüksek lipit miktarı inkübasyonun 10. günündedir; *C. vulgaris* C-27'indeki 8. günüdür; *C. vulgaris* ESP-31'indeki 6. günüdür; *Chlorella sp.* ESP-6'indeki 4. günüdür; ve *C. variabilis*'indeki 4, 6, 8. günlerdedir. Genel olarak, beş *Chlorella* türünden en fazla lipit miktarını üreten biri *Chlorella sp.* ESP-6'dır.

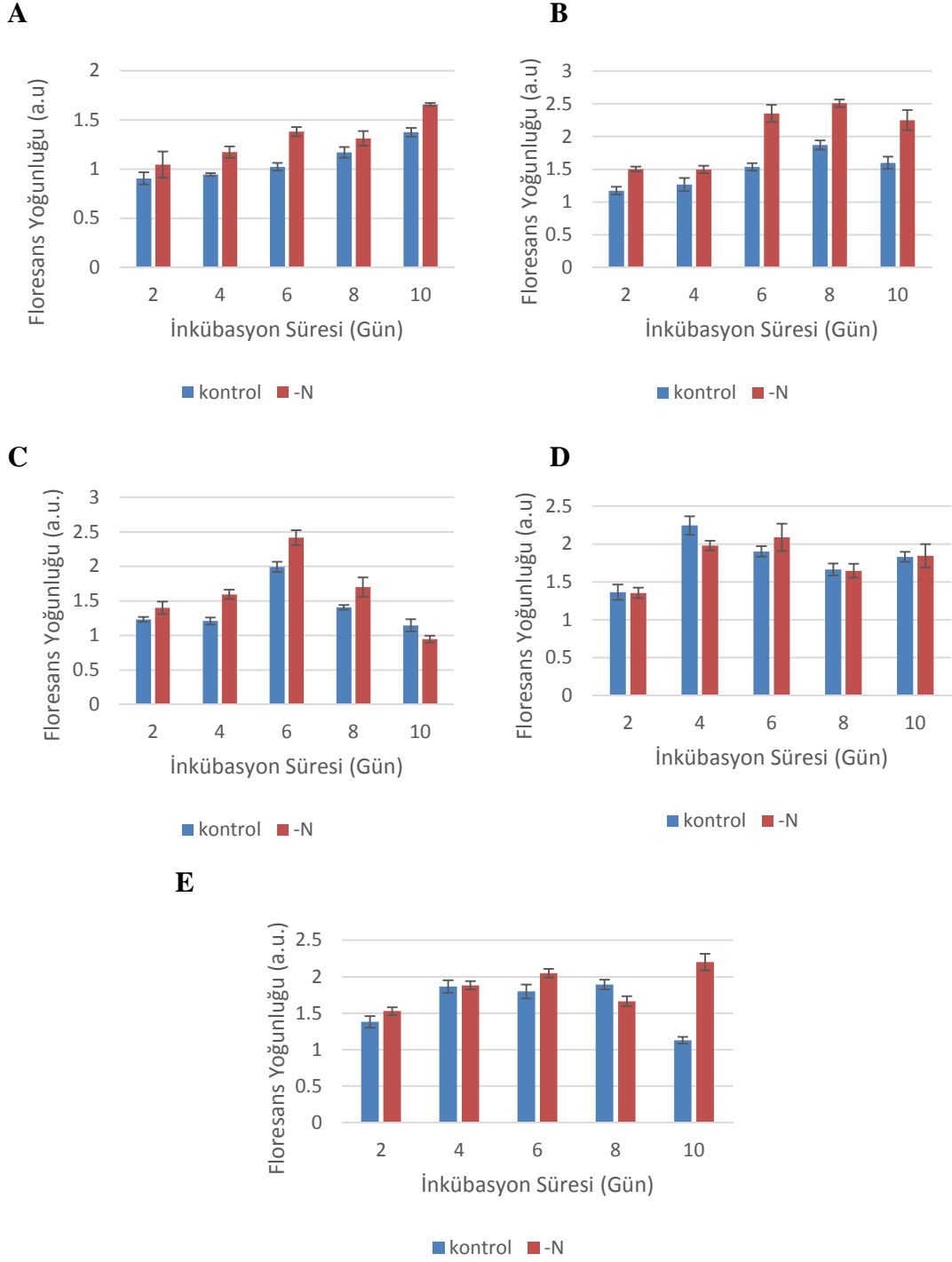
Azot yoksunlu unda, *Chlorella sp.* ArM0029B'in en yüksek lipit miktarı inkübasyonun 10. günündedir; *C. vulagris* C-27'indeki 6, 8, 10. günlerdedir; *C. vulgaris* ESP-31'indeki 6. gündedir; *Chlorella sp.* ESP-6'indeki 4 ve 6. günlerdedir; ve *C. variabilis*'indeki 6 ve 10. günlerdedir. Genel olarak, be *Chlorella* türünden lipit en fazla miktarını üreten biri *C. vulgaris* C-27 ve ESP-31'dir.

Birçok çalı ma, azot eksikli inde mikroalglerin do al olarak lipit içeri ini artırarak yanıt verdi ini ortaya koymaktadır. Sharma et al. (2012)'a göre, a ırı çevresel stres altında, mikroalgler lipit biyosentezini uyarmak için fizyolojik yolları yeniden programlamaktadır; lipitler, mikroalglerin olumsuz çevresel ko ulları dayanmasını sa layan hücredeki bir depolama fonksiyonunu sa lamaktadır. Ayrıca, lipit üretimin olu um ve kapsamı mikroalg türüne özeldir; sonuçta, organizmanın genetik kompozisyonu tarafından kontrol edilmektedir.

ekil 4.4. azot yoksun ve kontrollü ko ullarda yeti tirilmi be *Chlorella* türünün her birinin lipit içeri inde farklılı ı gösterir.

Büyüme, azot konsantrasyonu ile do rudan orantılıdı ama lipit içeri i azot konsantrasyonu ile ters orantılıdır (Nigam et al., 2011). Sonuçlarımız, kontrollü ko ullar ile kar ıla tırıldı nda azot yoksunlu unda bireysel mikroalglerin lipit içeri inde genel bir artı göstermektedir. nkübasyon 4. gününde *Chlorella sp.* ESP-6'nın lipit içeri inde %13 azalması olmu tur; 6. günde *Chlorella sp.* ArM0029B'nindekinde %26 ve *C. vulagris* C-27'indekinde %35 artı ı olmu tur; 2 ve 4. günlerde *C. vulgaris* ESP-31'indekinde %31 artı ı olmu tur; 10. günde *C. variabilis*'indekinde en yüksek olan %50 artı ı olmu tur.

Yeh et al. (2011), Praveenkumar et al. (2009), ve Converti et al. (2009), azot yoksunlu unda en çok *Chlorella* türlerinin lipit verimlili inin %17 oranında arttı ını bildirmektedir. Sonuçlarımız, *C. variabilis*'in lipit içeri inin %50 veya *C. vulgaris* C-27'nindekinin %35 oranına kadar artabildi ini göstermektedir. Azot yoksun ortamda yeti tirilmi *Scenedesmus obliquus* ve *C. vulgaris*'te sırasıyla %43 ve 40 oranına kadar bir artı ın oldu u bildirilmektedir (Gouveia & Oliveira, 2009; Ilman



ekil 4.4. Kontrollü ve azot yoksun ko ullaarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 *Chlorella* türünün lipit içeri i; *Chlorella sp.* ArM0029B (A) *Chlorella vulgaris* C-27 (B) *Chlorella vulgaris* ESP-31 (C) *Chlorella sp.* ESP-6 (D) ve *Chlorella variabilis* (E).

et al., 2000). Ayrıca, orta üslü fazda %18 oranında bir ortalama ile artı daha sıkça gözlemlendi; Bunlar, üstel fazda lipit içeri inde %18 oranında bir artı gözleyen Nigam et al. (2011) tarafından bildirilen sonuçlara benzemektedir.

Be mikroalgin büyüme ve lipit içeri ini analiz ederek, kontrollü ko ullar ile kar ıla tırıldı nda azot açlı nda büyümesi artar ama lipit içeri i azalmaktadır. Widjaja et al. (2009), azot stresi nedeniyle yüksek lipit üretiminin 2-5 gün sürebildi i ve mikroalglerin yava büyüme oranları oldu unu bildirmektedir. Çevresel stres, besinler sınırlı oldu unda hücre bölünmesinin oranında istikrarlı bir dü ü e neden olmaktadır. Bu durumda, yeni membran bile iklerin sentez yapılmasına bir ihtiyaç yoktur. Bu yüzden, hücreler TAG eklinde ya asitlerini depolamaktadır. Bu ko ullarda, TAG üretimi koruyucu bir mekanizmadır (Thompson, 1996). Normal büyüme ko ullarında, fotosentez tarafından üretilen ATP ve NADPH biyokütle üretilerek tüketilmektedir; sonunda, ADP ve NADP+ fotosentez alıcı molekülleri olarak yeniden kullanılabilir bir hale gelmektedir. Hücre bölünmesi besinlerin eksikli i nedeniyle kesintiye u radı ı için NADP+ tükenmi bir halde olmaktadır (Sharma et al., 2012). Fotosentez ık yo unlu u tarafından kontrol edildi i ve tamamen durdurulacak olamadi i için hücre bile enleri zarar görebilmektedir. Bu nedenle, NADPH, TAG olarak sonra depolanacak ya lı asitlerin sentezinde tüketilmektedir. Bu ekilde, NADP+ miktarı yeniden doldurulmaktadır (Thompson, 1996; Hu et al., 2008).

Azot yoksun ve kontrollü ko ullarda bireysel tür içinde ve be ayrı tür arasında büyüme ve lipit içeri i kar ıla tırmaları, biogübre veya hayvan gıdasının bir kayna ı olarak biyokütleyi üretmek için en de erli adayın, ikisi de yüksek büyüme profiline sahip oldu undan *C. vulgaris* C -27 veya ESP- 31 oldu unu ortaya çıkarmaktadır; biyodizel üretiminin bir kayna ı olarak arzu edilen ürün biyoyakıtısa, azot yoksun ko ullarda en yüksek lipit miktarına sahip oldu undan en iyi adaylar da *C. vulgaris* C-27 veya ESP-31'dir.

4.3. Proteinler

Weis's et al. (2002) küçük de i ikliklerle protokolü, be mikroalgin protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanıldı. Bir standart protein e risi OD592 nm'de ölçüldükten sonra çizildi ve bu, ekil 4.5.'de gösterilen kontrol ve azot yoksun ko ullarda yeti tirilmi 100 mg mikroalg kütlesinin bilinmeyen konsantrasyonlarını belirlemek için kullanıldı.

Kontrollü ko ullarda *Chlorella sp.* ArM0029B, *C. vulgaris* C-27, ve ESP-31'in en yüksek protein konsantrasyonu inkübasyonun 10. günündedir; *Chlorella sp.* ESP-6'indeki 6 ve 10. gündedir; *C. variabilis*'indeki 6, 8, ve 10. gündedir; Genel olarak, be *Chlorella* birbirine göre proteinleri aynı miktarda üretti.

Azot yoksun ko ullarda be mikroalgin en yüksek protein konsantrasyonları inkübasyonun 10. günündedir.

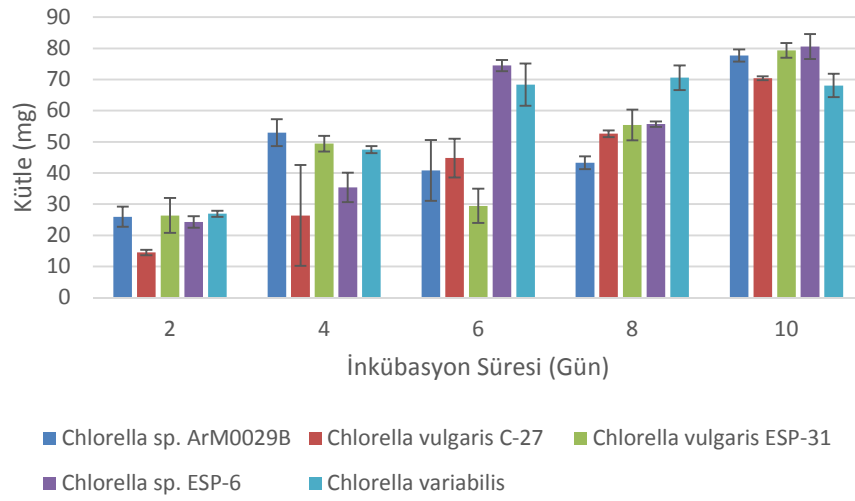
Azot yoksun ve kontrollü ko ullarda be ayrı türün protein konsantrasyonunda farklılık ekil 4.6.'da gösterilir.

Kontrollü ko ullarda üretilen proteinlerin konsantrasyonu ile kar ıla tırıldı nda azot yoksunlu unda, inkübasyonun 10. gününde dört *Chlorella*'nın protein konsantrasyonlarında belirgin bir azalma vardı. En yüksek dü ü açısından; nkübasyonun 4. gününde *Chlorella sp.* ArM0029B'in protein konsantrasyonunda %21 azalması vardır; 2. günde *C. vulgaris* C-27'indekinde %20 ve *C. vulgaris* ESP-31'indekinde %16 azalması vardı; 4 ve 6. günlerde *Chlorella sp.* ESP-6'indekinde %14 azalması vardır; 4. günde di er dört mikroalgin aksine, *C. variabilis*'in protein konsantrasyonunda % 27 artı ı vardır.

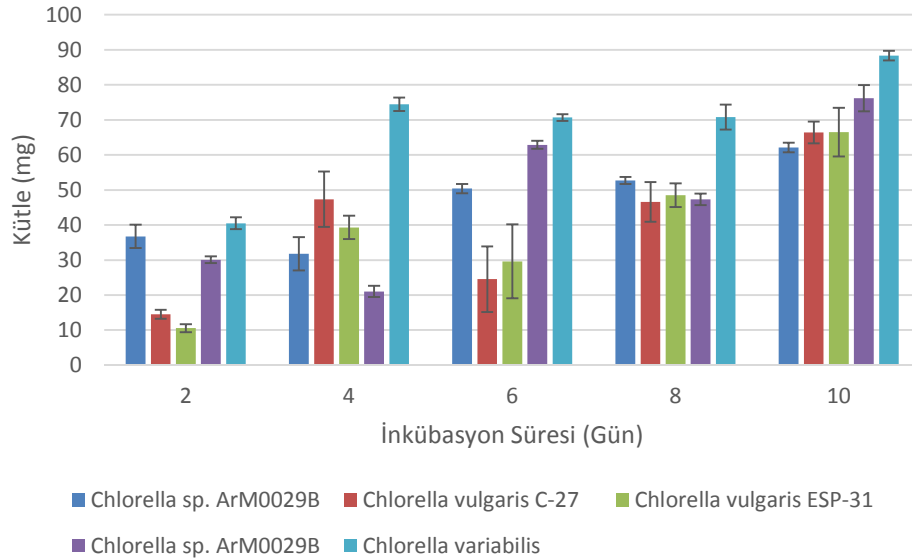
Proteinler mikroalg hücre kütlesinin yakla ık % 60-70'ini olu turmaktadır (Safi et al., 2013). Çalı mızda normal ko ullarda protein konsantrasyonları, inkübasyonun döneminin sonunda %80'ine kadar yüksektir, ören in *Chlorella sp.* ArM0029B, *C. vulgaris* ESP-31 ve *Chlorella sp.* ESP-6'de. Proteinler %16 azot olu maktadır (Jones, 1931); bu yüzden azot konsantrasyonu azaldıkça proteinlerin konsantrasyonunun

azalması da do aldır. Sonuçlarımız, azot yoksunlu unda üretilen proteinlerin miktarının genellikle %10-20 oranında azaldı mı göstermektedir. Ancak, *C. variabilis*'in protein konsantrasyonunda % 27 artı ı oldu; mikroalg protein konsantrasyonunda ba ka bildirilen artı yoktur. *C. variabilis*'in Chlorovirus *Paramecium bursaria* ile simbiyotik bir ili ki kurdu u bilinmektedir. Rowe et al.

A

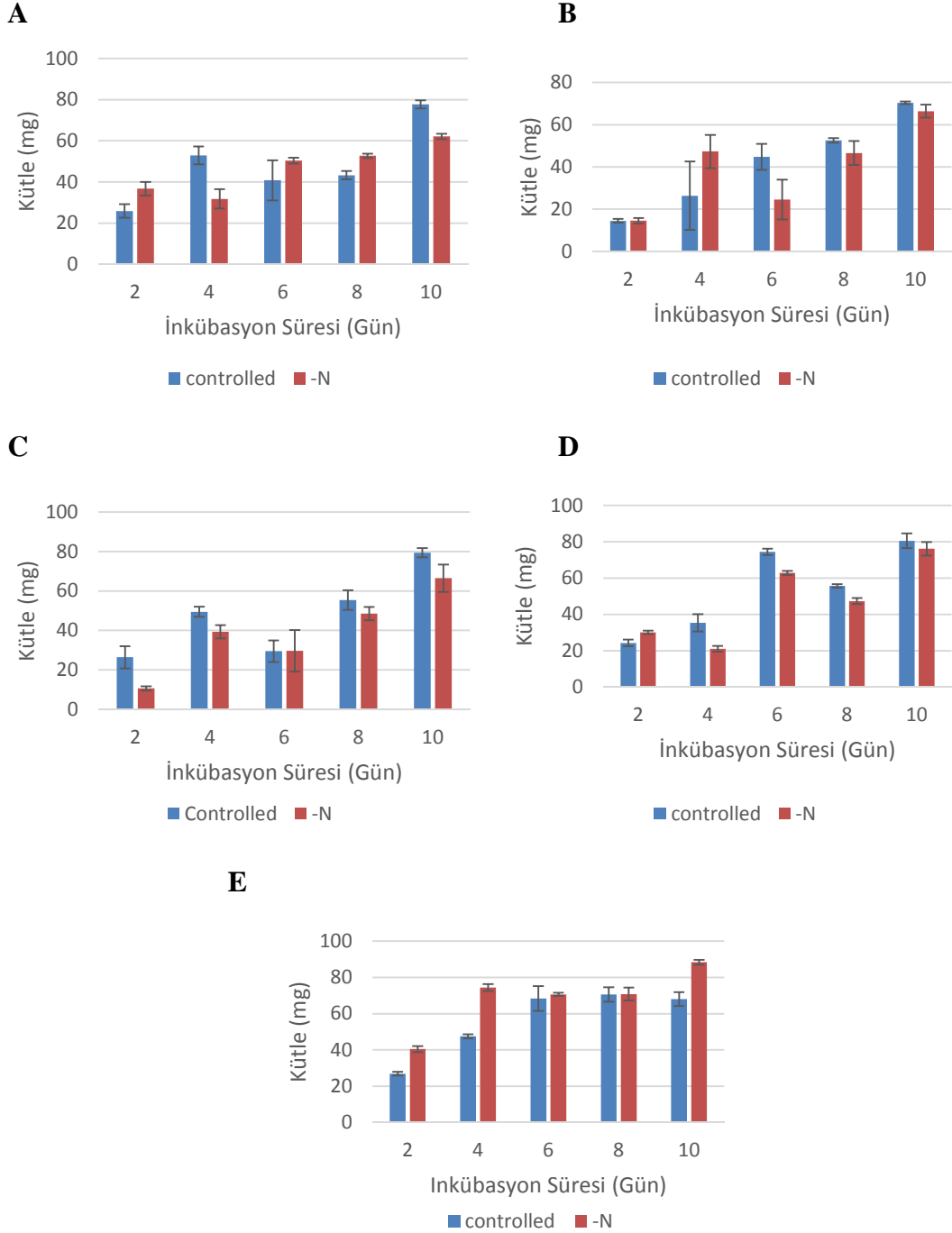


B



ekil 4.5. 5 *Chlorella* türünün kontrollü artlar (A) ve azot aç ortamda (B) 10 günlük inkübasyon sürecinde protein konsantrasyonu.

(2013)'a göre, endosimbiyotik durumunda RNA susturan genler, enfeksiyon sırasında savunma bir mekanizması olarak *C. variabilis*'te ifade edilmektedir.



ekil 4.6. Kontrollü ve azot yoksun ko ullarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 *Chlorella* türünün protein konsantrasyonu; *Chlorella sp.* ArM0029B (A)

Chlorella vulgaris C-27 (B) *Chlorella vulgaris* ESP-31 (C) *Chlorella sp.* ESP-6 (D) ve *Chlorella variabilis* (E).

C. variabilis'in virüs enfeksiyonu gibi ba ka stres türü (örne in azot yoksunlu u) ile mücadele etmek için aynı ekilde belli genleri ifade ederek ancak daha fazla proteinleri üretmeyerek tepki göstermesi mümkün olabilir, böylece sonuçumuzda protein düzeyinde tespit edilmi positif de i iklik. Ancak, daha fazla ara tırma bu olayın ihtimalini belirlemek için yapılmalıdır.

Kontrollü ko ullarda azot yoksunlu undan büyümesinin (biyokütle verimi) daha yüksek (yakla ık %30 oranında) oldu u ve normal ko ullarda yeti tirildi inde proteinlerin en yüksek miktarını (biyokütlenin %80'i) verdi i için biyogünre veya insan gıdasının bir kayna ı olarak en iyi aday *C. vulgaris* ESP-31'dir.

4.4. Klorofil ve Karotenoidler

Jephrey ve Humphrey's (1975) küçük de i ikliklerle protokolü, be mikroalgin klorofil ve karotenoidlerinin düzeylerini belirlemek için kullanıldı. Tablo 4.1. kontrollü ve azot yoksun ko ullarda be *Chlorella* türünün klorofil ve karotenoidlerinin konsantrasyonlarını göstermektedir.

Kontrollü ko ullarda be microalgin her birisinin klorofil ve karotenoidlerinin düzeylerinde zamana göre önemli bir de i iklik yoktur. Sadece hafif dalgalanmalar hasat gününden gününe bulundu. *Chlorella sp.* ArM0029B'in en yüksek klorofil ve karotenoidlerin düzeyi sırasıyla inkübasyonun 10. ve 6. günündedir; *C. vulgaris* C-27'nindekiler sırasıyla 4. ve 6. gündedir; *C. vulgaris* ESP-31'indekiler sırasıyla 4. ve 8. gündedir; *Chlorella sp.* ESP-6'nindekiler sırasıyla 2. ve, 6. ve 8. gündedir; *C. variabilis*'indekiler sırasıyla 6. ve 10. gündedir; En yüksek klorofil düzeyi olan mikroalg *Chlorella sp.* ESP-6'dır ve en yüksek karotenoidler düzeyi olan *C. variabilis*'dir.

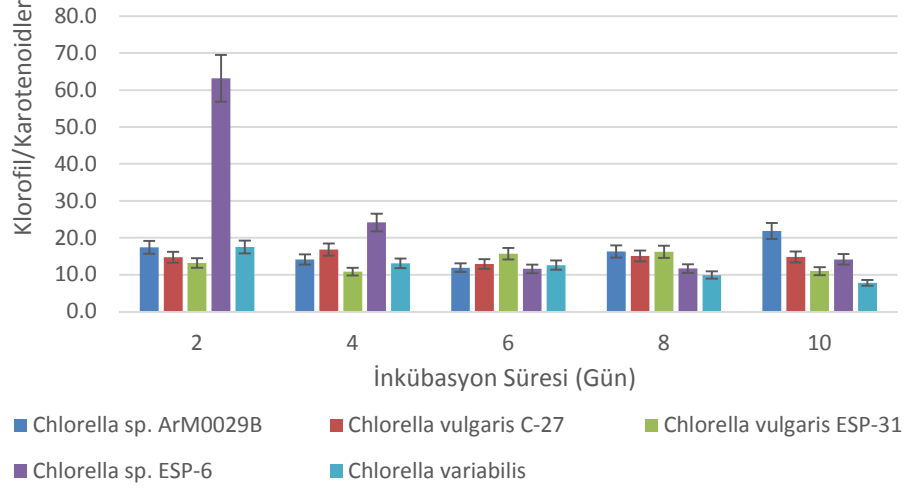
Azot yoksun ko ullaarda zamana göre her be mikroalgin klorofil ve karotenoidlerinin düzeylerinde sırasıyla kademeli bir dü ü ve artı oldu. En yüksek klorofil düzeyi olan mikroalg *C. vulgaris* ESP-31'dir ve en yüksek karotenoidler düzeyi olan mikroalg *C. vulgaris* C-27'dir.

Çizelge 4.1. 5 *Chlorella* türünün kontrollü artlar ve azot aç ortamda 10 günlük inkübasyon sürecinde klorofiller ve karotenoidlerinin düzeyleri.

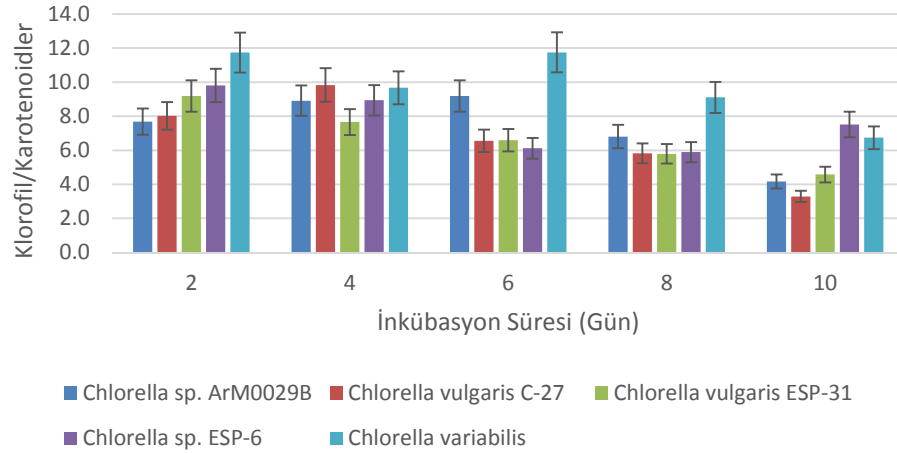
Türün smi	nkübasyon Süresi (Gün)				
	2	4	6	8	10
	Kontrollü Ko ullaar				
	Klorofil (<i>a</i> ve <i>b</i>) (µg/ml)				
<i>Chlorella sp.</i> ArM0029B	51.0	55.6	52.8	53.6	57.4
<i>Chlorella vulgaris</i> C-27	52.7	56.4	54.9	55.2	54.4
<i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31	48.0	54.6	50.7	54.5	49.7
<i>Chlorella sp.</i> ESP-6	64.2	55.5	54.8	53.8	55.4
<i>Chlorella variabilis</i>	52.3	50.9	53.4	46.9	43.0
	Karotenidler (µg/ml)				
<i>Chlorella sp.</i> ArM0029B	2.9	3.6	4.4	3.3	2.6
<i>Chlorella vulgaris</i> C-27	3.6	3.1	4.3	3.7	3.7
<i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31	3.6	4.4	3.2	3.4	4.5
<i>Chlorella sp.</i> ESP-6	1.0	2.7	4.7	4.6	3.9
<i>Chlorella variabilis</i>	3.0	4.0	4.2	4.7	5.5
	Azot Yoksunlu u				
	Klorofil (<i>a</i> ve <i>b</i>) (µg/ml)				
<i>Chlorella sp.</i> ArM0029B	45.9	41.5	48.4	39.9	36.0
<i>Chlorella vulgaris</i> C-27	43.5	43.0	41.0	38.8	30.7
<i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31	42.9	37.7	39.9	37.0	33.4
<i>Chlorella sp.</i> ESP-6	52.8	45.4	41.5	42.6	45.6

(Guedes et al., 2011); di er bir deyi le, a ırı enerjisine maruz kalan hücresi zararlı etkilerinden korumaktadır.

A

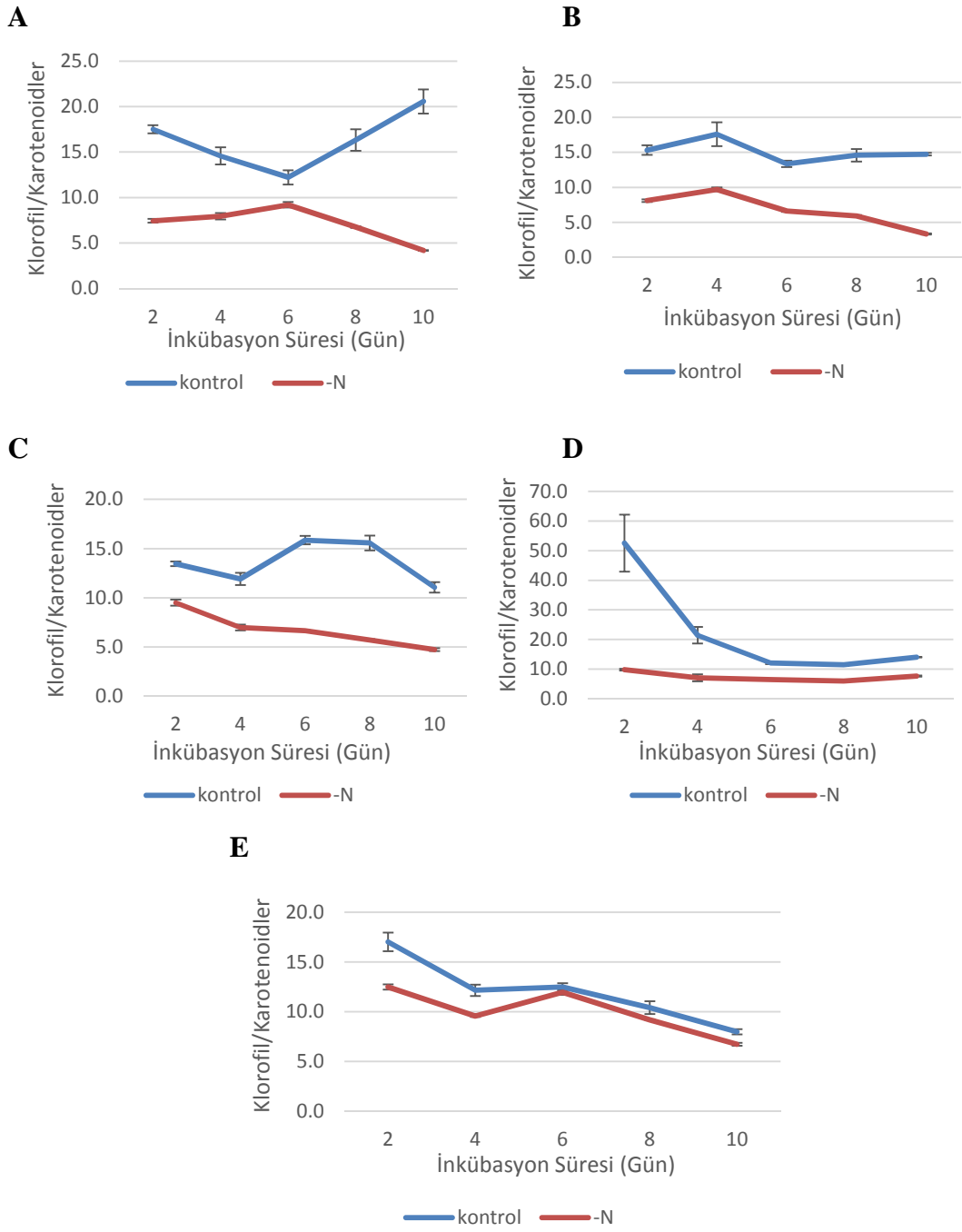


B



ekil 4.7. 5 *Chlorella* türünün kontrollü şartlar (A) ve azot aç ortamda (B) 10 günlük inkübasyon sürecinde klorofiller/karotenoidlerinin oranı.

Azot yoksun ko ullarda klorofil düzeyinde önemli azalma, klorofil moleküllerinin kendi yapısında dört nitrojen atomu oldu u için azot yoksunlu unda hücre



ekil 4.8. Kontrollü ve azot yoksun ko ullaarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 *Chlorella* türünün klorofil/karotenoidlerinin oranı; *Chlorella sp.* ArM0029B (A) *Chlorella vulgaris* C-27 (B) *Chlorella vulgaris* ESP-31 (C) *Chlorella sp.* ESP-6 (D) ve *Chlorella variabilis* (E).

organellerinin klorofili zor sentezlemesine ba lı olabilir (Lichtenthaler, 1987; Pisal & Lele, 2004). Ayrıca, zamana göre a amalı bir dü ü oluyor çünkü alg hücreleri nitrojenin bir kayna ı olarak klorofili kullanmaktadır (Ratha et al., 2013; Li et al., 2008). Bundan ba ka, azot yoksun ko ullarda serbest radikallerin a ırı olumu gerçeikle mektedir (Jalal et al., 2013). Bu nedenle, antioksidan özellikleri a ırı reaktif oksijen türlerini giderdi i, fazla enerjiyi da ıttı ı ve fizyolojik dengeyi geri yükleyebildi i için mikroalgler bir savunma tepki mekanizması olarak daha karotenoidleri üretmektedir.

Be microalgden, *Chlorella sp.* ArM0029B, *C. vulgaris* C-27 ve ESP-31 klorofil/karotenoidleri oranlarında (yaklaşık %70 oranında) en yüksek dü ü ya adı; *Chlorella sp.* ESP-6 ve *C. variabilis* %7 oranından daha az bir dü ü ya adı. Bu sonuçlar, büyümelerinin klorofil ve karotenoidlerin düzeyinde artı ı ile do rudan orantılı oldu unu göstermektedir. Büyüme sonuçlarında, ilk üç belirtilen microalgın azot yoksunlu unda büyümelerinde en yüksek azalması vardır; *Chlorella sp.* ESP-6 ve *C. variabilis* oldukça küçük bir dü ü ya adı; bu, klorofil düzeyinde çok önemli bir de i imin olmaması nedeniyle mümkün olabilir.

Sanayi ve ticaret sektörlerinde, gıda ve ilaç endüstrilerinde uygulanacak do al pigmentlerin bir talebi vardır (Dufosse et al., 2005). Mikroalg pigmentlerinin do al oranlarda do al izomerlerin tedari i avantajı vardır (Pulz and Gross, 2004; Murthy et al., 2005). Ayrıca, antioksidan etkilerinden dolayı karotenoidler, kanser, a ırı i manlık ve yüksek tansiyon gibi hastalıklarda yararlıdır (Bux, 2013). Bu nedenle, amaç insan gıdası, boyalar, veya tıbbi sömürü için en iyi kayna ı bulmak ise en dü ük klorofil/karotenoidler oranı (en keskin dengesi) oldu u için en iyi aday *C. vulgaris* C-27'dir.

4.5. TAG ve Karbonhidratlar

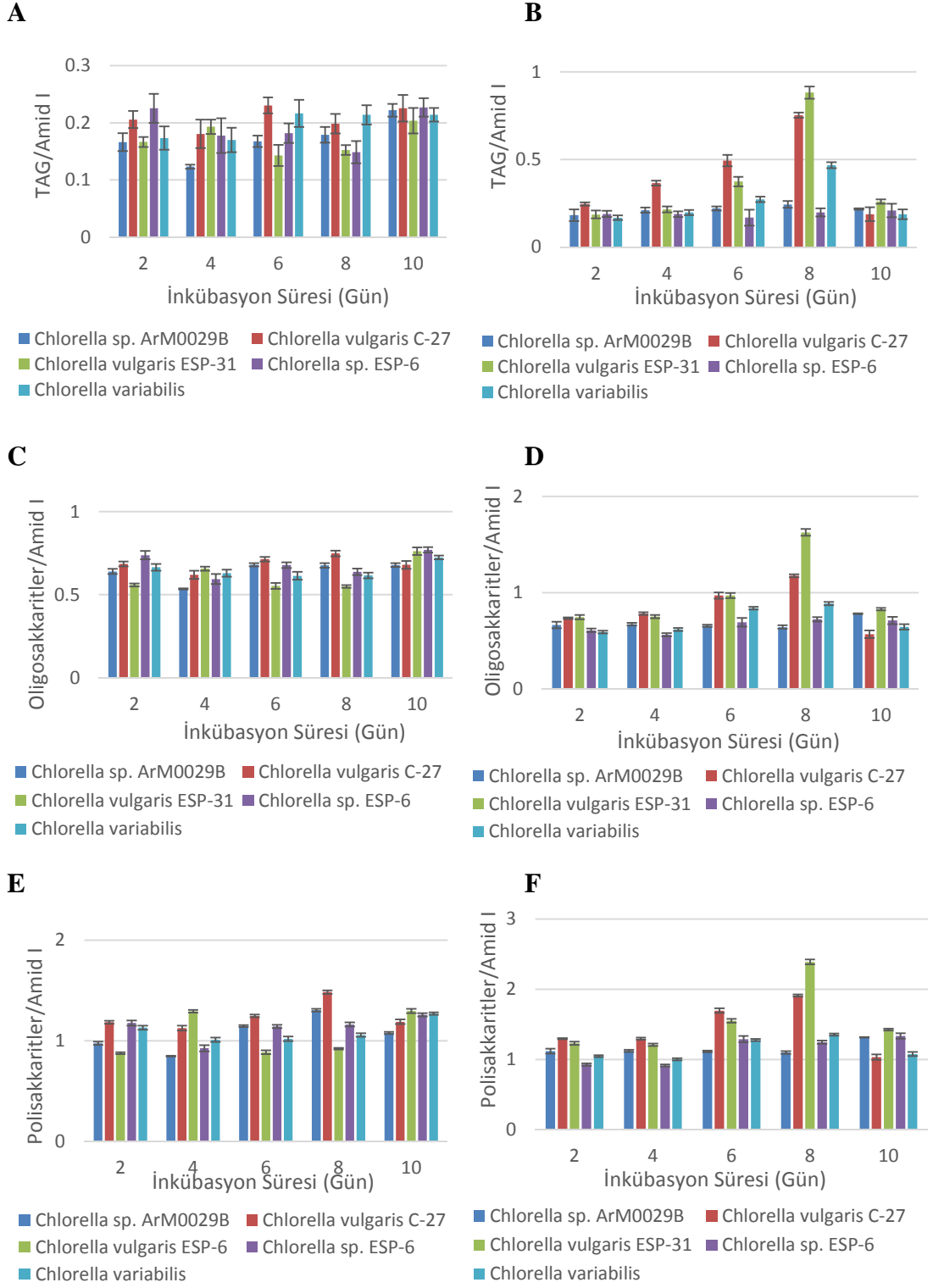
Lipit ve karbonhidrat içeri i daha fazla ölçmek (ve Nil Red yöntemi ile kar ıla tırmalar yapmak) için FTIR kullanıldı. FTIR kullanımı mikroalg biyokimyasal kompozisyonunu yerinde hızlı ölçmek için nispeten yeni bir yoldur. Farklı

makromoleküler gruplar, absorbans üzerine kendi kimlik ve miktarının belirtilmesi için bazı izin karakteristik fonksiyonel gruplar ve kimyasal bağları içermektedir (Mayers et al., 2013). FTIR spektrumu, belirli bir dalgasayısında bu i levsel grupların germe ve titre imlerini ortaya koymu tur. Çalı mamızda, dört bant ile özel bir ilgi vardı: 1,652 cm⁻¹'de amid I absorpsiyonu, 1,744 cm⁻¹'de triaçilgliseridlerin ester grubu (C=O) titre imleri, 1,145 cm⁻¹'de membran oligosakkaritinin C-OH ba ı, ve 1,045 cm⁻¹'de polisakkaritlerin C-OH gruplarının germe ve e ilme frekansları (Movasaghi et al. 2008).

Kızılötesi spektroskopisinde, kızılötesi ı ıması bir numune içinden geçirilmektedir. Kızılötesi radyasyonun bir kısmısı numune tarafından emilir ve % geçirgenlik olarak spektrometre tarafından bildirilen ba ka bir kısmısı geçmektedir (Thermo Nicolet Corporation, 2001). Hedeflenen makromolekülü (lipitler , proteinler, karbonhidratlar) ölçmek için bu de er, absorbans birimine dönü türülmelidir; A.U. = log₁₀ (100/%T) denklemiyle hesaplanmaktadır.

Be mikroalgin her birisinin tüm protein konsantrasyonunun ölçümleri, azot yoksunlu una tepki olarak asgari de i iklikleri gösterdi. Örne in, inkübasyonun süresi boyunca, bir artı ı olan *C. variabilis*'ten hariç microalglerin protein seviyesinde sadece %10-20 azalması oldu. Illham et al. (2000) de dü ük azot konsantrasyonunun *C. emersonii* ve *C. protothecoides*'in önemli ölçüde protein içeri ini azaltmadı ını ortaya çıkarmı tur. Normalde, Mayers et al. (2013), Çakmak et al. (2012), Miglio et al. (2013) ve Dean et al. (2010) tarafından gösterildi i gibi FTIR ölçümlerinde, OD birimi küçük oldu u için makromoleküllerin, ko ullar de i tirilirken (moleküllerin OD birimi/en küçük de i imini ya ayan moleküllerin) oranı üzerinde miktarı belirtilmektedir. Onların gibi, azot yoksunlu una tepki olarak protein içeri inde çok az azalmanın olması nedeniyle amid I grubunun emilimleri, FTIR spektrumunun normalle tirilmesi ve oranın belirlenmesi için dahili referans bantları olarak kullanılmı tur. ekil 4.9. be mikroalg içinde TAG'lar ve karbonhidratların bu oranını göstermektedir.

Kontrollü ko ullarda inkübasyonun 10. gününde be Chlorella türünün aynı ve en yüksek TAGler/proteinler oranı vardı. Azot yoksun ko ullarda zamana göre



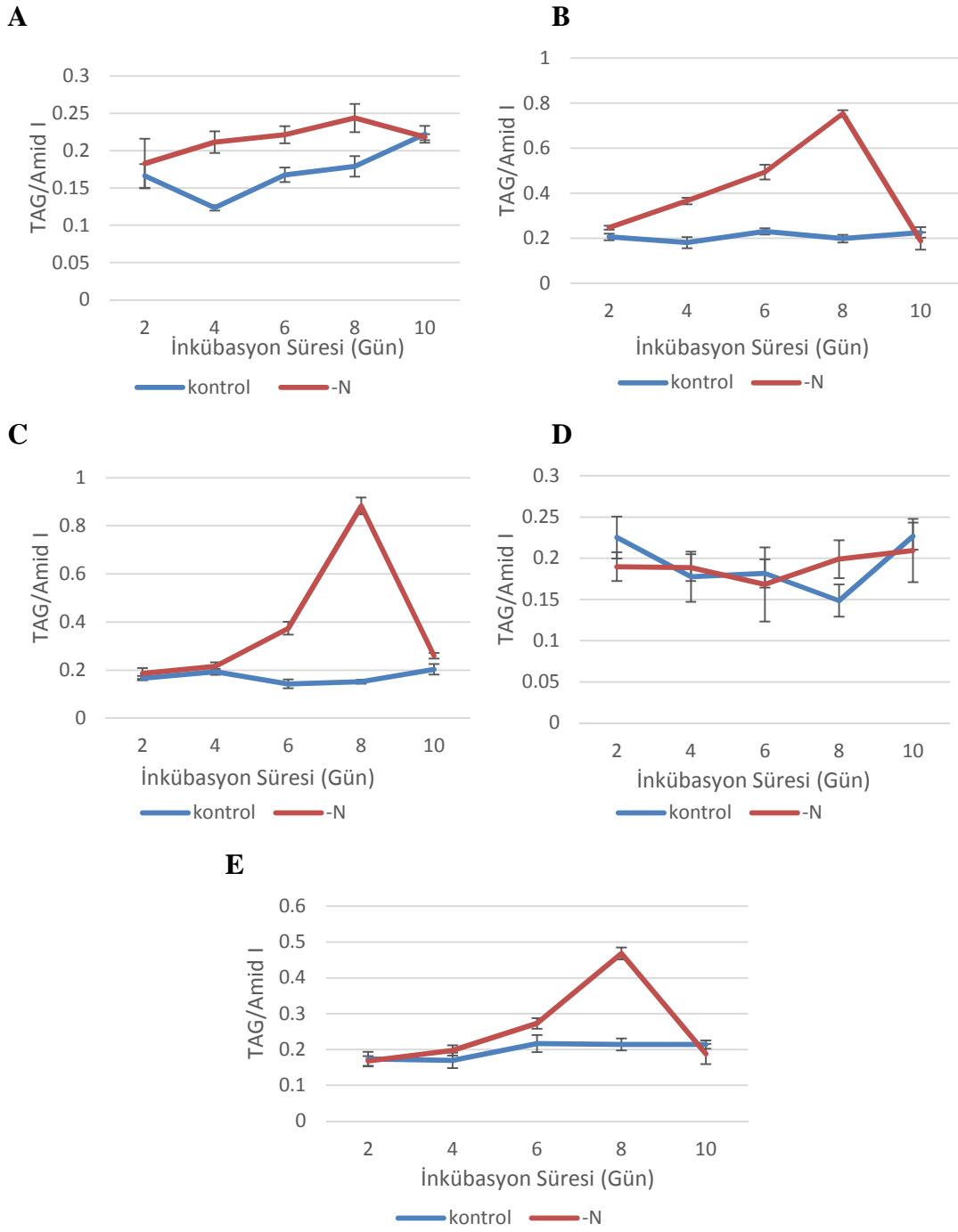
ekil 4.9. 5 *Chlorella* türünün kontrollü artlar (A, C, E) ve azot aç ortamda (B, D, F) 10 günlük inkübasyon sürecinde TAGlar (A,B), oligosakkaritler (C,D), ve polisakkaritler/proteinler (E,F) oranı.

Chlorella sp. ArM0029B ve *Chlorella sp.* ESP-6'da TAG miktarı sabit kaldı ama 2.'den 8. güne kadar *C. vulgaris* C-27'de ve 4.'den 8. güne kadar *C. vulgaris* ESP-31 ve *C. variabilis*'te kademeli bir artış oldu. Bu mikroalgden *C. vulgaris* ESP-31'in en yüksek TAGler/proteinler oranı vardı; ayrıca, zamana göre çarpıcı kademeli artış ile *C. vulgaris* C-27'te aynı durum gösterilmektedir. Aynı zamanda, Nil Red metodu bu iki mikroalgin azot yoksunluğunda en yüksek lipit içeriğini ortaya çıkarmıştır.

Kontrollü koşullarda inkübasyonun 10. gününde bu *Chlorella* türünün aynı ve en yüksek karbonhidratlar (oligo- ve polisakkaritler)/proteinler oranı vardı. Azot yoksun koşullarda bu oran *Chlorella sp.* ArM0029B ve *C. variabilis*'te zamana göre sabit kaldı ama *C. vulgaris* C-27, ESP-31 ve *Chlorella sp.* ESP-6'de zamana göre kademeli bir artış oldu. Bu *Chlorella*'dan *C. vulgaris* ESP-31'in en yüksek karbonhidratlar/proteinler oranı oldu.

ekil 4.10. azot yoksun ve kontrollü koşullarda bu *Chlorella* türünün her birisinin TAGlar/proteinler oranında değişimi göstermektedir.

Nil Red metodundan çıkarılan sonuçlar gibi, bu sonuçlar kontrollü koşullarda olanlarla karşılaştırıldığında azot yoksunluğunda yetiştirilen mikroalglerin lipit içeriğinde önemli bir artışın olduğunu bildirmektedir. Bu *Chlorella* türünün lipit içeriğinde en yüksek artış inkübasyonun 8. günündedir. Fakat, diğer dört mikroalgin lipit içeriği inkübasyonun gününden gününe kademeli olarak artarken *Chlorella sp.* ESP-6'ndeki sadece 8. günde arttı; Nil Red metodu da bu türde hiç belli bir değişimin zamana göre olmadığını göstermiştir. Ayrıca, bu sonuçlara göre, 10. günde hiç bir değişiklik yoktur ama Nil Red metodu *Chlorella sp.* ArM0029B, *C. vulgaris* C-27 ve *C. variabilis*'te önemli bir değişim olduğunu göstermiştir. ekil 4.10.'a göre inkübasyonun 8. gününde TAGlarda en yüksek artış (yaklaşık 5 kat) *C. vulgaris* ESP-31'de oldu. Ancak, zamana göre kendi kademeli artışını *C. vulgaris* ESP-31'indekinden daha yüksek olduğu için *C. vulgaris* C-27'nin lipit içeriğinde en yüksek artış oldu. Nil Red metodu da lipit içeriğinde en yüksek artışın *C. vulgaris* C-27 ve ESP-31'de yaşandığını göstermektedir.

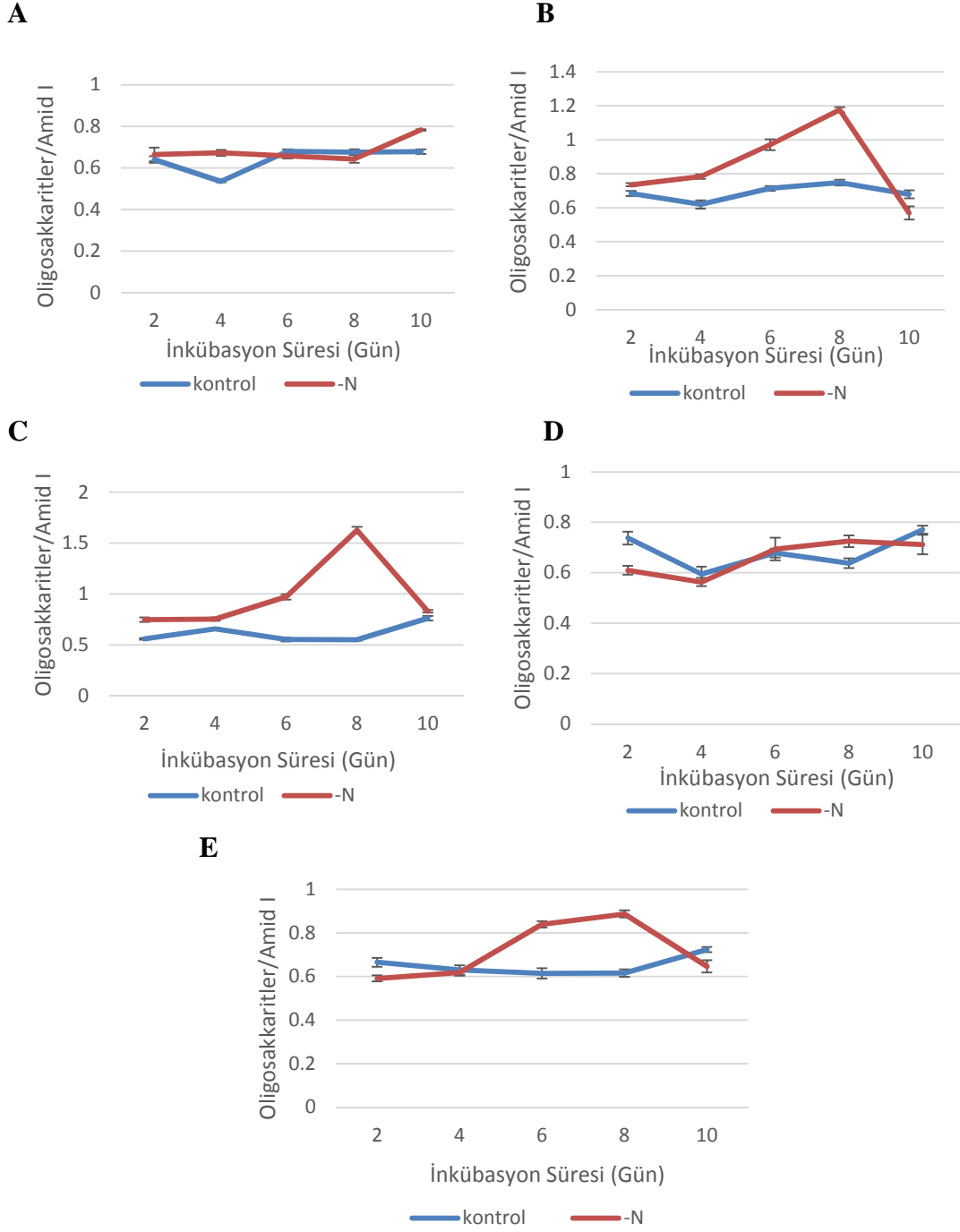


ekil. 4.10. Kontrollü ve azot yoksun ko ullaarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 *Chlorella* türünün TAG/proteinler oranı; *Chlorella sp.* ArM0029B (A) *Chlorella vulgaris* C-27 (B) *Chlorella vulgaris* ESP-31 (C) *Chlorella sp.* ESP-6 (D) ve *Chlorella variabilis* (E).

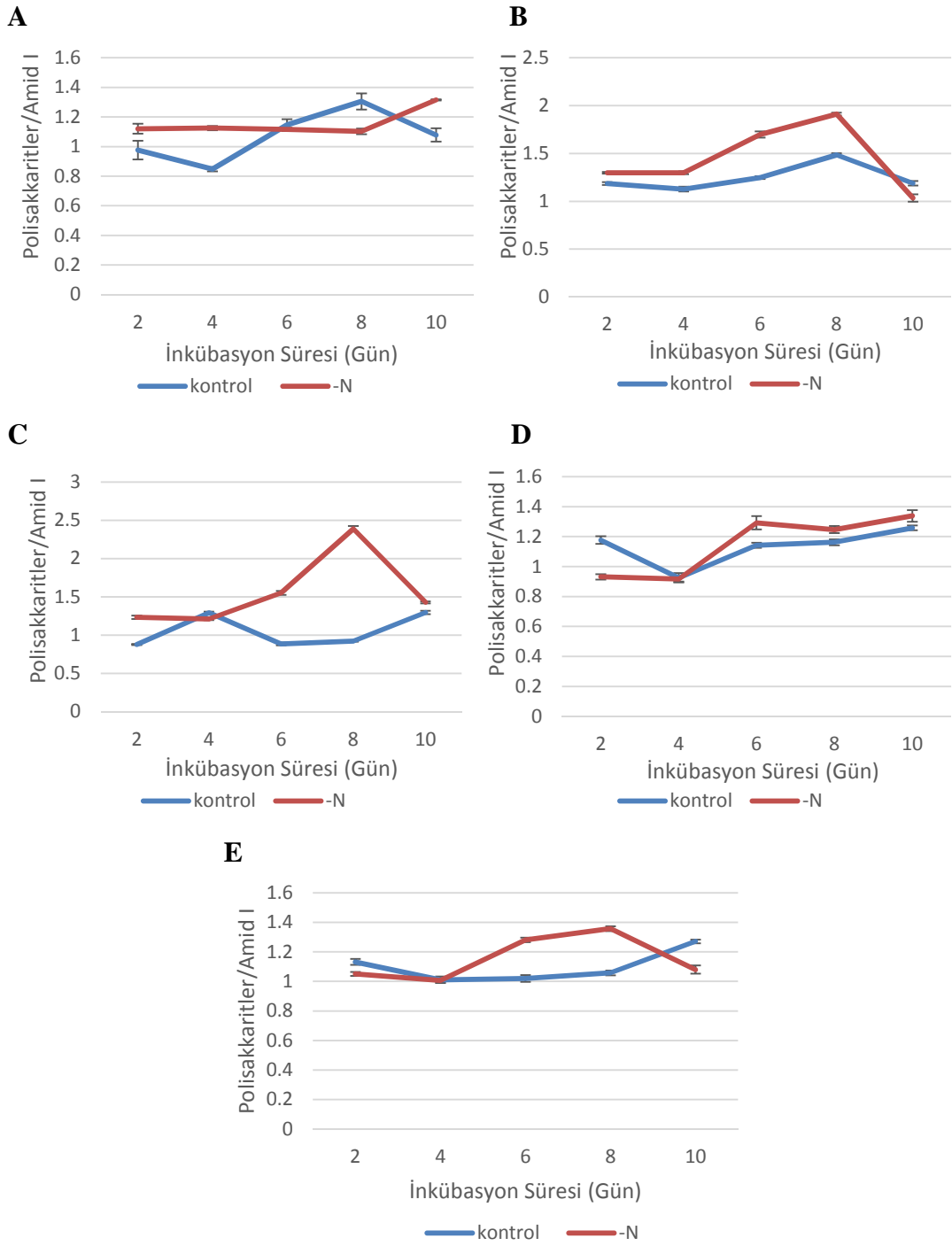
ekil. 4.11. ve 4.12. kontrollü ko ullaarda ve yoksunlu unda be *Chlorella* türünün her birisinin karbonhidratlar (oligo- ve polisakkaritler)/proteinler oranında de i ikli i göstermektedir.

Bu grafikler azot yoksun ko ullaarda oligosakkaritler ve poligosakkaritler düzeylerinin aynı eklilde de i ti ini göstermektedir; *C. vulgaris* C-27, ESP-31 ve *C. variabilis*'in oligosakkaritler ve polisakkaritler düzeylerinde zamana göre kademli bir artı ı vardı. Fakat, *Chlorella sp.* ArM0029B ve *Chlorella sp.* ESP-6'nın oligo- ve polisakkaritler düzeyleri zamana göre de i memi bir halde kalmaktadır. De i iklili in belirlendi i durumda en yüksek artı inkübasyonun 6. ve 8. günü arasında meydana çıkmaktadır; bundan sonra, 10. günde de i iklik her mikroalg türünde önemsiz oluyor. nkübasyonun 8. gününde *C. vulgaris* ESP-31'de 2.5 kat artı ı vardı; *C. vulgaris* C-27 ve *C. variabilis*'te 1.5 kat artı ı olmu tur. Dean et al. (2010) da azot yoksun ko ullaarda *Chlamydomonas reinhardtii* ve *Scenedesmus subspicatus*'un karbonhidratlarının düzeylerinde sırasıyla 2.4 ve 1.55 kat artı ının ve ardından inkübasyonun 10. gününde bir dü ü ün oldu unu bildirmi tir.

Karbonhidratlar, canlı hücreler ve organizmalara özel bir ekil veren birçok polimer yapısından sorumlu önemli moleküllerdir. Ayrıca, birbirleri ve çevre ile hücrelerin etkile iminde özel bir role sahiptir (Albersheim et al., 1992). Oligosakkaritler ve polisakkaritler kompleks karbonhidratlardır. Bunlar, monosakaritler glikoz, fruktoz ve galaktoz ile olu maktadır (Grant, 2014). Dean et al. (2010) ve Jakob et al. (2007)'a göre, azot yoksun ko ullaarda karbon/nitrojen oranı artıyor çünkü amino asitler veya proteinlerin üretilmesinin azalması karbonun daha yüksek miktarda özellikle polisakkaritler olarak karbonhidratlarda depolanmasına neden olmaktadır. Bundan ba ka, Courtois (2009), oligosakkaritlerin bitki elisitörleri oldu unu ve patojenlerin istilası, don, kurutma ve besinler sınırlanması gibi abiyotik ve biyotik stres ko ullaarında savunma tepkilerini ortaya çıkarmak için bikiler ve alglerde daha fazla miktarda biriktirildi ini bildirmektedir. Ayrıca, oligosakkaritlerin bitkiler ve algler büyümesinin düzenleme ve geli tirmesine etkileri üzerinde yo un çalı malar yapılmı tir. Bu yüzeden, sonuçlarımız ve ba ka bir çok çalı malar gösterdi i gibi, oligosakkaritler düzeylerinde artı , polisakkaritler veya lipitler olarak karbon bile iklerinin depolanmasına neden olabilmir tir.



ekil 4.11. Kontrollü ve azot yoksun ko ullaarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 *Chlorella* türünün oligosakkaritler/proteinler oranında de i iklik; *Chlorella* sp. ArM0029B (A) *Chlorella vulgaris* C-27 (B) *Chlorella vulgaris* ESP-31 (C) *Chlorella* sp. ESP-6 (D) ve *Chlorella variabilis* (E).



ekil 4.12. Kontrollü ve azot yoksun ko ullarda, 10 günlük inkübasyon süresince 5 *Chlorella* türünün polisakkaritler/proteinler oranı de i iklik; *Chlorella* sp. ArM0029B (A) *Chlorella vulgaris* C-27 (B) *Chlorella vulgaris* ESP-31 (C) *Chlorella* sp. ESP-6 (D) ve *Chlorella variabilis* (E).

Bir besin kaynağı olmasının yanı sıra, bitkiler ve mikroalglerden polisakkaritler ve oligosakkaritler, tedavi bilimi ve biyoteknoloji üzerinde yüksek potansiyel uygulamaya sahiptir. Probiyotikler olarak bilinen özel bakteri suşları ve prebiyotikler bilinen belirli sindirilemeyen oligosakkaritler, konakçı hücreler yada organizmaların refah ve sağlığı üzerine yarar vermektedir (Gibson, 2004). Bu oligosakkaritler, sindirilemediği için konakçıya probiyotiklerin büyümesini ve aktivitesini uyararak yarar veren seçici mayalanım maddelerine sahiptir; diğer bir deyişle, bağırsakta bulunan uygun bakteri beslemeye yardımcı etmektedir. (Gibson, 2004; Gibson & Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2001; Grant, 2014). Bu nedenle, amaç karbonhidratların bir kaynağı olarak en iyi mikroalg seçmek ise, en yüksek büyüme oranı ve karbonhidratlar düzeylerine sahip olmasından dolayı *C. vulgaris* ESP-31 en iyi adaydır.

5. SONUÇ

Mikroalgler gezegendeki en çe itli organizmalardır. Her tür yada soy çevresel stres faktörlerine farklı düzeylerde tepki verir. Çalı malar, yalnızca *Chlorella* türlerinin bu çevresel faktörlere di er türlerden daha etkili ve daha hızlı cevap verdi ini göstermi tir. Yaptı ımız çalı mada be farklı *Chlorella* türü/soyu olan; *Chlorella* sp. ArM0029B, *C. vulgaris* C-27, *C. vulgaris* ESP-31, *Chlorella* sp. ESP-6 ve *C. variabilis* Türkiyedeki volkanik göllerden izole edilip, azot açlı na bırakılmı tır. Bu mikroalglerin cevapları; büyüme, lipit üretimi, protein içeri i, klorofil ve karotenoid konsantrasyonu ve karbohidrat/protein oranları açısından de erlendirilmı tir ve bu sonuçlar ı ı nda biyoteknolojik yarar açısından en uygun aday belirlenebilir.

Azot açlı ı altında, kontrollü artlara göre kar ıla tırıldı nda; *Chlorella vulgaris* C-27 ve ESP-31 en yüksek büyüme oranlarına sahip olmakla birlikte, mikroalglerde büyüme genellikle azalmı tır. *Chlorella vulgaris* C-27 ve ESP-31 ayrıca en yüksek lipit içeri ini göstermi tir. Bundan dolayı biyodizel ve biyogübre üretimi için biyokütle kayn ı olarak bu iki mikroalg en iyi aday olarak dü ünülebilir. Protein açısından, daha önce herhangi bir çalı mada belirtilmemi olsada, *C. variabilis*'te göze çarpar bir artı olmasına ra men, di er dört mikroalgin protein konsantrasyonunda bir azalma meydana gelmi tir. E er insan besin kayna ı olarak en iyi adayı seçmek amaçlansaydı, bu aday kontrollü artlar altında büyüyen, protein konsantrasyonu ve büyüme oranı en yüksek olan *C. vulgaris* ESP-31 olurdu. Klorofil/karotenoid oranı, azot açlı nda klorofil miktarındaki azalmadan ve karotenoid miktarındaki artı tan dolayı bütün mikroalglerde azalmı tır. E er insan besin kayna ı, boya ve/yada tıbbi kullanımlar için en iyi türü seçmek amaçlansaydı, *C. vulgaris* C-27 azot yoksun ko ullarda yeti tirildi inde en iyi seçim olurdu. FTIR ölçümlerine göre azot açlı nda TAG/protein ve karbohidrat/protein oranlarında bir artı vardır. Nil Red yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlara benzeyen bu sonuçlar biyodizel üretimi için en iyi mikroalgin *C. vulgaris* C-27 ve ESP-31 oldu unu, ayrıca ESP-31'in en iyi karbohidrat kayna ı oldu unu göstermi tir. Genel olarak bu veriler ı ı nda, biyodizel ve hammadde üretim verimlili i ile ilgili en iyi adaylar *Chlorella vulgaris* C-27 ve *C. vulgaris* ESP-31'dir.

Gerekli kimyasalların ve ekipmanların bulunmaması nedeniyle microalglerin ya asidi metil ester bile imi analiz edilememi tir; bundan dolayı bu parametre biyodizel üretimi için izlenmeye de er önemli bir husustur. Ayrıca, mikroalglerin birbirlerine nazaran neden çok farklı cevaplar verdi ini anlamak için göl suyunun kalite ve özelli ini daha fazla analiz etmek, daha makul olacaktır. nsan hatasını azaltmayı amaçlama ve be mikroalgi daha fazla karakterize etme kapsamında, her mikroalgi tek tek incelemek ve onları sıcaklık, di er besin maddelerinin yoksunlu u ve pH gibi stress faktörlerine maruz bırakmak akıllıca olacaktır.

KAYNAKLAR

- Ahn J, Hwangbo K, Lee S, Choi H, Park Y, Liu J, Jeong W. (2012). A new Arctic *Chlorella* species for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 3: 125-340
- Albersheim P, Darvill A, Augur C, Cheong J-J, Eberhard S, Hahn M.C, Marfa V, Mohnen D, O'Neil M.A, Spiro M.D, York W.S. (Oligosaccharins: Oligosaccharides regulatory molecules. *Accounts of Chemical Research* 25: 77-83
- An J-Y, Sim S-J, Lee J.S, Kim B.W. (2003). Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology* 15: 185-191
- Alabi A.O, Tampier M, Bibeau E. (2009). *Microalgae technologies and processes for biofuels/ Bioenergy production in British Columbia*. Current technology, suitability, and barriers to implementation. Final report submitted to The British Columbia Innovation Council. Seed Science Press
- Anderson R.A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier, London
- Barsanti L, Gualtieri P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor and Francis Group, CRC Press
- Becker E.W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Benemann J, Oswald W. (1996). *Final report to the US Department of Energy*. Grant NO.DEFG22-93PC93204, Pittsburgh Energy Technology Center, USA

- Bhola V, Desikan R, Santosh S.K, Subburamu K, Sanniyasi E, Bux F. (2011). Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111: 377-382
- Borowitzka M.A. (1992). Algal biotechnology products and processes-Matching science and economics. *Journal of Applied Phycology* 4: 267-279
- Borowitzka M.A. (2005). Algal culture and biotechnology. School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University
- Boudreau D. (2008). Algae everywhere and plenty of Biofuel too. http://larb.asu.edu/files/biofuel_brochure.pdf (Eri im Tarihi: 12.02.2015)
- Bux F. (2013). *Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products*. CRC Press Taylor & Francis Group, Florida, USA
- Cadoret J, Garnier M, Saint-Jean B. (2012). Microalgae, Functional Genomics, and Biotechnology. *Advances in Botanical Research* 64: 285-341
- Chaumont D. (1993). Biotechnology of algal biomass production: A review of systems for outdoor mass cultures. *Journal of Applied Phycology* 5: 593-604.
- Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306
- Christi Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology* 25: 126-131
- Chisti Y. (2013). Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology* 167: 201-214
- Converti A, Casazza A, Ortiz E.Y, Perego P, Del Borghi M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of

Nannochloropsis oculata and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48: 1146-1151

Cooksey K.E, Guckert J.B, Williams S.A, Callis P.R. (1987). Fluorometric determination of the lipid content of microalgal cells using Nile Red. *Journal of Microbiological Methods* 6: 333-345

Cooper M.S, Hardin W.R, Petersen T.W, Cattolico R.A. (2010). Visualizing “green oil” in live algal cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109: 198-201

Courtois J. (2009). Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology* 12: 261-273

Crofcheck C, Shea A, Monstross M, Crocker M, Andrews R. (2013). Influence of media composition on growth rate of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* utilized for CO₂ mitigation. *Journal of Biochemical Technology* 4: 589-594

Cuello J, Ono E. (2005). Selection of optimal microalgae species for CO₂ sequestration. Department of Agricultural and Biosystems Engineering, University of Arizona

Çakmak T, Angun P, Demiray Y.E, Ozkan A.D, Elibol Z, Tekinay T. (2012). Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering* 109: 1947-1957

Darzins A, Hu Q, Sommerfield M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biodiesel production: perspectives and advances. *Plant Journal* 54: 621-639

- Day J. (2010). Algal biotechnology: Facts, Fiction and Future Prospects. Biomara.
<http://www.biomara.org/presentation-the-potential-of-marine-algae/pres%20john%20day.pdf/view> (Eri im Tarihi: 12.02.2015)
- Dean A.P, Sigeo D.C, Estrada B, Pittman J.K. (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology* 101: 4499-4507
- De La Pena M. (2007). Cell growth and nutritive value of the tropical benthic diatom, *Amorpha sp.*, at varying levels of nutrients and light intensity, and different culture locations. *Journal of Applied Phycology* 19: 647-655
- Dennis D.T, Turpin D.H, Lefebvre D.D, Layzell D.B. (1998). *Plant Metabolism*. Longman, Singapore
- Dragone G, Fernandes B, Vicente A, Teixeira J. (2010). Third generation biofuels from microalgae. Current Research, *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. Mendez-Vilaz (Ed.)
- Dufosse L, Galaup P, Yaron A, Arad S.M, Blanc P, Murthy K.N.C, Ravishankar G.A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in Food Science and Technology* 16: 389-406
- Fogg G.E, and Thake B. (1987). *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology* 3rd edition. University of Wisconsin Press, London, England
- Fuentes-Grunewald C, Garces E, Rossi S, Camp J. (2009). Use of the dinoflagellate *Karlodinium veneficum* as a sustainable source of biodiesel production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 1215-1224

- Garofalo R. (2011). Algae and aquatic biomass for a sustainable production of 2nd generation biofuels. Aquafuels. <http://www.aquafuels.eu/final-report.html> (Eri im Tarihi: 16.03.2015)
- Gibson G.R. (2004). Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements* 1: 25-31
- Gibson G.R, and Roberfroid M.R. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125: 1401-1412
- Gouveia L, and Oliveira A.C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 269-274
- Görs M, Schumann R, Hepperle D. (2009). Quality analysis of commercial *Chlorella* products used as dietary supplement in human nutrition. *Journal of Applied Phycology* 22: 265-276
- Grant J. (2014). The difference between oligosaccharides and polysaccharides. Livestrong.com. <http://www.livestrong.com/article/545158-the-difference-between-oligosaccharides-polysaccharides/> (Eri im Tarihi: 03.04. 2015)
- Greenspan P, Mayer E.P, Fowler S.D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cellular Biology* 100: 965-973
- Griffiths M.J, Dicks R.G, Richardson C, Harrison S.T.L. (2011). Advantages and challenges of microalgae as a source of oil for biodiesel. *Biodiesel- Feedstocks and Processing Technologies* chapter 9: 177-200
- Grima E, Belarbi E, Fernandez FG, Medina A, Chisti Y. (2002). Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnology Advances* 20: 491-515

- Grobbelaar J.U. (2000). Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology* 6: 331-335
- Guedes A.C, Amaro H.M, Malcata F.X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs* 9: 625-644
- Harris E.H. (1989). A *Chlamydomonas* sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, San Diego, 780pp.
- Hodaifa G, Martinez M, Sanchez S. (2008). Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 99: 1111-1117
- Hossain S, and Salleh A. (2008). Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4: 250-254
- Hu Q, Sommerfield M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A, (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54: 621-639
- Huang G, Chen F, Wei D, Zhang X, Chen G. (2009). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Journal of Applied Energy* 87: 38-46
- Illman A.M, Scragg A.H, Shales S.W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 631-635
- Jakob T, Wagner H, Stehfest K, Wilhelm C. (2007). A complete energy balance from photons to new biomass reveals a light- and nutrient-dependent variability in the metabolic costs of carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 58: 2101-2112

- Jalal K.C.A, Shamsuddin A.A, Rahman M.F, Nurzatul N.Z, Rozihan M. (2013). Growth and total carotenoid, chlorophyll a and chlorophyll b of tropical microalgae (*Isochrysis sp.*) in laboratory cultured conditions. *Journal of Biological Sciences* 13: 10-17
- Jeffrey S.W, and Humphrey G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1, and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Biochemical Physiology Pflanz* 167: 191-194
- Jeong H, Lim J, Park J, Sim Y, Choi H, Lee J. (2014). Plastid and mitochondrion genomic sequences from Arctic *Chlorella sp.* ArM0029B. *BMC Genomics* 15: 286
- Jones D.B. (1931). Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. Circular No. 183, United States Department of Agriculture, Washington DC
- Lam M.K, Lee K.T. (2012). Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems, and the way forward. *Biotechnology Advances* 30: 673-690
- Lardon L, Hei lias A, Sialve B, Steyer J.P, Bernard O. (2009). Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science and Technology* 43: 6475-6481
- Lee R.E. (1989). *Phycology 2nd Edition*. Cambridge University Press
- Lewis A, Nichols P.D, McMeekin T.A. (2000). Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *Journal of Microbiological Methods* 43: 107-116

- Li Y, Horsman M, Wang B, Wu N, Lan C.Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 629-636
- Lichtenthaler H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology* 148: 350-382
- Long S.P, Humphries S, Falkowski P.G. (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 633-662
- Mata M, Martins A, Caetano N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217-232
- Mayers J.J, Flynn K.J, Shields R.J. (2013). Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Bioresourcetechnology* 148: 215-220
- Miao X, and Wu Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresourcetechnology* 97: 841-846
- Miglio R, Palmery S, Salvalaggio M, Carnelli L, Capuano F, Borrelli R. (2013). Microalgae triacylglycerol contents by FT-IR spectroscopy. *Journal of Applied Phycology* 25: 1621-1631
- Mittelbach M, and Remschmidt C. (2004). *Biodiesel: The Comprehensive Handbook*. Martin Mittelbach
- Moazami N, Ashori A, Ranjbar R, Tangestani M, Eghtesadi R, Nejad A.S. (2012). Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nanochloropsis*. *Biomass and Bioenergy* 39: 449-453

- Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Revisions* 43: 134-179
- Murthy K.N.C, Swamy R.M.M, Ravishankar G.A. (2005). Comparative evaluation of hepatoprotective activity of carotenoids of microalgae. *Journal of Medicinal Food* 8: 523-528
- Mutanda T, Ramesh D, Karthikeyan S, Kumari S, Anandraj A, Bux F. (2011). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology* 102: 57-70
- Nigam S, Rai M.P, Sharma R. (2011). Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 7: 124-129
- Oswald W.J, and Golueke C. (1960). Biological transformation of solar energy. *Advanced Applied Microbiology* 2: 223-262
- Pai T, Lai W. (2011). Analyzing algae growth and oil production in a batch reactor under high nitrogen and phosphorous conditions. *International Journal of Applied Science and Engineering* 3: 161-168
- Piorreck M, Baasch K, Pohl P. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23: 207-216
- Pisal D.S, Lele S.S. (2004). Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology* 4: 476-483
- Praveenkumar R, Shameera K, Mahalakshmi G, Akbarsha M.A, Thajuddin N. (2009). Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant

- indigineous microlaga *Chlorella sp.*, BUM11008: evaluation for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy* 37: 60-66
- Priyadarsghani I, and Rath B. (2012). Commercial and industrial applications of microalgae. *Journal of Algal Biomass* 4: 89-100.
- Pulz O, Gross W. (2004). Valuable Products from Biotechnology of Microalgae. *Applied Microbial Biotechnology*, 65(6): 635-48
- Ramos M.J, Fernandez C.M, Casas A, Rodriguez L, Perez A. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 100: 261-268
- Ratha S.K, Babu S, Renuka N, Prasanna R, Prasad R.B.N, Saxena A.K. (2013). Exploring nutritional modes of cultivation for enhancing lipit accumulation in microalgae. *Journal of Basic Microbiology* 53: 440-450
- Regan D.L, and Gartside G. (1983). *Liquid Fuels from Microalgae in Australia*. CSIRO, Melbourne
- Richmond A, Hu Q. (2013). *Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology 2nd Edition*. Wiley-Blackwell
- Richmond A. (2008). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Wiley-Blackwell
- Roberfroid M.B. (2001). Prebiotics: preferential substrates for specific germs. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73: 406-409
- Rodolfi L, Chini Zittelli G, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici M.R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipit synthesis, and

outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102: 100-112

Roessler P. (1990). Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *Journal of Phycology* 26: 393-39

Rosenberg J.N, Mathias A, Korth K, Betenbaugh M.J, Oyler G.A. (2011). Microalgal biomass production and carbon dioxide sequestration from an integrated ethanol biorefinery in Iowa: A technical appraisal and economic feasibility evaluation. *Biomass and Bioenergy* 35: 3865-3876

Rowe J.M, Dunigan D.D, Blanc G, Gurnon J.R, Xia Y, Van Etten J.L. (2013). Evaluation of higher plant virus resistance genes in the green alga, *Chlorella variabilis* NC64A, during the early stage of infection with *Paramecium bursaria* chlorella virus-1. *Virology* 442: 101-113

Safi C, Charton M, Pignolet O, Silvestre F, Vaca-Garcia C, Pontalier P. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology* 25: 523-529

Sazdanoff N. (2006). *Modeling and simulation of the algae to biodiesel fuel cycle*. Honors Thesis, Ohio State University

Scheer H. (2008). Chemistry of chlorophylls and carotenoids. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* DOI 10.1002/9780470048672

Scheffler and John. (2007). Underwater habitats. *Illumin* 9:4

Schlarb-Ridley B. (2011). Algal Research in the UK. Bioscience for the Future. ncrops Project. <http://www.bbsrc.com/organisation/policies/reviews/scientific-areas/1107-algal-research.aspx> (Eri im Tarihi: 25.01.2015)

- Schlarb-Ridley B, Parker B. (2013). A UK Roadmap for Algal Technologies. https://connect.innovateuk.org/documents/3312976/3726818/AB_SIG+Roadmap.pdf (Eri im Tarihi: 18.12.2014)
- Scott S, Davey M, Dennis J, Horst , Howe C, Lea-Smith D, Smith A. (2010). Biodiesel from algae: Challenges and Prospects. *Current Opinions in Biotechnology* 21: 277-286
- Sharma K.K, Schuhmann H, Schenk P.M. (2012). High lipit induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5: 1532-1553
- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. (1998). *A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae*. Close-Out Report. National Renewable Energy Lab, Department of Energy, Golden, Colorado, USA, Report NO. NREL/ TP-580-24190
- Solovchenko A.E, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Cohen Z, Merzlyak M.N. (2008). Effects of light and nitrogen starvation on the content and composition of carotenoids of the green microalga *Parietochloris incisa*. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 455-462
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96
- Stanier R.Y, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazir G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriology Revisions* 35: 171-205
- Stuart B. (2004). *Infrared Sceptroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley
- Therien J. B, Zadvornyy O. A, Posewitz M. C, Bryant D. A, Peters J. W. (2014). Growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in acetate-free medium when co-cultured

with alginate-encapsulated, acetate-producing strains of *Synechoccus* sp. *Biotechnology for Biofuels* 7: 154

ThermoNicolet Corporation. (2001). Introduction to Fourier Transform Infrared Spectroscopy. <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf> (Eri im Tarihi: 25.03.2015)

Thompson Jr. G.A. (1996). Lipids and membrane functions in green algae. *Biochemistry and Biophysics-Lipids and Lipid Metabolism* 1302: 17-45

Tran D, Yeh K, Chen C, Chang J. (2012). Enzymatic Transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized Burkholderia lipase. *Bioresource Technology* 108: 119-127

Tsukahara K, and Sawayama S. (2005). Liquid fuel production using microalgae. *Journal of the Japan Petroleum Institute* 48: 251-259

Van Gerpen J. (2005). Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology* 86: 1097-1107

Weis V.M, Verde E.A, Reynolds W.S. (2002). Characterization of a short form perdinin-chlorophyll-protein (PCP), cDNA, and protein from the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium muscatinei* (Dinophyceae) from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Journal of Phycology* 38: 157-163

Widjaja A, Chien C-C, Ju Y-H. (2009). Study of increasing lipid production from freshwater microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40: 13-20

Willard Y. (2013). *Chlorella* (*Chlorella vulgaris*). *Harmonic Arts Botanical Dispensary*. <https://harmonicarts.ca/2013/04/chlorella-chlorella-vulgaris/> (Eri im Tarihi: 03.03.2015)

- Wolkers H, Barbosa M, Kleinegris D.M.M, Bosma R, Wijffels R.H. (2011). *Microalgae: The green gold of the future? Large-scale sustainable cultivation of microalgae for the production of bulk commodities*. Propress, Wageningen UR
- Ye C.P, Zhang M.C, Yang Y.F, Thirumaran G. (2012). Photosynthetic performance in aquatic and terrestrial colonies of *Nostoc flagelliforme* (Cyanophaceae) under aquatic and aerial conditions. *Journal of Arid Environments* 85: 56-61
- Yeh K-L, and Chang J-S. (2011). Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: implications for biofuels. *Biotechnology Journal* doi: 10.1002/biot201000433
- Yilancioglu K, Cokol M, Patirmaci I, Erman B, Cetiner S. (2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *Plos One* 9: e91957
- Zeng X, Danquah M.K, Chen X.D, Lu Y. (2011). Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15: 3252-3260

EKLER

BG-11 and TAP kültür ortamının protokolleri

BG11-Medium (modified)

Literature:

Kuhl, A. & Lorenzen, H. (1964): Handling and culturing of Chlorella. - In: Preston, D.M. (ed.): *Methods of cell physiology*, Vol. 1: p. 159-187, Academic Press, London.

Rippka, R. & Herdman, H. (1992): *Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria Catalogue & Taxonomic Handbook*. 1. Catalogue of Strains. Institut Pasteur, Paris

Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. (1974): Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). - *Bacteriological Reviews* 35(2): 171-205.

For 1000 mL final culture medium add the following quantities (Volume) of stock solutions (SL) prepared at the given concentrations to 850 mL dd-H₂O. Add **one component after the other until each one has completely mixed** and finally fill up to 1000 mL.

All stock solutions should be stored unsterilised at 4 °C. Store sterile-filtered vitamin mix (SL 11) at -20 °C.

Stock Solution (SL)	Volume	Component	Concentration in SL	Conc. in final Medium
SL 1	60 mL	NaNO ₃	2.50 g · 100 mL ⁻¹	1.76 · 10 ⁻² M
SL 2	10 mL	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.75 g · 100 mL ⁻¹	3.04 · 10 ⁻⁴ M
SL 3	20 mL	Na ₂ CO ₃	0.10 g · 100 mL ⁻¹	1.89 · 10 ⁻⁴ M
SL 4	5.3 mL	K ₂ HPO ₄	0.75 g · 100 mL ⁻¹	2,28 · 10 ⁻⁴ M
SL 5	14 mL	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.25 g · 100 mL ⁻¹	2.38 · 10 ⁻⁴ M

SL 6	6 mL	citrit acid	$0.10 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$3.12 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
SL 7	10 mL	ferric ammonium citrate	$0.06 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$2,26 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
SL 8	10 mL	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0.01 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$2.69 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
micronutrient solution (from Kuhl and Lorenzen 1964)	1 mL	H_3BO_3 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$61.0 \text{ mg} \cdot 1 \text{ L}^{-1}$ $169.0 \text{ mg} \cdot 1 \text{ L}^{-1}$ $287.0 \text{ mg} \cdot 1 \text{ L}^{-1}$ $2.5 \text{ mg} \cdot 1 \text{ L}^{-1}$ $12.5 \text{ mg} \cdot 1 \text{ L}^{-1}$	$9.87 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ $1.00 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ $9.98 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ $1.00 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ $1.01 \cdot 10^{-8} \text{ M}$

Adjust to final pH of 8.4 and autoclave (15 min at 121 °C).

The addition a vitamin mix is advised as some algal species need one or two of the vitamins contained in the mix.

SL 11	1 mL	Vit. B ₁ (Thiamine HCl)	$0.1 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$2.96 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
Vitamin mix		Vit. H (Biotin)	$0.025 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.02 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
		Vit. B ₁₂ (Cyanocobalamin)	$0.015 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.11 \cdot 10^{-10} \text{ M}$

For storage of this vitamin stock solution, acidify to a pH of 4.5-5.0 and autoclave, then dispense aseptically in plastic containers, or sterile-filter directly through 0.2 µm sterile filters into plastic containers (reaction vials, cryovials, polycarbonate tubes) in 1 mL aliquots and **add aseptically to prepared medium after autoclaving and cooling**. Store at -20 °C.

For stock cultures on agar slants add 1.0-1.3 % Agar (e.g. purified high strength, 1000 g · cm⁻²) to prepared medium before autoclaving.

TAP-Medium (Tris-Acetate-Phosphate)

Lit.: Andersen, R.A. (ed.) (2005): Algal culturing techniques, 578pp, Elsevier Academic Press, London. Gorman, D.S. & Levine, R.P. (1965): Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic

electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54: 1665-1669. Harris, E.H. (1989): The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use.

Academic Press, San Diego, 780pp.

Sueoka, N. (1960): Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 46(1): 83-91.

TAP-Medium can be used for those algae which use NH_4^+ instead of NO_3^- as a nitrogen source. Such algae lack the nitrate reductase which would enable them to reduce nitrate via nitrite to ammonium.

For 1000 mL final culture medium add the following quantities (Volume) of stock solutions (SL) prepared at the given concentrations to 850 mL dd-H₂O. Add **one component after the other until each one has completely mixed** and finally fill up to 1000 mL.

All stock solutions can be stored unsterilised at 4 °C.

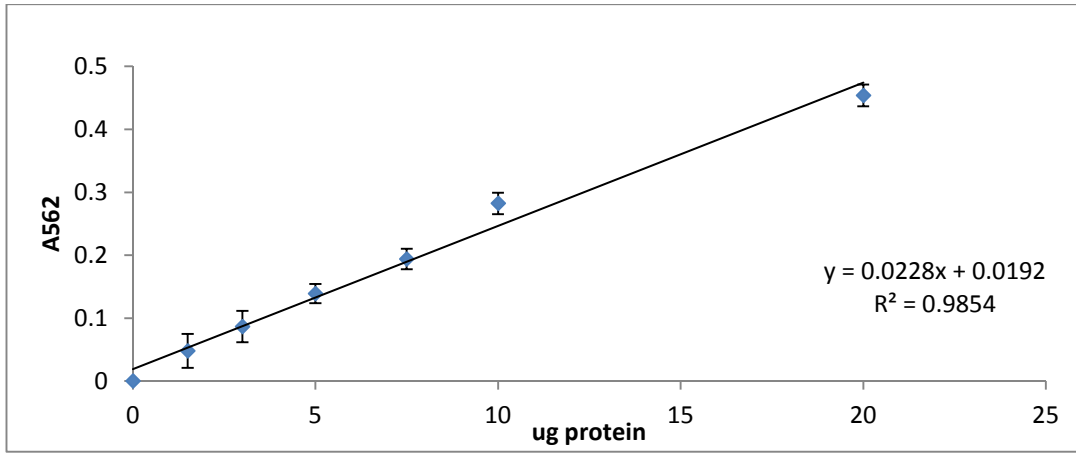
Stock Solution (SL)	Volume	Component	Concentration in SL	Conc. in final Medium
Tris base	2.42 g	H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃ Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		$2.00 \cdot 10^{-2}$ M
TAP-salts (Beijerinck salts)	25 mL	NH ₄ Cl	$15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$7.00 \cdot 10^{-3}$ M
		MgSO ₄ · 7H ₂ O	$4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$8.30 \cdot 10^{-4}$ M
		CaCl ₂ · 2H ₂ O	$2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$4.50 \cdot 10^{-4}$ M
Phosphate solution	1 mL	K ₂ HPO ₄	$28.8 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$	$1.65 \cdot 10^{-3}$ M

		KH ₂ PO ₄	14.4 g · 100 mL ⁻¹	1.05 · 10 ⁻³ M
Trace elements solution (Hutner trace elements)	1 mL	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	5.00 g · 100 mL ⁻¹	1.34 · 10 ⁻⁴ M
		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.20 g · 100 mL ⁻¹	1.36 · 10 ⁻⁴ M
		H ₃ BO ₃	1.14 g · 100 mL ⁻¹	1.84 · 10 ⁻⁴ M
		MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.50 g · 100 mL ⁻¹	4.00 · 10 ⁻⁵ M
		FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.50 g · 100 mL ⁻¹	3.29 · 10 ⁻⁵ M
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.16 g · 100 mL ⁻¹	1.23 · 10 ⁻⁵ M
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.16 g · 100 mL ⁻¹	1.00 · 10 ⁻⁵ M
		(NH ₄) ₆ MoO ₃	0.11 g · 100 mL ⁻¹	4.44 · 10 ⁻⁶ M
Acetic acid, conc.	1 mL	CH ₃ COOH		

First dissolve Na₂EDTA · 2H₂O in 100 mL dd-H₂O by heating to 60-80 °C, then adjust pH with KOH to 5.0. Add all trace elements separately and check the pH value constantly. The pH value should not increase above 6.8, otherwise MnSO₄ may precipitate. Let the solution stand at 4 °C; when the colour changes from orange to red after approx. 2 weeks, filter it, split it and store at -20 °C teflon or polycarbonate containers (do not use glass containers for trace elements as these tend to adsorb to the glass surface). After addition of acetic acid the pH should range at about 7.0.

Adjust medium to final pH of 6.0 or as desired with acetic acid and autoclave at 121 °C for 20 min.

For stock cultures on agar slants add 1.0-1.3 % Agar (e.g. purified high strength, 1000 g · cm⁻²) to prepared medium before autoclaving.



Ekler ekili 1. Standart protein e risi