

T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Scenedesmus intermedius ve *Scenedesmus planctonicus* Alg Türlerinde
Azota Bağlı Lipit İçeriğindeki Değişimlerin İncelenmesi

Merve KURUSAKIZ

OCAK 2020

Biyoloji Anabilim Dalında Merve KURUSAKIZ tarafından hazırlanan *SCENEDESMUS INTERMEDIUS VE SCENEDESMUS PLANCTONICUS* ALG TÜRLERİNDE AZOTA BAĞLI LİPİT İÇERİĞİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Aysun ERGENE
Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
Danışman

Başkan :Prof. Dr. Seyhan AKISKA _____
Üye (Danışman) :Prof. Dr. İlhami TÜZÜN _____
Üye :Prof.Dr. Yusuf MENEMEN _____

/01/2020

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

Prof. Dr. Recep ÇALIN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Bana sahip olduğumdan daha fazlasını verdiğini fark ettiren
ANNEME...

ÖZET

SCENEDESMUS INTERMEDIUS VE *SCENEDESMUS PLANCTONICUS* MİKROALG TÜRLERİNDE AZOTA BAĞLI LİPİT İÇERİĞİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

KURUSAKIZ, Merve

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi

Danışman: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Ocak 2020, 74 Sayfa

Bu çalışmada, *Scenedesmus intermedius* ve *Scenedesmus planctonicus* alg türlerinin biyoyakıt (biyodizel) üretiminde kullanılma potansiyellerini araştırmak üzere, azota bağlı yağ içeriklerindeki değişimler incelenmiştir. Kırıkkale ili çevresi sucul ortamlardan (Kapulukaya Baraj Gölü) örneklenen türler laboratuvar ortamında izole edilmiş ve BBM (Bold's Basal Medium) besi yeri kullanılan saf hücre kültürlerindeki büyümeleri 16 günlük inkübasyon süresince takip edilmiştir. Büyüme, kontrol grubuna karşı, besin ortamlarında azot elementinin hiç bulunmadığı (açlık) ve 5x konsantrasyonunda bulunduğu (bolluk) gruplarındaki günlük optik densite (OD) değerlerinin karşılaştırması ile ortaya konulmuştur.

Elde edilen sonuçlara göre, *Scenedesmus intermedius* ve *Scenedesmus planctonicus* türlerinin her birinde N-açlığı ve bolluğunun büyüme stres faktörü olduğu belirlenmiştir. Büyüme, her iki türde de kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde daha düşüktür. Büyümedeki azalma N-bolluğu uygulanan

grupta daha belirgindir. Türler arasında ortaya çıkan büyüme farklılıkları yine N-tokluğu grubunda farkedilir şekilde daha fazladır.

Alg türlerinin yağ asidi profilleri, büyüme durağan faza geçtiğinde inkübasyonun sonlandırılması ve elde edilen alg biyomasının Gaz Kromatografisi (GC) analizi ile belirlenmiştir. N-manipülasyonları sonucunda ortaya çıkan büyümedeki azalmalara karşın yağ asitlerinin arttığı belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre, N-açlığı ve bolluğu gruplarında SFA ve MUFA miktarları daha fazla PUFA miktarları ise daha düşüktür. Her iki türde, SFA ve MUFA ve PUFA oranları, Avrupa birliği EN 14214 standartlarını karşılayacak aralıkta bulunmuştur. *S.intermedius*'ta SFA ve MUFA oranı toplamı kontrol grubunda yaklaşık %97 iken açlık grubunda %90, tokluk grubunda ise %98, *S.planctonicus*'ta ise kontrol grubunda %98 iken açlık grubunda %98, tokluk grubunda ise %96 düzeyindedir.

FTIR analizleri neticesinde, azot açlığı ve azot fazlalığına cevapta mikroalglerin TAG miktarlarında önemli artışlar olduğu gözlemlenmiştir. N açlığına bırakılan mikroalglerde kontrol grubuna kıyasla TAG miktarı konsantrasyonu yaklaşık olarak 5 kat artış göstermiştir. Azot elementinin fazla olduğu durumda ise yine TAG miktarlarında artış yaklaşık 3 kat olarak kaydedilmiştir. Mikroalglerin, azot stresinde lipid miktarını karbonhidrat ve protein gibi makro bileşikleri dönüştürmek suretiyle artırdığı sonucuna varılmıştır.

Nötral yağların miktar ve değişimleri, Nil Red boyaması yapılarak Floresans spektrofotometresi ve Flow Sitometri kullanılarak saptanmıştır. *S.intermedius*'ta kontrol, açlık ve tokluk gruplarında nötral lipid miktarları, sırasıyla %23, %38, %6; *S.planctonicus*'ta ise yine sırasıyla %48, %49,%46 verim göstermiştir. Büyümenin baskılanması ile hücre hacminde, nötral lipid ve TAG içeriklerinde artış, karbonhidrat ve protein miktarlarında azalma gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Scenedesmus intermedius*, *Scenedesmus planctonicus*
Nötral Lipid, Triaçilgliserol, Besin Rejimi, Biyodizel.



ABSTRACT

N-DEPENDENT LIPID VARIATIONS IN MICROALG SPECIES, *SCENEDESMUS INTERMEDIUS* AND *SCENEDESMUS PLANCTONICUS*

KURUSAKIZ, Merve

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

January 2020, 74pp

In this study, N-driven changes in lipid profile of algal species, *Scenedesmus intermedius* and *Scenedesmus planctonicus* were investigated to explore a possible potential in order to us befor biodiesel production. The growth of two algal species, sampled from Kapulukaya reservuar, then isolated and cultured in laboratory conditions in BBM (Bold's Basal Medium), was monitored during 16 days of cultivation period. Growth was determined on three experimental groups being control, N-starved and N-enriched (as 5xN) upon the comparisons of daily OD measurements.

Our results revealed that both N-starvation and N-enrichment manipulations exerted stresses on the growth of algal species. Growth was detected to be markedly lower on groups exposed to N manipulations compared to control group. Decrease in growth was realised relatively greater on N-enriched group. Decrease in growth was realised to be relatively greater on N-

enriched group. Besides, the growth differences between the two species were markedly higher on N-enrichment group.

Fatty acid profiles of microalgae species were determined on the biomasses harvested at the stationary phase, which is the end of incubation period, by GC analysis. It was observed that decreases in growth due to N-manipulations were compensated by increases in fatty acids. While the total amounts of SFA and MUFA increased, the amount of PUFA decreased on manipulated groups compared to control. For both species, the ratios of SFA, MUFA and PUFA were recorded to meet the requirements validated by the European Union standards (EN 14214). In *S. intermedius*, the total of SFA and MUFA 97% in control group, 90% in N-starved and 98% in N-enriched group. Corresponding values for *S. planctonicus* were found to be 98%, 98% and 96%, respectively.

Accordingly, TAG concentrations of microalgae species increased as a result of N-manipulations. The rate of increase in N-starved groups were almost 5 times while it is 3 times in N-enriched group compared to the control group. FTIR results suggested that such increases in lipids occurred by the conversion of carbohydrates and proteins to the lipids.

Changes in neutral lipids were determined by applying the Nile Red dyes on microalgal cells followed by readings on Fluorosans spectrophotometry and flow cytometry. In *S.intermedius*, the ratios of neutral lipids were found to be 23%, 38%, 6% in control, N-starved and N-enriched groups, respectively. Corresponding values for *S.intermedius* were 48%, 49%, 46%, respectively.

Key Words: *Scenedesmus intermedius*, *Scenedesmus planctonicus*, Neutral Lipid, Triacylglycerol, Food Regime, Biodiesel.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesi sırasında her türlü bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli tez danışman hocam Sayın Prof.Dr. İlhami TZN'e teşekkür ederim. Hem laboratuvar çalışmaları hem de tez yazım aşamasında ki büyük katkılarından dolayı Dr. Yaşar ALU'a teşekkür ederim. Destek ve katkılarından dolayı Dr. Gökben BAŐARAN KANKILIÇ'a ayrıca FTIR çalışmasındaki yardımları için Uzman Kimyager Ogün BOZKAYA'ya teşekkür ederim.

ğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi hep yanımda olan, sevgi ve desteklerini bir an olsun ayırmayan aileme,

Sonsuz teőekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	
1.1. Mikroalgler	1
1.2. Yeşil algler (Chlorophyta).....	4
1.3. Mikroalg Yetiştirme Ortamının Fiziksel Özellikleri	8
1.4. Sıcaklık	9
1.5. Işık	9
1.6. pH	10
1.7. Tuzluluk.....	10
1.8. Besinler	11
1.9. Havalandırma/Karıştırma	11
1.10. Mikroalglerin Kullanım Alanları.....	12
1.11. Lipidler	15
1.12. Yağ asitleri	16
1.13. Doymuş Yağ Asitleri.....	16
1.14. Doymamış Yağ Asitleri.....	18
1.15. Triaçilgliseroller: (Nötral Yağlar).....	19
1.16. Algal Yağlar.....	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
2.1. Kültür Ortamları.....	22

2.2. Kültür Üretim Sistemleri	23
2.3. Stok Kültür Hazırlanması	24
2.4. Ekimi Yapılan Türlerin OD-750nm Ölçümleri	25
2.5. Ekimi Yapılan Türlerin Hasat İşlemi	26
2.6. Işık mikroskopisi.....	26
2.7. Toplam Nötral Lipid Tayini	26
2.8. TAG Konsantrasyonlarındaki Değişimler: FTIR analizi	27
2.9. FAME Üzerindeki Değişimler: GC-FID analizi.....	28
2.10. Nötral Lipid Değişimleri: Flow Sitometre Analizi.....	29
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	30
3.1. Alg Türlerinde Gruplara Göre Büyümenin İncelenmesi	30
3.2. Mikroalglerin Yağ Asidi Profillerinde Meydana Gelen Değişimin Belirlenmesi	35
3.3. <i>S.intermedius</i> 'da değişimler	40
3.4. <i>S.planctonicus</i> 'da değişimler.....	40
3.5. TAG Miktarlarının FTIR (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi) ile Ölçülmesi	42
3.6. Nötral Lipid Miktarının Floresans spektrofotometre ile Ölçülmesi	48
3.7. Nötral Lipid Miktarının Flow Sitometre ile Ölçülmesi	50
4. KAYNAKLAR	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Farklı Alg Gruplarının sınıflandırılması	4
1.2. Mikroalg üretimine etki eden parametreler için genelleştirilmiş değerler .	8
1.3. Lipidlerin sınıflandırılması	15
1.4. Bazı mikroalglerin biyokimyasal kompozisyonları	21
2.1. Besin yerlerine ait ortam içerisindeki kimyasal maddeler ve oranları	22
2.2. Besin manipulasyonları şeması	25
3.1. Mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen miktarsal değişimler	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Morfolojik olarak farklı <i>Scenedesmus</i> türlerine ait mikroskop görüntüleri	6
2.1. Kültürlerde kullanılan fotobiyoreaktör şeması	23
2.2. Kültürlerde kullanılan fotobiyoreaktör fotoğrafı	23
2.3. Deneyleerde kullanılan aşı kültür örnekleri görüntüsü.....	24
3.1. <i>S.intermedius</i> ve <i>S.planctonicus</i> 16.günlük optik yoğunluk (OD) grafiği	31
3.2. <i>S.intermedius</i> ve <i>S.planctonicus</i> kontrol grubu 16 günlük inkübasyon optik yoğunluğu (OD) 750 nm grafiği	32
3.3. <i>S.intermedius</i> ve <i>S.planctoncius</i> açıklık grubu 16 günlük inkübasyon optik yoğunluğu (OD) 750 nm grafiği	32
3.4. <i>S.intermedius</i> ve <i>S.planctoncius</i> tokluk (5x) grubu 16 günlük inkübasyon optik yoğunluğu (OD) 750 nm grafiği.....	33
3.5. Işık mikroskopisi görüntüleri.....	34
3.6. Toplam PUFA, MUFA, SFA grafiği.....	36
3.7. <i>S.intermedius</i> ve <i>S.planctonicus</i> türlerinin FAMES içeriğindeki Linolenic Asit yüzdeleri grafiği	37
3.8. <i>S.intermedius</i> ve <i>S.planctonicus</i> türlerinin FAMES içeriğindeki toplam PUFA yüzdeleri grafiği	38
3.9. <i>S.intermedius</i> kontrol grubuna ait FTIR spektrumu verileri	43
3.10. <i>S.intermedius</i> azot açıklığına ait FTIR spektrumu verileri.....	44
3.11. <i>S.intermedius</i> azot yüklemesine ait FTIR spektrumu verileri.....	44
3.12. <i>S.planctonicus</i> kontrol grubuna ait FTIR spektrumu verileri	46
3.13. <i>S.planctonicus</i> azot açıklığına ait FTIR yüklemesi verileri	46
3.14. <i>S.planctonicus</i> azot yüklemesine ait FTIR yüklemesi verileri	47

3.15.	<i>S.intermedius</i> floresans spektrofotometre cihaz analiz sonuçları	48
3.16.	<i>S.planctonicus</i> floresans spektrofotometre cihaz analiz sonuçları	49
3.17.	<i>S.intermedius</i> kontrol grubu flow sitometre verileri.....	50
3.18.	<i>S.intermedius</i> açlık grubu flow sitometre verileri	50
3.19.	<i>S.intermedius</i> tokluk grubu flow sitometre verileri	50
3.20.	<i>S.planctonicus</i> kontrol grubu flow sitometre verileri	51
3.21.	<i>S.planctonicus</i> açlık grubu flow sitometre verileri.....	51
3.22.	<i>S.planctonicus</i> tokluk grubu flow sitometre verileri.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

M	Molar
Mm	Milimolar
μ M	Mikromolar
rpm	Dakikadaki dönüş hız birimi
μ l	Mikrolitre
nm	Nanometre
μ m	Mikrometre
ppm	Milyonda bir birim(Parts per million)
ppb	Milyarda bir birim(Parts per billion)
μ mol	Mikromol
μ g	Mikrogram
A	Absorbans
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
ml	Mililitre
TAG	Triaçilgliserol
MUFA	Tekli doymamış yağ asidi
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi
SFA	Doymuş yağ asidi (Saturated Fatty Acid)
PAR	Fotosentetik aktif radyasyon
BBM	Bold Basal Medium
FAMEs	Yağ Asidi Metil Esterleri
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC-FID	Gaz Kromatografi - alev iyonizasyon
EDTA	Edetik asit (Etilen diamin tetraasetik asit)
PLT	<i>S.planctonicus</i>
İNT	<i>S.intermedius</i>

GİRİŞ

Algler; çoğu tek hücreli, okyanuslar, nehirler, tatlı su gölleri, çaylar, dereler, kutuplar, çöller, su birikintileri gibi sucul veya yarı sucul habitatlarda yaşayan, boyutları 0,5 µm ile 60 µm arasında değişen, selüloz çeperi bulunan, ototrof veya heterotrof, fotosentez yapabilen, hızlı büyüyen, tek veya çok hücreli, prokaryotik ya da ökaryotik mikroorganizmalar olarak adlandırılır (Morais vd., 2014).

Farklı ortamlarda yaşayabilen algler dünyanın %71'ini oluşturan okyanustaki birincil üreticilerin çoğunu oluşturur. Milyarlarca yıldır varlıklarını çeşitlenerek sürdürebilmiş, su sistemlerinde serbest azotun bağlanmasından, sudaki ve havada bulunan serbest oksijenin büyük bir kısmının üretiminden sorumlu olan özel mikroorganizmalardır. (Bolin vd.,1979).

Algler hücre boyutuna göre mikroalgler ve makroalgler olarak ikiye bölüme ayrılır. Büyük (inç ölçeğinde ve daha büyük olanlar), çok hücreli olanlar makroalg, küçük (mikrometre ölçeğinde), tek hücreli olanlar ise mikroalg olarak tanımlanır (Chang, 2007).

1.1. Mikroalgler

Mikroalgler zengin biyolojik çeşitliliğe sahiptir. Sucul ekosistemlerin içerisinde önemli bir grubu temsil etmektedir. Bunun nedeni, mikroalglerin zooplanktonlardan balıklara, daha sonra da insana kadar uzanan besin zincirinde, başta klorofil olmak üzere içerdikleri fotosentetik pigmentler yoluyla birincil üretimi gerçekleştirmeleri ve besin zincirin ilk halkasını oluşturmalarıdır. Bitkilerin aksine, kök, gövde ve yaprağa benzeyen yapıları yoktur. Atmosferdeki oksijenin yaklaşık yarısını mikroalgler üretir, aynı anda

karbondioksiti (CO₂) kullanarak fotoototrofik olarak büyüyebilmektedir (Aydın-Sisman, 2019).

Mikroalglerin 22.000 ile 26.000 arasında türünün varlığı tahmin edilmektedir. Ancak bu türlerin sadece 50 tanesinin biyokimyası ve fizyolojisi ayrıntılı olarak bilinmektedir. Bazı kaynaklarda önceden siyanobakteriler, mavi-yeşil algler olarak isimlendirilmiştir ve mikroalgler içerisinde incelenmiştir. Bu siyanobakterilerin bazı fizyolojik benzerliklerinden kaynaklı olmakla birlikte üretim prosesinde aynı sistemlere dayandırılmasından kaynaklanmaktadır. Mikroalgler ve siyanobakteriler fitoplanktonu oluştururlar (Sasson, 1997). Mikroalgler, lipidleri büyük miktarlarda depo edebilen, bunları doğrudan üretebilme yeteneğine sahip olan az sayıdaki fotosentetik mikroorganizmalardan en önemlisidir (Neenan vd., 1986).

Mikroalglerde yağ içeriği kuru ağırlığın %1 ile %40 arasında değişir ve belirli koşullar sağlandığında bu oran %80'e ulaşmaktadır. Algal yağlar, karbon sayıları 12 ile 22 arasında değişen yağ asitlerinin gliserol, şekerler ve bazlar ile birleşimi şeklindedir. Mikroalgler tarafından üretilen lipidler, iki kategoride gruplandırılabilir bunlar; depo lipidler (non-polar lipidler) ve yapısal (polar) lipidlerdir. Yapısal lipidler çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindir ve hayvansal besin kaynağıdır. Bir polar lipid olan fosfolipidler ve steroller ise hücre ve organeller için seçici geçirgen zar olan hücre membranlarının önemli yapısal parçasını oluştururlar. Bu yüzden bu lipidler spesifik membran fonksiyonunun sürdürülmesinde hayati önem taşırlar. Yapısal fonksiyona ek olarak, bazı polar lipidler hücre sinyal yollarında (sifingolipidler, inositol lipidler, oksidatif ürünler vb.) anahtar ara ürünler veya ara ürünlerin başlatıcısı olarak rol alabilirler ve çevresel değişikliklere cevapta rol oynarlar (Sharma vd., 2012).

Alglerin sistematiği farklı alg türlerinin içerdikleri pigment maddelerine, pigmentlerin kombinasyonuna ve türüne dayanmaktadır. Depo ürünlerin kimyasal yapısı ve algal hücre duvarları da ayrıca alg gruplarının tanımlanmasında önemlidir. İçerdikleri pigment maddelerine göre yedi büyük grup altında toplanmıştır.

Bu gruplar şöyledir (Pamir, 1985) ;

1. Yeşil algler (Chlorophyta),
2. Kamçılı Algler (Euglenophyta),
3. Mavi-Yeşil Algler (Cyanophyta),
4. Ateş Rengi Algler (Pyrophyta),
5. Altın Rengi Algler (Chrysophyta),
6. Esmer Algler (Phaeophyta),
7. KırmızıAlgler (Rhodophyta)

Çizelge 1.1. Farklı Alg Gruplarının Sınıflandırılması (Barsanti ve Gualtieri, 2006)

Alem	ŞUBE	SINIF
Prokaryota eubacteria	Cyanophyta (Mavi-Yeşil Algler)	Cyanophyceae
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae
Eukaryota	Glaucophyta	Glaucophyceae
	Rhodophyta	Bangiophyceae
		Florideophyceae
	Heterokontophyta	Chrysophyceae
		Xanthophyceae
		Eustigmatophyceae
		Bacillariophyceae
		Raphidophyceae
		Dictyochophyceae
		Phaeophyceae
	Haptophyta	Haptophyceae
	Cryptophyta	Cryptophyceae
	Dinophyta	Dinophyceae
	Euglenophyta	Euglenophyceae
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae
	Chlorophyta (Yeşil Algler)	Prasinophyceae
		Chlorophyceae
Ulvophyceae		
Cladophorophyceae		
Bryopsidophyceae		
Zygnematophyceae		
Trentepohliophyceae		
Trebouxiophyceae		
Charophyceae		
Klebsormidiophyceae		
Dasycladophyceae		

1.2. Yeşil algler (Chlorophyta)

Tatlı ve tuzlu sularda yaşayabilen, bir ya da çok hücreli organizmalardır. Büyük çoğunluğu sucul olmasına karşın, kar üzerinde, ağaç gövdelerinde ve toprakta simbiyotik yaşayan türleri de vardır. Hücreleri mekik şeklinde, tek olarak ya da 2, 4, 8 ya da 16'lı koloniler halindedir. Zengin protein içeriğine sahiptir. Bu tez çalışmasında kullanılan türler *Scenedesmus intermedius*, *Scenedesmus planctonicus* bu gruba dâhil edilir.

Scenedesmus Familya Özellikleri

Alem Plantae

Bölüm Chlorophyta

Sınıf Chlorophyceae

Takım Chlorococcales

Aile Scenedesmaceae

Cins Scenedesmus

Tür *Scenedesmus intermedius*

Alem Plantae

Bölüm Chlorophyta

Sınıf Chlorophyceae

Takım Chlorococcales

Aile Scenedesmaceae

Cins Scenedesmus

Tür *Scenedesmus planctonicus*



Şekil 1.1. Morfolojik olarak farklı Scenedesmus türleri.

Chlorophyta bölümünde Chlorococcales takımının bir üyesidir. Düzenli şekillerde gruplaşmış; 2, 4, 8'li veya 16'lı hücre grubu şeklinde görülürler. Göz ve kamçısı yoktur. Türleri göre yeri ve sayısı değişen, boynuz benzer çıkıntıları bulunur ve tatlı sularda yayılış gösterirler. Her hücrede 1 adet kromatofor, çekirdek ve pirenoit bulundurur. Protein maddesinde zenginliği nedeniyle son zamanlarda kültürü yapılarak gıda olarak kullanılmaktadır. (Borowitzka, 1991; Güner ve Aysel, 2006).

Scenedesmus türleri tatlı su organizmaları olmasına rağmen ancak düşük tuz konsantrasyonundada yaşayabilirler. Hücreleri hidrojenaz enzimi üretme yeteneğindedir. Nişasta hidrolizinde ekstrasellüler amilaz salgılamaktadır, hücrelerinin asit toleransı çok yüksek değildir. Üremeleri otokoloniler ve zoosporlar ile sağlanır. Hücrelerin çoğalması otomatik bir sistem şeklinde ilerlemektedir. Kardeş hücrenin oluşturulmasından önce iç selülozik tabaka

çözülür. Selülozik tabakanın üretimi kardeş hücrenin oluşturulmasından önce başlamasına rağmen, kardeş hücreler tarafından sentezlenen ilk bileşen dış tabakadır. Ana hücre duvarının dış tabakası yırtılmaya başladıktan sonra kardeş hücre oluşur. Daha sonra büyüme fazı başlar, selülozik tabaka kalınlaşır. Laboratuvar koşullarında bu döngü yaklaşık 24 saat sürerken, dışarıda uygun koşullar altında 48 saat veya daha fazla olabilmektedir (Borowitzka ve Borowitzka, 1992).

Scenedesmus türlerinin biyokütlesinin ham protein içeriği %50 ile %53 arasındadır. Hücre duvarı hücre ağırlığının %5-6'sını oluşturmaktadır. Hücre duvarının yapısı; kuru ağırlık olarak %28 selüloz, %31 hemiselüloz, %1,7 pektin, %14 ham protein ve %9 yağ oluşturmaktadır. Biyokütlesinin toplam yağ asidi içeriği kuru ağırlığın %5'i kadardır. Yapılan bazı çalışmalarda bu içeriğin %70'lere çıkabildiği ileri sürülmüştür. Bu yağ asitleri doymamış ve çoklu doymamış yağ asitlerinden, yüksek oranda da heksatetraenik asitten (C16:4) oluşmaktadır (Borowitzka ve Borowitzka, 1992).

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 stoplazmasında 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.

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 az sayıda genetik uygulama mevcuttur (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 özelliklerinde önemli değişimler gözlenmektedir (Sharma vd., 2012).

1.3. Mikroalg Yetiştirme Ortamının Fiziksel Özellikleri

Mikroalgler yaşadıkları çevre ile etkileşim içindedir. Işık, sıcaklık, ph ve besinler mikroalgleri etkileyen en önemli etkenlerdendir. Uygun üretim için bu parametrelerin optimum seviyede olması gerekir. Bu parametreler sadece fotosentezi ve verimliliği etkilemekle kalmaz, aynı zamanda hücrel aktiviteyi ve hücrel kompozisyonu da etkilerler (Richmond, 2004).

Çizelge 1.2. Mikroalg üretimine etki eden parametreler için genelleştirilmiş değerler (Coutteau, 1996).

Parametreler	Aralık	Optimum
Sıcaklık (°C)	16-27	18-24
Tuzluluk (g.L ⁻¹)	12-40	20-24
Işık Yoğunluğu (lux)	1,000-10,000 (hacim ve yoğunluğa bağlıdır)	2,500-5,000
Fotoperiyot (aydınlık: karanlık, saat)		16:8 (minimum) 24:0 (maksimum)
pH	7-9	8.2-8.7

1.4. Sıcaklık

Sıcaklık alglerin büyüme hızını, hücre boyutunu, gerekli besinleri, biyokimyasal bileşimini en çok etkileyen parametrelerden biridir. Optimum sıcaklıkta büyüme hızı, sıcaklık ile artmasına rağmen bazı türlerde belirgin bir şekilde azalma görülebilir. Üretimlerde mikroalglerin çoğu 16-27°C arasındaki sıcaklığı tolere edebilmektedir. 16°C'den düşük sıcaklıklar üremeyi yavaşlatır ve 35°C'den yüksek sıcaklıklar genellikle öldürücü etki göstermektedir. Hücre boyutu minimum, karbon ile azot kullanım verimliliği optimum sıcaklıkta artarken, optimum olmayan sıcaklıklarda azalır. Sıcaklık değişmesi ile birlikte lipit zarı içindeki yağ asitlerin seviyesinde de değişim oldukça sık görülür. Alg üretiminde optimum sıcaklığın üzerindeki bir artış protein sentezini azaltır ve dolayısıyla algin büyüme hızı yavaşlar. Sıcaklık aynı zamanda alg hücreesindeki nişasta içeriğine de etki etmektedir ve nişastanın bozulmasına yol açmaktadır (Juneja vd., 2013).

Sıcaklığın membran lipit içeriğine etkisinin incelendiği bir çalışmada; Sıcaklığın düşüşü membran sistemindeki yağların doymamışlık derecesini arttırdığı gözlemlenmiştir (Richmond, 2004).

1.5. Işık

Işık, alglerin büyüme evresinde kullandıkları bir enerji kaynağı ve organik bileşikleri; özellikle şekerleri karbon dioksit'e dönüştürmek için kullandıkları bir enerji türüdür. Bu yüzden ışık alglerin büyümesinde önemli bir etkidir. 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 çıkarır. 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. Düşük ışık yoğunluğunda, yosunlarda ekstraselüler polisakarit içeriğinde artış sağlandığı ve daha yüksek protein içeriğiyle sonuçlandığı gözlenmiştir (Juneja vd., 2013). Birçok fotosentetik mikroorganizmanın doygunluğa ulaştığı aydınlatma düzeyi yaklaşık $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ olduğu gözlemlenmiştir (Sharma vd., 2012).

1.6. pH

Mikroalglerin üretimine etki eden diğer bir parametre ise pH'dır. Spesifik olarak her tür belirli bir pH aralığında üreyebilir. 7 ile 9 aralığı alglerin üremeleri için uygun pH değeridir. Uygun pH değerinin olmaması, ortamdaki alglerin hücrelerinin parçalanarak ölmesine neden olur. Kontrollü sistemler ile çalışılması durumunda gerekli asit ve baz ilaveleri ile pH istenen aralıkta tutulabilmektedir. pH; besin alımı ile doğrudan ilişkilidir. pH yükselmesi karbondioksit ve nitrat alımında, pH düşüşü amonyak alımında olmaktadır (Rashid vd., 2013). pH 10-11'in üzerinde olduğunda mikroalglerin gelişimi inhibe olmaktadır. Ancak, bazı türler asidik veya alkali şartlarda optimum gelişim gösterebilirler. Örneğin, *C. Littorale* nin optimum pH değeri 4, *Spirulina platensis* türünün pH değeri 9 olarak gözlemlenmiştir (Zeng vd., 2011).

1.7. Tuzluluk

Tuzluluk (NaCl) konsantrasyonu; alg hücrelerinin biyokimyasal yapısını etkileyen önemli faktörlerden biridir. Doğal yaşamlarından daha tuzlu ya da tuz oranının az olduğu ortama alınan alglerin büyüme hızı ve bileşiminin değiştiği gözlemlenmiştir. Tuz stresi altındaki alglerin lipid içeriğinin arttığı görülmüştür (Zhila vd., 2011; Fabregas vd., 1984). Ayrıca yapılan başka bir

çalışmada, *Dunaliella sp.* türünün yetiştirildiği ortamdaki NaCl konsantrasyonu 0,4 M'dan 4 M'a artırıldığında, doymuş ve doymamış yağ asitlerinde bir artış olduğu tespit edilmiştir (Xu ve Beardall, 1997). Yapılan başka bir çalışmada *Dunaliella tertiolecta* türünün NaCl konsantrasyonu 0,5 M'dan 1,0 M'a çıkarıldığında lipitlerin %60'tan %67'ye yükseldiği ve trigliserid konsantrasyonların %40'tan %56'ya çıktığı gözlenmiştir (Takagi ve Yoshida, 2006).

1.8. Besinler

Mikroalglerin fototrofik üremede gerekli olan besinler; vitaminler, makro ve mikro elementlerdir. Yapılan bazı çalışmalarda Alglerde en az 56 elementin var olduğu saptanmıştır. Bu elementlerden bazıları Azot (N), Fosfor (P), kobalt (Co), Potasyum (K), nikel (Ni), Kükürt (S), Sodyum (Na), Magnezyum (Mg) ve Kalsiyum (Ca) gibi elementlerdir. Bu elementler alg fizyolojisinin temelini oluşturur ve metabolik faaliyetler için gereklidir. Azot açlığına maruz bırakılmış bazı mikroalgal hücrelerinin nötral yağları daha fazla ürettiği, buna karşit olarak büyüme ortamında azot bulunan hücrelerin ise polar yağları daha fazla ürettiği gözlemlenmiştir (Becker, 1995; Jayasankar ve Polywal, 2000; Sukatar, 2002; Richmond, 2004). Azot, alglerde bütün yapısal ve işlevsel proteinlerin temel bileşenini oluşturur, kuru ağırlığının %7-20'sini oluşturur, ayrıca nükleik asit ve proteinlerin oluşumunda görev alan temel elementtir (Hu., 2008).

1.9. Havalandırma/Karıştırma

Karıştırma, alglerin sedimentasyonunu önler. Kültürlerde sıcaklık, ışık gibi parametrelerin ortamda optimum seviyelerde tutulmasında ve hücrelerin homojen olarak dağılmasında önemli rol oynar. Böylece ısıl tabakalar önlenmiş

olur ve kültür ortamı ile hava arasındaki gaz transferinin düzeni sağlanmış olur. Karıştırma, kültür sisteminin büyüklüğüne bağlı olarak; günlük ve elle (tüpler ve erlenler için), havalandırma ile (torbalar, tanklar vb.), çarklı pedallar ve pompalar (havuzlar) ile gerçekleştirilir (Becker, 1995; Coutteau, 1996).

1.10. Mikroalglerin Kullanım Alanları

Mikro ve Makroalglerin kullanım alanlarıyla alakalı çalışmalar çok öncelere dayanmaktadır. Kral Shen Nung M.Ö. 2700 yıllarında, algleri ilk olarak kullanan kişi olarak bilinir. M.S. algler, tıp alanında yoğun olarak kullanılmıştır. Çin, Japonya ve Kore'de besin maddesi olarak kullanımı oldukça yaygındır. Roma imparatorluğunda Virjil ve Heros döneminde Alglerin kozmetik sanayinde kullanımı ve renk maddesi olarak kullanımından faydalanılmıştır. Uzak doğuda, gübre yapımı aglerin en eski kullanım alanlarındandır. Ayrıca agar, carragenan ve alginat gibi maddeler alglerden elde edilen diğer önemli maddelerin başında gelmektedir (Cirik, 1981).

Mikro ve makroalgler canlılar tarafından doğrudan kullanımıyla bilinip önemli besin kaynağını oluşturular. Şimdiki dönemde insanlar tarafından tüketilen ve oldukça beğenilen çok sayıda *Cyanophyta* türü bulunmaktadır. 1965 yılında Çad Gölünde yaşayan *Spirulina*'nın yanı sıra insanlar tarafından oldukça beğeniyle tüketilen *Prasiola japonica*, *Nostoc pruniforme*, *Nostoc verrucosum*, *Phylloderma sacrum*, *Oodegonium*, *Spirogyra*, *Prasiola juannica*, *Nostoc commune* türleride mevcuttur (Gökpınar, 1991).

Doğal olarak toplanabilen alglerin, kültürleri yapılmakta ve denizlerde de karalar gibi ekilip biçilmektedir (Atay, 1984; Zaccaro vd., 1999; Ordog, 1999). Mikroalgler tatlı su, deniz ve karasal ortamda yaşayabilirler (Issa vd., 2007).

Makroalglerde iyot, brom, organik asitler, monosakkaritler, polisakkaritler, agar, alginik asit, steroller, proteinler ve vitaminler içermektedirler (Atay, 1984; Zaccaro vd., 1999; Ordog, 1999). Mikroalgler bitkilerin gelişmesine etki eden oksinler, şeker, aminoasitler ve bazı vitaminler içerisinde barındırmaktadır ve toprağın yapısını, geçirgenliğini, su tutma kapasitesini geliştirip, toprak partiküllerini ve toprak agregasyonunu arttıran kompleks organik karbon bileşenleri içermektedir (Shariatmadari vd., 2011).

Alglerin bir diğer kullanım alanı deri sanayisidir. Boya sanayisinde kullanılan algler ise emülsiyonu sabitleştirmek ve fazla akıcılığı engellemek, pigmentlerin zarar görmesini önlemek için kullanılır. Algler çözücü ve boya zenginleştirici olarak kullanılır. Tekstil sanayisinde kullanılan alglerden püskürtme yöntemiyle ipeğe benzeyen yapay iplik üretimi için kullanılırlar. Toksik madde içermediğinden ve yan etkisinin bulunmamasından kaynaklı olarak algler kozmetik sanayisinde birçok ürünün kullanım içeriğinde yerini almıştır. Losyonlar, cilt temizleme maddeleri, saç spreyi, cilt bakım maskeleri, organik boyalar, cilt kremlerinde önemli ana madde olarak kullanılırlar (Banat vd., 1996; Robinson vd., 2001; Rao vd., 2011; Kim ve Pangestuti, 2017).

Alglerin alkol sanayisinde kullanımı bira ve şarap berraklaştırıcılığıdır. Kokteyllerin çökmesini engellemek amacı ile stabilizatör olarak kullanılırlar. İlaç sanayisinde alglerden sıkça faydalanılır. Mum ve yağların çözeltilerine akıcılık kazandırmak için; ilaç tabletlerinde ise ayrıştırma maddesi, dolgu maddesi olarak ve tabletlerin üzerine kaplama maddesi olarak kullanılır. Bilinen bir diğer kullanımı; hormon, vitamin, antibiyotik gibi maddelerin yapımıdır (Senthil vd., 2012).

Kâğıt sanayisinde kullanılan algler parşömen kâğıdı üretiminde kullanılır. Ayrıca cilalama işleminde, su sızdırma ve mürekkep dağılımını önlemede, dolgu materyali olarak kullanımında yaygındır. Doğal kauçuğa ilave edilerek, kauçuğun yumuşaklık ve akıcılık kazanmasını sağlarlar. Bu nedenle kauçuk

sanayisinde de kullanım alanları mevcuttur (Tarlan ve Dilek, 2002; Cardozo vd., 2007; Senthil vd., 2012).

Mikroalgler zengin yağ içeriğinden dolayı çeşitli yenilenebilir biyoyakıt eldesi olarak kullanılırlar. Algal biyokütlenin anaerobik sindirilmesi sonucu üretilen metan gazı, mikroalgal yağdan türetilen biyodizel ve fotobiyolojik olarak üretilen biyohidrojen bunlardan bazılarıdır. Yakıt kaynağı olarak kullanılan mikroalglerin kullanımı eskilere dayanmaktadır, fakat yeni dönemde petrol fiyatlarındaki artış ve küresel ısınma sorunları nedeniyle üretimi daha yaygın hale gelmiş ve kurtarıcı rol oynadığı düşünülmüştür (Chisti, 2007; Carioca vd., 2009).

Mikroalglerden üretilen doğal yağ (lipid) formunun, biyodizel üretimi için uygun yapıda oluşu, mikroalgleri biyodizel üretimde ayrıcalıklı bir yere koymuştur. Mikroalglerin yüksek lipid içeriğinden dolayı biyoyakıt üretiminde kullanılması alglerin en umut verici grubu halini almıştır (Brennan ve Owende, 2010).

Mikroalgler, içerdikleri çoklu doymamış yağ asitleri sayesinde (PUFA) çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) n-3 PUFA'lardan olan eikosapentaenik asit (EPA), α -linolenik asit (ALA), dokosapentaenik asit (DPA) ve dokosaheksaenik asit (DHA) ; astım, kanser, tip-2 diyabet, cilt hastalıkları ve kalp damar hastalıkları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Priyadarshani ve Rath, 2012).

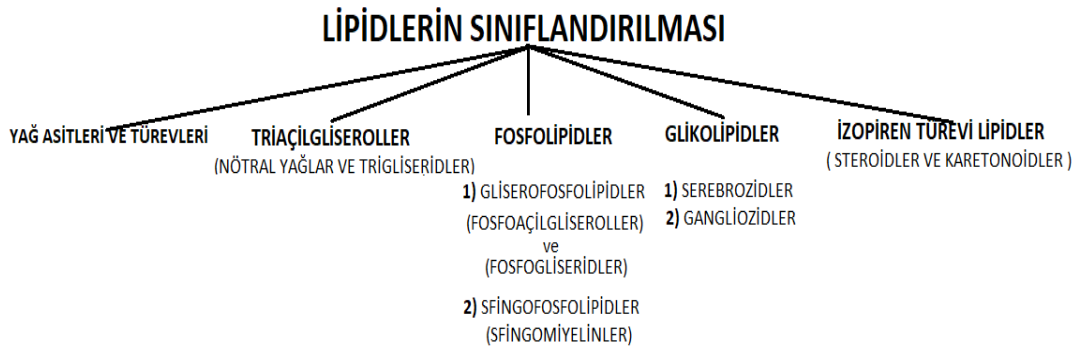
Alginat türevleri ve alginik asit, kahverengi alglerin hücre duvarlarından elde edilen bir karbonhidrattır. Bu madde kozmetik, mayalama, tekstil, boya endüstrilerinde, tıpta ise koagülasyon olarak kullanılmaktadır. Ayrıca önceden hazırlanmış yiyeceklerin paketlenmesi, kabızlığın tedavisi, kozmetik, deri, tekstil ve kâğıt endüstrilerinde kullanılmaktadır (Sharma, 2007).

Diatomite, mikroskopik boyutlardaki bir alg türünün fosilleşmesi sonucu meydana gelir ve diatomların hücre duvarı oluşturur. Diatom kabuklarının üst üste birikmesiyle de geniş yüzey alanları oluşur. Diatomite'ler bira sanayisi, ısı yalıtımı, şeker rafinerisi, temizleme sanayi, cam bardak fabrikalarında kullanılırlar (Sharma, 2007).

1.11. Lipidler

Yapılarında önemli miktarda nonpolar hidrokarbon zinciri bulunan, amfipatik özelliğe sahip, yağ asitleri ve yağ asiti türevleri ile biyosentetik veya fonksiyonel olarak ilişkilendirilen maddelere 'Lipid' adı verilmektedir. Lipidler suda erimeyen, kloroform, eter, benzin, petrol gibi organik solventlerde eriyen heterojenik yapılu bileşiklerdir (McMurry, 1984).

Çizelge 1.3. Lipidlerin sınıflandırılması (Ratledge ve Wilkinson, 1988)



Lipidler karbon (C) ve hidrojen (H) atomlarından oluşur, oksijen (O) ise bazılarında eser miktarda, bazılarında ise hiç bulunmamaktadır. Bazı

lipidlerin yapılarında fosfor (P), azot (N) ve kükürt (S) atomlarında bulunabilir. Basit, bileşik ve türev lipidler şeklinde 3 sınıfa ayırmak mümkündür. Basit yapılı lipidler triaçilgliseroller, yapısında şeker, fosfat ve sülfat gibi maddeler barındıranlar bileşik lipidler, yağ steroller, mono ve digliseridler gibi lipidlerin yapısında yer alan maddelere türev lipidler denir (Yenson, 1984).

1.12. Yağ asitleri

Yağ asitleri yağların temel bileşenini oluştururlar. Genellikle çift sayıda karbon içeren, düz zincirli, farklı zincir uzunluğuna sahip, alifatik ve monobazik organik asitlerdir. Yağ asitlerinin genel formülü $CH_3 (CH_2)_n COOH$ olarak yazılır. Yağ asitleri kısa, orta, uzun zincirli veya doymuş - tekli, çiftli ile çoklu doymamış yağ asitleri olarak bilinir (Karaca ve Aytaç, 2007). Yağ Asitleri, doymuş yağ asitleri ve doymamış yağ asitleri şeklinde ikiye ayrılır;

1.13. Doymuş Yağ Asitleri

Doymuş yağ asitleri genellikle çift sayıda karbon atomlarından oluşan ve yapısında hiç çift bağ içermeyen organik asitlerdir. Laurik asit (C12:0), miristik asit (C14:0), palmitik asit (C16:0), stearik asit (C18:0), araşidik asit (C20:0) ve behenik asit (C22:0) bitkisel yağlarda bulunan en önemli doymuş yağ asitleridir. Doku ve hücrelerden doğal olarak elde edilen yağ asitlerinin sayısı 70'i aşmaktadır (Karaca ve Aytaç, 2007).

Bazı önemli doymuş yağ asitleri;

ADI	YAPISI	ERİME NOKTASI
Laurik	Asit $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44
Miristik	Asit $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	54
Palmitik	Asit $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63
Stearik	Asit $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$	70
Araşidik	Asit $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	75
Behenik	Asit $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	80
Lignoserik	Asit $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	84
Butirik	Asit $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	-
Serebronik	Asit $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}\text{CHCOOH}$	alfa-hidroksi yağ asidi

Doymuş yağ asitleri çift sayıda karbon atomlarından oluşur. Fakat yapısında hiç çift bağ yoktur ve insan vücudunda, karbonhidrat metabolizması ile oluşan moleküllerden sentezlenebilmektedir. Miristik asit (C14:0), stearik asit (C18:0), stearik asit (C18:0), laurik asit (C12:0), palmitik asit (C16:0), behenik asit (C22:0), araşidik asit (C20:0) bitkisel yağlarda bulunan önemli doymuş yağ asitlerindedir (Karaca ve Aytaç, 2007).

1.14. Doymamış Yağ Asitleri

Doymamış yağ asitlerinin formülü $C_nH_{2n+1}-MCOOH$ tır. Zincir üzerinde en az bir çift bağ içerir. Doymamış yağ asitlerinde çift bağlar hemen hemen daima cis konfigürasyonundadır. Yapılarındaki çift bağlar nedeniyle, doymamış yağ asitleri doymuş yağ asitlerine göre daha reaktiftirler (Nas vd., 2001). Çift bağ sayısı arttıkça reaktivite artmaktadır. Doymamış yağ asidi olan Palmitoleik asit, deniz hayvanları yağları için karakteristik bir bileşen olduğu halde, oleik asit tüm doğal yağların yapısında bulunur. Bu iki yağlar monoenoik yağ asitleri olarak adlandırılır. Çoklu doymamış yağ asitleri beslenmede F vitamini olarak bilinir (Karaca ve Aytaç, 2007). Birden fazla çift bağ içeren yağ asitleri sırası ile çiftli doymamış, üçlü doymamış ve çoklu doymamış (poliansatüre, PUFA) yağ asitleri ya da polienoik yağ asitleri olarak isimlendirilmektedir (Nas vd., 2001).

Bazı önemli doymamış yağ asitleri;

<u>ADI</u>	<u>YAPISI</u>	<u>ERİME NOKTASI</u>
Oleik Asit	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	13
Vaksenik Asit	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9COOH$	44
Linoleik Asit	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_2(CH_2)_6COOH$	-5
Linolenik Asit	$CH_3CH_2(CH=CHCH_2)_3(CH_2)_6COOH$	-10
Arakidonik asit	$CH_3(CH_2)_4(CH=CH_2)_4(CH_2)_2COOH$	-50

1.15. Triaçilgliseroller: (Nötral Yağlar)

Nötral yağlar Mono, Di veya Triaçilgliseroller olarak isimlendirilirler. 3 molekül yağ asidinin gliserol ile yaptığı esterlerdir. Yağ asitlerinin ana depo şeklidir. Ayrıca nonpolar ve hidrofobik moleküllerdir. Önceden nötral yağlara, sadece trigliseridler denirdi, şimdi ise, mono ve digliseridler de nötral yağlar olarak kabul edilmektedir. Gliserolün bir yağ asidiyle esterleşmesine monoaçilgliserol, iki yağ asidi ile esterleşmesine diaçilgliserol, üç yağ asidi ile esterleşmesinde triaçilgliserol meydana gelir (Örneğin tristearin veya tripalmitinde olduğu gibi). Kısaca, bir alkol olan gliserolün yağ asidi esterlerine, nötral yağlar denir. Nötral yağlar bitkisel ve hayvansal hücrelerin başlıca depo yağlarıdır. Total lipidin önemli bir kısmı çoğu kez triaçilgliserol (TAG) içeren nötral lipidlerdir (Tonon vd., 2002). Özellikle omurgalıların yağ depoları, nötral yağlardan oluşmaktadır. Birden fazla değişik cinsten yağ asidi ihtiva eden nötral yağlara ise miks triaçilgliseroller (örneğin oleodi-stearin) denilir. Nötral yağların yapısında yer alan yağ asitlerinin zincir uzunlukları ne kadar kısa ise bu yağların erime noktaları o derece düşüktür, aynı zamanda besin değerleri de o derece büyüktür. Bitkilerde bulunan yağ asitlerinin zincir uzunlukları ve doymamışlık dereceleri farklılık gösterir, oda sıcaklığında (25° C) sıvı halde bulunur.

1.16. Algal Yağlar

Yağlar ve yağ asitleri, tüm bitki hücrelerinin bileşenleridir Algal yağlar karbon sayıları 12 ile 22 arasında değişen yağ asitlerinin gliserol, şekerler ve bazlar ile birleşimi şeklindedir. Membranda, metabolit olarak, depo maddesi olarak ve enerji kaynağı olarak kullanılırlar. 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.

Bu lipidler transesterifikasyon ile biyodizel ve gliserol eldesinde kullanılabilirler. Yağlar polaritelerine göre gruplandırılabilirler Mikroalglerin yağ içeriği kuru ağırlıkça %1 ile %40 arasında değişmektedir ve hatta belirli koşullar sağlandığında bu oran %80'lere ulaşmaktadır. Algal yağlar doymuş veya doymamış olabilirler. Ökaryotik algler ağırlıklı olarak doymuş ve tekli doymuş yağ asitleri, filamentöz siyanobakteriler çoklu doymamış yağ asitlerini içerir. Trigliseritler ise en yaygın depo yağlarıdır ve toplam yağ fraksiyonunun %80'ine varan oranlarda bulunur. Diğer temel algal yağlar; sülfokinovozil digliserit, mono ve digalaktozil digliserit, lesitin, fosfatidil gliserol ve inositoldür. Yağlar, yağı çözen eter, petrol eteri, kloroform gibi bazı organik çözücüler ile ekstrakte edilir. Bu şekilde ekstrakte edilmiş yağlara "toplam yağ" denir (Sharma vd., 2012; Richmond, 2004).

Besinsel ve çevresel faktörler, yağ asitlerinin toplam miktarını ve kompozisyonunu etkilemektedir. Bundan başka sıcaklık, aydınlanma gibi iç ve dış koşullar yağ sentezini etkilemektedir. Azot kıtlığına maruz kalan alglerde yağ içeriğinde artış görülmüştür. Stres şartlarına maruz bırakılan çoğu türde nötral lipidler TAG şeklinde sentezlenirler (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 bulunmaktadır (Sharma vd., 2012). *Dunaliella sp.* ve *Tetraselmis suecica* gibi türlerde ise azot kıtlığında yağ içeriği artmak yerine azalmış, karbonhidrat içeriği artmıştır. Azottan başka, diğer besinsel kıtlıklar da yağ içeriğini arttırıcı bulunmuştur (Makulla, 2000; Richmond, 2004).

Çizelge 1.4. Bazı mikroalglerin biyokimyasal kompozisyonları (Makulla, 2000; Richmond, 2004)

ALGAL SINIF	TOPLAM YAĞ (%KURU AĞIRLIK)	NÖTRAL YAĞ (%KURU AĞIRLIK)	GLİKOLİPİT (%KURU AĞIRLIK)	FOSFOLİPİT (%KURU AĞIRLIK)	HİDROKARBON (%KURU AĞIRLIK)
<i>Cyanophyceae</i>	2-23	11-68	12-41	16-50	0,005-0,6
<i>Chrysophyceae</i>	12-72				
<i>Cryptophyceae</i>	3-17				0,0035
<i>Xanthophyceae</i>	6-16	44	17	39	28
<i>Rhodophyceae</i>		41-58	42-59		
<i>Dinophyceae</i>	5-36				0,004-0,2
<i>Bacillariophyceae</i>	1-39	14-60	13-44	10-47	0,2-0,7
<i>Chlorophyceae</i>	1-70	21-66	6-62	17-53	0,03-1,0

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kültür Ortamları

Yapılan bu çalışmada *Scenedesmus intermedius* ve *Scenedesmus planctonius* türlerini yetiştirmek üzere Bold's Basal Medium (BBM) besiyeri kullanılmıştır. Genel besi yeri ve element manipülasyonunun olduğu besi yerlerine ait ortam içerisindeki kimyasal maddeler ve oranları Çizelge.1 de verilmiştir.

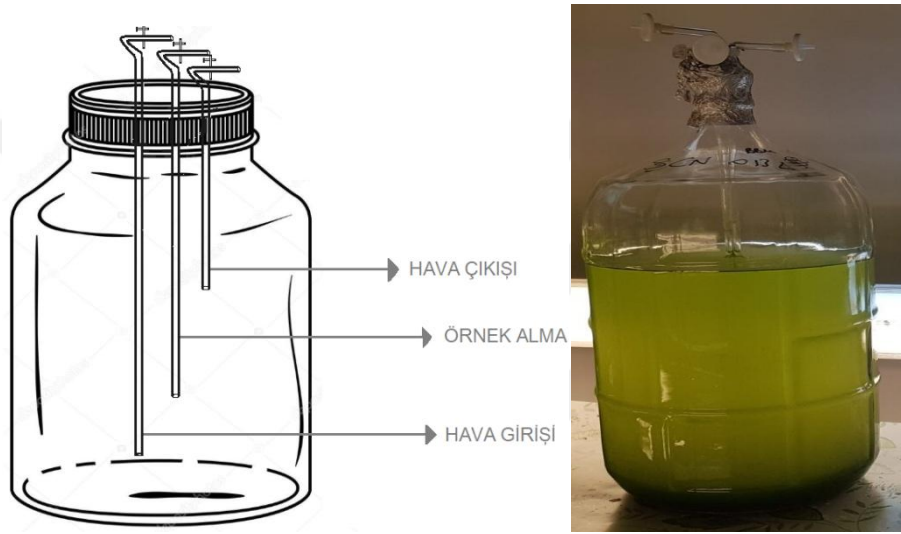
Çizelge 2.1. Besi Yerlerine Ait Ortam İçerisindeki Kimyasal Maddeler ve Oranları

<u>MAKROELEMENTLER 60ML</u>		<u>ALKALİN EDTA SOLÜSYONU 1ML</u>	
NaNO ₃		EDTA	0,025 g / 0,5ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,025g/10ml	KOH	0,016 g / 0,5ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075g/10ml	<u>ASİTLİ DEMİR SOLÜSYONU 1ML</u>	
K ₂ HPO ₄	0,075g/10ml	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005g/1ml
KH ₂ PO ₄	0,175g/10ml	H ₂ SO ₄	1ml
NaCl	0,025g/10ml	<u>BORON SOLÜSYONU 1ML</u>	
H ₃ BO ₃	0,014g/10ml	MoO ₃	0,071g/100ml
<u>TRACE SOLÜSYONU 1ML</u>		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,157g/100ml
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,082g/100ml	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,049g/100ml

*936 ml distile suya her solüsyondan yukarıda yazılı kadar eklenerek 1litreye tamamlanmıştır.

2.2. Kültür retim Sistemleri

Kültürü yapılan alg türlerinin besiyerleri 20 litrelik cam damacanalarda içerisine besi yerleri hazırlanmış ve otoklavlanmıştır. Hava girişi sağlama ve örnek alma amacıyla 0,7 x 250 mm ve 0,7 x 400 mm' lik, hava çıkışını sağlamak için ise, 0,7 x 80 mm'lik iki adet cam boru eklenerek kültür kontaminasyonunu önlemek için uçlarına 0,2 µm'lik PTFE filtreler takılmıştır.



Şekil 2.1. Kültürlerde kullanılan fotobiyoreaktör Şeması



Şekil 2.2. Kültürlerde kullanılan fotobiyoreaktör fotoğrafı



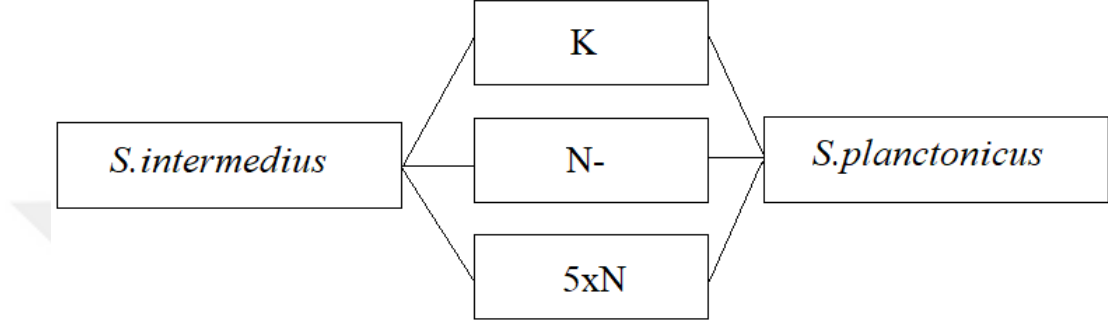
Şekil 2.3. Deneşlerde kullanılan aşı kùltür örnekleri

2.3. Stok Kùltür Hazırlanması

Stok kùltürleri hazırlamak amacıyla Kırıkkale bölgesinde bulunan Kızılırmak nehrinden 5 litre su örneği alınmış ve 5000 rpm'de 15 dk santrifùj edilmiştir. Daha sonra, süpernatant kısmı dökülerek pellet kısmı 1ml gölet suyu ile karıştırılarak süspansiyon elde edilmiştir. Literatürde yaygın olarak kullanılan BBM besiyerlerine steril edilmiş öze yardımıyla bu süspansiyondan alınarak petrilere (plak) hazırlanan katı besi ortamına çizgi ekim metoduyla ekim gerçekleştirilmiştir. Etrafı hava almayacak şekilde parafilmle kapatılan petrilere ekim odasında uygun sıcaklık (25°C) ve yeterli ışık altında ($90 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}^{-1}$) 30 cm mesafeden çift taraflı floresan lambalarla, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak şekilde aydınlatılma yapılmıştır. Bu işlemler monoalgal ve aksenik koloniler elde edilinceye kadar devam ettirilmiştir. Sonrasında elde edilen türler otoklavlanarak steril edilmiş, ağızları pamuk ve alüminyum folyo

ile kapatılan 250 ml'lik Erlenmayerlerde hazırlanan sıvı besi yerlerine(BBM) aktarılarak deneylerde kullanılacak aşı kültürleri elde edilmiştir.

Çizelge 2.2. Besin manipulasyonları şeması



Belirtilen tüm ölçümler inkübasyonun 16.gününde örneklenen mikroalgler kullanılarak yapılmıştır. Tüm deneysel ölçümler iki biyolojik tekrar grubu kullanılarak alınmıştır.

Yapılan ölçümler azot (N) elementlerinin hiç bulunmadığı ve N 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 bu seçim yapılmıştır.

2.4. Ekimi Yapılan Türlerin OD-750nm Ölçümleri

Alglerin bölünme zamanları/büyüme hızlarının belirlenmesi amacı ile örneklenen mikroalglerin spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek kaydedilmiştir. 16 gün inkübasyona bırakılan

alglerden günlük 1 ml sıvı alg kullanılmıştır. lmler sırasında BBM kr olarak kullanılmıştır.

2.5. Ekimi Yapılan Türlerin Hasat İşlemi

Durgun faz durumuna gelen numuneler 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen çöküntü kısım 1,33 Pa altında -83°C'de 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Daha sonra deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır (Richmond, 2004).

2.6. Işık mikroskopisi

Işık mikroskopisi ölümleri için erlenlerin herbirinden eppendorf tüplerine belirli bir miktar örnek alınıp %5 hacimde lugolle hücreler sabitleştirilmiş, inceleme için 20µl alg rneği alınarak hazırlanan geçici preparatlardaki mikroalgler x40'lık objektifte görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

2.7. Toplam Nötral Lipid Tayini

Mikroalglerde toplam nötral lipid içeriğinin miktarsal olarak belirlenmesi için 750 nm dalga boyunda tüm numunelerin absorbansı 0,2 olacak şekilde hacimlendi. Bir miktar alg çözeltisi alınıp son konsantrasyonu 0,26 µM olacak şekilde Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one) boyası ile 15 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra, 5000rpm'de 3dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve örneklerin her biri BBM mediumla yıkanıp vortekslendi. Nile red ile boyanan örneklerin her biri 490 nm eksitasyon ve 585 nm emisyon değerleri kullanılarak floresans özelliği bulunan

spektrofotometre cihazı ile absorbans değerlerine bakılarak lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler tayin edildi (Fedorov vd. 2005).

2.8. TAG Konsantrasyonlarındaki Değişimler: FTIR analizi

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

FTIR ölçümü için deney süresince ^{14}N elementinin hiç bulunmadığı veya 5x konsantrasyonda bulunduğu ortamlarda inkübasyona bırakılan ve inkübasyonun 16. gününde örneklenen mikroalglerin yoğunlukları 750 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerlerine bakılarak absorbans değeri 0,2'den düşük olanlardan daha fazla (1 ml'nin üzerinde) ve 0,2'den yüksek olanlardan daha düşük (1 ml'nin altında) hacimde olacak şekilde eşitlendi. Eşit yoğunlukta alınan mikroalgler 3 kez 4°C ' de ve 5000 rpm devir hızında 3dk boyunca santrifüjlendi ve süpernatant atılarak yıkama gerçekleştirildi. Daha sonra 45°C 'ye ayarlanmış vakumlu inkübatörde mikroalglerin buldukları ependoflardaki su tamamen buharlaşınca kadar inkübe edildi ve FTIR cihazına yerleştirildi. Cihaza yerleştirilen örneklerden $500\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ arası absorbans ölçümü ile elde edilen değerler toplandı. Her bir örneğin ölçümü için 32 tarama ortalaması kullanıldı. Mikroalglerdeki triaçilgliserol (1744 cm^{-1}) konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikler tespit edilmiştir (Movasaghi vd., 2008).

2.9. FAME Üzerindeki Değişimler: GC-FID 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.

- Büyüme ortamından sürekli çöktürerek sağlanan yaklaşık 0,1 g mikroalg eppendorf tüplerine alınmış, saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra üzerine 300 µl ekstraksiyon solüsyonu (metanol içerisinde hazırlanmış %2'lik H₂SO₄ çözeltisi) ilave edilmiştir.
- Örnekler 2 saat boyunca 80 °C sıcaklıkta sonikatörde bekletilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında örnekler 10 dk oda şartlarında bekletilmiş ve sıcaklığın düşmesi sağlanmıştır.
- Eppendorf tüplerinin içerisine 300 µl %0,9 konsantrasyonda NaCl ve 300 µl hekzan ilave edilmiştir.
- Metanolde bulunan lipidlerin hekzan fazına geçmesi için örnekler 1 dk boyunca vortekslenmiştir.
- Daha sonra örnekler 3 dk boyunca 5000 rpm devir hızında santrifüjlenmiştir.
- Son olarak üstteki hekzan tabakasından 300 µl örnek alınarak GC-FID tüplerine aktarılmıştır. GC-FID cihazında analiz yapılmıştır. Ölçüm için cihaza 130°C başlangıç sıcaklık, 240°C ye kadar her 5°C de 5 dk beklenmesi talimatı işlenmiştir.
- Ölçüm sonucunda elde edilen pikler analiz edilerek alan hesaplaması yapılmış ve belirlenen metil esterlerin yüzdeleri oransal olarak sunulmuştur.

2.10. Nötral Lipid Değişimleri: Flow Sitometre Analizi

Nötral lipid miktarındaki değişimi gözlemek için lipid bağımlı floresanı (nile red floresans) takip etmek amacıyla Flow Sitometre cihazı kullanılmıştır.

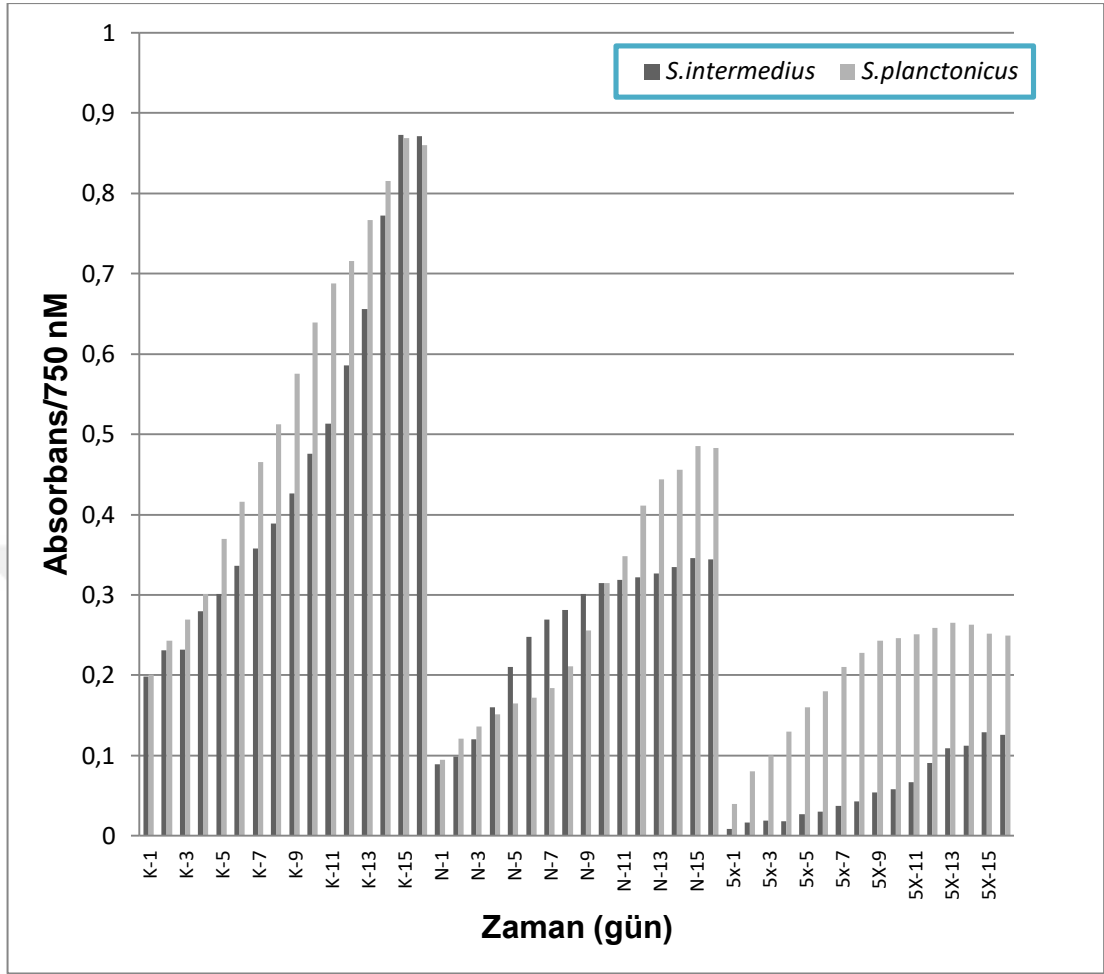
Numuneler, 1,0 ve 1,2 arasında bir PPUI (hücre yoğunluğu) karşılamak üzere seyreltildi ve daha sonra %0,35 etanol içinde seyreltilmiş 0,4 µg Nil Red kullanılarak nötral lipitler için boyandı. 5 dakikalık karanlık inkübasyondan sonra, örnekler aşağıdaki ayarlar kullanılarak FlowCAM çalıştırılmıştır 20x optik büyütme ve Tetikleyici-modeon, Kanal 1'in floresansı (otofloresans, 650 nm uzun geçiş filtresi) kanal 2 (BODIPY505 / 515, 525/30 nm filtresi) esas alınarak hazırlanmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, ortam Azot (N) elementi konsantrasyonlarında meydana gelen değişimlerin *S.intermedius* ve *S.planctonicus*'un nötral lipid içeriği ve ilgili parametreler üzerine olan etkilerini gösteren bulgular, şekiller ve çizelgelerle ayrıntılı olarak sunulmuştur.

3.1. Alg Türlerinde Gruplara Göre Büyümenin İncelenmesi

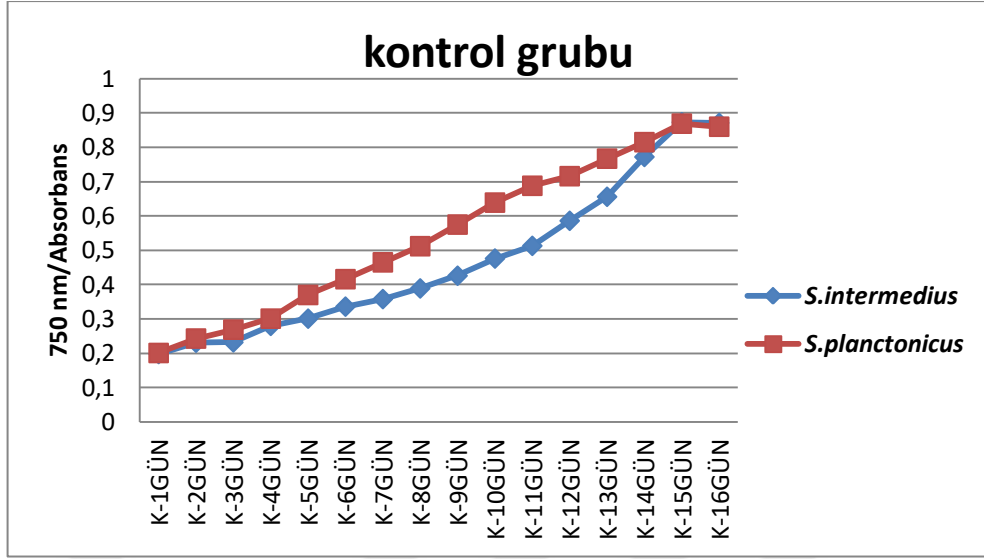
Mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasına yönelik uygun besin manipülasyonlarının belirlenmesi amacı ile öncelikle mikroalgler içerisinde, N (azot) elementinin hiç bulunmadığı veya 5x konsantrasyonda buldukları ortamlarda 16gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 16 gün inkübasyon süresince örneklenen mikroalglerin büyüme hızları 750 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Büyüme fazları (Lag fazı-adaptasyon fazı, Log fazı- logaritmik artış fazı, Durgunluk Fazı) bariz şekilde görülmüştür. Yapılan çalışmalarda mikroalglerin besin stresine cevapta mikroalglerin büyümelerinin baskılandığı görülmüştür (Young ve Beardall, 2003; Degrenne vd., 2011).



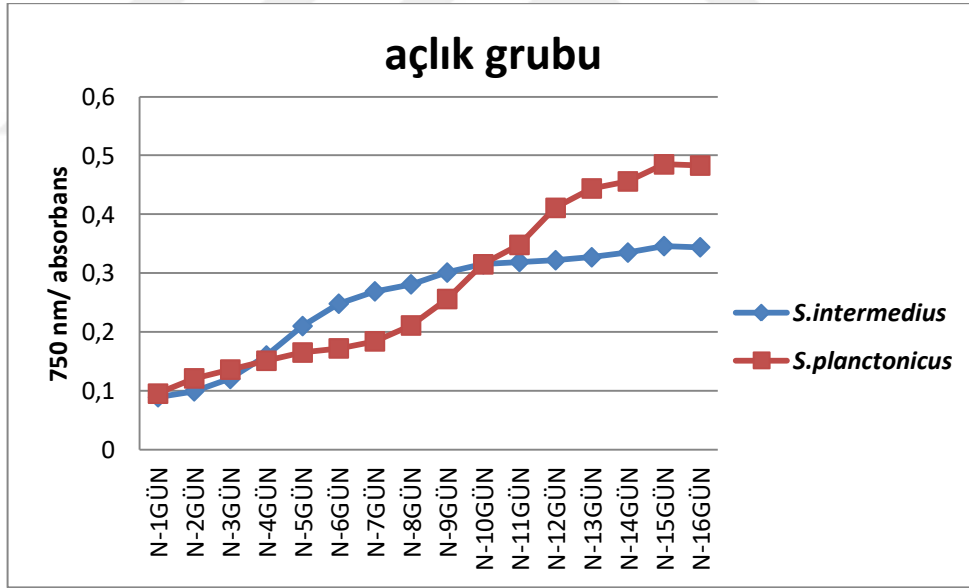
Şekil 3.1. *S.intermedius* ve *S.planctonicus* 16 günlük optik yoğunluk (OD; 750 nm) grafiği

Bu çalışmada büyüme ile ilgili elde edilen sonuçlara bakıldığında; açlık ve tokluk grubunun kontrol grubuna göre büyümesi baskılanmış, daha düşük düzeylerde büyüme gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil.3.1).

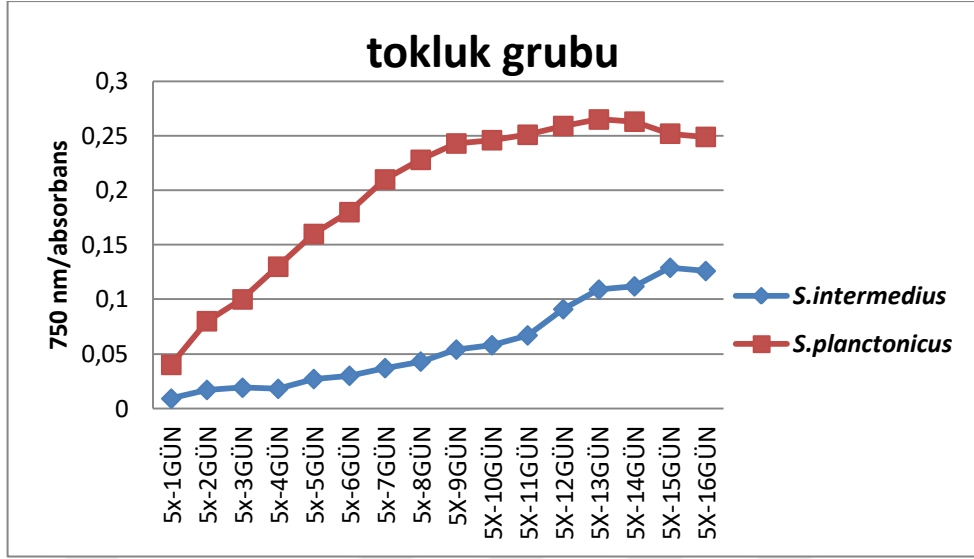
Kontrol grubu; 0-0,9 arasında artış gösterirken açlık grubu 0-0,5, tokluk grubu ise 0-0,2 arasında artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil.3.1).



Şekil 3.2. *S.intermedius* ve *S.planctonicus* kontrol grubu 16 günlük inkübasyon optik yoğunluğu (OD) 750 nm



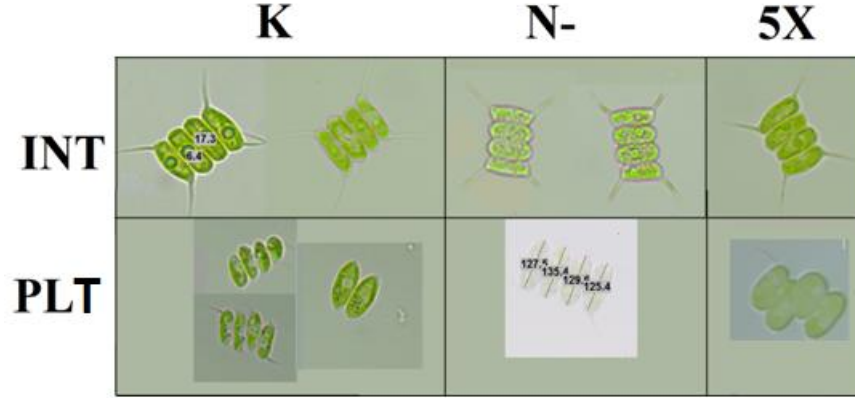
Şekil 3.3. *S.intermedius* ve *S.planctonicus* açlık grubu 16 günlük inkübasyon optik yoğunluğu (OD) 750 nm



Şekil 3.4. *S.intermedius* ve *S.planctonicus* tokluk (5x) grubu 16 günlük inkübasyon optik yoğunluğu (OD) 750 nm

Her iki tür için en düşük büyüme değerleri tokluk deneylerinde görülmüştür. Üstelik toklukta bu düşük değerler *S.intermedius* türü için *S.planctonicus* türüne göre deney boyunca daima yarıdan az olmuştur (Şekil 3.4).

S.planctonicus türü kontrol grubunda deney süresi boyunca daha fazla büyüme gösterdi. Bu durum açlık grubunda 11. ve 15. günlerde, tokluk grubunda ise deney süresi boyunca ve 2 katından daha fazla büyüme göstermiştir.



Şekil 3.5. *S.intermedius* ve *S.planctonicus* türlerinin Ortam element eksikliği ve bolluğu şartlarında 16 gün inkübe edilmiş hücrelerinin ışık mikroskopisi görüntüleri

Mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasına yönelik şimdiye kadar çok çeşitli stres uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yapılan uygulamalar sıcaklık ve ışık stresi uygulamaları, makrobesin element stresi, ultraviyole ışın stresi, tuz stresi, pH ve ağır metal stresi gibi uygulamalardır (Sharma vd., 2012). Yapılan çalışmalarda azot kaynağı ve farklı konsantrasyonlarının, mikroalglerin büyüme ve biyokimyasal yapılarında etkili olduğu gözlemlenmiştir (Brown vd., 1996; Gökpınar, 1991; Fidalgo vd., 1995; Valenzuela-Espinoza vd., 1999; Xu vd., 2010) Işık, pH, sıcaklık, besin mikroalglerin büyümelerini etkileyen önemli parametrelerdendir. En uygun büyüme için bu parametrelerin optimum seviyede olması gerekmektedir. Bu parametreler sadece fotosentezi ve hücrel verimliliği etkilemekle kalmayıp aynı zamanda hücrel aktiviteyi, dolayısıyla hücrel kompozisyonu da etkilerler (Richmond, 2004). Bu yüzden yağ içeriğinin maksimum olduğu koşullar hücrenin büyümesi için optimum olmayabilir.

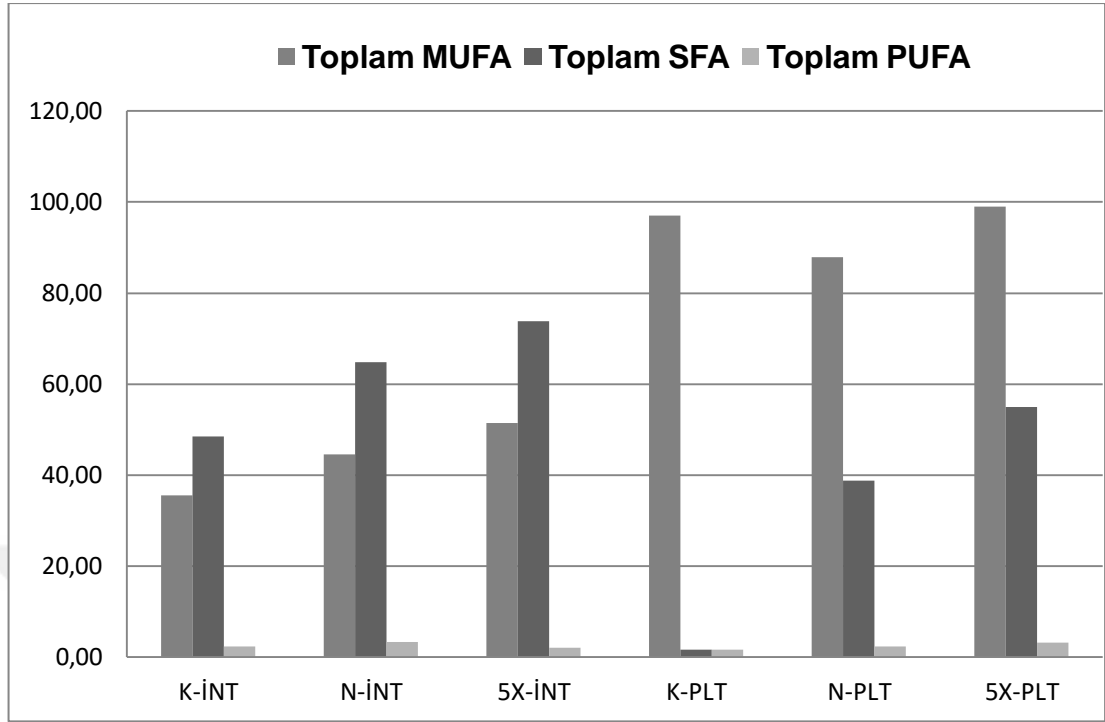
Mikroalglerin büyümelerinde baskılanmanın özellikle element açlığı uygulamalarında farklı oranlarda baskılanması ilk olarak fotosentez hızında

yavaşlama ile başladığı şeklinde bir açıklama getirilebilir. Örneğin azot açlığında mikroskopik görüntüler (Şekil.3.5) incelendiğinde, mikroalglerin yapılarında buldukları klorofil görünümlerinin azot açlığında azaldığını gözlemlenebilir. Böylece çalışılan element açıklıklarına cevapta mikroalglerin hem büyümelerindeki baskılanma ve hem de lipid içeriğindeki artışın kaynağı fotosentez hızında meydana gelen azalma olduğu sonucuna varılabilir (Çakmak vd., 2014).

Azot fazlalığı bitkinin vejetatif gelişme periyodunu uzatmaktadır. Ayrıca fazla azot bitkilerin kırılmaya karşı dirençlerini azaltırken, hasat zamanının gecikmesine de neden olmaktadır. Büyüme parametreleri incelendiğinde, büyümenin en düşük seviyelerinin 5x azot içeren gruplarda olmasının nedenini azot fazlalığının bitkiler için stres kaynağı olduğu şeklinde açıklanabilir (Bolat ve Kara, 2017; Boşgelmez vd., 2001; Fageria ve Moreira, 2011).

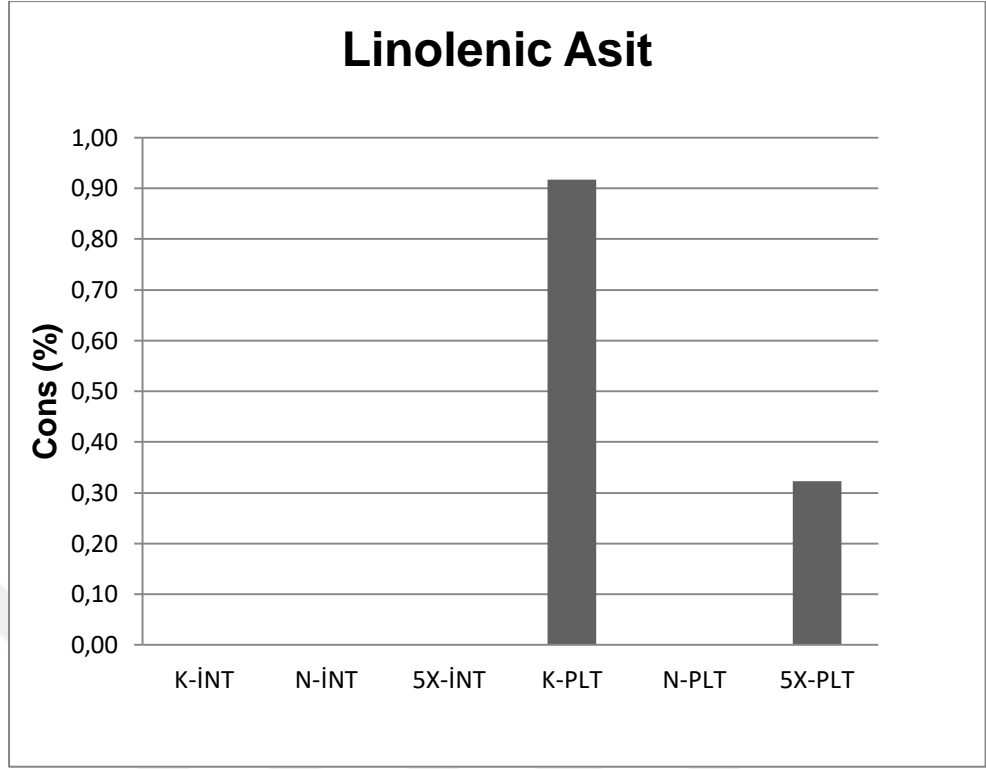
3.2. Mikroalglerin Yağ Asidi Profillerinde Meydana Gelen Değişimin Belirlenmesi

Ortam element açlığı ve tokluğuna cevapta mikroalglerin içerdikleri doymuş, tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asidi oranlarında meydana gelen değişimler İnkübasyonun 16. gününde örneklenen mikroalgler kullanılarak ölçüm yapılmıştır.



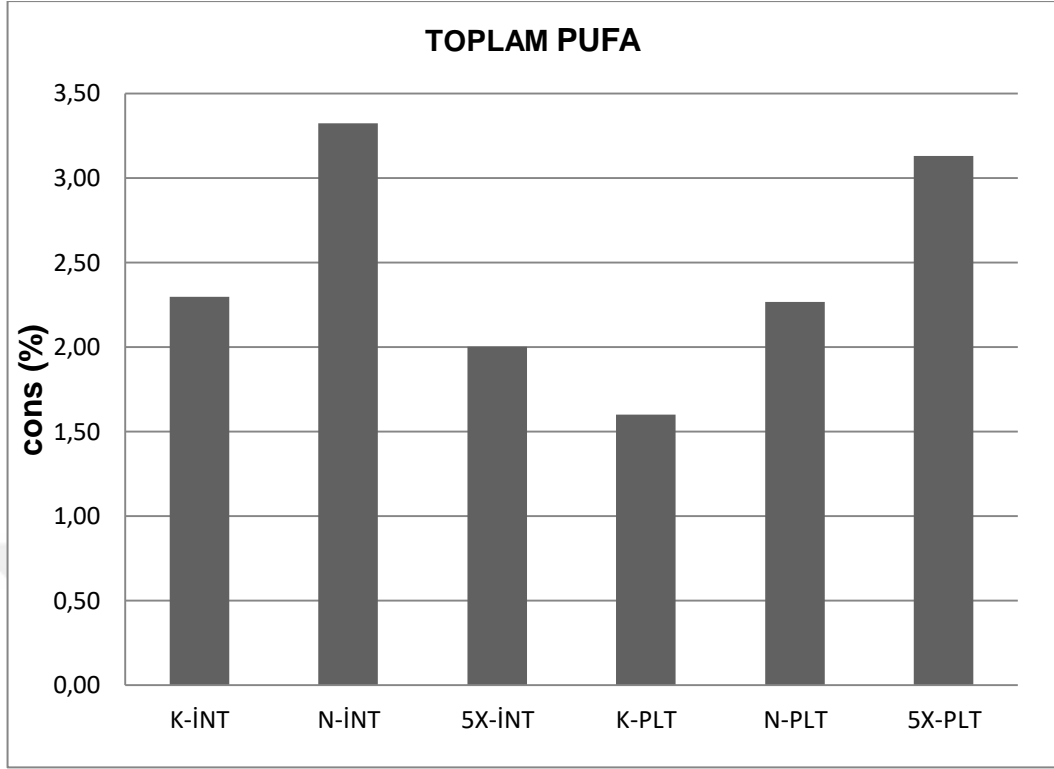
Şekil 3.6. Ortam element açlığı ve bolluğuna cevapta mikroalglerin içerdikleri doymuş, tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asidi oranlarında meydana gelen değişimler inkübasyonun 16. gününde örneklenen mikroalgler kullanılarak ölçüm yapılmıştır **PUFA**, Çoklu doymamış yağ asidi; **MUFA**, Tekli doymamış yağ asidi; **SFA**, Doymuş yağ asidi

Yapılan tüm azot manipülasyonlarında *S.intermedius* ve *S.planctonicus*'ta SFA oranı PUFA oranından fazla bulunmuştur. *S.planctonicus*'ta SFA yanında MUFA oranı da yine PUFA'dan fazla bulunmuştur. Avrupa birliği EN 14214 standartlarına göre biyodizel amaçlı kullanılan yağlardaki SFA ve MUFA oranlarının toplamının %75'den yüksek olması gerektiğini belirtmektedir (European standard EN 14214). Bu çalışmada, *S.intermedius*'ta SFA ve MUFA oranı toplamı kontrol grubunda yaklaşık %97 iken açlık grubunda %90, tokluk grubunda ise %98, *S.planctonicus*'ta ise kontrol grubunda %98 iken, açlık grubunda %98, tokluk grubunda ise %96 düzeyindedir (Çizelge.3.1).



Şekil 3.7. *S.intermedius* ve *S.planctonicus* türlerinin FAMES içeriğindeki Linoleic Asit yüzdeleri

Dikkat çekilmesi gereken bir diğer konu da biodizel numunelerinin içerdiği linolenik asit miktarıdır. Kullanılan yağa bağlı olarak koşullardan neredeyse bağımsız bir şekilde sabit kalan bu içerik, biyodizelin soğuk akış özellikleri üzerinde son derece etkilidir (Akgün ve İşcan, 2007). Diğer taraftan, bir çoklu doymamış yağ asidi olan linolenik asitin (C18:3) biyodizel için kullanılacak olan FAMES içerisindeki oranı en fazla %12 olmalıdır (European standard EN14214). Bu çalışmada linolenik asit miktarı her iki türde de hiçbir zaman %12 olmamıştır (Şekil.3.7).



Şekil 3.8. *S.intermedius* ve *S.planctonicus* türlerinin FAMES içeriğindeki toplam PUFA yüzdeleri

Biyodizel için kullanılacak olan FAMES içerisindeki oranı 4 veya daha fazla doymamış karbon bağı bulunan PUFA' ların oranının ise %3'den az olması gerekmektedir. (European standard EN 14214).Bu çalışmada PUFA konsantrasyonları açlık ve tokluk gruplarında genellikle %3 olarak gözlemlenmiştir. N-int ve 5x-plt bu sınırı çok az miktarda aşmıştır.(Sekil.3.8)

Çizelge 3.1. Mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen miktarsal değişimler

		K-İNT	N-İNT	5X-İNT	K-PLT	N-PLT	5X-PLT
butyric acid	SFA	1,34	0,00	5,35	0,76	0,00	0,33
caprylic acid	SFA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,93
capric acid	SFA	0,14	12,04	7,82	0,00	0,56	1,67
undecanoic acid	SFA	0,00	2,32	2,29	0,05	1,12	2,18
lauric acid	SFA	2,39	2,45	2,27	0,00	6,92	3,81
tridecanoic acid	SFA	4,15	9,68	1,41	0,06	8,30	2,11
myristic acid	SFA	0,00	5,29	3,06	0,09	11,36	0,00
myristoleic acid	MUFA	21,42	13,27	24,58	6,16	2,09	9,02
pentadecanoic acid	SFA	1,45	5,87	1,83	0,09	0,39	0,00
cis-10-pentadecanoic acid	MUFA	0,00	3,87	1,96	0,05	0,63	0,00
palmitic acid	SFA	4,30	0,00	3,24	0,00	0,00	0,00
palmitoleic acid	MUFA	0,00	2,88	0,00	1,96	0,36	4,05
heptadecanoic acid	SFA	4,04	2,31	4,50	0,00	0,00	4,87
cis-10-heptadecanoic acid	MUFA	0,00	0,66	0,00	0,02	1,74	0,00
stearic acid	SFA	9,55	1,94	6,74	0,00	0,00	4,84
Elaidic acid	MUFA	0,00	6,97	0,00	0,00	0,00	1,55
oleic acid	MUFA	11,92	0,00	7,50	0,00	0,00	8,11
linolelaidic acid	PUFA	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,21
linoleic acid	PUFA	1,90	0,72	0,02	0,00	0,27	0,34
arachidic acid	SFA	14,41	4,67	8,62	0,00	0,00	0,56
gama-linolenic acid	PUFA	0,41	0,73	0,23	0,00	1,35	0,23
cis-11eicosenoic acid	MUFA	0,00	13,18	0,00	0,00	1,02	0,07
linolenic acid	PUFA	0,00	0,00	0,00	0,91	0,00	0,20
heneicosanoic acid	SFA	8,87	0,00	6,56	0,14	0,00	1,46
behenic acid	SFA	0,00	0,00	0,00	0,40	0,35	1,29
cis-8,11,14-eicosatrienoic acid	PUFA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
erucic acid	MUFA	7,85	0,00	4,53	0,00	0,00	0,94
arachidonic acid	PUFA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
Cis-11,14,17-eicosatrienoic acid	PUFA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25
tricosanoic acid	SFA	5,52	6,94	4,31	0,00	1,09	1,38
cis-13,16- docosadienoic acid	PUFA	0,00	0,81	0,38	0,68	0,14	0,33
cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	PUFA	0,34	0,32	0,53	0,00	0,00	0,19
nervonic acid	MUFA	0,00	2,93	1,88	88,64	62,31	39,87
cis-4,7,10,13,16,19-docosaenoic acid	PUFA	0,00	0,02	0,42	0,00	0,00	0,08
	Toplam SFA	56,15	53,51	57,99	1,58	30,08	34,44
	Toplam PUFA	2,66	2,74	1,57	1,59	1,76	1,96
	Toplam MUFA	41,19	36,78	40,44	96,82	68,16	62,06

3.3. *S.intermedius*'da değişimler

- Doymuş yağ asidi (SFA) olan butyric acid tokluk miktarı kontrol grubuna göre %10 oranında artmıştır.
- Undecanoic acid miktarı kontrol grubunda gözlenmezken açlık ve tokluk grubunda %2 oranında oluşum göstermiştir.
- Lauric acid miktarı açlıkta eser miktarda artmıştır. Tridecanoic asit miktarı açlık grubunda yaklaşık %19 oranında artmıştır.
- Myristic acid kontrol grubunda görülmezken açlık ve tokluk grubunda sırasıyla %10 ve %5 oranında oluşum göstermiştir.
- Tokluk grubundaki myristoleic acid miktarı kontrol grubuna göre yaklaşık iki kat artış göstermiştir.
- Pentadecanoic acid açlık miktarı kontrol grubuna göre yaklaşık 5 kat artmıştır.
- Palmitoleic acid kontrol grubunda görülmezken açlık grubunda yaklaşık %3 oranında ortaya çıkmıştır.
- Elaidic acid kontrolde görülmezken açlıkta %7 oluşum göstermiştir.
- Cis-11-eicosenoic acid (MUFA) miktarı kontrol ve tokluk grubunda görülmezken açlık miktarında %13 oluşum göstermiştir.
- Cis-13,16-dokosadienoic acid, cis-4,7,10,13,16,19-dokosaheksaenoic acid ve nervonic acid miktarı kontrol grubunda belirlenememesine karşı açlık ve tokluk grubunda oluşum göstermiştir.

3.4. *S.planctonicus*'da değişimler

- Caprilic acid miktarı kontrol ve açlık grubunda belirlenememesine rağmen tokluk grubunda yaklaşık %30 oranında oluşum göstermiştir.

- Capric acid miktarı, kontrol grubunda görülmezken toklukta %2 oranında oluşum göstermiştir.
- Undecanoic acid, miktarı açlık ve tokluk grubunda artış göstermiştir.
- Lauric acid, kontrol grubunda gözlemlenmezken açlık ve tokluk grubunda yaklaşık %21 ve %12 oranında oluşum göstermiştir.
- Tridecanoic acid kontrolde eser miktarda iken açlık grubunda %24, toklukta %6 artmıştır.
- Myristic asit kontrol grubuna göre yaklaşık %33 oranda artmıştır.
- Myristoleic acid ve Palmitoleic acid tokluk miktarı açlığa göre sırasıyla iki kat ve altı kat daha fazla artış göstermiştir.
- Heptadecanoic acid açlık ve kontrol grubunda görülmezken, tokluk grubunda yaklaşık %12 oranında oluşum göstermiştir.
- Stearic acid, elaidic acid, linolelaidic acid kontrol ve açlıkta gözlemlenemezken toklukta sırasıyla %14 ,%6, %0,6 oranında oluşum göstermiştir.
- Oleic acid değeri, kontrol ve açlık grubunda görülmezken toklukta %24 oluşum göstermiştir.

Fame içeriğine göre, yapılan element manipülasyonu sonrası iki türün yağ asidi kompozisyonu değişmiş, açlık ve tokluk gruplarında bazı yağ asitlerinin miktarlarında kayda değer artış sergilenmiş hatta oluşum gözlemlenmiştir.

Biyodizel uygulaması bağlamında *Scenedesmus vacuolatus*'un hücre içi nötral lipit içeriğinin arttırılmasına yönelik bir çalışmada, azot açlığına maruz bırakılan alg grubunun FAME profilleri incelendiğinde, çoklu doymamış yağ asitlerinde (PUFA) belirgin azalma, doymuş (SFA) ve tekli doymamış yağ asidi (MUFA) içeriğinde bir artış olduğu sonucuna varılmıştır (Anand vd., 2019).

Bu çalışmada, mikroalglerde MUFA oranları toplam lipid üretimindeki artış ile paralel bir artış sergilerken PUFA oranları da aşağı yönde eğilim göstermişlerdir. Böylece kontrol grubu dâhil, element manipulasyonlarının mikroalglerden biyodizel eldesi için uygulanabilecek geçerli yollar olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmamızda kullanılan alg türlerinin biyodizel üretimi konusunda önemli bir potansiyeli olduğuna işaret eden bu ilk sonuçlara rağmen, daha detaylı düzeyde yapılacak bir araştırma ile biyodizel kalitesinin belirlenmesine ihtiyaç olduğu söylenmelidir. Örneğin, doymamış yağ asitleri kolay okside olduklarından biyodizelin akışkanlığını etkilemektedir (Saraf ve Thomas, 2007). Temelde biyodizelin içindeki FAME profiline bağlı olan ve biyodizelin kalitesini belirleyen ana unsurlardan, özellikle, setan numarası, iodin numarası, yanma noktası, NOx emisyon değeri, oksidatif durgunluğu ve akışkanlığı gibi değerlerin uygulama öncesi belirlenmesi gereken zorunlu parametrelerdir (Saraf ve Thomas, 2007; Francisco vd., 2010).

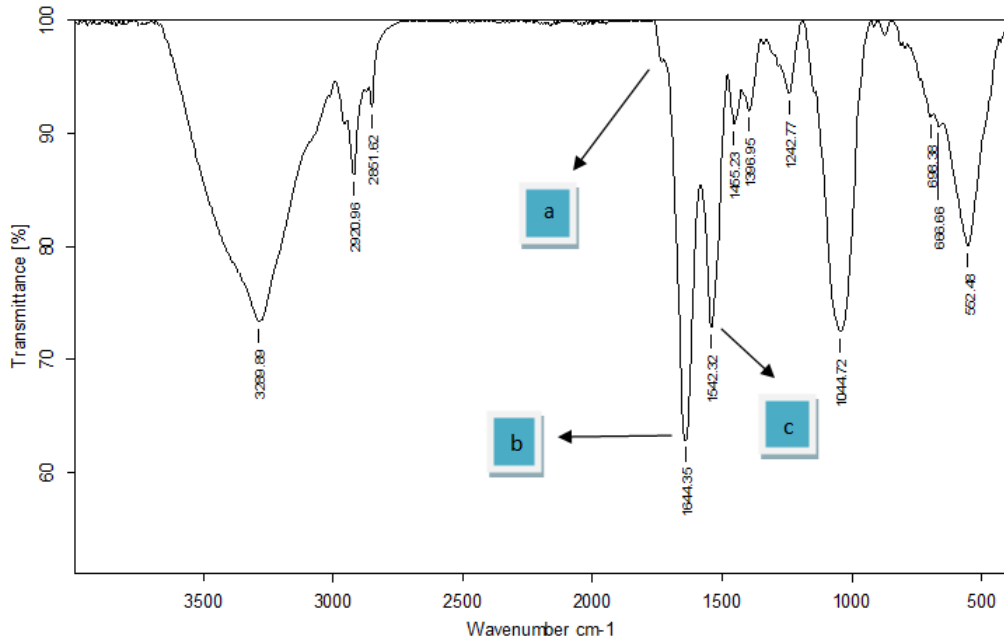
3.5. TAG Miktarlarının FTIR (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi) ile Ölçülmesi

Mikroalglerde sentezlenen nötral lipidlerin büyük çoğunluğunu triaçilgliseroller oluşturmaktadır. Triaçilgliseroller (TAG) biyodizel hammaddesi olarak kullanılmaktadır (Sharma vd., 2012). Mikroalglerin TAG içeriklerinin belirlenmesinde F-TIR spektroskopundan yararlanılmıştır.

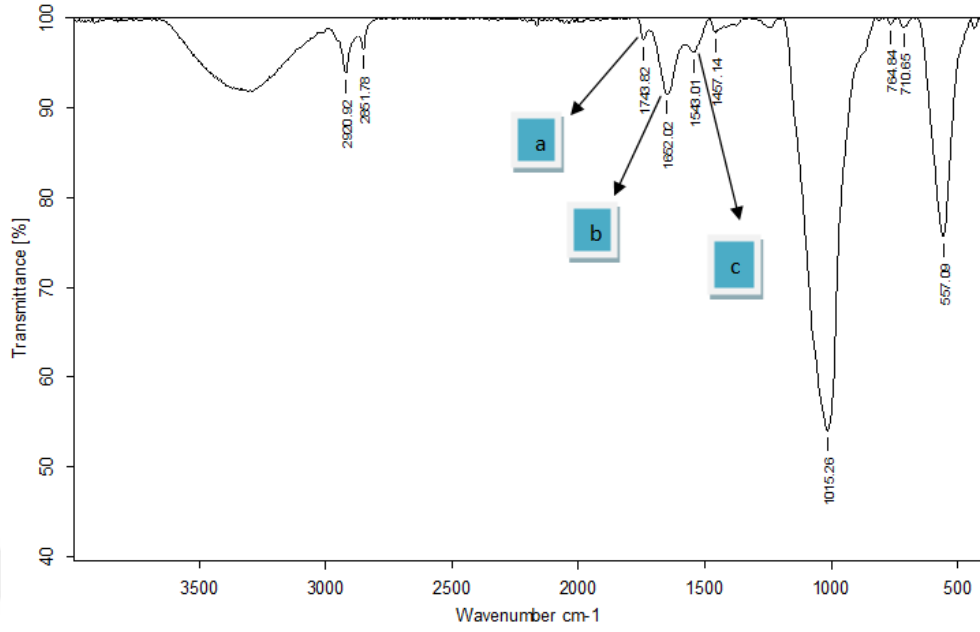
FTIR ölçümleri ile elde edilen veriler incelendiğinde azot açlığı ve azot fazlalığına cevapta mikroalglerin TAG miktarlarında önemli artışlar gözlemlenmiştir. Mikroalglerin TAG içeriklerinde en yüksek artış N açlığında gözlemlenmiştir. N açlığına bırakılan mikroalglerde kontrol grubuna kıyasla TAG miktarı konsantrasyonu yaklaşık olarak 5 kat artış göstermiştir. Azot elementinin fazla olduğu durumda ise yine TAG miktarlarında artış yaklaşık 3 kat olarak kaydedilmiştir.

500-3500 cm^{-1} dalga boyları arasında alınmış olan ölçümlerden daha önce TAG için spesifik olduğu belirlenen 1744 cm^{-1} değeri ele alınmıştır. Element açlığı ve fazlalığına cevapta FTIR ölçümleri ile elde edilen veriler ve ilgilendiğimiz absorbands değeri 1744 cm^{-1} 'dir.

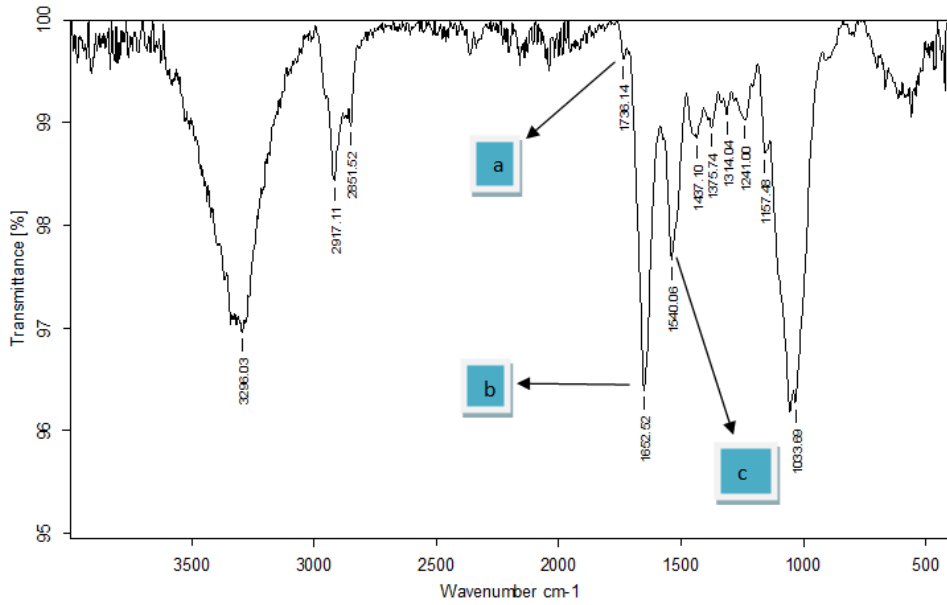
1500 cm^{-1} -1700 cm^{-1} dalga boyları Amid değerini; 1000 cm^{-1} -1200 cm^{-1} dalga boyu karbonhidratlar; 1700 cm^{-1} - 1750 cm^{-1} dalga boyu lipidler; 1477 cm^{-1} - 1590 cm^{-1} dalga boyu arası proteinler için spesifiktir (Pistorius vd., 2008). Grafiklerde yağlar 'a' , amid grupları ise 'b ve c' şeklinde gösterilmiş ve birbiriyle kıyaslanmıştır.



Şekil 3.9. *S.intermedius* kontrol grubuna ait FTIR spektrumu



Şekil 3.10. *S.intermedius* azot açlığına ait FTIR spektrumu



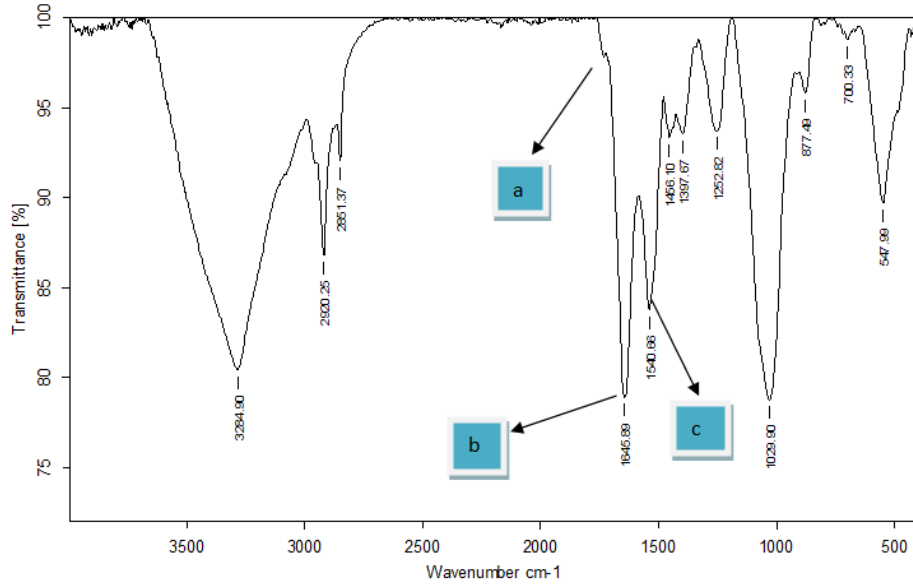
Şekil 3.11. *S.intermedius* azot yüklemesine ait FTIR spektrumu

Azot açlığından sonra 1500-2000 cm^{-1} bölgesinde değişim gözlenmiştir. Bu değişim a, b ve c rakamları ile belirtilmiştir. Bu değişim sonunda kontrol grubuna göre daha önce TAG için spesifik olduğu belirtilen 1744 cm^{-1} piki ortaya çıkarken 1652 cm^{-1} ve 1542 cm^{-1} pik şiddetlerinde azalma gözlemlenmiştir.

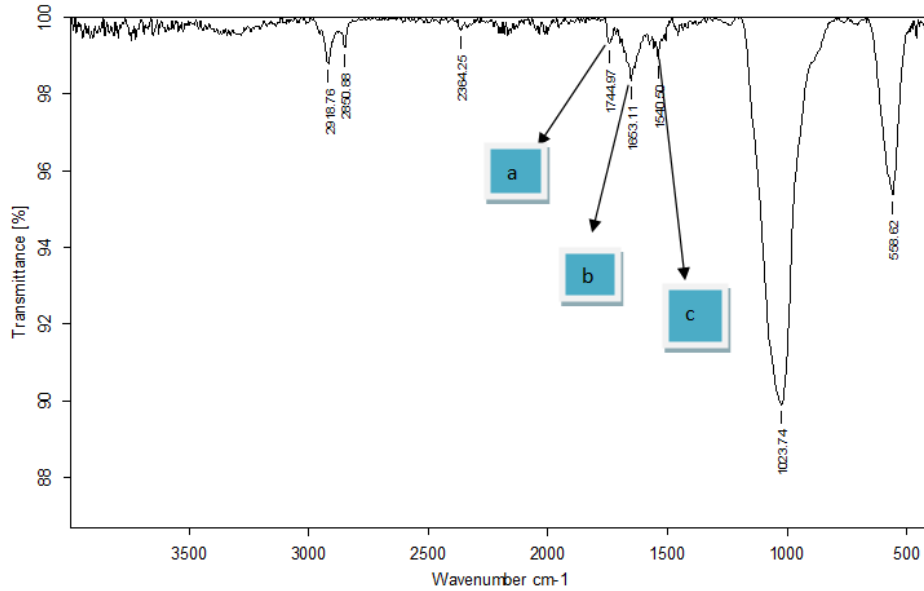
S.intermedius'ta; 1652 cm^{-1} de absorpsiyon veren Amid I değeri, 1543 cm^{-1} de absorpsiyon veren pik ise proteinler olarak belirlenmiştir. Nitritin indirgenmesi sonucu oluşan ya da bitki tarafından geliştiği ortamdan alınan amonyum öncelikle glutamin (glutamin = bir amino asit çeşidi) içerisindeki amid grubuna dönüştürülerek depo edilir. Diğer bileşiklere göre içerdiği azotun karbon oranı yüksek olması nedeniyle glutamin, çeşitli bitkilerde önemli bir azot deposudur. Azot açlığında Amid değerinin azalması ortamda azotun olmayışı olarak açıklanabilir (Taiz ve Zeiger., 2008).

1543 cm^{-1} absorpsiyonu veren pikteki azalma proteinlerdeki azalma olarak ifade edilir. Azot açlığında görülen bu değişim daha öncede belirtildiği üzere besin manipülasyonunda büyüme ve gelişmenin baskılandığından dolayı yapıtaşı olan proteinlerin azalmasını anlamlı kılmaktadır. Azot açlığına bırakılan mikroalglerde karbonhidrat içeriğinde azalma gözlemlenmiştir. Bu durum, mikroalglerin N açlığına cevapta öncelikle hem lipid hem de karbonhidrat biriktirdiğini, zamanla birlikte hayatta kalmak için öncelikle biriktirdiği şekerleri parçaladığını gösterir. Azot fazlalığındaki değişim ele alındığında protein ve yağ ve karbonhidrat miktarlarında artış gözlemlenmiştir. Karbonhidrat miktarının artışı bünyesinde biriktirdiği şekerleri kullanarak savunma mekanizmalarını harekete geçirdiğini gösterdiğini öngörebiliriz (Pistorius vd., 2008; Movasaghi vd., 2008). Bu sonuçlar ışığında FTIR spektrumu sonucuna bakacak olursak, mikroalglerin azot stresinde lipid miktarını karbonhidrat ve protein gibi makro bileşikler dönüştürmek suretiyle arttırdığını söyleyebiliriz.

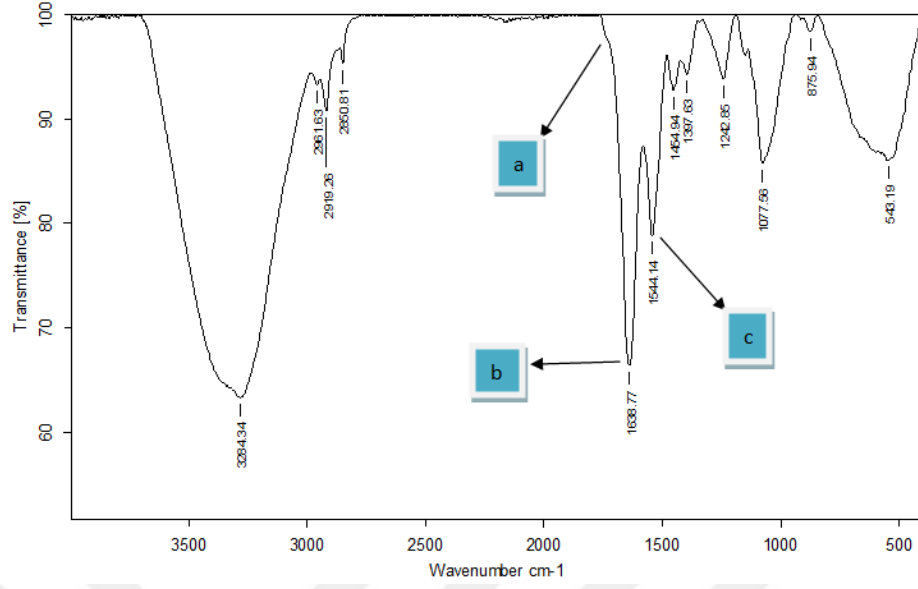
S.intermedius'ta miktarsal yağ değişimleri göz önüne alındığında tercih edilen grup azot ağlıdır, bunu tokluk ve kontrol grubu takip etmiştir.



Şekil 3.12. *S. planctonicus* kontrol grubuna ait FTIR spektrumu



Şekil 3.13. *S. planctonicus* azot açlığına ait FTIR yüklemesi

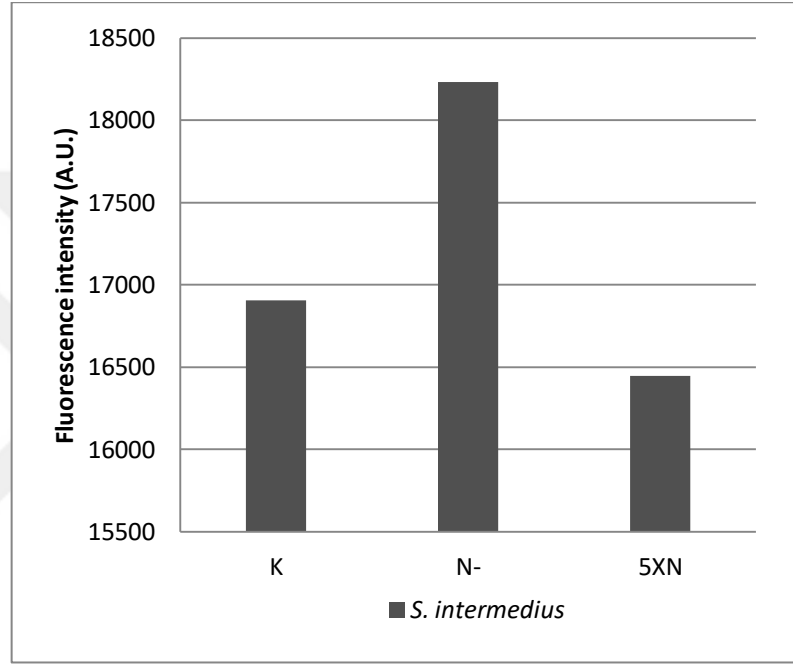


Şekil 3.14. *S.planctonicus* azot yüklemesine ait FTIR yüklemesi

S.planctonicus FTIR spektrumu $1500-2000\text{cm}^{-1}$ bölgesindeki değişime bakacak olursak azot açlığında 1744cm^{-1} absorbansı için spesifik olan lipid miktarı oluşum göstermiştir. Yine *S.planctonicus*'ta olduğu gibi protein miktarlarında azalmalar görülmüştür. Açlık ve tokluk miktarlarında kontrol grubuna kıyasla karbonhidrat miktarında azalma gözlemlenmiştir. Bu durumda *S.intermedius*'ta olduğu gibi öncelikle hem lipid hem de karbonhidrat biriktirdiğini, zamanla birlikte hayatta kalmak için öncelikle biriktirdiği şekerleri parçaladığını gösterir sonucuna varabiliriz.

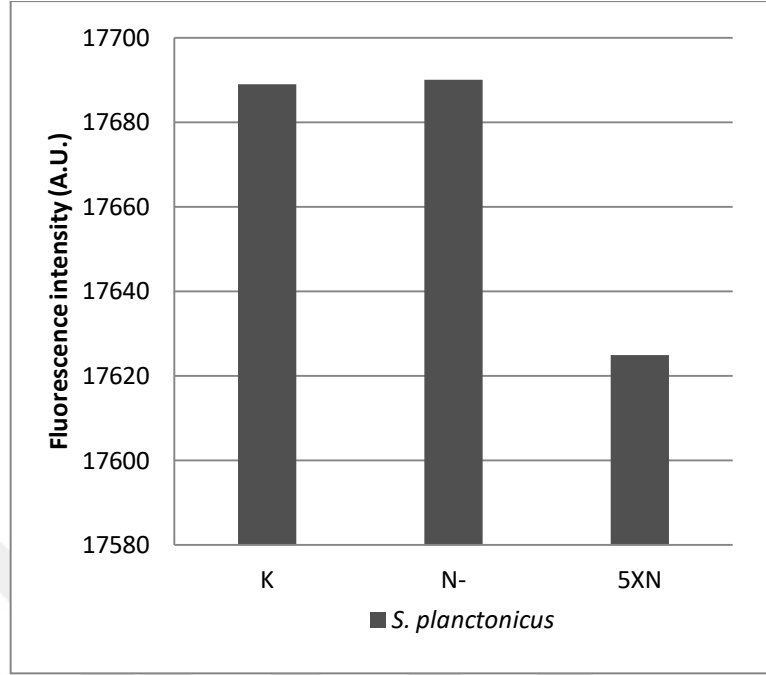
3.6. Nötral Lipid Miktarının Floresans spektrofotometre ile Ölçülmesi

Mikroalglerde toplam nötral lipid içeriğinin miktarsal olarak belirlenmesi için floresans özelliği bulunan spektrofotometre cihazı ile absorbans değerlerine bakılarak lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler irdelenmiştir (Fedorov vd., 2005).



Şekil 3.15. *S.intermedius* floresans spektrofotometre cihaz analiz sonuçları

S.intermedius'un yaymış olduğu floresans emisyonu yoğunluğu (intensity) incelendiğinde açlık ve tokluk miktarında kontrol miktarına göre artışlar kaydedilmiştir. Azot açlığına maruz bırakılan türde absorbans değeri yaklaşık 18000 nm iken kontrolde bu değer 16000 nm dedir, 5 kat fazla azot stresine maruz bırakılan türün ise absorbans değeri 17000nm değerini vermektedir.



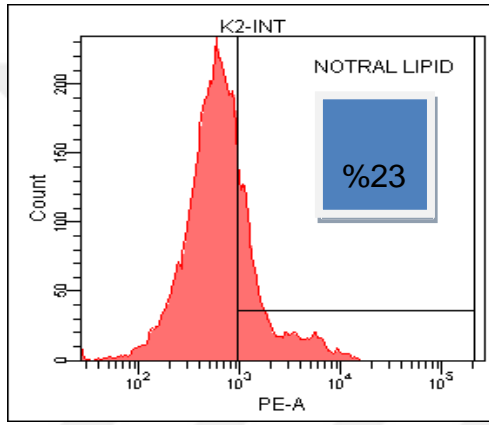
Şekil 3.16. *S.planctonicus* florasans spektrofotometre analizi sonuçları

S.planctonicus'un yaymış olduğu floresans emisyonu yoğunluğu (intensity) incelendiğinde kontrol ve N açlığına bırakılan türlerin hemen hemen aynı, 5 kat fazla azot stresine bırakılan türün ise kontrol ve açlığa göre daha az absorbans değeri verdiği gözlemlenmiştir.

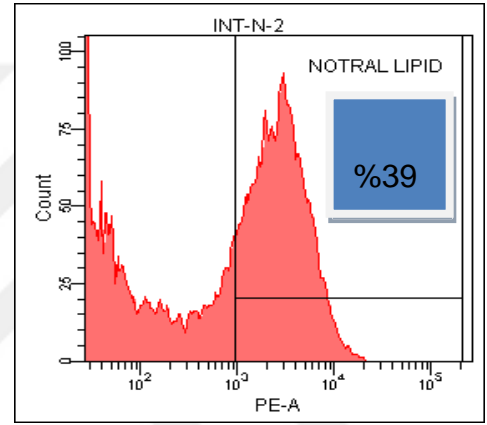
Florasans spektrofotometre ve flow sitometre sonuçları birlikte incelendiğinde, alglerin yağ miktarlarının belirlenmesinde her iki metodun da benzer ve destekleyici sonuçlar ortaya koyduğu ve bu durumun gelecekte yapılacak çalışmaların planlanmasında ve metod seçiminde dikkate alınabilecek niteliğe sahip olduğu söylenebilir.

3.7. Nötral Lipid Miktarının Flow Sitometre ile Ölçülmesi

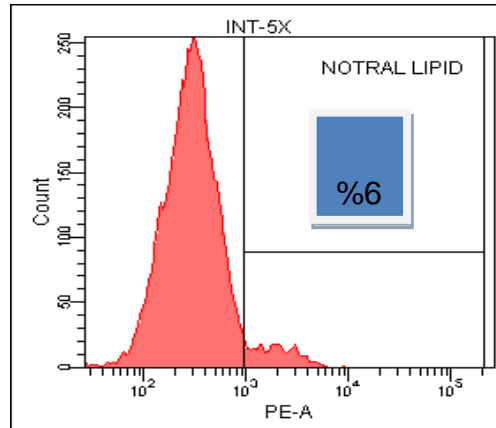
Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) - 1970'lerden bu yana memelilerin hücre sistemleri için kullanılmaktaydı. 1980'lerin başlarından itibaren deniz mikrobiyal ekolojisindeki flow sitometri uygulamaları sürekli artış göstermiştir. Özellikle, çapı 2 µm'den az olan hücrelerin belirlenmesi ve sayımı için sıklıkla başvurulan verimli bir metot olarak kaydedilmiştir (Cabanelas vd., 2016).



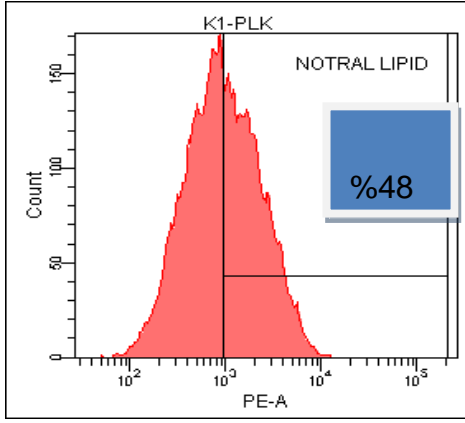
Şekil 3.17. *S.intermedius* kontrol grubu flow sitometre grafiği



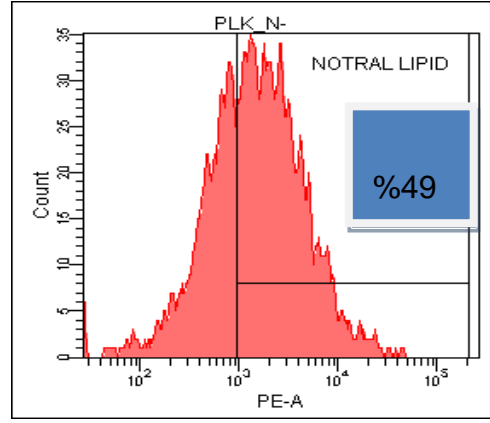
Şekil.3.18. *S.intermedius* açlık grubu flow sitometre grafiği



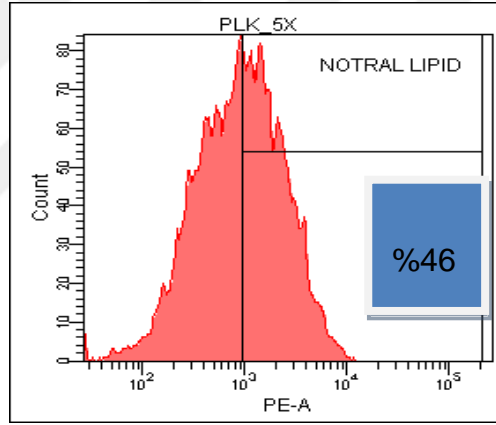
Şekil 3.19. *S.intermedius* tokluk grubu flow sitometre grafiği



Şekil 3.20. *S.planctonicus* kontrol grubu flow sitometre grafiği



Şekil.3.21. *S.planctonicus* açlık grubu flow sitometre grafiği



Şekil 3.22. *S.planctonicus* tokluk grubu flow sitometre grafiği

S.intermedius'ta kontrol, açlık ve tokluk gruplarında nötral lipid miktarlarına bakıldığında sırasıyla %23, %38, %6; *S.planctonicus*'ta ise yine sırasıyla %48, %49,%46 verim göstermiştir. Lipit verimliliğinin arttığı mikroalg hücrelerinin seçilmesine yönelik yapılan bir çalışmada azot açlığına maruz bırakılan türlerin diğer gruplara göre 1.9 kat daha yüksek TAG verimi gösterdiği rapor edilmiştir (Cabanelas vd., 2016). Bu değerlendirmeler, çalışmamızda kullanılan iki tür için de destekleyici niteliktedir.

4. KAYNAKLAR

- Anand, V., Kashyap, M., Samadhiya, K., Ghosh, A., & Kiran, B. Screening of microalgae for biosynthesis and optimization of Ag/AgCl nano hybrids having antibacterial effect, *Biomass and bioenergy*, 127: 105252, 2019.
- Akgün, N.A., İşcan, E., "Effects of Process Variables for Biodiesel Production by Transesterification", *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109 (5) 486-492, 2007.
- Atay, D. Plantal aquaculture and their production technique, (in Turkish). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları, 905, 253, Ankara, 203s, 1984.
- Aydın-Sisman G., Mikroalg Teknolojisi ve Çevresel Kullanımı, Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi, 4(1): 81- 92, 2019.
- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., and Marchant, R., Microbial Decolorization of Textile-Dye Containing Effluents: A Review. *Bioresource Technology*, 58, 217, 1996.
- Barsanti, L., and Gualtieri, P., *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, Taylor& Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 301 pp.US\$119.95. ISBN: 0-8493-1467-4, 2006.
- Becker, E.W., *Microalgae:Biotechnology and Microbiology*. P: 293. Cambridge University Press, 1995.
- 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.
- Bolat, İ., ve Kara, Ö., Bitki Besin Elementleri: Kaynakları, İşlevleri, Eksik ve Fazlalıkları, *Journal of Bartın Faculty of Forestry*, 19(1): 218-228, 2017.

- Bolin B., Egon T.D., Kempe, S., Ketner P., The global biogeochemical carbon cycle, J. Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, pp.1 – 56, 1979.
- Borowitzka, L.J., Development of Western Biotechnology's algal β -carotene plant. *Bioresour. Technol.*, 38(2): 251-2, 1991.
- Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. *Microalgal biotechnology*, Cambridge University press, Vol :1, (477pp).Cambridge, 1992.
- Boşgelmez, A., Boşgelmez, İ.İ., Savaşçı, S. ve Paslı, N., *Ekoloji-II, Toprak: Başkent Klişe Matbaacılık*, Ankara, 2001.
- 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.
- Cabanelas, I.T.D., van der Zwart, M., Kleinegris, D.M.M., Wijffels, R.H., and Barbosa, M.J., *Biotechnology for Biofuels*, Sorting cells of the microalga *Chlorococcum littorale* with increased triacylglycerol productivity, 219, 576–582, 2016.
- Carioca, J.O.B., Hiluy Filho, J.J., Leal, M.R.L.V., Macambirac, F.S., The hard choice for alternative biofuels to diesel in Brazil , *Biotechnology Advances*, 27(6): 1043-1050, 2009.
- 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.
- Cakmak, Z. E., Olmez, T. T., Cakmak, T., Menemen, Y. and Tekinay, T. Induction of triacylglycerol production in *Chlamydomonas reinhardtii*: comparative analysis of different element regimes. *Bioresour. Technol.* 155: 379–87, 2014.

- Chang, H., Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology* 5: 593-604, 2007.
- Chisti, Y., Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3): 294-306, 2007.
- Cirik, Ş., Algae in Turkish sea and their means of evaluation, (in Turkish). *Çevre haberleri, Boğaziçi Üniversitesi yayınları, İstanbul*, (9): 65-68, 1981.
- Coutteau P., 1996, *Microalgae, Manual on the production and use of live food for aquaculture*, Lavens,P.; Sorgeloos,P. (Eds). FAO Fisheries Technical Paper No. 361, 1996.
- Dean, A.P., Sigee, D.C., Estrada, B., Pittman, J.K., Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresour. Technol.* 101(12):4499-4507, 2010.
- 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.
- 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.
- Fabregas J., Toribio L., Abalde J., Cabezas B., Herrero C. Aquacultural Engineering Approach to biomass production of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (kylin) butch using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch cultures, 6(2):141-150, 1984.
- Fageria, N.K. and Moreira, A., The Role of Mineral Nutrition on Root Growth of Crop Plants. *Advances in Agronomy*, 110, 251-331, 2011.

- Fedorov, A.S., Kosourov, S., Ghirardi, M.L., Seibert, M., Continuous H₂ photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel two-stage, sulfate-limited chemostat system. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121-124:403–12, 2005.
- Fidalgo, J.P., Cid, J.A, Herrero, A.C., Culture of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* with different nitrogen sources: growth, nutrient conversion and biochemical composition. *Cah. Biol. Mar.* 36, 165-173, 1995.
- Francisco, E.C., Neves, D.B., Jacob-Lopes, E., Franco, T.T., Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbondioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J Chem Technol Biotechnol.* 85(3):395-403, 2010.
- Gökpınar, S., *Akuakültürde önemli bes deniz flagellatinin inorganik N alınımları üzerine sıcaklık değişimlerinin etkisi*, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, İzmir, 1991.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L., Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45:160-186, 2006.
- Güner, H., Aysel A., *Tohumuz Bitkiler Sistematiği*. no:108 VI. Baskı, 1.cilt, 117-120. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar serisi, 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.
- Issa, O.M. Défarge, C., Le Bissonais, Y., Marin, B., Duval, O., Bruand, A., D'Acqui, L.P., Nordenberg, S., Annerman, M. Effects of the inoculation of cyanobacteria on the microstructure and the structural stability of a tropical soil. *Plant Soil* 290: 209-219, 2007.
- Jayasankar, R., and Polywal, K., Seasonal variation in the essential micro-nutrients of *Gracilaria* spp. of Tamil Nadu coast. *Indian J. Fish.* 47(4):359-363, 2000.

- Juneja, A., Ceballos, R.M., Murthy, G.S., Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review, *Energies*, 6, 4607-4638, 2013.
- Karaca E., ve Aytaç S., Yağ bitkilerinde yağ asitleri kompozisyonu üzerine etki eden faktörler. *Ondokuz Mayıs Üniv. Ziraat Fak. Derg.*; 22(1): 123-131, 2007.
- Kim Se- K. and Pangestuti R., Biological Properties of Cosmeceuticals, *Cosmeceuticals Properties of Sea Cucumbers: Prospects and Trends*, 4 (3)- 26, 2017.
- Makulla, A., Fatty Acid Composition of *Scenedesmus obliquus*: Correlation to Dilution Rates, *Limnologica* 30: 162-168, 2000.
- McMurry J. *Organic Chemistry*, Brooks/Cole Publishing Company, Monterey, 478–519, 1984.
- Miao, X., Wu, Q., Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.*, 97:841-6, 2006.
- Morais, V.A., Haddad, D., Craessaerts, K., De Bock, P.J., Swerts, J., Vilain, S., Aerts, L., Overbergh, L., Grünewald, A., Seibler, P., Klein, C., Gevaert, K., Verstreken, P., De Strooper, B., PINK1 loss-of-function mutations affect mitochondrial complex I activity via NdufA10 ubiquinone uncoupling. *Science* 344(6180): 203-207, 2014.
- Movashagi, Z., Rehman, S. and Rehman, I. U., Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, 43:2, 134-179, 2008.
- Nas, S., Gökalp, Y.H., Ünsal, M., *Bitkisel Yağ Teknolojisi*. Pamukkale Üniversitesi Mimarlık Fakültesi Matbaası, 22:123-131, 2001.
- 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.

- Ordog, V., Beneficial effects of microalgae and cyanobacteria in plant/soil system with special regard to their auxin and cytokinin-like activity. International workshop and training course on microalgal biology and biotechnology, Mosonmagyaróvár, Hungary, June 13-26, UNESCO (International Cell Research Organization), pp 43-44, 1999.
- Pamir, H., Fermantasyon Mikrobiyolojisi Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları no:267-36, 1985.
- Pistorius, Arthur M.A., Willem J. DeGrip, Tatjana A. Egorova-Zachernyuk, Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy, *Biotechnology and Bioengineering*, 103:123-129, 2008.
- Priyadarshani, I., and Rath, B. Commercial and industrial applications of micro algae-A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89-100, 2012.
- Rao, P.H., Kumar, R.R., Raghavan, B.G., Subramanian, V.V., ve Sivasubramanian, V., Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility. *Water SA (Online)*, 37(1), pp.714, 2011.
- 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.
- Ratledge C., and Wilkson, S.G (eds), *Microbial Lipids*, vol. 1, Academic Press, London, p489, 1988.
- Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science Ltd., 2004.
- Robinson T., McMullan G., Marchant R. and Nigam P., Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, *Bioresource Technology*, pp 247-255, 2001.

- Saraf, S., Thomas, B., Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality. *Process Saf Environ.*85:360-364, 2007.
- Sasson, A., Microalgal Biotechnologies: Recent developments and prospects for developing countries. *Biotech Publication* 1/25, pp. 42-76, 1997.
- Senthil, K. B., Sampath, V.R., Garment Manufacturing through Lean Initiative – An Empirical Study on WIP Fluctuation in T-Shirt Production Unit, *European Journal of Scientific Research*, 73 (2), 235-244, 2012.
- Shariatmadari, Z., Riai, H., Shokravi, S. Study of soil blue-green algae and their effect on seed germination and plant growth of vegetable crops. *Rostaniha* (212): 101-110, 2011.
- Sharma, O. P., *Text Book of Algae*, 395 s., New Delhi, 2007.
- 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.
- Sukatar, A., Alg Kültür Yöntemleri. Ege Üni. Fen Fak. Kitapları Serisi No:184, syf: 104, 2002.
- Taiz, L, Zeiger, E., *Plant physiology*. Üçüncü baskıdan çeviri, palme yayıncılık, ISBN: 978-9944-341-61-5, original ISBN: 0-87893-823-0, 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.
- Tarlan E., Dilek F. B. and Yetiş Ü., Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater, *Bioresource Technology*, pp 1-5, 2002.
- 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.
- Valenzuela-Espinoza E., Millaín-Nuñez, R., Núñez-Cebrero, F., Biomass production and uptake by *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacult. Eng.* 20, 135-147, 1999.
- 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.
- Yenson, M., İnsan Biyokimyası, 5.Baskı Sermet matbaası, Vize-Kırklareli,1984.
- 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.
- Zaccaro, M.C., De Caire G.Z., De, Cano, M.S., Palma R.M., Colombo K., Effect of cyanobacterial inoculation and fertilizers on rice seedling and postharvest soil structure. *Comm Soil Sci Plant Anal* 30:97-107, 1999.
- Zeng, F., S. Ali, H. Zhang, Y. Ouyang, B. Qiu, F. Wu, G. Zhang., The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants *Environ. Pollut.*, 159 (2011), pp. 84-91, 2011.
- Zhila, N.O, Kalacheva, G.S., Volova, T.G., Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. *J Appl Phycol* 17:309–315, 2011.