

Zeynep ELİBOL ÇAKMAK

Doktora Tezi

KÜ 2013

T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

MİKROALGLERDE NÖTRAL LİPİD İÇERİĞİNİN ARTIRILMASI  
ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Zeynep ELİBOL ÇAKMAK

EKİM 2013

T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

MİKROALGLERDE NÖTRAL LİPİD İÇERİĞİNİN ARTIRILMASI ÜZERİNE  
BİR ARAŞTIRMA

Zeynep ELİBOL ÇAKMAK

EKİM 2013

**Biyoloji Anabilim Dalında** Zeynep ELİBOL ÇAKMAK tarafından hazırlanan MİKROALGLERDE NÖTRAL LİPİD İÇERİĞİNİN ARTIRILMASI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

(Unvanı, Adı ve Soyadı, İmzası)

Anabilim Dalı Başkanı

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

(Unvanı, Adı ve Soyadı, İmzası)

Ortak Danışman (Varsa)

(Unvanı, Adı ve Soyadı, İmzası)

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : (Unvanı, Adı ve Soyadı, İmzası) \_\_\_\_\_

Üye (Danışman) : (Unvanı, Adı ve Soyadı, İmzası) \_\_\_\_\_

Üye : (Unvanı, Adı ve Soyadı, İmzası) \_\_\_\_\_

Üye : (Unvanı, Adı ve Soyadı, İmzası) \_\_\_\_\_

Üye : (Unvanı, Adı ve Soyadı, İmzası) \_\_\_\_\_

...../...../.....

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

(Unvanı, Adı ve Soyadı, İmzası)

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### MİKROALGLERDE NÖTRAL LİPİD İÇERİĞİNİN ARTIRILMASI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

ELİBOL ÇAKMAK, Zeynep

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi

Danışman: Prof. Dr. Yusuf MENEMEN

Ortak Danışman: Doç. Dr. Turgay TEKİNAY

Ekim 2013, 171 sayfa

Bu doktora tezinde mikroalg çalışmalarında model organizma olarak kullanılan *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard türünün CC-124 soyu ve bu mikroalgin büyüme ortamı olarak Tris-Asetat-Fosfat besiyeri kullanılmış, büyüme ortamlarında çok sayıda makro ve mikroelementin hiç bulunmadığı veya 5x konsantrasyonda buldukları ortamlarda 10 gün boyunca inkübasyona bırakılan mikroalgler büyümenin farklı evrelerinde örneklenmiş, nötral lipid üretimi ve büyüme ile ilgili parametreler irdelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda mikroalglerin büyüme ortamında N, S, P ve Mg elementlerinin hiç bulunmadığı veya N ve Zn elementlerinin 5x konsantrasyonda buldukları ortamların lipid üretimini teşvik edici ortamlar oldukları sonucuna varılmıştır. Böylece bundan sonraki ölçümler ile sıcaklık ve ışık uygulamaları kontrol ile birlikte 7 grup kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Takip eden çalışmalarda ise *C. reinhardtii* üzerinde yapılan uygulamaların fizyolojik etkilerini belirlemek amacı ile, belirlenen zamanlarda örneklenen mikroalglerin yağ asidi profillerinde, element içeriklerinde, protein, klorofil, karotenoid içeriklerinde meydana gelen değişimler belirlenmiş, mikroalglere uygulanan stresin düzeyini yansıtan parametreler olan reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve antioksidan cevap irdelenmiştir. Son olarak element manipülasyonuna

cevapta mikroalglerde meydana gelen anatomik değişimler ışık mikroskobu, konfokal ve TEM görüntüleri ile birlikte değerlendirilmiştir.

*C.reinhardtii*'de makro- ve mikroelement kompozisyonu, farklı element rejimlerine tepki olarak oldukça değişik cevaplar sergilemiştir. *C. reinhardtii*'ye uygulanan element rejimleri (N, S, P ve Mg açlığı ile N ve Zn fazlalığı) nedeniyle hücre sayısında ki artışın baskılanması sonucunda, hücre hacminde, karbonhidrat, nötral lipid ve TAG içeriğinde artış gibi ortak cevapların ortaya çıktığı belirlenmiştir. Ayrıca konfokal ve TEM görüntüleri ile element açıklıklarına tepki olarak hücre içinde bol miktarda lipid cisimlerinin depolandığı gözlenmiştir. Diğer taraftan element manipülasyonu yapılarak mikroalglerde oluşturulan stresin düzeyinin, lipid içeriğindeki artış ile doğru orantılı olduğu ve oksidatif stresten kaynaklanan membran lipidleri oksidasyonunun mikroalglerden biyodizel eldesi için uygun olan doymuş yağ asidi oluşumunu olumsuz etkilemediği anlaşılmıştır. Büyüme ile ilgili parametreler ile TAG ve nötral lipid üretimindeki artışlar dikkate alındığında, mikroalglerde lipid üretimini artırmak için S, P ve Mg açlığı uygulamalarının, N açlığına kıyasla daha etkili yollar olduğu, diğer taraftan mikroalglerin içerdikleri FAME profilleri değerlendirildiğinde N, S ve P açlığının biyodizel eldesi için uluslararası standartları karşılayacak nitelikte yağ asidi üretimini teşvik ettikleri belirlenmiştir. Bununla birlikte, *C.reinhardtii* mikroalginin su ortamlarından çinko gideriminde etkili bir biyolojik araç olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Chlamydomonas reinhardtii*, iyonom, besin rejimi, nötral lipid, triaçilgliserol, oksidatif stress, algal fizyoloji

## ABSTRACT

### A RESEARCH ON INCREASING NEUTRAL LIPID CONTENT IN MICROALGAE

ELİBOL ÇAKMAK, Zeynep

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph.D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf MENEMEN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr.Turgay TEKİNAY

October 2013, 171 Pages

In this doctorate thesis, *C.reinhardtii* P.A.Dangeard CC-124 strain was incubated under several element deprivation and overabundance (5x), neutral lipid production and growth-related parameters were analysed during 10 days of incubation period. Tris-Acetate-Phosphate growth solution was utilized as growth medium. In view of the data obtained from neutral lipid production and growth parameters; N, S, P, Mg deprivations, and N and Zn supplementations were found to induce lipid production of microalgae effectively. Thus, temperature and light applications as second stress factors and following measurements were achieved on these groups of microalgae. Following measurements included analysis of fatty acid profiles, element concentration, protein, chlorophyll, carotenoid contents of microalgae in order to detect physiological effects of induction of lipid content, and ROS production and antioxidant response were dissected for detecting the oxidative stress level caused by element stress. Lastly, anatomical changes of microalgae under element stress were detected by using light microscope, confocal and TEM analysis.

Somewhat radical changes were detected on macro- and microelement composition of microalgae under different element regimes. Suppression of growth, increase of cellular biovolume, carbohydrate, neutral lipid and TAG content were defined as common response of microalgae under different element regimes studied. Most of the intracellular space was occupied by lipid bodies under all nutrient starvations, as observed by confocal microscopy and supported by transmission electron micrographs. On the other hand, the level of the oxidative stress was found to show positive correlation with lipid production while saturated fatty acid formation was not affected by oxidation of membrane lipids stemming from the oxidative stress. When increase in neutral lipid and TAG content of microalgae was evaluated together with growth parameters; S, P and Mg deprivations were found to superior to N deprivation for induction of total lipid acquisition. On the other hand, FAME profiles of the nitrogen, sulfur and phosphorus deprived cells were found to meet the requirements of international standards for biodiesel. In addition, we infer that *C. reinhardtii* can be used for zinc remediation from aquatic environments.

**Key Words:** *Chlamydomonas reinhardtii*, ionome, nutrient regime, neutral lipid, triacylglycerol, oxidative stress, algal physiology

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alıŐma Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi Sürdürülebilir Teknolojiler Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiŐtir.

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımı esirgemeyen ve biz genç araŐtırmacılara büyük destek olan, bilimsel deney imkânlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine veren, tez yöneticisi hocam, Sayın Prof. Dr. Yusuf Menemen'e, ortak yönetici hocam Sayın Doç. Dr. Turgay Tekinay'a, tez çalıŐmalarım esnasında bilimsel konularda yardımını gördüğüm hocam Sayın Prof. Dr. İlhami Tüzün'e ve Sayın Prof. Dr. Ali Dönmez'e, büyük fedakârlıklarla bana destek olan arkadaşım Tolga Tarkan Ölmez'e, tezimin birçok aşamasında yardım gördüğüm Zeynep Ülger'e ve son olarak bana birçok konuda olduğu gibi, tezimi hazırlamam esnasında da yardımlarını esirgemeyen eŐime ve aileme teşekkür ederim.



# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	x
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	7
1.1.1. Habitat, morfoloji ve yaşam döngüsü .....	9
1.2. Mikroalglerin büyümesi üzerine etkili olan faktörler .....	11
1.2.1. Besin Elementleri .....	11
1.2.2. Işık.....	13
1.2.3. Sıcaklık .....	15
1.3. Literatür Özeti .....	15
1.4. Çalışmanın Amacı.....	31
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	34
2.1. Materyal .....	34
2.1.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar .....	34
2.1.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanış Biçimleri.....	36
2.2. Yöntem.....	38
2.2.1. Deneysel Yaklaşım .....	38
2.2.2. Element manipülasyonu için besin ortamının hazırlanması .....	42
2.2.3. Ekim için hücre sayımı .....	44
2.2.4. Mikroalglerin hacim ölçümleri .....	45
2.2.5. Toplam nötral lipid tayini .....	45
2.2.6. Toplam nişasta tayini .....	46
2.2.7. Işık mikroskopisi.....	46

2.2.8. Konfokal ve floresans mikroskopileri.....	46
2.2.9. FTIR analizi .....	47
2.2.10. ICP-MS analizi.....	48
2.2.11. Sıcaklık ve ışık uygulamaları .....	50
2.2.12. Toplam lipid tayini .....	51
2.2.13. FAMES analizi .....	52
2.2.14. Toplam klorofil ve toplam karotenoid tayini .....	53
2.2.15. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tayini .....	54
2.2.16. Toplam protein tayini.....	55
2.2.17. Antioksidant enzim aktivite ölçümleri.....	57
2.2.17.1. Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1) aktivitesinin belirlenmesi.	57
2.2.17.2.Katalaz (EC 1.11.1.6) aktivitesinin belirlenmesi .....	58
2.2.17.3. Askorbat peroksidaz (EC 1.11.1.11) aktivitesinin belirlenmesi .....	59
2.2.17.4. Glutatyon redüktaz (EC 1.6.4.2) aktivitesinin belirlenmesi ...	60
2.2.18. Mikroalglerin oksijen radikal absorbans kapasitelerinin belirlenmesi.....	61
2.2.19. Mikroalglerde lipid peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi .....	62
2.2.20. Geçirimli Elektron Mikroskobu için örnek hazırlama ve görüntüleme .....	63
2.3. İstatistiksel Analiz.....	64
<b>3. BULGULAR</b> .....	65
3.1. Mikroalglerin Lipid İçeriğinin Artırılmasına Yönelik Uygun Besin Manipülasyonlarının Belirlenmesi Çalışmaları .....	65
3.1.1. Mikroalglerin çoğalmaları ve hücre hacimlerinde meydana gelen değişimler. ....	65
3.1.2 Mikroalglerin nötral lipid içeriğinde meydana gelen değişimler....	71
3.1.3. Mikroalglerin toplam nişasta içeriklerinde meydana gelen değişiklikler. ....	73
3.1.4. Element manipülasyonu uygulanan mikroalglerin ışık ve konfokal mikroskop görüntüleri .....	76
3.1.5. Mikroalglerin içerdikleri TAG miktarlarında meydana gelen değişiklikler .....	80

3.2. Büyüme ortamındaki element manipülasyonunun mikroalglerin içerdikleri ve kullandıkları element yoğunluğu üzerine etkisi .....	87
3.3. Mikroalglerin büyümesi ve nötral lipid içerikleri üzerine sıcaklık ve ışık şiddetinin etkisi .....	93
3.4. Büyüme ortamındaki element manipülasyonunun mikroalglerin toplam lipid üretimleri üzerine etkileri .....	98
3.5. Büyüme ortamındaki element manipülasyonunun mikroalglerin içerdikleri yağ asidi metil ester (FAMES) profillerinde sebep olduğu değişimler.....	99
3.6. Mikroalglerin içerdikleri klorofil ve karotenoid miktarlarında meydana gelen değişimler.....	104
3.7. Mikroalglerin içerdikleri Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) konsantrasyonunda meydana gelen değişimler.....	106
3.8. Mikroalglerin protein içeriklerinde meydana gelen değişimler .....	107
3.9. Mikroalglerin antioksidant enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler.....	107
3.9.1 Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesinde meydana gelen değişimler.....	108
3.9.2. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) aktivitesinde meydana gelen değişimler.....	109
3.9.3. Askorbat Peroksidaz (AP; EC 1.11.1.11) enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler .....	111
3.9.4. Glutatyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler.....	112
3.10. Mikroalglerin toplam antioksidant kapasitelerinde (Oksijen radikali süpürme etkinlikleri) meydana gelen değişimler .....	113
3.11. Mikroalglerin lipid peroksidasyonu düzeylerinde meydana gelen değişimler.....	114
3.12. Mikroalglerin anatomik yapılarında meydana gelen değişimler.....	115
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>119</b>
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>143</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>145</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>169</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Türkiye'nin yıllık petrol ihtiyacının (22 milyon ton) %50'sini karşılamak için kullanılabilir biyoürün yağ verimi ve gerekli alanın karşılaştırılması .	4
1.2. Mikroalglerin ikiye katlanma süreleri ile lipid içerikleri arasındaki ilişki.....	5
2.1. Element açlığı uygulamaları için hazırlanan besiyeri çözeltilerinin içerikleri.	43
2.2. Element bolluğu (5x) uygulamaları için hazırlanan besiyeri çözeltilerinin içerikleri .....	44
3.1. Mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen yüzde (a) ve miktarsal (b) değişimler .....	103

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	8
1.2. <i>C. reinhardtii</i> hücre morfolojisi .....	9
1.3. <i>Chlamydomonas</i> yaşam döngüsü .....	10
2.1. Doktora tez araştırmalarının ilk aşamasında yapılan deneysel uygulamalar ve ölçümler ...	39
2.2. Uygun element manipülasyonu belirlenen mikroalglerin büyüme ve nötral lipid içeriklerine sıcaklık ve ışık şiddetinin etkisinin araştırıldığı çalışma şeması.....	40
2.3. Tez çalışmasının son aşamasında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar.....	42
2.4. ICP-MS ölçümleri için kroze içine yerleştirilen örneklerin kül fırınındaki görüntüleri.....	49
2.5. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ölçümü için hazırlanan standart grafik.....	55
2.6. Protein tayini için hazırlanmış standart grafik .....	57
2.7. Mikroalglerin ORAC değerlerinin belirlenmesi için hazırlanmış olan standart grafik.....	62
3.1. Mikroalglerin büyümeleri üzerine element açlığının etkileri.....	67
3.2. Mikroalglerin büyümeleri üzerine element fazlalığının (5x) etkileri.....	68
3.3. Element açlığına cevapta mikroalg hacimlerinde meydana gelen değişiklikler.	70
3.4. Element bolluğuna (5x) cevapta mikroalg hacimlerinde meydana gelen değişiklikler .....	71
3.5. Element açlığına cevapta toplam nötral lipid içeriğinde meydana gelen değişiklikler .....	72
3.6. Element bolluğuna cevapta toplam nötral lipid içeriğinde meydana gelen değişiklikler.....	73
3.7. Element açlığına cevapta toplam nişasta içeriğinde meydana gelen değişiklikler.....	74
3.8. Element bolluğuna cevapta toplam nişasta içeriğinde meydana gelen değişiklikler.....	75
3.9. Ortam element eksikliği (üstte) ve bolluğu (altta) şartlarında 10 gün inkübe	

edilmiş <i>C. reinhardtii</i> hücrelerinin ışık mikroskopisi görüntüleri .....	77
3.10. Ortam element eksikliği (üstte) ve bolluğu (altta) şartlarında 10 gün inkübe edilmiş <i>C. reinhardtii</i> hücrelerinin konfokal mikroskopisi görüntüleri .....	79
3.11. Element açlığına cevapta mikroalglerin içerdikleri TAG miktarlarında meydana gelen değişimler .....	81
3.12. Element bolluğuna cevapta mikroalglerin içerdikleri TAG miktarlarında meydana gelen değişimler .....	82
3.13. Element açlığına maruz bırakılan mikroalglerden elde edilen FTIR verileri	83
3.14. Ortam element konsantrasyonunun fazla olduğu (5x) ortamda yetişen mikroalglerden elde edilen FTIR verileri .....	84
3.15. Element açlığına cevapta mikroalglerin içerdikleri Karbonhidrat miktarlarında meydana gelen değişimler .....	85
3.16. Element bolluğuna cevapta mikroalglerin içerdikleri Karbonhidrat miktarlarında meydana gelen değişimler .....	86
3.17. Farklı ortamlarda inkübasyona bırakılan mikroalglerin büyüme ortamlarındaki Mg, P, K, Ca, Fe ve Zn element konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikler .....	88
3.18. Mikroalglerin içerdikleri bazı makroelement miktarlarında zamana göre meydana gelen değişiklikler .....	89
3.19. Mikroalglerin N, S, C ve H element içeriklerinde meydana gelen değişiklikler .....	90
3.20. Mikroalglerin içerdikleri bazı mikroelement miktarlarında zamana göre meydana gelen değişiklikler .....	92
3.21. Farklı element açlığı ya da bolluğu bulunan ortamlarda yetiştirilen mikroalglerin ortam sıcaklık ve ışık şiddeti değişimlerine cevapta büyümelerinde meydana gelen değişiklikler .....	94
3.22. Farklı büyüme ortamlarında yetiştirilen mikroalglerin büyümeleri üzerine ortam sıcaklık ve ışık şiddetinin etkisi .....	95
3.23. Farklı element açlığı ya da bolluğu bulunan ortamlarda yetiştirilen mikroalglerin ortam sıcaklık ve ışık şiddeti değişimlerine cevapta nötral lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler .....	96
3.24. Farklı büyüme ortamlarında yetiştirilen mikroalglerin nötral lipid içerikleri üzerine ortam sıcaklık ve ışık şiddetinin etkisi .....	97

3.25. Ortam element açlığı ve bolluğuna cevapta mikroalglerin içerdikleri toplam lipid miktarı ve nispi kuru ağırlıklarında meydana gelen değişimler .....	99
3.26. Ortam element açlığı ve bolluğuna cevapta mikroalglerin içerdikleri doymuş, tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asidi oranlarında meydana gelen değişimler .....	101
3.27. Mikroalglerin toplam klorofil, klorofil a/b ve toplam karotenoid içeriklerinde meydana gelen değişimler .....	105
3.28. Mikroalglerin yapısında bulundurdukları H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarlarında meydana gelen değişimler .....	106
3.29. Mikroalglerin protein içeriklerinde meydana gelen değişimler .....	107
3.30. Süperoksit Dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler .....	109
3.31. Katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler .....	110
3.32. Askorbat Peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler .....	112
3.33. Glutatyon Redüktaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler .....	113
3.34. Mikroalglerin oksijen radikal absorbands kapasitelerinde (ORAC) meydana gelen değişiklikler .....	114
3.35. Mikroalglerin lipid peroksidasyonu değerlerinde meydana gelen değişimler .....	115
3.36. Element manipülasyonuna cevapta mikroalglerde meydana gelen anatomik değişimin karşılaştırmalı görüntüleri .....	117
4.1. Mikroalg lipid biyosentezinde ana yollar ve metabolitler .....	125
4.2. Bitkisel organizmalarda ROT temizleme mekanizmaları .....	137

## SİMGELER DİZİNİ

A	Absorbans
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
KeV	Kiloelektronvolt
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
nM	Nanomolar
ppb	Milyarda bir birim (Parts per billion)
ppm	Milyonda bir birim (Parts per million)

## KISALTMALAR DİZİNİ

AAPH	2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride
ACCaz	Asetil-CoA Karboksilaz
ACP	Açıl taşıyıcı protein
ADP	Adenozin di fosfat
AP	Askorbat Peroksidaz
ATP	Adenozin tri fosfat
BBM	Bold Basal Medium
BCA	Bisinkoninik asit (Bichinconinic asit)
BHT	Bütihidroksitoluen



BSA	Bovin Serum Albumin
CAT	Katalaz
CHNSO	Element Analizör
CoA	Koenzim A
CTEM	Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu
DAGAT	Diaçilgliserol açıltransferaz
DCW	Kuru hücre ağırlığı
ddH <sub>2</sub> O	Çift distile su
DGDG	Digalaktosildiaçilgliserol
DHA	Dokosaheksaenoik asit
DHA	Dehidroaskorbat
DHAP	Dihidroksiaseton fosfat
DHAR	DHA redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Edetik asit (Etilen diamin tetraasetik asit)
ENR	Enoil-ACP redüktaz
EPA	Eikosapentaenoik asit
FAMEs	Yağ Asidi Metil Esterleri
FAT	Yağ asidi-ACP tiyoesteraz
Fd	Ferrodoksin
FFA	Serbest yağ asitleri
FTIR Spektroskopisi	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC-MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektroskopisi
GPAT	Gliserol-3-fosfat açıltransferaz
G3PDH	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz
GPX	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid (Yükseltgenmiş glutasyon)
HD	3-hidroksiaçil ACP dehidrataz
HRP	Horseradish peroxidase
ICP-MS	Endüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi

IR	Kızıllötesi (İnfa Red)
KAR	3-ketoaçil-ACP redüktaz
KAS	3-ketoaçil-ACP sentaz
LPAAT	Lizo-fosfaditik asit açiltransferaz
LPAT	Lizo-fosfatidilkolin açiltransferaz
MAT	Malonil-CoA-ACP transaçilaz
MB	Mikroskop büyütmesi
MDA	Monodehidroaskorbat
MDAR	MDA redüktaz
MGDG	Monogalaktosildiaçilgliserol
MUFA	Tekli doymamış yağ asidi
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	Nitro blue tetrazolium
ORAC	Oksijen radikal absorbands kapasitesi
PAR	Fotosentetik aktif radyasyon
PC	Fosfatidilkolin
PDH	Piruvat dehidrogenaz kompleksi
PG	Fosfatidilgliserol
PIM	Protease inhibitör mix
PSI	Fotosistem I
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi
RNA	Ribonükleikasit
SFA	Doymuş yağ asidi (Saturated Fatty Acid)
SOD	Süperoksit Dismutaz
SQDG	Sülfoquinovosildiaçilgliserol
TAG	Triaçilgliserol
TAP	Tris Asetat Fosfat çözeltisi
TBA	Thiobarbituric acid
TCA	Trichloroacetic acid
TCD	Termal İletkenlik detektörü
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu

## 1.GİRİŞ

Yeryüzündeki bütün canlıların kullandığı enerjinin temel kaynağı güneş enerjisi olup, bu enerji besin zincirinin ilk basamağını oluşturan algler ve bitkiler gibi fotosentez yapabilme kabiliyetine sahip canlıların karbon fiksasyonu ile organik bileşiklerde depolanır ve farklı kimyasal formlarda diğer canlılara aktarılır. Besin zincirinin temel üreticileri konumunda olan mikroalgler okyanus ve denizlerden tatlı, acı ve sodalı sulara, su sızdıran kayalardan mağaralara, çöllerden sıcak su kaynakları, kar ve buzullara kadar çok değişik ekolojik şartlara sahip sistemlere adapte olabilmiş, ototrof ve/veya heterotrof beslenme özelliği gösterebilen, ökaryot ya da prokaryot yapıda ve milyarlarca yıldır varlıklarını çeşitlenerek sürdürebilmiş, su sistemlerinde serbest azotun bağlanmasından, su ve havadaki serbest oksijenin büyük bir kısmının üretiminden sorumlu olan özel mikroorganizmalardır. Cyanobacteria (Cyanophyceae), yeşil algler (Chlorophyceae), diatomlar (Bacillariophyceae), sarı yeşil algler (Xanthophyceae), altın sarısı algler (Chrysophyceae), kırmızı algler (Rhodophyceae), kahverengi algler (Phaeophyceae), dinoflagellatlar (Dinophyceae) ve pico-plankton (Prasinophyceae ve Eustimatophyceae) gibi gruplara ayrılmış olan mikroalglerin şimdiye kadar 40000'in üzerinde türü tanımlanmış olup bu rakamdan daha fazla sayıda türe sahip oldukları tahmin edilmektedir (Van den Hoek vd., 1995).

Bazı mikroalg türleri, yüzyıllardır Doğu Asya, Kuzey Amerika ve Orta Afrika'nın bazı bölgelerinde yöresel topluluklar tarafından toplanarak kurutulup besin olarak tüketilmektedir (Chisti, 2007). Bilimsel ilerlemeler ile birlikte ancak 18. yüzyılın sonlarında başlatılan kültüre alma çalışmaları 1900'lü yılların ilk çeyreği içerisinde meyvelerini vermiş, bugün geniş çapta biyokütle ticareti yapılan *Chlorella*, *Spirulina* ve *Dunaliella* türleri ilk olarak bu tarihlerde kültüre alınmıştır (Chisti, 2008). Ticari amaçla mikroalg üretimi, ilk olarak Japonya'da 1960'ların başlarında *Chlorella* cinsi mikroalgler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunu takiben 1970'li yıllarda Meksika'da *Spirulina* cinsi bazı türlerin ticari üretimi gerçekleştirilmeye başlanmıştır. *Dunaliella* türlerinden *D.salina*'nın geniş ölçekli endüstriyel üretimi,

özellikle  $\beta$ -karoten kaynağı olarak 1980'li yılların sonlarına doğru ilk kez Avustralya'da başlamış ve çok kısa zamanda üçüncü büyük mikroalg endüstrisi haline gelmiştir. Takip eden yıllarda İsrail, Hindistan ve Amerika'da da endüstriyel amaçlı büyük ölçekli *Dunaliella*, *Spirulina* ve *Chlorella* üretimi yapan çok sayıda şirket kurulmuş ve astaksantin bakımından oldukça zengin olan *Haematococcus pluviialis* gibi diğer mikroalg türlerinin de ilavesiyle mikroalg endüstrisi genişlemiştir (Christenson ve Sims, 2011). Böylece 30 yıl gibi kısa bir sürede mikroalg endüstrisi çok hızlı bir büyüme ve çeşitlenme göstermiştir. Günümüzde mikroalg endüstrisi milyarlarca liralık hacmi ile ülkeler için önemli bir ekonomik faaliyet alanı olma yolunda ilerlemektedir.

Bugüne kadar mikroalglerin kullanım alanları üzerine çok sayıda ve birbirinden değişik öneriler getirilmiştir ve bu konuda bir sınırlama yapmak pek uygun gözükmemektedir. Ancak şimdiye kadar tanımlanmış potansiyel kullanım alanları arasında ökaryot ve prokaryot yapıdaki değişik mikroalg türlerinin:

- Gıda olarak; yetersiz ve düzensiz beslenen bireylerin beslenmesinde protein kaynağı,
- Yem katkı maddesi olarak; evcil hayvanlar, kümes ve ahır hayvanlarının yemlerinde protein ve vitamin kaynağı,
- Su ürünleri yetiştiriciliğinde; yumuşakçalar ve kabuklu deniz hayvanlarının tüm yaşam evrelerinde, eklembecaklı ve balık larvalarının temel besinini oluşturan zooplanktonların üretilmesinde zengin besin kaynağı,
- Organik gübre olarak; azot fikse edebilen türlerin yanında kompost halde veya katı gübre olarak biyokütle kaynağı,
- Atıkların biyolojik arıtımında; özellikle sudaki yoğun azot, fosfor ve amonyağın arındırılmasında,
- Ağır metallerin çevreden geri kazanımında; canlı veya kurutulmuş biyokütle kaynağı,

- Küresel ısınmayla mücadelede; yüksek CO<sub>2</sub> seviyelerine toleranslı olan bazı mikroalglerin yoğun CO<sub>2</sub> emisyonunun gerçekleştirildiği endüstriyel bölgelerde ve hatta fabrika bacalarında yetiştirilmesine yönelik biyokütle kaynağı,
- Farmasötik ve terapötik amaçlı; bazı polisakkaritler, lipidler, vitaminler, karotenoidler, enzim ve antibiyotik kaynağı,
- Kimyasal madde kaynağı olarak; gıda, ilaç ve kozmetik sanayisinde geniş kullanım alanı bulan gliserol, değişik yağ asitleri, vakslar, steroller, hidrokarbonlar, enzim, vitamin ve polisakkarit kaynağı,
- Pigment ve antioksidan kaynağı olarak; gıda, eczacılık, tekstil ve kozmetik sanayiinde kullanılan klorofil a,b,c, β karoten, astaksantin, fikosiyenin, fikoeritrin ve ksantofil gibi bazı organik kökenli pigmentlerin elde edilmesinde biyokütle kaynağı
- Yenilenebilir enerji kaynağı olarak; biyometan, biyodizel ve biyohidrojen üretimi için biyokütle ve lipid kaynağı olarak kullanılabilme potansiyelleri ile alakalı değişik araştırmalar rapor edilmiştir (Chisti 2007; Chisti 2008; Stephens vd., 2010; Christenson ve Sims, 2011)

Halen dünyada tüketilen enerjinin % 90'ına yakını fosil kaynaklardan temin edilmektedir. Fosil kökenli yakıtların (petrol, kömür vb.) emisyon değerlerinin uygun olmayışı, gelecek için yeni önlemleri ve yeni arayışları mecbur bırakmaktadır. Nüfusun yoğun olduğu bölgelerde bu kirletici bileşikler, insan sağlığı açısından çok önemli problemlere yol açmaktadır. Dünyanın fosil yakıt rezervlerindeki giderek azalma ile birlikte petrol fiyatlarındaki sürekli artışlar ve özellikle küresel ısınmanın tehlikeli boyutlara ulaşması yenilenebilir enerjiye olan gereksinimi artırmaktadır. Şeker kamışı, kolza, soya ve ayçiçeği gibi bitkilerden biyodizel (Çizelge 1.1.) ve etanol üreterek geleneksel fosil yakıtlara alternatif bir yakıt oluşturacağı düşünülen birinci nesil biyokütle enerji kaynaklarının yakın geçmişte gıda piyasaları ve içme suyu kaynakları üzerinde bazı yan etkileri görülmeye başlanmış ve daha çevreci biyokütle kaynakları üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Öte yandan selülozik biyokütleden etanol üretimine dayanan ve halen teknolojik ve ekonomik açıdan yeterli düzeye gelmesi için yoğun araştırma ve geliştirmeye ihtiyaç duyulan ikinci nesil biyokütle enerji kaynakları, kullanımdaki diğer enerji türlerine alternatif

olmaktan uzak gözükmetedir (Chisti, 2007). Böylece tüm dünyada tarım alanları ve su kaynakları üzerinde daha az baskı yaratan, daha verimli ve gelişime daha açık biyolojik yakıt üretimi üzerine araştırmalar yapılmaktadır.

**Çizelge 1.1.** Türkiye'nin yıllık petrol ihtiyacının (22 milyon ton) %50'sini karşılamak için kullanılabilir biyoürün yağ verimi ve gerekli alanın karşılaştırılması

Biyodizel kaynağı	Yağ verimi (Litre/hektar)	Gerekli Alan (...bin hektar)
Mısır	172	63953
Soya Fasülyesi	446	24663
Kolza	1190	9243
Jatropha	1892	5813
Hindistan cevizi	2689	4090
Afrika Palmiyesi	5950	1848
Mikroalg (%30 yağ içeriğı)	58700	187
Mikroalg (%70 yağ içeriğı)	136900	80

Tüm mikroalgler metabolizmalarındaki işleyişe bağılı olarak değışen oranlarda protein, karbohidrat, yağ ve nükleik asit içerirler. Yukarıda belirtilen potansiyel kullanım alanları, mikroalglerin içerdikleri protein, karbohidrat, yağ ve nükleik asit miktarı ve bunları oluşturan katma değıeri yüksek moleküllerin oransal farklılıklarının belirlenmesi ile ortaya çıkmıştır. Mikroalglerin diğıer tüm biyoteknolojik özellikleri bir yana, mikroalglerdeki yağ miktarı genellikle %20-50 arasında değışirken bazılarında bu oran %80' e kadar çıkabilir (Çizelge 1.2). Mikroalglerde, lipidler ve yağ asitleri depolama ürünleri ve enerji kaynağı olarak sentezlenmektedir. Dolayısıyla mikroalgler strese maruz kaldıklarında, kolayca geri kazanabileceğı enerji formu olduğundan, sitoplazmalarında serbest yağ cisimleri biriktirme eğilimindedirler. Mikroalgler tarafından üretilen doğal yağ (lipid) formunun, biyodizel üretimi için uygun yapıda oluşu, mikroalgleri biyodizel üretiminde ayrıcalıklı bir yere koymuştur. Nitekim teorik olarak mikroalglerle kıyaslandığında, biyodizel eldesi için de kullanılmakta olan mısır bitkisinden hektar başına yaklaşık 555 kat, kolza tohumundan 79 kat ve Afrika palmyesinden 16 kat daha fazla biyodizel elde etmek mümkündür (Çizelge 1.1). Mikroalgler şu anda yüksek lipid içeriklerine bağılı biyoyakıt üretimi için alglerin en umut verici grubu olarak

görülmektedir (Brennan, 2010). Üçüncü nesil biyolojik yakıt kaynağı olarak görülen mikroalgler karasal bitkilere kıyasla çok daha yüksek biyokütle oluşturma hızına, fotosentetik verime ve yağ biriktirme potansiyeline sahiptirler. Bu nedenle biyolojik yakıt üretimi ve böylece fosil enerji kaynaklarına bağımlılığı önemli oranda azaltabilecek potansiyele sahiptirler.

Yenilenebilir bir doğal kaynak olması, ekilebilir tarım arazilerinin kullanılmasına gerek duyulmaması, birçok yerde üretim yapılması, atık sularda üretilebilmesi ve işlem sonucunda katma değeri olan bir atık (hayvan yemi veya gübre katkı maddesi olarak kullanılan) oluşması sebebiyle su yosunlarının, özellikle mikroalglerin biyodizel üretiminde kullanılması üzerine çalışmalar artarak devam etmektedir. Bu alanda ki araştırmaların çoğu, yüksek yağ içeriğine sahip olan algal türlerin tespit edilerek yağlarının ekstrakte edilmesi ve işlenmesi üzerinedir (Rodolfi vd., 2009). Diğer taraftan, yağ içeriği yüksek olan mikroalglerde (örneğin *Nannochloropsis*, *Botryococcus* ve *Neochloris* cinslerine ait bazı türler) bölünme hızının düşük, buna karşın yağ içeriği düşük olan mikroalglerde ise bölünme hızının yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1.2).

**Çizelge 1.2.** Mikroalglerin ikiye katlanma süreleri ile lipid içerikleri arasındaki ilişki

<b>Mikroalg</b>	<b>Lipid içeriği (% Kuru Ağırlık)</b>	<b>İkiye katlanma süresi (saat)</b>	<b>Referans bilgisi</b>
<i>Schizochytrium sp.</i>	50–77	60-80	Yaguchi vd., 1997
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75	48-72	Mata vd., 2010
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31–68	30-35	Sydney vd., 2010
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54	45-50	Murray vd., 2011
<i>Nitzschia sp.</i>	45–47	65-80	Krist ve Wiencke, 2008
<i>Isochrysis galbana</i>	25–33	70-80	Kaplan vd., 1986
<i>Nannochloris sp.</i>	20–35	30-40	Chisti, 2007
<i>Chlorella sp.</i>	28–32	5-25	Koh ve Ghazoul, 2008
<i>Cryptothecodinium cohnii</i>	20-25	8-25	Schenk vd., 2008
<i>Dunaliella primolecta</i>	23-27	10-30	Li vd., 2008
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21-30	5-24	Harris, 2009

Bölünme hızında ve lipid içeriklerindeki tezatlıklar dikkate alındığında örneğin Çizelge 1,2’de gösterilen türlerden lipid içeriği ortalama %25 olan *Chlamydomonas reinhardtii* ile % 64 olan *Schizochytrium* sp. türlerinden birim sürede yaklaşık olarak aynı miktarlarda lipid elde edilebileceği durumu ortaya çıkıyor. Bu durumu sayısal olarak göstermek gerekirse, aşağıdaki tabloda görüleceği gibi *Schizochytrium* sp. türünün ortalama lipid içeriği yaklaşık olarak %64, ikiye katlanma süresi ise 70 saattir. Diğer taraftan *Chlamydomonas reinhardtii* türünün ortalama lipid içeriği yaklaşık olarak %25, ikiye katlanma süresi ise 15 saattir. Lipid eldesi için yetiştirildiği düşünüldüğünde 10 günün sonunda 1 *Schizochytrium* sp. mikroalginden ortalama 3.4 mikroalg (240saat/70saat $\approx$ 3.4 mikroalg), 1 *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginden de ortalama 16 mikroalg (240saat/15saat $\approx$ 16 mikroalg) türeyecektir. Böylece 1 *Schizochytrium* sp. türünden 64 birim, 1 *Chlamydomonas reinhardtii* türünden de 25 birim lipid elde edilebileceği düşünüldüğünde 10 günün sonunda 1 *Schizochytrium* sp. türünden ortalama 220 birim (3.4 mikroalg x 64 birim lipid = 220 birim lipid), 1 *Chlamydomonas reinhardtii* türünden de ortalama 400 birim (16 mikroalg x 25 birim lipid = 400 birim lipid) lipid elde edilebilecektir. Elbette *Schizochytrium* sp. türünün sitoplazmik serbest lipid içeriğinin de fazla oluşu, hücre zarında da bol miktarda lipid biriktirmiş olması ve böylece pratikte daha fazla lipid saflaştırılabileceği durumları göz önünde bulundurulduğunda yukarıda yapılan teorik hesaplamalar pratikte gerçekçi olmayabilir. Burada anlatılmak istenen durum esasında doğadaki ökaryotik yapıda mikroalglerin birçoğu lipid ekstraksiyonu amacı ile kullanıldığında birbirleri arasında verim açısından çok önemli farklılıkların olmayacağıdır. Dolayısıyla lipid içeriği zaten yüksek olan bir türün bölünme hızı düşük olduğundan, lipid içeriği nispeten düşük olan ancak bölünme hızı yüksek olan mikroalglerin bölünme hızını çok düşürmeyecek, bununla birlikte lipid içeriğini önemli oranda artıracak uygulamalara ihtiyaç vardır. Mikroalglerin değişik stres şartları altında kolay geri dönüştürülebilir enerji formu olan lipidleri biriktirdikleri bilinmektedir (Chisti, 2007). Ancak şimdiye kadar mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasına yönelik olarak bu araştırma projesinde olduğu kadar kapsamlı ve karşılaştırmalı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada mikroalglerin büyüme ortamlarındaki element konsantrasyonları, sıcaklık ve ışık parametrelerinin tek başına ve belli bir düzende kombinasyonları sonucu mikroalglerin nötral lipid içeriğindeki değişim ve ilgili parametreler irdelenmiştir.

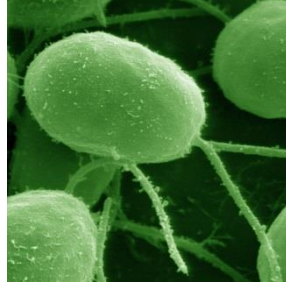


Büyük oranda yağ vermediği dikkate alınan tek hücreli yeşil arazi algi *Chlamydomonas reinhardtii* için hayli gelişmiş moleküler ve genetik araçlardan yararlanılarak, yağ üretiminin nasıl yükseltilebileceğini anlamak gibi kabul edilmiş tamamlayıcı bir yaklaşım halen gelişme aşamasındadır. (Sheehan vd.,1998; Harris, 2009). Diğer taraftan basit yaşam döngüsü, farklı dış ortam şartlarına karşı oldukça hızlı metabolik cevaplar vermesi, ikiye katlanma süresinin düşük olması, tüm genom haritasının çıkarılmış olması ve çok değişik mutant bireylerinin elde edilmiş olması ile tek hücreli bir organizma olan *Chlamydomonas reinhardtii* fotosentez, metabolizma düzenlenmesi, hücrelerarası tanıma ve hücre tutunması, beslenme yetersizliğine yanıt, kamçı hareketliliği, kloroplast dinamiği, biyogenesis ve genetik araştırmalarında, hidrojen üretimi ve biyoyakıt üretimi çalışmalarında model organizma olarak kullanılmaktadır.

Bu doktora araştırmasında da mikroalg çalışmalarında model organizma olarak kullanılan *Chlamydomonas reinhardtii* türünün yabancı tip CC-124 soyu kullanılarak, ortam element konsantrasyonları ve sıcaklık ile ışık gibi dinamik büyüme parametrelerindeki değişimler ile mikroalglerden en yüksek düzeyde ve kaliteli biyodizel eldesi için uygulanabilecek en uygun stres şartlarının neler olduğunun ve bu uygulamaların fizyolojik etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

### **1.1.Chlamydomonas reinhardtii**

Empire : Eukaryota  
Alem : Plantae  
Bölüm : Chlorophyta  
Sınıf : Chlorophyceae  
Takım : Chlamydomonadales  
Familya: Chlamydomonadaceae  
Cins : Chlamydomonas  
Tür : *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard



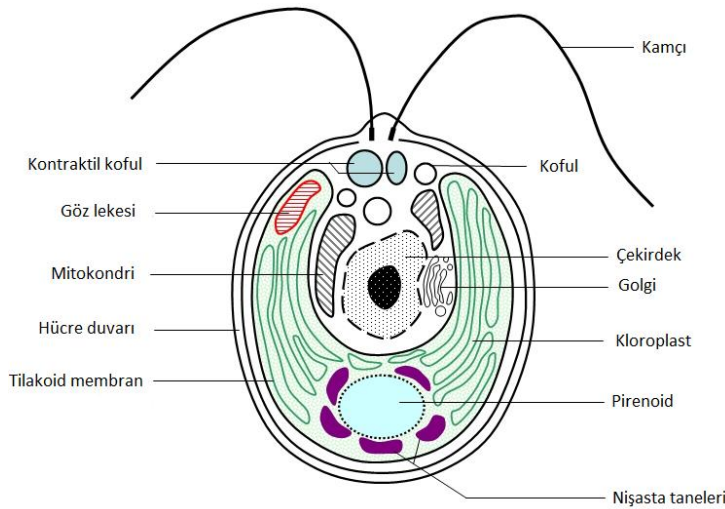
**Şekil 1.1.** *Chlamydomonas reinhardtii* (İnternet: *Chlamydomonas*-SEM)

Chlorophyta (yeşil algler) bölümü içerisinde tek tek hücreler olduğu gibi koloni oluşturan, dallanmış ya da dallanmamış ipliksi, kısmen farklılaşma göstererek genişlemiş talluslara sahip örneklerde bulunmaktadır. Çeperleri pektin ve selülozdur. Asimilasyon ürünleri nişasta ve yağlardır. Çoğu ototrof türlerden oluşur. Eşeysiz üreme zoospor ve aplanosporlarla olur. Zoosporlar armut biçiminde ve eşit uzunlukta 2 ya da 4 kamçıya sahiptirler. Eşeyli üremeleri izogami, anizogami ve oogami iledir. Yeryüzünde geniş bir yayılıma sahiptirler. %90 kadarı tatlı sularda, %10'u ise denizlerde yaşar. Nemli toprak ve kurak yerlerde yaşayan türleri de vardır. Mantarlar ile birleşerek likenleri oluştururlar. Chlamydomonaceae familyası üyeleri koloni oluşturmazlar, tek hücreli ve hücre biçimleri oldukça yuvarlaktır (Güner ve Aysel, 2006).

Tek hücreli, yeşil ve bir kamçılı mikroalg türü olan *C. reinhardtii* mikroalg çalışmalarında kullanılan model bir mikroorganizmadır. Tüm genom haritası çıkarılan bu mikroalgin çok sayıda mutant türleri de bulunmaktadır. Mikroalglerin lipid içeriğinin artırılması için uygulanabilecek en uygun stres şartlarının tanımlanabilmesini amaçlayan bu araştırmadan elde edilen sonuçların lipid içeriği zaten yüksek olan türlere uygulanabileceği düşünüldüğünden *C. reinhardtii* türünün herhangi bir mutant türü kullanılmamış olup bu araştırma kapsamlı uygulamalar ve analizlerle sadece yabancı tip *C. reinhardtii* CC-124 soyu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 1.1.1. Habitat, morfoloji ve yaşam döngüsü

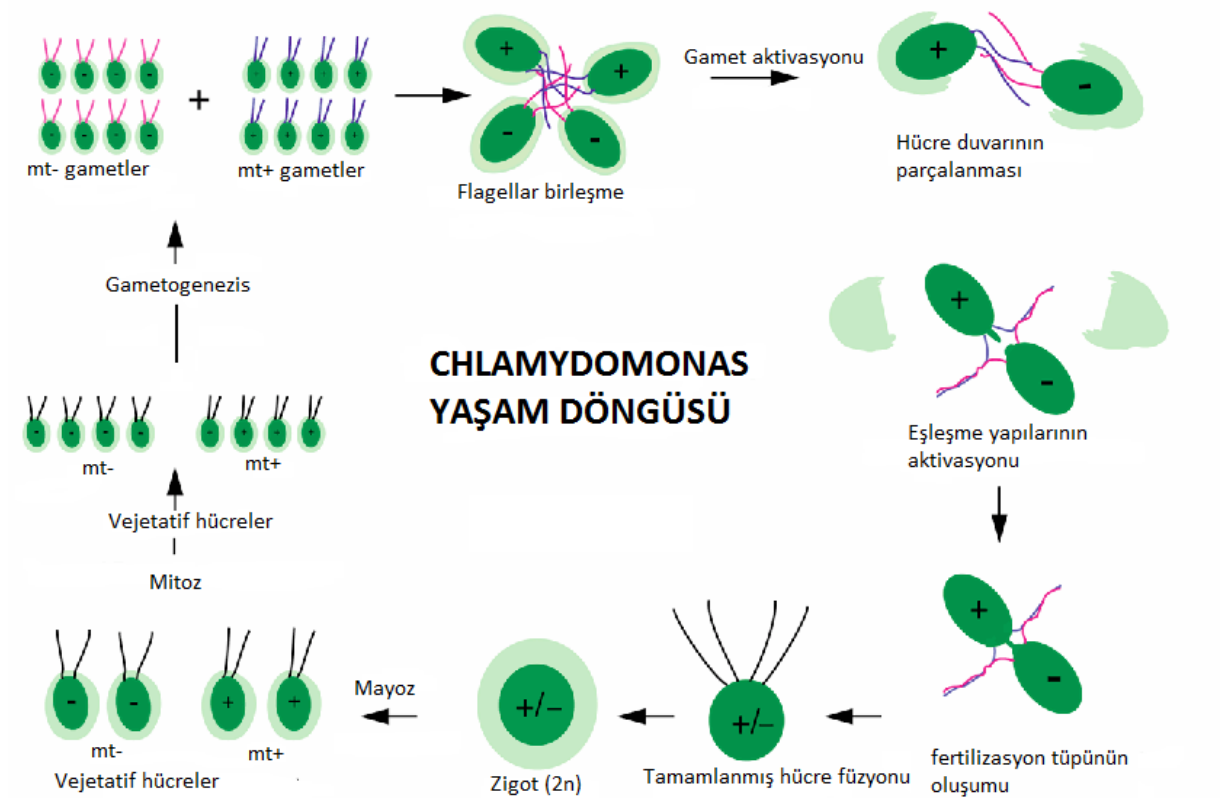
Chlorophyceae sınıfı mikroalgler tek hücreli yeşil alglerdendir. Bu sınıfa ait algler toprakta, tatlı su ve denizlerde ve hatta dağların karla kaplı zirvelerinde de yayılış göstermektedir. Bu sınıfa ait algler içerisinde laboratuvarında en sık üzerinde çalışılan mikroalg *C. reinhardtii* mikroalgidir. *C. reinhardtii*, çapı yaklaşık 10 mikrometre olan tek hücreli yeşil bir algdir ve iki kamçı ile yüzer. *C. reinhardtii* hidroksprolin zengini glikoproteinlerden oluşan hücre duvarına, büyük bir fincan şeklinde kloroplasta, büyük bir pirenoide ve bir ışık algılayıcı "göz lekesi" ne sahiptir. Fotosentez sonucu üretilen nişastanın depolandığı pirenoid halkaları ışık mikroskopunda da ayırt edilebilir. Bu mikroalgde yine çok sayıda küçük kofulun yanında hücre içi su dengesini sağlayan özelleşmiş kontraktıl kofullar da bulunmaktadır (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** *C. reinhardtii* hücre morfolojisi (İnternet: *Chlamydomonas*-Cronodon)

*Chlamydomonas reinhardtii*'nin nisbeten basit bir hayat devresi vardır (Şekil 1.3). Vejetatif hücreler monoploid (haploid), sadece zigot diploid yapıdadır. Germinasyon esnasında zigot mayozla maruz kalarak 4 monoploid hücre oluşturur. Bunlar tamamen fonksiyonel vejetatif hücrelerdir. Birçok türdeki seksüel üreme morfolojik olarak izogamidir. Ancak gametler fizyolojik olarak artı ve eksi soylara ayrılacak şekilde

farklılaşmıştır. Zıt yüklü bireyler arasındaki kimyasal çekim flagellalar aracılığı ile sağlanır.



Şekil 1.3. *Chlamydomonas* yaşam döngüsü (İnternet: *Chlamy-Connection-Educational*)

Basit hayat döngüsü, kısa bölünme süresi ve değişen çevresel koşullara hızla cevap vermesinden dolayı *C. reinhardtii* mikroalgi bu araştırma için biyolojik materyal olarak seçilmiştir. Bu doktora çalışmasında mikroalglerde lipid içeriğinin artırılmasına yönelik yapılan uygulamalar, diğer uygulamalardan daha ekonomik olan ve endüstriyel ölçekte üretim için maliyeti düşüren parametrelerden farklı yoğunlukta ki besin elementleri, farklı şiddetlerde ki ışık ve farklı derecelerde ki sıcaklık değerlerinden oluşturulmuştur.

## 1.2. Mikroalglerin büyümesi üzerine etkili olan faktörler

Mikroalglerin büyümesi üzerine etkili olan faktörlerin başında besin elementlerinin varlığı ve bunların miktarları, sıcaklık, ışık ve pH değerleri gelir.

### 1.2.1. Besin Elementleri

Mikroalglerin fototrofik üretimlerinde gerekli olan besinler makro elementler, mikro elementler ve vitaminlerdir. Alglerde en az 56 elementin var olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır. Bunlardan Azot (N), Fosfor (P), Potasyum (K), Kükürt (S), Sodyum (Na), Magnezyum (Mg) ve Kalsiyum (Ca) gibi elementler çokça bulunmaktadır. Makro elementlerden biri olan azot, en fazla gereksinim duyulan bir element olup aminoasitler ve nükleik asitler dahil birçok hücre bileşenini oluştururlar. Bu nedenle azot eksikliği büyümeyi önemli ölçüde engeller. Hücrelerin kuru ağırlığının %7-10'unu oluşturur ve kültür büyümesini etkileyen ana faktördür. Genellikle kültür ortamlarına nitrat, amonyak veya organik kaynaklı üre olarak konular. Çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlar ışığında, yağların biyosentezi ve biriktirilmesi, azotun sınırlı olduğu ve hiç azot olmayan durumlarda başarılıdır (Chisti 2007). Azot kıtlığına maruz bırakılmış bazı mikroalg hücreler nötral yağları daha fazla üretirken, buna karşıt olarak da büyüme ortamında azot bulunan hücreler polar yağları daha fazla üretmişlerdir (Becker, 1995; Jayasankar ve Polywal, 2000; Sukatar, 2002; Richmond, 2004.)

Fosfor makronutrienti, hücrel metabolik süreçlerde, mikroalglerin büyümesi ve gelişmesi için bazı yapısal ve fonksiyonel maddeleri oluşturarak önemli bir rol oynar. Fosfor ortamda fosfor tuzları ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ,  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ ) şeklinde bulunmaktadır. Bu tuzlar fosfor kaynağı olarak kullanılmakta ve aynı zamanda tampon özelliğinden yararlanılarak besin ortamının pH dengesinin kurulmasını sağlamaktadır (Sukatar, 2002; Richmond, 2004). Fosfor, bitki hücrelerinde solunum ve fotosentezin ara molekülü şeker-fosfat dahil, bitki zarını oluşturan fosfolipidler gibi önemli maddelerin bileşenidir. Ayrıca bitki ve mikroalglerin enerji metabolizmasında ve nükleotidlerin yapısında bulunur. Fosfor

eksikliğinde mikroalglerde lipid birikimi ve DHA (dokosaheksaenoik asit) üretiminin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Sternner vd., 2004).

Kükürt, azot ile birlikte proteinlerin bileşenidir, kükürt ayrıca tiamin ve biotin gibi vitaminlerin yapısına girer. Canlı bir hücrede moleküler kükürt, organik kükürte çevrilir ve sülfat iyonu halinde hücrede yeniden kükürt bileşikleri yapmada kullanılmak üzere birikir. Kükürt protein sentezi için gerekli olup, ikincil hücre bileşenleri glukosinolat ve süfolipidleri içeren kısmında bulunur (Leustek ve Saito, 1999). Kükürt yokluğunda *Chlamydomonas reinhardtii* hücrelerinde bölünmedeki yavaşlama ile birlikte biyohidrojen üretimi iyi karakterize edilmiştir (Melis ve Happe, 2001).

Potasyum, organizmada eriyebilir tuzlar şeklinde bulunur. Hücrelerin ozmotik basınçlarının düzenlenmesinde önemli görevi vardır ve özellikle erimiş halde  $K^+$  katyonu şeklinde bulunup turgor basıncının oluşmasını sağlar. Ayrıca solunum ve fotosentez enzimlerinin aktifleştirilmesinde de görevlidir.  $K^+$  iyonları, proton pompaları tarafından yayılmış  $H^+$  iyonlarıyla çok kolay yer değiştiren iyonlardır; böylece bu pompaların sürekli olarak çalışmasını, iki kısım arasında sürekli pH gradientlerinin oluşturulmasını ve dolayısıyla proton motor gücünün yaratılmasını sağlar. Bu güç mitokondri ile kloroplastlarda oksidoredüksiyonları ve fosforilasyonlar arasındaki birleşmeyi sağlayan kuvvettir. Potasyum ayrıca asit-baz dengesini (+ ve - yüklerin eşitliği) sağlayan temel elementtir. Bunlara ek olarak potasyum, hücre içi difüzyonda etkili olan elektriksel potansiyelin oluşumunun esas elemanıdır.

Kalsiyum,  $Ca^{+2}$  iyonları şeklinde hücre çeperlerinin sentezlenmesinde kullanılır. Hücre zarlarının normal çalışması için gereklidir ve canlının çevresel etkilere gösterdiği çeşitli tepkilerin oluşturulmasında sekonder haberci rolü oynadığı kabul edilir.

Magnezyum, hücrelerde  $Mg^{+2}$  iyonları şeklinde solunum, fotosentez, DNA ve RNA sentezlenmesinde görevli enzimlerin aktifleştirilmesinde spesifik görev alır.

Magnezyum ayrıca klorofil molekülünün halkasal yapısının bir kısmıdır. Magnezyum fazlalığı hücrelerde zehir etkisi yapar (Taiz ve Zeiger, 2008).

Mangan, bakır, bor, kurşun, çinko, demir, kobalt gibi iz elementler çok az miktarda besin ortamlarında bulunması gereken büyüme için esansiyel mikronutrientlerdir (Jayasankar ve Polywal, 2000).

Esansiyel iz elementlerden demir, redoks özelliğinden dolayı önemlidir, fotosentez, solunum, azot fiksasyonu ve DNA sentezi gibi prosesler doğrudan etkilenebilmektedir. Demir, klorofil üretiminde gerekli bir elementtir, ayrıca birçok enzimin komponentidir.

Bor hücrenin yapısına katılarak destek verici bir mikronutrienttir. Bakır, karbohidrat ve azot metabolizması için gereklidir. Mangan fotosentez ve azot metabolizmasında önemlidir. Molibden, azot fiksasyonu ile ilişkili enzim sistemlerinde yer alır, ayrıca azot metabolizması, protein sentezi ve sülfür metabolizmasını da etkilemektedir. Çinko, enerji üretimi, protein sentezi ve büyümeyi kontrol eden çeşitli enzim sistemlerindeki esansiyel elementtir. Çinko klorofil biyosentezi için de gerekli olup birçok enzimin kofaktörüdür (Richmond, 2004; İnternet: Ecochem).

### **1.2.2. Işık**

Işık, fotosentetik organizmaların canlılığını sürdürmeleri için zorunludur. Fotosentetik büyüme, her bir hücrenin kullandığı ışık enerjisiyle orantılı olduğundan, üretimlerde ışığın en uygun seviyelerde olması sağlanmalıdır. Işık yoğunluğu da bitki büyümesinde önemli bir faktördür. Bu sebeple üretimlerde, kültür kabının derinliği ile kültür yoğunluğu birbiriyle ilişkilidir. Derinliği ve hücre konsantrasyonu yüksek olan kültürde, ışık penetrasyonunu sağlamak için ışık yoğunluğu artırılır. Işık yoğunluğunun artması ile fotosentetik organizmaların büyüme hızları da artmaktadır, ancak belli bir noktadan sonra doygunluk seviyesine ulaşılır. Bu noktadan itibaren hücreler ürettikleri enerjiyi ısı olarak açığa çıkartır. Yüksek ışık seviyelerinin devam etmesi durumunda ise organizmanın dengesi bozularak üretilen yüksek miktarda

enerji nedeniyle inhibisyon meydana gelir ve bu fotoinhibisyon durumunda organizmada geri dönülmez zararlar oluşabilir (Richmond, 2004).

Algler fotosentez yaptıklarından biyokimyasal kompozisyonları için ışık etkisi kontrol edilmelidir. Alg hücrelerinin hücre kompozisyonlarının dinamiği değişime uğrayarak, fotosentez ve hücre gelişimi ile biyokimyasal ve fizyolojik özelliği artmaktadır. Işık yoğunluğunun azalması halinde genel trend, hücrelerdeki klorofil-a ve ışığı tutan pigmentlerin (klorofil-b, klorofil-c, fitobiliproteinler ve birincil karotenoidler) artmasıdır. Diğer yandan yüksek ışık yoğunluğunda klorofil-a ve diğer pigmentler fotosentezin azalmasını gerçekleştirirken ikincil karotenoidler artarak (zeaksantin,  $\beta$ -karoten, astaksantin) fotokoruyucu ajanlar olarak görev yapmaktadırlar. Karotenoidlerin birikmesi türlerin yapısına göre değişmektedir. Örneğin; plastidlerde bulunan plastoglobüller veya sitoplazmik lipidler fotosentetik canlıların yüksek ışıktan korunmasında rol oynamaktadır. Stres koşullarında, karbon ve azotun hücreye akışının azalmasıyla karotenoidler birikir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Işık, mikroalg fotosistemlerinin antenleri ile yakalanmaktadır. Antenler fotosentezin gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Bunlar, fotonları tutarak enerji reaksiyon merkezlerine göndermektedirler. Antenlerin yapısında pigmentler ve proteinler görev almaktadır. Hücreler farklı ışık yoğunluklarına adapte olabilmek için fotosistem sayılarında veya anten boyutlarında değişim göstermektedirler (Fox, 1996; Vonshak ve Lu, 1999; Vonshak ve Lu, 2002).

Işık kaynağı doğal ya da yapay olabilir. Laboratuvar ortamında suni aydınlatma için floresan lambaları kullanılır. Farklı tipteki floresan lambalarının verdiği ışık şiddeti de farklı olmaktadır. Kullanılan ışık kaynağının ortamı ısıtmasından kaçınılmalıdır. Bu sebeple, ışık kaynağı olarak floresan lambalarının kullanılması daha uygundur (Sukatara, 2002) ve bu araştırmada da aydınlatma için floresans ışık kullanılmıştır.



### **1.2.3.Sıcaklık**

Sıcaklık, doğrudan kinetik olarak biyokimyasal reaksiyonların hızını ve algin biyokimyasal kompozisyonunu etkilediği için önemli bir çevresel faktördür. Mikroalgler farklı sıcaklık aralıklarında yaşayabilirler. Doğada bulunan alglerden bazıları yüksek sıcaklıkta yaşayabilirken bazıları bu sıcaklıkta canlılığını sürdürememektedir. Bu nedenle üretimi yapılacak türün optimum yaşama sıcaklığına dikkat edilmelidir. Genel olarak mikroalg üretimlerinde 16-27°C arasındaki sıcaklıklar tercih edilmektedir. Zira 16°C'den düşük sıcaklıklar üremeyi yavaşlatırken, 35°C'den yüksek sıcaklıklar genellikle öldürücü etki göstermektedir (Sukatar, 2002).

Yapılan araştırmalar, sıcaklığın membran lipid içeriğine etki ettiğini gösterir niteliktedir. Sıcaklığın azalmasıyla gelişim optimum seviyenin altına düşmekte ve membran sisteminde bulunan doymamış lipidlerin derecesi artmaktadır. Hücrelerin membranlarının stabilitesi ve akışkanlığı artmakta, tilakoid membranlar azalan sıcaklık etkisinde fotosentetik yapılarını korumak için fotoinhibisyonu gerçekleştirmektedir (Richmond, 2004). Bunun yanında sıcaklık artışları buharlaşmayı arttırarak üretimde hacim kaybına neden olurken kültür dengesini olumsuz yönde etkilemektedir (Vonshak ve Torzillo, 2003). Mikroalgler metabolizmalarını ve fizyolojik aktivitelerini doğrudan etkileyen sıcaklık değişimlerine hemen tepki vermektedirler. Sıcaklık arttığında solunum hızı artmakta, artan solunum biyokütle kayıplarını arttırmaktadır (Cohen, 1999).

### **1.3. Literatür Özeti**

Mikroalgler biyoyakıt üretimi için yüksek yapılı bitkilerden daha yüksek fotosentetik verimle ışık enerjisi ve karbondioksiti kullanabilen tek hücreli fotosentetik organizmalardır (Benemann, 1997; Miao ve Wu, 2006). Biyoyakıt üretiminin yanında mikroalgler, besin kaynağı, besin katkı maddesi, atık su arıtımı, ağır metal giderimi ve CO<sub>2</sub> emisyonuna yönelik çok sayıda çalışmalara konu olmuştur

(Spolaore vd., 2006 ; Chisti, 2007; Chisti, 2008; Stephens vd., 2010; Christenson ve Sims,2011). Mikroalglerden katma değeri yüksek ürünler açısından özellikle yağ asitleri ( $\gamma$ -linolenik, araşidonik, eikosapentaenoik, dokosaheksaenoik asitler, vb.) (Cardozo vd., 2007; Valencia vd., 2007) pigmentler (karotenoidler, fikobilinler), biyokimyasal sabit izotoplar (Borowitzka, 1991; Furuki vd., 2003; Olaizola, 2003; Chisti, 2007), biyotin (Baker vd., 1981), vitamin C (Survase vd., 2006) ve E (Running vd.,2002) gibi vitaminler bakımından zengin türler içerdiğini ve dışarıdan yapılan uygulamalarla bu biyomoleküllerim içeriğinin artırılabilindiğini, ayrıca mikroalglerden elde edilen bazı metabolitlerin de antikolesterolemik, antitümoral, bağışıklık sistemini düzenleyen, antibakteriyel ve antimikotik gibi bazı farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirtilmiştir (Bremus vd., 2006).

Mikroalgler, lipidleri büyük miktarlarda depo edebilen ve bunları doğrudan üretebilme yeteneğine sahip olan az sayıdaki fotosentetik mikroorganizmalar arasında yer alır (Neenan vd., 1986). Mikroalglerden elde edilen lipidler, enerji işletmesi için buhar kazanında veya dizel motorda basit bir yanmayı içeren farklı uygulamalarda kullanılabilirler. Yine de bu yağın kullanımındaki en iyi olasılık kesinlikle biyoyakıt olarak, özellikle de “biyodizel” olarak lipidlerin transformasyonudur (Chisti, 2007). Diğer taraftan mikroalg biyokütlesi kuru ağırlık bazında yaklaşık olarak %50 karbon içerir (Sánchez vd., 2003). Hücre içindeki mevcut tüm karbon genellikle karbondioksitten orijinlenir. 100 tonluk mikroalg biyokütlesi üretimi için, atmosferden 180 ton civarında CO<sub>2</sub> fikse edilmesi ve fotosentez için doğal veya yapay ışık kullanılması gereklidir. Dolayısı ile biyodizel üretimi için mikroalgler kullanıldığında atmosferden sağlanabilecek olan CO<sub>2</sub> emisyon potansiyeli de göz ardı edilmemelidir. Nitekim biyodizel üretimi bir yana mikroalglerin endüstriyel üretiminin yoğun olduğu bölgelerde yetiştirilmesi sera gazı emisyon kontrolü amacına da hizmet edebileceği rapor edilmiştir (Sawayama,1996; Yun vd.,1997).

Mikroalglerin yağ içeriği kuru ağırlığın %1 ile %40 arasında değişmektedir ve hatta belirli koşullar sağlandığında bu oran %80'lere ulaşmaktadır. Algal yağlar, karbon sayıları 12 ile 22 arasında değişen yağ asitlerinin gliserol, şekerler ve bazlar ile birleşimi şeklindedir. Mikroalgler tarafından üretilen lipidler, depo lipidler (non-

polar lipidler) ve yapısal lipidler (polar lipidler) olmak üzere iki kategoride gruplandırılabilir. Depo lipidleri çoğunlukla doymuş yağ asitleri ve bazı doymamış yağ asitlerinden oluşan Triaçilgliserol (TAG) formundadır ki bu lipidler transesterifikasyon ile biyodizel ve gliserol eldesinde kullanılabilirler. Yapısal lipidler tipik olarak çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindirler ve hayvansal organizmalar için önemli bir besin kaynağıdır. Polar lipidlerden fosfolipidler ve steroller, hücre ve organeller için seçici ve geçirgen zar olarak rol oynayan hücre membranlarının önemli yapısal parçalarıdır. Dolayısıyla bu lipidler spesifik membran fonksiyonunun sürdürülmesinde hayati öneme sahiptirler. Yapısal fonksiyona ek olarak, bazı polar lipidler hücre sinyal yollarında (inositol lipidler, sifingolipidler, oksidatif ürünler gibi) anahtar ara ürünler (veya ara ürünlerin başlatıcısı) olarak rol alabilirler ve çevresel değişikliklere cevapta da rol oynarlar (Sharma vd., 2012). Özellikle filamentöz siyanobakteriler genelde çoklu doymamış yağ asitlerini içermeye eğilimi gösterirler. Ökaryotik algler ağırlıklı olarak doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri içerirler (Sharma vd.,2012).

Non-polar lipidlerden TAG'ler metabolik enerji sağlamak için kolayca katabolize olabilen depo ürünleridirler (Gurr vd., 2002). Genelde TAG'ler çoğunlukla ışıktan sentezlenirler, sitozolik lipid cisimlerinde depo edilirler ve sonradan karanlıkta polar lipid sentezi için tekrar kullanılırlar (Thompson,1996). Mikroalgal TAG'ler genellikle her iki şekilde doymuş ve doymamış tekli yağ asitleri ile karakterize edilirler. Bununla birlikte bazı yağ zengini türler, uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerini de (PUFA) TAG formunda yüksek miktarlarda depolayabilmektedirler. Yeşil bir mikroalg olan *Parietochloris incisa* ile yapılan bir çalışmada, azot açlığında yüksek miktarda TAG biriktiren bu türün ortama azot kaynağı tekrar ilave edildiğinde bu sefer kloroplastik lipid biriktirdiği ve böylece sitoplazmik TAG'lerin enerji depo maddeleri olmanın dışında, başka bazı metabolik rollerinin de olduğu gösterilmiştir (Bigogno vd., 2002; Khozin-Goldberg ve Cohen,2006). Bu çalışmalar PUFA içeriği yüksek olan TAG'lerin metabolik olarak aktif oldukları, bazı spesifik yağ asitlerinin üretimi için rezervuar olarak kullanılabilirliklerini göstermiştir.

Optimum büyüme koşulları altında, algler kuru hücre ağırlıklarının %5-20 'sini oluşturan gliserol bazlı membran lipidlerinin esterifikasyonu için çoğunlukla yağ

asitlerini sentezlerler. Yağ asitleri orta zincir (C10-C14), uzun zincir (C16-18) ve çok uzun zincir ( $\leq$ C20) türleri ve yağ asiti ara ürünleri içerirler. Büyük membran lipidleri olan glikozil gliseritler kloroplastta bolca bulunurlar, ilaveten fosfoglisericitlerin önemli miktarları başlıca plazma membranları ve çoğu endoplazmik membran sistemlerinde bulunurlar (Pohl ve Zurheide, 1979a, 1979b; Guckert ve Cooksey, 1990; Harwood, 1998; Wada ve Murata, 1998).

Büyüme için olumsuz stres şartları geliştiğinde ise çoğu algler başlıca triaçilgliserol (TAG) formunda nötral lipidlerin (%20-50 DCW) oluşumu ve birikimine doğru kendi lipid biyosentez yollarını değiştirirler (Thompson 1996; Guschina ve Harwood 2006). TAG'ler sentez edildikten sonra, yoğun olarak algal hücrenin sitoplazmasında paketlenmiş yağ damlacıkları olarak bırakılır. Lipid damlacıklarının sitoplazmada birikiminin yanında *Dunaliella bardawi* gibi belirli bir yeşil algde kloroplastın inter tilakoit boşluğunda da bulunduğu bildirilmiştir (Ben-Amotz vd., 1989). Bu da TAG'lerin enerji kaynağı olmalarının yanında başka metabolik rollerinin de olduğunu gösterir nitelikte olmuştur.

Yağ içeriği yüksek olan mikroalglerin bölünme hızı düşük olduğundan bu mikroalglerin direkt olarak üretilmeye çalışılmasının elde edilebilecek biyoyakıt hammaddesi miktarı az olacağından ekonomik değerinin olmayacağı aşikârdır. Çoğu mikroalg türleri, doymuş ve doymamış yağ asitlerini doğal olarak yüksek besinsel değere sahip ideal büyüme koşulları altında üretir fakat bu türler ergonomik biyoyakıt üretimi için ideal değildir. Oysa stres koşulları altında çoğu mikroalgin sitoplazmik lipid damlacıkları biriktirdiği göze alındığında, örneğin biyodizel hammaddesi üretimi amacı ile kullanılacak olan bir mikroalgin lipid ekstraksiyonundan önce uygun ve fazla bir maliyeti olmayan bir stres faktörüne maruz bırakılması suretiyle biyoyakıt üretimini ekonomik değeri olan bir düzeye taşıyacağı düşünülebilir. Stres şartlarına maruz bırakılan çoğu türde nötral lipidler TAG şeklinde sentezlenirler ki bu da mikroalgleri biyodizel üretimi için uygun biyolojik materyaller yapar. Bu durum değerli derlemeler ve çalışmalarla gösterilmiştir (Miao ve Wu 2006; Hu vd., 2008). Azot ve fosfor açlığı, ışık stresi, pH, sıcaklık, ağır metal ve diğer kimyasalların uygulanması ile mikroalglerde lipid

içeriğinin artırılmasına yönelik gerçekleştirilen besin stresi yöntemleri üzerine çok sayıda araştırmalar rapor edilmiştir (Sharma vd.,2012).

Mikroalgler, kuru hücre ağırlıklarının %70'ine kadar, sıvı yakıt üretimi için hammadde olarak kullanılabilen lipidi önemli miktarlarda üretebilirler (Metzger ve Largeau, 2005; Hu vd., 2008). Total lipidin önemli bir kısmı, çoğu kez triaçilgliserol (TAG) içeren nötral lipidlerdir (Tonon vd., 2002). TAG'ler yüksek ışık veya besin açlığı gibi çevresel streslere cevapta toplanan lipid cismi organelleri içinde sentez ve depo edilirler (Guschina ve Harwood, 2006; Hu vd., 2008). Mikroalglerde lipid üretimini artırmak için birkaç genetik uygulamada bulunulmuştur (Sheehan vd., 1998). Fakat bu girişimler başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Dunahay vd., 1995). Ancak basit bir şekilde, mikroalglerin kültür koşulları değiştirildiğinde (besinsel ve çevresel faktörler) yağ asitlerinin toplam miktarı, kompozisyonları ve kimyevi özelliklerinde önemli değişimler gözlenmektedir (Sharma vd.,2012).

Besin mevcudiyeti, mikroalglerin büyüme ve çoğalmasında en önemli etkidir. Çevresel şartlardan biri olan, besinler optimumdan az olduğu durumda hücre bölünmesi baskılanır. Diğer taraftan fotosentez için yeterli ışık ve CO<sub>2</sub> sağlanan bazı alg türlerinde yüksek yağ üretiminin yanında, nispeten yüksek bölünme hızına sahip oldukları da rapor edilmiştir ki yine de bu alg türlerinin dahi üretim için ekonomik olamayacağı rapor edilmiştir (Thompson,1996). Ancak algal büyüme (hücre büyümesiyle ölçülen) yavaşladığında ve yeni membran bileşimlerinin sentezine ihtiyaç olmadığında hücreler yağ asitlerini TAG halinde biriktirirler. Bu koşullar altında, TAG üretimi koruyucu bir mekanizma olarak aktif hale geçiyor olabilir. Normal büyüme koşulları altında, fotosentezle akseptör (alıcı) moleküller olarak üretilen ATP ve NADPH, içerdikleri bağ enerjilerini, enerji gerektiren metabolik olaylara aktararak ADP ve NADP<sup>+</sup> 'ye dönüşürler. Hücre büyümesi ve çoğalması besinsizlik yüzünden azaldığında, fotosentezin başlıca en son elektron akseptörü durumunda olan NADPH, içerdiği bağ enerjisini normalde karbohidrat sentez reaksiyonlarına aktarması gerekirken, bu metabolik yol yavaşladığından dolayı lipid biyosentez reaksiyonlarına aktarmak durumunda kalır. Zira NADPH, çok reaktif bir bileşik olup, hücrede bu haliyle depolanamaz. Oluştuktan hemen sonra içerdiği bağ enerjisini başka bir moleküle aktarması zorunludur. Öte yandan fotosentez esas

olarak ışığın varlığıyla kontrol edilen ve besin azlığı durumunda bile tamamen kapatılmayan bir metabolik olay olduğundan, NADPH sentezi besin azlığı durumunda dahi devam eder. Hücrede NADPH birikimi, potansiyel olarak hücre bileşenlerine zarar vererek hücre için tehlikeli bir duruma yol açabilir. Bu sebeple, hücre bundan kaçınabilmek için fotosentezle oluşan NADPH'ların bağ enerjisini yağ asit biyosentezinde kullanır. Bu yüzden büyümeyi sınırlayan koşullar, yağ asitlerinin üretiminde (üstelik TAG'ler olarak depo edilirler) ve NADP<sup>+</sup> oluşumunda artışa yol açar (Thompson,1996; Hu vd., 2008).

Besin açlığı uygulamaları, mikroalgal TAG üretiminde en fazla başvurulan yollardan birisidir ve çoğu türde de çalışılmıştır. Örneğin diatom *Stephanodiscus minutulus* silikon, nitrojen veya fosfor sınırlaması altında yetiştirildiğinde, TAG birikiminde bir artış ve polar lipidlerde bir azalma (total lipidlerin yüzdesi olarak) besinle sınırlanan kültürlerin çoğunda belirlenmiştir (Lynn vd., 2000). Yeşil alg *Chlamydomonas moewusii* 'de besin sınırlamasının PUFA C16:3, C16:4 ve C18:3 miktarlarında azalmaya, oysa C16:1 ve C18:1 yağ asitlerinin tüm seviyelerinde ise artışa yol açtığı rapor edilmiştir (Arisz vd., 2000).

Azot, alglerde lipid metabolizmasını etkileyen en kritik besin elementidir. Azot açlığı durumunda lipidlerin birikim gösterdiği, (özellikle TAG) birçok mikroalg türü ve soylarında belirlenmiştir (Hsieh ve Wu 2009;Yeh ve Chang 2011). Hu (2006), çok sayıda yeşil mikroalg, diatom ve siyanobakterilerde N açlığına cevapta lipid üretiminde önemli bir artış olduğunu bildirmiştir. Rodolfi vd. (2009), birkaç diyatome, yeşil alg, kırmızı alg, prymnesiophytes ve eustimatophytes'de besin açlığı (nitrojen, fosfor) durumunda lipid üretimi artışının mekanizmasını detaylı bir şekilde sunmuşlardır. Yine bu çalışmada azot açlığında büyüyen pek çok mikroalg kültüründe yağ içeriğinin arttığı, buna karşın *Dunaliella* sp. ve *Tetraselmis suecica* gibi bazı türlerde ise yağ içeriğinin azaldığı, buna karşın karbohidrat içeriğinin arttığı bildirilmiştir. Rodolfi vd. (2009), tarafından rapor edilen önemli bir diğer bulgu da, çok sayıda siyanobakterin azot kaynağı miktarındaki değişime rağmen, lipid miktarının önemli bir değişim göstermemiş olmasıdır. Richmond (2004), tarafından yapılan bir araştırmada, N konsantrasyonundaki artışın temel PUFA'ların (çoklu

doymamış yağ asitleri) oranını azalttığı, diğer taraftan P kıtlığının ise toplam yağ miktarını değiştirmeden bu temel PUFA'ların oranını arttırdığı rapor edilmiştir.

Hücre içinde lipidlerin miktarı ve kalitesi, büyüme koşullarındaki (sıcaklık, ışık yoğunluğu) veya besin ortam özelliklerindeki (nitrojen, fosfat, demir konsantrasyonu), değişikliklerin bir sonucu olarak değişebilir (Illman vd., 2000, Liu vd., 2008) . Kaynak sınırlaması altında yetişen algler, sınırlanan besine ve sınırlama derecesine bağlı olarak kendi biyokimyasal kompozisyonlarında önemli değişim gösterirler (Sharma vd.,2012). Azot ve fosfordan başka diğer besinsel açlıkların da yağ içeriğini artırdığı rapor edilmiştir. Örneğin diatomlarda, silisyum eksikliğinde yağ oranı artmaktadır. Diyatome *Cyclotella cryptica*'da silikon eksikliğinde yüksek düzeyde nötral lipidler (öncelikle TAG) ve doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin yüksek oranlarda üretildiği rapor edilmiştir (Miao ve Wu 2006). Bununla birlikte, *Phaeodactylum tricornutum* mikroalginde N konsantrasyonundaki azalma ile paralel olarak TAG düzeylerinde ve fosfolipid içeriğinde de artışlar olduğu rapor edilmiştir (Alonso vd., 2000). Nitrojen veya fosfor kısıtlamasına maruz kalan *Scenedesmus sp.* türünün lipid içeriğinin sırasıyla %30 ve %53 oranında arttığı rapor edilmiştir (Xin vd., 2010). Bir tatlı su yeşil algi *Chlorella vulgaris* 'in lipid miktarı önemli derecede düşük nitrojen içeren ortamda %40 civarında artış göstermiştir (Illman vd.,2000). Shifrin ve Chisholm (1981)'de azotla sınırlanmış yeşil alglerin her zaman daha yüksek lipid içeriklerine sahip olduklarını, fakat Diatomlar'da durumun böyle olmadığını rapor etmişlerdir.

Mikroalglerdeki nitrojen açlığı sadece yağ asit metabolizmasını etkilemez aynı zamanda pigment kompozisyonunu da etkiler. Nitrojenle doymuş ortamda yetiştirilen *Parietochloris incise* için karotenoid ve klorofil oranlarında önemli bir artış kaydedilmiştir (Solovchenko vd., 2008).

Mikroalg kültürlerinde azot sınırlamasının metabolitler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, hücre sayısı ve klorofil-a miktarlarında azalma saptanırken, yağ gibi organik bileşiklerin oranlarında artış olduğu kaydedilmiştir. Bununla birlikte kültürlerde karoten miktarının artmasına bağlı olarak renkte sararma gözlenmiştir (Shifrin ve Chisholm, 1981; Sukenik vd., 1989). Bir başka çalışmada

azot eksikliği sonucunda hücre içeriği, klorofil değerleri, klorofil yapısı ve lipid içeriği incelenmiş, ortamda % 3 oranında N elementi bulunduğu durumda *Chlorella* sp.'in 6. günde maksimum yağ asidi ürettiği belirlenmiştir (Richardson vd., 1969). Yine *Chlorella protothecoides* ile yapılan bir çalışmada, ototrofik ve heterotrofik büyüme koşulları denenmiştir. Heterotrofik hücrelerde yağ içeriği %55,2'ye ulaşırken, ototrofik hücrelerde bu oran %14,57'de kalmıştır (Miao ve Wu, 2006).

*Neochloris oleoabundans* ile yapılan bir çalışmada, standart Bold Basal Medium (BBM)'da toplam yağ içeriği kuru ağırlıkça %23 iken, azot açlığı uygulanmış kültürde yağ içeriğinin %37'ye çıktığı gözlenmiştir. *Neochloris oleoabundans* ile yapılan bir başka çalışmada ise mikroalg *Neochloris oleoabundans*'ın, özellikle triaçilgliseroller (TAG) ve lipidleri biriktirme yeteneğine bakılmıştır. Besin sınırlaması olmadan en yüksek biyomas üretim verimliliği  $16,5\text{g m}^{-2}\text{gün}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Lipid birikmesine neden olan azot açlığının etkileri araştırılmıştır. Farklı azot kaynakları olarak amonyak, nitrat, nitrit ve üre denenmiştir. Bu azot kaynaklarından nitratta büyüme hızı ve yağ içeriği üredikine göre daha fazla olurken, amonyakta büyüme ve yağ çok az olmuştur. *N. oleoabundans*'da kuru maddede toplam %23 lipid içeriği elde edilmiştir (Hsieh ve Wu, 2009; Pruvost, 2009). Conventi vd. (2009), ise iki farklı mikroalg türünde (*Nannochloropsis oculata* H. ve *Chlorella vulgaris*) sıcaklık ve nitrojen konsantrasyonundaki değişiklikler yapılması sonucu, bu türlerde lipid miktarını artırmanın mümkün olduğunu rapor etmişlerdir.

Wang vd. (2009), N açlığında *C. reinhardtii* mikroalginin yalnızca nötral lipid miktarının değil bununla birlikte karbohidrat miktarının da artırıldığını rapor etmişlerdir. Bu bulgular ayrı ayrı bir çok çalışmada da rapor edilmiştir (Shifrin vd., 1981; Ben-Amotz vd.,1982; Tornabene vd., 1983; Suen vd., 1987; Rossler, 1990; Katz vd., 1995; Thompson, 1996; Weers vd., 1997; Mc, Ginnis, 1997; Khozin vd., 2002; Rodolfi vd., 2009).

Yapılan bir diğer çalışmada ise 4 farklı mikroalg türüne (2 deniz türü ve 2 tatlı su türü) azot eksikliği uygulanmış, yapay aydınlatmalı alveolar panel sistemde dış ortamda kültüre alınmışlardır. *Nannochloropsis* sp., türünün dört gün sonra alveolar



panel sistemde uygulanan yüksek aydınlatma altında lipid oranının %60'a kadar yükseldiği rapor edilmiştir, üstelik büyüme parametrelerinin toplamda beklenenin altında düşüş gösterdiği rapor edilmiştir. Diğer taraftan yağ asidi içeriğinin ise azot ve fosfor eksikliğinde kuru ağırlığının %50'sini geçtiğini ancak büyümenin önemli oranda baskılandığı bildirilmiştir (Rodolfi vd., 2003).

*Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *Isochrysis galbana* ve *Pavlova lutheri*, *Nannochloris atomus*, *Tetraselmis* sp., ve *Gymnodinium* sp. türleri farklı miktarda besin sınırlamaları ile kültüre alınmış ve türlerin lipid ve yağ asitleri içeriğine bakılmıştır. *Isochrysis galbana* ve *Pavlova lutheri*'de lipid oranı kuru ağırlıkta %8.3-29.5 arasında değişim göstermiştir. *P. tricornutum*, *I. galbana*, *Chaetoceros* sp. ve *P.lutheri* fosfor sınırlaması ile lipid içeriğinde (TAG) artış gösterirken, *N. atomus* ve *Tetraselmis* sp. türlerinde lipid miktarı azalmıştır. Besleyici element sınırlamasının da çoğunlukla uzun zincirli doymamış yağ asitlerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Reitan vd., 1994). Aksine yeşil alg *Chlorella kessleri*'nin fosfor açlığında fosfatidilkolin (PC), fosfatidilgliserol (PG), digalaktosildiaçilgliserol (DGDG), monogalaktosildiaçilgliserol (MGDG) ve sülfoquinovosildiaçilgliserol (SQDG) olarak adlandırılan tüm tanımlanmış özgün lipidlerinde doymamış yağ asitleri içeriğinin yükseldiği gözlenmiştir (El-Sheek ve Rady, 1995).

Sato vd. (2000), tarafından yeşil alg *C. reinhardtii*'de sülfür ve fosfor eksikliği üzerinde yapılan bir çalışma sülfür eksikliğinin SQDG'nin azalmasına yol açtığını fakat diğer taraftan sülfür içeren lipidlerin fosfat içeren lipidlerin yerine kullanıldığını gösteren dengeleyici bir mekanizmayla PG'nin iki kat yükseldiğini, göstermiştir. *C. reinhardtii* sınırlı fosfor ortamında yetiştirildiğinde PG'de %40 oranında bir azalma ve ayrıyeten SQDG miktarında uyarılmış bir artış görülmüştür. Diğer çalışmalar, sülfür eksikliğinin yeşil algler *Chlorella* ve *C.reinhardtii*'de toplam lipid miktarının artmasına neden olduğunu göstermiştir (Matthew vd., 2009).

Literatür araştırmaları baz alınarak, tüm besin açlığı yaklaşımları arasında biyoyakıt üretimi için N açlığı uygulamasının hemen hemen tüm mikroalg türlerinde en geniş uygulanan yöntem olduğu bilinmektedir. Yetiştirme ortamından nitrojen kaynağının

çıkarılmasıyla mikroalglerde kontrollü nitrojen stresinin uygulanması nispeten kolaydır. Dahası çalışılan mikroalg türlerinin çoğu, nitrojen stresi altında TAG üretimini belirli bir seviyeye kadar artırır. Bununla birlikte hücre bölünme hızında ilk günden itibaren gözlenen keskin düşüşler N açlığında ekonomik açıdan değerlendirilince istenilen biyokütleyi sağlamadığı ile ilgili ayrıntılı bilgi (Widjaja vd.,2009) tarafından rapor edilmiştir.

Sıcaklığın, mikroalglerin yağ asidi bileşimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Morgan-Kiss vd., 2006; Guschina vd., 2006; Schuhmann vd., 2011). Çoğu mikroalg ve siyanobakterde sıcaklık arttıkça doymuş yağ asidi oranının, azaldığında ise da doymamış yağ asidi içeriğinin arttığı rapor edilmiştir (Sato ve Murata 1980; Renaud vd., 2002). Genellikle yağ asidi profilinde meydana gelen değişiklikler çoğu durumda membranların fiziksel özelliklerini değiştirir ve normal fonksiyonlar (örneğin geçirgenlik, fotosentez ve solunum süreçleri gibi) bozulmadan devam edebilir (Somerville, 1995). Sıcaklık değişimini izleyen membran lipidlerindeki en yaygın değişim doymamış yağ asitlerindeki değişimdir (Harwood ve Jones 1989). Geometrilere yüzünden, karbon karbon çift bağlı yağ asitleri doymuş yağ asitleri gibi yoğun olarak sarmalanamaz, bu yüzden doymamış yağ asidi içeren membranların akışkanlığı artar. Membran akışkanlığı daha düşük sıcaklıklarda azaldığı gibi, artan yağ asidi doymamışlığı değişen çevreye adaptasyonu sağlar.

*Dunaliella salina*'nın büyüme ortamında sıcaklık 30°C'den 12°C'ye düşürüldüğünde yağ asidi kompozisyonunda doymamış yağ asidi içeriğinin %20 oranında arttığı rapor edilmiştir. (Thompson,1996). Diğer taraftan ortam sıcaklığı 25°C'den 35°C'ye artırıldığında *Nannochloropsis salina*'nın hem büyüme hızı artmış ve hem de total lipid içeriğinde artışlar rapor edilmiştir (Boussiba vd., 1987).

Bazı yüksek bitkilerde düşük sıcaklığın etkileri üzerine yapılan çalışmalarda, doymamış yağ asit miktarının arttığı gösterilmiştir (Murata, 1983). Benzer sonuçlar doymamış yağ asit miktarının iki kat artış gösterdiği *Chlorella ellipsoidea*'da elde edilmiştir (Joh vd., 1993). Deniz mikroalgi *Pavlova lutheri*'de asidik lipid ve yağ asiti kompozisyonunda 25°C'dekine kıyasla 15°C'de yetiştirilen kültürlerde önemli değişiklikler rapor edilmiştir.15°C'de yetiştirilen kültürde EPA ve DHA'nın artan

nispi miktarıyla sonuçlanmıştır. (Tatsuzawa ve Takizawa,1995). Yetiştirme sıcaklığıyla yağ asidi kompozisyonundaki farklılıklar Fork vd., tarafından termofilik siyanobakter *Synechococcus lividus*'da çalışılmıştır. Büyüme sıcaklığı 55°C'den 38°C'ye düşürüldüğünde, doymamış yağ asitleri C18:1 ve C16:1 artarken doymuş yağ asidi C18:0 miktarı azalmıştır. Genelde hücreler daha düşük sıcaklıkta yetiştirildiğinde lipid sınıflarının tümünde daha çok akışkan lipidlerde bir artış olmuştur (Fork vd.,1979).

Siyanobakter *Spirulina platensis* ve ökaryotik mikroalgler *Chlorella vulgaris* ve *Botryococcus braunii*'de hücre içi yağ asitlerinin bileşimi ve ortamdaki serbest yağ asitlerinin (FFA) oluşumu üzerine ortam sıcaklığının etkisi çalışılmıştır. Her üç türde, değişen sıcaklık rejimine karşı hücre içi doymamış yağ asitlerinin azaldığı rapor edilmiştir. Sıcaklık artırıldığında doymamış yağ asitlerinin kompozisyonu ise değişmemiştir. Taksonomik statülerine bakılmadan yukarıda çalışılan türlerin çoğunda, hücre içi yağ asidi kompozisyonundaki benzer değişikliklerle sıcaklık rejimine cevapta çoğu doymamış yağ asitlerinin nispi miktarının azaldığı ve sıcaklık artışıyla doymuş yağ asitlerinin arttığı bildirilmiştir (Sushchik vd., 2003).

Koru ve Cirik (2003), yaptıkları çalışmada, laboratuvar koşullarında *Spirulina platensis*'in 2000 lux. ışık şiddetinde ve 28°C'den 45°C'ye kadar olan sıcaklıklarda metabolizmada meydana gelen değişiklikleri araştırmışlardır. Sıcaklık artırılarak filamentlerin morfolojisindeki, büyümesindeki, makromoleküler yapısındaki, yağ ve yağ asitleri içeriklerindeki değişimler araştırılmıştır. Su sıcaklığı 43°C olduğunda, protein içeriğinde %20 gibi önemli bir azalma, yağlarda %45 ve karbohidratta %32 artma gözlenmiştir. *S. platensis*'in yoğun üretiminde biyokimyasal özelliklerinin ve büyümenin 35°C sıcaklıkta en uygun olduğu saptanmıştır.

*Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp., *Rhodomonas* sp. ve *Cryptomonas* sp. türleri 5 farklı sıcaklık derecesinde (25, 27, 30, 33 ve 35 °C), % 0,25 tuzluluk, 8.3 pH ve 80 µmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> ışık yoğunluğunda, 12h:12h aydınlık-karanlık periyodu uygulanarak kültüre alınmış ve kimyasal kompozisyonu ile yağ asidi kompozisyonu incelenmiştir. 25°C'de *Chaetoceros* sp. %16,8 ile en yüksek lipid oranına sahipken, 27-30°C'lerde en yüksek lipid oranı %21,7 ile *Isochrysis* sp.'de bulunmuştur (Renaud vd., 2002).

*Isochrysis galbana*'nın 15° ve 30°C'de kültürü yapılmış ve bu iki sıcaklıkta oluşan yağ değerleri kıyaslanmıştır. Yüksek sıcaklıkta toplam yağ miktarının arttığı ve non-polar lipidlerde küçük bir azalma, glikozilgliserit oranında ise artış olduğu görülmüştür. Buna rağmen fosfolipid oranının değişmediği kaydedilmiştir. Düşük sıcaklıkta yaptıkları deneyde ise daha yüksek seviyelerde omega-3 yağ asidi (DHA) (dokosaheksaenoik asit) bulunmuş, buna karşılık doymuş yağ asitlerinde azalmalar kaydedilmiştir (Guschina vd., 2006).

Öte yandan çeşitli sıcaklıklarda yetiştirilen *Chlorella sorokiniana*'da lipid miktarında önemli bir değişiklik gözlenmediği rapor edilmiştir (Patterson,1970) *C. reinhardtii*'de asidik tilakoit lipidlerin, SQDG ve PG'nin miktarı üzerinde sıcaklık değişiminin etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Sato vd., 2000). Sıcaklık artış ve azalışından kaçınmak için, açık sistemlerle kıyaslandığında pahalı olan kapalı sistem fotobiyoreaktörlerinin çok daha uygun olduğu, ayrıca biyodizel üretim amaçlı yetiştirilen alglerin lipid profillerinin farklı sıcaklıklarda olduğu gibi farklı mevsimlerde ve farklı iklimsel şartlarda dadeğişim gösterdiği rapor edilmiştir. Sıcaklık istekleri dikkate alınarak, farklı alg soy veya türleri (örneğin yaz veya kış soyları) farklı mevsimlerde tercih edilerek kullanılabilir. Konuya diğer bir yaklaşım olarak, daha soğuk iklimlerde alg yetiştiriciliğini artırmak için fabrika baca gazlarını ve diğer ısı kaynaklarını kullanmak için girişimler de sürmektedir (Sharma vd., 2012).

Işık fotosentez için, ototrofik yaşamın devam edebilmesi veya ilerleyebilmesi dışında en önemli elementlerden biridir. Değişen ışık yoğunluklarında yetiştirilen mikroalglerin, bütün kimyasal bileşiminde, pigment miktarında ve fotosentetik aktivitesinde dikkate değer değişiklikler bildirilmiştir (Richardson vd., 1983). Dahası, farklı ışık yoğunluklarının ve dalga boylarının mikroalglerde lipid profilini değiştirerek lipid metabolizmasını değiştirdikleri bildirilmiştir (Harwood, 1998). Li vd. (2010), model mikroalg olarak *Chlamydomonas reinhardtii* ve birkaç önceden izole edilmiş nişastasız mutantları uygun (düşük ışık ve nitrojen bolluğu) ve stres (yüksek ışık ve nitrojen açlığı) koşullarında TAG üretme yeteneklerini test etmek için kullanmışlardır. Mutantlar arasında yüksek ışık altında ve nitrojen açlığında oluşan nötral lipidin total lipide oranı ve nötral lipid miktarında etkileyici artışlar

gözlemlemiştir. Düşük ışık yoğunluğunun polar lipidlerin özellikle kloroplast ile ilişkili membran polar lipidlerin oluşumunu uyardığı, oysa yüksek ışık yoğunluğunun ise nötral depo lipidlerden özellikle TAG'lerin miktarında eşzamanlı bir artışla birlikte toplam polar lipid miktarını düşürdüğü yönünde çok sayıda araştırma rapor edilmiştir (Orcutt ve Patterson, 1974; Napolitano, 1994; Brown vd., 1996; Khotimchenko ve Yakovleva, 2005). Yüksek ışığa maruz bırakılan *Chladophora* sp.,'de toplam fosfolipid miktarının azaldığı, (TAG olarak adlandırılan) non-polar lipid düzeyinin de arttığı bildirilmiştir (Napolitano, 1994). Kırmızı mikroalg *Tichocarpus crinitus*'da düşük ışık yoğunluğuna maruz kalma bazı hücre membran lipidlerinin özellikle SQDG, PG ve PC'nin düzeylerinin artışıyla sonuçlandığı, oysa daha yüksek ışık yoğunluklarının TAG düzeyini artırdığı bildirilmiştir. (Khotimchenko ve Yakovleva, 2005). Yüksek ışık koşulları altında TAG üretimi hücre için koruyucu bir mekanizma olarak hizmet edebilir. Fotosentez mekanizması tarafından ihtiyaç duyulan elektron alıcıları yüksek ışık koşulları altında yetersiz kalabilir. Böylece artan yağ asit sentezi TAG olarak depolanır, ki böylece TAG potansiyel olarak hücreye elektron alıcı havuzunu yeniden oluşturması için kaynak molekül rolünü üstlenebilir (Sharma vd., 2012).

Işık yoğunluğu mikroalglerde sadece yağ asit bileşimini etkilemez, bundan başka pigment bileşimini de etkiler. Yeşil mikroalg *Parietochloris incise*'de düşük ışık altında, kültürlerin yavaş büyüme ve nispeten düşük bir karotenoit/klorofil oranı gösterdiği bildirilmiştir. Daha yüksek ışık şiddetinde bu algin daha yüksek bir büyüme oranı ve karotenoit miktarında özellikle beta karoten ve lutein içeriğinde önemli bir artış gösterdiği rapor edilmiştir (Solovchenko vd., 2008).

Çeşitli mikroalgler ile yapılan çalışmalar neticesinde hücrelerin yağ ve toplam doymamış yağ asidi içeriklerinin ışık şiddeti ile ters orantılı oldukları bulunmuştur. Mesela *Nannochloropsis* ile yapılmış bir diğer çalışmada ışığı sınırlandırılmış örneklerde daha yüksek oranlarda EPA (eikosapentaenoik asit) tespit edilmiştir. Bununla birlikte bazı farklı örnekler de mevcuttur. Belirli mikroalg türlerinde yüksek ışık şiddeti doymamış yağ asitlerini arttırmak için kullanılmaktadır (Richmond, 2004).

Mikroalglerde lipid içeriğinin artırılmasına yönelik şimdiye kadar uygulanmış olan makrobesin element stresi, sıcaklık ve ışık stresi uygulamalarının yanında ultraviyole (UV) ışın stresi, tuz stresi, pH ve ağır metal stresi uygulamaları ile genetik mühendisliği yaklaşımlarına da başvurulmuştur (Sharma vd., 2012).

Mikroalglerin lipid içerikleri ve lipid profillerindeki değişim üzerine UV radyasyonunun etkisi ile ilgili çalışmalar rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalar UV radyasyonunun geniş ölçekli kültürasyon sistemlerinde mikroalgal lipid içeriğinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Forjan vd. (2011), 7 gün boyunca UV-A radyasyonuna maruz kalan *Nannochloropsis* sp.,'de yağ asitlerinin üretiminde önemli artışlar olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak UV-A ışınları kısa dalga boylu ışınlar olduğundan bu ışınların sabit kullanımı endüstriyel ölçekli kültürasyon için uygulanamaz. Diğer taraftan daha güçlü UV radyasyonu mikroalglerin DNA'larına zarar vermenin yanında besin alınımını ve karbon asimilasyon mekanizmasını da inhibe eder ve bu da mikroalgal lipid üretimi ve bileşimi üzerine etkili olabilir. Ancak UV uygulamasının sebep olduğu önemli genetik hasar dikkate alınınca lipid üretimine sağladığı katkı ekonomik olmaktan uzaktır.

Srinivas ve Ochs (2012), tarafından yürütülen bir çalışmada UV-A uygulamalarının *Nannochloropsis oculata*'da PUFA konsantrasyonunu önemli derecede artırdığı gözlenmiştir. Diğer taraftan Liang vd., (2006), *P. tricornutum* ve *Chaetoceros muelleri* diatomlarında UV-A uygulamasında tekli doymamış yağ asidi içeriği azalırken EPA ve PUFA konsantrasyonlarında artış rapor etmişlerdir. Yine aynı çalışmada UV-A ve UV-B ışınları kombine bir şekilde uygulandığında *C. muelleri* diatomunda EPA ve PUFA yüzdeleri azalırken tekli doymamış yağ asidi konsantrasyonunda artış rapor edilmiştir.

*Dunaliella* türleri yüksek tuz konsantrasyonunu tolere edebilen mikroalglerin en iyi örneklerini içinde bulundurur. *Dunaliella* türünün pratik olarak fazla çoğalma yeteneği, tuzluluğa doyum oranı, onları mikroalglerde tuzluluk etkilerini çalışmak için sık kullanılan organizmalardan biri yapar. *Dunaliella tertiolecta*'nın büyüme ortamında başlangıç NaCl konsantrasyonunun 0.5M dan 2M'a artırılması ile hücre içi lipid miktarında ve TAG içeriğinde önemli bir artışa sebep olduğu rapor edilmiştir

(Takagi ve Yoshida, 2006). Azachi vd., tarafından yürütülen bir çalışmada *D. salina*'nın hücreleri 0.5'dan 3.5M NaCl'e transfer edildiklerinde doymamış yağ asitlerinin doymuş yağ asitlerine oranında önemli derecede artışların ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Azachi vd., 2002). Yine *Dunaliella* sp.'in büyüme ortamında tuz konsantrasyonu 0.4M'dan 4M'a yükseltildiğinde bu mikroalgin içerdiği toplam doymuş yağ ve tekli doymamış yağ asitlerinin oranında artış ve çoklu doymamış yağ asidi oranında da azalma olduğu rapor edilmiştir (Xu ve Beardall, 1997).

Diyatome *Nitzschia laevis*, yüksek miktarlarda EPA üretmesiyle bilinir. Bu hücreler belli bir dereceye kadar yüksek tuz konsantrasyonuna maruz kaldıklarında, hem nötral hem de polar lipid içeriklerinin arttığı rapor edilmiş, ancak ortam tuzluluğu 30g/L'ye çıkarıldığında yağ asidi içeriğinde azalma olduğu belirlenmiştir (Chen vd., 2008).

Ortamdaki pH değişimlerinin de mikroalglerde lipid bileşimini değiştirdiği bildirilmiştir. Örneğin, alkali pH stresi *Chlorella* sp.'de TAG içeriğinde artışa ve membran lipidlerinde azalmaya sebep olmuş, bununla birlikte alg büyüme hızı önemli oranda baskılanmıştır (Guckert ve Cooksey,1990). Volkanik ve asidik özellikte bir gölden izole edilen *Chlamydomonas* sp.'nin lipid ve yağ asidi bileşimine pH'ın etkileri çalışılmış ve *Chlamydomonas reinhardtii* ile kıyaslanmıştır. Bu çalışmada *Chlamydomonas* sp.'de ortam asitliği arttığında, nötral lipidlerden TAG'ın nispi konsantrasyonlarında önemli artışlar rapor edilmiştir (Tatsuzawa vd., 1996).

Kadmiyum, demir, bakır ve çinko gibi ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarda bazı mikroalglerde lipid miktarını artırdığı rapor edilmiştir (Einicker-Lamas vd., 2002). Ototrofik, heterotrofik (karanlıkta) ve mikсотrofik (organik karbon kaynağı ile ışıkta) kültürlerde yetiştirilen *Euglena gracilis*'de kadmiyumun yüksek konsantrasyonlarının hücre başına toplam lipid miktarında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Einicker-Lamas vd., 2002). Diğer taraftan *Chlorella vulgaris*'te büyüme ve lipid birikimi üzerine demirin etkisi, Liu vd. (2008), tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada ortam demir konsantrasyonu artırıldığında bu mikroalgin toplam lipid konsantrasyonunun önemli oranda arttığı rapor edilmiştir.

Genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak mikroalglerin yağ asidi içeriklerinin zenginleştirilmesine yönelik araştırmalar rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalar çoğunlukla yağ asidi metabolizmasında donör molekül olan Asetil CoA molekülünün daha çok miktarda Malonil CoA'ya dönüşümünü sağlamak için bu reaksiyonu katalizleyen Asetil CoA Karboksilaz enzim aktivitesinin artırılması yönündedir. Ancak yapılan çalışmaların çoğunda bu enzimi kodlayan gen ifadesinin artırılması ile mikroalglerde nötral lipid birikiminde önemli bir artış olmadığı rapor edilmiştir (Dunahay vd.,1995).

Farklı mikroalg türlerinin farklı streslere farklı yağ asitlerini üreterek veya yağ asitlerinin bileşimini değiştirerek reaksiyon verdikleri açıktır. Mikroalglerde lipid içeriğinin artırılmasına yönelik yapılan uygulamalar çevresel koşullara ve kültürasyon sistemlerine bağlı olarak değişik sonuçlar doğurmaktadır. Elbette ticari üretimi yapılacak olan türün lipid miktarı ve içeriğinde meydana gelen değişimler üzerine çevresel şartların etkileri öncelikle laboratuvar koşulları altında değerlendirilmelidir. Literatürde bildirilen bilimsel yayınlar incelendiğinde mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasına yönelik en yaygın uygulamanın mikroalgleri azot açlığına maruz bırakmak olup, bu yöntem çok sayıda mikroalg türüne uygulanmış ve lipid içeriğinin arttığı yönünde raporlar bildirilmiştir. Bu araştırmada da azot açlığının *C. reinhardtii*'de nötral lipid içeriğini önemli oranda artırdığı gözlemlenmiş, bu grup mikroalgler de diğer uygulamalar için bir başka kıyaslamalı kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Diğer taraftan yukarıda belirtildiği gibi sıcaklık, pH, tuzluluk ve ağır metal konsantrasyonlarındaki değişimin de mikroalglerde lipid içeriğini artırdığı yönünde bulgular rapor edilmiştir. Ancak bu uygulamaların geniş ölçekli kültürasyon sistemlerinde ek maliyet getireceğinden, pratiğe aktarılabilmesi zor gözükmektedir. Ancak getireceği ek maliyet bir yana hem mikroalglerdeki lipid içeriğini artıracak ve hem de birim zamanda elde edilebilecek olan biyokütlenin maliyetini düşüreceği gibi bir avantaj göz önüne alındığında, uygulaması aşırı maliyet gerektirmeyecek olan sıcaklık, ışık ve besin manipülasyonu uygulamalarının doğru kombine edilmesi halinde, kapalı sistem reaktörlerde ekonomik ölçekte algal biyodizel üretimin kapısı aralanabilir. Bu doktora çalışmasında bu durum araştırılmış, çarpıcı bulgular rapor edilmiştir.



#### 1.4. Çalışmanın Amacı

Yeryüzünün ekolojik açıdan etkili ilk biyolojik CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> dönüştürücüleri olduğu düşünülen mikroalgler önemli metabolik çıktılar sunan eşsiz mikroorganizmalardır. Son zamanlarda mikroalglerin atık su arıtımı, protein bakımından zengin besin ve besin katkı maddelerinin üretimi, katma değeri yüksek maddelerin (pigmentler ve vitaminler gibi) eldesi, hidrojen ve biyoyakıt üretimi gibi değişik alanlarda kullanıldığı görülmektedir. Bu doktora çalışmasında, mikroalgler üzerinde yapılan araştırmalarda model organizma olarak tercih edilen *Chlamydomonas reinhardtii* türünün yabancı tip CC-124 soyu kullanılarak, kültür ortamındaki element konsantrasyonları, sıcaklık ve ışık parametrelerinin değişik kombinasyonlarda uygulanması suretiyle söz konusu mikroalglerden maksimum ve en kaliteli biyolojik yakıt elde etmek için uygulanması gereken en uygun stres şartlarının tanımlanabilmesi ve uygulanan streslerin alg metabolizmasında yol açtığı bazı fizyolojik değişimlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla; büyüme ortamlarında <sup>14</sup>N, <sup>32</sup>S, <sup>39</sup>K, <sup>31</sup>P, <sup>24</sup>Mg, <sup>40</sup>Ca, <sup>66</sup>Zn, ve <sup>56</sup>Fe elementlerinin hiç bulunmadığı veya 5x konsantrasyonda buldukları ortamlarda 10 gün boyunca inkübasyona bırakılan mikroalgler, büyümenin tüm evrelerini yansıtan süreleri olarak belirlenen inkübasyonun 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerde örneklenmiş ve örneklenen mikroalglerin çoğalmaları, hücresel hacimleri, toplam nötral lipid ve toplam nişasta içerikleri belirlenmiştir.

Bunların yanında ortam element manipülasyonlarına cevapta mikroalglerin lipid içeriklerindeki değişim konfokal lazer tarayıcı mikroskop kullanılarak görüntülenmiş, yine Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizleri ile mikroalglerin içerdikleri triaçilgliserol (TAG) ve karbohidrat miktarlarında meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Bu çalışmalarla elde edilen bulgular ile FTIR verileri birlikte değerlendirildiğinde büyüme ortamında <sup>14</sup>N, <sup>32</sup>S, <sup>31</sup>P ve <sup>24</sup>Mg elementlerinin hiç bulunmadığı veya <sup>14</sup>N ve <sup>66</sup>Zn elementlerinin 5x konsantrasyonda buldukları ortamların mikroalglerin biyodizel hammaddesi üretimini teşvik edici ortamlar oldukları sonucuna varılmıştır. Böylece bundan sonraki ölçümler kontrol de dikkate alındığında 7 grup ile gerçekleştirilmiştir.

Bir sonraki adım olarak içerisinde  $^{14}\text{N}$ ,  $^{32}\text{S}$ ,  $^{31}\text{P}$  ve  $^{24}\text{Mg}$  elementlerinin hiç bulunmadığı ve  $^{14}\text{N}$  ve  $^{66}\text{Zn}$  elementlerinin 5x konsantrasyonlarda buldukları ortamlarda inkübasyona bırakılarak inkübasyonun 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerinde örneklenen mikroalglerin yapılarında buldukları ve büyüme ortamlarında bulunan makro ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{40}\text{Ca}$ ,  $^{39}\text{K}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) ve mikroelement ( $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{95}\text{Mo}$ ) konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler ICP-MS analizi ve CHNSO element analizörü kullanılarak belirlenmiştir.

Mikroalglerin ürettikleri lipid miktarı üzerine sıcaklık ve ışık şiddetinin etkilerini belirlemek amacı ile seçilen gruplara ait örnekler kontrol sıcaklık ve ışık değerlerinin yanında ortam sıcaklık ve ışık yoğunluğunun düşük ve yüksek olduğu durumlarda inkübasyona bırakılmış ve mikroalglerin içerdikleri nötral lipid içeriğindeki değişim ile birlikte büyümelerinde meydana gelen değişimler ölçülmüştür.

Takip eden çalışmalarda ise yapılan uygulamalarda lipid içeriğindeki artışın fizyolojik etkilerini belirlemek amacı ile belirlenen zamanlarda örneklenen mikroalglerdeki

- Toplam lipid miktarı ve nispi kuru ağırlıklarında meydana gelen değişimler
- Yağ asidi profillerinde meydana gelen değişimler
- Klorofil ve karotenoid konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler
- Hidrojen Peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) konsantrasyonunda meydana gelen değişimler
- Toplam çözümlü protein içeriğinde meydana gelen değişimler
- Antioksidan enzimlerden Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Askorbat Peroksidaz (AP) ve Glutasyon Redüktaz (GR) enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler
- Toplam antioksidan kapasiteleri
- Lipid Peroksidasyonu değerlerinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir.

Son olarak farklı ortamlarda ( $^{14}\text{N}$ ,  $^{32}\text{S}$ ,  $^{31}\text{P}$  ve  $^{24}\text{Mg}$  elementlerinin hiç olmadığı,  $^{14}\text{N}$  ve  $^{66}\text{Zn}$  elementlerinin 5x konsantrasyonda buldukları) inkübe edilen mikroalglerin sitoplazmalarında depoladıkları serbest lipidlerin görüntülenmesi

amacı ile TEM görüntüleri çekilmiş olup, böylece mikroalglerin nötral lipid içeriklerinin artırılmasına yönelik yapılan uygulamalar sonrasında mikroalglerin ürettikleri nötral lipid içerikleri, lipid kalitesi ve muhtemel oksidatif stresin derecesi belirlenmiş, tüm bu veriler bir arada değerlendirilerek mikroalglerden lipid eldesi amaçlı uygulanabilecek en uygun stres şartları belirlenmeye çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çoklu parametre okuyucu	: SpectraMax M5, USA.
Gaz Kromatografi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS)	: Agilent 5975B, USA
Liyofilizatör	: Christ Alpha 1-2 LD plus, Australia
Fourier Transform Infrared Spektroskopu (FT-IR)	: Nicolet 6700 – Thermo Scientific / USA
Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry	: Thermo X Series II, USA
CHNS/O Element Analizör	: Thermo Scientific Flash 2000, USA
Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	: FEI, Tecnai Biotwin (CTEM), Japonya
Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop	: Carl Zeiss, LSM 510 Almanya
Floresans Mikroskop	: Carl Zeiss, Almanya
Işık Mikroskobu	: Carl Zeiss, Almanya
Thermomixer	: Thermo, USA
Kuru Blok Isıtıcı	: Cole-Parmer, UK
Santrifüj	: VWR Himac CT6E, USA
Ultra mini santrifüj	: VWR Galaxy Ministar, USA
Soğutmalı santrifüj	: VWR Himac CT15RE, USA

Spektrofotometre	:Thermo scientific Genesys 10 Bio, USA
pH metre	: VWR, USA
Hassas terazi	: Precisa XB220A, İsviçre
Otomatik pipetler	: Eppendorf, USA
İklim Dolabı	: Sanyo MLR- 351H, Japonya
Orbital Çalkalayıcı	: VWR, USA
Soğutmalı çalkalamalı inkübatör	: Sartorius, Certomat BS-T, Almanya
Isıtıcıli manyetik karıştırıcı	: VWR, USA
Derin Dondurucu (-20 °C)	: Liebherr profiline, Almanya
Derin Dondurucu (-85 °C)	: Thermo scientific, USA
Kar makinesi	: ZBE 250 Ziegra, UK
Otoklav	: Tuttnauer 3870 ELV, USA
Kül fırını	: Nanoplas, DSB 6000, USA
Kimyasal kabin	:Köttermann, Almanya
Bulaşık makinası	: Miele Professional G7883, Almanya
Çift distile su cihazı	: Sartorius Arium 611VF, Almanya
Fırın	:Binder, Almanya
VWR Tube Rotator	: VWR, USA
Vortex	:VWR, USA
Nutating mixer	:VWR, USA
Orbital çalkalayıcı	:VWR
Steril kabin	: Telstar, PMV, USA

### 2.1.2.Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanış Biçimleri

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanışları aşağıda sunulmuştur. Çalışmalarımızda kullanılan kimyasal maddeler Sigma, Fluka, Merck ve Fischer firmalarından temin edilmiştir.

1. Tris Asetat Fosfat Besiyeri Çözeltisi (Farklı element manipülasyonu uygulamaları için bu besiyeri kullanılmış, uygun hesaplamalarla belli değişiklikler yapılmıştır): 2.42 g Tris-base tampon çözeltisi içerisinde hazırlanan çözeltideki son makroelement konsantrasyonları 7mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.4mM MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 0.34mM CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O, 0.61mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.39mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, şeklinde sağlanmış mikroelement konsantrasyonları ise 25µM MnCl<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O, 6µM ZnSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 0.183mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 6µM CoCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, 6µM CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O, 6µM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>4H<sub>2</sub>O, 17.9 µM FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O çözeltileri ilavesi ile tamamlanmıştır. Son olarak ortama 1ml/L asetik asit ilave edilmiş son pH değeri 7.1 olacak şekilde ayarlanmış ve otoklavlanmıştır.
2. Lügol çözeltisi 10 g potasyum iyodür 100 ml suda eritilir. 5 g iyot kristali çalkalama sırasında yavaşça eklenir.
3. Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one) (Invitrogen): 0,0025g Nile Red kimyasalı 10ml aseton içinde çözünerek hazırlanmıştır.
4. Safranin O çözeltisi: 4000 ml balon içerisine 2000 ml Etil Alkol konur.20 gr Safranin Tozu etil alkolün içerisine katılıp çözülünceye kadar çalkalanır. Safranin'in tamamı çözüldükten sonra, üzerine saf su ilave edilerek 4000 ml' ye tamamlanır.
5. Lizis tamponu (örneklerin toplam protein tayini ölçümü için kullanılmıştır):50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA ve PIM (Protease inhibitör mix)
6. Protein ölçüm solüsyonu: 1 kat %4 bakır sülfat / 50 kat Bicinchoninic asit solüsyonu (Sigma)
7. Total protein ekstraksiyon tamponu (örneklerin protein miktarlarını belirlemek ve CAT, SOD, GR enzim aktivitelerini belirlemek amaçlı protein ekstraksiyonu için kullanılmıştır): %2 (w/v) çözülebilir polivinylpyrrolidon

- ve 1 mM EDTA içeren 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu (pH 7.0). AP aktivitesinin belirlendiği ekstrakt için bu çözeltiye 5 mM askorbat ilave edilmiştir.
8. CAT reaksiyon karışımı (Katalaz enzim aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır): 19 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0)
  9. SOD reaksiyon karışımı (Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır): 13 mM methionin, 75  $\mu\text{M}$  NBT, 2  $\mu\text{M}$  riboflavin ve 0.1 mM EDTA içeren 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.8) tampon çözeltisi.
  10. GR reaksiyon karışımı (Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır): 0.5 mM GSSG ve 0.12 mM NADPH- $\text{Na}_4$  içeren 0.025 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.8) tampon çözeltisi.
  11. AP reaksiyon karışımı (Askorbat peroksidaz enzim aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır): 0.5mM askorbik asit ve 0.1 mM EDTA- $\text{Na}_2$  içeren 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tampon (pH 7.0) çözeltisi.
  12. Mikroalglerin oksijen radikal absorban kapasiteleri (antioksidan kapasiteleri) ölçümü için ekstraksiyon solüsyonu (%0,2' lik formik asit içinde hazırlanmış %80'lik aseton)
  13. Fluorescein solüsyonu (fosfat tamponu içinde fluorescein disodium tuzunun çözülmesiyle hazırlandı, son konsantrasyonu 60nM)
  14. Trolox'un kalibrasyon solüsyonları (0, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100uM) fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır.
  15. MDA ölçümü için kullanılan substrat çözeltisi: % 0.65 thiobarbituric acid (TBA), % 0,01 butylated hydroxitoluene içeren %20'lik trichloroacetic acid (TCA) içerisinde hazırlanmıştır.
  16. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) için örnek hazırlama ve görüntüleme sodyum fosfat tamponu (1M, pH=7.0) kullanılarak hazırlanmış olan ve içerisinde %1'lik paraformaldehid, %1'lik glutraldehid ilave edilmiştir, daha sonra üzerine %1 konsantrasyonda olacak şekilde osmium tetroxide ilave edilmiştir.
  17. FAMEs ekstraksiyon çözeltisi: Metanol içerisinde %2 oranında  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ilave edilerek hazırlanmıştır.

## 2.2. Yöntem

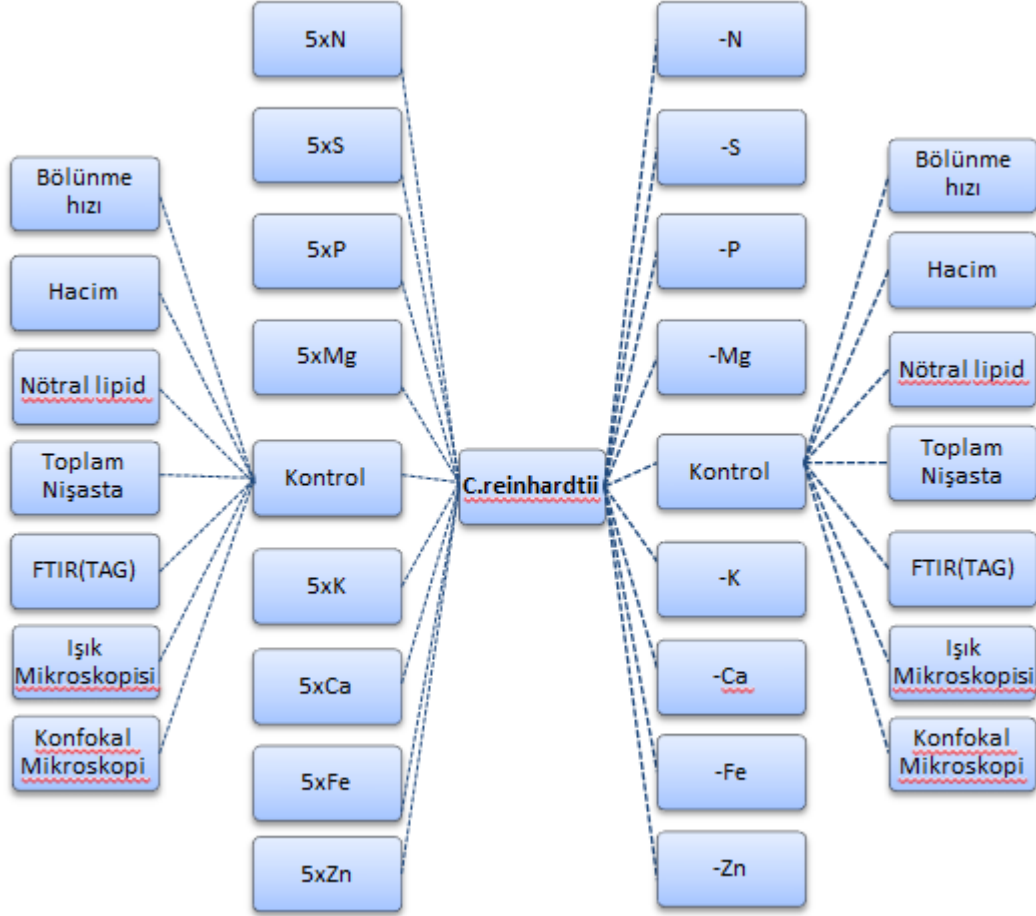
### 2.2.1. Deneysel Yaklaşım

Mikroalgler büyümelerini etkileyecek herhangi bir şekilde olumsuz çevresel şartlara maruz kaldıklarında genel olarak sitoplazmalarında lipid damlacıkları biriktirirler. Bunun sebebi, lipidlerin kolay geri dönüştürülebilir enerji formu olmalarındandır. Ortam şartları normale döndüğünde mikroalgler sitoplazmalarında depoladıkları lipidleri tekrar parçalayarak hücrel kompartmanlarının yeniden inşasında ve ilgili metabolik faaliyetler için gerekli enerjiyi üretirler. Mikroalglerin stres şartları altında depoladıkları lipidler çoğunlukla nötral lipidlerdir ve bu nötral lipidlerin çok büyük kısmı TAG'lerdir ve bu moleküller de günümüzde biyodizel hammaddesi olarak kullanılırlar. Dolayısıyla mikroalgleri strese maruz bırakmak, mikroalglerden biyodizel eldesi için etkili bir yoldur. Mikroalglerin sitoplazmalarında biriktirdikleri nötral lipidlerin miktarı uygulanan stresin şiddeti, süresi ve şekli ile yakından ilişkilidir. Literatürde, mikroalglerin lipid içeriğinin artırılması amacı ile çok değişik stres faktörleri uygulanmış, bunlar içerisinde mikroalglerin besiyerlerinde bulunan elementlerin konsantrasyonlarında meydana gelen değişimin, sıcaklık ve ışık şiddeti gibi çevresel parametrelerin de etkili uygulamalar olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple bu doktora çalışmasında, mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasında ortam element konsantrasyonunda, ışık ve sıcaklık şiddetinde meydana gelen değişimlerin araştırılması uygun görülmüştür. Biyolojik materyal olarak da basit hayat döngüsü, hızlı bölünme süresi, çevresel değişkenlere hızlı cevap vermesi sebeplerinden dolayı tüm genom haritası çıkarılmış olan *C.reinhardtii* mikroalginin yabanıl tip CC-124 soyu kullanılmıştır. Böylece uygulanan deneysel yaklaşım aşağıda şemalar yardımıyla açıklandığı şekilde yürütülmüştür.

Bu doktora araştırmasında ilk olarak yabanıl tip *C.reinhardtii* mikroalgi, içerisinde N, S, P, K, Mg, Ca makroelementleri ile Fe veya Zn elementinin hiç bulunmadığı veya 5x konsantrasyonda bulunduğu besiyeri ortamında 22°C sıcaklık ve 100 PAR ışık şiddeti altında 10 gün boyunca sıvı ortamda 120 rpm devirle çalışan çalkalayıcılar üzerinde inkübasyona alınmıştır. Inkübasyonun 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerinde örneklenen mikroalglerin; bölünme hızları, hücrel hacimleri, toplam



nişasta içerikleri, nötral lipid içerikleri ve TAG konsantrasyonları belirlenmiştir (Şekil 2.1).

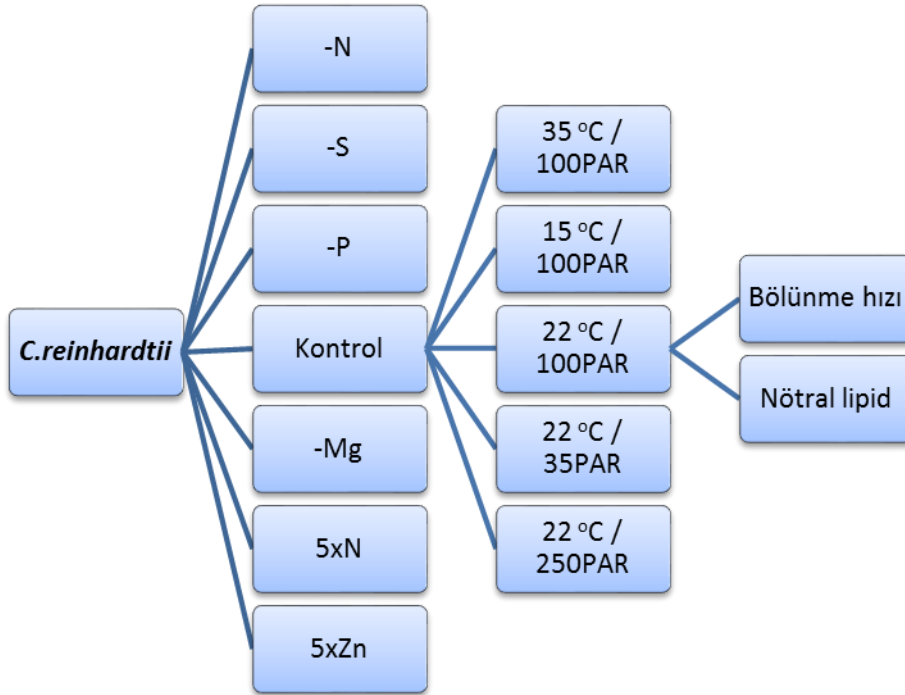


**Şekil 2.1.** Doktora tez araştırmalarının ilk aşamasında yapılan deneysel uygulamalar ve ölçümler. Belirtilen tüm ölçümler inkübasyonun 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerinde örneklenen mikroalgler kullanılarak yapılmıştır. Tüm deneysel ölçümler, en az 3 biyolojik tekrar grubu kullanılarak alınmıştır

Yapılan ölçümler sonrasında N, S, P, ve Mg elementlerinin hiç bulunmadığı ve N veya Zn elementlerinin ortamda 5x konsantrasyonunda bulunduğu durumlarda mikroalglerin lipid içeriklerinin en uygun düzeyde artmış olduğu belirlenmiştir.

Burada mikroalglerin bölünme hızlarındaki düşüş ile nötral lipid ve TAG içeriklerindeki artış değerleri özellikle dikkate alınarak böyle bir seçim yapılmıştır.

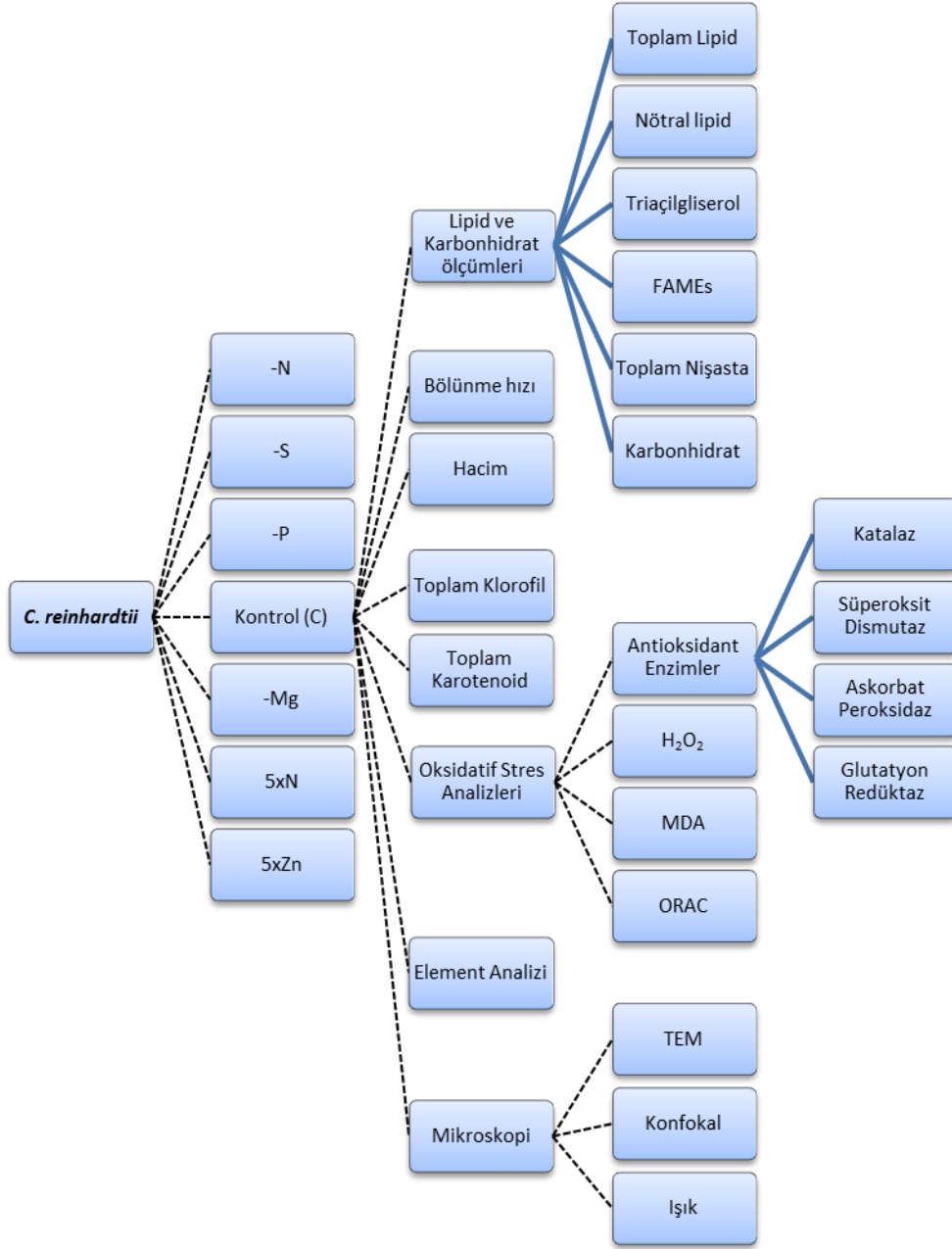
Bir sonraki çalışmada mikroalglerin besiyeri çözeltilerinde N, S, P ve Mg elementlerinin hiç bulunmadığı ve N veya Zn elementlerinin 5x konsantrasyonlarında bulunduğu ortamlarda kültüre alınan mikroalgler ışık şiddeti sabit (100 PAR) tutularak ortam sıcaklığının düşük (15°C) veya yüksek (35°C) olduğu ortamda; ve sıcaklık sabit tutularak (22°C) ortam ışık şiddetinin düşük (35 PAR) veya yüksek (250 PAR) olduğu şartlarda inkübasyona alındılar. Her iki uygulama için de kontrol değerleri 22°C sıcaklık ve 100 PAR ışık şiddeti değerleri kullanılmıştır. Böylece bu ortamlarda inkübasyona bırakılan mikroalglerin bölünme hızları ve nötral lipid içerikleri ölçülmüştür (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Uygun element manipülasyonu belirlenen mikroalglerin büyüme ve nötral lipid içeriklerine sıcaklık ve ışık şiddetinin etkisinin araştırıldığı çalışma şeması. Belirtilen tüm ölçümler inkübasyonun 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerinde örneklenen mikroalgler kullanılarak yapılmıştır

Yapılan değerlendirme neticesinde ortam sıcaklık ve ışık Şiddetindeki değişimin element manipölasyonu uygulanan mikroalglerde beklenenin altında verimi artırdığı belirlenmiş ve bu uygulamalardan herhangi birinin yalnız uygulandığında sağladığı verim artışının element manipölasyonu ile birlikte uygulandığında sağlamadığı durumu anlaşılmış, sıcaklık ve ışık uygulamaları ile kombine element stresi uygulamalarının hem beklenen verimi sağlamadığı ve hem de çok sayıda değişken olduğu için bir değişkenin fizyolojik etkisinin açıklanmasının güçleştığı sonucuna varılmıştır. Bu sebeple sıcaklık ve ışık uygulamalarında daha ileri ölçümlere gidilmemiş, detay çalışmalarına mevcut deneysel gruplar ile devam edilmiştir.

Böylece besiyeri ortamında N, S, P ve Mg elementlerinin hiç bulunmadığı ve N veya Zn elementlerinin 5x konsantrasyonda bulunduğu ortamlarda inkübasyona alınan mikroalglerin bölünme hızları, hücresel hacimleri, toplam lipid, nötral lipid, toplam nişasta, toplam protein içerikleri (ekstrakte edilen proteinler kullanılarak mikroalglerin CAT, SOD, AP ve GR antioksidan enzim aktiviteleri ölçülmüştür), toplam klorofil, toplam karotenoid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipid peroksidasyonu (MDA bileşik miktarı), oksijen radikali absorblama kapasiteleri, makro ve mikro element içerikleri (ICP-MS ve CHNSO element analizörü kullanılmıştır), TAG ve karbonhidrat içerikleri ve son olarak ta yağ asidi metil ester (FAMES) içerikleri belirlenmiş, mikroalgler fotoğraflanmış (TEM, Konfokal ve ışık mikroskopları ile) ve çalışma tamamlanmıştır. Tüm deneylerde en az 3 biyolojik tekrar grubu kullanılmıştır.



Şekil 2.3. Tez çalışmasının son aşamasında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar

### 2.2.2. Element manipülasyonu için besin ortamının hazırlanması

Tris-Asetat-Fosfat (TAP) besiyeri çözeltisi çoğu fotosentetik mikroalgler için uygun olmakla birlikte *C. reinhardtii* için en uygun büyüme ortamıdır. Bu çalışmada *C.*

*reinhardtii* CC-124 (mt-) soyu, 7mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.4mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.34mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.61mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.39mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6µM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.183mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 25µM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 6µM CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 6µM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 6µM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 17.9 µM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O içeren TAP besiyeri çözeltisinde (Harris vd., 2009), 23°C sıcaklık ve 100 µmol foton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> şiddetinde sürekli ışık altında kültüre alınmıştır. Bu aşamada alglerde maksimum miktarda yağ sentezlenmesini sağlamak için besiyeri içindeki besin oranlarıyla oynanmıştır. Öncelikle çalışma solüsyonunda birtakım değişiklikler yaparak herbirinden üç tekrarlı olmak üzere -N,-S,-K,-P,-Mg,-Ca,-Zn ve -Fe ortamları hazırlandı (Çizelge 2.1). Bunun yanında yine çalışma solüsyonunda birtakım değişiklikler yaparak herbirinden üç tekrarlı olmak üzere içlerinde 5x konsantrasyonda N, S, K, P, Mg, Ca, Zn ve Fe içeren büyüme ortamları hazırlandı (Çizelge 2.2).

**Çizelge 2.1.** Element açlığı uygulamaları için hazırlanan besiyeri çözeltilerinin içerikleri

TAP	Kontrol (mg/L)	-N (mg/L)	-S (mg/L)	-P (mg/L)	-K (mg/L)	-Ca (mg/L)	-Mg (mg/L)	-Zn (mg/L)	-Fe (mg/L)
Tris-Base	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420
Glasiyal asetik asit	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	108	108	108	KCl/122	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 105	108	108	108	108
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	54	54	54	-----	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /83	54	54	54	54
NH <sub>4</sub> Cl	375	---	375	375	375	375	375	375	375
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100	100	MgCl <sub>2</sub> /59	100	100	100	---	100	100
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50	50	50	50	50	---	50	50	50
İz elementler	1 ml	1 ml -N	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml -Zn	1 ml -Fe

**Çizelge 2.2.** Element bolluğu (5x) uygulamaları için hazırlanan besiyeri çözeltilerinin içerikleri

TAP	Kontrol (mg/L)	5xN (mg/L)	5xS (mg/L)	5xP (mg/L)	5xK (mg/L)	5xMg (mg/L)	5xCa (mg/L)	5xZn (mg/L)	5xFe (mg/L)
Tris-Base	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420	2420
Glasiyal asetik asit	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	108	108	108	---	108	108	108	108	108
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	54	54	54	229	54	54	54	54	54
KCl	---	---	---	---	486	---	---	---	---
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	---	---	---	405	---	---	---	---	---
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	---	---	214	---	---	---	---	---	---
NH <sub>4</sub> Cl	375	1875	202	375	375	375	375	375	375
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MgCl <sub>2</sub>	---	---	---	---	---	155	---	---	---
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	50	50	50	50	50	50	250	50	50
İz elementler	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22	22	22	22	22	22	22	110	22
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5	5	5	5	5	5	5	5	25

Çizelge 2.1 ve 2.2' deki hesaplamalara göre hazırlanan besiyeri çözeltileri 100 ml' lik erlenlere 50'şer ml hacimle aktarıldılar ve otoklavlanan ortamlara daha önce kontrol ortamında 4 gün boyunca kültüre alınmış olan mikroalg örneklerinden (logaritmik büyüme evresinde olan örneklerin seçilmesi amacı ile bu süredeki mikroalgler seçilmiştir) başlangıç konsantrasyonu 1 ml büyüme çözeltilisinde  $3 \times 10^4$  hücre olacak şekilde aktarım yapılarak örnekler 10 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

### 2.2.3. Ekim için hücre sayımı

Alglerin farklı sürelerde sayımı için kontrol ortamında inkübasyona bırakılan 4 günlük mikroalg kültüründen 100µl alg solüsyonu alındı, eşit miktarda lügol çözeltisi ile karıştırılarak hareketsiz kalmaları sağlandı ve Neubauer hemositometresi kullanılarak sayımları yapıldı (Spolaore vd., 2006). Dilüsyon oranı hesaba katılarak stok hücre konsantrasyonu hesaplandı. Başlangıç hücre konsantrasyonu  $3 \times 10^4$  olacak

şekilde hesaplama yaparak stok kültürden ne kadar hacimde hücre çözeltisi alınacağı bulundu. Bu şekilde CC-124 stok ortamdan yeni hazırlanan ortamların her birine çıkan değer kadar örnek aktarıldı. Steril kabinde ekim işleminden sonra yeni ekimi yapılmış 27 örnek ve CC-124 kontrol stok ortamı  $100 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  şiddetinde sürekli ışık altında 120rpm hızda  $23^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta çalkalamalı inkübatörde kültüre alındılar. İnkübasyonun 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerde alglerin bölünme zamanları/büyüme hızlarının belirlenmesi amacı ile örneklenen mikroalglerin spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek kaydedildi.

#### **2.2.4. Mikroalglerin hacim ölçümleri**

Erlenlerden eppendorf tüplerine belirli bir miktar örnek alınıp %20 hacimde lügolle hücreleri sabitleştirip hacim ölçümü için alg preparatları hazırlandı ve ışık mikroskobunda x40'lık objektifte fotoğrafları çekildikten sonra "Image J" programı kullanılarak ortalama hacimleri hesaplanmıştır (Collins, 2007).

#### **2.2.5. Toplam nötral lipid tayini**

Mikroalglerde toplam nötral lipid içeriğinin miktarsal olarak belirlenmesi için 750 nm dalga boyunda absorbansı 0,2 olarak hacimlenmiş bir miktar alg çözeltisi alınarak son konsantrasyonu  $0,26 \mu\text{M}$  olacak şekilde Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one) (Invitrogen) boyası ile 15 dk boyunca inkübe edildikten sonra, 5000rpm'de 3dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve örneklerin her biri TAP mediumla yıkandı ve vortekslendi daha sonra Nile red ile boyanan örneklerin her birinden 275 ul, 96 kuyucuklu mikropalakadaki kuyucuklara belirli bir sıraya göre pipetlenmiştir. Her gruba ait örneklerin ölçümleri 3 tekrarlı ve 2 paralelde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 490 nm eksitasyon ve 585 nm emisyon değerleri kullanılarak floresans özelliği bulunan eliza okuyucusu sayesinde absorbans değerlerine bakılarak lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler tayin edilmiştir (Fedorov vd., 2005).

### **2.2.6. Toplam nişasta tayini**

Mikroalglerde karbohidrat içeriğinin kantitatif belirlenmesi için 750 nm dalga boyunda absorbanı 0,2 olarak hacimlenmiş bir miktar alg çözeltisi alınarak son konsantrasyonu %0,02 olacak şekilde ilave edilen Safranin O boyası ile 15 dk boyunca inkübe edilmiş ve 5000 rpm'de 3dk boyunca santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant atılmış ve örneklerin her biri mikroalglerin yetiştirildikleri TAP mediumla yıkanmıştır. Safraninle boyanan örneklerin herbirinden 275 ul, 96'luk mikroluka kuyucuklarına belirli bir sıraya göre pipetlenmiştir. Her gruba ait örneklerin ölçümleri 3 tekrarlı ve 2 paralelde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 435 nm eksitasyon ve 480 nm emisyon değerleri kullanılarak floresans özelliği bulunan eliza okuyucusu sayesinde absorban değerlerine bakılarak karbohidrat içeriklerinde meydana gelen değişiklikler tayin edilmiştir (Fedorov vd., 2005).

### **2.2.7. Işık mikroskopisi**

Işık mikroskopisi ölçümleri için erlenlerin herbirinden eppendorf tüplerine belirli bir miktar örnek alınıp %5 hacimde lügolle hücreler sabitleştirilmiş, inceleme için 20ul alg örneği alınarak hazırlanan geçici preparatlardaki mikroalgler x40'luk objektifte görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

### **2.2.8. Konfokal ve floresans mikroskopileri**

Toplam nötral lipid tayini için hazırlanan örnekler seyreltilerek önce floresans mikroskopta görüntülenmiş, daha sonra uygun olan preparatlar Konfokal mikroskopta analiz edilerek fotoğrafları alınmıştır. Carl Zeiss marka LSM 510 model konfokal lazer taramalı mikroskop kullanarak (63 yağ objektif lensleri 1.40 ile 0.60 arasındaki sayısal bir aralıkla) fotoğraf çekimi yapılmıştır. Görüntüleme lazer eksitasyon çizgisi 488nm ve emisyonu 570nm kullanılarak Nile red boyasının lipid için verdiği sinyal, 633 nm eksitasyon ve 650 nm emisyon değerlerinde de bu



boyanın klorofil için verdiği sinyal yakalanmıştır. Klorofil ve lipid için sağlanan renkler ZEN 2008 CLSM arayüz programı kullanılarak sağlanmıştır.

### 2.2.9. FTIR analizi

Bu yöntem, kızıl ötesi (IR) radyasyonun absorpsiyonu ile kimyasal bağların titreşiminin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bu çalışmada, FTIR ölçümü Dean vd. (2010), tarafından tarif edildiği şekilde yapılmıştır.

- a. FTIR ölçümü için 10 gün boyunca  $^{14}\text{N}$ ,  $^{32}\text{S}$ ,  $^{39}\text{K}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{40}\text{Ca}$ ,  $^{66}\text{Zn}$  ve  $^{56}\text{Fe}$  elementlerinin hiç bulunmadıkları veya 5x konsantrasyonlarında buldukları ortamlarda inkübasyona bırakılan ve inkübasyonun 1., 3., 5., 7., ve 10. günlerinde örneklenen mikroalglerin yoğunlukları eşitlenmiştir (750 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerlerine bakılarak absorbans değeri 0.3'den düşük olanlardan daha fazla (1 ml'nin üzerinde), ve 0.3'den yüksek olanlardan daha düşük (1 ml'nin altında) hacimde alınarak eşitlenmiştir.
- b. Eşit yoğunlukta alınan mikroalgler  $4^{\circ}\text{C}$ ' de ve 4000 rpm devir hızında 5dk boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant olarak dipte kalan mikroalgler sıvısı azotta dondurulmuş, FTIR ölçümü için  $-80^{\circ}\text{C}$  dondurucuya aktarılmıştır.
- c. FTIR ölçümü için örnekler dondurucudan çıkarılarak içerisine 100  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O ilave edilmiş ve bir süre (yaklaşık 5 dk) oda sıcaklığında bekletilmiş, vortekslenmiş ve 40  $\mu\text{l}$  mikroalg sıvısı 96 kuyucuklu özel FTIR plakalarının kuyucuklarına aktarılmıştır.
- d. Daha sonra içerisi  $45^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış inkübatörde mikroalglerin buldukları kuyucuklardaki su tamamen buharlaşmaya kadar (45-60 dk) inkübe edilmiş ve plakalar FTIR cihazına (Nicolet 6700 – Thermo Scientific / USA) yerleştirilmiştir.
- e. Cihaza yerleştirilen örneklerden 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  arası absorbans ölçümü ile elde edilen değerler toplanmıştır.
- f. Her bir örneğin ölçümü için 128 tarama ortalaması kullanılmıştır.
- g. Çevresel koşullardan fazla etkilenmeyen absorpsiyon bandı olan Amid 1 ( $1652\text{ cm}^{-1}$ ) değeri doğrulama değeri olarak seçilmiştir. Triaçilgliserol ( $1744$

cm<sup>-1</sup>) değerleri Amid 1 değerlerine oranlanarak mikroalglerdeki triaçilgliserol konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikler tespit edilmiştir (Movasaghi vd., 2008).

### 2.2.10. ICP-MS analizi

Mikroalglerin içerdikleri ve büyüme ortamlarında bulunan çok sayıda makro ve mikroelementin konsantrasyonunun belirlenmesinde ICP-MS cihazından faydalanılmıştır. Mikroalglerin büyüme ortamlarında bulunan element konsantrasyonlarında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için;

- a. Mikroalg ortamlarından alınan çözeltiler 8000 rpm devir hızında 5 dk boyunca santrifüjlenerek üstte kalan süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı.
- b. Daha sonra örnekler 0.22µm'lik filtreden geçirilerek çözelti içerisinde kalabilecek muhtemel kalıntılar da arındırılmış oldu.
- c. Bir sonraki aşamada, su örneklerinin içerisinde son konsantrasyonu %2 olacak şekilde derişik nitrik asit çözeltisinden ilave edildi.
- d. Son olarak örnekler ICP-MS tüplerine aktarıldı ve analiz gerçekleştirildi.
- e. Analiz için her elementten içerisinde 0, 20, 50 ve 100 ppm/ppb (makroelementler için ppm düzeyinde, mikroelementler için ppb düzeyinde hazırlanmıştır) konsantrasyonlarda element bulunan standart çözeltiler hazırlanmış ve miktarsal tanımlama böylece hazırlanmış olan standart çözeltiler yardımıyla gerçekleştirilmiştir (Kropat vd., 2011).

Mikroalglerin içerdikleri element konsantrasyonlarında meydana gelen değişimlerin belirlenmesinde ise aşağıdaki yol takip edilmiştir.

- a. Ölçüm için her gruptan -80°C'de saklanan mikroalgler (yaklaşık  $1.4 \times 10^9$  hücre) oda şartlarına alınmış ve çift deiyonize su ile vorteksledikten sonra 5000 rpm devir hızında 5 dk santrifüjlemek suretiyle yıkanmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.
- b. Daha sonra mikroalgler kül fırınına alınmak üzere krozeler içerisinde aktarılmış ve 450 °C'ye ayarlanmış kül fırını içerisinde 48 saat bekletilmiştir.

- c. Kül fırınından çıkarılan örnekler 1 ml saf nitrik asit içerisinde 24 saat boyunca bekletilmiş, daha sonra 0.22µm'lik filtreden geçirilen örnekler ddH<sub>2</sub>O ile 50 kat seyreltikten sonra (%2 nitrik asit) ICP-MS tüplerine aktarılmış ve analiz gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 2.4.** ICP-MS ölçümleri için kroze içine yerleştirilen örneklerin kül fırınındaki görüntüleri

Örneklenen mikroalglerin yapılarında bulunan N ve S elementlerinin konsantrasyonlarında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ICP-MS analizi ile mümkün değildir. Bu sebeple bu elementlerin ölçümü için Thermo Scientific Flash 2000 Series Elemental Analiz Cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz, 950-1000 °C deki yüksek sıcaklıkta yaklaşık 2 mg olarak tartılan katı veya sıvı organik bileşiği yakma yoluyla örnekteki element yüzdelelerini tayin etmektedir. Cihazda taşıyıcı gaz olarak Helyum gazı (He), yakıcı gaz olarak ise Oksijen gazı kullanılmaktadır. Katı, sıvı veya gaz örneklerde bulunan anorganik ve organik maddelerin yapısında bulunan Karbon (C), Hidrojen (H), Azot (N) ve Kükürt (S) 'ün aynı anda tayinine yönelik bir cihazdır (İnternet: CHNS-O Elemental Analiz İstanbul Üniversitesi).

- a. Ölçüm için ilk aşamada 8-10 mg arası Vanadium oksit tartılmış ve darası alınmıştır.
- b. Üzerine kurutulmuş mikroalg örneğinden 3.6-3.8 mg arasında olacak şekilde numune, kalay bir kapsüle konuldu ve daha sonra yakılarak yükseltgenmesi sağlandı.
- c. Sonuçta oluşan gaz karışımı, taşıyıcı inert bir gaz (He) ile bir kromatografi kolonuna gönderilir. Burada oksijen gazı ile yakılarak oluşan ve ayrılan karışım gazları bir termokondüktif dedektöre yönlendirilerek ayrılan her bir gazın miktarı ile orantılı bir elektrik sinyali elde edilir. Bu elektrik sinyali daha sonra spektrumda elde edilen eğri alanlarıyla orantılı olarak örneğin elementel bileşim yüzdesini verir. Kantitatif yanma işlemini tam olarak yapmak için yanma gaz karışımı bir yükseltgen katalizör bölgesine gönderilir (CuO). Daha sonra Bakır (Cu)'ın bulunduğu bir indirgenme bölgesinde azot oksitler ve SO<sub>3</sub> indirgenir. Böylece N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O ve SO<sub>2</sub> karışımı bir TCD detektörle tek tek tespit edilir. Böylece elde edilen değerler excell ortamında değerlendirilerek mikroalglerdeki C, H, N ve S elementlerinin miktarlarında meydana gelen değişimler değerlendirilmiştir (Makarevičienė vd., 2012).

### 2.2.11. Sıcaklık ve ışık uygulamaları

Steril kabin içerisinde <sup>14</sup>N, <sup>32</sup>S, <sup>31</sup>P ve <sup>24</sup>Mg elementlerinin hiç bulunmadığı veya <sup>14</sup>N ve <sup>66</sup>Zn elementlerinin 5x konsantrasyonda buldukları TAP büyütme ortamı bulunan 100ml'lik erlenler içerisine 1x10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan hücre grupları;

- Sıcaklık uygulaması için içerisi 100 µmol foton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ışık şiddetine ayarlanmış ancak sıcaklık değeri 15°C ya da 35°C olan iklimlendirme kabinlerinde,
- Işık uygulaması için ise içerisi 23°C ye ayarlanmış ancak ışık şiddeti 35 µmol foton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ya da 250 µmol foton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> olan iklimlendirme kabinlerinde 250rpm devir hızına ayarlanmış çalkalayıcılar üzerinde 10 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

- Kontrol olarak ortam şartları 22°C sıcaklık ve 100  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ışık şiddeti olarak uygulanmıştır.

İnkübasyonun 1., 3., 5., 7., ve 10. günlerinde örneklenen mikroalglerin büyümelerinde ve nötral lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler kaydedilmiştir.

### **2.2.12. Toplam lipid tayini**

Mikroalglerin içerdikleri toplam lipid miktarı Bligh ve Dyer (1959)'a göre yapılmıştır. İzlenen deneysel yol aşağıda detaylandırılmıştır.

1. Farklı ortamlarda inkübasyona bırakılan mikroalglerden 40 ml örnek, ağırlığı önceden tartılarak kaydedilmiş olan falkon tüpüne alınarak 5000 rpm devir hızında 3 dk santrifüjlendi, sıvı atıldı ve tüp tartıldı. Tüp içerisinde 1g mikroalg örneği oluncaya kadar aynı şekilde mikroalg örnekleri tüp içerisine alınarak santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
2. Tüp içerisinde bulunan mikroalgler ddH<sub>2</sub>O ile iki kez yıkandı
3. Tüp içerisine 10 ml metanol ilave edildi ve 30 sn vortekslendi
4. Daha sonra 5 ml kloroform ve 1 ml ddH<sub>2</sub>O ilave edilip 30 sn vortekslendi
5. Tüpler 3500 g devir hızında, 20 °C sıcaklıkta 15 dk boyunca santrifüjlendiler
6. Üst kısımda bulunan metanol/su tabakası uzaklaştırıldı
7. Alt kısımda bulunan metanol/kloroform tabakası bir pastör pipeti yardımı ile önceden tartılmış temiz bir tüpe aktarıldı
8. Arta kalan katılar 4-7. basamaklar tekrar uygulanarak katılarda bulunan lipidler de alınmış oldu
9. Elde edilen lipid sıvısı Whatmann no 1 filtre kağıdı kullanılarak filtrelendi ve rotary evaporator kullanılarak (40°C sıcaklık ve düşük basınç altında) metanol ve kloroformun buharlaştırılması sağlandı.

10. Tüpler tekrar tartılarak lipid miktarı ağırlıksal olarak hesaplandı. Örnekte bulunan lipid miktarının yüzde olarak hesaplanmasında ise aşağıdaki formül kullanıldı

$$\text{Lipid yüzdesi} = (\text{ekstrakt edilen lipid miktarı (gr)} / \text{mikroalg örnek ağırlığı (g)}) \times 100$$

### 2.2.13. FAMES analizi

Element manipölasyonlarına cevapta mikroalglerin yağ asidi profillerinde meydana gelen değişimin belirlenmesi için FAMES analizi gerçekleştirilmiştir. Yağ asitlerinin ekstraksiyonu, metilleştirilmesi ve analizi için Xu vd. (2010), tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır.

- a. Büyüme ortamından sürekli çöktürerek sağlanan yaklaşık 0.5 g mikroalg örneği vida kapaklı eppendorf tüplerine alınmış, saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra üzerine 300 µl ekstraksiyon solüsyonu (metanol içerisinde hazırlanmış %2'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi) ilave edilmiştir
- b. İnternal standart olarak, kör numune dahil her tüpe 30 µg nonadecanoic acid ilave edilmiştir
- c. Örnekler 2 saat boyunca 80 °C sıcaklıkta termomikser yardımı ile 750 rpm devir hızında sürekli çalkalanarak hücrelerin parçalanması ve lipidlerin açığa çıkması sağlanmıştır
- d. İnkübasyon sonrasında örnekler 10 dk oda şartlarında bekletilmiş ve sıcaklığın düşmesi sağlanmıştır
- e. Tüplerin içerisine 300 µl %0.9 konsantrasyonda NaCl ve 300 µl hekzan ilave edilmiştir.
- f. Böylece metanolde bulunan lipidlerin hekzan fazına geçmesi için örnekler 30 sn boyunca vortekslenmiş ve 10 dk boyunca da nutating mikser üzerinde çalkalanmıştır
- g. Daha sonra örnekler 3 dk boyunca 20 °C sıcaklıkta 3000 g devir hızında santrifüjlenmiştir

- h.** Son olarak üstteki hekzan tabakasından 150 µl örnek alınarak GC-MS tüplerine aktarılmıştır
- i.** Tüplere aktarılan örnekler analiz için Agilent marka GC-MS cihazına yerleştirilmiştir. Ölçüm için cihaza 130°C başlangıç sıcaklık, 240°C ye kadar her 5°C de 5 dk beklenmesi talimatı işlenmiştir.
- j.** Ölçüm sonucu elde edilen pikler analiz edilmiş, alan hesaplaması yapılarak belirlenen metil esterlerin yüzdeleri oransal olarak sunulmuştur.

#### **2.2.14. Toplam klorofil ve toplam karotenoid tayini**

Mikroalglerin içerdikleri klorofil a, b ve c ve toplam karotenoid miktarları Jeffrey ve Humphrey (1975)' e göre aşağıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

- a. Derin dondurucudan (-80°C) çıkarılan mikroalg örneklerine 500µl ddH<sub>2</sub>O eklendi, örnekler çözüldü ve vortekslendi. 2000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- b. Süpernatant atıldı ve 450µl %90'luk aseton eklendikten sonra vortekslenerek 15 dk. alt-üst pozisyonunda karıştırıldı.
- c. Daha sonra örnekler 15.000 rpm'de 5dk santrifüjlendi.
- d. Daha sonra 96'luk mikropılaka kuyucuklarına her bir örneğin süpernatantından 210µl pipetlendi.
- e. Süpernatant absorbansı sırasıyla 750, 664, 647, 470 ve 630 nm'de %90'luk aseton körüne karşı okundu.
- f. Klorofil a, b ve c konsantrasyonları ile toplam karotenoid miktarları Jeffrey ve Humphrey (1975), denklemlerine göre aşağıdaki formülasyonlar kullanılarak hesaplandı.

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

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

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

Toplam karotenoid= $(1000E_{470}-(1.86 \times \text{Chla})-(74.08 \times \text{Chlb}))/206$

### 2.2.15. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tayini

Mikroalglerdeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı tayini Shin vd., (2005) 'e göre yapılmıştır.

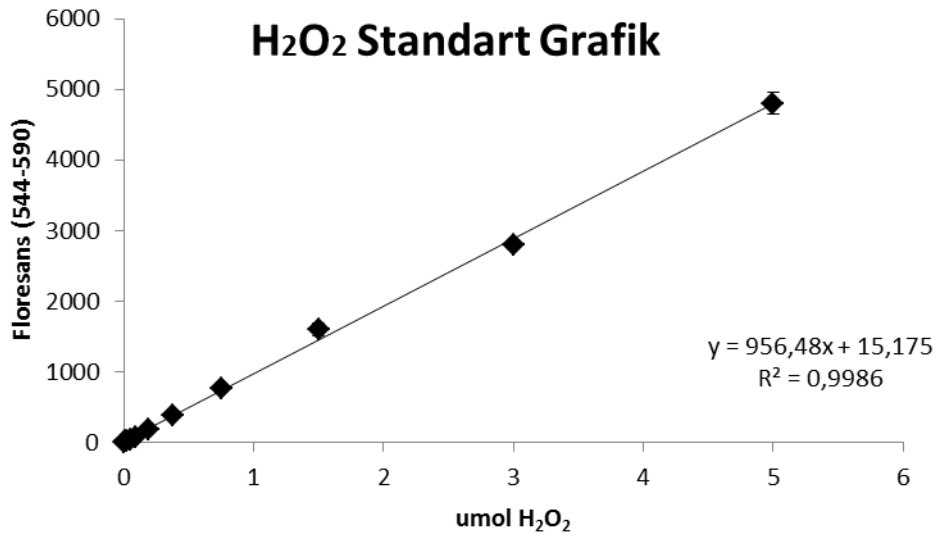
- Ölçüm için yıkanarak santrifüjlenip üzerine 120µl fosfat tamponu (20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) eklenen ve -80°C derin dondurucuya daha önce kaldırılmış olan örnekler çözünmeleri için oda sıcaklığına alınmışlardır.
- Çözünen örnekler daha sonra 2 dk boyunca sonikasyona maruz bırakılmış ve 12000 xg devir hızında 4dk boyunca 4°C'ye ayarlanmış şartlarda santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj sonrası 50 µL süpernatant, oda şartları ve karanlıkta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ölçümü için, 50 µL süpernatant da peroxidase ölçümü için kullanılmıştır.
- Mikroplaka kuyucuklarına 50 µL süpernatant ve üzerine 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart solüsyonu eklenmiştir.
- Aynı zamanda diğer mikroplakaya aynı örnek için 50 µL süpernatant ve üzerine 50 µL enzim için hazırlanan solüsyon eklenmiş olup 30 dk inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra 544 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon dalga boylarında ölçülen floresans değerleri hazırlanmış olan standart grafikten yola çıkarak, örneklerdeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları hesaplanmıştır.

Mikroalg örneklerindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarını sayısal olarak hesaplamak için standart çözeltiler hazırlanmıştır.

- Standart çözelti hazırlamak için ayrı ayrı olmak üzere 10mM Amplex Red bileşiği (10-acethyl-3,7-dihydrophenoxazine) ve 200 u/ml Horseradish peroxidase (HRP) solüsyonları hazırlanmıştır.



- b. 8 adet falkon tüplerinin her birine 10'ar ml fosfat tamponundan (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) dökülmüştür.
- c. Her birinin üzerinden sırayla 12.5; 25; 50; 75; 100; 150 ve 200 $\mu\text{l}$  fosfat tampon çözeltisi çekilip atılmış olup üzerlerine atılan miktarlar kadar 1mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenmiştir.
- d. Bu şekilde 10ml hacimde 0; 1.25; 2.5; 5; 7.5; 10; 15 ve 20 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  olacak şekilde standartlar hazırlanmıştır.



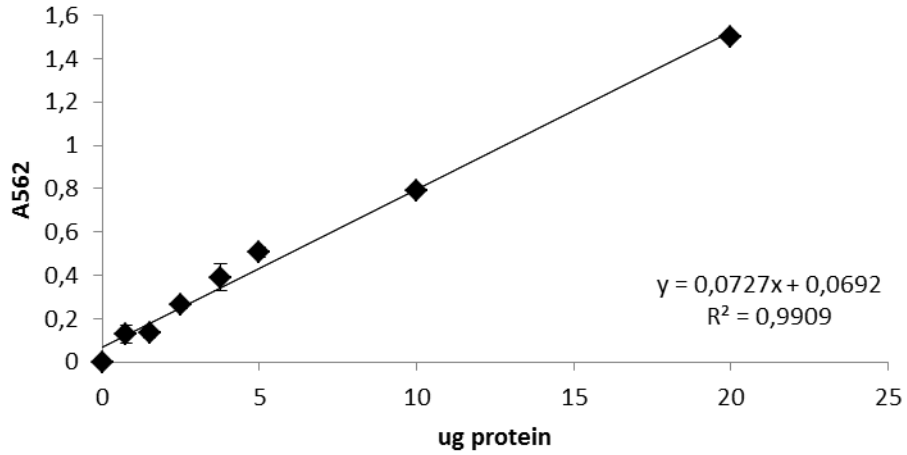
Şekil 2.5.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ölçümü için hazırlanan standart grafik

## 2.2.16. Toplam Protein Tayini

Örneklerdeki protein miktarı Bichinoninic asit (BCA) metodu kullanılarak belirlenmiştir (Smith vd., 1985). Metod proteindeki peptid bağlarının  $\text{CuSO}_4$  çözeltisindeki  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarının  $\text{Cu}^{+1}$  iyonlarına indirgenmesi ve  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarının indirgenmesiyle paralel olarak meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrede okunması esasına dayanır.

1. Protein ekstraksiyonu için lizis tamponunda önce sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra dondurucuya kaldırılmış olan mikroalg örnekleri oda sıcaklığında bir süre tutularak erimesi sağlanmıştır.
2. Daha sonra örnekler 5 dk sonikasyona maruz bırakılmıştır.
3. Sonrasında örnekler tekrar sıvı azot içerisinde 1 dk bekletilmiş ve oda sıcaklığında çözülmeleri beklenmiştir.
4. Bir sonraki basamakta örnekler vortekslenmiş ve 3 dk süre ile tekrar sonikasyon banyosunda bekletilmişlerdir.
5. Daha sonra örnekler 13000xg'de +4°C'de 20dk santrifüj edildiler.
6. Her bir örneğin üzerinden 200µl süpernatant yeni etiketlenen eppendorf tüplerinin içine pipetlendi ve geriye kalan örneklerin pelletleri atıldı.
7. En son sıvı azotta dondurularak -80'e kondular.
8. Protein tayini öncesi ısı fırını 60°C'ye ayarlandı.
9. Çalışma solüsyonu karışımı: 1 kat %4 bakır sülfat / 50 kat Bicinchoninic asit solüsyonu (Sigma) oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.
10. Standartlar hazırlandı. Standart için 0,5 mg/ml Bovin Serum Albumin çözeltisinden kuyucuklara sırasıyla 0, 1,5, 3, 5, 7,5 ve 10 ul ilave edilerek son hacim saf suyla 10 ul'ye tamamlandı. Daha sonra esas çalışma için mikroalg ekstraktlarından 5ul alınarak 96 kuyucuklu mikropalakaya aktarıldı ve son hacim 10 µl'ye tamamlandı.
11. Daha sonra hazırlanmış olan çalışma solüsyonundan 190 µl alınarak örnekler ve standartların üzerine ilave edildi.
12. İçerisinde standart ve örnekler bulunan 96 kuyucuklu mikropalaka 60°C de 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve meydana gelen renk değişimi 562 nm de okunmuştur.
13. Elde edilen değerler, bovin serum albumin ile hazırlanmış olan standart grafikten yola çıkılarak mg protein/gr örnek olacak şekilde hesaplanmıştır.

## Protein Standart Grafik



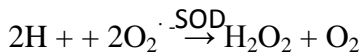
Şekil 2.6. Protein tayini için hazırlanmış standart grafik

### 2.2.17. Antioksidant enzim aktivite ölçümleri

Hüresel antioksidan enzimlerden katalaz (CAT; EC 1.11.1.6), süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) ve glutatyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) enzim ekstraksiyonları için, 100 mg alg örneği lizis tamponu içerisinde homojenize edilmiş ve homojenat 12000xg'de 30 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır. Askorbat peroksidaz enzim ekstraksiyonu için ise lizis tamponuna ayrıyeten 0.1mM askorbat ilave edilmiştir.

#### 2.2.17.1. Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1) aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD) antioksidatif stres savunma mekanizmasının anahtar enzimidir ve  $O_2^{\cdot-}$ 'i  $O_2$  ve  $H_2O_2$  ye dönüştürdüğünden  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$ 'nin hücre derişimlerini doğrudan belirler (Van Camp vd., 1994).



Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi, nitro blue tetrazolium (NBT) bileşiminin ortamda riboflavin varlığında süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazana

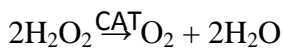
fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır (Plumb-Dhindsa ve Thorpe, 1981).

Reaksiyon karışımı (3 ml); 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.8), 13 mM Methionin, 75 µM NBT, 2 µM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 4 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2.9 ml alınmış ve üzerine 70 µl enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Reaksiyon, içinde enzim örneği de bulunan spektrofotometre küvetine 200 µM'lık riboflavin çözeltisinden 30 µl pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirilmek suretiyle başlatılmıştır. Küvet, ışık kaynağının karşısında 20 dk tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 20 dk içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de kör numuneye karşı okunmuştur. Kör numune, aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EÜ/mg protein şeklinde sunulmuştur.

#### **2.2.17.2. Katalaz (EC 1.11.1.6) aktivitesinin belirlenmesi**

Katalaz (CAT) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in suya ve oksijene dismutasyonunu katalizleyen hem-içerikli bir enzimdir. Bu enzim bütün aerobik ökaryotlarda bulunur ve peroksizomlarda meydana getirilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i uzaklaştırılmasında önemlidir (Redinbaugh vd., 1988; Scandalios, 1990). CAT ışık engellemesine uğradığı için devamlı olarak sentezlenmesi gerekir. Protein sentezini engelleyen stres faktörleri CAT'ın aktivasyonunu da engeller (Volk ve Feierabend, 1989). CAT peroksizomlarda yerleşmiştir ve lipidlerin β- oksidasyonunda ve solunumda üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi temizleme işinden sorumludurlar (Scandalios vd., 1997).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAT ve peroksidazlar tarafından temizlenir. CAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya dönüştürür.



Bu doktora çalışmasında CAT aktivitesi tayini için kullanılan yöntem, Beers ve Sizer (1952), tarafından önerilen yöntemdir. Bu metotla aktivite ölçümü, CAT aktivite ölçüm ortamındaki CAT aktivitesine bağlı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında meydana gelen azalmanın 240 nm’de izlenmesi esasına dayanır.

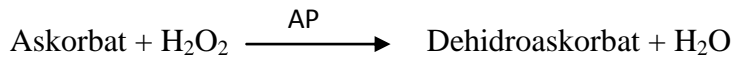
CAT aktivite ölçümü için içerisinde 2.9 ml hacimde 19 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) bulunan 4 ml’lik spektrofotometre küvetine 100 µl enzim ekstraktından ilave edildikten sonra 240 nm dalga boyunda reaksiyon çözeltisindeki CAT enzim aktivitesine bağlı olarak reaksiyon karışımında meydana gelen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarındaki azalma 0. ve 3. dakikalarda kaydedildi. Enzim ekstraktındaki protein miktarı belirlendikten sonra CAT spesifik aktivitesi;

Spesifik aktivite (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg protein/dk) = ([ΔA<sub>240 nm/dk</sub> x 1000] / [43.6 x (mg protein/ ml reaksiyon karışımı)])

şeklinde bir formülasyon ile hesaplanmıştır. Formüldeki “43.6” H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için molar ekstinksiyon katsayısıdır.

### **2.2.17.3. Askorbat peroksidaz (EC 1.11.1.11) aktivitesinin belirlenmesi**

Askorbat peroksidaz (AP) enzim aktivitesi ölçümü Nakano ve Asada (1981), tarafından önerilen protokole göre yapılmıştır. Metod, AP aktivitesi ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bağımlı askorbik asit oksidasyonundan kaynaklanan absorbans düşüşününün 290 nm dalga boyunda okunması esasına dayanır. Enzimin katalizlediği reaksiyon;



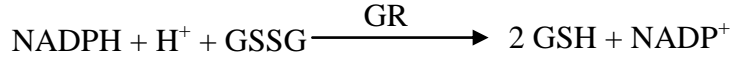
şeklinde gösterilebilir. Bir ünite AP aktivitesi dakikada 1 µmol askorbik asiti oksidize edebilen enzim miktarı olarak gösterildi.

Reaksiyon karışımı (2.5 ml); 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (pH 7.0), 0.5mM askorbik asit, 0.1 mM EDTA-Na<sub>2</sub> içermektedir. Aktivite ölçümü için 4 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki reaksiyon karışımından 2.36 ml ilave edilmiş ve bunun üzerine

0.07 ml enzim ekstraktından ilave edilmiştir. Reaksiyon, ortama 70 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilmesi ile başlatılmıştır. 290 nm dalga boyunda 3 dk boyunca absorbansta meydana gelen değişim kaydedilmiş ve enzim aktivitesi; Spesifik aktivite (µmol yükseltgen askorbat/mg protein/dk) = ([ΔA<sub>290 nm</sub> / 2.8]/mg protein) şeklinde bir formülasyonla hesaplanmıştır. Formülde kullanılan “2.8” değeri askorbik asitin ekstinksiyon katsayısını, “mg protein” ise reaksiyon karışımına ilave edilen enzim ekstraktı içerisinde bulunan protein miktarını göstermektedir.

#### 2.2.17.4. Glutasyon redüktaz (EC 1.6.4.2) aktivitesinin belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR) glutasyon disülfitin (GSSG) glutatyona (GSH) indirgenmesi için gerekli olan bir flavoproteindir. Bu enzim aynı zamanda nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ı da yükseltir. Yani glutasyon redüktaz enzimi GSSG'in GSH'a indirgenmesinde NADPH-bağımlı bir reaksiyonu katalizler. Reaksiyon;



şeklinde gösterilebilir. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi NADPH'ın NADP<sup>+</sup> a oksidasyonu ile meydana gelen absorbans azalmasının 340 nm'de ölçülmesi esasına dayanır (Foyer ve Halliwell, 1976).

Reaksiyon karışımı (2.5 ml); 0.025 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.8), 0.5 mM GSSG, 0.12 mM NADPH-Na<sub>4</sub> içermektedir. Aktivite ölçümü için 4 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki reaksiyon karışımından 2.38 ml ilave edilmiş ve bunun üzerine 0.07 ml enzim ekstraktından ilave edilmiştir. En son karışıma 10 mM konsantrasyonda askorbat çözeltisinden 50µl eklendikten sonra NADPH'ın oksidasyonundan kaynaklanan absorbanstaki düşüş 340 nm dalga boyunda 3 dk boyunca takip edilmiştir. 1 dakikada mg protein başına 1 µM NADPH'ın oksidasyonu 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Örneklerdeki GR aktivitesi;

Spesifik aktivite ( $\mu\text{mol}$  yükseltgenmiş NADPH/mg protein/dk) =  $([\Delta A_{340\text{nm}}/6.22]/\text{mg protein})$

şeklinde bir formülasyonla hesaplanmıştır. Formülde kullanılan “6.22” değeri NADPH’in molar ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon=6.22\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) ve mg protein ise 0.1 ml enzim ekstraktında bulunan protein miktarını göstermektedir.

### 2.2.18. Mikroalglerin oksijen radikal absorbands kapasitelerinin belirlenmesi

Mikroalglerde oksijen radikal absorbands kapasite (ORAC) ölçümleri Číž vd., (2010)’e göre yapılmıştır. Ölçüm, 37°C’de AAPH (2,2-azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride) solüsyonu ile uyarılmış peroksil radikaline karşı antioksidan uzaklaştırma fonksiyonunu ölçer. Fluorescein, floresan probu olarak kullanılır. Fluorescein’deki floresan kaybı peroksil radikaliyle onun reaksiyonunun zarar boyutunun bir göstergesidir.

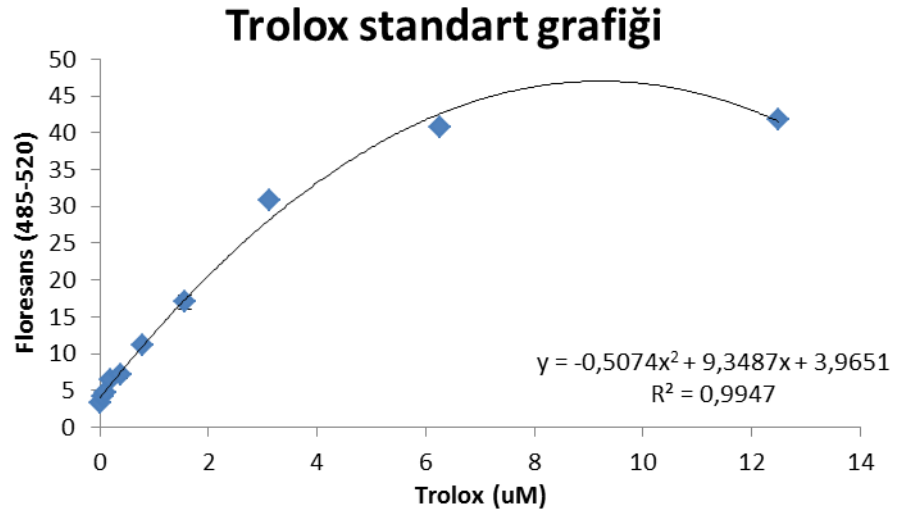
Ekstraksiyon için;

1. Yaklaşık 100 mg mikroalg içeren ependorf tüpleri içine 10 katı hacimde (1ml) ekstraksiyon solüsyonu (%0,2’ lik formik asit içinde hazırlanmış %80’lik aseton) ilave edildi.
2. Örnekler vortekslendiler ve 1 saat karıştırıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldılar.
3. İnkübasyon sonrası örnekler 6400g’de 10dk 25°C sıcaklıkta santrifüj edildiler ve süpernatantlar yeni etiketlenen eppendorf tüplerine, tek kullanımlık şırınga uçlarında (gözenek büyüklüğü 0,20 $\mu\text{m}$  olan) filtrelerden geçirilerek süzüldü.
4. Süzüntü fosfat tamponuyla (75mM, pH=7.4) 10 kat dilüe edildi ve aktivite ölçümü için hazır hale getirildi.

Aktivite ölçümü için;

1. 170  $\mu\text{l}$  fluorescein solüsyonu (fosfat tamponu içinde fluorescein disodium tuzunun çözülmesiyle hazırlandı, son konsantrasyonu 60nM) ve örnekten 10  $\mu\text{l}$ , 96’lık mikrolaka kuyucuklarına ilave edilerek mikrolaka okuyucuda 37°C’de 30dk. inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonrası 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH'den (son konsantrasyonu 515mM) 20 µl, reaksiyonun başlaması için çok kanallı pipet kullanılarak hızlıca eklendi.
3. Floresans ölçüm değerleri (eksitasyon dalga boyu=485nm ve emisyon dalga boyu=520nm) 1'er dakikalık aralarla kaydedildi ve mikroplaka her okumadan önce otomatik olarak karıştırıldı.
4. Standart grafiği elde etmek için antioksidan olarak Trolox'un kalibrasyon solüsyonları (0, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100uM) fosfat tamponu içerisinde hazırlanarak kullanılmıştır (Şekil 2.7).
5. Son ORAC değerleri Trolox konsantrasyonu ve eğri altındaki net bölge arasındaki regresyon denklemini kullanılarak hesaplandı. ORAC değerleri örneklerin taze ağırlığının gram (veya mgr) başına umol Trolox eşitlikleri olarak belirlendi.



**Şekil 2.7.** Mikroalglerin ORAC değerlerinin belirlenmesi için hazırlanmış olan standart grafik

### 2.2.19. Mikroalglerin lipid peroksidasyonu düzeylerinin belirlenmesi

Mikroalglerde lipid peroksidasyonu Hodges vd., (1999)' e göre yapılmıştır.



1. Alg örneği 1.3 ml %80'lik etanol içerisinde 10 dk sonikasyona tabi tutulmuş, homojenat sıvı nitrojende önce dondurulmuş sonra çözdürülmüştür.
2. Daha sonra 3000xg'de 10 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant eşit iki hacime bölünmüştür.
3. Süpernatantlardan birisine eşit hacimde % 0.65 thiobarbituric acid (TBA), % 0,01 butylated hydroxitoluene içeren %20'lik trichloroacetic acid (TCA) çözeltisi ve diğerine de yine eşit hacimde %0.01 butylated hydroxitoluene içeren %20'lik TCA çözeltisi ilave edilip tüpler 95°C'de 20 dk inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon sonrasında örnekler buz banyosunda 5 dk tutulmak suretiyle soğutulmuş, böylece reaksiyon durdurulmuş ve tekrar 3000xg'de 10 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm'de okunmuş ve daha sonra 440 nm (antosiyenin için) ve 600 nm (şekerler için) dalga boyundaki non-spesifik absorpsiyon için absorbans değerleri belirlenmiştir.

Örneklerde lipid peroksidasyonu ile oluşan malondialdehit (MDA) bileşiklerinin miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanmış, sonuçlar gr dokuda bulunan MDA bileşikleri (nmol MDA / gr doku) şeklinde gösterilmiştir.

$$[(A^{532}_{+TBA}) - (A^{600}_{+TBA}) - (A^{532}_{-TBA} - A^{600}_{-TBA})] = A$$

$$[(A^{440}_{+TBA} - A^{600}_{+TBA}) 0.0571] = B$$

$$\text{MDA bileşikleri (nmol/ml süpernatant)} = (A - B/157000) 10$$

### 2.2.20. Geçirimli Elektron Mikroskobu için örnek hazırlama ve görüntüleme

1. Santrifüjlenerek yoğunlaştırılan ve sıvısı uzaklaştırılmış olan 10-15mg mikroalg pelleti 1.5 ml eppendorf tüplerine alınmış, sodyum fosfat tamponu (1M, pH=7.0) kullanılarak hazırlanmış olan ve içerisinde %1'lik paraformaldehid ve %1'lik gluteraldehid çözeltisinde 24 saat oda şartlarında inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonrasında tüpler en az üç kez yıkama solüsyonu ile (0.1M sodyum fosfat tamponu, pH=7.0) yıkanmış, yıkama olayı tüplerin içerisine yıkama

solüsyonu bırakıldıktan sonra 15'er dakika yavaşça alt-üst edildikten sonra 4°C sıcaklığa ayarlanmış olan mikrosantrifüjde 800xg'de 5dk santrifüjlendikten sonra sıvı uzaklaştırılarak gerçekleştirilmiştir.

3. Daha sonra içinde mikroalg bulunan tüplerin içine %1 konsantrasyonda osmium tetroxide çözeltisi ilave edilmiş ve örnekler 4°C sıcaklıkta 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda aşırı OsO<sub>4</sub> distile su ile 4°C sıcaklıkta 10 dk boyunca 2 kez inkübe edilerek yıkanarak arıtılmıştır.
4. Bir sonraki adım olarak mikroalg pelleti bir seri alkol solüsyonlarında 4°C sıcaklıkta 10 dk boyunca EMBED-812 solüsyonu ve alkol solüsyonlarından 1:1 oranında olmak ve EMBED-812 solüsyonunun konsantrasyonunu sabit tutmak kaydıyla %70, %80, %90, %96 ve %100 saflıkta olan EtOH ile inkübe edilmiştir. Daha sonra yalnızca EMBED-812 solüsyonunda 12 saat oda sıcaklığında örnekler inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda reçine içine alınmış olan mikroalg pelleti gömme tüpüne alınmış ve reçinenin polimerize olması için örnekler 65°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.
5. Daha sonra ultramikrotom kullanılarak alınan ultra-ince parçalar (70-80 nm kalınlık) karbon ızgaralara yerleştirilmiştir.
6. İçerisinde örnek bulunan karbon ızgaralar kurşun sitrat ve uranil asetat çözeltileri ile boyanmış (Karnovsky, 1965) ve TEM cihazına yerleştirilen örnekler ortalama 80KeV elektron enerjisi kullanılarak resmedilmiştir (İnternet: ODTÜ Merkez Laboratuvarı Tem Örnek Hazırlama Üniteleri).

### 2.3. İstatistiksel Analiz

Grafiklerde belirtilen değerler en az 3 farklı kültürden iki farklı zamanda alınmış verilerin ortalamasıdır ( $n \geq 6$ ). Uygulamalı gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar Student ttest (2;2) analizi ile belirlenmiştir. Grafikler üzerinde belirtilen \*,\*\*,\*\*\* işaretleri sırasıyla  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$  düzeyinde farklılığı ifade eder. Değerler üzerindeki sonlu çizgiler standart sapmayı gösterir.

### 3. BULGULAR

Bu çalışmada, ortam element konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler ile ayrı ayrı veya birlikte uygulanan sıcaklık ve ışık şiddeti değişimlerinin *C. reinhardtii*'nin nötral lipid içeriği ve ilgili parametreler üzerine olan etkilerini gösteren bulgular, şekiller ve çizelgelerle ayrıntılı olarak sunulmuştur.

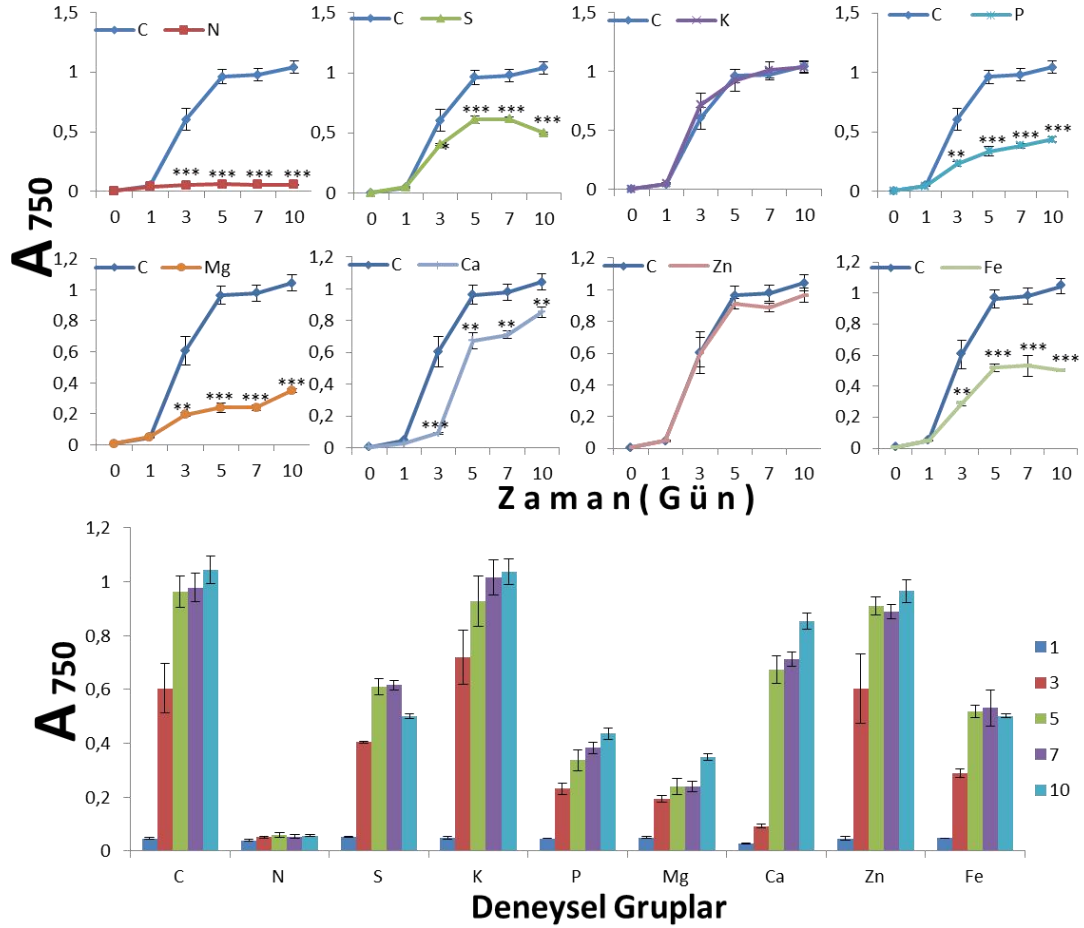
#### 3.1. Mikroalglerin Lipid İçeriğinin Artırılmasına Yönelik Uygun Besin Manipülasyonlarının Belirlenmesi Çalışmaları

##### 3.1.1. Mikroalglerin çoğalmaları ve hücre hacimlerinde meydana gelen değişimler

Mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasına yönelik uygun besin manipülasyonlarının belirlenmesi amacı ile öncelikle mikroalgler içerisinde N; S; K; P; Mg; Ca; Zn; Fe elementlerinin hiç bulunmadığı veya 5x konsantrasyonda buldukları ortamlarda 10 gün boyunca inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyonun 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerinde örneklenen mikroalglerin büyüme hızları 750 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerlerine göre, hacim ölçümleri de yöntem kısmında belirtildiği şekilde Image J programından faydalanılarak gerçekleştirilmiştir.

Element açlığına bırakıldıklarında genel manada mikroalglerin büyüme ve çoğalmaları baskılanmıştır (Şekil 3.1). Özellikle N açlığına cevapta ilk günden itibaren büyüme durmuş hücreler lineer faza girmişlerdir. Örneğin inkübasyonun üçüncü gününde N açlığına maruz bırakılmış hücrelerin çoğalmaları %91.6 oranında baskılanmıştır. Diğer taraftan N açlığına verilen cevap kadar dramatik olmamakla birlikte S, P, Mg Ca ve Fe açlığına cevapta yine hücre çoğalması baskılanmış, baskılanma oranları 7 günlük inkübasyon periyodunun sonunda sırasıyla %37, %61, %75.5, %27.3 ve %45.7 olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte Ca açlığına cevapta üç günlük inkübasyon sonunda büyüme %84.7 oranında baskılanmasına rağmen

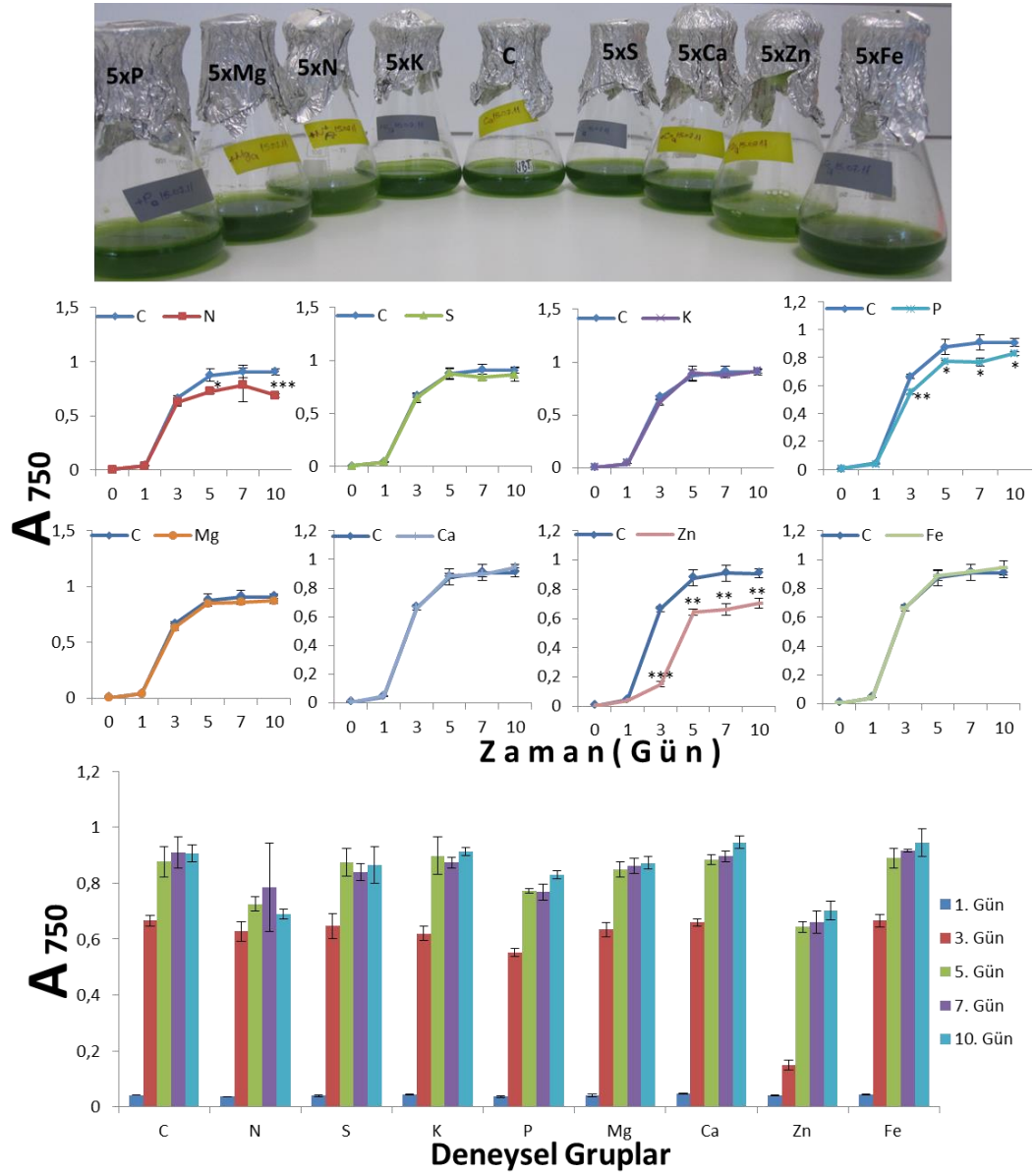
ilerleyen zamanlarda mikroalgler hızlı bir büyüme evresine girmiş, büyümenin baskılanması 5., 7. ve 10. günlerin sonunda sırasıyla %30, %27.3 ve %18.3 olmuştur. Diğer taraftan yapılan mikroskobik incelemelerde Ca açlığına bırakılan mikroalglerin üç günlük inkübasyon sonunda kümeleşme gösterdikleri fakat takip eden günlerde bu durumun kaybolduğu gözlemlenmiştir. Mikroalgler K ve Zn açlığına cevapta hücre çoğalması açısından önemli bir değişim sergilememişlerdir. Potasyum (K) gibi bir makrobesin elementinin kısıtlanmasında hücre çoğalmasında önemli bir değişim gözlenmemiştir ancak büyüme ortamına K iyonu  $K_2HPO_4$  ve  $KH_2PO_4$  şeklinde sağlandığı ve K açlığı için hazırlanmış büyüme ortamında P iyonlarının konsantrasyonunu sabit tutmak amacıyla büyüme ortamına uygun konsantrasyonlarda  $Na_2HPO_4$  ve  $NaH_2PO_4$  ilave edilmiş olmasından dolayı hücre içerisinde K iyonu yerine Na iyonunun kullanıldığı ve böylece K iyonu eksikliğinden kaynaklanacak zararların giderildiği düşüncesindeyiz. Sonraki şekillerde de görüleceği gibi K hariç tüm makrobesin element açıklıklarına cevapta hücre çoğalması baskılanmış, hacmi genişlemiş ve nötral lipid içeriği artmıştır. Tüm bu fizyolojik cevapların da ortamda K yerine Na kullanılmış olmasıyla alakalı olduğu düşüncesindeyiz.



**Şekil 3.1.** Mikroalgelerin büyümeleri üzerine element açlığının etkileri. Grafığın üstünde inkübasyonun 10. gününde mikroalg kültürlerinin fotoğraf görüntüsü sunulmuştur. Grafiklerde belirtilen değerler en az 3 farklı kültürden iki farklı zamanda alınmış verilerin ortalamasıdır ( $n \geq 6$ ). Uygulamalı gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar Student ttest (2;2) analizi ile belirlenmiştir. \*,\*\*,\*\*\* sırasıyla  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$  düzeyinde farklılığı ifade eder. Değerler üzerindeki sonlu çizgiler standart sapmayı gösterir

Büyütme ortamında S, K, Ca, Mg ve Fe iyonları normal konsantrasyonlarının 5 katı yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında mikroalglerin büyüme ve çoğalmalarında

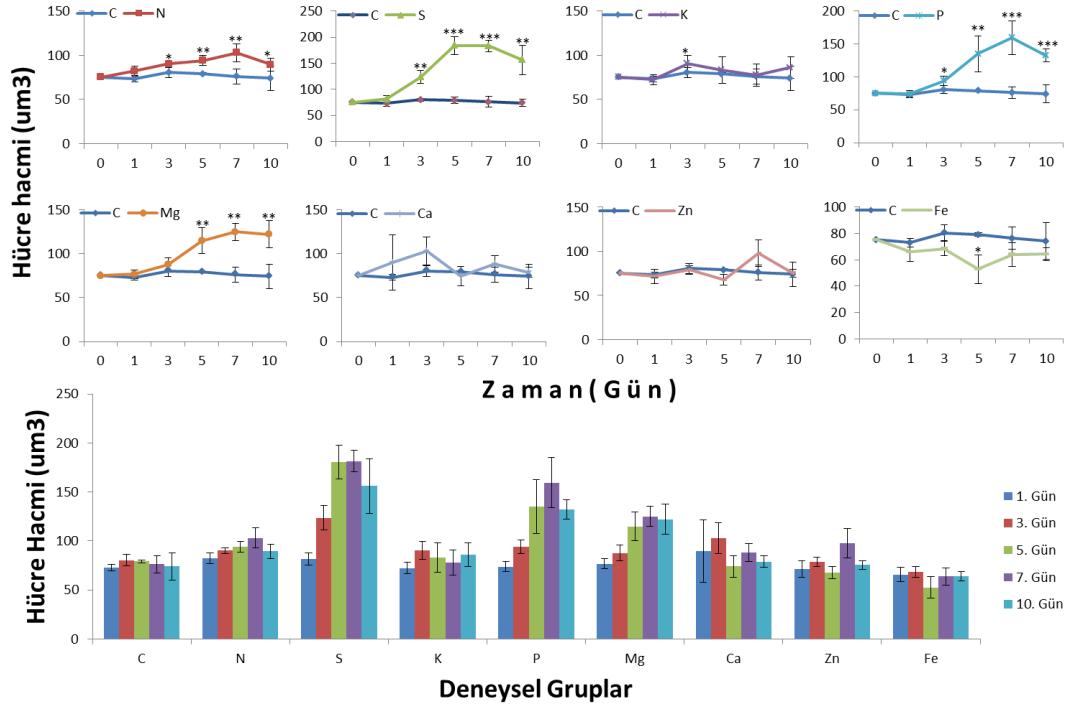
önemli değişiklikler kaydedilmemiştir (Şekil 3.2). Diğer taraftan ortam N, P ve Zn konsantrasyonları artırıldığında hücre çoğalması istatistiksel olarak önemli oranlarda baskılanmıştır.



Şekil 3.2. Mikroalgelerin büyümeleri üzerine element fazlalığının (5x) etkileri. Grafiğin üstünde inkübasyonun 10. gününde mikroalg kültürlerinin fotoğraf görüntüsü sunulmuştur

Özellikle ortam Zn element konsantrasyonu artırıldığında mikroalglerin çoğalması ilk üç günlük inkübasyon periyodunun sonunda %77.4 oranında baskılanmış olmasına rağmen inkübasyonun ilerleyen evrelerinde %22-%27'lik düzeylere gerilemiştir (Şekil 3.2). Elde edilen bu bulgu *Chlamydomonas reinhardtii* yabancı tip soyunun ağır metal gideriminde etkili bir şekilde kullanılabileceğini gösterir.

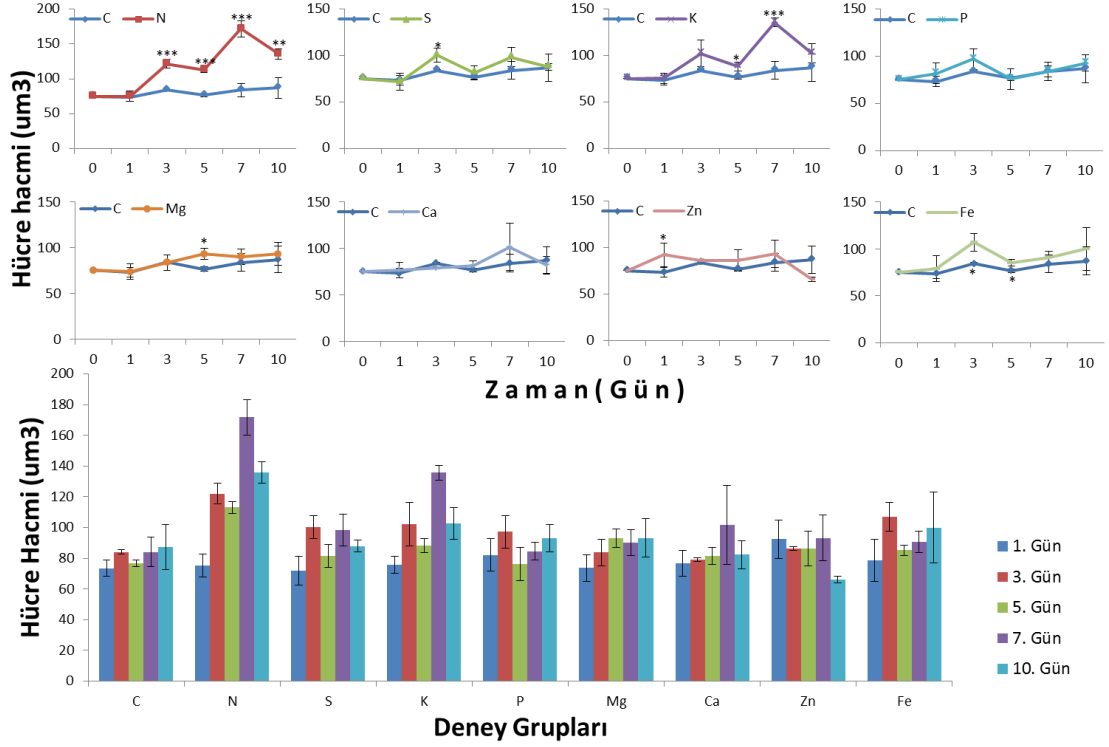
Büyüme ortamlarında K, Ca ve Zn eksikliğine cevapta mikroalglerin hacimlerinde önemli değişiklikler gözlemlenmemiştir (Şekil 3.3). Diğer taraftan N, S, P ve Mg açlığına cevapta mikroalglerin hacimleri artmış, Fe açlığına cevapta azalmıştır (Şekil 3.3). Yedi günlük inkübasyon periyodunun sonunda N, S, P ve Mg açlığından dolayı mikroalglerin hacimleri sırasıyla %35, %138, %109 ve %64 artmış; Fe açlığı nedeniyle %16 oranında azalmıştır. Diatomlar haricinde genel olarak tek hücreli mikroalglerin hücre çeperleri esnek bir yapıya sahiptir. Böylece değişen çevresel şartlara tepki olarak hücreler hacimlerini küçültür veya büyütebilirler. Toplam nötral lipid sonuçları ile birlikte ele alındığında (Şekil 3.5) hücre hacminin artan lipid içeriği ile doğru orantılı olduğu sonucuna varılabilir.



**Şekil 3.3.** Element açlığına cevapta mikroalg hacimlerinde meydana gelen değişiklikler

Büyütme ortamında normalden 5 kat yüksek konsantrasyonda N bulunduğunda hücre hacmi artmıştır. Diğer taraftan artma veya azalma lineer olmadığı için sayısal olarak artış gösterse de K ve Fe bulunduğunda hücre hacminde meydana gelen artış ve azalmalar anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.4). Diğer elementler ortamda yüksek konsantrasyonlarda bulduklarında hücre hacimlerinde önemli değişiklikler belirlenmemiştir.



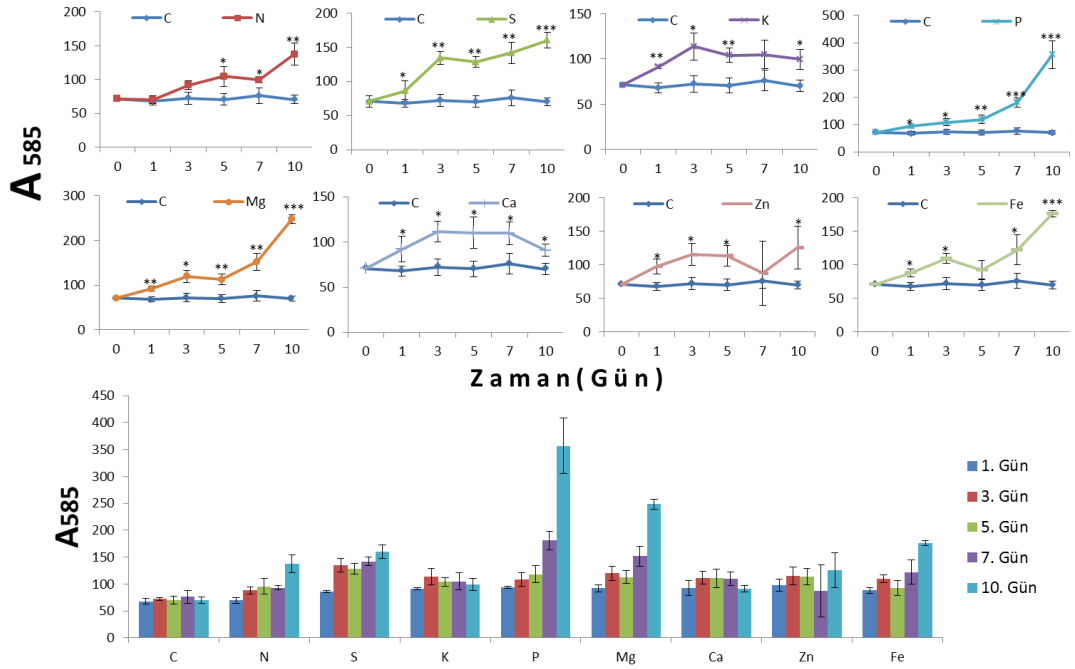


Şekil 3.4. Element bolluğuna (5x) cevapta mikroalg hacimlerinde meydana gelen değişiklikler

### 3.1.2. Mikroalglerin Nötral lipid içeriğinde meydana gelen değişimler

Mikroalglerin ve bitkilerin içerdikleri nötral lipidlerin büyük bir kısmı biyodizel üretiminde kullanılan triaçilgliserollerdir. Büyüme ortamında çalışılan tüm element eksikliklerine cevapta mikroalglerde toplam nötral lipid içerikleri farklı düzeylerde artışlar göstermiştir (Şekil 3.5). Yedi ve On günlük inkübasyon sonrasında N, S, K, P, Mg, Ca, Zn ve Fe element açıklıklarına cevap olarak *C. reinhardtii* hücrelerinin nötral lipid içerikleri sırasıyla %22-95, %87-128, %37-42, %137-407, %99-253, %44-30, %15-79 ve %60-151 oranlarında artışlar göstermiştir. Bu sonuçlara göre her ne kadar P, Mg ve Fe açlığı nedeniyle mikroalglerin toplam lipid içeriklerinde en yüksek artışlar ölçüldü ise de bu element açıklıklarında mikroalglerin büyüme ve çoğalmaları N hariç diğer elementlere kıyasla çok daha yüksek oranda baskılanmıştır. Örneğin 7 günlük inkübasyon sonunda N, S, P, Mg, Ca ve Fe element eksikliklerinden dolayı mikroalglerin çoğalmaları sırasıyla %95.1, %37, %61,

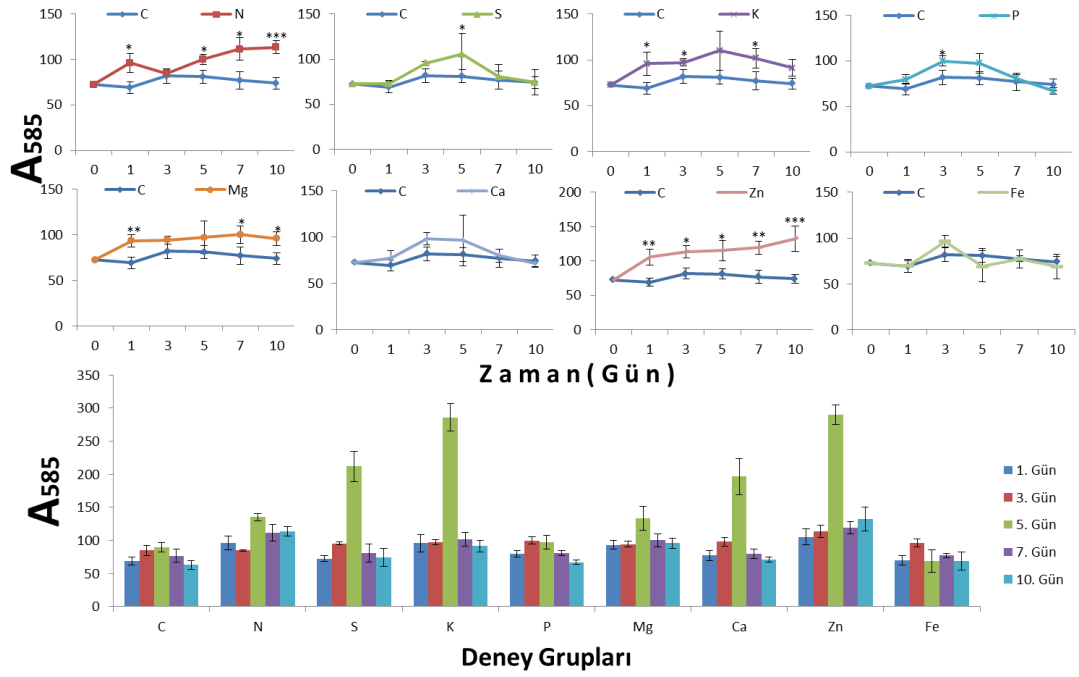
%75.5, %27.3 ve %45.7 oranlarında baskılanmıştır. Mikroalglerin çoğalma hızlarındaki düşüş ile toplam lipid içeriklerindeki artışlar birlikte ele alındığında S açlığına maruz bırakmanın diğer tüm element açlıklarından daha avantajlı sonuçlar verebileceği sonucuna varılabilir.



**Şekil 3.5.**Element açlığına cevapta mikroalglerin toplam nötral lipid içeriğinde meydana gelen değişiklikler

Büyütme ortamında çalışılan tüm elementlerin konsantrasyonları 5 kat artırıldığında toplam nötral lipid içeriğinin genel olarak arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.6). Bununla birlikte N, K, Mg ve Zn konsantrasyonlarındaki artışa cevap olarak lipid içeriklerindeki artışlar istatistiksel olarak önemli, diğer gruplara ait değerlerin ise kontrollerine kıyasla önemsiz oldukları belirlenmiştir. Büyüme ortamlarında yüksek konsantrasyonlarda N, K ve Mg bulunması ile bu elementlerin direkt olarak dahil oldukları protein metabolizması, iyon taşınımı ve fotosentez olaylarının hızlanması sayesinde hücrel redoks homeostazisinin dengede kalması için gerekenden fazla enerji formunun nişasta ve/veya lipid formunda depolanması sebebiyle bu element

fazlalıklarında mikroalglerde lipid içeriğinin artmış olması öngörülebilir bir durumdur. Ancak ortam Zn konsantrasyonunda bir artışın mikroalglerde lipid içeriğini neden artırdığı sorusu, canlı bünyesinde elementler arasındaki biyokimyasal etkileşimin karmaşıklığını düşününce, detaylı araştırmaya değer bir problemidir.

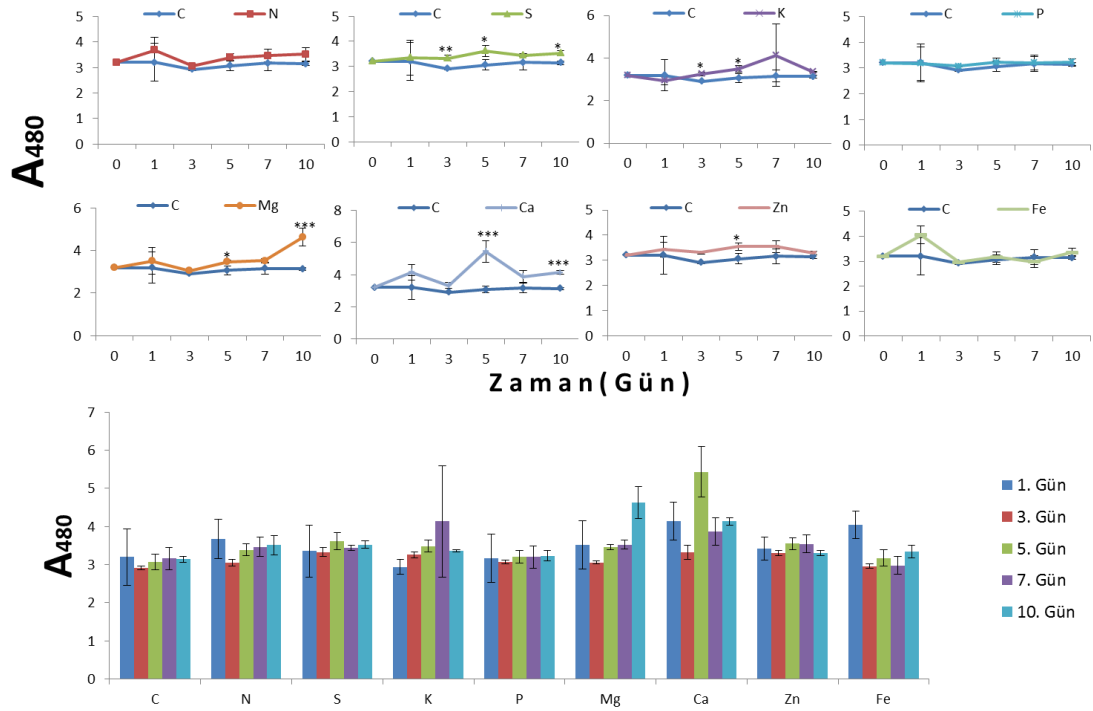


Şekil 3.6. Element bolluğuna cevapta mikroalglerin toplam nötral lipid içeriğinde meydana gelen değişiklikler

### 3.1.3. Mikroalglerin toplam nişasta içeriklerinde meydana gelen değişiklikler

Diğer canlılarda olduğu gibi mikroalglerde de metabolizmanın fizyolojik faaliyetleri sonrasında açığa çıkan ancak yapıya katılmayan ergastik maddeler olan depolanabilir enerji formları protein, karbohidrat ve lipidlerdir. Değişen çevresel şartlara cevapta canlılar temelde bu üç metabolitin birbirine dönüştürülmesi sayesinde yaşamlarını sürdürürler. Biz farklı element manipülasyonlarına cevap olarak ortaya çıkan nötral lipid içeriğindeki değişimin toplam nişasta içeriğindeki bir değişimle ilişkili olup olmadığını araştırdık. Yapılan ölçümlerde S, Mg, ve Ca açlığı durumunda lipid

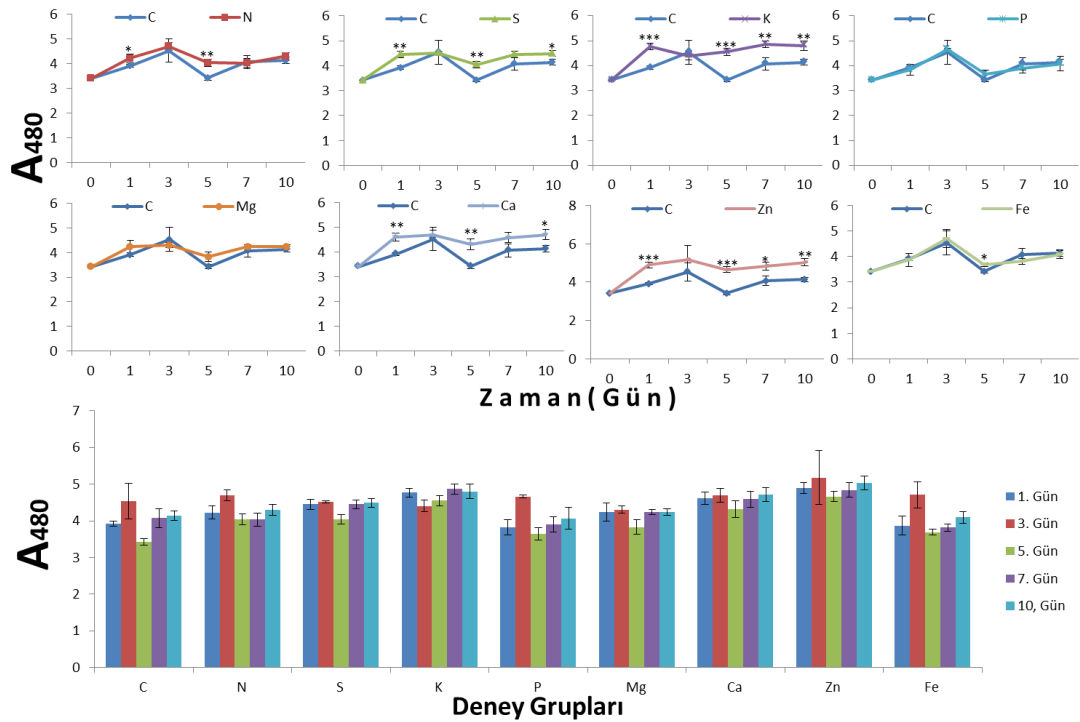
içeriklerindeki dramatik artışlara rağmen, toplam nişasta içeriklerinde genel manada çok önemli ve sürekli değişiklikler olmadığını gözlemledik (Şekil 3.7). Farklı stres şartlarına cevapta mikroalglerin lipid ve karbohidrat metabolizması arasındaki bağlantı üzerine çalışmalar devam etmektedir. Bu doktora tezi kapsamında yürütülen çalışmalardan birisi de Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi ile mikroalglerde triaçilgliserol ile polisakkarit ve oligosakkarit içeriğindeki değişikliklerin araştırılması olmuştur. Böylece yapılan diğer fizyolojik ölçümler ile birlikte ortam element manipülasyonlarına cevapta mikroalglerde lipid ve karbohidrat metabolizması arasındaki bağlantı ile ilgili değerli bulgular elde edilmiştir.



Şekil 3.7. Element açlığına cevapta toplam nişasta içeriğinde meydana gelen değişiklikler

Büyütme ortamında N, S, K, Ca ve Zn konsantrasyonları artırıldığında mikroalglerin toplam nişasta içeriklerinde artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, diğer elementlerin fazlalığı durumunda ise önemli bir değişiklik belirlenememiştir (Şekil

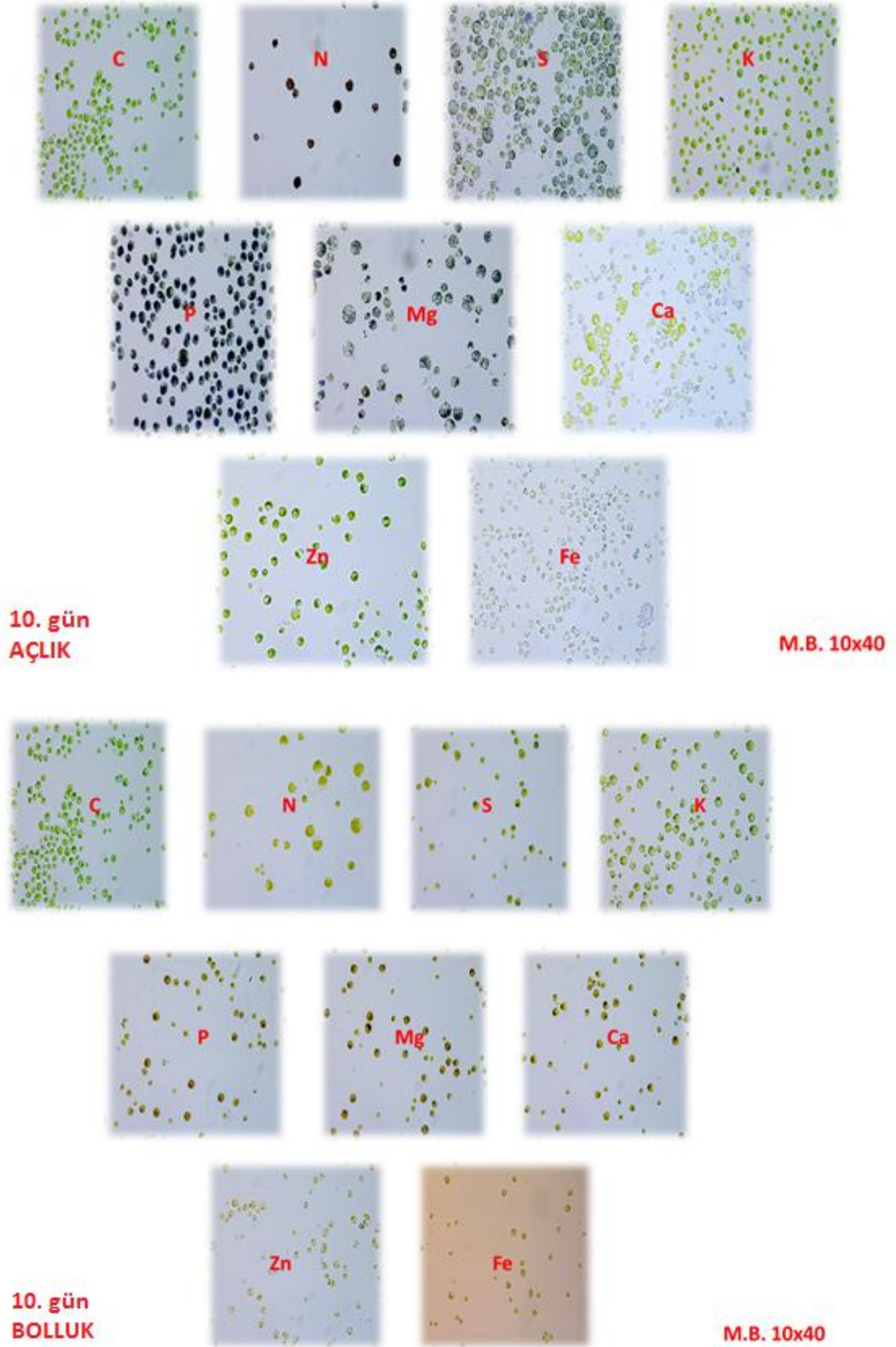
3.8). Azot konsantrasyonundaki artışa ve yokluğa cevapta *C.reinhardtii*'de hem lipid hem de nişasta içeriğinin önemli oranda artması, N elementinin protein metabolizmasının yanında lipid ve karbonhidrat metabolizmasında da önemli rolünün olduğunu gösterir. Diğer bulgular bir tarafa, Zn element konsantrasyonundaki artışla birlikte yine hem lipid üretiminin ve hem de nişasta içeriğinin artması ise ağır metal stresi nedeniyle bir yandan şekerler depolayarak ve bunları parçalayarak metabolizmasını hızlandırmak sureti ile Zn gibi kofaktör olarak kullanılabilir ağır metalleri temizleme yoluna giderek bir yandan da kolayca geri dönüştürülebilir bir element formu olan lipidleri depolamak sureti ile ikinci bir savunma mekanizması geliştirdiği düşünülebilir . Fizyolojik değerlendirmeler bir yana, bu bulgular mikroalglerin kofaktör olarak kullanabilecekleri ağır metallerin gideriminde ve ağır metal stresine uğrayan mikroalglerin karbonhidrat ve/veya lipid eldesinde kullanılabilirliği düşüncesini akla getirmektedir.



Şekil 3.8. Element bolluğuna cevapta toplam nişasta içeriğinde meydana gelen değişiklikler

### **3.1.4. Element manipölasyonu uygulanan mikroalglerin ışık ve konfokal mikroskop görüntüleri**

Bölünme hızları, hücresel hacimleri nötral lipid ve nişasta içerikleri belirlenmiş olan mikroalglerin morfolojik özelliklerini incelemek ve element açlık ve bolluğuna cevapta biriktirdikleri nötral lipidlerin görüntülenmesi amacı ile inkübasyonun 10. gününde örneklenen mikroalglerin ışık mikroskopi (Şekil 3.9) ve konfokal mikroskop görüntüleri (Şekil 3.10) alınmıştır. Işık mikroskopi görüntüleri incelendiğinde element açlığında inkübasyona alınan mikroalglerin özellikle N, S, P ve Mg açlığında morfolojik yapılarında bozulma olduğu, gözlemlenmiştir. Bu ortamlarda kültüre alınan mikroalglerin diğerleri ile kıyaslandığında hacimsel olarak daha büyük oldukları göze çarpan bir bulgudur. Nitekim image J programı kullanarak yaptığımız hacim hesaplamasında da bu ortamlarda kültüre alınan mikroalglerin hacimlerinin diğer gruplara nazaran çok daha yüksek olduğunu belirlemiştik. Diğer taraftan, Ca açlığına bırakılan mikroalglerin daha çok kümeler halinde bulunduğu hem kültür incelendiğinde ve hem de mikroskopik inceleme ile rahatlıkla gözlemlenebilmiştir. İlginç olanı mikro ve makro ölçekte kümelenmenin bazı günlerde ortadan kalkması idi. Örneğin Ca açlığına cevapta inkübasyonun ilk üç gününde mikroalglerin kümeleşme gösterdiği, 4. ve 5. günlerde göstermediği belirlenmiştir. Nitekim Şekil 3.9’da da gösterildiği gibi inkübasyonun 10. gününde Ca açlığına bırakılan hücrelerde kümelenme gözlemlenmiştir. Bu durum detaylı araştırmaya değer bir bulgu olarak rapor edilmiştir, ancak bu araştırmada ana tema mikroalglerde lipid içeriğinin artırılması olduğundan bu noktada araştırma detaylandırılmamıştır. Son olarak K, Zn ve Fe açlığına maruz kalan mikroalglerin morfolojik yapılarında önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir. Zira bu grup mikroalglerin nötral lipid içeriklerinde de önemli bir değişme kaydedilmemiş, büyümedeki baskılanma istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmamış idi.

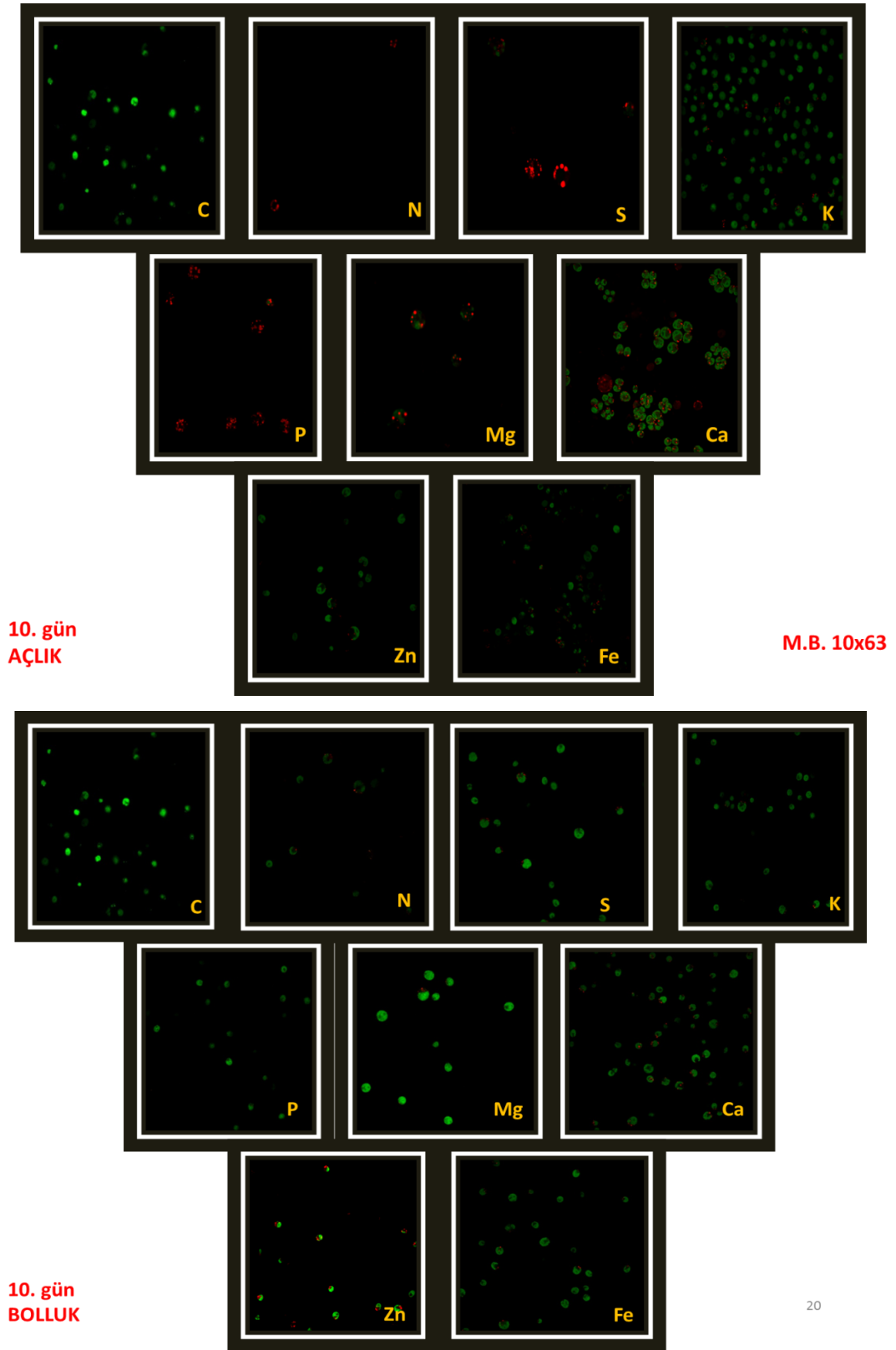


**Şekil 3.9.** Ortam element eksikliği (üstte) ve bolluğu (altta) şartlarında 10 gün inkübe edilmiş *C. reinhardtii* hücrelerinin ışık mikroskopisi görüntüleri

Konfokal mikroskopisi için yöntem kısmında belirtildiği gibi örneklenen mikroalgler bir süre nil kırmızısı boyası ile inkübe edilmiş ve böylece sitoplazmik lipid cisimcikleri boyanmıştır. Konfokal mikroskopisi görüntüleri incelendiğinde (Şekil 3.10) ortam element manipülasyonlarına cevapta mikroalglerde oluşan sitoplazmik lipid damlacıkları kırmızı renk ile, klorofil kümeleri de yeşil renk ile açık bir şekilde görülebilmektedir. Özellikle N, S, P ve Mg açlığına maruz kalan mikroalglerdeki sitoplazmik lipid oluşumları dikkate değer düzeydedir. Konfokal görüntüleri incelendiğinde en ilginç sonuç olarak karşımıza çıkan durum N element açlığında neredeyse hiç klorofil görüntülenememesinin yanında S ve P açlığında klorofil kümelerinin büyük oranda tüketilmiş olması idi ancak beklenenin aksine Mg açlığında kültüre alınan mikroalglerin içerdikleri klorofil kümeleri diğer 3 gruba ait mikroalglerden daha belirgin idi. Oysa Mg atomu klorofil molekülünün merkezinde bulunan bir atomdur ve bu atomun yokluğunda yeni klorofil moleküllerinin sentezlenememesi beklenir. Elde ettiğimiz konfokal görüntülerini ilerleyen çalışmalarımızda belirlediğimiz toplam klorofil sonuçları da desteklemektedir.

Diğer taraftan K ve Fe açlığına cevapta mikroalglerin morfolojik yapılarında önemli bir değişiklik olmadığı gibi konfokal görüntülerinden de anlaşılacağı gibi dikkate değer oranda lipid üretimi de görüntülenememiştir. Yine Ca açlığına bırakılan hücrelerin ışık mikroskopisinde gösterildiği gibi konfokal görüntülerinde de kümeler halinde bulunduğu, yoğun klorofil içerikleriyle karakterize olan bu grup mikroalglerin biriktirdikleri sitoplazmik nötral lipidler de görüntülenebilmiştir. Son olarak Zn açlığına bırakılan mikroalglerin hacimlerinde ve morfolojik yapılarında önemli değişimler olmasa da sitoplazmalarında dikkate değer oranda nötral lipid biriktirdikleri gözlemlenmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10).



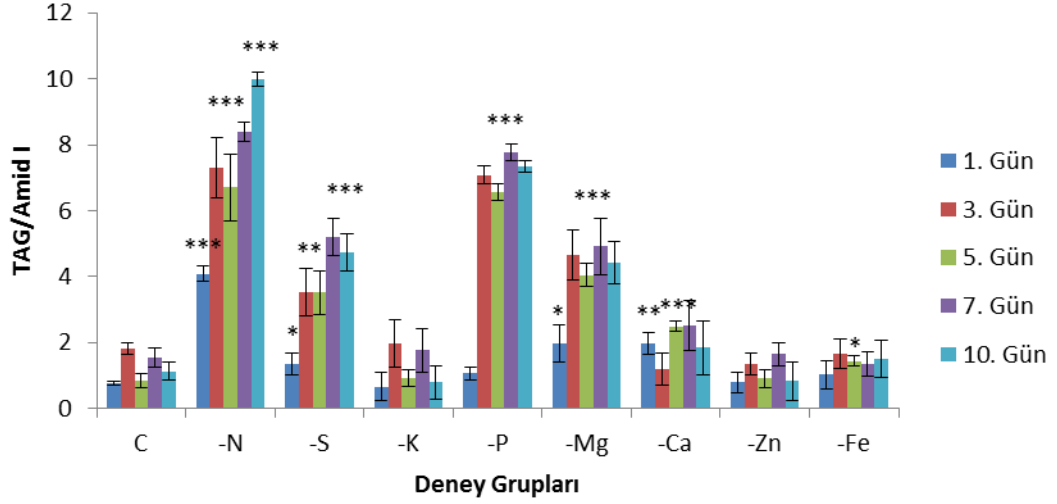


**Şekil 3.10.** Ortam element eksikliği (üstte) ve bolluğu (altta) şartlarında 10 gün inkübe edilmiş *C. reinhardtii* hücrelerinin konfokal mikroskopisi görüntüleri. Klorofiller yeşil, Lipid cisimleri ise kırmızı renkte görüntülenmiştir

### 3.1.5. Mikroalglerin içerdikleri TAG miktarlarında meydana gelen değişiklikler

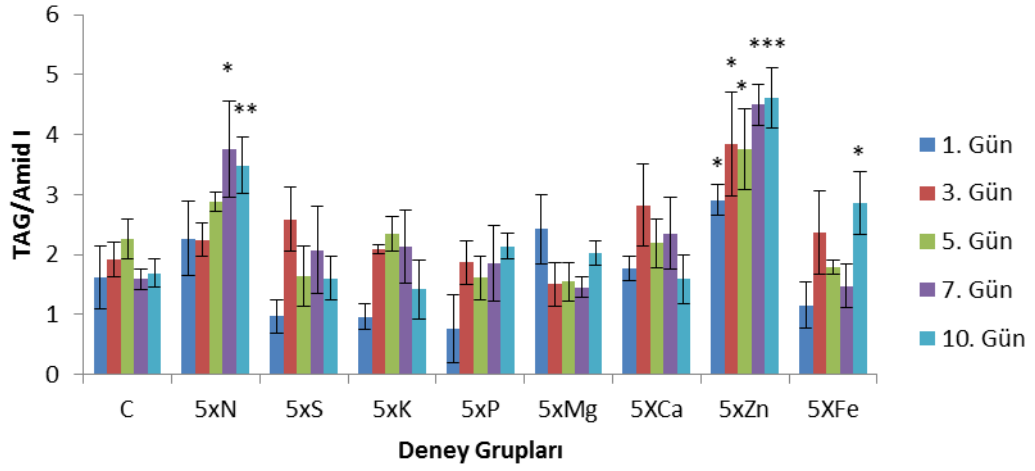
Mikroalglerin TAG içeriklerinin belirlenmesinde FT-IR spektroskopundan faydalanılmıştır. FTIR ölçümleri ile elde edilen veriler incelendiğinde K, Zn ve Fe açılığına cevapta mikroalglerin triaçilgliserol içerikleri genel olarak çok fazla değişmemiş ancak N, S, P ve Mg açılığına bırakılan mikroalglerde tüm günlerde önemli artışlar kaydedilmiştir (Şekil 3.11). Mikroalglerin TAG içeriklerinde ilk günden itibaren en yüksek artış N açılığında gözlemlenmiştir. Diğer taraftan N açılığı kadar çarpıcı olmamakla birlikte sırasıyla P, Mg ve S açılığında da önemli oranda artışlar kaydedilmiştir. Özellikle P açılığına cevapta 3. günden itibaren yüksek düzeyde TAG birikimi gözlemlenmiştir. Süre bakımından incelendiğinde, inkübasyonun ilk gününde N açılığına bırakılan mikroalglerde kontrol grubuna kıyasla TAG konsantrasyonu yaklaşık olarak 5.3 kat artmış ve bu artış lineer olarak devam ederek 10 günlük inkübasyonun sonunda yaklaşık 8.9 kat olarak kaydedilmiştir. Diğer taraftan P açılığında ilk günde TAG konsantrasyonu yaklaşık olarak 1.4 kat artış gösterse de bu artış istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur, ancak inkübasyonun 3. gününden itibaren gerçekleşen ani artış inkübasyon periyodunun sonunda yaklaşık olarak 6.5 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 3.11). Yine Mg açılığına bırakılan mikroalglerde TAG içeriği ilk günün sonunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak 2.5 kat artmış, bu artış 10 günlük inkübasyon periyodunun sonunda 3.9 kat olarak ölçülmüştür. Son olarak S açılığında inkübasyona alınan mikroalglerin TAG içeriği ilk günün sonunda kontrol grubuna kıyasla 1.7 kat artmış, bu artış lineer olarak devam etmiş ve inkübasyon periyodunun sonunda kontrol grubuna kıyasla 4.2 kat artmıştır (Şekil 3.11). Kalsiyum açılığına bırakılan mikroalglerin içerdikleri lipid damlacıkları floresan mikroskop altında rahatlıkla gözlemlenebilmekte idi. Nitekim Şekil 3.10'da da resimlendiği gibi bu grup mikroalglerin kümeler oluşturduğu ve lipid biriktirdikleri gözlemlenmiştir. Ancak bu grup mikroalglerin TAG içeriklerinde zaman zaman önemli artışlar kaydedilse de sürekli olmadığı için özel önem gösterilmemiştir. Zira floresan ölçümle belirlenen toplam nötral lipid ölçümlerinde de Ca açılığına bırakılan mikroalglerin nötral lipid içeriğinin arttığı (Şekil 3.5), ancak bu artışın N, S, P ve Mg açılığına bırakılan mikroalglerde olduğu kadar yüksek olmadığı kaydedilmiştir. Dolayısıyla tüm gruplardan elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde FT-IR ölçümleri ile elde

edilen verilerin toplam nötral lipid ölçümleri (Şekil 3.5) ve görüntüleri (Şekil 3.10) ile de uyumlu olduğu ortaya çıkmaktadır.



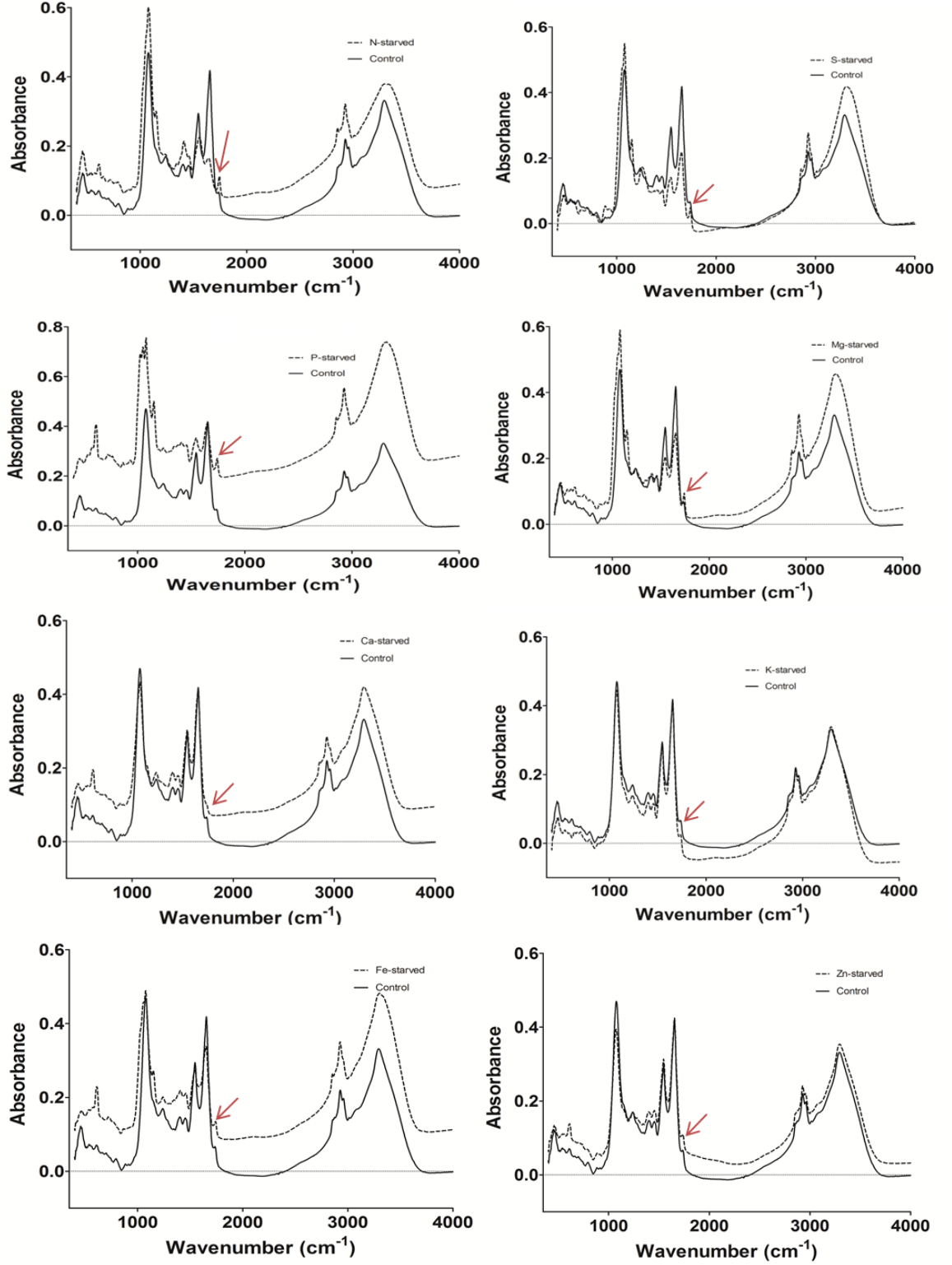
**Şekil 3.11.** Element açlığına cevapta mikroalglerin içerdikleri TAG miktarlarında meydana gelen değişimler

Ortam element konsantrasyonları artırıldığında N, Zn ve Fe gruplarının dışında çoğu durumda TAG miktarlarında önemli artışlara rastlanmamıştır (Şekil 3.12). Ortam Fe konsantrasyonu artırıldığında ilk günlerde meydana gelen değişimler istatistiksel olarak önemsiz bulunsa da inkübasyonun son gününde kaydedilen yaklaşık 1.7 kat artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Diğer taraftan ortam N konsantrasyonundaki artışa cevapta mikroalglerin TAG içeriklerinde ilk günlerde kaydedilen artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olsa da inkübasyonun 7. ve 10. günlerinde gözlemlenen 2.3 ve 2.1 kat artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Element fazlalığı uygulanan gruplar içerisinde en çarpıcı sonuçlar Zn grubunda kaydedilmiştir. Bu grup mikroalglerin TAG konsantrasyonları kontrole kıyasla ilk günde 1.8 kat artmış, bu artış lineer olarak devam etmiş ve inkübasyonun son gününde yaklaşık olarak 2.7 kat olarak belirlenmiştir. FTIR ölçümleri ile elde edilen bu sonuçlar floresans ölçümleri ile elde edilen toplam nötral lipid içeriğindeki değişiklikler ile örtüşmektedir.

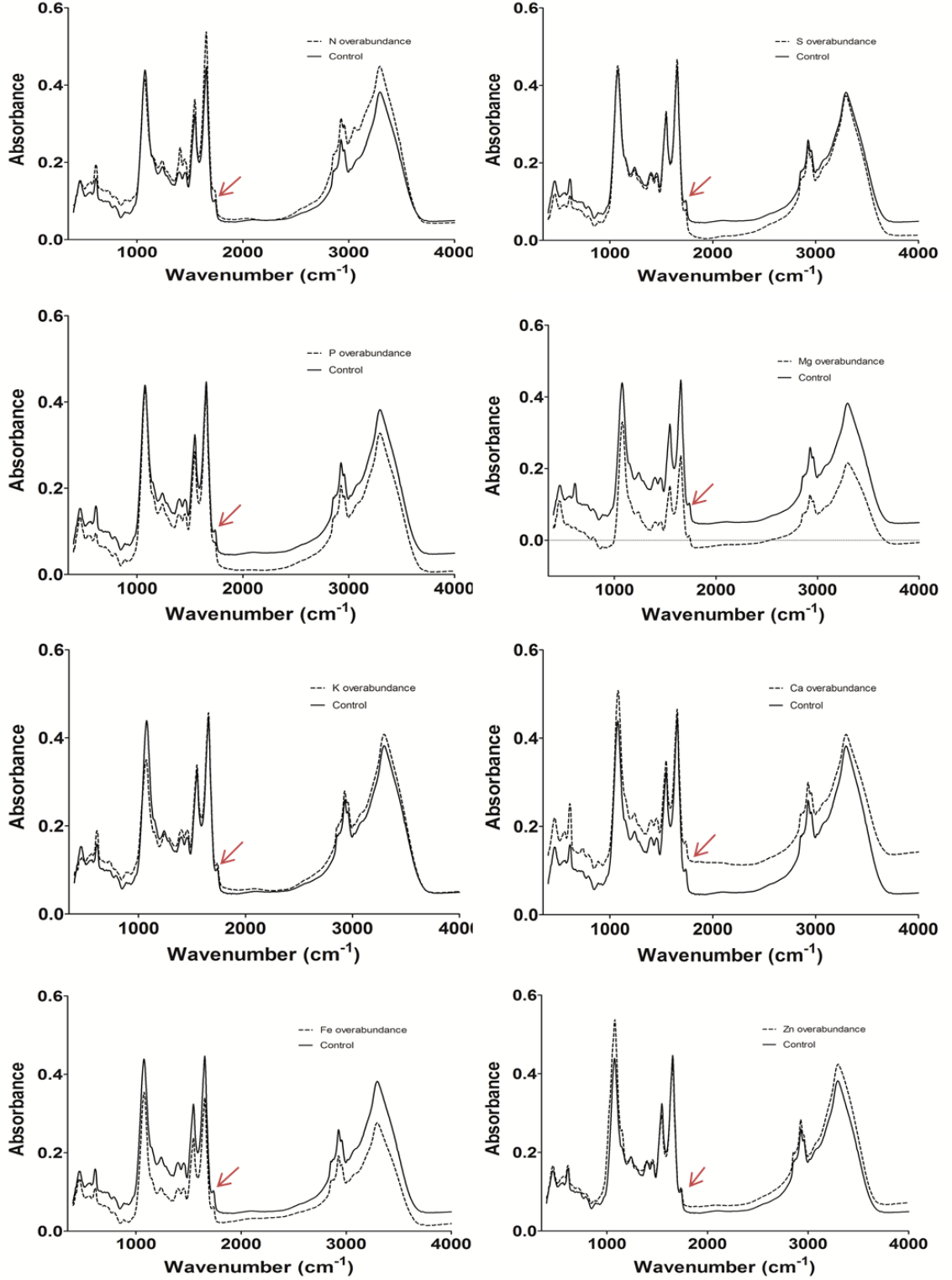


**Şekil 3.12.** Element bolluğuna cevapta mikroalglerin içerdikleri TAG miktarlarında meydana gelen değişimler. Şekli basitleştirmek adına 5xZn grubunun 7. Günü ile 10. Gününde elde edilen değerler için ayrı ayrı önem işareti kullanılmamıştır

Şekil 3.11 ve 3.12’de elde edilen değerler; 600-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyları arasında alınmış olan ölçümlerden daha önce TAG için spesifik olduğu belirlenen 1744  $\text{cm}^{-1}$  ve karbonhidratlar için spesifik olduğu bildirilen 1045, 1097 ve 1145  $\text{cm}^{-1}$  de edinilen değerlerin, çevresel değişime cevapta önemli bir değişim sergilemediği belirtilen 1652  $\text{cm}^{-1}$  de absorbands veren Amid I değerine oranı ile elde edilmiştir. Şekil 3.13 ve 3.14’de element açıklıkları ve fazlalıklarına cevapta FTIR ölçümleri ile elde edilen veriler ve ilgilendiğimiz absorbands değeri olan 1744  $\text{cm}^{-1}$ ,de meydana gelen değişimler ok işareti ile gösterilmiştir.

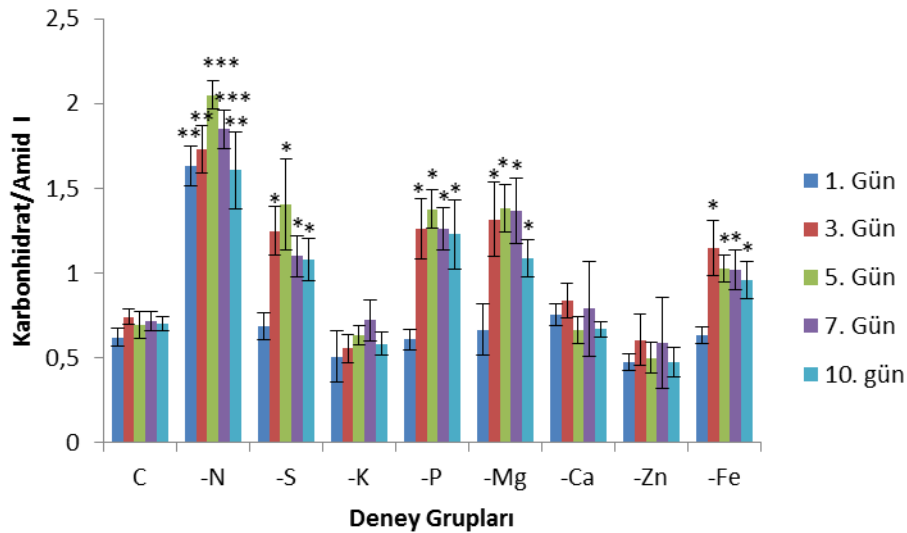


**Şekil 3.13.** Element açlığına maruz bırakılan mikroalglerden elde edilen FTIR verileri. 5 gün boyunca element açlığına bırakılmış mikroalglerin analizi ile elde edilen veriler sunulmuştur



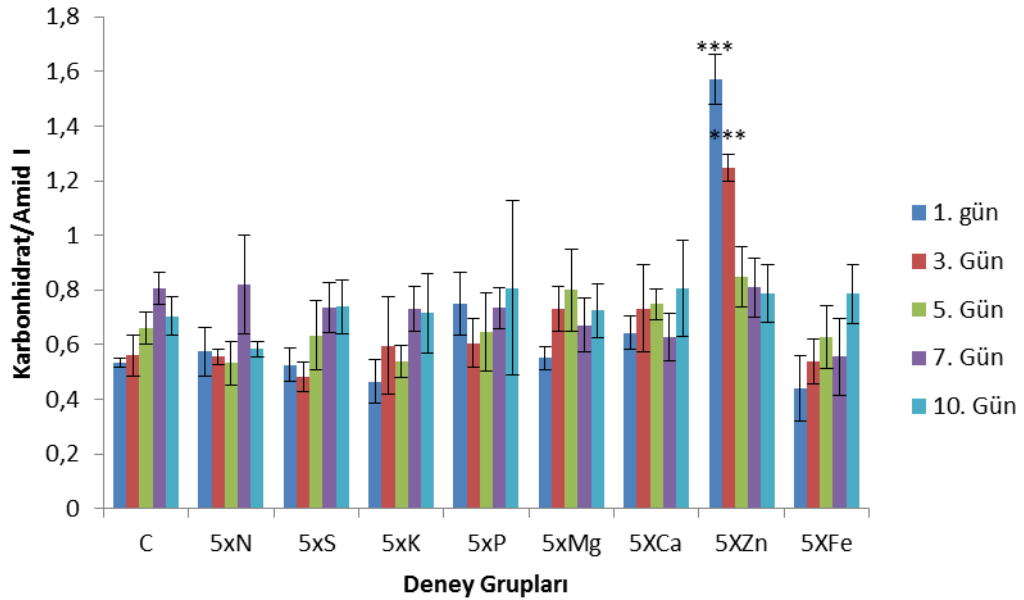
**Şekil 3.14.** Ortam element konsantrasyonunun fazla olduğu (5x) ortamda yetişen mikroalglerden elde edilen FTIR verileri. 5 gün boyunca element bolluğuna bırakılmış mikroalglerin analizi ile elde edilen veriler sunulmuştur

FTIR verileri içerisinde karbonhidrat için pik verdiği daha önce bildirilen 1045, 1097 ve 1145  $\text{cm}^{-1}$  dalga boylarındaki değerler 1652  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyundaki Amid I piki ile oranlanarak mikroalglerin içerdikleri karbonhidrat miktarlarındaki değişim sayısal olarak hesaplanmıştır. Şekil 3.15'de de gösterildiği gibi element açlığına cevapta yalnızca TAG içeriği değil karbonhidrat içeriğinde de önemli artışlar kaydedilmiştir. En yüksek artışlar N açlığına bırakılan gruplarda kaydedilmiştir. İnkübasyonun ilk gününde ani bir artışla yaklaşık 2.6 kat olan karbonhidrat içeriğindeki artış ilerleyen günlerde de sürmüştür, inkübasyonun 5. gününde yaklaşık 3 kat ile maksimum değere ulaşmıştır. Ancak N açlığına bırakılan mikroalglerde karbonhidrat içeriği TAG ölçümlerinde kaydedilenin aksine 5. günden itibaren azalmaya başlamıştır. Bu durum, mikroalglerin N açlığına cevapta öncelikle hem lipid hem de karbonhidrat biriktirdiğini, zamanla birlikte hayatta kalmak için öncelikle biriktirdiği şekerleri parçaladığını gösterir. Kükürt, P, Mg ve Fe açlığına cevapta ilk günde önemli bir değişiklik kaydedilmemiş, ancak inkübasyonun ilerleyen günlerinde önemli artışlar belirlenmiştir. 10 günlük inkübasyon periyodunun sonunda S, P, Mg ve Fe açlığına bırakılan mikroalglerin karbonhidrat içerikleri kontrol grubuna kıyasla sırası ile yaklaşık olarak 1.5, 1.8, 1.6 ve 1.4 kat artış göstermiş ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.



**Şekil 3.15.**Element açlığına cevapta mikroalglerin içerdikleri karbonhidrat miktarlarında meydana gelen değişimler

Ortam element konsantrasyonu normalden 5 kat fazla olduğunda, çoğu durumda mikroalglerin karbonhidrat içeriklerinde önemli bir değişim belirlenmemiştir. Ancak Zn fazlalığında mikroalglerin karbonhidrat içerikleri ilk gün yaklaşık 3 kat artmış, bu artış 3. günde 2.2 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 3.16). İnkübasyonun ilerleyen sürelerinde de azalma sürmüştü ve 5. günden itibaren ölçülen değerler kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Şekil 3.16). Bu durum ağır metal stresine cevapta mikroalglerin karbonhidrat biriktirdiklerini, stresin süresinin uzaması ile birlikte bünyesinde biriktirdiği şekerleri kullanarak savunma mekanizmalarını harekete geçirdiğini gösterir



**Şekil 3.16.** Element bolluğuna cevapta mikroalglerin içerdikleri Karbonhidrat miktarlarında meydana gelen değişimler

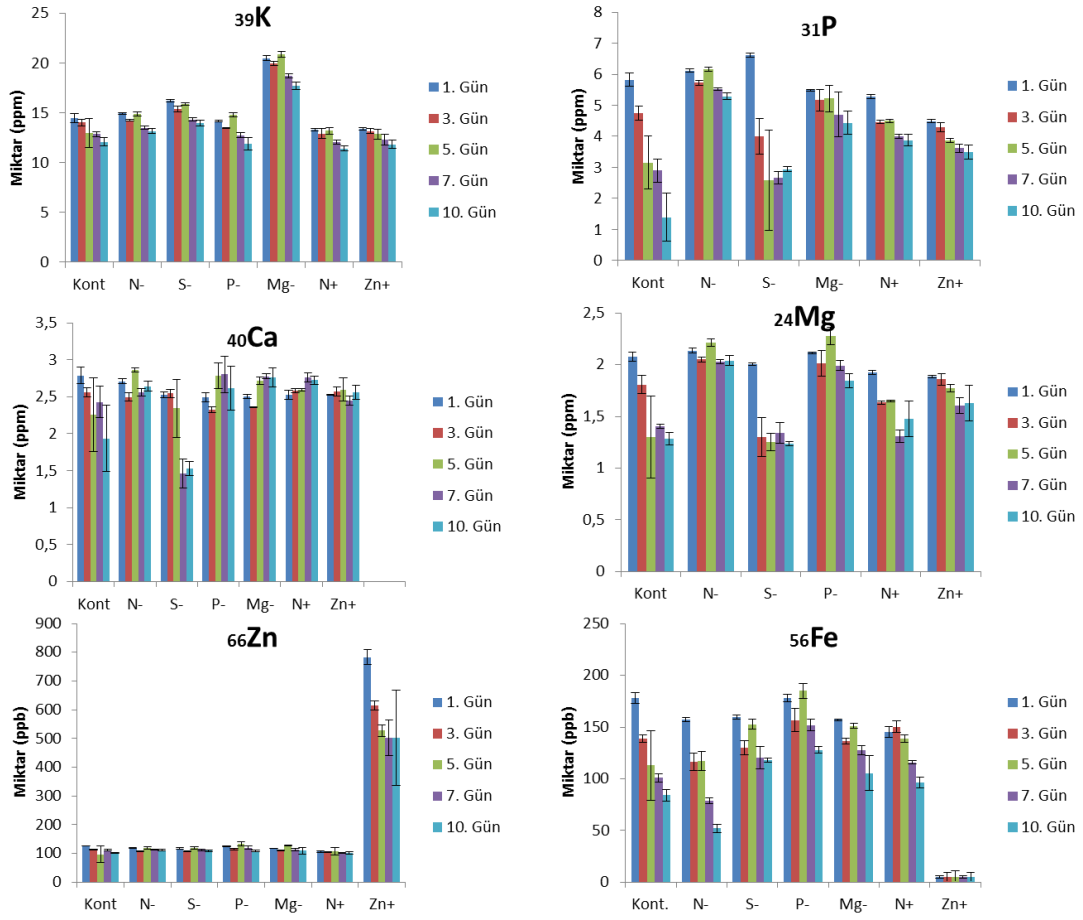
FTIR ölçümleri ile elde edilen veriler daha önce gerçekleştirilen floresans ve mikroskopik ölçümler ile birlikte değerlendirildiğinde bu aşamadan sonra yapılacak ölçüm ve uygulamaların lipid içeriği en fazla artış gösteren element uygulamaları olan N, S, P ve Mg açıkları ile N ve Zn elementlerinin 5x konsantrasyonda



buldukları ortamlarda kültüre alınan mikroalgler özne alınarak gerçekleştirilmesi kararlaştırılmıştır.

### **3.2. Büyüme ortamındaki element manipülasyonunun mikroalglerin içerdikleri ve kullandıkları element yoğunluğu üzerine etkisi**

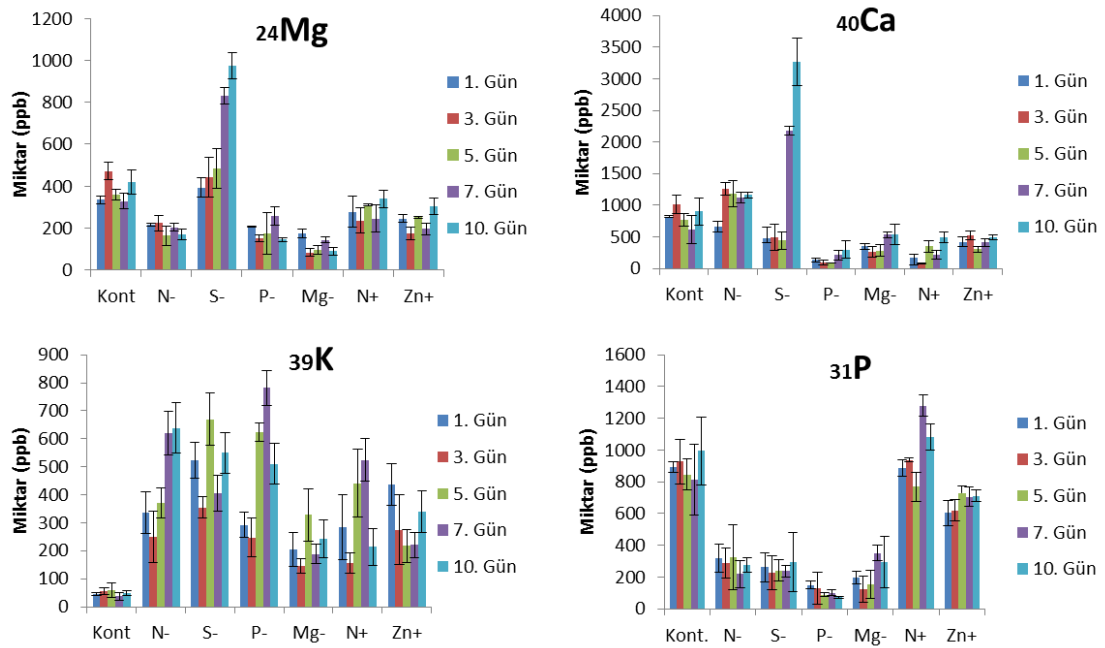
Mikroalglerin büyümesi ile ilgili değerlerle birlikte nötral lipid içeriğindeki artışın en yüksek ve nispeten uygun olduğu büyüme ortamları olarak belirlenen, içerisinde N, S, P, ve Mg elementlerinin hiç bulunmadığı ve N ve Zn elementlerinin 5x konsantrasyonlarda buldukları ortamlarda inkübasyona bırakılarak inkübasyonun 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerinde örneklenen mikroalglerin yapılarında buldukları ve büyüme ortamlarında bulunan bazı makro ve mikroelement (Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo) konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler ICP-MS analizi ile belirlenmiştir. ICP-MS analizi birçok makro ve mikroelementin konsantrasyonlarının belirlenmesinde çok kesin sonuçlar verebiliyor olsa da C, N, H ve S konsantrasyonlarının belirlenmesi için uygun değildir. Bu sebeple bu elementlerin miktarlarında meydana gelen değişimler CHNS/O elemental analizör cihazı ile ölçülmüştür.



**Şekil 3.17.** Farklı ortamlarda inkübasyona bırakılan mikroalglerin büyüme ortamlarındaki Mg, P, K, Ca, Fe ve Zn element konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikler

Farklı ortamlarda (N, S, P, ve Mg elementlerinin hiç olmadığı, N ve Zn elementlerinin 5x konsantrasyonda buldukları) inkübe edilen mikroalglerin büyüme ortamlarındaki Mg, P, K, Ca, Fe ve Zn elementlerinin miktarlarında 10 günlük inkübasyon süresince meydana gelen değişiklikler incelendiğinde, ölçülen elementlerin hiç birinin 10 günlük süre sonunda tükenmediği, ancak Zn elementinin büyüme ortamında 5x konsantrasyonda bulunduğu Fe miktarında ilk günden itibaren azalma gösterdiği kaydedilmiştir (Şekil 3.17). Bu durum ortamda fazla miktarda bulunduğu Zn elementinin Fe ile bileşik oluşturduğu ve çökeldiğini gösterebilir. Böylece Zn elementinin 5x konsantrasyonda bulunduğu ortamda büyüyen mikroalglerin Fe alımının da engellendiği sonucuna varılabilir. Bu haliyle,

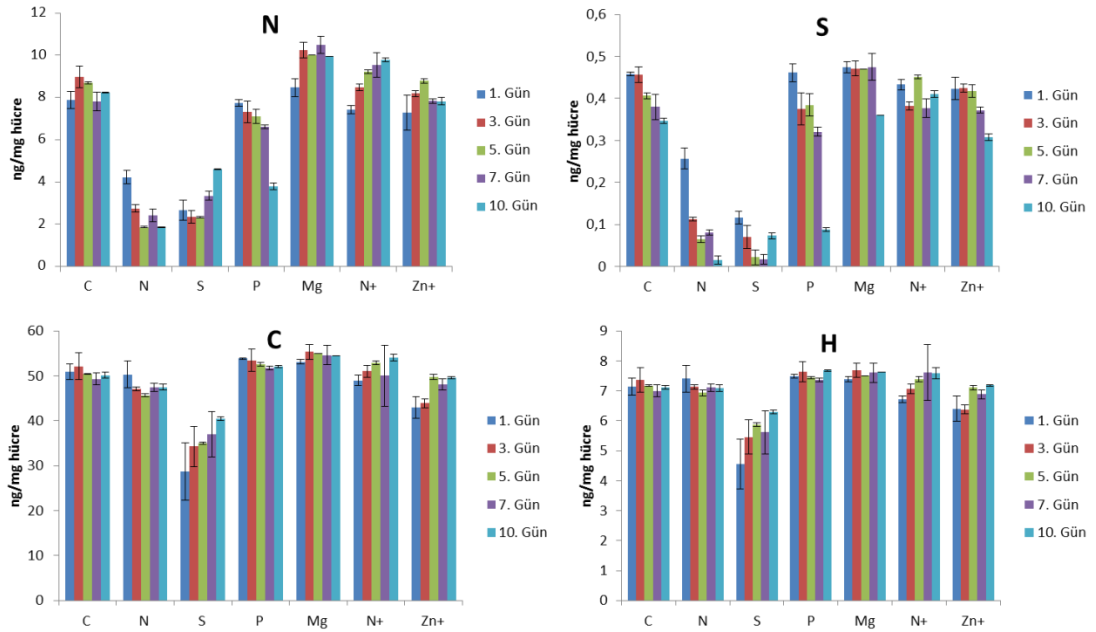
yalnızca büyütme ortamında bulunan element değişikliklerine bakıldığında Zn elementinin 5x konsantrasyonda bulunduğu ortamda büyüyen mikroalglerin lipid içeriklerindeki artışlar Zn fazlalığından ziyade Fe alınamaması ile ilişkilendirilebilir. Ancak Fe açlığında mikroalglerin lipid içeriklerinde floresans ölçümlere göre küçük artışlar belirlenmiş olsa da FTIR ölçümleri bu artışın diğerleri kadar önemli olmadığını göstermiştir. Diğer taraftan Zn elementinin 5x konsantrasyonda bulunduğu ortamdaki mikroalglerin nötral lipid ve TAG içerikleri hem floresans hem de FTIR ölçümleri ile doğrulanmıştır. Dolayısıyla ortamda Zn elementi bol miktarda bulunduğu meydana gelen değişiklikler hem Zn elementinin fazla olmasından ve hem de Fe elementinin alınamamasından kaynaklanabilir.



**Şekil 3.18.** Mikroalglerin içerdikleri bazı makroelement miktarlarında zamana göre meydana gelen değişiklikler

Mikroalglerin büyüme ortamlarında bulunan bazı elementlerin miktarlarında meydana gelen değişiklikler belirlendikten sonra mikroalglerin yapılarında buldukları bazı makro (Şekil 3.18) ve mikroelement (Şekil 3.20) miktarlarında meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir. Şekil 3.18 'de gösterildiği gibi,

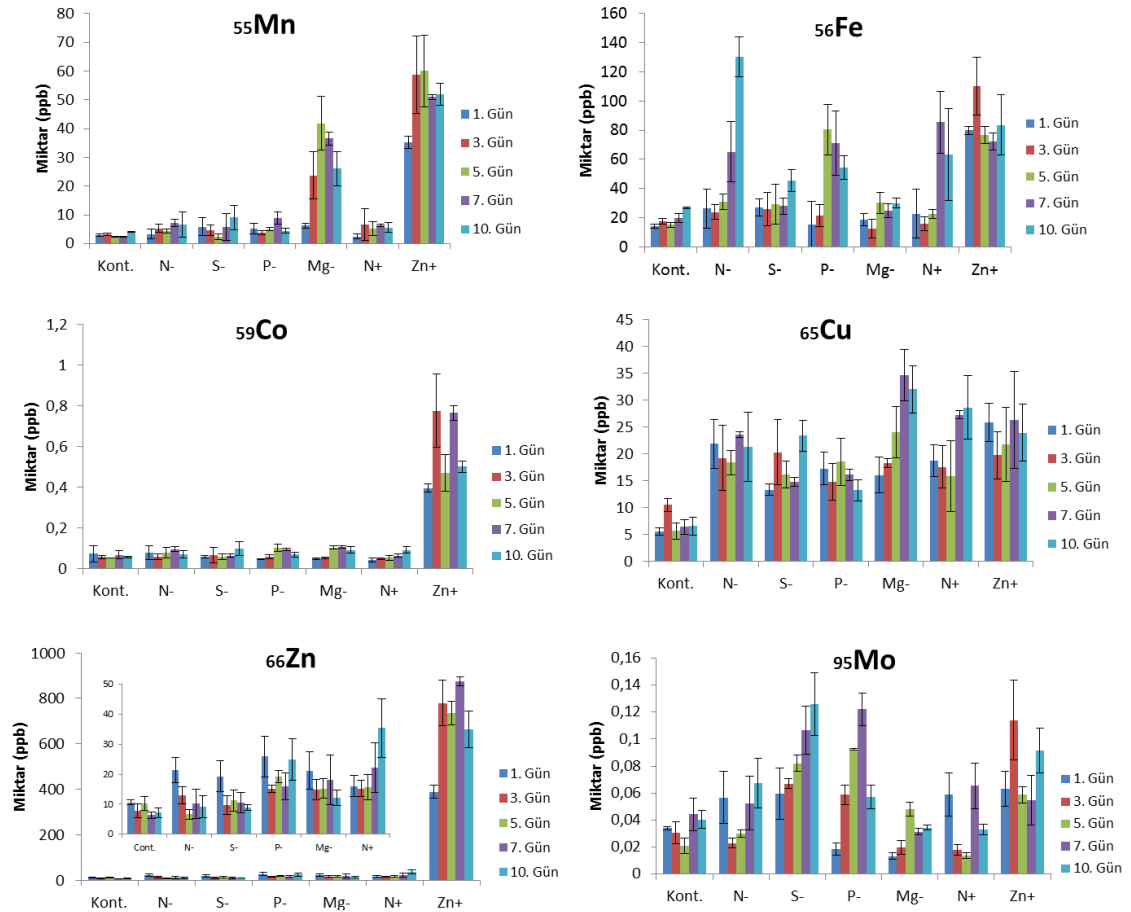
mikroalglerin içerdikleri Mg element miktarı element açlıklarında azalmıştır. Azot ve çinko fazlalıklarında bu element alımında azalma olmuş ancak diğer ortamlarda olduğu gibi çarpıcı değişiklikler belirlenmemiştir. Ancak Mg elementi ile ilgili olarak dikkati çeken bir nokta kükürt açlığında Mg alımının artması olmuştur. Yine Ca elementi kontrole kıyasla diğer gruplarda az oranda iken kükürt açlığına bırakılan mikroalglerde artış göstermiştir. İlgi çeken diğer bir nokta K elementinin element manipülasyonu uygulanmış olan tüm mikroalglerde kontrole kıyasla artış göstermesidir. Bu durum detaylı incelemeye değer bir bulgudur. Son olarak fosfor elementi, N fazlalığında yetişen mikroalgler dışında element manipülasyonu uygulanan tüm mikroalglerde kontrole kıyasla azalma göstermiştir.



**Şekil 3.19.** Mikroalglerin N, S, C ve H element içeriklerinde meydana gelen değişiklikler

Mikroalglerin içerdikleri C, H, N ve S element konsantrasyonlarının belirlenmesinde CHNSO/Element analizöründen faydalanıldı. Özellikle kükürt açlığında kültüre alınan mikroalglerin N konsantrasyonlarındaki önemli ve keskin düşüş, S açlığına cevapta mikroalglerin N elementini de kullanımlarının engellendiğini

göstermektedir. Dolayısı ile S açlığında kaynaklanan metabolik değişiklikler S elementinin olmayışından mı, yoksa buna bağlı olarak N elementinin yeterince alınamamasından mı kaynaklandığının araştırılması literatüre değerli katkılar verecektir. Bu doktora çalışması ile elde edilen bu bulgu ileride detaylı bir şekilde irdelenecektir. Yine P açlığına maruz bırakılan mikroalglerin N içerikleri de zamanla lineer bir azalma göstermiştir. Bu durum da P açlığında mikroalglerin N elementini almadıklarını gösterebilir. Dolayısıyla P açlığında mikroalglerin büyüme ortamından N elementini kullanabilmek için gerekli taşıyıcı sistemde zamanla bir hasar oluştuğu ve mikroalglerin kendi bünyelerinde bulunan azotu kullanma yoluna gittikleri sonucu çıkar. Ancak bu durumda S açlığında yetişen mikroalglerde, P açlığında yetişenler bir yana N açlığında yetişenlerden dahi daha düşük N element konsantrasyonlarına ilk günden itibaren sert düşüşün açıklaması bu çalışmada merak edilen önemli bir konudur. Bu durumu anlaşılır ve bir o kadar da ilginç kılan bulgu N açlığında inkübasyona bırakılan mikroalglerin S element içeriklerinde ilk günden itibaren yine oldukça sert bir düşüşün gerçekleşmesi, ve ilerleyen günlerde de bu durumun devam etmesidir. Dolayısı ile *C.reinhardtii* mikroalginde N ve S metabolizması birbiri ile sıkı bir ilişki içerisinde ve bu elementlerden herhangi birinin olmayışı mikroalglerin büyümesini önemli oranda baskılar. Tabii burada N açlığında kültüre alınan mikroalglerin büyümelerindeki baskılanmanın ortalama %90 düzeylerinde, oysa S açlığında %40 düzeyinde olduğunu da vurgulamak gerekir (Şekil 3.19).



**Şekil 3.20.** Mikroalglerin içerdikleri bazı mikroelement miktarlarında zamana göre meydana gelen değişiklikler

Farklı ortamlarda inkübe edilen mikroalglerin büyütme ortamlarında kullanılan bazı mikroelementlerin mikroalglerdeki miktarlarında zamana göre meydana gelen değişikliklere bakıldığında dikkati çeken genel durum kontrol şartlarından çıkıldığında mikroalglerin mikroelement konsantrasyonlarında genel manada bir azalmanın olmaması ve hatta artışlar olmasıdır (Şekil 3.20). Farklı ortamlarda yetiştirilen mikroalglerde diğer elementlerin miktarsal değişimlerine bakıldığında;

- N açlığına bırakılan hücrelerin Fe ve Cu içeriklerinde,
- S açlığına bırakılan hücrelerin Cu ve Mo içeriklerinde,
- P açlığına bırakılan hücrelerin Zn, Fe, Cu, Mo içeriklerinde,
- Mg açlığına bırakılan hücrelerin Mn ve Cu içeriklerinde,
- N bolluğunda (5x) yetişen hücrelerin Fe ve Cu içeriklerinde,

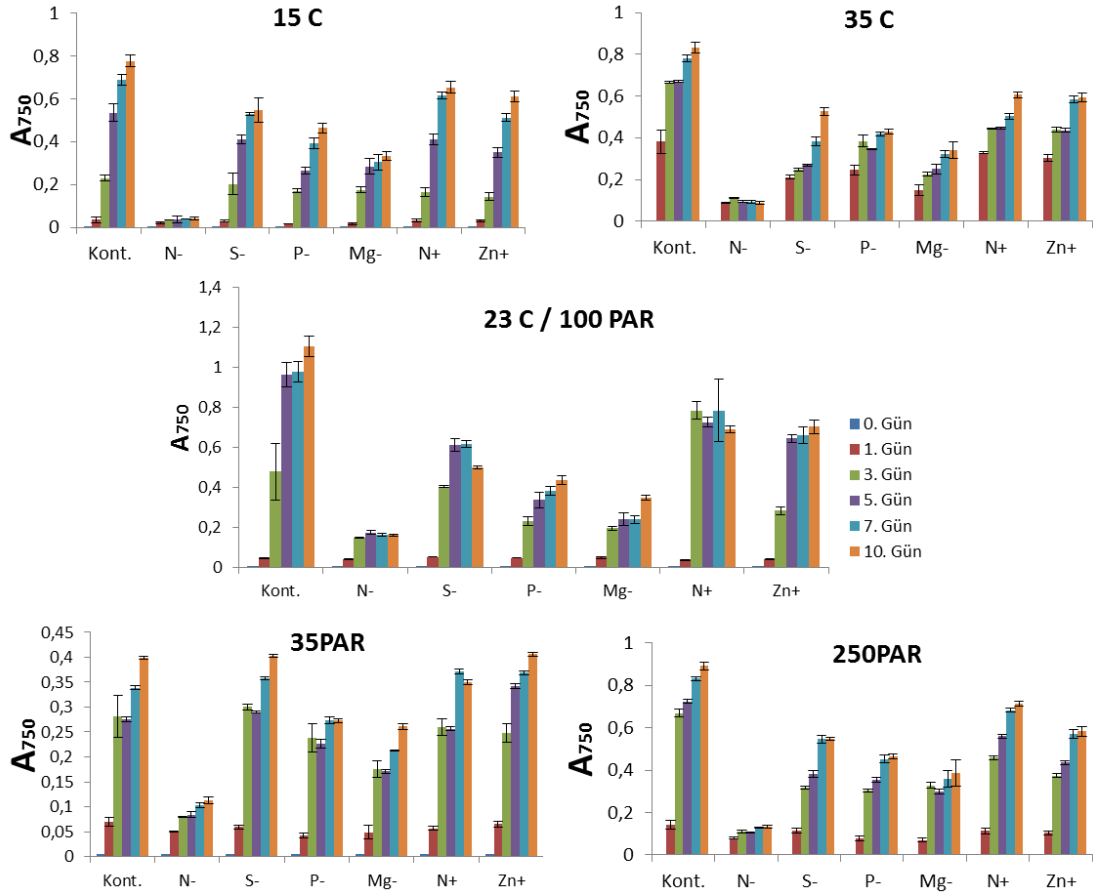
- Zn bolluğunda (5x) yetişen hücrelerin ise ölçülen tüm mikroelementler bakımından kontrole kıyasla çok daha yüksek düzeyde artışlar gözlemlenmiştir.

Çinko elementinin fazla olduğu ortamlarda yetişen mikroalglerin büyüme ortamlarında Fe konsantrasyonunun ilk günden itibaren son derece düşük olduğu gözlemlenmiş idi (Şekil 3.17). Bu durumda mikroalglerin yapılarında bulunan Fe konsantrasyonunun kontrole ve belki de diğer ortamlarda yetişen mikroalglerle kıyasla çok daha az miktarda olması beklenmesine rağmen bu ortamda büyütülen mikroalglerin Fe içerikleri kontrol ve diğer ortamlarda yetişen mikroalglerle kıyasla yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. Yine Zn elementinin fazla bulunduğu ortamda yetişen mikroalglerin Zn içeriklerinde kontrol ve diğer gruplara kıyasla çok önemli oranda artışlar belirlenmiş ve böylece bu elementin fazlalığında meydana gelen nötral lipid ve TAG artışlarının ana etkeninin yalnızca bu elementin fazlalığı olduğu sonucuna varılmıştır. Büyüme ortamında mikroalgler tarafından kullanılan bir ağır metalin yüksek konsantrasyonda bulunması mikroalglerin kullandığı diğer tüm mikroelement konsantrasyonlarında artışa yol açıyor. Beklenenin aksine ortam element konsantrasyonları ile oynandığında mikroalglerin içerdikleri mikroelement konsantrasyonlarında kontrol gruplarına kıyasla önemli artışlar olması tezin yazımında detaylı bir şekilde tartışılacaktır fakat bu durum kontrol şartlarından uzaklaştıkça mikroalglerin bazı hayati metabolik yolların sekteye uğraması ve böylece seçicilik özelliklerinin azalması sonucu ile açıklanabilir.

### **3.3. Mikroalglerin büyümesi ve nötral lipid içerikleri üzerine sıcaklık ve ışık şiddetinin etkisi**

Farklı ortamlarda inkübasyona bırakılan mikroalglerin nötral lipid içeriklerinde ortam sıcaklığına ve ışık şiddetine bağlı olarak meydana gelen değişimlerin belirlenmesi amacıyla yukarıda bahsedildiği şekilde kontrol dahil 7 değişik ortama ekilen mikroalgler; içerisi 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) ya da 15°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) sıcaklığa ayarlanmış veya 35 PAR ya da 250 PAR ışık şiddetine ayarlanmış iklimlendirme kabinlerinde 10 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerinde

örneklenen mikroalglerin büyüme (Şekil 3.21, 3.22) ve nötral lipid (Şekil 3.23, 3.24) içeriklerinde meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir.

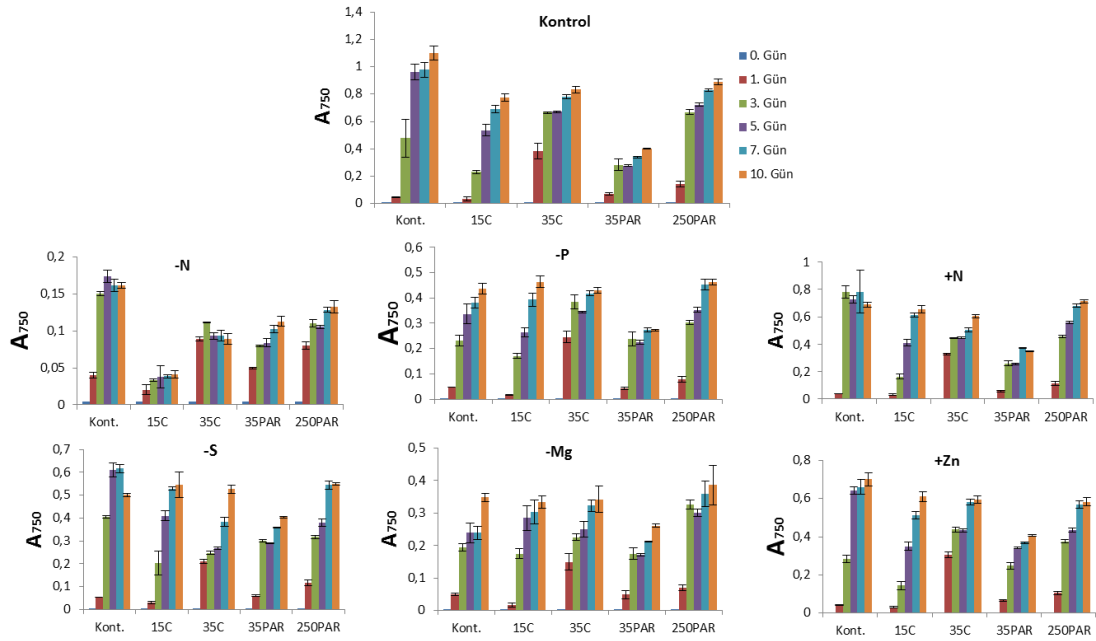


**Şekil 3.21.** Farklı element açlığı ya da bolluğu bulunan ortamlarda yetiştirilen mikroalglerin ortam sıcaklık ve ışık şiddeti değişimlerine cevapta büyümelerinde meydana gelen değişiklikler

Yukarıdaki şekilde gösterildiği gibi kontrol şartlarında (23°C sıcaklık ve 100 PAR ışık şiddeti) ortam element açlığı veya bolluğunda mikroalglerin büyümeleri değişik oranlarda baskılanmıştır. Kontrol şartlarında büyümenin en fazla ve en az baskılandığı gruplar N elementinin olmadığı ve bol miktarda bulunduğu ortamlardır. Ortam sıcaklık ve ışık şiddetinin düşük olduğu (15°C ve 35PAR) durumlarda kontrol grubunda da büyüme önemli düzeyde baskılandığından dolayı kontrol şartları (23°C



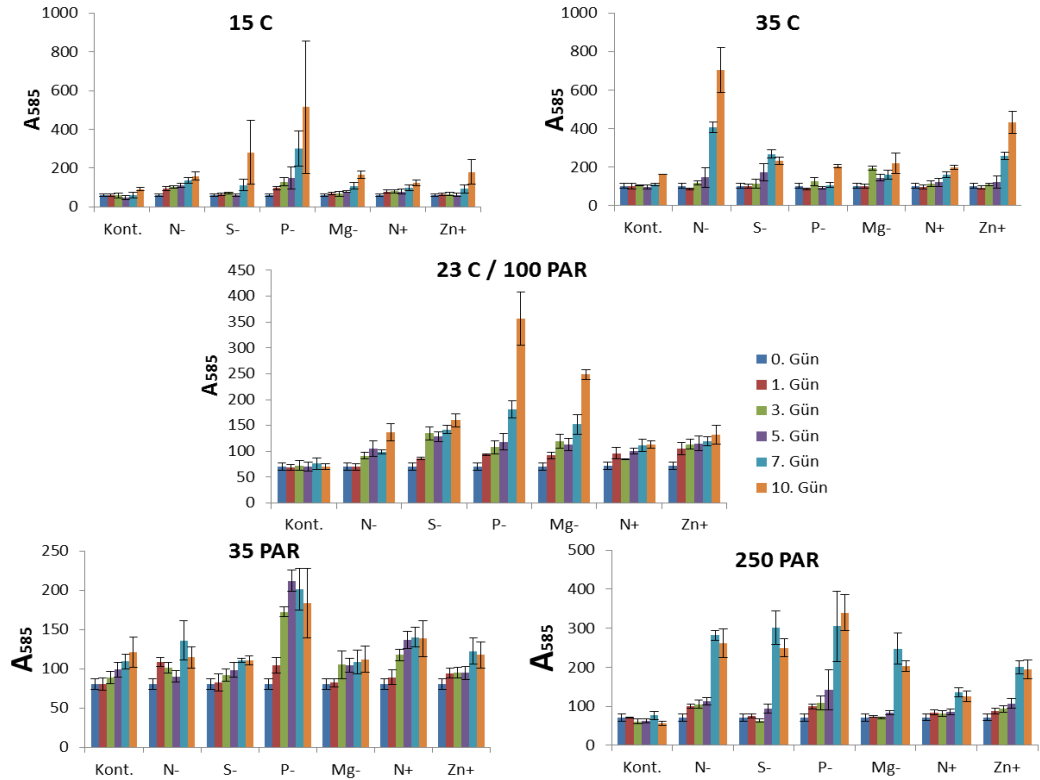
ve 100PAR) altında element manipulasyonu uygulanan mikroalglerin kontrollerine kiyasla aralarındaki büyüme farklılıkları oldukça azalmıştır. Diğer taraftan ortam sıcaklık ve ışık değeri artırıldığında (35°C ve 250 PAR) element manipulasyonu uygulanan mikroalgler ile kontrol grupları arasındaki büyüme farklılıklarında kontrol şartlarına kiyasla önemli bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 3.21). Böylece düşük sıcaklık ve ışık şiddetleri mikroalglerin büyümelerinde önemli sınırlayıcı etkenler olarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.22.** Farklı büyüme ortamlarında yetiştirilen mikroalglerin büyümeleri üzerine ortam sıcaklık ve ışık şiddetinin etkisi

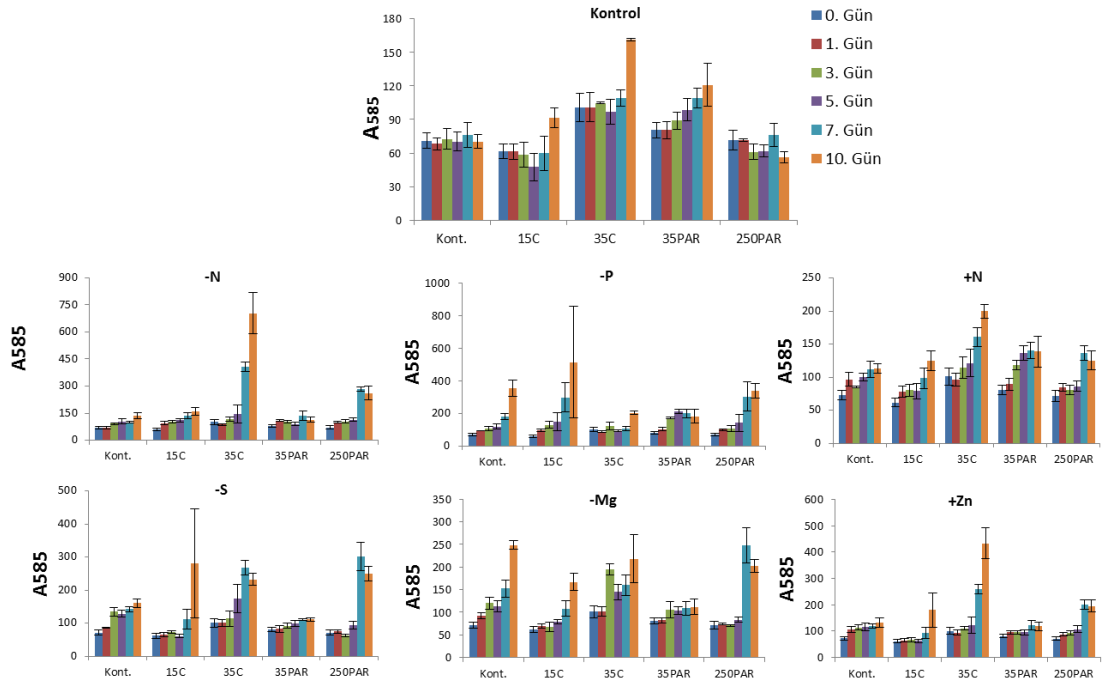
Ortam sıcaklık ve ışık şiddetleri değiştirildiğinde kontrol şartlarına kiyasla büyüme ortamında element manipulasyonu uygulanmış mikroalglerin büyümelerinde meydana gelen değişimlerin daha açık gösterilmesi amacı ile, element manipulasyonu uygulanan mikroalglerin farklı sıcaklık ve ışık şiddetleri altında yalnızca tek bir grupta meydana gelen büyüme oranlarındaki değişiklikler gösterilmiştir (Şekil 3.22). Şekil 3.22’de gösterildiği gibi kontrol, N ve S eksik, N ve Zn fazlalığı ortamlarında yetişen mikroalglerin büyümeleri ortam sıcaklık ve ışık

şiddeti değiştirildiğinde azalmış, düşük sıcaklık ve ışık şiddetleri altında büyümedeki azalma daha yüksek oranda gözlemlenmiştir. Ancak Mg ve P açlığında yetişen mikroalglerin büyümeleri sıcaklık ve ışık değişiminden etkilenmemiştir. Bu durum, bu element açlığında büyümede meydana gelen baskılanmanın, sıcaklık ve ışık değişiminde meydana gelen değişiklikler ile alakalı olabileceğini göstermekle beraber detaylı araştırmaya değer bir konudur. Genel manada mikroalgler stres şartları oluştuğunda büyümelerini yavaşlatarak karbonhidrat ve lipid stoklarını artırdıklarından dolayı ortam sıcaklık ve ışık şiddetindeki değişikliğin mikroalglerin nötral lipid içeriğini ve böylece biyodizel hammaddesi üretimini artıracakları düşünülmüştür. Bu sebeple ortam sıcaklık ve ışık yoğunluğunun değiştiği durumlarda farklı element manipülasyonu uygulanmış mikroalglerin nötral lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler ölçülmüştür (Şekil 3.23, 3.24).



**Şekil 3.23.** Farklı element açlığı ya da bolluğu bulunan ortamlarda yetiştirilen mikroalglerin ortam sıcaklık ve ışık şiddeti değişimlerine cevapta nötral lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler

Normal şartlar altında mikroalglerin nötral lipid içerikleri çalışılan tüm ortamlarda kontrole kıyasla artışlar göstermişti. Bu durumun, ortam sıcaklık ve ışık şiddetinin değiştiği durumlarda da benzer şekilde olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte bazı özgül farklılıklar da gözlemlenmiştir. Ortam sıcaklık ve ışık şiddetleri değiştirildiğinde kontrol şartlarına kıyasla büyüme ortamında element manipulasyonu uygulanmış mikroalglerin nötral lipid içeriklerinde meydana gelen değişimlerin daha açık gösterilmesi amacı ile, element manipulasyonu uygulanan mikroalglerin farklı sıcaklık ve ışık şiddetleri altında yalnızca tek bir grupta meydana gelen nötral lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir (Şekil 3.24).



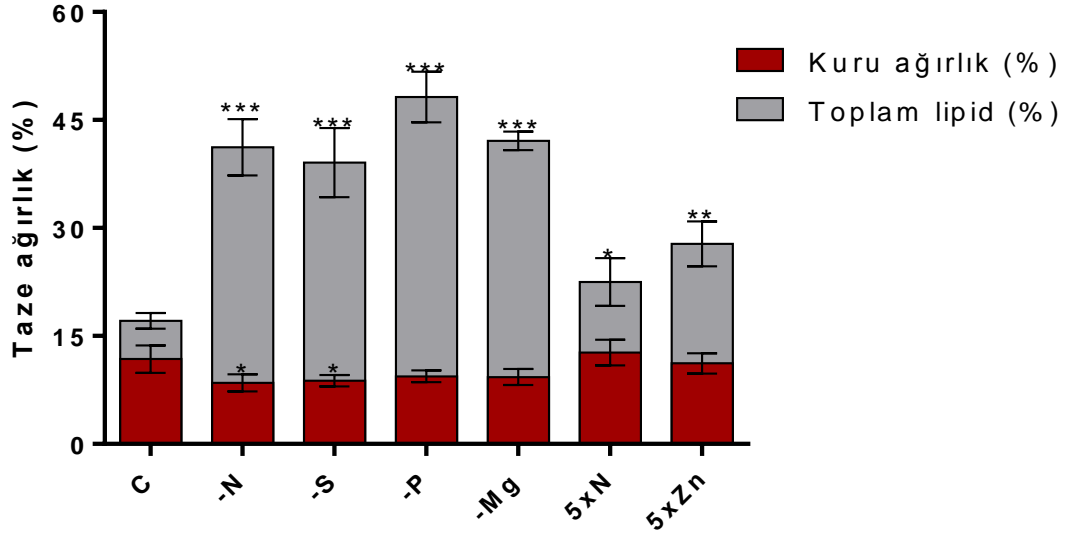
**Şekil 3.24.** Farklı büyüme ortamlarında yetiştirilen mikroalglerin nötral lipid içerikleri üzerine ortam sıcaklık ve ışık şiddetinin etkisi

Genel olarak ortam sıcaklığı artırıldığında tüm ortamlarda yetişen mikroalglerin nötral lipid içeriklerinde kontrol ortamında yetişenlere kıyasla artışlar belirlenmiştir. Ancak bazı grupta nötral lipid artışları oldukça yüksek düzeylerde

gerçekleşmiştir. Örneğin N açlığına bırakılan mikroalglerde 10. gün sonunda nötral lipid içerikleri kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1.95 kat artmış iken ortam sıcaklığı 35°C'ye çıkarıldığında nötral lipid içeriklerindeki artışlar aynı sıcaklıktaki kontrol grubuna göre 4.35 kat, kontrol ortamındaki N eksik gruba göre ise 7.1 kat daha yüksek olmuştur. Diğer taraftan P açlığına bırakılan mikroalglerin nötral lipid içerikleri kontrol şartları altında 10 günlük bir inkübasyonun sonunda kontrol gruplarına kıyasla yaklaşık olarak 5.1 kat artmış iken ortam sıcaklığı 15°C olan şartlarda aynı sıcaklıktaki kontrol grubuna göre ise 5.6 kat daha yüksek olmuştur (Şekil 3.23). Bu uygulamalarla elde edilen sonuçlar, element eksikliği sayesinde nötral lipid üretimindeki artışa rağmen meydana gelen büyüme hızındaki yavaşlamanın ortam sıcaklığı artırıldığında bir noktaya kadar giderilebildiğini göstermektedir.

#### **3.4. Büyüme ortamındaki element manipülasyonunun mikroalglerin toplam lipid üretimleri üzerine etkileri**

Mikroalglerin büyümesi ile ilgili değerlerle birlikte nötral lipid içeriğindeki artışın en yüksek ve nispeten uygun olduğu büyüme ortamları olarak belirlenen, içerisinde N, S, P ve Mg elementlerinin hiç bulunmadığı ve N ve Zn elementlerinin 5x konsantrasyonlarda buldukları ortamlarda inkübasyona bırakılarak inkübasyonun 10. gününde örneklenen mikroalglerin toplam lipid üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Mikroalg örneklerinin kuru ağırlıkları tayin edilmiş ve içerdikleri toplam lipid miktarı ile birlikte aynı şekil üzerinde gösterilmiştir. Şekil 3.25 incelendiğinde N ve S açlığına maruz bırakılan mikroalglerin kuru ağırlıkları kontrole kıyasla sırasıyla %28 ve %25.4 oranında azalmış buna karşın toplam lipid içerikleri sırasıyla 2.4 ve 2.3 kat artmıştır. Öte yandan P ve Mg açlığına bırakılan örneklerin kuru ağırlıkları kontrole kıyasla önemli bir değişim sergilememiş, oysa toplam lipid içerikleri sırasıyla 2.8 ve 2.5 kat artış göstermiştir. Yine ortam N ve Zn konsantrasyonu normalin 5 katı artırıldığında mikroalglerin kuru ağırlıklarında önemli bir değişim gözlemlenmezken toplam lipid içerikleri sırasıyla 1.3 ve 1.6 kat artmış, bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



**Şekil 3.25.** Ortam element açlığı ve bolluğuna cevapta mikroalglerin içerdikleri toplam lipid miktarı ve nispi kuru ağırlıklarında meydana gelen değişimler. İnkübasyonun 10. Gününde örneklenen mikroalgler kullanılmıştır

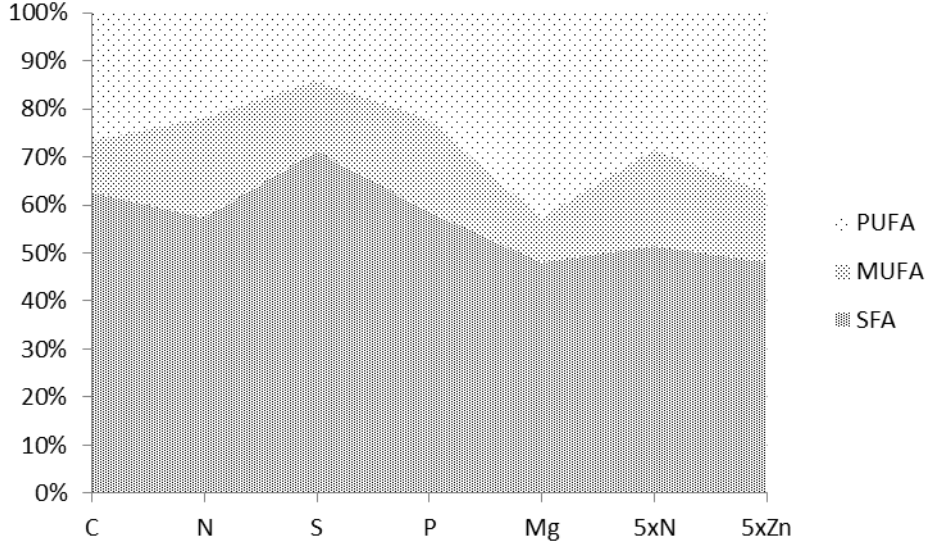
### 3.5. Büyüme ortamındaki element manipülasyonunun mikroalglerin içerdikleri yağ asidi metil ester (FAMES) profillerinde sebep olduğu değişimler

Mikroalglerin büyümesi ile ilgili değerlerle birlikte toplam ve nötral lipid içeriğindeki artışın en yüksek ve nispeten uygun olduğu büyüme ortamları olarak belirlenen, içerisinde N, S, P ve Mg elementlerinin hiç bulunmadığı ve N ve Zn elementlerinin 5x konsantrasyonlarda buldukları ortamlarda inkübasyona bırakılarak inkübasyonun 10. gününde örneklenen mikroalglerin FAMES profillerinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Daha önce yapılan ölçümlerde bu ortamlarda yetiştirilen mikroalglerin toplam ve nötral lipid içerikleri önemli oranda artmış, büyümedeki baskılanma da N açlığına bırakılan mikroalglerde çok

yüksek düzeyde olsa da diğer gruplarda nispeten makul oranlarda olduğu, dolayısı ile mikroalglerden biyodizel üretim amaçlı lipid eldesinde bu ortamların kullanılabilmesi kanısına varılmış idi. Ancak mikroalglerin ekstraksiyonu ile elde edilen yağın yağ asidi profillerinin de bilinmesi, biyodizel üretimi için önem taşımaktadır. Biyodizel üretilecek olan yağda doymuş yağ asitlerinin (SFA) ve tekli doymamış yağ asitlerinin (MUFA) yüksek oranda bulunması, diğer taraftan çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) de düşük oranlarda bulunması aranan bir özelliktir.

Şekil 3.26'da gösterildiği gibi kontrol ortamında kültüre alınan mikroalglerin toplam SFA, MUFA ve PUFA oranları sırası ile %62.5, %10.7 ve %26.8 olarak belirlenmiştir. Azot ve P açlığına bırakılan mikroalglerin kontrole kıyasla SFA (%57.2 ve %58.7) ve PUFA (%21.9 ve %22.2) oranları azalmış buna karşın MUFA (%20.9 ve %19.1) oranlarında artışlar belirlenmiştir. Bununla birlikte, S açlığında kültüre alınan mikroalglerin SFA (%71.1) ve MUFA (%14.7) oranları artmış ve bununla birlikte PUFA (%14.2) oranında da önemli bir azalma kaydedilmiştir. Öte yandan Mg açlığında kültüre alınan mikroalglerin MUFA konsantrasyonlarında (%9,1) önemli bir değişim olmamış, SFA içeriği (%48.1) önemli oranda azalmış, buna karşın PUFA içerikleri de (%42.8) dikkate değer düzeyde artmıştır.

Büyüme ortamında normalden 5 kat fazla N veya Zn elementi bulunduğunda mikroalglerin içerdikleri SFA konsantrasyonları (%51.4 ve %48.3) azalmış, buna karşın MUFA konsantrasyonları (%20.1 ve % 14.4) artmıştır. Diğer taraftan PUFA konsantrasyonu N fazlalığında (%28.5) kontrole kıyasla önemli bir değişim sergilememiş, ancak Zn fazlalığında (%37.3) önemli oranda artmıştır (Şekil 3.26).



**Şekil 3.26.** Ortam element açlığı ve bolluğuna cevapta mikroalglerin içerdikleri doymuş, tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asidi oranlarında meydana gelen değişimler. İnkübasyonun 10. gününde örneklenen mikroalgler kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

Çizelge 3.1’de mikroalglerin FAMES değerleri yüzde olarak sunulmuş (a), ayrıca mikroalglerin içerdikleri FAMES değerleri sayısal olarak ( $\mu\text{g}$  FAMES/mg liyofilize hücre) verilmiştir (b). Çizelge 3.1 incelendiğinde, ortam element yokluğu veya bolluğuna cevapta kontrol grubunda belirlenmiş olan yağ asidi metil esterlerin oranlarında değişiklik olmasının yanında bazı yağ asitlerinin belirlenemediği ve kontrol grubunda olmayan bazı yağ asidi metil esterlerinin de farklı oranlarda ortaya çıktığı görülebilir. Kontrol grubunun içerdiği FAMES içerisinde en yüksek oranı doymuş yağ asitleri (SFA) olan Palmitik asit ve Stearik asit oranları yaklaşık olarak %32.3, %29.2, çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) olan Linolenik asit ve tekli doymamış yağ asidi (MUFA) olan Oleik asit sırasıyla %21.1 ve %8.3 çokluğu ile oluşturmaktadır. Mikroalglerin büyüme ortamlarında N veya S elementi çıkarıldığında mikroalglerin içerdikleri bu yağ asitleri yüzdeleri sırası ile %43.3 ve %39.3 oranlarında Palmitik asit, %12.9 ve 30.6 oranlarında Stearik asit, %4.3 ve 3.7 oranlarında linolenik asit ve %19.3 ve 11.6 oranlarında da Oleik asit oluşturmaktadır. Burada çarpıcı olan sonuç doymuş yağ asidi oranlarında önemli artışların yanında doymamış yağ asidi içeriğinde de önemli oranda düşüşler gerçekleşmiştir. Ancak tekli doymamış yağ asidi içeriğinde artış olmasının yanında bir başka çoklu

doymamış yağ asidi olan linoleik asit yoğunluğunun da artması idi. Kontrol grubunda yaklaşık olarak %4.75 oranında bulunan linoleik asit yüzdesi N ve S açlıklarında sırası ile %15.4 ve %7.2'ye kadar artışlar göstermiştir (Çizelge 3.1.a, Çizelge 3.1.b).

Büyüme ortamında P elementi bulunmadığı durumda mikroalglerin içerdikleri Palmitik asit ve Stearik asit konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişme kaydedilmemiştir. Bu grup mikroalglerin içerdikleri Linolenik asit konsantrasyonunda %46 oranlarında azalma belirlenmiş, doymamış yağ asitleri olan Oleik asit ve Linoleik asit konsantrasyonlarında sırası ile yaklaşık olarak %80 ve %104 oranında artışlar ölçülmüştür. Öte yandan Mg açlığına bırakılan mikroalglerin Palmitik asit ve Linolenik asit içeriklerinde önemli bir değişim belirlenmemesine rağmen Stearik asit içerikleri yaklaşık olarak %48 oranında azalmış bu durumun P açlığına bırakılan mikroalglerdekine benzer olduğu kaydedilmiştir. Ancak bu grup mikroalglerde kontrol grubunda belirlenmemesine karşın bir başka çoklu doymamış yağ asidi olan Palmitoleik asit ve Eikosatrienoik asit sırası ile %7.2 ve 2.3 oranlarında, ve bir tekli doymamış yağ asidi olan Hipogeik asit %1.3 oranında ortaya çıkmış, bununla birlikte Oleik asit içeriği de yaklaşık olarak %37 oranında azalmıştır (Çizelge 3.1.a, Çizelge 3.1.b).

Büyüme ortamlarında normalden 5 kat fazla konsantrasyonda N veya Zn elementi bulunduğu durumlarda mikroalglerin içerdikleri Palmitik asit konsantrasyonlarında önemli bir değişim belirlenmemiş, buna karşın Stearik asit ile Linolenik asit konsantrasyonlarında kontrole kıyasla sırası ile yaklaşık olarak %39 ve %45 ile %24 ve %20 oranlarında azalmalar kaydedilmiştir. Yine ortam N konsantrasyonu artırıldığında kontrol grubunda belirlenmemesine karşın çoklu doymamış yağ asitleri olan Palmitoleik asit, Heksadekatrienoik asit, Eikosatrienoik Asit ve tekli doymamış yağ asitleri olan 7-Oktadesenoik asit, Hipogeik asit ve Nevronik asit bileşikleri dikkate değer oranlarda ortaya çıkmıştır. Öte yandan ortam Zn konsantrasyonu artırıldığında da kontrol grubunda rastlanamamasına rağmen çoklu doymamış yağ asitleri olan Palmitoleik asit, Heksadekatrienoik asit, Eikosatrienoik Asit ve Eikosapentaenoik asit ile tekli doymamış yağ asidi olan Lignoserik Asitin önemli oranlarda olduğu belirlenmiştir.

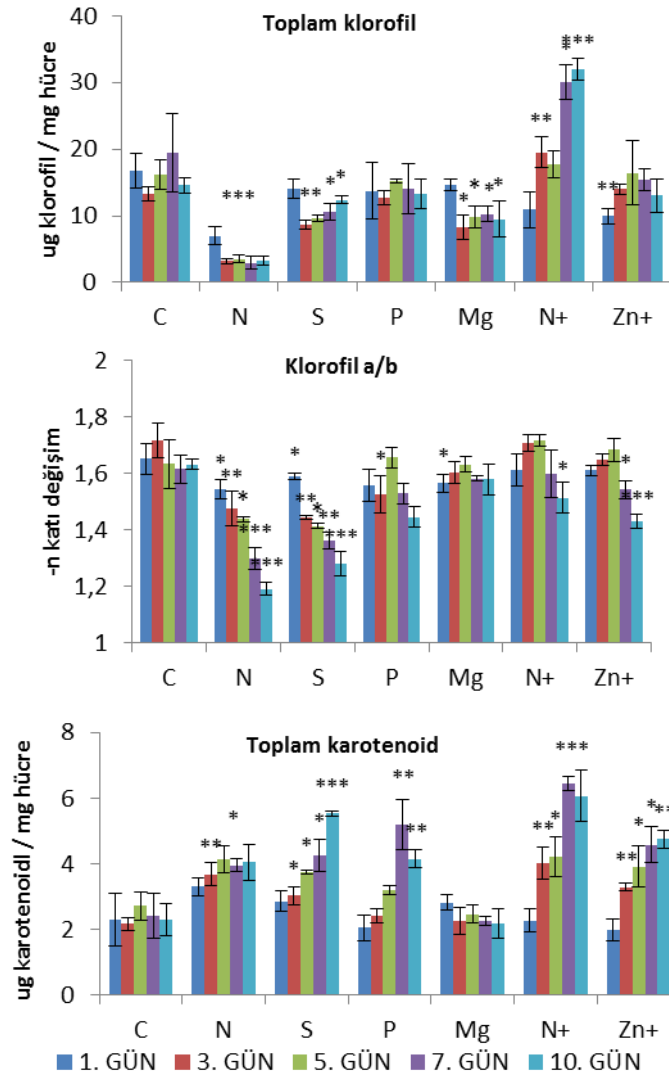


**Çizelge 3.1.a, b.** Mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen yüzde (a) ve miktarsal (b) değişimler

a)	FAMES		Doğası	% oran (Ortalama ± Standart Sapma)						
				C	-N	-S	-P	-Mg	5xN	5xZn
	Myristik asit	14:0	SFA	0,55±0,1	0,9±0,15	---	---	---	---	0,2±0,03
	Pentadekanoik asit	15:0	SFA	0,6±0,05	---	1,3±0,2	0,8±0,1	1,8±0,3	0,8±0,1	---
	Palmitik asit	16:0	SFA	32,3±3,4	43,3±1,1	39,3±2,5	33,3±4,1	31,3±3	32,7±5,1	32,3±4,1
	Palmitoleik asit	16:2	PUFA	---	---	---	---	7,2±0,8	2,8±1,1	1±0,2
	7 Hekzadesenoik asit	16:1	MUFA	2,4±0,6	1,7±0,4	2,9±0,4	4,3±1,3	2,6±0,5	2,9±1,2	1,6±0,2
	7,10-heksadekadienoik asit	16:2	PUFA	0,9±0,05	2,2±0,3	1±0,2	1,1±0,2	1,1±0,1	1,1±0,2	3,1±0,3
	7,10,13 Heksadekatrienoik asit	16:3	PUFA	---	---	---	---	---	0,5±0,06	1,7±0,6
	Hipogeik asit	16:1	MUFA	---	---	---	---	1,3±0,2	3,2±0,7	---
	Stearik Asit	18:0	SFA	29,2±6,4	12,9±1,2	33±5,8	24,5±5,8	15±2,1	17,9±2,4	16,3±3,1
	Lignoserik Asit	18:1	MUFA	---	---	---	---	---	---	3,4±0,6
	7-Oktadesenoik asit	18:1	MUFA	---	---	---	---	---	3,3±1,1	---
	Oleik asit	18:1	MUFA	8,3±2,1	19,3±0,5	11,6±2,7	14,9±2,7	5,2±1,2	10,4±1,4	9,5±2,3
	Linoleik asit	18:2	PUFA	4,65±1,1	15,4±0,2	7,2±0,9	9,7±1	5,8±0,8	6,3±1,2	9,1±1,9
	Linolenik Asit	18:3	PUFA	21,1±5,4	4,3±0,2	3,7±1	11,2±3,2	26,4±4,1	16,1±2,6	16,8±2,8
	Araşidik asit	20:0	SFA	---	---	---	0,2±0,01	---	---	---
	11,14,17 Eikosatrienoik Asit	20:3	PUFA	---	---	---	---	2,3±0,4	1,7±0,3	1,6±0,2
	Eikosapentaenoik asit	20:5	PUFA	---	---	---	---	---	---	3,4±0,9
	Nevronik asit	24:1	MUFA	---	---	---	---	---	0,3±0,04	---
b)	FAMES		Doğası	ug/mg liyofilize hücre						
				C	-N	-S	-P	-Mg	5xN	5xZn
	Myristik asit	14:0	SFA	0,35±0,01	1,5±0,2	---	---	---	---	0,2±0,03
	Pentadekanoik asit	15:0	SFA	0,45±0,06	---	0,9±0,1	1±0,3	1,3±0,3	0,6±0,1	---
	Palmitik asit	16:0	SFA	26,8±1,4	39,6±4,2	27,4±3,5	43,6±5,1	32,6±4,5	24,7±4,1	25,6±2,8
	Palmitoleik asit	16:2	PUFA	---	---	---	---	6,1±0,9	2,1±0,3	0,9±0,1
	7 Hekzadesenoik asit	16:1	MUFA	1,8±0,2	1,6±0,5	2±0,2	5,4±0,9	1,8±0,5	1,66	1,4±0,3
	7,10-heksadekadienoik asit	16:2	PUFA	0,7±0,04	2,2±0,4	0,6±0,1	1,5±0,2	1±0,2	0,94	2,7±0,3
	7,10,13 Heksadekatrienoik asit	16:3	PUFA	---	---	---	---	---	---	1,5±0,5
	Hipogeik asit	16:1	MUFA	---	---	---	---	2,8±0,4	2,89	---
	Stearik Asit	18:0	SFA	25,9±1,1	11,4±1,1	24,4±2,1	31,5±5,2,7	18,3±3,6	13,04	12,6±2,3
	Lignoserik Asit	18:1	MUFA	---	---	---	---	---	---	1,5±0,2
	7-Oktadesenoik asit	18:1	MUFA	---	---	---	---	---	2,27	---
	Oleik asit	18:1	MUFA	6,6±0,2	17,6±6,5	7,7±2,1	19,5±1,6	5,4±1,1	7,48	8,6±2,1
	Linoleik asit	18:2	PUFA	3,9±1,4	14,2±3,4	4,3±1,4	12,7±1,3	5,4±1,3	4,52	8,2±1,1
	Linolenik Asit	18:3	PUFA	17,7±1,1	4,1±1,1	3,5±1,2	15,4±4,5	25,2±3,5	13,68	15±2,3
	Araşidik asit	20:0	SFA	---	---	---	0,1±0,02	---	---	---
	11,14,17 Eikosatrienoik Asit	20:3	PUFA	---	---	---	---	4,8±0,7	1,15	1,5±0,2
	Eikosapentaenoik asit	20:5	PUFA	---	---	---	---	---	---	3,6±0,7
	Nevronik asit	24:1	MUFA	---	---	---	---	---	0,20158	---

### **3.6. Mikroalglerin içerdikleri klorofil ve karotenoid miktarlarında meydana gelen değişimler**

Mikroalgler metabolik faaliyetleri ve dolayısıyla çoğalmaları için fotosenteze ihtiyaç duyarlar. Fotosentez yapma etkinlikleri yapılarında buldukları klorofil ve karotenoid miktarları ile paralellik gösterir. Stres altında mikroalgler metabolik aktivitelerini yavaşlatırlar hatta zigot oluştururlar, dolayısıyla fotosentez hızını da yavaşlatmak için stres altında mikroalglerin çoğunlukla klorofil içeriklerini azaltmaları beklenen bir sonuçtur. Yapılan ölçümlerde mikroalglerin toplam klorofil içerikleri N, S ve Mg açlığına bırakılan örneklerde azalmış, N elementinin fazla bulunduğu durumlarda ise özellikle ilerleyen 7 ve 10. günlerde artış göstermiştir. Klorofil içeriğinde en önemli azalma N açlığına bırakılan örneklerde gözlemlenmiştir. Kükürt ve Mg açlığına cevapta mikroalglerin klorofil içeriklerinde ilk gün meydana gelen düşüş istatistiksel olarak önemsiz bulunmuş, diğer günlerde yapılan ölçümler sonucu elde edilen değerler klorofil içeriğinin kontrole kıyasla önemli oranda azaldığını göstermiştir. Öte yandan P açlığına maruz bırakılan mikroalglerin klorofil içeriklerinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemli bir değişim kaydedilmemiştir. Çinko fazlalığına cevapta klorofil içeriği ilk gün düşük olarak bulunsa da ilerleyen günlerde yapılan ölçümler kontrole kıyasla bu grup mikroalglerde klorofil içeriğinin önemli oranda değişmediğini göstermiştir (Şekil 3.27). Diğer taraftan klorofil a / klorofil b oranları N ve S açlığında ilk günden itibaren, Zn ve N fazlalığında ise inkübasyonun süresinin uzaması ile önemli oranda azalmalar göstermiştir (Şekil 3.27). Bununla birlikte klorofil a/b oranı P ve Mg açlığına cevapta lineer bir değişim göstermemiştir.

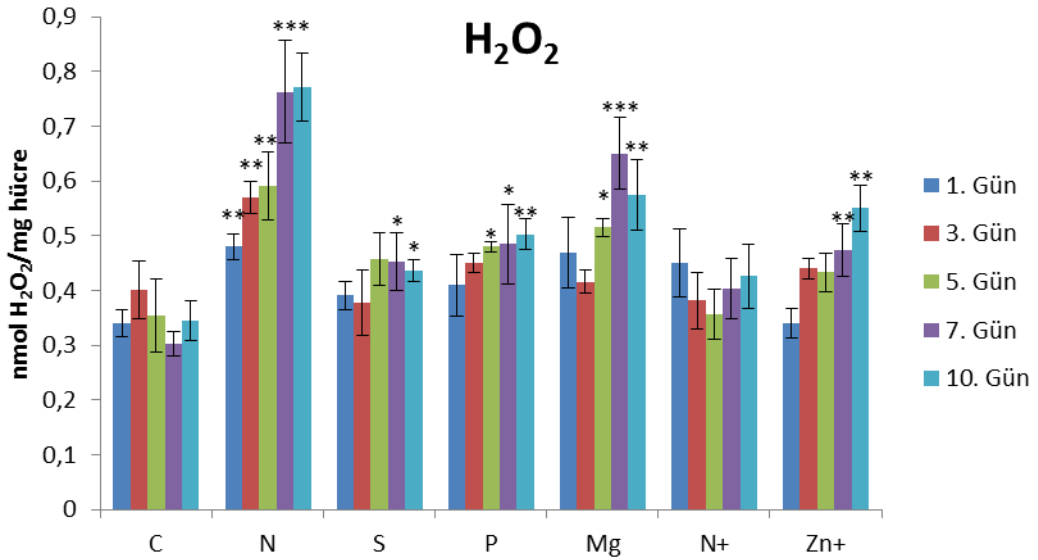


**Şekil 3.27.** Mikroalglerin toplam klorofil, klorofil a/b ve toplam karotenoid içeriklerinde meydana gelen değişimler

Yapılan ölçümler genel olarak strese cevapta mikroalglerin karotenoid içeriklerinin arttığını göstermiştir. Karotenoidler fotosentezdeki işlevlerinin yanı sıra önemli antioksidant moleküllerdir. Dolayısıyla stresin süresi arttıkça karotenoid içeriğinin artması şaşırtıcı bir sonuç değildir. Yapılan tüm uygulamalarda stresin süresi uzadıkça mikroalglerin karotenoid içeriklerinde lineer artışlar gözlemlenmiştir. Ancak Mg açlığında ilk günden itibaren önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir (Şekil 3.27).

### 3.7. Mikroalglerin içerdikleri Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) konsantrasyonunda meydana gelen değişimler

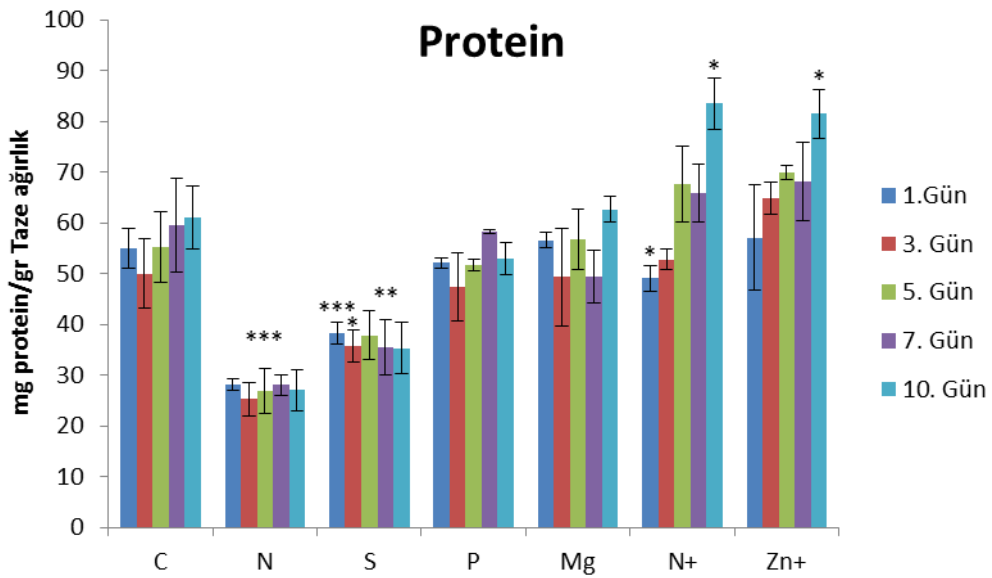
Canlı organizmalar strese maruz kaldıklarında reaktif oksijen türlerinin salınımı artar ve eğer reaktif oksijen türleri etkili bir biçimde temizlenemez ise meydana gelen oksidatif stres organizmayı ölüme sürükleyebilir. Farklı element manipulasyonlarına cevapta mikroalglerde meydana gelen oksidatif stresin düzeyini belirlemek amacı ile bu araştırmada farklı günlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları ölçülmüştür. Şekil 3.28 'de gösterildiği gibi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı, N açlığına bırakılan mikroalglerde ilk günden itibaren önemli oranda artmıştır. Öte yandan S, P ve Mg açlığına bırakılan mikroalgler ile Zn fazlalığında ilk günlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarlarında önemli bir değişim gözlemlenmemiş olsa da 7. ve 10. günlerde önemli oranda artmıştır.



Şekil 3.28. Mikroalglerin yapısında bulundurdukları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarlarında meydana gelen değişimler

### 3.8. Mikroalglarin protein içeriklerinde meydana gelen değişimler

Enzimler, protein yapıda olduklarından dolayı mikroalglerde meydana gelen enzim aktivitesindeki değişimleri belirlemek için metod kısmında belirtildiği gibi protein ekstraksiyonu yapılmış ve ekstraktlardaki protein miktarları ölçülmüştür. Böylece hem protein konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler belirlenmiş ve hem de enzim aktivitesi ölçümü için hesaplamalarla farklı hacimlerde, ancak eşit miktarda proteinde bulunan çözeltilerde enzim aktivitelemi tayin edilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre N ve S açılığına bırakıldığında mikroalglarin içerdikleri protein konsantrasyonu düşmüş, N ve Zn elementlerinin normalden 5 kat yüksek miktarda bulunduğu ortamlarda artış göstermiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. Mikroalglarin protein içeriklerinde meydana gelen değişimler

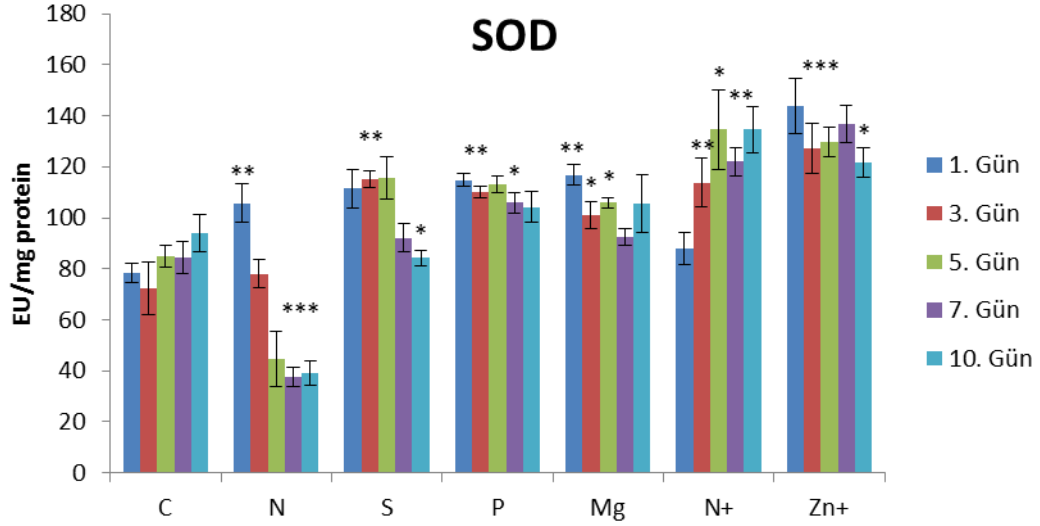
### 3.9. Mikroalglarin antioksidant enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler

Farklı ortamlarda (N, S, P, ve Mg elementlerinin hiç olmadığı, N ve Zn elementlerinin 5x konsantrasyonda buldukları) inkübe edilen mikroalglarin

antioksidant enzim aktivitelerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Antioksidant enzimlerden SOD, iki süperoksit molekülünü hidrojen peroksit ve oksijene indirgemekte ve hidrojen peroksit molekülü de çoğunlukla CAT enzimi tarafından etkili bir şekilde suya dönüştürülmektedir. Dolayısıyla mikroalglerde element açlığına ve fazlalığına cevapta meydana gelen oksidatif stresin düzeyinin belirlenmesinde  $H_2O_2$  miktarındaki değişimin yanında antioksidant enzim aktivitelerindeki değişim de önemli yer tutar.

### **3.9.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesinde meydana gelen değişimler**

Süperoksit Dismutaz enzim aktivitesi element açlığına cevapta inkübasyonun ilk gününde önemli artışlar sergilemiştir. Ancak inkübasyon süresi ile birlikte aktivitede zayıflama başlamış, 10 günlük inkübasyon periyodunun sonunda element açlığına cevapta mikroalglerde ölçülen SOD aktiviteleri kontrol ile kıyaslandığında ya düşük (N ve S açlıkları) çıkmış veya önemli bir farklılık belirlenmemiştir (P ve Mg açlıkları). N ve S açlığı uygulanmış mikroalglerde SOD aktivitesi kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 3.30). Azot ve S açlığına cevapta inkübasyonun ilk günü SOD aktivitesi sırasıyla %34.8 ve %42 oranlarında artmış olmasına rağmen aktivite, ilerleyen günlerde düşmüş ve inkübasyonun son günü SOD aktivitesinin bu gruplarda kontrole kıyasla %58.2 ve %10.3 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 3.30). Son olarak ortam N ve Zn bolluğuna cevapta aktivite düzeyinde önemli artışlar gözlemlenmiştir. İnkübasyonun ilk gününde N bolluğuna cevapta önemli bir değişim belirlenmezken ilerleyen günlerdeki lineer artış inkübasyonun sonuna kadar sürmüştür ve inkübasyonun sonunda % 46 oranında bir artış kaydedilmiştir. Zn bolluğuna cevapta ise inkübasyonun ilk gününde SOD aktivitesinde çok önemli düzeyde bir artış belirlenmiştir (%83.4) ancak ilerleyen günlerde aktivite ilk güne oranla zayıflasa da on günlük inkübasyon periyodunun sonunda kontrol grubuna kıyasla %32.3 oranında bir artış kaydedilmiştir (Şekil 3.30).

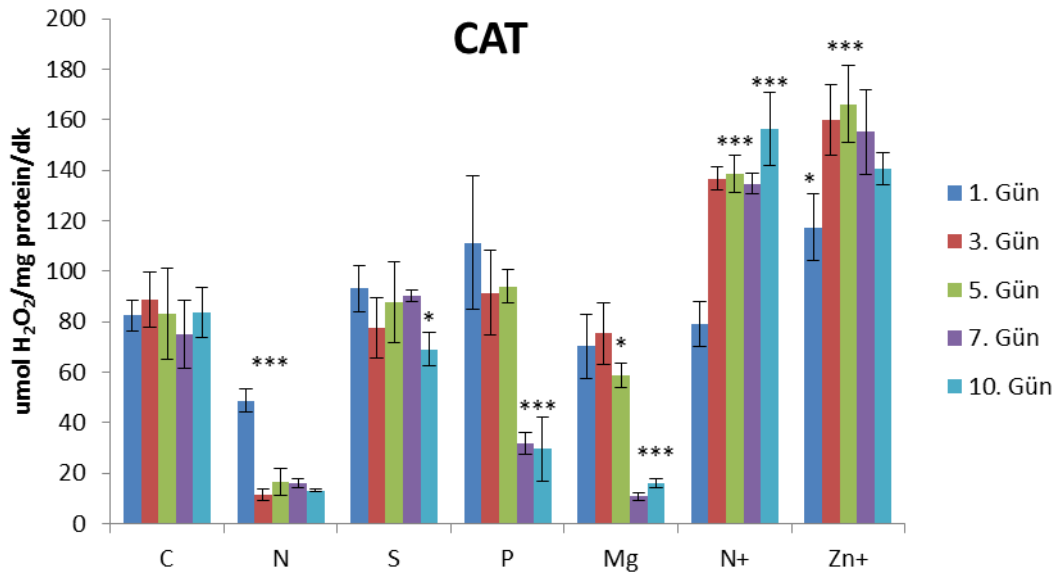


Şekil 3.30. Süperoksit Dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler

### 3.9.2. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) aktivitesinde meydana gelen değişimler

Yapılan ölçümlerde N açlığına bırakılan hücrelerde  $H_2O_2$  miktarı artmış olmasına rağmen CAT enzim aktivitesi de ilk günden itibaren önemli oranda düşmüştür. Azot açlığına cevapta CAT aktivitesi inkübasyonun ilk gününde kontrole kıyasla % 40.8 oranında azalmış, aktivitedeki azalma lineer olarak devam etmiş ve 10 günlük inkübasyon sonrasında aktivitedeki azalma %84.2 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.31). Kükürt açlığına bırakılmış olan mikroalglerde CAT aktivitesi önemli bir değişim sergilememiştir. Diğer taraftan P açlığına bırakılan mikroalglerde ilk günlerdeki değişim önemli bulunmamış olsa da takip eden günlerde aktivitede keskin düşüşler gözlemlenmiş bu düşüşler istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Yine Mg açlığında ilk günlerde CAT enzim aktivitesi önemli bir değişiklik göstermemiş olsa da 5. günden itibaren dikkate değer azalmalar belirlenmiştir. Katalaz enzimi  $H_2O_2$ 'in temizlenmesinde en önemli enzimdir. Bu enzimin aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bulunmasa da S, P ve Mg açlığında bazı durumlarda önce artış, sonra önemli

oranda azalma görülmesi, N açlığında da ilk günden itibaren önemli bir düşüşün gözlemlenmesi durumu mikroalglerin bu ortamlarda ilk günlerde antioksidan enzim sistemlerini aktive ederek başa çıkmaya çalıştıklarını, ancak ilerleyen günlerde hayati faaliyetlerini yavaşlattıklarını göstermektedir. Nitekim ortamda 5 kat fazla konsantrasyonda N bulunduğunda CAT aktivitesi ilk günün sonunda önemli bir değişim sergilememiş olsa da ilerleyen sürelerde aktivitede lineer bir artış gözlemlenmiş, 10 günlük inkübasyon periyodunun sonunda CAT aktivitesindeki artış kontrole kıyasla %87 olarak ölçülmüştür. Yine Zn fazlalığına cevapta ilk günde önemli bir değişim belirlenmezken CAT aktivitesi ilerleyen günlerde önemli oranda artmış, ancak inkübasyonun sonuna yaklaştığında aktivitedeki değişim aşağı yönde eğilim göstermiştir. Buna rağmen inkübasyonun 10. gününde CAT aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla %84.6 oranında artış kaydedilmiştir (Şekil 3.31).

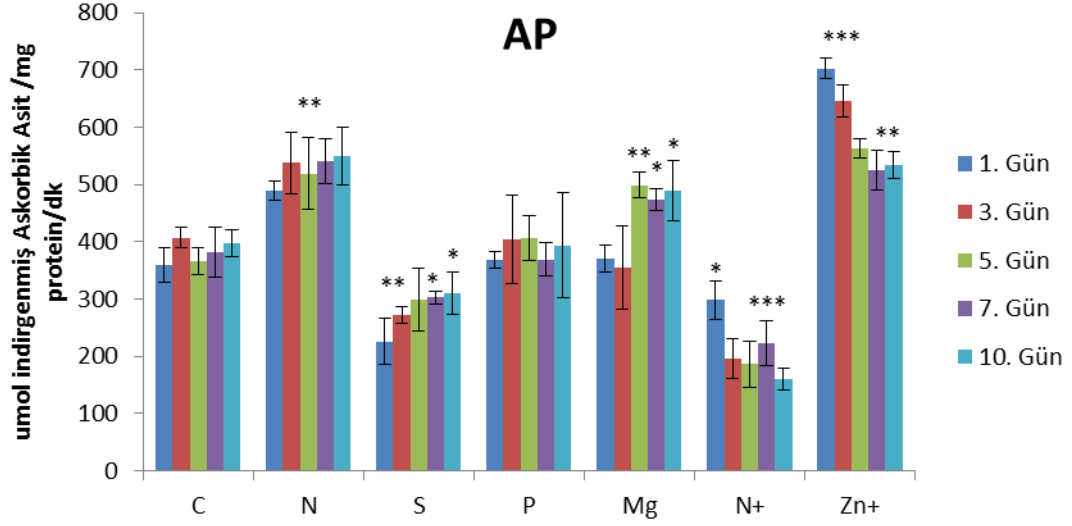


**Şekil 3.31.** Katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler



### **3.9.3. Askorbat Peroksidaz (AP; EC 1.11.1.11) enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler**

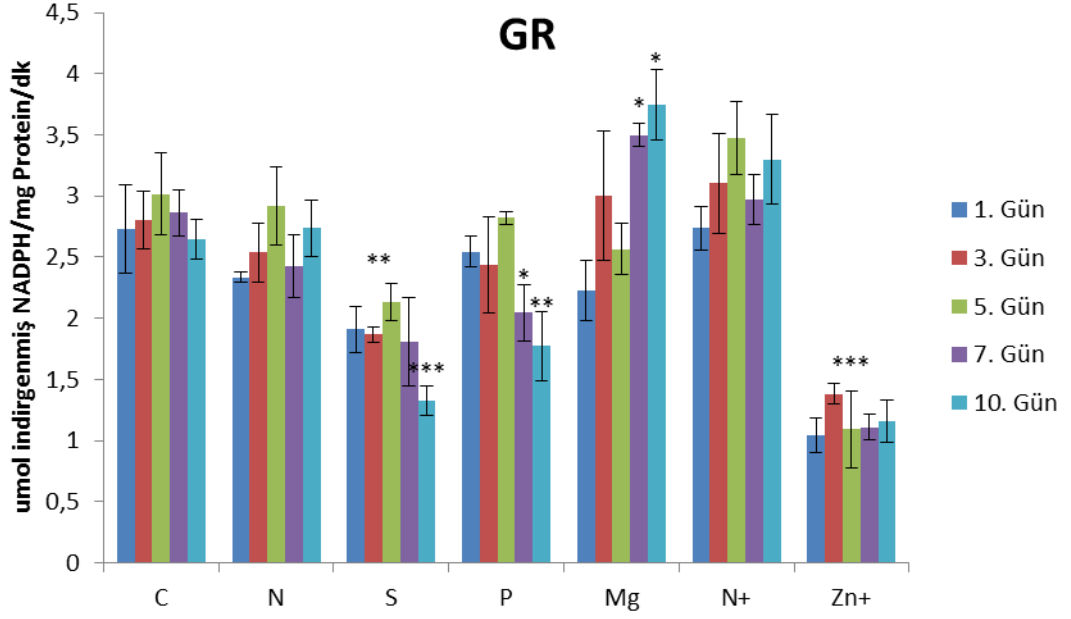
AP enzim aktivitesi N açlığına bırakılmış grupta ilk günden itibaren önemli oranda artmıştır. İnkübasyonun ilk gününde yaklaşık olarak %36 oranında meydana gelen artış inkübasyonun son gününde %38.5 olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.32). Kükürt açlığına cevapta AP aktivitesi ilk günde önemli oranda düşmüş (%37.2), diğer günlerde de yine değerlerin kontrole kıyasla düşük olduğu belirlenmiştir (inkübasyonun on gününde %22). Magnezyum açlığında enzim aktivitesi ilk günlerde önemli bir değişim gözlemlenmezken ilerleyen günlerde artmış ve inkübasyonun son gününde aktivitedeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer taraftan P açlığında AP aktivitesi önemli bir değişim sergilememiştir. İlginç bir şekilde mikroalglerde ölçülen AP aktivitesi N bolluğunda ilk günden itibaren kontrole kıyasla azalmıştır. Bu grup mikroalglerin AP aktivitesinde inkübasyonun ilk gününde %17.2 oranında belirlenen azalmanın ilerleyen günlerde de sürdüğu ve aktivitedeki düşüşün inkübasyonun son gününde kontrol ile kıyaslandığında %60 oranında olduğu belirlenmiştir. Oysa bu grup mikroalglerde CAT aktivitesi yine ilk günden itibaren önemli oranda artış göstermiştir. Bu sonuç tartışma kısmında detaylı bir şekilde irdelenmiştir. Son olarak Zn bolluğunda AP aktivitesi ilk günde çok önemli oranda artmış (%95.2), ancak ilerleyen günlerde aktivitedeki artışta lineer bir azalma kaydedilmiştir.



Şekil 3.32. Askorbat Peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler

#### 3.9.4. Glutasyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler

Glutasyon Redüktaz enzim aktivitesi N açlığı veya bolluğuna cevapta önemli bir değişim sergilememiştir. Bununla birlikte aktivite, S açlığına bırakılmış mikroalgler ile Zn bolluğunda inkübasyona alınan mikroalg gruplarında ilk günden itibaren önemli oranda azalmıştır. Diğer taraftan Mg ve P açlığına bırakılmış olan mikroalglerde ilk günlerde GR aktivitesinde kontrole kıyasla önemli bir değişim kaydedilmemiş olmasına rağmen inkübasyonun son günlerinde aktivite P açlığında düşerken Mg açlığında istatistiksel olarak anlamlı artışlar kaydedilmiştir.



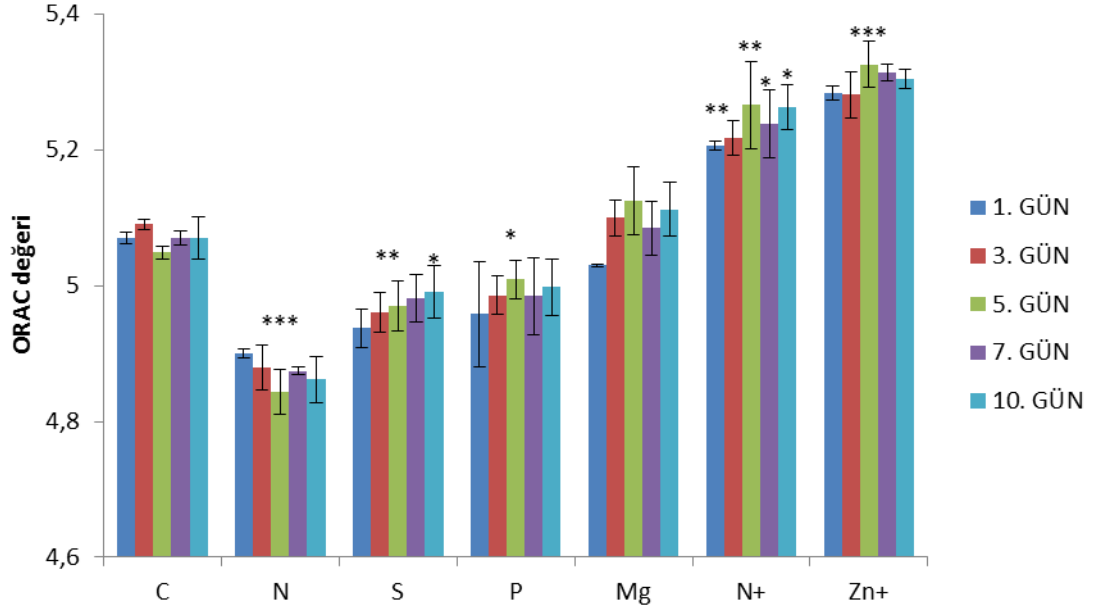
**Şekil 3.33.** Glutasyon Redüktaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler

Genel olarak değerlendirildiğinde, CAT ve AP her ikisi de  $H_2O_2$  moleküllerini elimine etmeye çalışırlar ancak CAT enziminin  $H_2O_2$  moleküllerine olan afinitesi daha düşüktür (Miller ve Cramer, 2005). N açlığına bırakılmış hücrelerde  $H_2O_2$  konsantrasyonunun ve AP aktivitesinin yüksek, ancak CAT aktivitesinin düşük olması, oksidatif stresin ileri boyutta olduğunu göstermektedir.

### 3.10. Mikroalglerin toplam antioksidant kapasitelerinde (Oksijen radikali süpürme etkinlikleri) meydana gelen değişimler

Farklı stres ortamlarında mikroalglerin  $H_2O_2$  ve antioksidant enzim aktivitelerini belirledikten sonra, enzimatik yapıda olmayan antioksidant moleküllerin aktivasyon durumlarını belirlemek üzere mikroalglerin oksijen radikal süpürme kapasiteleri de (ORAC) ölçülmüştür. Şekil 3.34'de de gösterildiği gibi genel olarak element açlığına bırakılan mikroalglerin ORAC değerleri düşmüş, element fazlalığında da artmıştır. Element açlığı uygulamaları içerisinde ORAC değeri N açlığına maruz bırakılan mikroalglerde en düşük bulunmuştur. Bu durum, element açlığının mikroalglerde

geniş çaplı oksidatif hasara sebep olduğunu, ancak element fazlalığında enzimatik ve non-enzimatik yapıda antioksidant moleküllerinin aktivasyonunu artırarak muhtemel oksidatif stres ile mücadele edebildiklerini gösterir.

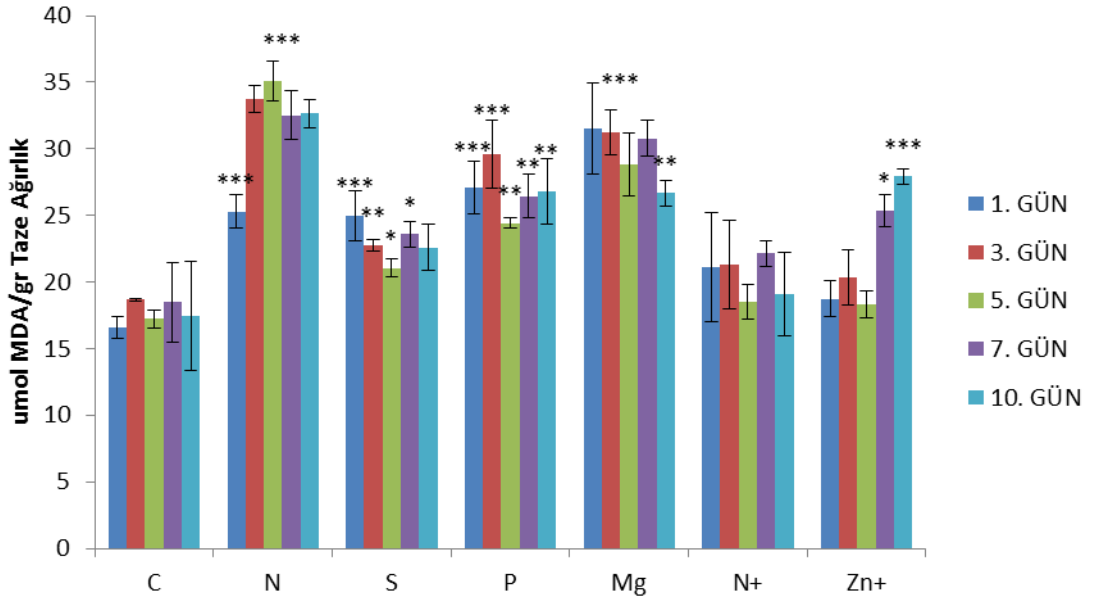


**Şekil 3.34.** Mikroalglerin oksijen radikal absorban kapasitelerinde (ORAC) meydana gelen değişiklikler

### 3.11. Mikroalglerin lipid peroksidasyonu düzeylerinde meydana gelen değişimler

Herhangi bir stres koşulu altında salınımı hızlanan reaktif oksijen türleri eğer etkili bir biçimde temizlenemez ise ilk olarak meydana gelen hasarların başında lipidlerin oksitlenmesi ile oluşan malonildialdehitli (MDA) bileşikler gelir. Bu bilgiden hareketle, uyguladığımız farklı element manipülasyonları nedeniyle meydana gelen muhtemel oksidatif hasarın düzeyinin belirlenmesi amacı ile farklı zamanlarda hasat edilen mikroalglerin içerdikleri MDA'lı bileşik miktarları tayin edilmiştir. Şekil 3.35'de de gösterildiği gibi element açlığına cevapta MDA'lı bileşiklerin konsantrasyonlarında ilk günden itibaren önemli artışlar gerçekleşmiştir. Element

fazlalığı bulunan ortamlardan N fazlalığında önemli bir değişim gözlemlenmez iken, Zn fazlalığında ilk günlerde önemli bir değişim olmasa da ilerleyen 7. ve 10. günlerde MDA'lı bileşiklerin konsantrasyonlarında artış gözlemlenmiştir. Bu durum, mikroalglerin oksidatif stres ile ilgili ölçülen diğer parametreler ile örtüşmektedir.

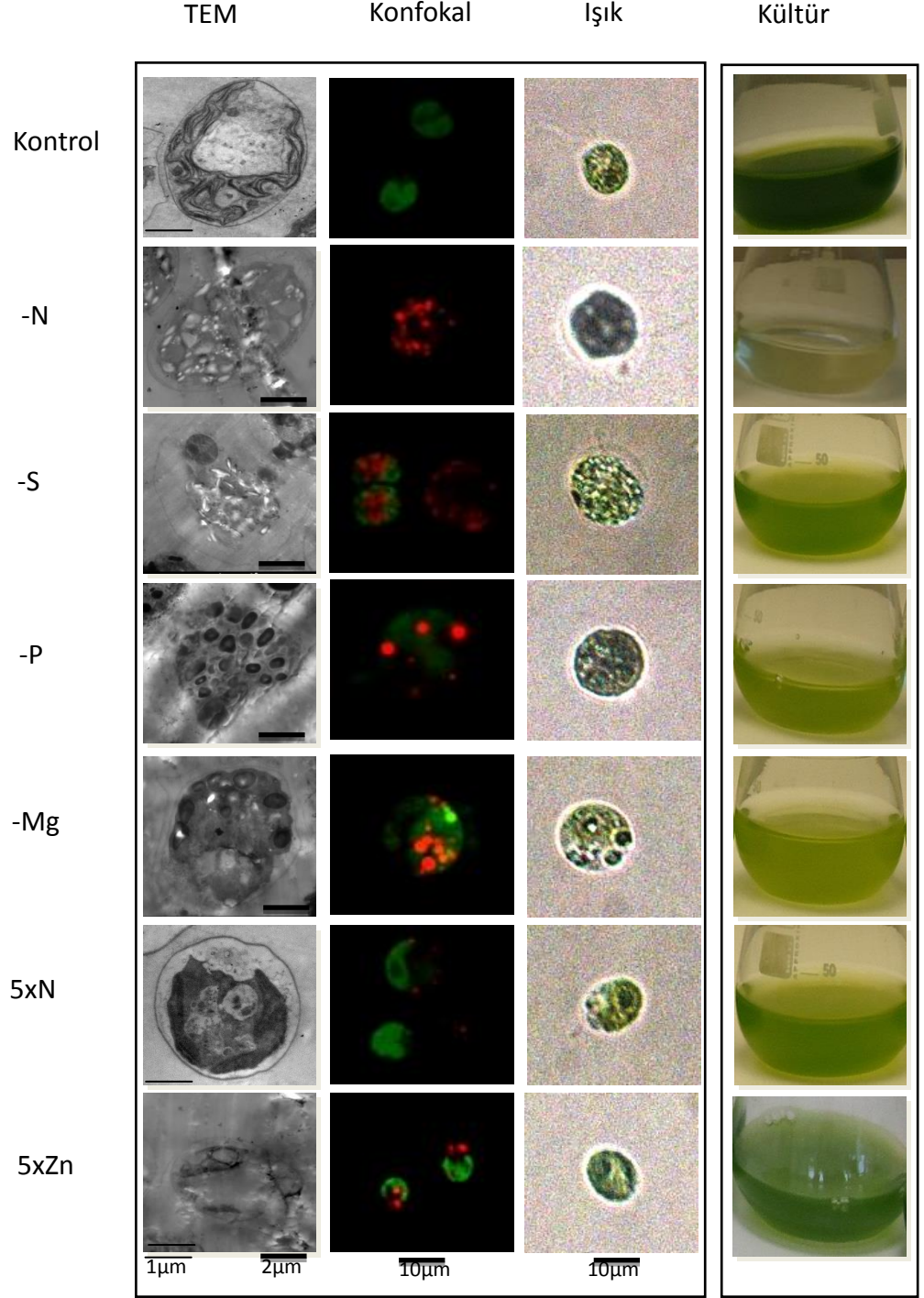


**Şekil 3.35.** Mikroalglerin lipid peroksidasyonu değerlerinde meydana gelen değişimler

### 3.12. Mikroalglerin anatomik yapılarında meydana gelen değişimler

Aşağıda TAP-N, TAP-S, TAP-P, TAP-Mg, TAP+N ve TAP+Zn ortamlarında kültüre alınan mikroalglerin inkübasyonun 10. gününde çekilmiş TEM, Konfokal, ışık mikroskopisi ve kültür fotoğrafları karşılaştırmalı olarak sunulmuştur (Şekil 3.36). Şekil 3.36'da gösterilen TEM görüntüleri incelendiğinde ortam element manipülasyonlarına cevapta mikroalglerde oluşan sitoplazmik lipid damlacıkları açık bir şekilde görülebilmektedir. Kontrol ortamında yetiştirilen mikroalglerde hücreyi bir ağ gibi çevrelemiş görüntüsü veren klorofil kümeleri, özellikle N açlığında çok

yüksek oranlarda kaybolmuş ve bunun yerine sitoplazmik lipid cisimcikleri oluşmuştur. Nitekim klorofillerin yeşil renkte, lipid cisimciklerinin de kırmızı renkte gözlemlenebildiği konfokal görüntüleri de incelendiğinde TEM görüntülerinden elde edilen görüntüler doğrulanmaktadır. Yine ışık mikroskopisi görüntüleri özellikle N açlığında yetiştirilen mikroalglerdeki anatomik tahribatı açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Mikroskop görüntüleri ile içinde yetiştirildiği erlen görüntüsündeki şeffaf sıvı görüntüsü de bu durumu desteklemektedir. Diğer taraftan S, P ve Mg açlığına bırakılmış mikroalglerin klorofil içerikleri TEM görüntülerinde de yer yer karartı şeklinde, konfokal görüntülerde de yeşil şekilde renklendirilmiş olan klorofillerin yoğunlukları önemli oranda azalmış olsa da N açlığında gözlemlendiği gibi neredeyse tamamen kaybolmamıştır. Bu durum S, P ve Mg açlığında mikroalglerin önemli oranda lipid depoladıkları, ancak klorofillerini de miktarları azalmakla birlikte belli oranda sürdürebildikleri için yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmeleri açısından temel olay olan fotosentezi gerçekleştirebildikleri ve çoğalabildiklerini göstermektedir. Son olarak N ve Zn elementlerinin mikroalglerin büyüme ortamlarında normalden 5 kat fazla buldukları durumda, büyüme diğer gruplarda olduğu kadar baskılanmamıştır. Buna karşın mikroalglerde nötral lipid oluşumu ve büyümedeki baskılanma TAP+Zn ortamında TAP+N ortamına kıyasla daha fazla olsa da diğer gruplarla kıyaslandığında ortamda N veya Zn elementlerinin fazla bulunması durumunda mikroalglerin hem ortam kirliliğinin artırılmasında veya ağır metal gideriminde ve biyodizel hammaddesi olan nötral lipid eldesinde kullanılamayacağı kurgusunu desteklemektedir.



**Şekil 3.36.** Element manipülasyonuna cevapta mikroalglerde meydana gelen anatomik değişimin karşılaştırmalı görüntüleri. Soldan sağa sırasıyla 10 günlük inkübasyonun sonunda mikroalglerin TEM, Konfokal, ışık mikroskopisi ve kültür görüntüleri. Konfokal görüntülemeye sitoplazmik lipid cisimleri kırmızı renkle, klorofil kümeleri de yeşil renkle resmedilmiştir

Tüm gruplara ait elde edilen bu görsel bulgular bu tez çalışmasında daha önce ölçülen büyüme, klorofil içerikleri ve nötral lipid içerikleri ile ilgili spektrofotometrik ölçümlerle de desteklenmektedir. Örneğin azot açlığına bırakılmış mikroalglerde inkübasyonun ilk gününden itibaren bölünme neredeyse durmuş (Şekil 3.1), buna karşın nötral lipid içeriği artmış (Şekil 3.5) buna karşın klorofil konsantrasyonu hızlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 3.27).

Diğer taraftan S, P ve Mg açlığına bırakılmış mikroalglerin büyüme hızları önemli oranda baskılanmış olsa da durmamış (Şekil 3.1), klorofil içeriğinde azalma olmasına rağmen N açlığında olduğu gibi ani ve hızlı düşüşler gözlemlenmemiştir (Şekil 3.27). Bununla birlikte bu gruplarda lipid içeriği özellikle inkübasyonun 10. gününde N açlığına kıyasla daha yüksek çıkmıştır ki elde edilen TEM ve konfokal görüntüleri S, P ve Mg açlığına bırakılmış mikroalglerin diğer gruplara kıyasla daha büyük hacimli lipid damlacıkları biriktirmeleri ile de desteklenmektedir.

Son olarak ortamda 5 kat fazla konsantrasyonda N ve Zn bulunduğu durumlarda da büyüme kontrole kıyasla düşük oranda baskılanmış (Şekil 3.2), nötral lipid içeriği de nispeten artmıştır (Şekil 3.6). Ancak sayısal olarak karşılaştırıldığında özellikle S, P ve Mg açlığına bırakılmış mikroalglerde +N ve +Zn gruplarına kıyasla çok daha bol miktarda lipid damlacığı oluşması durumu mikroalglerin hem ortam temizlemede ve hem de biyoyakıt eldesinde etkili bir biçimde kullanılamayacağını göstermektedir.



#### 4. TARTIŞMA

Bu doktora tezi kapsamında yapılan çalışmalarda temel hedef, mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasına yönelik en uygun stres ortamını tanımlamaktır. Diğer taraftan stres ortamı oluşturmak için yapılabilecek uygulamalar oldukça çeşitlidir. Mikroalglerin herhangi bir stres durumuna verdikleri cevapların başında, sitoplazmik lipid damlacıklarının birikimi gelir. Bunun sebebi mikroalglerin stres altında olsalar bile fotosentezle C fiksasyonuna devam ederek organik bileşikleri sentezlemek durumunda olmaları, ancak stres altında olduklarından dolayı, hücre metabolizmasının stresten korunabilmek için daha ziyade lipid biyosentezine doğru kayıyor olmasıdır. Zira stres altında iken sentezlenen lipidler (stresin türüne göre doymuş veya doymamış olanlar) hem mikroalgleri strese karşı koruyucu rolü üstlenmekte ve hem de stres sonrasında bu depolanmış lipidler normal metabolik faaliyetlerin gerçekleşmesinde enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Mikroalglerin lipid içeriklerindeki artışın düzeyi, uygulanan stresin çeşiti ve süresi ile ilişkilidir.

Mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasına yönelik şimdiye kadar çok çeşitli stres uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yapılan uygulamalar genel olarak; makrobesin element stresi, sıcaklık ve ışık stresi uygulamaları, ultraviyole ışın stresi, tuz stresi, pH ve ağır metal stresi uygulamaları ile genetik mühendisliği yaklaşımlarını kapsamaktadır (Sharma vd.,2012). Literatürde yapılan inceleme neticesinde makrobesin element stresi, sıcaklık ve ışık şiddeti uygulamaları ile oluşturulan stres ortamlarının mikroalglerde lipid içeriğinin artırılmasına yönelik uygulanan en uygun stres çeşitleri olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sebeple bu doktora çalışmasında da, mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasına yönelik olarak bu stres çeşitleri uygulanmıştır. Yine bu çalışmada, basit yaşam döngüsü, farklı dış ortam şartlarına karşı oldukça hızlı metabolik cevaplar vermesi, ikiye katlanma süresinin düşük olması ve tüm genom haritasının çıkarılmış olması sebebi ile çoğu mikroalg çalışmalarında model organizma olarak kullanılan tek hücreli *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginin yabancıl tip CC-124 soyu kullanılmıştır. Şimdiye kadar mikroalglerin lipid içeriğinin artırılması için çeşitli streslerin uygulanmasının yanı sıra, bu süreç içerisinde mikroalg hücresinde lipid

biyosenteziyle ilgili olarak değişim gösteren birçok fizyolojik ve biyokimyasal parametrenin bu araştırma projesinde olduğu kadar kapsamlı ve karşılaştırmalı olarak araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

**Büyüme ve lipid üretimi: *C.reinhardtii*'de yağ asidi miktarı stresin çeşiti, süresi ve büyümedeki yavaşlama ile sıkı ilişki içindedir**

Mikroalglerden biyodizel eldesi için aranan özelliklerin başında, lipid içeriğinin yüksek olması veya ekonomik olarak uygun manipülasyonlarla kolayca artırılabilmesinin yanında, yapılan uygulamalara cevapta mikroalg biyokütlesinin de ekonomik olarak uygun seviyede olması gelir. Besin stresi uygulamaları, mikroalglerin lipid içeriğinin artırılması için çoğu durumda ekonomik olarak uygun bir yoldur. Bu doktora çalışmasında ilk olarak *C. reinhardtii*'de makroelementler (N, S, K, P, Mg, Ca) ile önemli bazı mikroelementlerin (Fe, Zn) lipid üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacı ile bu elementlerin hiç bulunmadıkları veya normalden 5 kat fazla konsantrasyonda buldukları ortamlarda inkübasyona alınan mikroalglerin büyümeleri ve lipid üretimi üzerine etkileri araştırıldı. Yapılan ölçümlerde element açlığına bırakılan mikroalglerde K makroelementi ve Zn metali haricinde diğer tüm element açıklıklarında mikroalglerin büyümelerinin baskılandığı belirlendi (Şekil 3.1). Bu elementler büyüme ortamında normalden 5 kat daha fazla konsantrasyonda bulunduğunda ise yalnızca N ve Zn fazlalığında büyümede baskılanma gözlemlenmiştir (Şekil 3.2). Böylece, N, S, P, Mg ve Ca makroelementlerinin hiç bulunmadığı, Zn ve N elementlerinin ise normalden 5 kat fazla bulunduğu ortamların mikroalgler için büyümeyi baskılayabilen uygun stres ortamı olduğu sonucuna varıldı.

Mikroalglerin hacimlerinde meydana gelen değişimler büyümeleri ile ilişkilidir. Yapılan ölçümlerde N, S, P ve Mg açlığına bırakılan mikroalglerin hacimlerinde kontrole kıyasla önemli artışlar gözlemlenmiştir. Bu durum büyümedeki baskılanma ile mikroalglerin hacimlerindeki artışın ters orantılı olduğu anlamına gelmektedir. Ancak Ca açlığında büyüme önemli oranda baskılanmasına rağmen hücre hacimlerinde önemli bir değişim olmamıştır (Şekil 3.3). Bu gruba ait hücrelerin mikroskopta incelenmesiyle, hücrelerin bir araya gelerek kümeler oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.9). Diğer taraftan ortam element konsantrasyonu

artırıldığında, yalnızca N fazlalığında mikroalglerin hacimlerinde anlamlı artışlar belirlenmiştir (Şekil 3.4). Oysa Zn fazlalığında büyüme baskılanmasına rağmen mikroalglerin hacimlerinde önemli bir değişme kaydedilmemiştir. Bu durum, Zn elementinin çok sayıda reaksiyonda kofaktör olarak kullanılmasına rağmen, bir ağır metal olduğu için gereğinden yüksek konsantrasyonda olduğunda mikroalglerin ağır metal stresine girmelerine sebep olmasından kaynaklanabilir.

Element açlığı, mikroalglerde metabolizmadan kaynak paylaşımına kadar çok sayıda mekanizma üzerine farklı etkiler gösterir. Mikroalglerin büyümelerinin besin stresi durumunda baskılanması beklenen bir sonuçtur. Ancak büyümenin baskılanması ile birlikte hücre hacminde meydana gelen değişiklikler ile ilgili olarak farklı raporlar bildirilmiştir. Örneğin N ve S açlığına cevapta büyümenin baskılanması ve hücre hacminde artış, bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Young ve Beardall, 2003; Degrenne vd., 2011). Buna karşın N açlığına cevapta algal büyümedeki yavaşlama ile birlikte hücre hacminde de küçülme olduğu da rapor edilmiştir (Lynn vd., 2000). Bu araştırmada yukarıda bahsedildiği gibi N, S, P ve Mg açlığına ve N fazlalığına cevapta mikroalglerin büyümelerindeki baskılanma ile birlikte hacimleri artmış, oysa Ca açlığı ile Zn fazlalığında büyüme baskılansa da hücre hacimlerinde önemli bir değişim kaydedilmemiştir.

Besin stresine cevapta büyümedeki baskılanmaya rağmen hücre hacmindeki artış lipid üretimi ile ilgili olabilir. Lipidler kolay geri dönüştürülebilir enerji formu olduklarından, stresin süresine bağlı olarak daha fazla lipid biriktirmek için mikroalgler hücre hacimlerini genişletebilirler. Nitekim element açlığı ve fazlalığı bulunan ortamlarda inkübasyona alınan mikroalglerin nötral lipid içerikleri ölçüldüğünde lipid içeriğindeki artışın çoğu durumda büyümedeki baskılanma ve hücre hacmindeki artış ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Örneğin mikroalgler özellikle N, P, S ve Mg açlığına bırakıldıklarında nötral lipid içerikleri önemli oranda artmıştır (Şekil 3.5). Diğer taraftan Ca açlığı ve Zn fazlalığında da mikroalglerin nötral lipid içeriklerinde dikkate değer artışlar kaydedilmiştir. Ancak bu artışlar N, P, S ve Mg açlığına bırakılan mikroalglerdeki kadar yüksek değildir. Bu durum *C. reinhardtii* mikroalginde element stresine cevapta öncelikle lipid biriktirildiğini, ancak stresin şekline ve süresine bağlı olarak daha fazla lipid biriktirmek için hücre

hacminin genişletildiğini gösterir. Bu çalışmada elde edilen ilk sonuçlar ile özellikle makroelement yokluğuna cevapta yaşamın sürekliliği için gerekli molekülleri üretilmediğinden mikroalglerin yalnızca C, H ve O kullanarak üretebilecekleri ve kolay parçalanabilen enerji formunu ürettikleri ve daha fazla lipid üretebilmek için hacmini genişlettiğine işaret etmektedir. Azot, P, S ve Mg elementleri mikroalg metabolizmasında çok sayıda hayati fonksiyona sahip moleküllerin ana elementleri konumunda olduklarından bu elementlerden birinin olmaması metabolizmada köklü değişikliklere sebep olmakta, bu da *C.reinhardtii* mikroalginin çoğalmak yerine depo ürünlerini (özellikle de lipidleri) biriktirmesini tetiklemektedir.

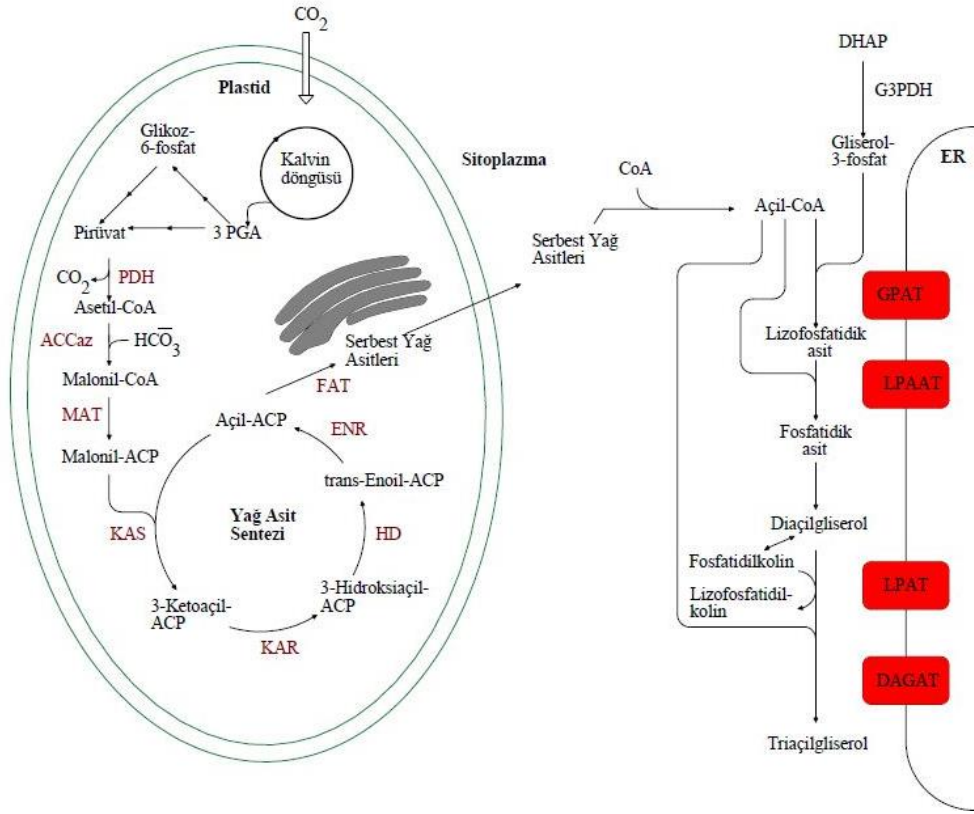
Mikroalglerde lipid içeriğinin artırılmasına yönelik yapılan besin stresi çalışmalarının çoğunda büyümede baskılanma ile birlikte lipid içeriğinde artışlar rapor edilmiştir. Besin stresi ile ilgili şimdiye kadar yapılan çalışmalar içerisinde N, S ve P açlığı, Fe fazlalığı ve üre kısıtlamasında bu yönde bulgular rapor edilmiştir (Liu vd., 2008; Hsieh ve Wu, 2009; Dean vd., 2010; Zemke vd., 2010). Ancak lipid içeriğindeki artışa rağmen büyümede baskılanmanın olmadığı çalışmalar da rapor edilmiştir. Diğer taraftan son zamanlarda yayınlanan bir makalede *C.vulgaris* mikroalginin N açlığında, hem lipid içeriğinde artış ve hem de büyümede önemli bir baskılanma olmadığını rapor etmişlerdir (Praveenkumar vd., 2012). Bu doktora çalışması ile elde edilen bulgular, lipid içeriğinde artışın gözlemlendiği grupların tümünde büyümenin önemli oranda baskılandığını göstermektedir.

Lipidlerin yanında diğer önemli depo molekülleri de karbonhidratlardır. Lipidlerin depolanması için daha fazla alana ihtiyaç duyulduğundan mikroalgler daha kolay geri dönüştürülebilir bir enerji formu olmasına rağmen belli bir aşamadan sonra hacmini genişletmek yerine karbonhidrat biriktirmeye de başlayabilir veya stresin şekline ve süresine bağlı olarak lipid ile birlikte karbonhidrat da biriktirebilir. Şayet karbonhidrat sentezini lipid sentezine kaydırabilecek etkili bir müdahale çeşiti bulunabilirse mikroalglerin net lipid üretimi daha da artırılabilir. Böylece biyodizel üretimi için bir mikroalgden daha etkin faydalanılabilir. Mikroalglerin besin stresine cevapta nişasta içeriklerinin de arttığına yönelik çalışmalar rapor edilmiştir. Nitekim *C. reinhardtii*'nin nişasta üretemeyen mutant soyları ile yabancı tip soyu, N açlığına maruz bırakılmış ve mutant bireyin yabancı soya oranla daha fazla lipid ürettiği rapor

edilmiştir (Wang vd., 2009; Li vd., 2010). Diğer taraftan *C.reinhardtii*'de hem lipid ve hem de nişastanın yüksek oranda sentezlendiği de gösterilmiştir (Work vd., 2010). Bu doktora çalışmasında özellikle N, S, P, Mg ve Fe açlığı ile Zn fazlalığına cevapta mikroalglerin karbonhidrat içeriklerinde önemli artışlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.15). Diğer uygulamalarda karbonhidrat içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim kaydedilmemiştir. Bu doktora tezi ile elde edilen sonuçlar da gösteriyor ki element stresine cevapta mikroalglerin lipid içeriklerindeki artışla birlikte bir başka depo bileşeni olan karbonhidrat sentezi de artmaktadır.

Biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol (TAG) mikroalglerde sentezlenen nötral lipidlerin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır (Sharma vd., 2012). Bu doktora çalışmasında yapılan TAG ölçümü ile elde edilen veriler, nötral lipid ölçümü ile elde edilen veriler birbirini desteklemektedir. FT-IR ölçümlerinde belirlenen mikroalglerin TAG içeriklerindeki artışlar ile karbonhidrat içeriklerindeki artışlar birbirleri ile kıyaslandığında mikroalglerin TAG'leri karbonhidratlara oranla daha fazla sentezledikleri anlaşılıyor. Örneğin N açlığında kültüre alınan mikroalglerin 10 günlük inkübasyon periyodu boyunca TAG içerikleri lineer olarak artmış ve 10. günün sonunda kontrole kıyasla yaklaşık 9.8 kat artış göstermiştir (Şekil 3.11). Oysa mikroalglerin karbonhidrat içeriği ilk 5 günlük inkübasyon periyodunda sürekli artış göstererek yaklaşık olarak 3 katlık bir artış sergilemişken stresin süresinin uzaması ile birlikte karbonhidrat içeriğinde bir azalma olmuş ve 10 günlük inkübasyon periyodunun sonunda artış 2.3 kat olarak sonlanmıştır (Şekil 3.15). Bu durum, mikroalglerin element stresine cevapta öncelikle TAG çoğunlukta olmak üzere, depo maddesi olarak karbonhidrat da biriktirdiklerini, ancak stresin süresinin uzaması ile birlikte mevcut şekerleri de yakıp yalnızca TAG üretmeye yöneldiklerini düşündürmektedir. Elde edilen bu sonuçlar, *C. reinhardtii* ve *C.vulgaris* kullanılarak yapılan N açlığı uygulamalarında daha önce rapor edilmiş veriler ile örtüşmektedir (Work vd., 2010; Dean vd., 2010). Bu doktora çalışmasında yukarıda bahsedilen durum yalnızca N açlığında değil, lipid üretiminin artırıldığı S, P ve Mg açıkları ile N ve Zn fazlalığında da görülmüştür. Bu da element stresine cevapta mikroalglerin öncelikli olarak TAG biriktirdiklerini, yedek besin depo maddesi olarak ta karbonhidrat biriktirdiklerini gösterir ki bu bilgi, bu doktora tezi kapsamında yapılan çalışmalarla elde edilen önemli bir bulgudur.

Bu doktora çalışmasında elde edilen bulgular lipid üretiminin artırıldığı stres uygulamalarında, büyümenin farklı oranlarda baskılandığını göstermiştir. Mikroalglerin büyümelerinde baskılanmanın özellikle element açlığı uygulamalarında ilk olarak total fotosentez hızında yavaşlama ile başladığı şeklinde bir açıklama getirilebilir. Örneğin, N, S, P veya Mg açlığında mikroalglerin hem kültür resimleri (Şekil 3.1) hem de mikroskopik görüntüler incelendiğinde (Şekil 3.9, 3.10) mikroalglerin yapılarında bulundukları klorofil kümelerinin farklı oranlarda seyredildiği gözlemlenmiştir. Nitekim yapılan spektrofotometrik ölçümlerde de özellikle N, S, P ve Mg açlığına cevapta mikroalglerin içerdikleri klorofil miktarları kontrole kıyasla farklı oranlarda düşüşler göstermiştir (Şekil 3.27). Böylece çalışılan element açlıklarına cevapta mikroalglerin hem büyümelerindeki baskılanma ve hem de lipid içeriğindeki artışın kaynağı total fotosentez hızında meydana gelen azalma olduğu sonucuna varılabilir. Bu çalışmada mikroalglerin nötral lipid içeriklerinde önemli artışların olduğu N, S, P ve Mg açlıklarına bakıldığında, bu elementlerin tümünün fotosentezde önemli yapısal ve fonksiyonel rollerinin olduğu görülür. Bu elementler mikroalglerin büyüme ortamında yeterince bulunmadığı durumda, stres altında olması, fotosentezin yavaşlatılmasının gerekiyor olması nedeniyle ihtiyaç duyduğu bu elementleri, fotosentetik pigmentlerin bir kısmının ve fotosentezin Calvin döngüsü reaksiyonlarında rol alan enzimlerden ihtiyaç fazlası olanların parçalanması ile sağlayabilir. Fotosentez hızındaki düşüğe rağmen fotosentetik pigmentlerden bir kısmının parçalanmasıyla sağlanan elementler, aynı metabolik proses için kullanılır ve hücrede bulunan indirgeyici konsantrasyonunda artış olur (Courchense vd., 2009). İndirgeyici konsantrasyonunda artış, Sitrat sentaz enzimini inhibe eder ve Asetil CoA'nın Krebs döngüsüne girmesini bir dereceye kadar engeller. Asetil CoA konsantrasyonundaki artış Asetil CoA Karboksilaz enzimini aktive eder ve mevcut Asetil CoA malonil CoA'ya dönüştürülür. Sonuç olarak lipid sentezi de artmış olur (Mandal vd., 2009) ki bu da mikroalglerde sitoplazmik lipid damlacıkları oluşması sonucunu doğurur (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** Mikroalg lipid biyosentezinde ana yollar ve metabolitler. Serbest yağ asitleri kloroplastlarda sentezlenirken TAG'ler endoplazmik retikulumda oluşturulurlar. Kısaltmalar: ACCaz, Asetil-CoA Karboksilaz; ACP, Açı taşıyıcı protein; CoA, Koenzim A; DAGAT, diaçıgliserol açıltransferaz; DHAP, dihidroksiaseton fosfat; ENR, enoil-ACP redüktaz; FAT, yağ asidi-ACP tiyoesteraz; G3PDH, gliserol-3-fosfat dehidrogenaz; GPAT, gliserol-3-fosfat açıltransferaz; HD, 3-hidroksiaçı ACP dehidrataz; KAR, 3-ketoaçı-ACP redüktaz;; KAS, 3-ketoaçı-ACP sentaz; LPAAT, lizo-fosfatidik asit açıltransferaz; LPAT, lizo-fosfatidikolün açıltransferaz; MAT, malonil-CoA-ACP transaçılaz; PDH, piruvat dehidrogenaz kompleksi; TAG, triaçıgliserol (Radakovits vd., 2010'dan alınmıştır)

Mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasına yönelik yürütülen çalışmalarda yapılan uygulama sonrasında mikroalgler tarafından üretilen yağ asidi bileşenlerinin oranı önem taşımaktadır. Biyodizelin kalitesini belirleyen ana unsurlar olan setan numarası, iodin numarası, yanma noktası, NOx emisyon değeri, oksidatif durgunluğu ve akışkanlığı gibi değerler temelde biyodizelin içindeki FAME profiline bağlıdır (Saraf vd., 2007; Francisco vd., 2010). Doymamış yağ asitleri kolay okside olduklarından biyodizelin akışkanlığını etkiler (Saraf vd., 2007). Bu sebeple biyodizelin doymuş (SFA) ve tekli doymamış yağ asidi içeriği (MUFA) yüksek,

çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriği de düşük olmalıdır. Bu doktora çalışmasında kullanılan mikroalg *C.reinhardtii*'de kontrol dahil tüm uygulamalarda mikroalglerdeki SFA oranı PUFA oranından fazla bulunmuştur. Ancak Avrupa birliği EN 14214 standartlarına göre biyodizel amaçlı kullanılan yağlardaki SFA ve MUFA oranlarının toplamı %75'den yüksek olmalıdır (European standard EN 14214). Bu çalışmada, *C.reinhardtii* mikroalginde SFA ve MUFA oranları toplamı kontrol grubunda %73 civarında iken N, S ve P açlıklarında bu oran sırası ile %78, %86 ve %78 düzeylerinde idi (Şekil 3.26). Diğer gruplarda SFA ve MUFA oranları toplamı %75'in altında olduğu belirlendi. Diğer taraftan, bir çoklu doymamış yağ asidi olan Linolenik asitin (C18:3) biyodizel için kullanılacak olan FAMES içerisindeki oranı en fazla %12 olmalı, 4 veya daha fazla doymamış karbon bağı bulunan PUFA'ların oranının ise %3'den az olması gerekmektedir (European standard EN 14214). Bu çalışmada N,S ve P açlığında inkübe edilen mikroalglerden elde edilen FAMES profili bu şartı da sağlamaktadır (Çizelge 3.1 a,b). Bununla birlikte bu grup mikroalglerde MUFA oranları toplam lipid üretimindeki artış ile paralel bir artış sergilerken PUFA oranları da aşağı yönde eğilim göstermişlerdir. Böylece bu çalışma ile N, S ve P açlıklarının mikroalglerden biyodizel eldesi için uygulanabilecek geçerli yollar olduğu sonucuna varılmıştır.

### **Büyüme ortamında bir elementin yokluğu veya bolluğu mikroalglerin diğer bazı elementleri kullanma etkinliğini değiştirir.**

Işık, karbondioksit ve mineral besinler mikroalg ve bitkisel organizmaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için gerekli olan en temel öğelerdir. Metabolik fonksiyonların devamı için mineral besinlerin etkili bir biçimde alınması oldukça önemlidir. Büyüme ortamlarında yaşamsal faaliyetleri için gerekli bir elementin bulunmaması mikroalglerin diğer elementleri de etkili bir biçimde alamamasına sebep olabilir. Örneğin N elementi bitkisel organizmalarda kuru ağırlığın yaklaşık %2'si oranında bulunur ve proteinler, nükleik asitler ve pek çok sekonder metabolitin yapısına katılır (Miller ve Cramer 2005). Fosfor elementi de nükleik asitler, ATP ve çok sayıda sekonder metabolitin, S elementi ise önemli bazı esensiyel aminoasitlerin ve dolayısıyla çok sayıda protein ve enzimin yapısında bulunan önemli bir elementtir (Zemke vd., 2010). Böylece bu elementlerin herhangi birinin büyüme ortamında



bulunmadığı durumda diğer elementlerin alımının da etkilenmesi beklenir. Çünkü mikroalgler çevreye uyum sağlamak için metabolizmalarını dinamik olarak ayarlamak zorundadırlar. Böylece ortam element konsantrasyonunda meydana gelen değişime cevapta mikroalglerin büyüme ortamından element alım etkinliklerinin belirlenmesi de önem taşımaktadır.

Bu doktora çalışmasında yapılan ölçümlerle elde edilen mikroalglerin element içeriklerinde meydana gelen değişimler mikroalglerin element manipülasyonuna cevapta lipid içeriğindeki artışın diğer bir veya birkaç elementin alımını etkilemesi ile de ilgili olabileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada mikroalgler N, S veya P bulunmayan ortamlarda kültüre alındıklarında mikroalglerin içerdikleri N, S ve P elementlerinin her üçünde de farklı oranlarda azalmalar kaydedilmiştir (Şekil 3.18, 3.19). Bu da bu elementlerden herhangi birinin bulunmayışının diğer iki elementin de alımını engellediğini gösterir. Böylece bu üç elementten hangisinin yokluğunun lipid içeriğindeki artışa sebep olduğunu anlamak için değişik yaklaşımlar geliştirmek gereklidir. Birincil düzeyde gerekli makrobesin elementi olan P açlığında mikroalglerin N ve S element alımlarında ilk günlerde zayıf düşüşler var iken ikincil düzeyde gerekli olan bir makroelement olan S açlığında N ve P element konsantrasyonları ilk günden itibaren çok keskin bir düşüş sergilemiştir. Dolayısı ile S veya N elementlerinden birinin yokluğu diğerinin alımını engelleyen sinyal mekanizmalarını tetikliyor olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece mikroalgler S veya N açlığına bırakıldıklarında gözlemlenen sonuçlar çoğunlukla bu iki elementin birden mikroalg bünyesinde bulunamamasından kaynaklanır.

Mikroalgleri S açlığına bırakarak biyohidrojen üretimi üzerine yapılan çalışmalarda hücrel indirgeyici konsantrasyonunda artışla birlikte yeterli protonun ETS'de kullanılamaması ancak sürekli olarak sitoplazmada birikmesi sonucu irdelenmiştir (Gaffron ve Rubin, 1942; Kalıncı vd., 2009). Bu konuda yapılan çoğu çalışmada S açlığından kaynaklanan fotosentez hızındaki düşüş ve ETS tarafından yeterli oksijenin kullanılamaması ile sinyal yollarının tetiklediği hidrojenaz enzim aktivitesindeki artışlar ile gündüz-gece döngüsü etkileri araştırılmıştır (Roessler ve Lien, 1984; Saleema vd., 2012). Oysa yapılan literatür çalışmalarında S açlığından kaynaklanan biyohidrojen üretiminin S açlığından mı yoksa N başta olmak üzere

diğer elementlerin alınmasındaki eksiklikten mi kaynaklandığı irdelenmemiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular gösteriyor ki elementler arası ilişki, bir elementin olmadığı durumda elde edilen sonuçların doğru yorumlanması bakımından önemlidir. Örneğin yeşil mikroalglerden biyohidrojen üretiminde kullanılan mikroalg çoğunlukla *C.reinhardtii*'dir. Diğer uygulamalar bir yana S açlığında biyohidrojen eldesi üzerine çok sayıda çalışma vardır. İlgili çalışmaların çoğu son zamanlarda yayınlanmış incelemeye değer bir derlemede bir araya getirilmiştir (Rashid vd., 2013). Bu doktora çalışmasında, S açlığına bırakılan mikroalglerin biyohidrojen üretimleri irdelenmemiştir, diğer taraftan bu grup mikroalglerde dikkate değer oranda lipid üretiminin arttığı belirlenmiştir. Üstelik sentezlenen yağ asitlerinin bileşenlerinin de biyodizel üretim amaçlı kullanılabilceği belirlenmiştir. Dolayısı ile bu doktora çalışması ile getirilen yeni bir bakış açısı ise *C.reinhardtii* mikroalginde S açlığı kullanılarak bu mikroalg hem biyohidrojen üretimi ve hem de biyodizel eldesinde kullanılabilmesi durumudur. Kükürt açlığının tetiklediği ana faktör biyohidrojen üretiminde hidrojenaz enzim aktivasyonunun sağlanması ise, S açlığından kaynaklanan N alımının engellenmesi de lipid üretimini tetikleyen etken olabilir. Bu konu tez sahibinin doktora sonrası çalışmalarında irdelenecektir.

Bu doktora çalışmasında elde edilen bir başka ilginç sonuç ta Mg açlığına bırakılmış hücrelerde S konsantrasyonunun önemli oranda değişmemiş olmasına rağmen S açlığında hücrelerin biriktirdiği Mg konsantrasyonundaki önemli artışlardır (Şekil 3.18 ve 3.19). Magnezyum elementi klorofil üretiminde, aminoasit ve hücre proteini sentezinde büyük bir rol oynar ve besin sınırlaması gibi olumsuz faktörlere direnç gösterir (Finkle ve Appleman 1953). Kükürt açlığında klorofil içeriğinde düşüşün olması (Şekil 3.27) durumu fotosentezin yavaşladığının belirgin bir göstergesidir. Klorofil içeriğinde düşüşe rağmen S açlığına cevapta Mg konsantrasyonunun artması Mg elementinin kullanımının gerektirdiği molekül veya mekanizmaların harekete geçtiği anlaşılıyor. Diğer taraftan Mg açlığında yalnızca S element konsantrasyonu değişmemiş bu grup mikroalglerin N element konsantrasyonlarında da artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.19). Oysa Mg açlığında mikroalglerin toplam ve nötral lipid konsantrasyonlarında N, S ve P açıklarında elde edilen değerler ile kıyaslanacak ölçüde artışlar kaydedilmiştir. Üstelik klorofil moleküllerinin yapısına katılan ana element olmasına rağmen Mg açlığında mikroalglerin klorofil içeriklerinde meydana

gelen düşüş beklenebileceği kadar yüksek değildi (Şekil 3.27). Magnezyum açlığına cevapta mikroalglerin N ve S konsantrasyonlarında azalma ve klorofil içeriklerinde keskin bir düşüş olmamasına rağmen büyümenin neden önemli oranda baskılandığı, hücre hacmindeki önemli genişleme ile birlikte lipid üretiminin neden çok önemli düzeyde arttığı sorusuna sağlıklı bir yaklaşım bu grup mikroalglerdeki P elementi konsantrasyonundaki önemli düşüş irdelenerek getirilebilir. Magnezyum açlığına cevapta her ne kadar N ve S konsantrasyonlarında düşüş olmasa da P konsantrasyonunda ilk günden itibaren önemli bir düşüşün olması, fotosentezle birlikte tüm mekanizmalar işlemesine rağmen kullanılabilir enerji formu olan ATP'nin yeterli oranda üretilmediği için fotosentez sonucu oluşan şekerlerin parçalanması ile meydana gelen Asetil CoA molekülünün Krebs döngüsüne sokulmak yerine çoğunlukla lipid metabolizmasında kullanıldığını gösterebilir.

Mikroalglerin büyüme ortamlarındaki N fazlalığında mikroalglerin N içeriklerinde inkübasyon süresi boyunca lineer bir artış kaydedilmiştir (Şekil 3.19). Bu grup mikroalglerde element açlığı uygulamalarında belirlendiği kadar yüksek oranda olmasa da dikkate değer düzeyde lipid üretiminin olması aslında metabolik faaliyetin hızlandığını gösterir. Bu grup mikroalglerin klorofil içeriklerinde kontrol grubuna kıyasla önemli artışlar kaydedilmiştir (Şekil 3.27). Böylece, fotosentez hızında meydana gelen artış metabolizma hızı ile uyumlu olmadığından, kullanılacak olandan fazla olan kimyasal enerji lipid formunda depolanması şaşırtıcı olmaz. Mikroalgler kullanılarak sıvı ortamdan N ve P giderimi üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur (Lee ve Lee 2002; Huang vd., 2013). Bu çalışmalarda mikroalglerin hem N veya P giderimi hem de biyodizel elde edilmesi amacı ile kullanılabileceği belirtilmiştir. Yine bu doktora çalışmasında, Zn fazlalığında mikroalglerdeki Zn düzeylerinin de ilk günden itibaren çok önemli düzeylerde arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.20). Öte yandan bu grup mikroalglerdeki lipid içeriği de N fazlalığında olduğu gibi dikkate değer oranda artışlar göstermiştir (Şekil 3.6). Böylece elde edilen sonuçlar mikroalglerin de hem ortamdan ağır metal uzaklaştırmada, makroelement gideriminde ve hemde biyodizel üretiminde kullanılabilmesi düşünülebilir. Bu doktora çalışmasında N ve Zn fazlalığı ile elde edilen veriler de bu doğrultudadır ve önceki araştırmalar ile desteklenmektedir (Yu ve Wang, 2004; Kropat vd., 2011).

Bu çalışmada ulaşılan bir başka dikkate değer sonuç ta çalışılan tüm element rejimleri altında yetiştirilen mikroalglerde K konsantrasyonunun kontrol grubuna göre artış göstermesidir (Şekil 3.18). Potasyum konsantrasyonundaki artış *C. reinhardtii*'nin çok yönlü stres cevabı eyleminin bir işaretidir. Potasyum elementi mikroalgler gibi bitkisel organizmalarda birçok enzim sistemlerinin aktive edilmesinde rol oynadığı gibi solunum hızının düşürülmesinde ve böylece enerji kaybının önlenmesinde ve nişasta oluşumunun başlatılmasında kullanılan başlıca elementtir (Leigh and Jones 1984). Bu çalışmada lipid içeriğinin artırıldığı belirlenen tüm gruplarda karbonhidrat içeriğinin artması verileri de bu durumu desteklemektedir (Şekil 3.15). Azot ve özellikle S yokluğunda inkübasyona bırakılan mikroalglerin Ca element konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla önemli artışlar olduğu halde diğer uygulamalı gruplarda bu elementin konsantrasyonunda düşüşler belirlenmiştir. Bu durumda, N ve S yokluğunda mikroalg hücrelerinin daha kalın hücre duvarı oluşturdıkları sonucuna varılabilir.

Mikroalglerden biyodizel veya katma değeri yüksek ürün eldesi amacı ile yeni bir büyüme ortamı hazırlayabilmek için su ortamında elementler arası sitokiyometri mekanizmasının anlaşılması önemlidir. Bununla birlikte çok sayıda mikroelementin mikroalg ve bitki metabolizmasında çok sayıda enzimin kofaktörü rolünü üstlendikleri durumu göz önünde bulundurulunca, element-metal interaksiyonunun da iyi anlaşılması gerekmektedir. Demir elementi açlığında mikroalglerin nitrat ve fosfat asimilasyonunda azalma (Sterner vd., 2004) ve ortam nitrat konsantrasyonu artırıldığında mikroalglerin Cd ve Zn alım oranlarında artışlar bildirilmiştir. Kropat vd. (2011), yaptıkları dikkate değer bir çalışmada mikroalglerde TAG üretimini artıran ancak büyüme hızındaki yavaşlamanın da önemsiz olduğu bir mikroelement besin solüsyonu önermişlerdir. Ancak mikroalglerin besin ortamlarına katılan mikroelement solüsyonlarının mikroalglerde lipid üretim mekanizmaları üzerine etkileri henüz bilinmemektedir. Bu doktora çalışmasında Fe iyonunun *C.reinhardtii* hücrelerinde en bol bulunan iz metal iyonu olduğu ve bunu da miktar bakımından Mn, Zn, Cu Co ve Mo metal iyonlarının izlediği belirlenmiştir (Şekil 3.20). Mikroalglerin içerdikleri ağır metal iyon konsantrasyonları yapılan uygulamalara cevapta kontrol grubuna oranla artmış veya değişmemiştir (Şekil 3.20). Alglerin hücre duvarlarında lipidik ve glisidik biyopolimerler bulunduğundan hücre duvarları

yüksek düzeyde metal bağlama kapasitesine sahiptirler (Kratochvil ve Volesky, 1998). Bu doktora çalışmasında mikroalglerin büyüme ortamındaki Zn konsantrasyonu artırıldığında mikroalglerin yapılarında bulunan özellikle Zn elementi konsantrasyonunda 92 kata kadar artışlar belirlenmiştir. Hücre duvarında tutulan Zn elementleri bir yana mikroalglerde bulunan proteinlerin yaklaşık %10'u Zn-bağlayan bölge içerir (Andreini vd.,2006). Bu da Zn elementinin, mikroalg bünyesinde bulunan proteinlerin %10'unun aktifleşmesi için gerekli olduğunu gösterir. Böylece ortam Zn konsantrasyonundaki bir artış hücre metabolizmasını da önemli oranda etkileyecektir. Zn konsantrasyonundaki artışla birlikte metabolizmanın hızlanması ve diğer birçok enzim için kofaktör olarak kullanılan bazı metallerin alımının artması Zn elementinin normalden fazla oranda alınması ile ilişkilendirilebilir.

Hem grupları ve klorofilin öncü molekülü olan 5-aminolevulinik asitin oluşumunda kilit rol oynayan bir enzim olan glutamil-tRNA redüktazın aktif bölgesinde olduğundan Fe elementi fotosentez için Mg iyonu kadar önemli bir elementtir (Wang vd.,2001). Bu çalışmada Mg açlığına bırakılan grup dışında diğer uygulamalarda mikroalglerin Fe içeriği önemli oranda artmıştır (Şekil 3.20). Diğer uygulamalarda, yani element stresine cevapta mikroalglerin Fe içeriğinde artış olmasına rağmen Mg açlığında bu elementin miktarında önemli bir değişme görülmemesinin nedeni özellikle fotosentez hızında meydana gelen yavaşlama olabilir. Diğer taraftan N ve Zn bolluğunda Fe iyonlarında meydana gelen artış metabolik faaliyetlerde artıştan kaynaklanabilir. Bu grup mikroalglerde metabolizma hızındaki artışa rağmen büyümede önemli bir değişimin olmaması depo ürünü olarak yağ ve karbonhidratların miktarındaki artışı doğrular. Nitekim bu çalışmada gözlemlenen nötral lipid, TAG ve karbonhidrat içeriklerindeki artışlar bu durumu doğrulamaktadır (Şekil 3.6, Şekil 3.12 ve Şekil 3.16).

Manganez elementi bitkisel organizmalarda çok sayıda enzimin redoks kofaktörüdür ve metal bağlama bölgelerinde önemli bir aktivatör olarak kullanılır (Marschner, 1995; Yocum ve Pecoraro, 1999). Bitkisel organizmalardaki önemli rollerinin yanında Mn açlığının *C.reinhardtii*'de ikincil P ve Fe açlığına sebep olduğu bildirilmiştir (Allen vd., 2007). Bu doktora çalışmasında, Mg açlığında ve Zn

bolluğunda inkübasyona alınan mikroalglerin Mn konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla çok önemli derecede artışlar göstermiştir (Şekil 3.20). Bir taraftan makroelement açlığı, diğer taraftan da ağır metal stresi durumlarında Mn elementinde önemli artışların görülmesi durumunu tek başına lipid üretimine bağlamak doğru olmaz. Ancak Mg açlığı ve Zn fazlalığında bu elementin konsantrasyonunda artışların görülmesi her iki stres durumunda da Mn iyonunun karıştığı metabolik fonksiyonların harekete geçtiği anlaşılıyor. Bu durumun daha iyi anlaşılabilmesi için Mn iyonunun kofaktör olarak kullanıldığı enzim aktivasyon düzeylerinin belirlenmesi gereklidir.

### **Sıcaklık ve ışık yoğunluğundaki değişimler mikroalglerde nötral lipid üretimini etkiler.**

Ortam sıcaklık değerlerinde meydana gelen değişimlerin mikroalglerin lipid üretimi ve yağ asidi bileşimi üzerinde dramatik etkilere sebep olduğu daha önce yapılan çok sayıda çalışma ile bildirilmiştir (Morgan-Kiss vd.,2006; Schuhmann vd.,2011; Sharma vd., 2012). Ancak mikroalglerin büyüme ortamlarında lipid içeriğinde artışa sebep olan element açlığı gibi bir uygulama ile birlikte sıcaklık değişiminin etkisi üzerine, bizim bilgimize göre herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu doktora çalışmasında lipid içeriğinde artışa sebep olduğu belirlenen element açlığı ve fazlalığı olan ortamlarda inkübasyona alınan mikroalglerde lipid içeriğindeki değişiklik üzerine sıcaklığın da etkisini belirlemek için yüksek ve düşük sıcaklık değerleri kullanılmıştır. Magnezyum ve P açlığına maruz bırakılan grupların hariç, kontrol grubu dahil element açlığı ve bolluğu uygulamalarının bulunduğu diğer tüm gruplarda ortam sıcaklık değerleri değiştirildiğinde büyüme azalmış, bu azalmanın düşük sıcaklık değerinde daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.22). Bu bulgudan hareketle, Mg ve P açlığında büyümede meydana gelen baskılanmanın, ortam sıcaklık değerindeki değişimden bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu doktora çalışmasında özellikle ortam sıcaklığı artırıldığında nötral lipid içeriğinde önemli artışlar olduğu belirlenmiştir. Oysa daha önce yapılmış bazı çalışmalarda ortam sıcaklığındaki artışla birlikte nötral lipid içeriğinde azalma olduğu rapor edilmiştir (Xin vd., 2011). Xin vd. (2011), yaptıkları çalışmada doğal ortamdan izole

edilmiş olan bir *Scenedesmus* sp. türü kullanmışlardır, bu doktora çalışmasında kullanılan mikroalg ise *Chlamydomonas* Resource Center ([www.chlamy.org](http://www.chlamy.org))’dan sağlanan yabancı tip *C.reinhardtii* CC-124 soyudur. Dolayısıyla iki çalışmada rapor edilen bulgular farklı türler kullanılarak elde edilmiş olup, bu bulgular gösteriyor ki; ortam sıcaklığındaki değişime mikroalglerin verdikleri cevaplar türden türe değişebilmektedir Nitekim çeşitli sıcaklıklarda yetiştirilen *Chlorella sorokiniana*’da lipid miktarında önemli bir değişiklik gözlenmediği de rapor edilmiştir (Patterson,1970). Bu doktora çalışmasında, lipid içeriğini artırdığı belirlenen tüm uygulamalarda ortam sıcaklığı artırıldığında da, nötral lipid içeriğinin kontrol grubuna kıyasla önemli oranda arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.23). Sıcaklıkla birlikte element açlığına cevapta mikroalglerin nötral lipid içeriklerinde meydana gelen artışlar kontrol sıcaklık değerinde inkübasyona alınan gruplarla kıyaslandığında artan sıcaklığın element açlığı ile birlikte lipid üretiminde artışa sebep olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin kontrol sıcaklığında (23°C) N açlığına bırakılan mikroalglerde 10 günlük inkübasyon periyodunun sonunda kontrole kıyasla lipid içeriği yaklaşık olarak 2 kat artmış iken yüksek sıcaklıkta (35°C) element açlığı uygulanmayan gruba kıyasla N açlığında 4.35 kat artmıştır. Sıcaklık artışının element açlığı uygulanmayan gruplarda da lipid içeriğini artırdığı düşünüldüğünde, N açlığına bırakılan ve 35 °C sıcaklıkta inkübe edilen mikroalglerin, 23 °C’de inkübasyona bırakılan gruba göre de 7.1 kat arttığı hesaplanmıştır. Öte yandan ortam sıcaklığı düştüğünde mikroalglerin lipid içeriklerinde artışlar rapor edilmiştir (Guschina and Harwood 2006). Bu doktora çalışmasında elde edilen sonuçlar da bu bulguyu desteklemektedir. Ancak bu artışlar, yüksek sıcaklıkta inkübasyona bırakılan mikroalglerle oranla daha düşük bulunmuştur (Şekil 3.24). Böylece bu doktora çalışması, element açlığına bırakılan mikroalglerin ortam sıcaklığı artırıldığında lipid verimlerinin daha da önemli oranda artırılabilceğini ortaya koymuştur.

Fotosentez etkinliği mikroalglerin lipid içeriklerinde meydana gelen değişim üzerine en etkili faktördür (Thompson, 1996). Doğal ortamlarında gündüzleri mikroalglerin lipid üretimini artırdıkları ve geceleri de lipidleri kullandıkları rapor edilmiştir (Thompson,1996). Bu çalışmada da ortam ışık şiddeti düşürüldüğünde, mikroalglerin lipid içeriklerinde orta veya yüksek ışıpta yetiştirilen gruplara oranla düşüşler belirlenmiştir. Li vd. (2010), nişasta üretmeyen *C.reinhardtii* mutantları ile yaptıkları

bir çalışmada yüksek ışık şiddetinin N açlığına bırakılan mikroalglerde nötral lipid içeriğini artırdığını bildirmişlerdir. Bu doktora çalışmasında kullanılan yabancı tip *C.reinhardtii* mikroalginde de benzer sonuçlar belirlenmiştir. Dahası, bu çalışmada yalnızca N açlığında değil, S açlığında da ortam ışık şiddeti artırıldığında nötral lipid üretiminde artışlar kaydedilmiştir (Şekil 3.23). Mikroalglerin element içeriğinde meydana gelen değişimlere bakıldığında büyüme ortamında N veya S elementleri bulunmadığında, mikroalglerin yapılarında bu her iki elementin konsantrasyonunda önemli düşüşler kaydedilmiştir (Şekil 3.19). Ortam ışık şiddeti artırıldığında her iki element açlığında da, lipid üretiminde artışın görülmesinin ortak sebebi, söz konusu olan N ve S elementlerinin hücrede daha ziyade proteinlerin sentezinde gerekli olan yapıtaşlarından olmaları, ancak ortamda bu elementlerden yeterince olmadığında, metabolizmada protein sentezinin yavaşlaması ve hücrede redoks dengesinin sağlanabilmesi için, enerji akışının, N ve S elementinin çok daha az oranda gerek duyulduğu lipid biyosentezine doğru kaydırılıyor olmasıdır. Ortam ışık şiddeti de artırıldığında (aşırı olamamak üzere) redoks dengesini sağlamak için fotosentez hızı artar. Bunu müteakiben öncelikle hücrede karbohidrat sentezi ve daha sonra da protein ve lipid sentezleri artar. Ancak eğer ışık şiddeti fotosistemlere zarar verecek düzeyde uygulanacak olursa, bu stres durumunda hücre kendini koruyabilmek için normal metabolik aktivitesin değiştirmek durumunda kalır ve karbohidrat sentezi yerine strese karşı korunmasında rolü olan öncelikle protein ve ikinci derecede lipidleri daha fazla oranda sentezleme ihtiyacı duyar. Bunu gerçekleştirmek için de, fotosentezin Calvin döngüsünde oluşan 3PGA ve solunumun glikoliz safhasında ortaya çıkan piruvat molekülleri Asetil CoA'ya ve Malonil CoA üzerinden lipid biyosentezine aktarılır. Protein sentezi solunumun krebs evresiyle bağlantılı olarak gerçekleşen bir proses olup, şayet hücrede protein sentezi için zaruri olan elementlerden bir tanesi dahi eksik olduğunda (N, S gibi), hücrede protein sentezine ayrılması gereken enerjinin de lipid biyosentezine kaydırılması zorunlu hale gelir ki, bu durum, araştırmamızda N ve S azlığında ve yüksek ışık yoğunluğunda lipid sentez oranının neden arttığını ortaya koyacak nitelikte gözükmektedir.

**Element manipülasyonuna cevapta mikroalglerde oluşan stresin düzeyi lipid içeriğindeki artış ile doğru orantılıdır.**



Mikroalglerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için fotosentezin etkili bir düzeyde gerçekleştirilebilmesi son derece önemlidir. Fotosentez hızında meydana gelen bir değişim mikroalg metabolizmasında ve dolayısı ile metabolik ürünlerinin kompozisyonu ve yoğunluğunda farklılıklara sebep olur (Thompson, 1996). Büyüme ortamında bulunması gereken elementlerin yokluğu veya normalden fazla miktarda bulunması, mikroalglerin klorofil ve karotenoid içeriklerini, dolayısıyla fotosentez verimini etkiler (Sharma vd., 2012). Bu doktora çalışmasında N, S ve Mg açlığına cevapta mikroalglerin klorofil içeriklerinde önemli düşüşler olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.27). Büyüme ortamlarında N ve S açlığına cevapta mikroalglerin klorofil içeriklerinin azaldığı ve böylece fotosentez hızında azalmalar olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Zhang vd., 2002; Young ve Beardall, 2003;). Bu doktora çalışmasında özellikle N ve S açlığına cevapta mikroalglerin içerdikleri toplam klorofil miktarındaki düşüşün yanında klorofil-a / klorofil-b oranında da önemli azalmalar olduğu kaydedilmiştir (Şekil 3.27). Fotosentez için anahtar molekül olan Klorofil a molekülü mavi, mor ve kırmızı dalga boyundaki ışınları emer ve yeşil dalga boyundaki ışınları da yansıtır (Taiz ve Zeiger, 2008). Başta klorofil b molekülü olmak üzere diğer fotosentetik pigmentler de, fotosentetik organizmaların daha geniş spektrumda ışınların yakalanmasını, böylece fotosentez veriminin artmasını sağlarlar (Raven vd., 2005). Işık yoğunluğu azaldığında fotosentetik yapılarda klorofil b konsantrasyonunun önemli oranda arttığı bildirilmiştir (Taiz ve Zeiger, 2008). Özellikle element açlığına cevapta toplam klorofil içeriğinde azalmaya rağmen klorofil a/b oranının da azalması fotosentezde rol alan anten kompleksi ve pigment sistemleri arasındaki dengenin de değiştiğini göstermektedir.

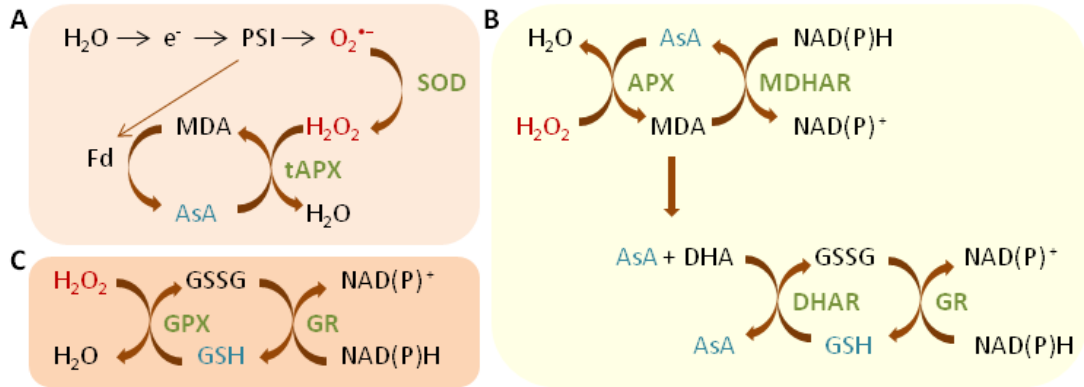
Element açlığı durumlarında bazı alglerin yüksek oranda karotenoid, yağ ve karbonhidrat formunda karbonlu bileşikleri biriktirdikleri rapor edilmiştir (Thompson, 1996). Bu doktora çalışmasında elde edilen bulgular da daha önce rapor edilen çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir. Zira lipid içeriğini artırdığı belirlenen tüm gruplarda karbonhidrat (Şekil 3.15) ve karotenoid (Şekil 3.27) içeriklerinde de artışlar saptanmıştır. Stres şartları altında karotenoid içeriğindeki artışın algal hücrelerin ışık zararına karşı geliştirdikleri bir korunma mekanizması olduğu ileri sürülmüştür (Ledford ve Niyogi, 2005). Dolayısı ile klorofil içeriğinde azalma olduğu belirlenen gruplarda karotenoid içeriğinin artması mikroalgleri ışığın

zararlı etkilerinden korumak amaçlı geliştirilen mekanizmaları tetiklediği düşünülebilir. Ancak bu çalışmada lipid ve karbonhidrat içeriğindeki artışın yanında N fazlalığında mikroalglerin hem klorofil ve hem de karotenoid içerikleri kontrol grubuna kıyasla önemli oranda artmıştır. Bu grup mikroalglerde büyümenin önemli oranda baskılanmadığı da düşünülünce metabolizmanın hızlandığı ve metabolik faaliyetler sonucu arta kalan karbonlu bileşiklerin de karbonhidrat ve lipid şeklinde depolandığı sonucuna varılmıştır. Bu durumda mikroalglerde yalnızca fotosentez hızında yavaşlamanın değil, artışın da lipid üretimini uyardığı anlaşılmaktadır. Diğer taraftan element açlığı uygulanan gruplarda element fazlalığına oranla çok daha yüksek oranda lipid üretildiği düşünülünce fotosentez hızında yavaşlamanın lipid üretimini daha yüksek oranda tetiklediği görülmekte olup bunun nedeni yukarıda tartışılmıştır.

Fotosentetik organizmalar herhangi bir stres faktörüne cevapta reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunun önlenmesi ve oluşan ROT'lerinin detoksifiye edilmesi yollarına başvururlar (Des Marais, 2000). Abiyotik streslere çoğunlukla ROT düzeylerindeki artışlarla cevap verirler (Torres ve Dangl, 2005), Çünkü hücrenin herhangi bir kısmındaki redoks dengesinin bozulmasıyla reaktif bileşiklerin belirli bir seviyenin üzerinde oluşması durumunda, ortaya çıkan bu reaktif bileşikler lipidler, proteinler ve nükleik asitler dahil çok sayıda biyomoleküllerin yapılarının bozulmasına ve radikal hale geçmelerine böylece metabolizma düzeyinde geri dönüşümsüz negatif etkilere sebep olabilme potansiyeline sahiptirler. Eğer organizma ROT düzeyini belirli bir seviyede tutamaz ise meydana gelen oksidatif stres organizmayı ölüme dahi sürükleyebilir. Bu nedenle mikroalglerde lipid üretimini artırmak amacı ile başvuru stres uygulamalarında oluşturulan stresin şiddeti de çok önemlidir. Bu çalışmada, mikroalglerdeki  $H_2O_2$  konsantrasyonunun N açlığına cevapta inkübasyonun ilk gününden itibaren, N fazlalığı hariç diğer uygulamalarda ise inkübasyonun son günlerinde arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.28). İnkübasyonun sonuncu gününde ölçülen  $H_2O_2$  değerleri incelendiğinde, en fazla artışın N açlığında (2.3 kat) meydana geldiği anlaşılıyor. Diğer uygulamalarda  $H_2O_2$  konsantrasyonunda meydana gelen artışlar, bu kadar yüksek olmasa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu da N fazlalığı hariç diğer tüm uygulamaların mikroalglerde stres şartları oluşturduğunu ve alglerin yaşamaya devam ettiği de

dikkate alındığında, tercih ettiğimiz stres şiddetinin bu mikroalg türü için uygun olduğunu gösterir nitelikte olmuştur.

Esasen bitkisel organizmalar, birçok metabolik yolda yan ürün olarak ortaya çıkan ve bir takım metabolik yolların aktive edilmesinde sinyal molekül rolü oynayabilen reaktif oksijen türleriyle, hücrede bu reaktif molekülleri inaktif hale getirmekte görevli antioksidan moleküller arasında bir denge kurmak gibi karmaşık bir düzen geliştirmişlerdir. Bitkisel organizmalarda antioksidan enzimler, ROT düzeylerinin belli bir seviyede tutulmasında önemli roller üstlenirler. Antioksidan enzimlerden Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1), singlet Oksijen radikallerine Hidrojen atomları bağlayarak reaktif özelliği daha düşük olan reaktif oksijen türüne, ( $H_2O_2$ 'e) dönüştürürler. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) enzimi ise iki molekül  $H_2O_2$ 'yi birleştirerek  $H_2O$  ve serbest Oksijen oluşumu reaksiyonunu katalizler. Bitkisel organizmalarda etkili bir ROT temizleme mekanizması olan Askorbat/Glutatyon havuzunda rol alan kilit enzimlerden Askorbat Peroksidaz (AP, EC 1.11.1.11) ve Glutatyon Redüktaz (GR, EC 1.8.1.7) enzimleri de  $H_2O_2$ 'nin temizlenmesinde çok önemli bir yeri olan Askorbat/Glutatyon döngüsünde rol alan iki anahtar enzimdir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Bitkisel organizmalarda ROT temizleme mekanizmaları. A, Su-su döngüsü (Mehler reaksiyonu); B, Askorbat-Glutatyon döngüsü; C, Glutatyon döngüsü. Reaktif oksijen türleri kırmızı renkte, Antioksidan enzimler yeşil ve antioksidant moleküller de mavi renkle sunulmuştur (Mittler vd. 2004'ten alınmıştır)

Bu doktora çalışmasında, büyüme ortamında yapılan element manipülasyonuna cevapta mikroalglerin farklı element durumlarına birbirinden farklı antioksidan cevap verdikleri anlaşılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla element açlığı uygulanan gruplarda SOD aktivitesi inkübasyonun ilk gününde önemli oranda artmış ancak bu artışın ilerleyen günlerde zayıfladığı ve hatta N ve S açlığında olduğu gibi önemli oranda azalma ile sonuçlandığı kaydedilmiştir (Şekil 3.30). Diğer taraftan N fazlalığında inkübasyon süresince lineer olarak artan SOD aktivitesi Zn fazlalığında ilk gün en yüksek düzeyde aktivasyon örneği sergilemiş, ilerleyen günlerde aktivitedeki artış aşağı yönlü eğilime girmiştir (Şekil 3.30). Süperoksit dismutaz enzimi son derece reaktif yapıda olan süperoksit moleküllerinin ( $O_2^-$ ) daha az reaktif yapıda bir ROT molekülü olan  $H_2O_2$  'e indirgenmesi reaksiyonunu katalizler (Mittler vd., 2004). Dolayısı ile  $H_2O_2$  konsantrasyonundaki bir artışın SOD aktivitesinde de artış ile sonuçlanması beklenir. Bu çalışmada da N fazlalığı dışında tüm gruplarda farklı oranlarda  $H_2O_2$  birikimi tespit edilmiştir (Şekil 3.28). Stres şartları altında mikroalglerin SOD enzim aktivitesinde artışların olduğu, farklı mikroalgler kullanılarak yapılan daha önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Li vd., 2006; Tripathi vd., 2006; Sabatini vd., 2009). Öte yandan ortamda yüksek konsantrasyonda Cu (Morelli ve Scarano, 2004) ve Zn (Tripathi vd., 2006) bulunduğu stresin süresinin uzaması ile birlikte SOD aktivitesinde sürekli artışlar rapor edilmiştir. Oysa bizim çalışmamızda element açlığına cevapta mikroalglerin SOD aktivitelerinde ilk günde artış görülse de zamanla aktivite kaybı gözlemlenmiş, inkübasyonun sonunda aktivitedeki azalma N açlığında çok daha yüksek oranda olmakla birlikte S açlığında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dahası Zn bolluğuna cevapta mikroalglerin SOD aktivitelerinin ilk günde en yüksek düzeyde olduğu, daha sonra da kontrole kıyasla yüksek olmasına rağmen aktivitede aşağı yönlü eğilimler belirlenmiştir. Bu yönü ile elde edilen bulgular *Scenedesmus* sp. kullanılarak yürütülmüş olan Tripathi vd. (2006)'nin yaptıkları çalışma ile örtüşmemektedir. Diğer taraftan ROS stresinin her zaman SOD aktivitesini etkilemediği yönünde raporlar da bildirilmiştir. Sabatini vd. (2009), yaptıkları çalışmada Cu stresine cevapta *Scenedesmus vacuolatus* türünde SOD enzim aktivitesinin stresin süresine paralel olarak artış gösterdiğini, öte yandan aynı stres durumunda *Chlorella kessleri* mikroalginin SOD aktivitesinde herhangi bir değişimin olmadığını rapor etmişlerdir. Yine Li vd. (2006), yaptıkları çalışmada Cu stresinin *Pavlova viridis*

mikroalginde SOD aktivitesinde stresin süresi ile paralel artışlar gözlemlenmiş, ancak Zn stresine cevapta aktivitede önemli bir değişim olmadığını rapor etmişlerdir. Büyüme ortamında farklı element yokluğu veya bolluğu durumlarının çalışıldığı bu doktora tezinde elde edilen sonuçlar gösteriyor ki oksidatif strese cevapta ilk korunma mekanizmalarının başında gelen SOD aktivasyonu her zaman stresin süresi ile paralel olarak artış göstermemektedir.

Katalaz enzimi hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) su ( $H_2O$ ) ve serbest Oksijen'e ( $O_2$ ) parçalayan porfirin hem aktif alanları içerir. Mikroalglerde CAT enzimi aktivitesinin, stresin süresi (Morelli ve Scarano 2004; Qian vd., 2008) ve yoğunluğundaki (Li vd., 2006; Qian vd., 2008; Sabatini vd., 2009) artış ile paralellik gösterdiği rapor edilmiştir. Oysa bu doktora çalışmasında element açlığı uygulamalarının artan süre ile birlikte CAT aktivitesinde azalmaya sebep olduğu, element fazlalığı uygulamalarında ise stresin süresi ile paralel olarak aktivitede önemli oranda artışlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.31). Shao vd. (2008), yaptıkları çalışmada *C.reinhardtii* mikroalginde CAT aktivitesinin stresin düzeyine göre belirlendiğini ve CAT aktivitesindeki azalmanın mikroalglerin ROT sinyal yollarını aktive ettiğini rapor etmişlerdir. Özellikle depo ürünleri olan lipid ve karbonhidrat içeriğinde artış, klorofil içeriğinde ve büyümede de azalma olduğu verileri ile birlikte değerlendirildiğinde bu doktora çalışmasında element açlığına cevapta stresin süresi ile paralel olarak CAT aktivitesinde görülen azalmanın metabolik faaliyetlerde görülen yavaşlama ile alakalı olduğu sonucuna varılmıştır. Nitekim Tripathi vd. (2006), yoğun metal stresinin *Scenedesmus* sp. mikroalginin CAT enzim aktivitesinde inhibisyona sebep olduğunu rapor etmişlerdir.

Bu doktora çalışmasında N ve Mg açlığı ile Zn fazlalığı durumlarının AP aktivitesini önemli oranda artırdığı belirlenmiştir (Şekil 3.32). Stresin süresindeki artış ile birlikte N açlığına cevapta AP aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmezken Mg açlığında enzim aktivitesinde artış, Zn fazlalığı durumunda ise zamanla aşağı yönlü bir eğilim sergilemiştir. Diğer taraftan P açlığına cevapta AP aktivitesinde önemli bir değişim kaydedilmezken S açlığında enzim aktivitesi inkübasyonun ilk gününden itibaren önemli oranda düşmüştür. Mikroalglerde bir stres faktörüne cevapta AP aktivitesinde meydana gelen değişimler ile ilgili olarak birbirinden farklı bulgular

rapor edilmiştir. Janknegt vd. (2009), yaptıkları bir çalışmada 15 farklı mikroalg türünü yoğun radyasyona maruz bırakmış ve ancak iki türde AP enzim aktivitesinde bir artış olduğunu, diğerlerinde aktivitede önemli değişimler olmadığını rapor etmişlerdir. Diğer taraftan Tripathi vd. (2006), *Scenedesmus* sp. mikroalginin büyüme ortamında 2.5µM konsantrasyonda Cu elementi bulunduğunda AP aktivitesinde artış olduğunu, ancak Cu konsantrasyonu 10µM'a çıkarıldığında bu enzimin aktivitesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Oysa Morelli ve Scarano (2004), farklı konsantrasyonlarda Cu elementinin *Phaeodactylum tricomutum* mikroalginde AP aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. Bitkisel organizmalarda enzimatik antioksidanların yanında enzimatik yapıda olmayan Askorbat-Glutatyon havuzu da ROT temizlenmesinde aktif rol alır (Taiz ve Zeiger, 2008). Askorbat Peroksidaz enziminin yanında Askorbat-Glutatyon oksidasyon havuzunda rol aldığı bilinen bir başka enzim de GR enzimidir (Şekil 4.2). Dolayısıyla bu enzimin aktivitesinde meydana gelen değişimin AP aktivitesindeki değişim ile paralellik göstereceği düşünülebilir. Bu doktora çalışmasında, çoğu durumda AP ve GR aktivitelerinde meydana gelen değişimler birbiri ile örtüşmekte, bu da enzimatik yapıda antioksidanların yanında enzimatik yapıda olmayan Askorbat-Glutatyon havuzunun da ROT temizleme mekanizmalarında aşağı ya da yukarı yönlü düzenlemeler ile önemli rol oynadığını göstermektedir. Mikroalgler S açlığına bırakıldıklarında AP ve GR enzim aktivitelerinde azalma meydana gelmiştir ki bu durum Askorbat-Glutatyon havuzunun S açlığına cevapta aşağı yönlü düzenleme örneği sergilediğini gösterir. Yine P açlığı ve N fazlalığına cevapta AP ve GR aktiviteleri ya değişmemiş ya da stresin süresine bağlı olarak azalma göstermiştir. Diğer taraftan N ve Mg açlığına cevapta bu iki enzimin aktivitesi de birbirleri ile uyumlu olarak ya artmış ya da değişmemiştir. Bu grup mikroalglerde de CAT ve SOD enzim aktivitelerinde meydana gelen keskin düşüşler dikkate alındığında Askorbat-Glutatyon havuzunun enzimatik oksidanlara kıyasla daha aktif rol aldığını gösterir. Burada ilginç olarak görülen bir diğer sonuç AP ve GR enzim aktivitelerinde Zn bolluğu durumunda kaydedilen zıt yönlü düzenleme örneğidir. Çinko fazlalığında mikroalglerin AP aktiviteleri önemli oranda artmış iken (Şekil 3.32) GR aktiviteleri yüksek oranda baskılanmıştır (Şekil 3.33). Bu grup mikroalglerde yalnızca AP enzimi değil, SOD (Şekil 3.30) ve CAT (Şekil 3.31) aktivitelerinde de önemli artışlar kaydedilmiştir. Çinko fazlalığına cevapta CAT ve

AP her ikisi de  $H_2O_2$  temizlenmesinde direkt roller üstlenirken aktivasyonu için indirgeyicilere ihtiyaç duyan (Şekil 4.2) GR enzim aktivitesi düşmüştür. Bu da gösteriyor ki Zn elementinin sebep olduğu ağır metal stresine cevapta metabolizmada üretilen hücresel indirgeyiciler bu enzimin aktivasyonu için öncelikli olarak kullanılmamış ve enzimatik yapıda olan diğer antioksidan moleküller daha aktif roller üstlenmiştir. Tripathi vd. (2006), yaptıkları çalışmada *Scenedesmus* sp. büyüme ortamında 7 gün boyunca Cu ve Zn fazlalığına cevapta mikroalglerin GR aktivitelerinde önemli azalmalar rapor etmişlerdir ki bu bulgular, bu doktora tezinden elde edilen veriler ile örtüşmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde ara molekül olan  $H_2O_2$  miktarındaki artışlara rağmen antioksidant enzim aktivitelerindeki farklı regülasyon örnekleri gösteriyor ki element açlığı veya bolluğu durumlarında mikroalglerin ROT temizleme mekanizmaları aktif roller üstlenmiştir. Bitkisel organizmalarda ROT temizleme mekanizmalarının çeşitliliği tek başına antioksidant molekül ölçümleri ile bir sonuca varmayı zayıf kılmaktadır. Bu doktora çalışmasında mikroalglerin element stresine verdikleri antioksidant cevabın daha iyi tanımlanabilmesi için antioksidant enzim aktivitelerinin yanında toplam antioksidant cevabın da belirlenmesi için mikroalglerin oksijen radikal absorban kapasiteleri (ORAC) de ölçülmüştür. Elde edilen veriler mikroalglerin ORAC değerlerinin N ve S açlığına cevapta azaldığını, N ve Zn fazlalığına cevapta arttığını, oysa Mg ve P açlığına cevapta önemli bir değişim sergilemediğini göstermiştir (Şekil 3.34). Özellikle N ve S açlığına cevapta  $H_2O_2$  konsantrasyonundaki artışa rağmen antioksidant enzim aktivitelerinde de genel olarak aşağı yönlü eğilimin gözlenmesi de bu durumu desteklemektedir. Yine her iki elementten birinin büyüme ortamında bulunmadığında diğer elementin de alımının engellenmesi durumu, N veya S her iki elementin de mikroalg bünyesinde bulunmayışından doğan redoks düzensizliği sebebi ile mikroalglerin hızla depo ürünleri olan lipid ve karbonhidrat üretmek suretiyle durağan faza geçtiklerini gösteriyor. Bu durumda metabolik faaliyetler yavaşladığı için antioksidant sistemlerinin aktivasyonu için gerekli enerjinin de sağlanamadığı anlaşılıyor. Öte yandan N ve Zn fazlalığına cevapta mikroalglerin ORAC değerlerindeki artış, metabolik faaliyetlerdeki çeşitliliğin arttığını gösteriyor. Fotosentetik hücrelerin ROT düzeylerindeki artış ile birlikte antioksidant

kapasitelerindeki artışın hücrenin metabolizma hızında meydana gelen artış ve reaksiyon çeşitliliğini gösterdiği vurgulanmıştır (Cirulis vd., 2013).

Bu doktora çalışmasında, element stresine cevapta mikroalglerin içerdikleri ROT düzeyleri ile antioksidant cevabın yanında, oluşan stres ile ne düzeyde başa çıktıklarını anlamak amacı ile mikroalglerin hücre zarlarındaki lipidlerin bozulma durumunu gösteren lipid peroksidasyon düzeyleri de belirlenmiştir. Yapılan ölçümlerde N fazlalığı dışında tüm uygulamaların, mikroalglerde lipid peroksidasyon düzeylerini artırdığı belirlenmiştir (Şekil 3.35). Özellikle element açlığına cevapta lipid peroksidasyon düzeyleri inkübasyonun ilk gününde dahi çok yüksek düzeylerde bulunmuş, Zn fazlalığında ise ilk günlerde önemli bir değişim olmamakla birlikte inkübasyonun son günlerinde meydana gelen artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Genel olarak element açlığına cevapta mikroalglerin ORAC değerlerinin ya düşük çıktığı ya da değişmediği düşünüldüğünde, mikroalglerin element açlığından kaynaklanan oksidatif stres ile başa çıkmakta yetersiz oldukları ve oluşan oksidatif stresin bir oksidatif hasar ile sonuçlandığını göstermektedir. Nitekim mikroskopi görüntüleri ile sağlanan anatomik bulgular da bu durumu doğrulamaktadır. Şekil 3.36'da gösterilen mikroalglerin farklı ortamlarda 10 günlük inkübasyonu sonunda alınan TEM, Konfokal ve ışık mikroskopisi görüntüleri ile kültür fotoğraflarında özellikle element açlığı durumlarında mikroalglerin anatomik yapılarında meydana gelen bozulma dikkate değer düzeydedir. Diğer taraftan anatomik yapıda bir bozulmanın yanında klorofil içeriğindeki azalma ile lipid içeriğindeki artışın da doğru orantılı olduğu bu görüntülerden anlaşılmaktadır. Sonuç olarak çalışılan element açlıklarına cevapta metabolizmadaki yavaşlamaya, oluşan redoks düzensizliğinden kaynaklanan oksidatif strese ve hatta anatomik bozukluklara rağmen mikroalglerin lipid içeriklerindeki önemli artışlar, çalışılan element açlığı uygulamalarını mikroalglerden biyodizel eldesi için uygun kılmaktadır. Öte yandan FAMES ölçümleri sonucu elde edilen verilerden de yola çıkarak N, S ve P açlıklarının mikroalglerden Avrupa birliği standartlarına uygun biyodizel elde etmek için uygun yollar olduğu sonucuna varılmıştır.



## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu doktora tezi ile elde edilen sonuçları birkaç madde ile şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Fotosentez hızının artması veya yavaşlaması mikroalglerde bir depo ürünü olan lipid üretimini teşvik eder. Ancak fotosentez hızındaki artış ile ancak fazla olan karbon kaynakları lipide dönüştürülürken, stres durumunda total fotosentez hızındaki azalma ile mikroalgler metabolik faaliyetlerini lipid formunda enerji depolamaya yönlendirir. Dolayısı ile total fotosentez hızının yavaşlaması lipid üretimini daha etkili bir biçimde uyarır.
2. Stres faktörü uygulamaları mikroalglerde lipid üretimini teşvik eder.
3. Azot, S, P ve Mg açlıkları mikroalglerdeki lipid içeriğini önemli düzeyde artırır. Ancak, FAMEs sonuçları dikkate alındığında N, S ve P açlığı durumlarında Avrupa Birliği standartlarına uygun yapıda biyodizel elde etmek mümkündür.
4. Biyodizel üretimi için kullanılan substrat molekül olan triaçilgliserol içeriğindeki önemli artışın ve yüksek standartlarda biyodizel elde edebilme potansiyelinin yanında büyümedeki baskılanma da dikkate alındığında, literatürde yoğun bir şekilde çalışılan N açlığına rağmen S ve P açlıkları da, mikroalglerden biyodizel elde etmek için en uygun iki yoldur.
5. Element stresinin yanında ikinci bir stres faktörü olarak ortam sıcaklık ve ışık şiddetinin artırılması da mikroalglerde lipid üretiminin artırılmasına katkıda bulunmaktadır.
6. Özellikle element açlığına cevapta oksidatif stresin düzeyini gösteren membran lipidlerinin oksidasyonu mikroalglerin ürettikleri depo yağ asidi bileşenlerini önemli oranda etkilemez.
7. Mikroalgler kullanılarak hem atık su arıtımı ve hem de biyodizel üretimi teorik olarak mümkün gözükmektedir. Bu düşünceye, bu doktora tezinde N ve Zn fazlalığında hem biyomas kaybının olmaması ve hem de lipid içeriğindeki önemli artışların olması dikkate alınarak varılmıştır.

Dizel yakıtları birçok alanda kullanılmakta ve ülke ekonomisinde önemli bir yer teşkil etmektedir. Bir tarım ülkesi olan Türkiye’de, biyodizel üretimi için büyük bir potansiyel vardır. Biyodizel her türlü bitkisel ve hayvansal yağ ile kullanılmış yağlardan üretilmektedir. Türkiye’de iklime uygun çeşitli yağ bitkilerinden biyodizel üretilir. Ancak karasal ürünlerin dönemsel olarak büyümeleri ve sahip oldukları yağ miktarlarının kendi kuru ağırlıklarının yalnızca %5’i kadar olduğu, diğer taraftan mikroalglerdeki yağ miktarının genellikle %20-50 arasında bulunması, hızlı yaşam döngüleri ve yağ içeriklerinin artırılabilmesi durumları düşünüldüğünde, ülkemizde de algere dayalı biyodizel üretimine öncelikli yer verilmesi ve ilgili araştırmalara yeterli devlet desteğinin sağlanması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Allen, M., Kropat, J., Tottey, S., Del Campo, J., Merchant, S., Manganese deficiency in *Chlamydomonas* results in loss of photosystem II and MnSOD function, sensitivity to peroxides, and secondary phosphorus and iron deficiency. *Plant Physiology*. 143(1):263-277, 2007.
- Alonso, D.L., Belarbi, E.H., Fernández-Sevilla, J.M., Rodríguez-Ruiz, J., Grima, E.M., Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, 54:461–471, 2000.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A., Zinc through the three domains of life. *Journal of Proteome Research*. 5(11):3173-3178, 2006.
- Arisz, S.A., van Himbergen, J.A.J., Musgrave, A., van den Ende, H., Munnik, T., Polar glycerolipids of *Chlamydomonas moewusii*. *Phytochemistry*, 53:265–270, 2000.
- Azachi, M., Sadka, A., Fisher, M., Goldshlag, P., Gokhman, I., Zamir, A., Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol*. 129:1320–1329, 2002.
- Baker, E., Mclaughlin, J.J.A., Hutner, S.S.H., Deangelis, B., Feingold, S., O., Baker, H., Water-soluble vitamins in cells and spent culture supernatants of *Poterochromonas stipitata*, *Euglena gracilis*, and *Tetrahymena thermophila*. *Arch. Microbiol.*, 129:310–3, 1981.
- Becker, E.W., *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. P: 293. Cambridge University Press, 1995.

- Beers, R.F., Sizer, I.W., A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J. Biol. Chem.* 195(1):133-40, 1952.
- Ben-amotz, A., Katz, A., and Avron, M., Accumulation of B-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of B-carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil*. *J. Phycol.* 18(4):529–537, 1982.
- Ben-amotz, A., Shaish, A. and Avron, M., Mode of action of the massively accumulated b-carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol.* 91(3): 1040–1043, 1989.
- Benemann, J.R., CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae systems. *Energy conv. Manag.*, 38:475-9, 1997.
- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Accumulation of arachidonic acid-rich triacylglycerols in the microalga *Parietochloris incisa* (trebuxiophyceae, chlorophyta). *Phytochemistry.* 60:135–143, 2002.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J., A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917, 1959.
- Borowitzka, L.J., Development of Western Biotechnology's algal β-carotene plant. *Bioresour. Technol.*, 38(2): 251–2, 1991.
- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, Y., Richmond, A., Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass.*, 12:37–47, 1987.
- Bremus, C., Herrmann, U., Bringer Meyera, S., Sahm, H., The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *J. Biotechnol.*, 124:196–205, 2006.

- Brennan, L., Owende, P., Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14,557–577, 2010.
- Brown, M.R., Dunstan, G.A., Norwood, S.J., Miller, K.A., Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycol.* 32: 64–73,1996.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P, Campos, S., Torres, M.A., Souza, A. A.O, Colepicolo, P., Pinto, E., Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146 60–78,2007.
- Chen, G.Q., Jiang, Y., Chen, F., Salt-induced alterations in lipid composition of diatom *Nitzschia laevis* (bacillariophyceae) under heterotrophic culture condition1. *J. Phycol.* 44:1309–1314,2008.
- Chisti, Y., Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3): 294-306, 2007.
- Chisti, Y., Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26:126–131, 2008.
- Christenson, L., Sims, R., Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* 29:686–702, 2011.
- Číž, M., Čížová, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A. and Lojek, A., Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control.* 21(4): 518–523,2010.
- Cirulis, J.T., Scott, J.A., Ross, G.M., Management of oxidative stress by microalgae. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 91(1):15-21, 2013.

- Cohen, Z., Chemicals From Microalgae, British Library Cataloguing-in-Publication Data, pg:419, 1999.
- Collins, T.J., Image J for microscopy. *Biotechniques*. 43:25-30, 2007.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M., Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process*. 48:1146–1151, 2009.
- Courchesne, N.M.D., Parisien, A., Wang, B., Lan, C.Q., Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol*. 141:31-41,2009.
- Dean, A.P., Sigeo, D.C., Estrada, B., Pittman, J.K., Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresour. Technol*. 101(12):4499–4507,2010.
- Degrenne, B., Pruvost, J., Titica, M., Takache, H., Legrand, J., Kinetic modeling of light limitation and sulfur deprivation effects in the induction of hydrogen production with *Chlamydomonas reinhardtii*. Part II: Definition of model-based protocols and experimental validation. *Biotechnol Bioeng*. 108(10):2288–2299(2011).
- Des Marais, D. J., When Did Photosynthesis Emerge on Earth? *Science*. 289(5485): 1703 – 1705,2000.
- Dunahay, T.G., Jarvis, E.E., Roessler, P.G., Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *J. Phycol.*, 31:1004–1012, 1995.
- Einicker-Lamas, M., Mezian, G.A., Fernandes, T.B., Silva, F.L.S., Guerra, F., Miranda, K., Attias, M., Oliveira, M.M., *Euglena gracilis* as a model for the

- study of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{n}^{2+}$  toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environ. Pollut.* 120:779–786, 2002.
- El-Sheek, M.M., Rady, A.A., Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Phyton.* 35:139–151,1995.
- European Standard EN14214. Automotive fuel fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engine requirements and test methods. Brussels: European Committee for Standardization. pp. 1-15, 2008.
- Fedorov, A.S., Kosourov, S., Ghirardi, M.L., Seibert, M., Continuous  $\text{H}_2$  photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel two-stage, sulfate-limited chemostat system. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121-124:403–12, 2005.
- Finkle, B. J., and Appleman D., The effect of magnesium concentration on growth of *Chlorella* *Plant Physiol.* 28(4): 664–673, 1953.
- Forján, E., Garbayo, I., Henriques, M., Rocha, J., Vega, J., Vílchez, C., UV-A mediated modulation of photosynthetic efficiency, xanthophyll cycle and fatty acid production of *Nannochloropsis*. *Mar. Biotechnol.* 13:366–375, 2011.
- Fork, D.C., Murata, N., Sato, N., Effect of growth temperature on the lipid and fatty acid composition, and the dependence on temperature of light-induced redox reactions of cytochrome f and of light energy redistribution in the thermophilic blue-green alga *Synechococcus lividus*. *Plant Physiol.* 63:524–530, 1979.
- Foyer, C.H., Halliwell, B., The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta.* 133:21–25, 1976.

- Francisco, E.C., Neves, D.B., Jacob-Lopes, E., Franco, T.T., Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J Chem Technol Biotechnol.* 85(3):395-403, 2010.
- Furuki, T., Maeda, S., Imajo, S., Hiroi, T., Amaya, T., Hirokawa, T., Ito, K., Nozawa, H., Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. *J. Appl. Phycol.* 15 319–24, 2003.
- Gaffron, H., and Rubin, J., Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J. Gen. Phys.* 26:219-240, 1942.
- Greenbaum, E., Photosynthetic hydrogen and oxygen production: kinetic studies. *Science.* 196:879-880, 1982.
- Guckert, J.B. and Cooksey, K.E., Triacylglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high-pH induced cell cycle inhibition. *J. Phycol.* 26(1):72–79, 1990.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., Frayn, K.N., *Lipid Biochemistry: An Introduction*, p. 320. 5th ed., Blackwell: Oxford, UK, 2002.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L., Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45:160–186, 2006.
- Güner, H., ve Aysel A., *Tohumuz Bitkiler Sistematigi*. no:108 VI. Baskı, 1.cilt, 117-120. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar serisi, 2006.
- Harris, E.H., The genus *Chlamydomonas*. In *The Chlamydomonas sourcebook: introduction to Chlamydomonas and its laboratory use*. Elsevier, 2(1):1-18, 2009.



- Harwood, J.L., Jones, A.L., Lipid Metabolism in Algae. In *Advances in Botanical Research*.16: 1–53. Ed: by J.A. Callow. Academic Press., Waltham, MA, USA, 1989.
- Harwood, J.L., Membrane lipids in algae. In *Lipids in Photosynthesis:Structure, Function and Genetics*. 53–64. Ed: by P.A. Siegenthaler and N. Murata. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands,1998.
- Hodges, D.M., Delong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K.,Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604-611,1999.
- Hsieh, C.H., Wu, W.T., Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresour. Technol.* 100(17):3921–3926, 2009.
- Hu, Q. PSA abstracts. *J. Phycol.* 42, 1–48,2006.
- Hu, Q., Sommerfeld M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54(4):621-39, 2008.
- Huang, X., Huang, Z., Wen, W., Yan, J., Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*) *Journal of Applied Phycology*. 25:129-137, 2013.
- Illman, A.M., Scragg, A.H., Shales, S.W., Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme microb. technol.* 27(20): 631-5,2000.

- Janknegt, P. J., De Graaff, C. M., Van de Poll, W. H., Visser, R. J. W., Rijstenbil, J. W. and Buma A. G. J., Short term antioxidative responses of 15 microalgae exposed to excessive irradiance including ultraviolet radiation. *Eur. J. Phycol.* In Press. 2009.
- Jayasankar, R., and Polywal, K., Seasonal variation in the essential micro-nutrients of *Gracilaria* spp. of Tamil Nadu coast. *Indian J. Fish.* 47(4):359-363, 2000.
- Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F., New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 167:191 – 194, 1975.
- Joh, T., Yoshida, T., Yoshimoto, M., Miyamoto, T., Hatano, S., Composition and positional distribution of fatty acids in polar lipids from *Chlorella ellipsoidea* differing in chilling susceptibility and frost hardiness. *Physiol. Plant.* 89:285–290, 1993.
- Kalinci, Y., Hepbasli, A., Dincer, I., Biomass-based hydrogen production: a review and analysis. *Int J Hydrogen Energy.* 34:8799-8817, 2009.
- Kaplan, D., Cohen, Z., Abeliovich, A., Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass.* 9(1)37-48, 1986.
- Karnovsky, M.J., A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy, *J. Cell Biol.* 27:137A, 1965.
- Katz, A., Jimé'nez, C., and Pick, U., Isolation and characterization of a protein associated with carotene globules in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 108:1657–1664, 1995.
- Khotimchenko, S.V., Yakovleva, I.M., Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry.* 66:73–79, 2005.

- Khozin-Goldberg, I., Bigogno, C., Shrestha, P., and Cohen, Z., Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa*. *J. Phycol.* 38:991–994, 2002.
- Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67:696–701, 2006.
- Kirst, G. O., Wiencke, C., Ecophysiology of polar algae. *Journal of Phycology.* 31(2):181–199, 1995.
- Koh, L.P., Ghazoul, J., Biofuels, biodiversity, and people: understanding the conflicts and finding opportunities, *Biological Conservation*, 141:2450-2460, 2008.
- Koru, E., Cirik, S., Turan, G., Ak, İ., Başaran, A., *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss Kültürüne Farklı Işık Yoğunluklarının Etkisi. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 25(3): 187–190, 2008.
- Kratochvil, D., Volesky, B., Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology.* 16(7):291-300, 1998.
- Kropat, J., Hong-Hermesdorf, A., Casero, D., Ent, P., Castruita, M., Pellegrini, M., Merchant, S.S., Malasarn, D.A., Revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 66(5):770-780, 2011.
- Kundu, K., Kulshrestha, M., Dhar, N., Roy, A., Production of Hydrogen as a Potential Source of Renewable Energy from Green Algae – A Review. *IACSIT Coimbatore Conferences, IACSIT Press, Singapore*, 28:2012.
- Ledford, H.K., and Niyogi, K.K. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell Environ.* 28(8):1037–1045, 2005.

- Lee, K., Lee, C. , Nitrogen removal from wastewaters by microalgae without consuming organic carbon sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 12(6):979-985, 2002.
- Leigh, R.A. and Wyn Jones, R.G., A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytol.* 97, 1-13. 1984.
- Leustek, T., Saito, K., Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.* 120: 637–643, 1999.
- Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z., and Liu, Z., Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere.* 62(4):565–572, 2006.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q. and Dubois-Calero, N., Biofuels from microalgae, *Biotechnology Progress*, 24(4):815-820, 2008.
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Dauvillee, D., Sommerfeld, M., Ball, S., Hu, Q., *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metab Eng.* 12(4):387–391, 2010.
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Sommerfeld, M., Hu, Q., Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Bioeng.* 107(2):258–268, 2010.
- Liang, Y., Beardall, J., Heraud, P., Effect of uv radiation on growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricorutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Phycologia.* 45:605–615,2006.

- Liu, Z.Y., Wang, G.C., Zhou, B.C., Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*, *Bioresour. Technol.* 99(11):4717-22, 2008.
- Lynn, S. G., Kilham, S. S., Kreeger, D. A., and Interlandi, S. J., Effects of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry of the freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology.* 36(3):510-522, 2000.
- Makarevičienė, V., Skorupskaitė, V., and Andrulevičiūtė, V., Biomass and Oil Production of Green Microalgae *Scenedesmus* sp. Using Different Nutrients and Growth Environmental Research. *Engineering and Management.* 4(62):5-13, 2012.
- Mandal, S., Mallick, N., Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84:281-91, 2009.
- Marschner, H., Mineral nutrition in higher plants. Academic Publisher, London, 1995.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 14:217-232, 2010.
- Matthew, T., Zhou, W., Rupprecht, J., Lim, L., Thomas-Hall, S.R., Doebbe, A., Kruse, O., Hankamer, B., Marx, U.C., Smith, S.M., et al., The metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following induction of anaerobic H<sub>2</sub> production by sulfur depletion. *J. Biol. Chem.* 284:23415–23425, 2009.
- Mcginnis, K. M., Dempster, T. A., and Sommerfeld, M. R., Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *J. Appl. Phycol.* 9:19–24, 1997.

- Melis, A., and Happe, T., Hydrogen production: green algae as a source of energy. *Plant Physiol.* 127: 740–748, 2001.
- Metzger, P., Largeau, C., *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 66(5):486–496, 2005.
- Miao, X., Wu, Q., Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.*, 97:841-6, 2006.
- Miller, A.J., and Cramer M.D., Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil.* 274: 1–36, 2005.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9(10):490–8, 2004.
- Morelli, E., and Scarano, G., Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Sci.* 167(2): 289–296, 2004.
- Morgan-Kiss, R.M., Priscu, J.C., Pockock, T., Gudynaite-Savitch, L., Huner, N.P.A., Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:222–252, 2006.
- Movashagi, Z., Rehman, S. and Rehman, I. U., *Appl.Spectrosc. Rev.* 43(2):134–179, 2008.
- Murata, N. Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant Cell Physiol.* 24:81–86, 1983.

- Murray, K. E., Healy, F. G., McCord, R. S., Shields, J. A., Biomass production and nutrient uptake by *Neochloris oleoabundans* in an open trough system. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(1): 89-95, 2011.
- Nakano, Y., Asada, K., Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 22:867–880, 1981.
- Napolitano, G.E., The relationship of lipids with light and chlorophyll measurements in freshwater algae and periphyton. *J. Phycol.* 30:943–950, 1994.
- Neenan, B., Feinberg, D., Hill, A., McIntosh, R., Terry, K., Fuels from microalgae: Technology status, potential, and research requirements. *Solar Energy Research Institute Publ. No. SERI/SP-231-2550*. 149 pp., Golden, CO, 1986.
- Olaizola, M., Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.* 20:459–66, 2003.
- Orcutt, D., Patterson, G., Effect of light intensity upon lipid composition *Nitzschia closterium* (*cylindrotheca fusiformis*). *Lipids*. 9:1000–1003, 1974.
- Patterson, G., Effect of culture temperature on fatty acid composition of *Chlorella sorokiniana*. *Lipids*. 5:597–600, 1970.
- Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T. A., Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dimutase and catalase. *J. Exp, Bot.* 32: 93-101, 1981.
- Pohl, P. and Zurheide, F., Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. In *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. 473–523. Ed:by H.A. Hoppe, T. Levring, Y. Tanaka. Walter de Gruyter, Berlin, 1979a.

- Pohl, P. and Zurheide, F., Control of fatty acid and lipid formation in Baltic marine algae by environmental factors. In *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*. 427–432. Ed: by L.A. Appelqvist and C.Liljenberg. Elsevier, Amsterdam, 1979b.
- Praveenkumar, R., Shameera, K., Mahalakshmi, G., Abdulkader, A.M., Thajuddin, N., Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. *Biomass Bioenergy*. 37:60–66, 2012.
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., Legrand, J., Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresour Technol*. 100(23):5988–5995, 2009.
- Qian, H., Chen, W., Sheng, G.D., and Liu, W., Effects of glufosinate on antioxidant enzymes, subcellular structure, and gene expression in the unicellular green alga *Chlorella vulgaris*. *Aquat.Toxicol*. 88(4):301–307, 2008.
- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Darzins, A., and Posewitz, M. C., Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. *Eukaryotic cell*. 9(4):486–501, 2010.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Fuerstenberg, S.I., Tae, H., Settlege, R.E., Boore, J.L. and Posewitz, M.C., Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nature Communications*. 3:686, 2012.
- Rashid, N., Rehman, M., Memon, S., Rahman, Z., Lee, K., Han, J., Current status, barriers and developments in biohydrogen production by microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 22:571-579, 2013.
- Raven J.A, Ball L.A, Beardall J, Giordano M, Maberly S.C Algae lacking CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. *Can. J. Bot.* 83: 879–890. 2005.



- Redinbaugh, M.G., Wadsworth, G.J. and Scandalios, J.G., Characterization of Catalase Transcripts and their Differential Expression in Maise. *Biochim. Biophys. Acta.* 951:104-116, 1988.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Olsen, Y., Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.*, 30: 972–979, 1994.
- Renaud, S.M., Tinh, L.V., Lambrinidis, G., Parry, D.L., Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture.* 211:195–214, 2002.
- Richardson, B., Orcutt, D.M., Schwertner, H.A., Martinez, C.L., Wickline, H.E., Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Appl Microbiol.* 18:245–250, 1969.
- Richardson, K., Beardall, J., Raven, J.A., Adaptation of unicellular algae to irradiance: An analysis of strategies. *New Phytol.* 93:157–191, 1983.
- Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science Ltd., 2004.
- Rodolfi, L., Zitelli, G. C., Barsanti, L., Rosati, G., Tredici, M. R., Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomolecular Engineering*, 20: 243-248, 2003.
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., and Tredici, M. R., Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102:100–112, 2009.
- Roessler, P.G., Lien, S., Activation and de novo synthesis of hydrogenase in *Chlamydomonas*. *Plant Phys.* 76:1086-1089, 1984.

- Roessler, P.G., Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* 26:393-399, 1990.
- Running, J.A., Severson, D.K., Schneider, K.J., Extracellular production of L ascorbic acid by *Chlorella protothecoides*, *Prototheca* species, and mutants of *P. moriformis* during aerobic culturing at low pH. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29: 93–8, 2002.
- Sabatini, S.E., Juarez, A.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M., and del Carmen Rios de Molina, M., Oxidative stress and antioxidant defences in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72(4): 1200–1206, 2009.
- Saleema, M., Chakrabarti, M.S., Raman, A.A., Hasan, B.D., Daud, W.M., Mustafa, A., Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* in a two-stage process with and without illumination at alkaline pH. *Int J Hydrogen Energy.* 37:4930-4934, 2012.
- Sánchez Mirón, A., Cerón García, M.C., Contreras Gómez, A., García Camacho, F., Molina Grima, E., Chisti, Y., Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem. Eng. J.* 16:287-97, 2003.
- Saraf, S., Thomas, B., Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality. *Process Saf Environ.* 85:360-364, 2007.
- Sato, N., Murata, N., Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*: The central role of diacylmonogalactosylglycerol in thermo-adaptation. *BBA-Lipid Lipid Metab.* 619:353–366, 1980.
- Sato, N., Hagio, M., Wada, H. and Tsuzuki, A.M., Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes. *Biochem. Soc. Trans.* 28:912-914, 2000.

- Sawayama, S., CO<sub>2</sub> fixation and oil production through microalga. *Fuel. Energ. Abstr.* 37: 217, 1996.
- Scandalios, J.G., Response of Plant Antioxidant Defence Genes to Environmental Stres, *Adv. Genet.* 28:1-41, 1990.
- Scandalios, J.G., Guan, L. and Polidoros, A.N., Catalases in Plants: Gene Structure, Properties, Regulation and Expression. *Oxidative Stres and He Molecular Biology of Antioxidant Defenses.* 34:343-406. Ed: by J.G. Scandalios. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, Cold Spring Harbor, 1997.
- Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J., Posten, C., Kruse, O., and Hankamer, B., Second generation biofuels: high efficiency microalgae for biodiesel production, *BioEnergy Research*, 1:20-43, 2008.
- Schuhmann, H., Lim, D.K.Y., Schenk, P.M., Perspectives on metabolic engineering for increased lipid contents in microalgae. *Biofuels.* 3:71–86,2011.
- Shao, N., Beck, C.F., Lemaire, S.D., and Krieger-Liszkay, A., Photosynthetic electron flow affects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling by inactivation of catalase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta.* 228(6): 1055–1066, 2008.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., and Schenk, P. M., High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production *Energies.* 5:1532-1553, 2012.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., A look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program-biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, 1998.
- Shifrin, N. S., and Chisholm, S. W., Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.*,17:374–384, 1981.

- Shin, R., Berg, R.H., Schachtman, D.P., Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant and Cell Physiology* 46: 1350–1357, 2005.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytic Biochemistry*, 150: 76-85, 1985.
- Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M., Effects of light and nitrogen starvation on the content and composition of carotenoids of the green microalga *Parietochloris incisa*. *Russ. J. Plant Physiol.* 55, 455–462, 2008.
- Somerville, C., Direct tests of the role of membrane lipid composition in low-temperature induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92: 6215–6218, 1995.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng.* 101:87–96, 2006.
- Srinivas, R., Ochs, C., Effect of UV-A irradiance on lipid accumulation in *Nannochloropsis oculata*. *Photochem. Photobiol.* 88:684–689, 2012.
- Stephens, E., Ross, I.L., Mussgnug, J.H., Wagner, L.D., Borowitzka, M.A., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends Plant Sci.*, 15(10): 554–564, 2010.
- Sterner, R., Smutka, T., McKay, R., Qin, X., Brown, E., Sherrell, R., Phosphorus and trace metal limitation of algae and bacteria in Lake Superior. *Limnology and Oceanography.* 49(2):495-507. 2004.

- Suen, Y., Hubbard, J. S., Holzer, G., and Tornabene, T. G., Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. QII under different nitrogen regimes. *J. Phycol.* 23:289–296, 1987.
- Sukatar, A., Alg Kültür Yöntemleri. Ege Üni. Fen Fak. Kitapları Serisi No:184, syf: 104, 2002.
- Sukenik, A., Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Biores. Tech.* 35: 263-269,1991.
- Survase, S.A., Bajaj, I.B., Singhal, R.S., Biotechnological production of vitamins. *Food Technol. Biotechnol.* 44:381–96, 2006.
- Sushchik, N.N., Kalacheva, G.S., Zhila, N.O., Gladyshev, M.I., Volova, T.G., A temperature dependence of the intra- and extracellular fatty-acid composition of green algae and cyanobacterium. *Russ. J. Plant Physiol.* 50:374–380, 2003.
- Sydney, E.B., Sturm, W., de Carvalho, J.C., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A., Soccol, C.R., Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*, 101:5892-5896, 2010.
- Taiz, L., and Zeiger, E., Bitki Fizyolojisi. Mineral beslenme. 67-84. Ed: by İ. Türkan. Palme yayıncılık, Ankara, 2008.
- Takagi, M., Yoshida, T., Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.* 101:223–226, 2006.
- Tatsuzawa, H., Takizawa, E., Changes in lipid and fatty acid composition of *Pavlova lutheri*. *Phytochemistry.* 40:397–400, 1995.

- Tatsuzawa, H., Takizawa, E., Wada, M., Yamamoto, Y., Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas* sp. *J. Phycol.* 32:598–601, 1996.
- Thompson, Jr., G. A., Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta.* 1302:17–45, 1996.
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R., Graham, I.A., Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry.* 61(1): 15–24, 2002.
- Tornabene, T. G., Holzer, G. Lien, S., and Burris, N., Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb. Technol.* 5:435–440, 1983.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol.* 8(4): 397–403, 2005.
- Tripathi, B., Mehta, S., Amar, A., and Gaur, J., Oxidative stress in *Scenedesmus* sp., during short- and long-term exposure to  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . *Chemosphere.* 62(4): 538–544, 2006.
- Valencia, I., Ansorena, D., Astiasarán, I., Development of dry fermented sausages rich in docosahexaenoic acid with oil from the microalgae *Schizochytrium* sp.: Influence on nutritional properties, sensorial quality and oxidation stability. *Food Chem.* 104:1087–96, 2007.
- Van camp, W., Van Montagu, M., and Inze, D., Superoxide Dismutases. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. 317–341. Ed: by C.H. Foyer, and P.M. Mullineaux. CRC Press, BocaRaton, 1994.

- Van den Hoek, C., Mann, D.G. and Jahns, H.M., *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1995.
- Volk, S. and Feierabend, J., Photoinactivation of Catalase at Low Temperature and its Relevance to Photosynthetic and Peroxide Metabolism in Leaves. *Plant Cell Environ.* 12:701-712, 1989.
- Vonshak, A., and Lu, C., Characterization of PSII photochemistry in salt-adapted cells of *Spirulina palentis*. *New Phytol.*, 141: 231-239, 1999.
- Vonshak, A., and Lu, C., Effects of salinity stress on photosystem II function in *Spirulina palentis* cells. *Physiologia Plantarum*, 114: 405-413, 2002.
- Vonshak, A., and Torzillo, G., International workshop and training course on photobioreactors, Ebiltem Yayınları, İzmir, 2003.
- Wada, H. and Murata, N., Membrane lipids in cyanobacteria. In *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. 65–81. Ed: by P.A. Siegenthaler and N. Murata. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998.
- Wang, W., Dei, R., Xu, Y., Responses of Zn assimilation by coastal plankton to macronutrients. *Limnology and Oceanography*. 46(6):1524-1534, 2001.
- Wang, Z.T., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S., and Goodenough, U., Algal Lipid Bodies: Stress Induction, Purification, and Biochemical Characterization in Wild-Type and Starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, American Society for Microbiology, 8(12):1856–1868, 2009.
- Weers, P. M. M., and Gulati, R. D., Growth and reproduction of *Daphnia galeata* in response to changes in fatty acids, phosphorus, and nitrogen in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Limnol. Oceanogr.* 42:1584–1589, 1997.

- Widjaja, A., Chien, C.C., Ju, Y.H., Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 40, 13–20, 2009.
- Work, V., Radakovits, R., Jinkerson, R., Meuser, J., Elliott, L., Vinyard, D., Laurens, L., Dismukes, G., Posewitz, M., Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* sta7-10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains. Eukaryot Cell. 9(8):1251–1261, 2010.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S., Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. Bioresour. Technol. 101:5494–5500, 2010.
- Xin, L., Hong-ying, H., Yu-ping, Z., Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. Bioresource Technology. 102:3098–3102, 2011.
- Xu, X.Q., Beardall, J., Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an antarctic hypersaline lake. Phytochemistry. 45:655–658, 1997.
- Xu, Z., Harvey, K., Pavlina, T., Dutot, G., Zaloga, G., Siddiqui, R., An Improved Method for Determining Medium- and Long-Chain FAMES Using Gas Chromatography. Lipids. 45:199–208, 2010.
- Yaguchi, T., Tanaka, S., Yokochi, T., Nakahara, T., Higashihara, T., Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. Journal of the American Oil Chemists' Society. 74(11): 1431-1434, 1997.



- Yeh, K.L., Chang, J.S., Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris*. Implications for biofuels. *Biotechnol. J.* 6:1358–1366, 2011.
- Yocum, C., Pecoraro, V., Recent advances in the understanding of the biological chemistry of manganese. *Current Opinion in Chemical Biology.* 3(2):182-187, 1999.
- Young, E.B., Beardal, I.J., Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *J Phycol.* 39(5):897–905, 2003.
- Yu, R., Wang, W., Biological uptake of Cd, Se (IV) and Zn by *Chlamydomonas reinhardtii* in response to different phosphate and nitrate additions. *Aquatic Microbial. Ecology.* 35(2):163-173, 2004.
- Yun, Y.S., Lee, S.B., Park, J.M., Lee, C.I., Yang, J.W., Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69:451–5, 1997.
- Zemke, P., Wood, B., Dye, D., Considerations for the maximum production rates of triacylglycerol from microalgae. *Biomass Bioenergy.* 34(1):145–151, 2010.
- Zhang, L., Happe, T., Melis, A., Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta.* 214:552–561, 2002.
- İnternet: Ecochem. [http://www.ecochem.com/t\\_micronutrients.html](http://www.ecochem.com/t_micronutrients.html) (Erişim tarihi:14.06.2012)
- İnternet: CHNS-O Elemental Analiz İstanbul Üniversitesi. <http://www.istanbul.edu.tr/merkezler/itl/CihazElemental.html> (Erişim tarihi:17.07.2012).

İnternet: ODTÜ Merkez Laboratuvarı Tem Örnek Hazırlama Üniteleri.  
<http://www.merlab.odtu.edu.tr> (Erişim tarihi: 20.07.2012).

İnternet: *Chlamydomonas*-Cronodon.  
<http://cronodon.com/BioTech/Chlamydomonas.html> (Erişim  
tarihi:10.06.2013).

İnternet: *Chlamydomonas*-SEM. <http://remf.dartmouth.edu/Chlamydomonas/>  
Erişim tarihi:13.09.2011).

İnternet: *Chlamy*-Connection-Educational.  
<http://www.chlamy.org/images/lifecycle.gif> (Erişim tarihi: 14.06.2013)

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynep ELİBOL ÇAKMAK  
Doğum Tarihi : 02.10.1981  
Yabancı Dil : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lisans : Atatürk Üniversitesi, Fen Fak. Biyoloji Bölümü. 1999-2003  
Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2006-2009  
Doktora : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2009-2013

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar:

Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edb. Fak., Biyoloji Bölümü. 2006-...

### Yayımları (SCI) :

1. Elibol, Z., Menemen, Y., Sağıroğlu, M., Duman, H.,” A molecular phylogenetic study on some Turkish *Ferula* L. (Apiaceae) species using nrDNA ITS sequences” Pak. J. Bot., 44(2): 589-594, 2012.
2. Çakmak, T., Elibol Çakmak, Z., Dumlupınar, R., Tekinay T.,” Analysis of apoplastic and symplastic antioxidant system in shallot leaves: Impacts of weak static electric and magnetic field” Journal of Plant Physiology. 169: 1066– 1073, 2012.

### Yayımları (Diğer) :

1. Bağcı, Ö., Menemen, Y., Elibol, Z., Kızılırmak Kapulukaya (Kırıkkale) baraj gölü çevresi florası. OT Sist. Derg., 18(1):89-116, 2011.

2. Elibol akmak, Z., lmez, T. T., Menemen, Y., Tekinay, T., “Bazı evresel Faktrlerin Mikroalglerin Büyümeleri ve Biyodizel Hammaddesi retimine Etkileri: Işık ve Element Manipulasyonu”, Ekoloji Sempozyumu, 03 – 05 Mayıs 2012, Kilis, Türkiye (Poster).347
3. Elibol akmak, Z., lmez, T. T., Menemen, Y., Tekinay, T., “Fosforu veya Magnezyumu Eksik Ortamlarda Büyüyen *Chlamydomonas reinhardtii*’de Farklı Sıcaklıklar Altında Lipid Birikimi” Ekoloji Sempozyumu, 03 – 05 Mayıs 2012, Kilis, Türkiye (Poster).348
4. akmak, T., Elibol akmak, Z., lmez, T. T., Tekinay, T., Farklı İnorganik Azot Kaynaklarına Cevapta *Arabidopsis thaliana* Kök Hücrelerinde Meydana Gelen Bazı Biyokimyasal Değişimler”, Ekoloji Sempozyumu, 03 – 05 Mayıs 2012, Kilis, Türkiye (Bildiri).346
5. akmak, T., Dumlupınar, R., Elibol, Z., Rasmusson, AG., “Farklı İnorganik Azot Kaynaklarına Cevapta Alternatif Oksidazın Redoks Yanıtları”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi 21-25 Haziran 2010, Denizli, Türkiye (Poster).
6. akmak T., Dumlupınar R., Erdal S., Elibol Z. *Arabidopsis thaliana* Köklerinde İnorganik Azot Kaynaklarındaki Değişime Cevapta Meydana Gelen Hücrel Redoks Değişimleri. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi 21-25 Haziran 2010, Denizli, Türkiye (Poster).
7. akmak, T., Dumlupınar, R., Elibol, Z.,” Farklı Ortamlarda Bazı Tohumların imlenmeleri zerine DC Elektrik ve Manyetik Alan Uygulamalarının Etkileri”, VII. Ulusal Ekoloji ve evre Kongresi 10-13 Eylül 2007, Malatya, Türkiye (Bildiri)

## **Diğer Etkinlikler**

1. Elibol, Z., Menemen, Y., “Kırıkkale İli Enerji Hizmetleri Ve Doğal Kaynaklar Sektörü’ne Genel Bakış” 21. Yüzyılın başında II. Kırıkkale Sempozyumu, Kırıkkale Sanayi Ve Ticaret İl Müdürlüğü sekreteryası, 10-11 Haziran 2009, Kırıkkale.
2. Elibol Çakmak, Z., “Second Fermentation Short Course” The instructor of the course is Prof. Dr. Ali Demirci form the Penn State University.National Nanotechnology Research Center, Bilkent, Ankara. May 31st-June 2nd 2011.

## **Ulusal Kuruluşlarca Desteklenen Projede Görev Alma**

1. Anti kanserojen flavonoidlerin polikatyonik taşıyıcılar ile in vitro ortamda hela hücrelerine aktarımı. (2007/48 Kırıkkale Üniversitesi BAP Projesi)
2. Kızılırmak kapulukaya (Kırıkkale ) Baraj gölü çevresi üzerine floristik çalışmalar ve farklı toprak özelliklerinde yetiştirilen bazı bitkilerin büyüme özelliklerinin ortaya çıkarılması. (2007/45 Kırıkkale Üniversitesi BAP Projesi)
3. Kanser terapide ilaç taşıyıcı nanopartiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve hücre kültürü uygulamaları. (2010/12 Kırıkkale Üniversitesi BAP Projesi)
4. Mikroalglerden Biyodizel Üretimi. (2011/04 Kırıkkale Üniversitesi BAP Projesi)

**Araştırma Alanları:** Bitki biyolojisi, Biyokimya, Bitki fizyolojisi, Alg biyoteknolojisi