



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Horseshoe Adasından(Antartika) İzole Edilen *Chloroidium*
saccharophilum Asya23 Mikroalginin Element
Manipölasyonuna Verdiği Fizyolojik Yanıtlar**

Yüksek Lisans Tezi

Yalçın Gül

Mayıs 2023



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Horseshoe Adasından(Antartika) İzole Edilen *Chloroidium*
saccharophilum Asya23 Mikroalginin Element
Manipülasyonuna Verdiği Fizyolojik Yanıtlar**

Yüksek Lisans Tezi

Yalçın Gül

Danışman

Doç. Dr. Zeynep Elibol Çakmak

Mayıs 2023

ONAY

Yalçın Gül tarafından hazırlanan ‘Horseshoe Adasından (Antartikadan) İzole Edilen *Chloroidium Saccharophilum* Asya23 Mikroalginin Element Manipulasyonuna Verdiği Fizyolojik Yanıtlarının Değerlendirilmesi başlıklı bu yüksek lisans tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalında hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Doç.Dr. Zeynep Elibol Çakmak

.....

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Prof.Dr. Turgay Çakmak

.....

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Doç.Dr.Mustafa Yaman

.....

İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 31/05/ 2023

BİLDİRİM

Bu tez kapsamındaki bütün veri ve bilgilerin doğruluğuna, bu çalışmanın bana ait olduğuna, etik kuralların ve akademik bilgilerin inceleyerek çalıştığımı, her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt ederim.

İmza

Öğrencinin adı soyadı

Danışmanlığını yaptığım işbu tezin tamamen öğrencinin çalışması olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığını taahhüt ederim.

İmza

Danışmanın Unvanı Adı Soyadı

ÖZET

HORSESHOE ADASINDAN (ANTARKTİKA) İZOLE EDİLEN

***Chloroidium saccharophilum* ASYA23 MİKROALGININ**

ELEMENT MANİPULASYONUNA VERDİĞİ FİZYOLOJİK

YANITLAR

Yalçın Gül

Yüksek Lisans Tezi, Doğa Bilimleri Ana Bilim Dalı, Biyomühendislik Programı

Danışman: Doç. Dr. Zeynep Elibol Çakmak

Mayıs 2023

Mikroalglerin içerdiği karbonhidrat, protein, yağ asitleri ve klorofil gibi önemli metabolitler biyoyakıt üretimi, gıda ve insan sağlığı ve kozmetik sektörü başta olmak üzere biyoteknoloji alanında sıklıkla kullanılmaktadır ve bu alanda çalışmalar devam etmektedir.

Mikroalgler geliştirdikleri adaptasyon mekanizmalarından dolayı çeşitli ortam koşullarında yaşamlarını sürdürebilmektedirler ve bu adaptasyonları metabolik içeriklerinde ve morfolojik yapılarında gerçekleştirdikleri değişimler sayesinde sağlayabilmektedirler. Antarktika kıtası, mikroalglerin çeşitli yaşam habitatları arasında bulunmaktadır, kuru ve soğuk iklimi sebebiyle burada yaşayan mikroalgler psikofilik olarak değerlendirilmektedirler. Bu stres koşulları altında yaşayan mikroalglerin metabolit oranlarında değişimler görülmektedir.

Bu çalışmada Antarktika'nın Horseshoe adasından izole edilen *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 mikroalginin azot (N) ve magnezyum (Mg) açlığına cevapta sergilediği fizyolojik cevaplar irdelenmiştir. Yapılan çalışmada N açlığının mikroalg büyümesi, fotosentez ve solunum hızı, toplam klorofil ve karotenoid içerikleri ilk günlerden itibaren önemli oranda baskıladığı, sakkarit üretimini ise artırdığı anlaşılmıştır. Yine N-açlığı toplam protein ve lipid üretimi üzerine ilk 14 günlük inkübasyonda önemli bir değişime sebep olmamış, ancak ilerleyen günlerde protein içeriğindeki önemli azalmaya karşılık lipid üretimi artmıştır. Öte yandan Mg açlığı ilk günlerde büyüme ile birlikte yukarıda belirtilen ölçümlerde önemli bir değişikliğe sebep olmamış, inkübasyonun 14. gününden itibaren N-açlığı ile elde edilen verilerle örtüşen sonuçlar elde edilmiştir. FTIR analizleri ve floresan boyama ile elde edilen veriler spektrofotometrik ölçümleri doğrular niteliktedir.

Azot ve Mg eksik olan besiyerlerinde kültüre edilen mikroalglerin yağ asitlerindeki değişimlerini belirlemek için mikroalglerden elde edilen lipid, Gaz Kromatografi Alev İyonlaşmalı Dedektör (GC-FID) cihazı ile incelenmiştir. Mikroalgin içerdiği yağ asitlerinin doymamışlık derecesi yüksek düzeyde (%82,78) belirlenmiştir. *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 mikroalgi N ve Mg açlığına bırakıldığında 21

günlük inkübasyon sonrasında doymamışlık derecesinin sırasıyla %106,24 ve %100,58 düzeyine çıktığı kaydedilmiştir.

Sonuç olarak Antarktika’da psikofilik şartlar altında yetişen bir tür olan *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 mikroalginin çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) üretimi için kullanılabilir potansiyel bir mikroalg olduğu, N ya da Mg açlığı uygulamasının bu mikroalgden ÇDYA üretimi amacıyla kullanılabilir yaklaşımlar olduğu değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Chloroidium saccharophilum*, Magnezyum açlığı, Azot açlığı, FAME

SUMMARY

PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF THE MICROALGA *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 ISOLATED FROM HORSESHOE ISLAND (ANTARCTICA) TO ELEMENT MANIPULATION

Yalçın Gül

Master Thesis, Department of Natural Sciences, Bioengineering Program

Advisor: Assoc. Prof. Zeynep Elibol Çakmak

MAY 2023.

Important metabolites such as carbohydrates, proteins, fatty acids and chlorophyll contained in microalgae are frequently used in the field of biotechnology, especially in the biofuel production, food and human health and cosmetics sector, and studies in this field continue.

Microalgae can survive in various environmental conditions due to the adaptation mechanisms they have developed, and they can achieve these adaptations through changes in their metabolic contents and morphological structures. The Antarctic continent is among the various habitats of microalgae, and microalgae living here are considered psychophilic due to its dry and cold climate. Changes are observed in the metabolite ratios of microalgae living under these stress conditions.

In this study, the physiological responses of the microalgae *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 isolated from Horseshoe Island in Antarctica in response to nitrogen (N) and magnesium (Mg) starvation were examined. In the study, it was understood that N starvation significantly suppressed microalgae growth, photosynthesis and respiration rate, total chlorophyll and carotenoid contents from the first days and increased saccharide production. Again, N-starvation did not cause a significant change on total protein and lipid production in the first 14 days of incubation, but lipid production increased in the following days despite the significant decrease in protein content. On the other hand, Mg starvation did not cause a significant change in the above-mentioned measurements with growth in the first days, and results were obtained from the 14th day of incubation, which overlapped with the data obtained with N-starvation. Data obtained by FTIR analyzes and fluorescent staining confirm the spectrophotometric measurements.

In order to determine the changes in fatty acids of microalgae cultured in nitrogen and Mg deficient media, the lipid obtained from microalgae was examined with a Gas Chromatography Flame Ionization Detector (GC-FID). The degree of unsaturation of the fatty acids contained in microalgae was determined at a high level (82.78%). When

Chloroidium saccharophilum ASYA23 microalgae was starved for N and Mg, the degree of unsaturation increased to 106.24% and 100.58%, respectively, after 21 days of incubation.

As a result, it has been evaluated that the microalgae *Chloroidium saccharophilum* ASYA23, a species grown under psychophilic conditions in Antarctica, is a potential microalgae that can be used for polyunsaturated fatty acid (PUFA) production, and N or Mg starvation is the approach that can be used for PUFA production from this microalgae.

Key Words: *Chloroidium saccharophilum*, Magnesium starvation, Nitrogen starvation, FAME

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecinin tamamlanmasına katkı sunan değerli danışmanım Doç. Dr. Zeynep ELİBOL ÇAKMAK' a, tez çalışmamın her noktasında bilgi birikimini, tecrübesini benimle hiç düşünmeden paylaşan sunduğu destek ve yardımlarla bu çalışmanın sonuçlanmasını sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Turgay ÇAKMAK' a, başta Kader BOZUKLU olmak üzere bütün laboratuvar arkadaşlarıma, maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda duran ve beni destekleyen canım aileme çok teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY	i
BİLDİRİM	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1.Antarktika	4
1.1.1 Antarktik mikroalgler	5
1.2.Mikroalgler	7
1.2.1. <i>Chloroidium saccharophilum</i>	10
1.3.Mikroalg Üretimine Etki Eden Parametreler.....	11
1.3.1 Sıcaklık	11
1.3.2. Işık şiddeti.....	12
1.3.3. Tuzluluk	13
1.3.4. pH.....	14
1.2.5. Besinler	15
1.4 Mikroalglerin Biyoteknolojik Kullanım Alanları.....	19
1.4.1 Biyoyakıt Üretimi	19
1.4.2 Gıda ve İnsan Sağlığı.....	20
1.4.3 Hayvan Besleme	21
1.4.4 Biyogübre Olarak Mikroalg.....	21
1.4.5 Kozmetik.....	21
2. MATERYAL VE METOD	22
2.1 Mikroalglerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu	22
2.2 Mikroalglerin Kültüre Alınması ve Büyütülmesi.....	22
2.3. <i>C.saccharophilum</i> ASYA23'ün 18SrDNA bölgesine göre tanımlanması	24
2.4. Deney Düzenegi	25
2.5. Deney düzenegi ve takip süreci	26
2.6. Büyüme Takibi	27

2.7. Total Klorofil ve Total Karotenoidlerin Spektrofotometrik Tayini	27
2.8. Sakkarit tayini.....	28
2.9 Nötral Lipit Tayini.....	29
2.10 Protein tayini	30
2.11.Oksijen Evolusyonu.....	31
2.12.FT-IR Analizi	32
2.13.Yağ Asidi Metil Ester Tayini (FAMES)	33
3. BULGULAR.....	34
3.1. <i>Chloroidium saccharophilum</i> ASYA23 Tanımlamasına Ait Bulgular Ve Sonuçlar.....	34
3.2 Mikroalglerin Çoğalmasında Meydana Gelen Değişimler.....	36
3.3 Mikroalglerin içerdikleri klorofil ve karotenoid miktarlarında meydana gelen değişimler	37
3. Mikroalglerin toplam sakkarit içeriklerinde meydana gelen değişiklikler.....	39
3.5 Mikroalglerin protein içeriklerinde meydana gelen değişimler	40
3.6 Mikroalglerin nötral lipid içeriğinde meydana gelen değişimler	41
3.7 Oksijen Evolusyonu	43
3.8 FT-IR analiz sonuçları.....	46
3.9 Büyüme ortamındaki element manipülasyonunun mikroalglerin içerdikleri yağ asidi metil ester (FAMES) profillerinde sebep olduğu değişimler	51
4.TARTIŞMA	57
5.SONUÇLAR	60
6.KAYNAKÇA	61
ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Alglerin taksonomik bölümlere ayrımı.....	2
Şekil 2. Antarktika kıtasının görüntüsü.	5
Şekil 3. <i>Chloroidium saccharophilum</i> ASYA23'nın toplandığı alanı gösteren fotoğraf.	22
Şekil 4. <i>Chloroidium saccharophilum</i> mikroalglerin x100 ışık mikroskop görüntüsü.	24
Şekil 5. 7.gün mikroalg kültür görüntüleri.....	25
Şekil 6. Deney düzeneğini gösteren şema ve gerçekleştirilen analizler.	27
Şekil 7. Sakkarit tayini için hazırlanmış standart grafiği.	29
Şekil 8. Protein tayini için hazırlanmış standart grafiği.....	31
Şekil 9. Clark tipi oksijen elektrot sistemi (Hansatech Oxytherm, Hansatech Ins. Ltd., Norfolk, U.K.).	32
Şekil 10. Perkin Elmer Spectrum Two cihazını gösteren şekil.....	32
Şekil 11. Trace 1310 gaz kromatografisi (Thermo scientific) görüntüsü.....	34
Şekil 12. <i>Chloroidium saccharophilum</i> DNA'sının PCR jel görüntüsü.....	34
Şekil 13. <i>Chloroidium saccharophilum</i> ASYA23 filogenetik ağacı.	35
Şekil 14. <i>Chloroidium saccharophilum</i> ASYA23 hücrelerinin ışık mikroskopisi görüntüsü. Mikroskop büyütmesi 10x40.	35
Şekil 15. 20.günde çekilmiş mikroalg kültürlerinin görüntüsü.....	36
Şekil 16. Mikroalglerin büyümeleri üzerine element açlığının etkileri	36
Şekil 17. Kontrol ortamı ve element açlığına bırakılan mikroalglerin içerdikleri klorofil-a miktarında meydana gelen değişimler.	37
Şekil 18. Kontrol ortamı ve element açlığına bırakılan mikroalglerin içerdikleri toplam klorofil miktarında meydana gelen değişimler.	38
Şekil 19. Kontrol ortamı ve element açlığına bırakılan mikroalglerin içerdikleri toplam karotenoid miktarında meydana gelen değişimler.	39
Şekil 20. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin içerdikleri toplam sakkarit miktarında meydana gelen değişimler.....	40
Şekil 21. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin protein içeriklerinde meydana gelen değişimler.....	41
Şekil 22. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin toplam nötral lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler	42
Şekil 23. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin solunum hızında meydana gelen değişiklikler.	44

Şekil 24. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin fotosentez hızında meydana gelen değişiklikler	45
Şekil 25. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin fotosentez/solunum hızında meydana gelen değişiklikler	46
Şekil 26. Kontrol ortamı ve element açlığına maruz bırakılan mikroalglerden elde edilen 7. gün FTIR verileri.....	48
Şekil 27. Kontrol ortamı, ve element açlığına maruz bırakılan mikroalglerden elde edilen 14. gün FTIR veriler.....	49
Şekil 28. Kontrol ortamı, ve element açlığına maruz bırakılan mikroalglerden elde edilen 21. gün FTIR verileri.....	51
Şekil 29. Kontrol grubu mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen yüzdelik değişimler.....	52
Şekil 30. Mg (-)ortama cevapta mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen yüzdelik değişimler.....	53
Şekil 31. N (-) ortama cevapta mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen yüzdelik değişimler.....	54

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. <i>Chloroidium saccharophylum</i> taksonomisi	10
Tablo 2. <i>Chloroidium saccharophilum</i> ASYA23 türünün 3N-BBM ortamının içeriğine ait tablo.....	22
Tablo 3. PCR ve sekanslama için kullanılan primer listesi.	25
Tablo 4. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta <i>Chloroidium saccharophilum</i> ASYA23 hücrelerinin ZEISS Axio Imager 2 floresans mikroskopisi. Mikroskop büyütmesi 10x100 Nötral lipid cisimleri nil kırmızısı ile kırmızı renkte görüntülenmiştir.....	44
Tablo 5. Mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen yüzdesel değişimler.	54
Tablo 6. Kontrol ortamı ve ortam element açlığına cevapta mikroalglerin içerdikleri doymuş (SFA), tekli doymamış (MUFA) ve çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) oranlarında meydana gelen değişimler	54

KISALTMALAR

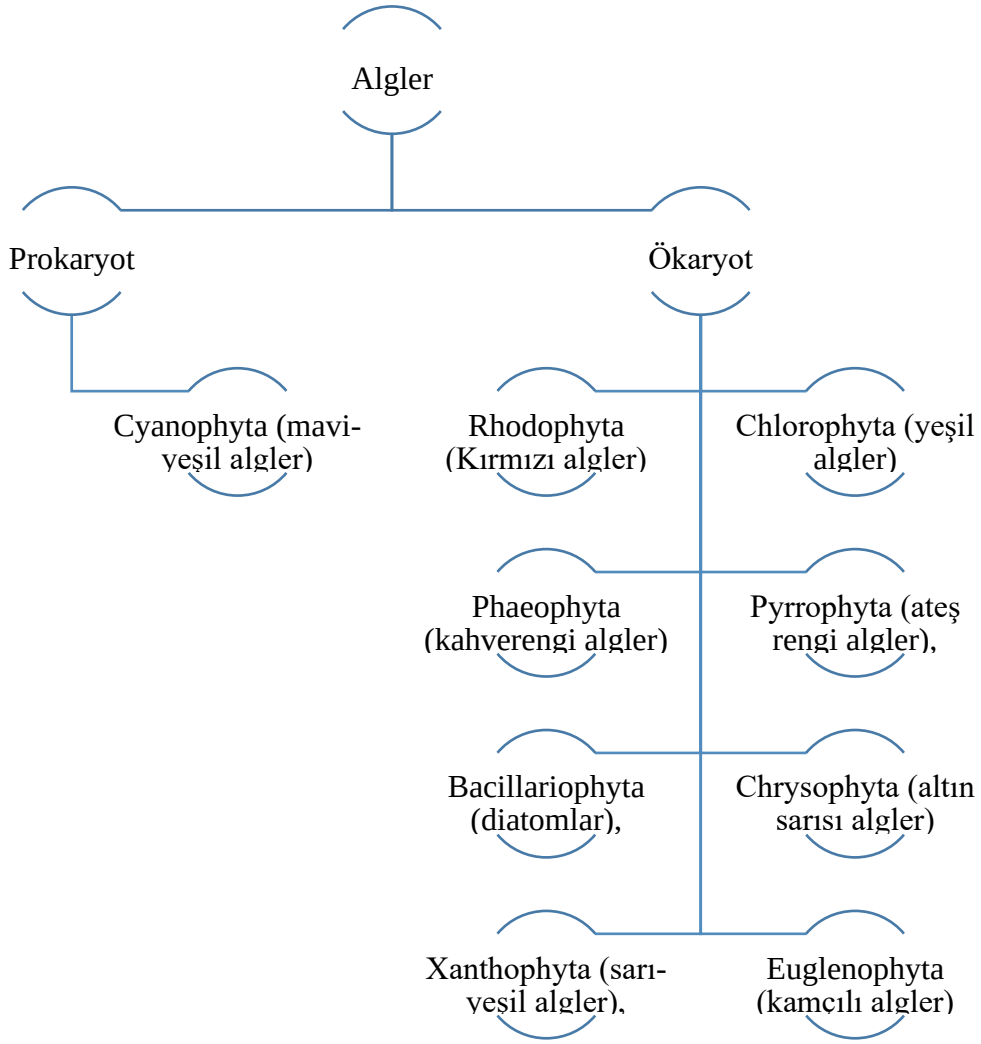
ATP: Adenozin tri fosfat
BBM: Bold Basal Medium
BCA: Bisinkoninik asit (Bichinconinic asit)
ddH₂O: Çift distile su
DHA: Dokosaheksaenoik asit
DNA: Deoksiribonükleik asit
EDTA: Edetik asit (Etilen diamin tetraasetik asit)
EPA: Eikosapentaenoik asit
FAMES: Yağ Asidi Metil Esterleri
FTIR Spektroskopisi: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC-FID: Gaz Kromatografisi
MUFA: Tekli doymamış yağ asidi
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PUFA: Çoklu doymamış yağ asidi
RNA: Ribonükleik asit
SFA: Doymuş yağ asidi (Saturated Fatty Acid)
TAG: Triaçilgliserol

1. GİRİŞ

Algler, dünya üzerinde geniş bir yaşam alanına sahip türlerdir ve çeşitli olumsuz yaşam koşullarına adapte olabilen canlılar arasında yer almaktadır. En soğuk kutup ekosisteminden, en sıcak çöl ekosistemine kadar ekstrem koşullarda büyümelerini sağlayabilmektedirler. Bu kadar çeşitli ortamlarda yaşayabilmelerinin temelini yüksek adaptasyon yeteneklerinin oluşturduğu düşünülmektedir. Yeryüzünde farklı biyomlarda çeşitlendirilmiş 272.500 civarında ökaryotik alg olduğu tahmin edilmektedir. Bu mikroalglerin 200.000'i diatom ve 72.500'ü diğer ökaryotik algler tarafından temsil edilir (Guiry ve ark., 2012). Buna rağmen, Temmuz 2022 itibariyle AlgaeBase'de yalnızca 44.596 ökaryotik alg bildirilmiştir ve bunların 17.819'unu diatomlar oluşturmaktadır. (www.algaebase.org/browse/taxonomy, July-2022).

Alglerin morfolojileri değişkenlik gösterebilmektedir. Uzunluk olarak tek hücreli türleri genellikle 3-10 µm arasında iken çok hücreli su algleri 70 m'ye kadar ulaşabilmektedirler. Ökaryotik türlerinde gelişmiş bir nükleusları, hücre duvarları, kloroplastında klorofil ve diğer pigment içerikleri vardır ve bazılarının flegellalara sahip olduğu bilinmektedir. Fotosentetik olan bu canlılar güneşten aldıkları ışığı absorbe ederek ve atmosferdeki CO₂'yi kullanarak inorganik maddelerden organik madde ve oksijenin elde edilmesini sağlayan primer üreticilerdir. Atmosferdeki oksijenin çoğunun algler tarafından sağlandığı bilinmektedir. Ayrıca atmosferdeki karbon ve azot döngüsüne de yardımcı oldukları bilinmektedir (Guedes ve ark., 2011).

Algler genellikle suda yaşarlar ancak bazı alglerin kaya, toprak, kar gibi farklı yüzeylerde de yaşayabildikleri bilinmektedir. Algler, makro ve mikro algler olarak iki büyük sınıfa ayrılırlar. Makroalgler gözle görülebilen çok hücreli alglerdir. Mikroalgler ise mikroskobik ve genellikle tek hücreli alglerdir. Algler 8 ayrı ökaryotik bölüm ve 1 prokaryotik bölümden oluşmaktadırlar (Aydın ve ark. (2009)) (Şekil 1).



Şekil 1. Alglerin taksonomik bölümlere ayrımı (Aydın ve ark. (2009)).

Mikroalgler, tüm iklim kuşaklarında yaşamaya uyum sağlamış antik bir fotosentetik ökaryot grubu teşkil eder. Çevresel değişkenlere cevapta hızlı adaptasyon kabiliyetleri, metabolik işleyişlerini aktif bir şekilde düzenleyebilmelerine bağlı olarak gelişmiştir. Yeryüzünde farklı karasal ve sucul biyomlarda yaşamaya uyum sağlamış çok sayıda türün yanında bir grup mikroalg arktik biyomlarda besin zincirinin temelini oluşturmaktadırlar. Mikroalglerin büyümesi ve biyokimyasal özellikleri pH, artan tuzluluk, karbon kaynağı ve konsantrasyonu, ışık yoğunluğu, besin sınırlılığı ve yoksunluğu gibi değişken kültür parametrelerine bağlı olarak farklılık göstermektedir (Gim ve ark., 2016; Kim ve ark., 2014; Qiu ve ark., 2017; Xin ve ark., 2010).

Su ekosisteminde, kar yüzeyinde ve permafrost yüzeylerde yaşamaya uyum sağlamış mikroalgler Antarktika kıtasında temel üreticiler olarak başlıca rol oynarlar. Hızlı büyüyen bir yeşil mikroalg türü olan *Chloroidium saccharophilum* morfolojik ve moleküler olarak iyi bilinen ve lipid içeriği bakımından zengin türler arasında yer alan yerel bir tür olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, türlerin endüstriyel potansiyelleri ve çevresel koşulların değişimine olan yanıtları net olarak bilinmemektedir (González ve ark., 2013).

Mikroalglerin gelişimi, kültürünün büyümesi ve fotosentetik metabolit üretim oranları; besin türü ve konsantrasyonu, CO₂ kullanılabilirliği, sıcaklık ve ışık (dalga boyu, yoğunluk ve fotoperiyodu) gibi birçok çevresel faktörden etkilenebilmektedir. Bu nedenle endüstriyel kullanımlarında net potansiyelleri henüz anlaşılamamış olan mikroalg türlerinin hâlihazırda kullanılmakta olan kültür ortamları ve şartları dışındaki davranışları ve gelişimleri incelenmelidir (Aguilera ve ark., 2000; de Castro Araújo & Garcia, 2005; Olivieri ve ark., 2012; Roleda ve ark., 2013). Literatür çalışmaları bizlere besin sınırlaması ve yoksunluğu, artan ışık yoğunluğu veya yüksek tuz konsantrasyonları gibi yoğun veya orta derecede stresli koşullar altında mikroalg hücrelerinin hayatta kalma stratejileri geliştirdiğini, morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere maruz kaldığını göstermektedir (Carvalho ve ark., 2011; Minhas ve ark., 2016).

Mikroalgler fotosentez yapabilen canlılar olarak güneşten aldıkları ışık enerjisi ile inorganik maddeleri organik maddelere dönüştürebilmektedirler ve büyüme döngülerini birkaç günde tamamlayabilmektedirler. Oluşturdukları bu organik madde ve kısa süreli hücre büyüme döngüleri sayesinde biyoteknoloji alanında önemli uygulama potansiyellerine sahip oldukları bilinmektedir. Mikroalgler karbonhidratlar, proteinler, lipidler ve pigmentler de dâhil olmak üzere birçok ticari ve endüstriyel değeri yüksek ürünlerin sentezi ve üretimi için potansiyel bir yenilenebilir kaynak olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Mikroalglerin kullanım alanları hakkındaki gelişmeler ile birlikte, konu ile ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Büyük çeşitlilikleri, yüksek bitkilerden daha iyi fotosentetik verimliliği ve düşük besin maddesi gereksinimleri nedeniyle mikroalgler, çeşitli biyoteknolojik ve ticari uygulamalarda kullanılmaktadır. Örneğin farmasötikler, nutrasötikler, kozmetikler, biyoyakıtlar, hayvan yemi, su ürünleri yetiştiriciliği gibi ticari ve endüstriyel alanlarda

kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yetiştirilmeleri için tarımsal alana ihtiyaç duyulmaması, yüksek büyüme hızları, yüksek fotosentez hızları ve yüksek lipid içerikleri nedeniyle mikroalgler üçüncü nesil yenilenebilir enerji kaynağı olarak görülmektedir(Eleren ve ark.,2019).

Bu tez çalışmasında, 2020 yılının şubat ayında gerçekleştirilen TAE-IV Türk Antarktik Bilim Seferi ile ülkemizin ilk bilimsel araştırma üssünün kurgulandığı Horseshoe Adasından (Antarktika) toplanan mikroalglerden *Chloroidium saccharophilum* sp. Asya23 mikroalg türünün morfolojik ve genomik karakterizasyonu ile büyütme ortamında yapılan element manipülasyonu uygulamalarına cevapta özellikle triaçilgliserol üretimi, yağ asidi metil ester kompozisyonunda meydana gelen değişimlerin irdelenmesi amaçlanmıştır.

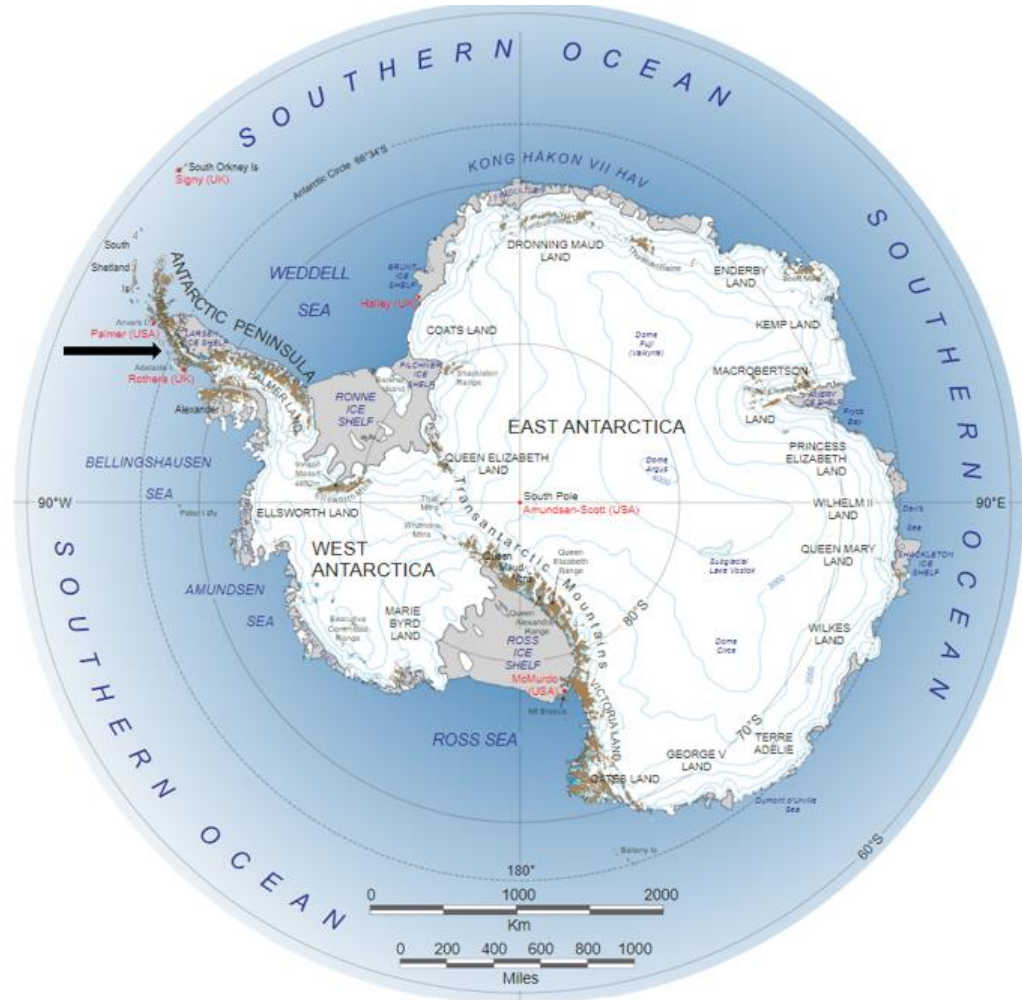
1.1. Antarktika

Antarktika, dünya yüzeyinin en kurak, en soğuk ve en rüzgârlı iklimine sahip bir kıtadır; yüzeyinin %98'lik kısmı buzullarla kaplı bu kıtanın toplam alanı 13.290.000 km²'dir. Avrupadan %30, Avustralya kıtasından ise %50 daha büyük bir alana sahiptir. Bu kıta 3.400 km uzunluğuna sahip Transantarktik Dağları ile doğu ve batı diye iki bölgeye ayrılır(WEB1).Doğu boylamları tarafında kalan kısım Doğu Antarktika olarak, batı boylamları kısmında kalan kısım Batı Antarktika olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2). Doğu Antarktika, Batı Antarktika'dan daha büyüktür (Watt, L. van der (2023, March 30). Kıta yüzeyinde bulunan buz katmanının kalınlığı 1.800 m olabilmektedir, bu buz kütlesi 29 km³ hacminde. Dünya yüzeyindeki tatlı suyun %70'ini ve buz kütlesinin hemen hemen %90'ını oluşturmaktadır (Scott, 2015).

Antarktika, -89,6 °C'lik en düşük sıcaklık kaydı ile dünyadaki en zorlu ortamlardan birine sahiptir. Bu soğuk kıtanın kıyıları boyunca, su sıcaklığı kışın yaklaşık -1,8 °C' ulaşırken yazın maksimum yaklaşık 5°C'ye ulaşmaktadır (Wiencke & Dieck, 1990). Güney Okyanusu'nun yaz aylarında ortalama yüzey suyu sıcaklıkları 2 ila 5,5°C arasında değişebilir (Reay ve ark., 2001).

Karasal iklimin hâkim olduğu kıtada, ortamın uç koşullarına dayanıklı olduğu bilinen binlerce mikroorganizma türü tespit edilmiştir. Tespit edilen bu mikroorganizmalar uç koşullarda yaşamlarını sürdürebilmektedir. Özellikle de kıtanın sahil ve deniz

kesimlerinde oldukça zengin bir mikroorganizma çeşitliliği bulunmaktadır (Watt, L. van der (2023, March 30)).



Şekil 2. Antartika kıtasının görüntüsü.(WEB2)

1.1.1 Antarktik mikroalgler

Antartika’da yaşayan mikroalgler psikotolerant mikroalgler olarak değerlendirilebilmektedirler. Antartika’nın soğuk, UV, osmotik basınç ve besinsel nedenlerle mikroalgler için stresli bir habitat olduğu bilinmektedir. Aşırı koşullara rağmen, Antartika zengin bir mikroalgal flora çeşitliliğine sahiptir ve genel olarak,

Antarktika algleri çok düşük sıcaklıklarda büyüyebilir ve hayatta kalabilirler. Kutup okyanuslarının planktonik ve buz habitatlarından izole edilen mikroalglerin çoğu psikrofiliktir, 0°C veya altında büyüyebilirler ancak 15°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişemezler. Örneğin, deniz buzu diatom *Nitzschia seriata* 6 ila 12 °C arasında optimal olarak büyür (R. E. Smith ve ark., 1994). Bununla birlikte, ortam sıcaklığı diğer Antarktika alglerinin büyümesi için optimum olmayabilir. Örneğin, çoğu polar siyanobakteri, psikrofil değil psikotroftur (Tang ve ark., 1997).

Antarktika'da yaşayan mikroalg türleri olumsuz yaşam koşullarına uyum sağlamak için bazı fizyolojik ve morfolojik değişimlere uğramışlardır. Membran akışkanlığı Antarktika iklim koşullarından etkilenen önemli mekanizmalardan biridir. Membran akışkanlığı hücre içi ve hücre dışı ortamlar arasındaki madde alışverişi için önemli olduğundan dolayı düşük sıcaklık koşullarında bu akışkanlığın korunması önem arz etmektedir. Bu akışkanlığı düzenleyen mekanizma doymuş ve doymamış yağ asidi profillerindeki değişimlerle kontrol edilebilmektedir. Doymamış bağ oranlarındaki artış lipidlerin daha esnek bir şekilde paketlenmesini sağlayarak, membran akışkanlığında rol oynamaktadır. Psikrotolerant mikroalglerin geliştirdikleri bu kontrol mekanizmalarından dolayı çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriği bakımından zengin türler olarak görülmekte olup önemli biyoteknolojik kullanım potansiyelleri sergilemektedirler. Polar diatomlarda, dinoflagellatlarda ve klorofitlerde bu durum yapılan çalışmalar ile doğrulanmıştır (Z. Chen ve ark., 2012; Fogliano ve ark., 2010; Osipova ve ark., 2009). Polar mikroalglerin enzim kinetiklerindeki farklılıklar görülmektedir. Psikrofilik ve mezofilik klorofitler arasındaki karşılaştırmalar da düşük sıcaklıklarda psikrofilik hücrelerde metabolik enzimlerin daha yüksek ve daha kararlı aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Vona ve ark., 2004).

Düşük sıcaklığa uzun süreli maruz kalma, fotosentetik aktivitenin yapısını ve dinamiklerini değiştirebilir. Örneğin, *Dunaliella tertiolecta*'nın karbon fiksasyon oranı, optimal olmayan düşük sıcaklıkta büyütüldüğünde azalır (Levasseur ve ark., 1990). Düşük sıcaklıklarda (6 ve 15°C), fotosentetik enzimlerin aktivitesinin azalması nedeniyle karbon fiksasyon hızı bozulur. Buna karşılık, Antarktika klorofit *Zygnema* sp.'nin fotosentetik hızı 5 ve -4°C arasında tekrarlanan donma-çözülme döngülerine maruz kaldığında dahi etkilenmez (Hawes ve ark., 1990).

Algal biyoteknolojideki potansiyel uygulamalarla ilgili olarak, soğuk kuzey-ılıman iklimler için tasarlanmış üçüncül atık su arıtma sistemlerinde kullanım için polar algleri tarama çabaları olmuştur (Tang ve ark., 1997). Ek olarak, Antarktika kar algleri, alglerde fotokoruyucu rolü olan ikincil karotenoidlerin potansiyel bir kaynağıdır (Bidigare ve ark., 1993).

1.2.Mikroalgler

Mikroalgler için günümüze kadar birçok farklı sınıflandırma yapılmıştır. Başlangıçta alg terimi, Linnaeus tarafından 1753'te "Species Plantarum" adlı kitabında taksonomik bir kategori olarak önerilmiştir. Ancak alg teriminin tek hücreli organizmalardan çok hücreli talluslara kadar birçok canlı formunu kapsadığı düşünülmektedir. (Bicudo & Menezes, 2006). Bu nedenle, Linnaeus tarafından önerilen sınıflandırma doğal değil sadece ekolojik olarak değerlendirilmektedir, çünkü alg olarak adlandırılan farklı canlı gruplarının tek ortak özelliği ototrof olmalarıdır (Bicudo ve Menezes, 2006).

Smith ve ark. (1987) ise alglerin daha farklı kriterlere göre sınıflandırılmaları gerektiğini düşünmüştür. Smith alglerin, üreme hücrelerinin morfolojileri, vejetatif hücrelerinin fizyolojik karakterleri, pigment kompozisyonu, depo maddesi içeriği ve flagella pozisyonları gibi kriterlere göre sınıflandırılmasını önermiştir. Bu sınıflandırma sistemine göre algler 10 organizma sınıfına ayrılmaktadır. Bu 10 organizma sınıfı şu şekilde ayrılmaktadır: *Cryptophyceae*, *Chlorophyceae*, *Euglenophyceae*, *Phaeophyceae*, *Xanthophyceae*, *Rhodophyceae*, *Cyanophyceae*, *Chrysophyceae*, *Bacillariophyceae* ve *Dynophyceae*.

Daha sonraki yıllarda ise mikroalgler Lee ve ark (2018) tarafından, prokaryot ve ökaryot olmalarına ve sahip oldukları kloroplast türlerine göre dokuz filuma ayrılmıştır. Bu dokuz filum şu şekildedir: *Rhodophyta*, *Glaucophyta*, *Cyanophyta*, *Euglenophyta*, *Dinophyta*, *Heterokontophyta*, *Chlorophyta*, *Prymnesiophyta* (*Haptophyta*) ve *Criptomfit*. Günümüzde ise algler pigment içeriklerine göre 13 alt bölümden oluşan üç ana gruba ayrılmaktadırlar. Bu kategorideki *Cyanophyta* ve *Rhodophyta* klorofil-a pigmentine sahip olan algler; *Prochlorophyta*, *Chlorachniophyta*, *Chlorophyta* ve *Euglenophyta* dahil klorofil a ve b pigment içeren algler; *Dinophyta*, *Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Haptophyta*, *Bacillariophyta*,

Phaeophyta, ve *Cryptophyta*'yı içeren klorofil a ve c pigmentlerine sahip olan olarak bilinmektedirler (Bell, P. R., & Hemsley, A. R. 2000).

Genel olarak mikroalgler yeşil algler (*Chloophyceae*), kırmızı algler (*Rhodophyceae*), kahverengi algler (*Phaeophyceae*) ve mavi-yeşil algler (*Cyanophyceae*) olarak kategorize edilebilmektedirler. Mikroalglerin renklerine göre yapılan bu sınıflandırmanın temeli pigment içeriklerine dayanmaktadır ve bu pigment içerikleri birçok farklı uygulama alanında kullanılabilmektedirler. Bu uygulama alanlarının arasında kozmetik, gıda ve tekstil gibi alanlar görülmektedir (Yaakob ve ark. 2021).

Fitoplanktonik topluluklar, farklı organizma türleri için doğrudan gıda görevi gören, dünyanın birincil üretiminin en az %60'ından sorumlu olan, trofik zincirlerin temelini meydana getiren ve ağırlıklı olarak sucul organizmalardır (Sheehan ve ark. 1998). Okyanuslarda, göllerde, yeraltı su kaynaklarında ve nehir ağızlarında birincil üretkenliği düzenleyen mikroalglerin devamlılığı; bolluk, mevsimsellik, varlık ve kıtlık gibi faktörlerin yanında azot, fosfor, silika ve demir gibi besinlerin mevcudiyetine de bağlıdır. Deniz ortamında, fitoplankton temsilcileri toplu olarak insan faaliyetlerinden kaynaklanan tüm atmosferik CO₂'nin yaklaşık %50'sini emer ve böylece küresel karbon döngüsünde temel bir rol oynar (Raven ve ark. 2007).

Genel olarak sucul ortamlarda yaşamalarına rağmen, mikroalglerin birçok farklı ortamda da yaşayabildikleri bilinmektedir. Dünya'nın biyolojik evrimi sırasında farklı koşullara uyum sağlayabildiklerinden dolayı yaşama alanları çeşitlilik göstermektedir. Ayrıca mikroalgler farklı canlı türlerini kolonize eder. Bu adaptasyon yetenekleri sayesinde mikroalgler, yüksek ya da düşük sıcaklıklar, farklı pH ve farklı tuzluluktaki ortamlarda yaşayabilmektedirler. Makroalgler ve sucul bitkiler çeşitli hayvanların epizoikleri veya endozoikleri olarak karşılıklı simbiyotik bir ilişki içerisinde yaşayabilmektedirler. Algler likenler, siliatlar, mercanlar, yassı solucanlar ve diğer hayvanlarla simbiyotik bir ilişki içerisinde yaşayabilmektedirler (Hasle ve ark., 1996).

Tüm mikroalgler klorofil-a içeriğine sahip olmalarına rağmen öne çıkan pigment içeriklerine göre birbirlerinden ayırt edilebilmektedirler. Siyanobakteriler (*Cyanophyta*) prokaryot mikroorganizmalardır (organize çekirdekleri, mitokondrileri veya kloroplastları yoktur), bu grubun üyeleri yeşil renk veren klorofil-a pigmenti ve grubun temsilcilerine mavi renk veren fikosiyanın, fikoeritrin ve allofikosiyanın gibi

bazı yardımcı pigmentlere sahiptirler. Ayrıca siyanobakterilerin β -karoten, zeaksantin, miksoksantinde içerdikleri ve depo ürünü olarak glikojen depoladıkları bilinmektedir (Bell, P. R., & Hemsley, A. R. 2000; Lee ve ark , 2018; Raven ve ark. 2007).

Chlorophyta filumundaki mikroalgler klorofil a ve b pigmentlerinin yanı sıra karotenoid gibi farklı pigmentlerde sahiptirler. Örneğin, diatomlarda (*Bacillariophyta*) klorofil a, klorofil c ve karotenoidler bulunurken, dinoflagellatlarda klorofil a pigmenti ile karoten, ksantofiller ve primidin bulunmaktadır (Lee ve ark, 2018).

Ökaryotlar arasında diatomlar (*Bacillariophyta*) deniz fitoplanktonunun ana temsilcileri olarak öne çıkmakla beraber yaklaşık 285 cins ve 10.000-12.000 arasında bilinen türle temsil edilmektedir, ancak yaklaşık 200.000 tür olduğu tahmin edilmektedir (Armbrust.,2009). Başlıca özellikleri geometrik süslemeli ve karakterleri büyük taksonomik değere sahip früstül adı verilen silisli bir hücre duvarına sahip olmalarıdır (Round ve ark., 1990). Früstüllerin simetrisi, diatomları iki gruba ayırır, iki taraflı simetriye sahip pennatlar ve radyal simetriye sahip merkezli. Diatomlar, fotosentezin yedek ürünü olarak krizolaminleri depolar (James ve ark.,1967) ve klorofil-a' ya ek olarak klorofil-c1 ve c2, fukoksantin ve diadinoksantin ve diatoksantin gibi çeşitli ksantofillere sahiptirler. (Lee ve ark, 2018).

Chlorophyta 'lar kamçılı, kokoid, ipliksi veya nadiren yapraksı formlarla temsil edilir ve üremeleri eşeysiz veya eşeyli olabilir.Bunlar dokuz sınıfa ayrılırlar ve Chlorophyceae sınıfı en bol bulunan mikroalg sınıfıdır(Bell, P. R., & Hemsley, A. R. 2000). 968 cins ve 128 aileden oluşan 6829 *Chlorophyta* türü bulunmaktadır(WEB4). *Chlorophyta* 'ların tipik yeşil rengi, klorofil a ve b'nin diğer pigmentlere göre öne çıkmasından ve renk değişiklikleri karotenoidlerin varlığından kaynaklanmaktadır (Raven ve ark., 2007; R. E. H. Smith ve ark., 1987). Bunlardan β -karoten, lutein, zeaksantin ve neoksantin en bol bulunanlardır (Bell, P. R., & Hemsley, A. R. 2000; Lee ve ark, 2018). Fotosentezin yedek ürünü olarak klorofiller nişastayı pirenoidlerin içinde depolar (Raven ve ark., 2007; R. E. H. Smith ve ark., 1987).

1.2.1. *Chloroidium saccharophilum*

Chloroidium cinsinin morfolojik olarak genç olan suşlarının hücreleri dar bir şekilde elipsoidal, oval, bazen silindirik ve tetrahedral olmaktadır. Hücre duvarı ince ve kloroplastlar parietal, bant şeklinde ve düzgün kenarlıdır. Pirenoidi belirsiz, çıplak, nişasta kılıfı ve nişasta taneleri ile birlikte. Olgun vejetatif hücrelerin şekli silindirik, elipsoidalden neredeyse küresel veya hafif piriforma kadar farklılık gösterir. Hücre duvarı çoğu hücrede incedir ve genellikle yaşla birlikte çok az değişir ancak bazı hücrelerde granüller bir hücre bulunur. Tek çekirdek büyüktür. Kloroplast parietal, bant veya kuşak şeklinde bazen hafif dalgalı kenarlı ve hafif lopluya kadar çok değişken bir forma sahiptir. Pirenoid, kloroplast stromasının tilakoidleri ile çevrilidir. Küçük nişasta taneleri stromada bulunur. Yaşlı hücrelerde kloroplastı hücre duvarından uzaklaştıra bilen birçok renksiz vakuol ve lipid damlacıkları oluşturur. Eşeysiz üremeleri 2-4-8-16 veya 3,5,7,9 ve daha fazla otospor aracılığıyla gerçekleşir (Egorova ve ark., 2022).

Chloroidium saccharophilum suşu daha az yağlı fakat besinsel önemi olan omega-3 çoklu doymamış yağ asidi ALA (18:3n-3) biriktirir (González ve ark. 2013). Alfa linolenik asit hayvanlar için gerekli olduğu düşünülen tek omega-3 yağ asididir (Stark ve ark. 2008). *Chloroidium saccharophilum* türü taksonomik olarak *Chlorophyta* şubesinde yer almaktadır. Tablo 1’de filogenetik taksonomisi gösterilmektedir.

Tablo 1. *Chloroidium saccharophilum* taksonomisi (WEB3)

Alem	Plantae
Şube	Chlorophyta
Sınıf	Trebouxiophyceae
Takım	Watanabeales
Aile	Watanabeaceae
Cins	<i>Chloroidium</i>
Tür	<i>Chloroidium saccharophilum</i> (W.Krüger)

1.3.Mikroalg Üretimine Etki Eden Parametreler

Mikroalgler adaptasyon yeteneği oldukça yüksek olan mikroorganizmalardır ve çeşitli ortam koşullarına uyum sağlayabilmektedirler. Ancak bazı fiziksel, kimyasal ya da biyolojik etkenler mikroalglerin yetiştirilmesini doğrudan etkiler ve bu etki mikroalglerin büyümesini teşvik edici yönde ya da engelleyici yönde olabilmektedir. Sıcaklık, pH, ışık, tuzluluk ve besin mevcudiyeti gibi etkenler fiziksel ve kimyasal etkenler (abiyotik stres faktörleri) olarak, yetiştirilen hücrelerin metabolizması ise biyolojik etkenler olarak değerlendirilmektedir (C.-Y. Chen ve ark., 2011). Mikroalg türlerinin büyümesini ve kültürlenmesini etkileyen başlıca etkenler aşağıda sırasıyla verilmiştir.

1.3.1 Sıcaklık

Sıcaklık mikroalglerin büyümesini etkileyen en önemli etmenlerden biridir ve her bir türün büyümesi için gerekli optimum sıcaklık derecesi türe spesifik olarak değişir. Bu yüzden kültüre alınan türlerin optimum sıcaklık koşulları belirlendikten sonra büyütülmeye başlanması yapılacak deneylerin doğruluğu bakımından önem arz etmektedir. Sıcaklık biyokütlenin üretimini ve içeriğini (protein, lipid gibi bileşenler) etkilemektedir. Hücrede gerçekleşen bu değişimler sıcaklığın hücre metabolizma hızını etkilemesi ile ilişkilendirilmektedir. Optimum büyüme seviyesinin altındaki sıcaklıklar genellikle zarlardaki lipidlerin doymamışlık derecesini arttırmaktadır. Sıcaklığın hücre metabolizmasına bir diğer etkisi ise artan sıcaklık ile karotenoid içeriğinde görülen artış olarak belirlenmiştir. Kültür ortamında artan sıcaklık azot ve karbon tüketimini de etkilemektedir (Ho ve ark., 2013).

Bazı türler için sıcaklıktaki artışı, doymamış yağ asitlerinin miktarını azaltabilir ve doymuş yağ asitlerinin miktarını artırabilir (Vona ve ark., 2004). Sıcaklık faktörünün etkisiyle, daha kaliteli biyodizel üretimine, setan sayısının artmasına ve yakıtın oksidatif kararlılığının artmasına katkıda bulunulabilir. Bununla birlikte, çok yüksek sıcaklıklar hücre zarlarının yırtılmasına neden olabilmektedir, çünkü lipid çift tabakası ısı etkisiyle değişiklik göstermektedir. Deneylerde büyütülen tür için, belirlenen optimum sıcaklık değeri kullanılmalıdır, bu sayede stabilite sağlanabilmektedir (Vona ve ark., 2004).

Breuer ve ark., (2013) *Scenedesmus obliquus* mikroalginde, pH ve sıcaklığın biyokütle üretimi ve triaçilgliserol (TAG) formundaki lipid birikimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Deneyler, pH 5, 7 ve 9'un tüm kombinasyonlarında ve 20 °C, 27,5 °C ve 35 °C sıcaklıklarda ve 500 $\mu\text{mol foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ 'lık ışık yoğunluğunda yapılmıştır. En yüksek nihai biyokütle konsantrasyonu ve en yüksek biyokütle üretkenliği, pH 7'de ve 27,5 °C sıcaklıkta gözlemlenmiştir. Bu durum aynı zamanda daha büyük bir TAG birikimi ile de sonuçlanmıştır (Rukminasari ve ark, 2013).

1.3.2. Işık şiddeti

Algler ışığı fotosentez için enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar bu yüzden ışık şiddeti ve uygulama aralığı alglerin büyütülebilmesi için önemli etkenler olarak görülmektedir. Işık koşulları mikroalgin büyümesini ve fotosentez işlemini doğrudan etkilemektedir. Işık fotosentez işlemi için gerekli olduğundan uygun ışık periyodunun ve ışık yoğunluğunun belirlenmesi optimum büyüme elde edebilmek için önem arz etmektedir. Işık uygulama periyotları mikroalg türüne göre çeşitlilik göstermektedir ancak genel olarak 16:8 aydınlık/karanlık ışık periyodu optimum olarak belirlenmiştir. Mikroalgler karanlık ve aydınlık uygulama fazlarına ihtiyaç duymaktadırlar. Aydınlık faza ATP ve NADPH üretiminin gerçekleştiği fotokimyasal reaksiyonlar için ihtiyaç duyarken, karanlık faza asıl moleküllerin sentezinin gerçekleştiği biyokimyasal evre için ihtiyaç duymaktadır (Belcher H. And Swale E.,1982, Dean ve ark., 2010). Işık uygulama periyodunun yanı sıra, uygulanan ışığın yoğunluğu da diğer bir önemli nokta olarak görülmektedir. Uygulanılan ışık yoğunluğunun ve periyodunun lipid içeriği üzerine olan etkilerini araştıran bir dizi çalışma literatürde bulunmaktadır. Bu çalışmaların ortak sonucu olarak belirlenen yorum ise artan ışık yoğunluğu seviyesi ve uygulama süresi doymuş yağ asidi içeriğini artırırken, tekli ve çoklu doymamış yağ asidi içeriğini azalttığı gözlemlenmiştir (Al-Qasmi, M., Raut, N., 2012). Behrens'e (2005) göre büyüme sürecinin optimizasyonunda kontrol edilmesi gereken ana faktör ışıktır, bunu sıcaklık, pH ve ortamdaki CO₂ ve O₂ varlığı takip eder. Derner ve ark., (2006), fotosentetik sistem tarafından alınan ışık enerjisi miktarının mikroalgler tarafından sabitlenecek karbon miktarı ile doğrudan ilişkili olduğunu ve dolayısıyla biyokütle üretimini ve kültürlerin büyüme hızını etkileyebileceğini vurgulamaktadır.

Mikroalg kültürlerinde aşırı ışık seviyeleri, fotoinhibisyon olarak adlandırılan, büyüme üzerinde olumsuz bir etki yaratabilir. Fotoinhibitör süreç, kloroplastlar tarafından soğurulan fotonların akışı, hücredeki yüksek enerjili elektronların konsantrasyonu Calvin Döngüsü tarafından tüketilemeyecek kadar yüksek olduğunda meydana gelir, bu nedenle klorofil molekülleri uyarılmış bir durumda olur ve işlem sonlanır (Becker ve ark., 1994).

Doğal ışık, üretim maliyetlerini azalttığından dolayı çeşitli yetiştirme sistemlerinde kullanılabilir. Bununla birlikte, çevresel değişiklikler ve ışık yoğunluğunun fotoperiyot kontrolünün olmaması, doğal ışık kullanan kültürlerin stabil olmamasına neden olur (Becker ve ark., 1994).

Liu ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada farklı ışık yoğunluklarının (50, 250 ve 400 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) biyokütle üzerine etkileri incelenmiştir ve en yüksek biyokütle konsantrasyonu 400 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ışık uygulaması altında elde edilmiştir.

Pancha ve ark. (2015), *Scenedesmus* sp.'de ışık yoğunluğu 30'dan 150 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 'e yükseldiğinde lipid içeriğinde %21,34'ten %23,62'ye ve karbonhidrat içeriğinde %35,34'ten %42,58'e bir artış buldu. Bu depolama ürünlerinin birikmesi, esas olarak, yüksek ışınlamada daha yüksek bir metabolik akış gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır ve bu, nihai olarak, mikroalglerde lipidlerin ve karbonhidratların birikmesine yol açmaktadır (Ramanan ve ark., 2013).

Krzemińska ve ark. (2015), ışık yoğunluğundaki artışın, mikroalg *Chlorella protothecoides*'in spesifik büyüme hızında bir artışa ve iki katına çıkma süresinde bir azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar ayrıca artan ışık yoğunluğu ile lipid içeriğinde %24,8'den %37,5'e önemli bir artış bulmuşlardır. Ayrıca, yağ asidi metil esterlerinin bileşimi ışık yoğunluğundan etkilenmiş, C16-18 yağ asitleri toplam yağ asitlerinin %76.97'sinden %90.24'üne yükselmiş ve artan ışık yoğunluğu ile linolenik asit içeriği (C18-3) azalmıştır.

1.3.3. Tuzluluk

Tuzluluk, iyon içeriğine bağlı ozmotik stres ve zararlı iyonlara karşı seçici geçirgenliği etkilemesi nedeniyle hücresel iyonik oranlardaki değişiklikler mikroalg büyümesini etkiler. Ek olarak, bazı iyonların yüksek konsantrasyonu mikroalglerde toksisite

gösterebilmektedir (van Dam ve ark., 2014). Kültür ortamındaki tuzluluk konsantrasyonlarındaki değişiklikler, mikroalglerin biyokimyasal bileşiminde değişikliklere neden olarak, lipidlerin ve karbonhidratların sentezini doğrudan etkiler. Farklı araştırmacılar, tuzluluk konsantrasyonundaki artışın (sodyum klorür şeklinde) ve bazı besin maddelerindeki azalmanın karbonhidrat konsantrasyonunda artışa yol açtığını bildirmiştir (Richmond ve ark., 2008; Vonshakve ark., 1997).

Sanchez ve ark. 2008’de *Scenedesmus almeriensis*’in NaCl’nin bulunmadığı ortamlarla karşılaştırıldığında, 5.85 g.L⁻¹ NaCl içeren kültürlerde daha yüksek biyokütle üretkenliği gösterdiği bulunmuştur. Ancak, *Chlorella* sp. gibi mikroalg türlerinde, 4,2 g.L⁻¹ ‘den yüksek sodyum klorür tuzu (NaCl) konsantrasyonları kültürler için toksisite göstermiştir (van Dam ve ark., 2014). Pancha ve ark., (2015) tarafından mikroalg *Scenedesmus* sp. 7.200 mg.L⁻¹ NaCl içeren kültür ortamında yüksek seviyelerde birikmiş lipid (%33.13) ve karbonhidratlar (%35.91) rapor edilmiştir.

1.3.4. pH

pH, ise çözünmeyen ve çökelmeyen çeşitli kimyasal elementlerin mevcudiyetini doğrudan etkiler. Bu nedenle, çoğu mikroalglerin büyümesi için uygun pH, ortamın bileşenlerinin mikroalgler tarafından etkin bir şekilde absorbe edilebilmesi için her zaman nötrüye yakındır. Düşük pH değerleri fotosentez sürecinde enzim inhibitörü olarak rol oynar(Yang ve ark., 2011).

Mikroalglerin büyümesi, ortamda çözünmüş CO₂’nin tüketilmesini içerir ve pH’da bir artışa neden olur (Pires ve ark., 2012). Düşük karbonat ve bikarbonat iyonları konsantrasyonları da pH’daki artışla ilişkilidir. Bu pH artışı, biyolojik atık su arıtma işlemlerinde patojenlerin inaktivasyonu için faydalı olabilir, ancak mikroalglerin büyümesini engelleyebilir (Kumar ve ark., 2010).

Bakuei ve ark. (2015), *Scenedesmus* sp. yetiştirdiklerinde maksimum biyokütle üretimini pH 8’de 3.23 g.L⁻¹ olarak bulmuşlardır. Bu biyokütle konsantrasyonu değeri, pH 7, 7.5 ve 8.5’te yetiştirme için bulunan değerin yaklaşık üç katıdır.

Moheimani ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada *Chlorella* sp. mikroalgi pH 7’de yetiştirildiğinde, biyokütle (407 ± 5.5 mg biyokütle.L⁻¹ .gün⁻²) ve lipit (99 ± 17.2 mg lipid.L⁻¹ .gün⁻²) içeriği bakımından daha yüksek üretkenlik gösterdiği bulunmuştur.

1.2.5. Besinler

Mikroalgler için kültür ortamı temel olarak karbon (C) kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), hidrojen (H), azot (N), fosfor (P), hidrojen (H) fosfor (P) ve oksijen (O) gibi makro besinlerden oluşur. Ayrıca Kükürt (S), potasyum (K), demir (Fe), manganez (Mn), bakır (Cu), molibden (Mo) ve kobalt (Co) gibi mikro besinlerde bulunur. Bazı mikroalgler kültür ortamında düşük konsantrasyonlarda vitaminlere ihtiyaç duymaktadırlar (Guillard ve ark, 1975). Büyümeyi sınırlayan başlıca unsurlar C, N, P ve demirdir. (Richmond & Hu, 2013).

Azot mikroalglerin büyümesi için temel besin kaynaklarından biridir ve lipid, karbonhidrat, protein gibi makromoleküllerin sentezinde görev almaktadır. Azot konsantrasyonundaki değişikliklerin mikroalg biyokimyasında önemli değişikliklere yol açtığı yapılan literatür çalışmaları ile belirlenmiştir. Örneğin, N konsantrasyonu azaldığında mikroalg hücrelerinin büyümesi yavaşlarken, lipid içeriğinde artış olduğu belirlenmiştir. Mikroalgler nitrat, amonyum, nitrit gibi farklı N kaynaklarını kullanabilmektedirler ancak en çok tercih edilen N formu nitrat olarak bilinmektedir. Mikroalgler N eksik ortamda ya da sınırlandırılmış N içeren ortamda büyüttükleri zaman lipid üretim miktarı artmaktadır. Bu lipid içeriği başlıca triaçilgliserol olarak belirlenmiştir. Triaçilgliserol, N eksikliği durumunda bolca sentezlenerek, sitoplazmada karbon ve enerji kaynağı olarak depolanmaktadır. Ortalama olarak nitrojen, mikroalgal biyokütlenin kuru ağırlığının yaklaşık %7-10'unu oluşturur ve alg hücrelerinde yapısal ve fonksiyonel proteinlerin oluşumu için gereklidir (Yaakob ve ark., 2021).

Mikroalgler nitrat, amonyak ve üre gibi diğer organik N kaynaklarını özümseyebilir; ek olarak, bazı mikroalgler atmosferik nitrojeni sabitleyebilir (Becker ve ark, 1994). Mikroalgler, nitrat tüketiminde, nitrojeni asimile edilebilir bir forma indirgemek için enzimleri kullanır. İlk olarak nitrat hücre içine bir nitrat taşıyıcı protein tarafından taşınır ve nitrat redüktaz enzimi tarafından nitrite, daha sonra nitrit redüktaz tarafından amonyağa indirgenir (Hattori & Myers, 1966). Amonyak, amino asitlerin oluşumu için transaminazların etkisiyle metabolizmaya dahil edilir (Hung ve ark., 2000).

İndirgenmiş formdaki (amonyum nitrojen) inorganik nitrojen kaynaklarının kullanımı, nitratlar ve nitritlere kıyasla enerji açısından uygundur ve hücre büyümesi için enerji

sağlar. Kültürde inorganik N bulunduğunda protein, karotenoid ve klorofil konsantrasyonlarında artış olur ancak ortamdaki N sınırlı olduğundan bu maddelerin miktarları da azalır (Becker ve ark., 1994).

Kültür ortamında N azlığı, mikroalglerin lipid içeriğini artırabilir(Santos ve ark., 2003). Azot tükenmesi, daha önce doymuş yağ asitleri gibi rezerv bileşenleri üretmek için hücre çoğalmasını amaçlayan mikroalglerin metabolizmasını yönlendirmesi nedeniyle, hücreyi bir besin yoksunluğu dönemi için hazırlar (Alonso ve ark., 2000).Vasileva ve ark.(2015), farklı N kaynaklarının (amonyum nitrat, üre ve amonyum nitrat + üre) kültür ortamında bulunan mikroalg *Scenedesmus* sp.'nin tüm yetiştirme periyodu boyunca daha iyi bir alg biyokütlesi verimi sağladığını gözlemlemişlerdir. En iyi büyüme, biyokütle konsantrasyonunun 9.0 g.L⁻¹'e ulaştığı üre içeren ortamda gözlenmiştir. *Scenedesmus* sp'nin biyokimyasal bileşimine karbonhidratlar, ardından proteinler ve lipitler hakim olmuştur. Üre veya amonyum nitrat içeren ortamda yetiştirilen mikroalglerin biyokütlesi, benzer seviyelerde protein (%29), karbonhidrat (%41) ve lipitler (%24) ile karakterize edilmiştir. Ağırman ve Çetin (2015), %50 nitrojen açlığı olan bir ortamda yetiştirildiğinde mikroalg *Chlorella vulgaris*'in biyokütlesinde biriken lipit içeriğinde %80'lik bir artış bulmuşlardır. *Chlorella* kültürlerinde, kültür ortamında nitrojen tükenmesi, hücre bölünmesini durdurmuş ve hücrelerin lipid içeriği %28'den %70'e yükselmiştir. Protein içeriğinde %30'dan %8'e bir düşüş aynı anda gözlemlenmiştir(Round ve ark, 1973).

Mikroalglerin büyümesini ve metabolizmalarını etkileyen bir diğer önemli besin elementi ise fosfordur. Fosfor konsantrasyonu mikroalglerin lipit ve yağ asidi profilini ve miktarını etkilemektedir. Fosfor mikroalg hücrelerinde enerji transferi, sinyal iletimi ve fotosentez gibi birçok önemli işlemde görev almaktadır. DNA, RNA, fosfolipitler ve ATP gibi hücresel bileşenler fosforun işlev gösterdiği başlıca yapılardır. Mikroalg hücrelerinin hücresel kompozisyonlarında da fosfor bulunduğundan dolayı mikroalgler için fosfor konsantrasyonu önemli olarak değerlendirilmektedir. Fosfor sınırlandırılmış ya da eksikliği durumlarında hücre metabolizmasında bazı değişiklikler görülmektedir. Bu değişikliklerin en önemli örneklerinden birisi de fosfor sınırlandırılması durumunda lipit içeriğinde görülen artış olarak bilinmektedir. Fosforun hücrede, enerji alışverişini içeren tüm süreçlerle ve ATP, fosfat şekerleri, nükleik asitler ve fosfoenzimler gibi moleküllerin oluşumuyla

ilişkili olarak önemli işlevleri vardır. Fosforun mikroalgler tarafından asimilasyonu, esas olarak ortofosfat (PO_4^{-3}) ve polifosfatlar gibi inorganik formlarda gerçekleşir (Becker ve ark, 1994). Optimal büyüme için fosfor konsantrasyonları, hiçbir dış sınırlayıcı faktör olmasa bile türler arasında önemli ölçüde farklılık gösterir (Richmond ve Hu, 2013). Mikroalgler, ihtiyaç duyulan minimum miktarın 8 ila 16 katı kadar fosforu biriktirebilirler, bu da yeni fosfor kaynakları bulunmasa bile hücre büyümesini garanti eder (Chisti ve ark., 2007). Lipitlerin ve karbonhidratların birikimi, kültür ortamındaki fosfor seviyeleri değiştirilerek iyileştirilebilir. Liang ve ark., (2009) fosfor konsantrasyonunun mikroalg *Chlorella* sp. tarafından lipid birikimi üzerindeki etkisini bildirmiştir. Bu çalışmada yazarlar, kültür düşük konsantrasyonda fosfor (1 mg.L^{-1}) ile yapıldığında hücrelerde lipid birikiminin arttığını doğrulamışlar, bu da *Chlorella* sp. fosfor için elverişsiz koşullar altında lipidleri biriktirebilir. Bu etki, fosfor açlığı kullanıldığında lipid içeriğinde %35'lik bir artışın gözlemlendiği *Scenedesmus* sp.'de de gözlemlenmiştir (Wu ve ark., 2015).

Bununla birlikte, alg biyokütlesindeki N:P oranı, türe ve besin mevcudiyetine bağlı olarak 4:1 ila yaklaşık 40:1 arasında değişebilir. Uygun koşullar altında, nispeten düşük N:P oranlarında bile yüksek verimlilik elde edilebilir (Park ve ark., 2011). Margarites ve ark. (2014), nitrojen ve fosfat konsantrasyonlarının *Chlorella minutissima* mikroalginin biyokütlesinde karbonhidrat içeriği üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Kültürler, 0 ila 0.250 g.L^{-1} arasında KNO_3 ve 0 ila 0.175 g.L^{-1} arasında $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ konsantrasyonları ile Box-Behnken tasarımı izlenerek Bazal ortamında gerçekleştirilmiştir. Etkilerin analizi, 0.125 g.L^{-1} nitrojen bileşeni (KNO_3) eklenerek ve fosfat bileşenleri (K_2HPO_4 ve KH_2PO_4) eklenmeden yetiştirilen *Chlorella minutissima* 'nın en yüksek karbonhidrat verimini ($0.030 \pm 0.002 \text{ g.L}^{-1}$) gösterdiğini bulmuşlardır.

Karbon, mikroalgal biyokütlenin yaklaşık %50'sini oluşturduğu için en önemli besinlerden biri olarak kabul edilir. Yüksek talebi, bu bileşenin hücreler tarafından sentezlenen tüm organik maddelerin (diğerlerinin yanı sıra proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler, vitaminler, lipitler) ana bileşeni olması gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Mikroalg kültür ortamında karbon, karbondioksit (CO_2), karbonik asit (H_2CO_3), bikarbonat (HCO_3^-) ve karbonat (CO_3^{2-}) gibi inorganik formlarda olabilir

veya glikoz, asetat (asetik asit), gliserol, nişasta gibi karbonhidratlar ve organik asitler gibi organik formda bulunabilir (Moheimani ve ark., 2013).

Mikroalg biyokütlesinin biyokimyasal bileşimi, kültür ortamındaki karbon kaynağından ve konsantrasyonundan etkilenebilir (Liang ve ark., 2009). Organik ve inorganik karbonun aynı anda asimilasyonunun olduğu mikсотrofik koşullar altında, bazı mikroalgler, daha fazla miktarda yağ asidi üretmenin yanı sıra biyokütle konsantrasyonunu ve büyüme oranını artırır (Liang ve ark., 2009).

Girard ve ark., (2014), bir karbon kaynağı olarak peynir altı suyu kullanarak, mikroalg *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing'in fotoototrofik, heterotrofik ve mikсотotropik koşullar altında kültivasyonunu incelemişler. Mikсотrofik kültür, 1.083 d^{-1} ile en yüksek spesifik büyüme oranını göstermiştir. Li ve ark., (2014), karbon kaynağı olarak glikoz kullanmış ve mikсотrofik olarak kültürlendiğinde *Chorella sorokiniana*'nın daha yüksek bir biyokütle konsantrasyonunu bulmuşlar; burada nihai kuru biyokütle, heterotrofik ve ototrofik kültürlerden sırasıyla 2,4 ve 5,2 kat daha yüksek olarak bulunmuştur.

Qu ve ark.,(2008) heterotrofik, mikсотrofik ve ototrofik kültür koşulları altında biyokütle üretiminde *Chlorella pyrenoidosa* tarafından fosfat asimilasyonunu bildirmişlerdir. Heterotrofik kültürler sırasında, fosfat eksikliği altında nihai biyokütle üretimi daha düşük olurken, mikсотrofik ve ototrofik koşullar altında maksimum fosfat asimilasyonu ve daha yüksek biyokütle üretimi gözlenmiştir.

Magnezyum elementi mikroalg büyümesi için gerekli bir elementtir. Magnezyum, DNA ve RNA sentezinde, fotosentezde, solunumda görevli enzimlerin aktivasyonunda görev almaktadır ve ayrıca klorofil molekülünün bir kısmını oluşturmaktadır. Magnezyumun hücrelerdeki fazlalığının zehir etkisi yaptığı bilinmektedir. Magnezyum klorofil yapısında işlev gördüğünden dolayı, Mg eksikliği durumunda klorofil gelişiminde azalma olmakta ve nişasta depolanması artış göstermektedir(Bolat ve ark.,2017).

Chlorella ve *Scenedesmus obliquus* türleri üzerine yapılan bir çalışmada Mg eksikliğinde lipit içeriğinde çok hafif bir değişiklik olduğu bulunmuştur (Gorain ve ark.,2013). (Wang ve arkadaşlarının) 2014'te yaptığı bir çalışmada Mg eksikliğinin *Chlorella vulgaris* mikroalginin metabolik profilini nasıl etkilediği incelenmiştir.

Çalışmanın sonucunda biyokütle üretiminde, protein, klorofil a ve klorofil b içeriklerinde azalış gözlemlenirken, lipit içeriğinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Magnezyum eksikliği ayrıca fotokimyasal yeterliliği de etkilemektedir (Wang ve ark. 2014).

1.4 Mikroalglerin Biyoteknolojik Kullanım Alanları

Mikroalgler biyoteknolojik olarak önem kazanmaktadır çünkü biyoteknolojik alanlarda kullanılabilmeleri için birçok avantajlı özelliğe sahiptirler. Bu avantajlı özelliklerinin arasında küçük alanlarda yüksek miktarda biyokütle üretebilmeleri, kolay yetiştirilebilmeleri ve çeşitli biyoyakıt bileşen üretim potansiyelleri sayılabilir. Mikroalgler insan ve hayvan gıdalarında, kimya ve ilaç endüstrilerinde uygulamalara sahiptirler. Mikroskopik yeşil alglerin ticari kullanımları incelendiğinde, kullanılan başlıca türler arasında *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* ve *Botryococcus braunii* türleri sayılabilmektedir. *Chlorella vulgaris* türü hücresel veya koloni halinde büyüyelebilmektedirler. Pigment içeriği olarak klorofil a, klorofil b, β -karoten ve ksantofiller gibi pigmentleri bulundurmaktadır ve depo maddesi olarak nişasta depolamaktadır (Wilson ve Huner, 2000). *Chlorella* gıda takviyesi, ayrıca kozmetik ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Bileşiminde proteinler, karotenoidler, immünostimülatörler, polisakkaritler, vitaminler ve mineraller bulunur (Masojídek ve ark. 2010). Yetiştirmede yüksek verimliliğe sahiptir ve alg biyokütlesi üretiminde en yaygın olarak kullanılan organizmalardan biridir (Görs ve ark. 2010).

1.4.1 Biyoyakıt Üretimi

Fosil yakıt rezervlerinin yarım yüzyıl içinde tükeneyeceğinin belirtilmesi nedeniyle, dünyanın gelecekte enerji sorunlarıyla karşı karşıya kalacağı öngörülmektedir (Harun ve ark. 2011). Bu nedenle gelecekte kullanılabilecek yenilenebilir enerji kaynaklarının araştırılması önem arz etmektedir (Park ve ark. 2011). Bu noktada mikroalglerin yenilenebilir enerji kaynağı olarak kullanılması hususuna olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Mikroalg biyokütlesi, biyoteknolojik ürünler, ilaçlar ve gıda katkı maddeleri kaynağı olarak kullanabilmelerinin yanı sıra dünyanın enerji ihtiyacının yaklaşık %25'ini karşılayabilme potansiyeline sahiptir (Rawat ve ark. 2011). Biyoyakıt oluşturmak için yenilebilir bitkilerin kullanılması, gıda güvenliği konularını içeren çok sayıda tartışma yaratmıştır. Biyoyakıt üretimi için bir kaynak olarak

mikroalglerin başlıca avantajları şunlardır: yüksek büyüme oranları ve kısa üretim süreleri; minimum arazi gereksinimleri; yüksek lipit ve yağ asitleri içeriği; atık suyun besin kaynağı ve CO₂ yakalama kaynağı olarak kullanılmasıdır (Maity ve ark. 2014). Ayrıca mikroalglerin yetiştirilmesi ekilebilir arazi ve tatlı su gerektirmez, ancak tuzlu veya acı su içeren sert tabakalı topraklarda sığ havuzlarda da yapılabilir (Sialve ve ark. 2009).

Genel olarak biyoyakıt üretimi 2 büyük gruba ayrılabilir: termokimyasal dönüşüm ve biyokimyasal dönüşüm. Birinci grup, yakıt ürünleri üretmek için biyokütlenin termal ayrışmasından oluşur ve aşağıdaki teknikleri içerir: sentez gazı üretimi için gazlaştırma; biyo-yag üretimi için termokimyasal sıvılaştırma; biyo-yag, sentez gazı ve odun kömürü için piroliz ve elektrik üretimi için doğrudan yanma. Biyokimyasal dönüşüm ise, mikroorganizmaların metabolik süreçleri ile bağlantılı kimyasal ve biyolojik reaksiyonlar yoluyla biyokütlenin biyolojik olarak parçalanmasından oluşur. Biyogaz üretimi için anaerobik sindirim tekniklerini içerir. Bunlar etanol üretmek için alkollü fermantasyon ve hidrojen üretimi için fotobiyolojik üretimdir (Prajapati ve ark. 2013).

Mikroalglerin yağlarından biyodizel üretimi mevcut çevre sorunlarına ve yakın gelecekte olası petrol kıtlığına etkili bir çözüm olarak sunulmaktadır (Wang ve ark 2012; Zeng ve ark. 2011). Yüksek büyüme oranları ve transesterlenebilir lipidlerin üretimi nedeniyle petrol dizeliyle karşılaştırıldığında, mikroalg dizeli, CO₂ emisyonunda %78'e varan azalmaya sahiptir. Ayrıca daha fazla biyokütle elde etmek için daha az arazi alanına ihtiyaç duyulması birçok karasal bitki türünden biyodizel üretiminde ekonomik ve teknolojik olarak daha iyidir (Hou ve ark. 2011; Wang ve ark. 2012).

1.4.2 Gıda ve İnsan Sağlığı

Mikroalglerin besin olarak tüketimi, gıda güvenliği, ticari faktörler, Pazar talebi ve özel hazırlık üzerindeki sıkı kontroller nedeniyle birkaç türle sınırlı kalmıştır. En belirgin 3 cins, diyet takviyesi olarak pazarlanan *Chlorella*, *Spirulina* ve *Dunaliella* dır (Spolaore ve ark., 2006). *Chlorella* cinsine ait bazı türler, böbrek yetmezliğine karşı koruyan ve bağırsak *Lactobacillus*'ın büyümesini destekleyen tıbbi değerler için de pazarlanmaktadır. *Dunaliella* ise kan kolesterol konsantrasyonlarındaki azalmayı

desteklediğinden ve beta-karoten içeriği nedeniyle pazarlanmaktadır (Brennan ve Owende, 2010; Spolaore ve ark., 2006). Ayrıca *Chlorella* içeren bir diyetin sigara içenlerde antioksidan seviyesini artırdığı, bu da onu sağlığı destekleyen bir takviye haline getirdiği tespit edilmiştir (Lee ve ark., 2010). Öte yandan, *C. pyrenoidosa*'dan elde edilen polisakkarit ve monosakkaritler, tümörlere karşı ilaçların geliştirilmesi için oldukça potansiyel bir kaynaktır (Sheng ve ark., 2007).

1.4.3 Hayvan Besleme

Dünya mikroalg üretiminin %30'u hayvan tüketimine yöneliktir ve aslında *Arthrospira* üretiminin %50'si bu amaç içindir (Spolaore ve ark., 2006). *Chlorella*, *Scenedesmus* ve *Spirulina* cinslerine ait bazı alg türleri, hayvanlar için yararlı olup, bağışıklık tepkisini, kısırılığı, kilo kontrolünü, daha sağlıklı cilt ve parlak saç üretmeyi geliştirir (Brennan ve Owende, 2010; Spolaore ve ark., 2006). Kedi, köpek, akvaryum balıkları, süs kuşları, atlar ve ineklerin beslenmesinde kullanılırlar. Su ürünleri yetiştiriciliğinde mikroalgler, yumuşakçalar, balıklar ve kabukluların larva evreleri için ana besin kaynağıdır (Harun ve ark., 2011). Gıda olarak kullanılan en yaygın cinsler, çoğunlukla canlı olarak tüketilen *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros* ve *Thalassiosira*'dır (Spolaore ve ark., 2006).

1.4.4 Biyogübre Olarak Mikroalg

Diğer bir uygulama alanı ise mikroalglerin biyogübre olarak kullanımınıdır. Alglerin organik tarımda gübre olarak kullanılabilecekleri bilinmektedir (Şimşek ve ark., 1995). Ağırlıklı olarak deniz algleri ve Cyanophyta grubu algler biyogübre olarak kullanılmış ve yüksek protein içeriğine sahip olan *C. vulgaris* türü N kaynağı olarak tarımda kullanılmaktadır (Selvam ve Sivakumar, 2014). Bazı dönüştürme teknikleri (özellikle piroliz), ile biokarbon adı verilen ve tarımda gübre olarak yüksek potansiyele sahip olan odun kömürü üretilir (Brennan ve Owende, 2010).

1.4.5 Kozmetik

Arthrospira ve *Chlorella* cinslerine ait bazı mikroalg türleri kozmetik endüstrisinde cilt bakımı için kullanılmaktadır (yani yaşlanma karşıtı kremler, cilt tazeleyici veya yenileyici ürünler, yumuşatıcılar ve tahriş önleyiciler). *Arthrospira*'nın protein açısından zengin özleri, cilt yaşlanmasının erken belirtilerini onarır, sıkılaştırıcı bir

etki gösterir ve çatlakların oluşumunu engeller. *C. vulgaris* özleri kolajen sentezini uyarak doku yenilenmesini ve kırışıkların azalmasını desteklerken, *Nannochloropsis oculata* mükemmel cilt sıkılaştırma özelliklerine sahiptir (Spolaore ve ark., 2006).

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Mikroalglerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Mikroalg örnekleri, Prof. Dr. Turgay Çakmak tarafından Antarktika'nın Horseshoe adası (67°49'23.6"S 67°18'20.9"W) deniz kenarındaki kayalıkların üzerinden (Şekil 3) toplanmıştır.



Şekil 3. *Chloroidium saccharophilum* ASYA23'nin toplandığı alanı gösteren fotoğraf.

2.2 Mikroalglerin Kültüre Alınması ve Büyütülmesi

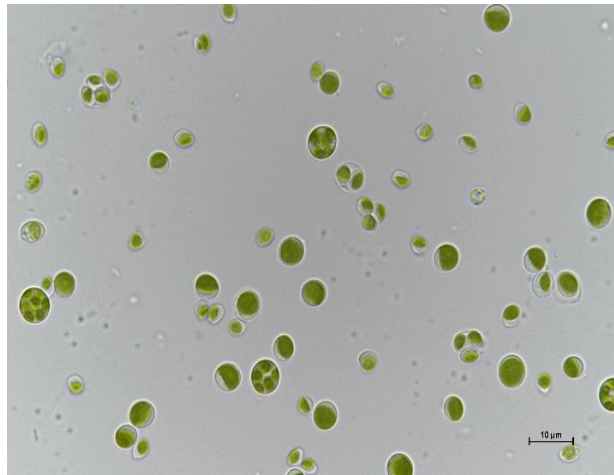
Saflaştırılarak kültüre alınan *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 mikroalg türü modifiye edilmiş büyüme ortamı olan 3N-BBM(3xAzot Blod's Basal Medium) ortamında kültüre edilmiştir. Kullanılan ortamın madde içeriği Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 türünün 3N-BBM ortamının içeriğine ait tablo

BBM	Kontrol	Mg(-)	N(-)
NaNO ₃	2,250 g/10ml	0,750 g/10ml	-
MgSO ₄	0,075g/10ml	-	0,075g/10ml
NaCl	0,025 g/10ml	0,025 g/10ml	0,025 g/10ml
K ₂ HPO ₄	0,075g/10ml	0,075g/10ml	0,075g/10ml
KH ₂ PO ₄	0,175 g/10ml	0,175 g/10ml	0,175 g/10ml

CaCl₂	0,025 g/10ml	0,025 g/10ml	0,025 g/10ml
ZnSO₄ 7H₂O	0,882 g/100ml	0,882 g/100ml	0,882 g/100ml
MnCl₂ 4H₂O	0,144 g/100 ml	0,144 g/100 ml	0,144 g/100 ml
MoO₃	0.071 g/100 ml	0.071 g/100 ml	0.071 g/100 ml
CuSO₄ 5H₂O	0,157 g/100 ml	0,157 g/100 ml	0,157 g/100 ml
Co(NO₃)₂ 6H₂O	0,049 g/ 10 ml	0,049 g/ 10 ml	0,049 g/ 10 ml
Na₂ EDTA 2H₂O	0,5 g/100 ml	0,5 g/100 ml	0,5 g/100 ml
KOH	0,31 g /100 ml	0,31 g /100 ml	0,31 g /100 ml
FeSO₄ 7H₂O	0,005 g/1 ml	0,005 g/1 ml	0,005 g/1 ml
H₂SO₄	1 ml	1 ml	1 ml
Vit. B1 (Thiamine HCl)	0,01 g/100 ml	0,01 g/100 ml	0,01 g/100 ml
Vit. H (Biotin)	0,0025 mg /100 ml	0,0025 mg /100 ml	0,0025 mg /100 ml
Vit. B12 (Cyanocobalamin)	0,0015 mg 100 ml	0,0015 mg 100 ml	0,0015 mg 100 ml

3N-BBM büyüme ortamı uygun kimyasallarla 1 L hazırlandıktan sonra pH'ı(Mettler Toledo) 6,5 a ayarlanıp 121°C'de 20 dk otoklavlanmıştır. Daha sonra dışarıda besi ortamı soğutulmaya bırakılmış ve soğutulan besi ortamının içerisine laminar kabin içerisinde vitaminler eklenmiştir. 100ml'lik erlen mayerler içerisine 50 ml sıvı 3N-BBM konulduktan sonra katı ortamdan sıvı ortama hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. 15



°C sıcaklık ve $150 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık altında, çalkalayıcı üzerinde 120 rpm de hücrelerin çoğalması beklenilmiştir. Hücrelerin saflığını sağlamak için belirli aralıklarla mikroskop altında hücreler gözlemlenmiştir.(Şekil 4). Hücrelerin çoğalma hızı ise spektrofotometrede 680 nm de ölçümü yapılarak incelenmiştir. Hücreler belirli bir konsantrasyona ulaşıncaya, saflığı kontrol edilip deney düzeneği için stok olarak saklanmıştır.

Şekil 4. *Chloroidium saccharophilum* mikroalglerin x100 ışık mikroskop görüntüsü.

2.3. *C.saccharophilum* ASYA23'ün 18SrDNA bölgesine göre tanımlanması

Örneklenen mikroalgin saflaştırılması işlemine araştırma gemisinde kurulan bir laboratuvar ortamında daha önceden hazırlanan katı ve sıvı besiyerlerine (BG-11, BBM, TAP, F/2) ekim yapılarak başlanmıştır. Ayrıca hem ekimi yapılan örnekler ve hem de doğrudan falkon tüpleri içerisine alınan örnekler İstanbul Medeniyet Üniversitesi'ne taşınmıştır. Laboratuvara getirilen mikroalg kültürünün saflaştırılmasında çizgi plaka yöntemi ve seyreltme yöntemleri uygulanarak saf mikroalg kültürleri elde edilmiştir.

Filogenetik analiz için kültüre alınan mikroalgin DNA ekstraksiyonu Qiagen DNEasy Plant Mini kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saflığı spektrometrik olarak doğrulanan DNA örneği 18S rDNA bölgesi Tablo 3'de sunulan primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR şartları; 95 °C (2dk); 30x [95 °C (1dk)-55 °C (1dk)-68 °C (3dk)] olarak uygulanmıştır. PCR sonrası elde edilen ürün TAE tamponu içinde kurgulanan %1 (w/v)'lik agaroz jelde yürütülmüş ve net bant elde edilerek tanımlama işleminin ilk adımı tamamlanmıştır. Daha sonra Qiagen purification kit ile tekrar saflaştırılan ampikon, E528F-BR primerleri kullanılarak SANGER sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Kültüre alınan mikroalg 18S rDNA bölgesinden elde edilen SANGER sekans analizi verisi NCBI sistemine kaydedilmiş ve türün giriş numarası belirlenmiştir. Kaydedilen sekans sonucu NCBI/BLAST analizi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile en yakın türlerin eşleşen sekans dizileri sistemden alınmış ve FASTA formatında birleştirilmiş, UGENE programı kullanılarak Clustal W algoritması ile hizalanmıştır. Filogenetik ağaç Maksimum Likelihood

yöntemi ve 100 Bootstrap tekrarı kullanılarak oluşturulmuştur. Üretilen filogenetik ağacın şekilsel olarak düzenlenmesi için ayrıca FigTree (v1.4.4) programı kullanılmıştır.

Tablo 3. PCR ve sekanslama için kullanılan primer listesi.

Primer Adı	Primer Sekansı 5' - 3'	Uygulama	Referans
Euk-F	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	PCR	Sands ve ark., 2008
Euk-R	TGATCCTTCTGCAGGTTACCC	PCR	Sands ve ark., 2008
E528F	TGCCAGCAGCYGCGGTAATTCCAG C	Sekans	Marin ve ark., 2003
BR	TTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	Sekans	Marin ve ark., 2003

2.4. Deney Düzenegi

Deney düzenegi kontrol grubu, Mg açlığına bırakılmış grup ve N açlığına bırakılmış grup olacak şekilde 3 biyolojik tekrarlı ve 3 farklı zamanda tekrarlanmıştır. Tekrarlanma sonuçları aynı verileri vermiştir. Hücre grupları etiketlenirken; kontrol A,B,C; eksik magnezyum A,B,C; eksik Azot A,B,C olarak etiketlenmiştir (Şekil 5).



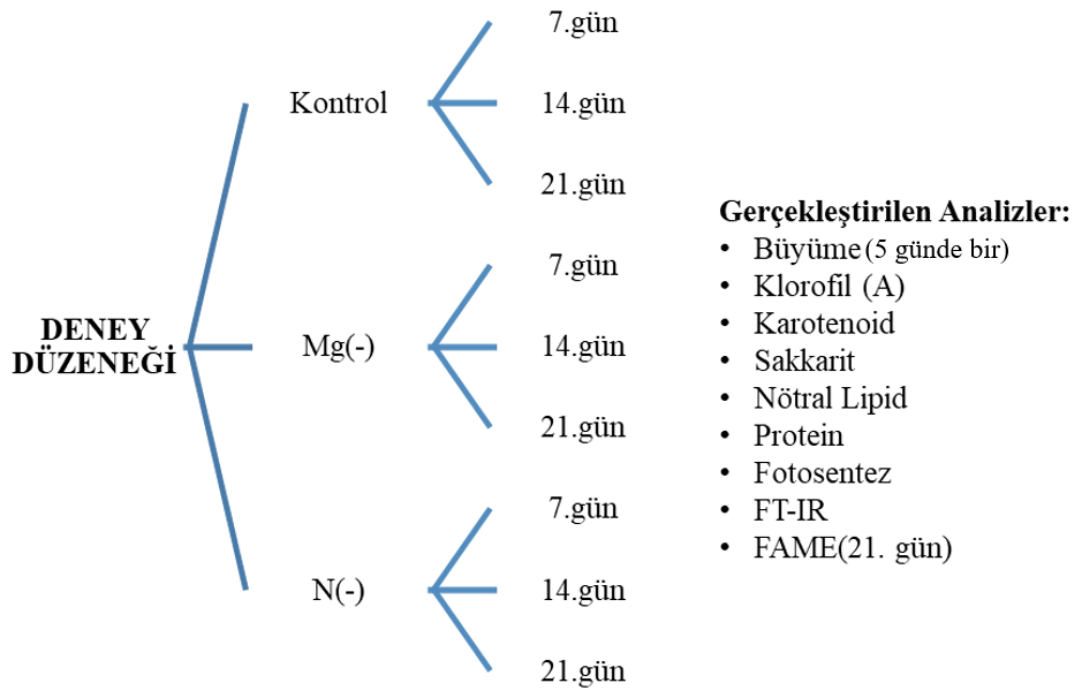
Şekil 5. 7.gün mikroalg kültür görüntüleri.

Stok olarak kaldırılan hücrelerin saflığı mikroskopta incelendikten sonra spektrofotometrede 680 nm dalga boyunda absorbanlarını ölçülmüştür. Çıkan absorbanssiyon değerine bağlı olarak de büyüme takibi için 0,2 abs ve diğer analizler

için 0,4 olacak şekilde Excell'de stok ortamından (50 ml'lik sıvı kültür) ne kadar ml alınacağı hesaplandı. Hesaplanan sonuca göre laminar kabin içerisinde stoktan hesaplanan ml alınıp steril falkonlara aktarıldı. Daha sonra hücreler ölmeyecek şekilde 3000 rpm 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj edilen falkonlar laminar kabin içerisinde süpernatant kısmı dökülüp pelet kısımları 1000'lik pipet yardımıyla önceden hazırlanmış 100 ml'lik erlen mayerler içerisindeki 50 ml'lik 3N-BBM ortamına ekimi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu için 3N-BBM ortamı, Mg açlığına bırakılan ortam için Mg eksik 3N-BBM ortamı, N açlığına bırakılanlar için ise N eksik BBM ortamı kullanıldı. Daha sonra erlen mayerleri 15 °C sıcaklık, 16h/8h (aydınlık/karanlık) ışıklandırma, %60 nem parametrelerine ayarlanan iklimlendirme dolabında 120 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde kültüre alarak deney düzeneği başlanmıştır.

2.5. Deney düzeneği ve takip süreci

Kurulan büyüme deneyinde 30 günlük bir süreç içerisinde 5 günde bir hücre büyüme hızları spektrofotometre de 680 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek kaydedildi ve thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Klorofil, karotenoid, sakkarit, lipid, protein ve FT-IR Analizleri için kurulan deneyde ise 21 günlük süreç içerisinde 7 günde bir üç biyolojik tekrar olacak şekilde örnek alımı gerçekleştirildi. Sadece FAME analizi için 21.gün biyoması kullanıldı (Şekil 6).



Şekil 6.Deney düzeneğini gösteren şema ve gerçekleştirilen analizler

2.6. Büyüme Takibi

Büyüme takibi için 7 günde bir örnekler homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra 96 kuyucuklu well platelere üç biyolojik tekrar olacak şekilde 200 µl alınarak kuyucuklara yüklendikten sonra 680 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuması yapılmıştır.

Laminar kabin içerisinde örneklerimiz kültür ortamından eppendorflara 200 ul olacak şekilde alınmıştır. Daha sonra örneklerimizden 10 ul olacak şekilde Thoma lamına yüklenmiştir ve ışık mikroskobu altında 5 farklı bölgedeki hücre sayımı yapılmıştır. 10ul’ deki hücre sayısı bulunduğundan sonra 1 ml’deki hücre sayısı bulunmuştur.

2.7. Total Klorofil ve Total Karotenoidlerin Spektrofotometrik Tayini

Klorofil ve karotenoid tayini için Jeffrey ve Humphrey, (1975)’in uyguladığı metot kullanılmıştır. Erlenlerdeki örneklerimizin spektrofotometrede 680nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 1 ml de klorofil absorbansı 0,4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneyin devamında kullanılacak madde miktarını (mL) belirlemek için; 0,4 değerinin, ölçülen absorbans değerlerine oranı hesaplanmıştır ($=0,4/\text{çıkan abs}$). Hesaplama sonrasında çıkan değer kadar örnekleri eppendorf tüplerine aktardıktan sonra 5000 rpm, 3 dk olacak şekilde santrifüjledik ve santrifüj aşamasından sonra süpernatant kısım atılmıştır. Pelletin üstüne 300 µl olacak şekilde boncuk ve 200 µl %96’lık etanol eklenmiştir. Daha sonra homojenizatörde 2 dk’lık mekaniksel parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Parçalanan örnekleri yeni eppendorflara aktarmak amacıyla; daha önceki aşamada eklediğimiz 200ul etanol yeni eppendorflara mikropipet aracılığıyla aktarılmıştır. Sonrasında 2 defa olacak şekilde 400ul etanol eppendorflara pipetlenmiş ve eppendorflarda geri kalan kısımlar yeni eppendorflara aktarılmıştır. Totalde 1 ml hacim oluşmuştur. Eppendorflarımız 15000 rpm, 5 dk olacak şekilde santrifüjlenmiştir. Daha sonra her bir örneğin yeşil olan süpernatant kısmı 96’lık mikroluka kuyucuklarına üç biyolojik tekrar olacak şekilde 240 µl örnek yüklenmiştir. Dipte kalan pellet kısmı ise sakkarit analizi için -80°C ’de dondurulmuştur. Kuyucuklara yüklenen örneklerin spektrofotometrede absorbans

değerleri sırasıyla 470,647,664,630 ve 750 nm’de okunmuştur. Çıkan sonuçlar doğrultusunda (Jeffrey & Humphrey, 1975) aşağıda verilmiş olan denklemlere göre hesaplamalar gerçekleştirilerek klorofil a, klorofil b ve total karotenoid değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{Klorofil } a = (11,85*(E664-E750)-1,54*(E647-E750)-0,08*(E630-E750))$$

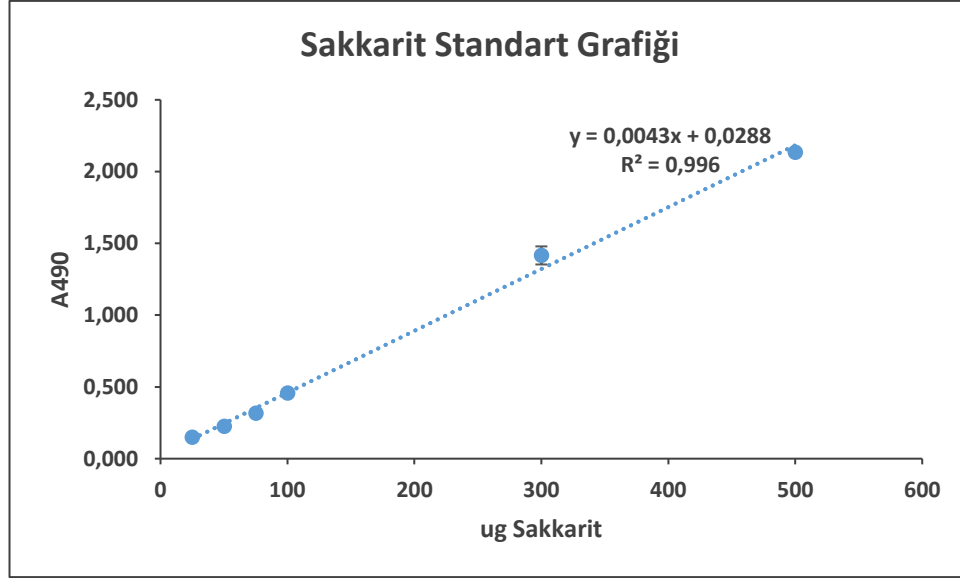
$$\text{Klorofil } b = (-5,43*(E664-E750)+21,03*(E547-E750)-2,66*(E530-E750))$$

$$\text{Total karotenoid} = (1000*A470-(1,86*\text{klorofil A})-(74,08*\text{Klorofil B}))/206$$

2.8. Sakkarit tayini

Mikroalg örneklerinin farklı stres koşullarına tabi tutulduğunda, total sakkarit içeriğinin nasıl etkilendiğini anlamak amacı ile fenol-sülfirik asit analizi yapılmıştır. Total sakkarit tayini için klorofil analizi kısmında ayrılan ve -80° C’de bekletilen pelletler kullanılmıştır. En az 1 saat -80° C’de bekletilen pelletler 500 ul suda çözdürülmüştür. Pelletlerin homojen bir şekilde çözülebilmesi için 10 dakika rotatorda döndürülmüştür. Homojen bir karışım elde edildikten sonra üzerine 500 ul fenol eklenmiştir ve 15 dakika rotatorda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 60 ul örnek üç biyolojik tekrar olacak şekilde 96’lık mikrolplaka üzerine yüklenmiştir ve üzerine 150 ul sülfirik asit eklenmiştir. Sülfirik asit eklenmesinden sonra reaksiyonun gerçekleşebilmesi için pipetaj yapılmıştır. Reaksiyon gerçekleştikten 5 dakika sonra 490 nm dalga boyunda Thermo Scientific spektrofotometre ile ölçüm yapılmıştır.

Mikroalgr örneklerinin sakkarit konsantrasyonlarını sayısal olarak hesaplamak için standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltisi hazırlamak için 10 ml glikoz çözeltisi hazırlanmıştır. Standart çözeltilerin A490 değerine göre standart grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 7).



Şekil 7. Sakkarit tayini için hazırlanmış standart grafik.

2.9 Nötral Lipit Tayini

Alglerin nötral lipit tayini için Satpati.G.G ve Pal,R.(2015) modifiye ettiği yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemle göre 100 ml'lik erlenler içerisindeki 50 ml besi ortamında yetişen alg örneklerimizden 200 ul 96'lık mikroluka kuyucuklarına 3 biyolojik tekrar olacak şekilde yüklenmiştir. Thermo scientific Spektrofotometre ile 680nm'de absorbansları ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerine bağlı olarak 1 ml de 0,3 absorpsiyon olacak şekilde absorbans hesaplanmıştır. Hesaplanan absorbans göre erlenlerden mililitre bazında örnek alınmıştır. Alınan bu örnekler eppendorflara aktarılmıştır. Eppendorflar 1 ml olacak şekilde ayarlanmıştır (fazla ise süpernatant kısım atılır örnek miktarı düşük ise 1ml'ye tamamlamak için ddH2O eklenir). Daha sonra 500 ml olacak şekilde her örnek iki eppendorfa ayrılmıştır (Herhangi bir sorun yaşandığında diğerinin yedek olarak kullanılması amacıyla ikiye ayrılır). 500ul örneklere 2ul Nile red (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one) boya eklenmiştir ve Nile red boya eklendikten sonra bütün aşamalar karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Boya eklenen örneklerin üzerine 300 ml DMSO eklenmiştir. 30 sn olacak şekilde eppendorflar vortekslenmiştir. Vortekslenen eppendorflar daha sonra 15 dk 40° C'de Thermo-Shaker(Grant-Bio) cihazında inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örnekler 4000 rpm'de 4 dk olacak şekilde Thermo Scientific MicroCl 17 cihazında santrifüj edilmiştir. Santrifüj aşamasından sonra örneklerin süpernatant kısımları

atılarak pelletlerin üzerine 400 ml PBS eklenmiş ve iki defa yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler 180 ml olacak şekilde 96 oyuklu plakaya yüklendi. Nil red ile gerçekleştirilen boyama işleminde sonra her örnek 490 nm eksitasyon ve 545 emisyon değerleri kullanılarak floresans özelliği bulunan mikropilaka okuyucu (BioTEK Cytation5) ile absorbas değerlerine bakılarak lipit içeriğinde meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir.

2.10 Protein tayini

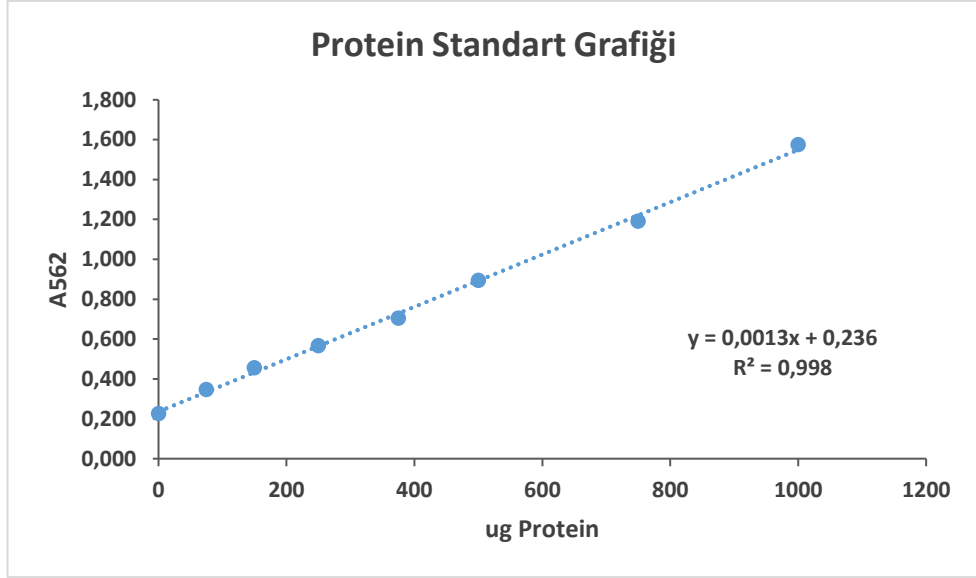
Mikroalg örneklerinin protein miktar tayini için Bichinconinic asit (BCA) metodu kullanılmıştır(Weis ve ark., 2002). Absorbansları alınan örnekler göre absorbanslar 1 abs olacak şekilde ayarlanarak örnekler alınmıştır ve alınan örnekler 4000 rpm 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısım atılır ve pelletlerin ağırlıkları hassas terazide ölçülmüştür. Üstlerine önce 0,3 ml olacak şekilde cam boncuk eklenmiştir. Daha sonra ölçülen ağırlığa bağlı olarak biyomasa 1:5 (mg:mL) oranında lizis tamponu eklenmiştir.

2 dakika homojenizatörde parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir ve hücrelerin parçalandığından emin olmak için örnekler mikroskop altında incelenmiştir. Daha sonra parçalanmış örnekler 20 dk 13000 rpm 'de +4° C'de santrifüjlenmiştir. Standart için 96'lık mikropilaka kuyucukları üzerine sırasıyla 0,1,5,3,5,7,5 ve 10 ul Bovin Serum Albumin (0,5 mg/ml) çözeltisi yüklenmiştir ve üzerlerie 10 ul olacak şekilde hacimlendirilmiştir. Daha sonra yaptığımız çalışmadan elde etmiş olduğumuz mikroalg örneklerini 2 ul alınarak 96'lık mikropilaka kuyucuklarına 3 tekrarlı olacak şekilde yüklenmiştir. Ve sonra hem örneklerin, hem de standardın üzerine 200 ul çalışma solüsyonu yüklenmiştir.

Çalışma solüsyonu karışımı

Karanlıkta 1 kat %4 lük Bakır sülfat ve 50 kat Bicinchoninic asit solüsyonu (Sigma) karıştırılarak yapılır.

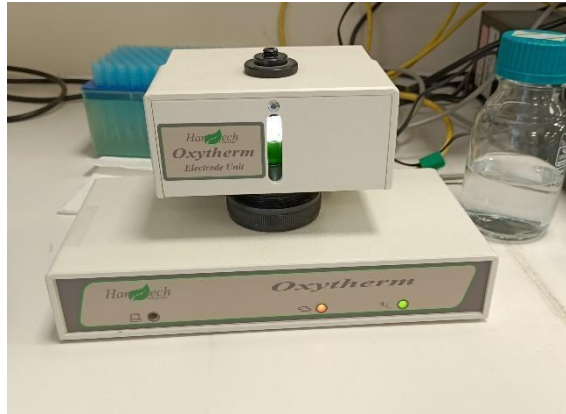
60° C'de 15'dk olacak şekilde inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra görülen renk değişimi 562 nm'de absorbans olarak spektrofotometrede ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar bovin serum albüminle hazırlanmış standart grafiğe göre ug protein/gr şeklinde hesaplanmıştır (Şekil 8).



Şekil 8. Protein tayini için hazırlanmış standart grafik.

2.11 Oksijen Evolusyonu

Chloroidium saccharophilum ASYA23 mikroalginin fotosentez ve solunum hızları, Clark tipi oksijen elektrot sistemi (Hansatech Oxytherm, Hansatech Ins. Ltd., Norfolk, U.K., Şekil 9) kullanılarak oksijen üretimi veya tüketim seviyelerinin bir fonksiyonu olarak ölçüldü (Kaliyamurthi, Selvaraj, Cakmak, & Cakmak, 2016). İlgili çözeltilerle ayarlanmış absorbands değeri $A_{680} = 1.0$ olan 2 ml hücre kültürü reaksiyon kaplarına yüklendi ve 25°C’de sürekli karıştırıldı. Hücreler, 3 dakika boyunca oksijen tüketiminin izlenmesiyle karanlık koşullara adapte edildi. Daha sonra, küvetin içerisindeki örneklerin 480 $\mu E/(m^2/s)$ şiddetinde bir projektör lambası ile aydınlatılmasıyla 5dk boyunca oksijen üretim seviyeleri ve 5 dk da ışık kapatılarak karanlık evrede oksijen tüketim oranları incelendi.



Şekil 9. Clark tipi oksijen elektrot sistemi (Hansatech Oxytherm, Hansatech Ins. Ltd., Norfolk, U.K.).

2.12.FT-IR Analizi

Kullanılan bu yöntem, moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekansını ölçer ve kızıl ötesi (IR) radyasyonun absorpsiyonu ile moleküllerdeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi verir.

Çalışmanın bu kısmında üzerinde çalışılan *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 mikroalg türünün moleküler içeriğinin tanımlanması amacı ile Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi yapılmıştır ve ayrıca bu analiz ile mikroalgin biyomolekül içeriği de değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu araştırmada, FTIR ölçümü Dean vd. (2010), tarafından tarif edildiği şekilde yapılmıştır. Bu analizi gerçekleştirmek amacı ile absorbans ölçümü yapıldıktan sonra absorbans 1 olacak şekilde ayarlamalar yapılarak gerekli miktarlarda örneklemeler yapıldı. Toplanan örnekler liyofilize edildikten sonra 40°C'ye ayarlanmış fırında örneklerin iyice kurumasını sağlamak amacı ile inkübe edildi. Örnek hazırlama aşaması bittikten sonra Perkin Elmer Spectrum Two(Şekil 10) cihazında, 4000-400 cm^{-1} spektrum aralığında, 128 tarama yapılarak ölçümler alındı. . Çevresel koşullardan fazla etkilenmeyen absorpsiyon bandı olan Amid 1 (1652 cm^{-1}) değeri doğrulama değeri olarak seçilmiştir. Triaçilgliserol (1744 cm^{-1}) değerleri Amid 1 (1652 cm^{-1}) değerlerine oranlanarak mikroalglerdeki triaçilgliserol (TAG) konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikler tespit edilmiştir (Movasaghi vd., 2008).



Şekil 10.Perkin Elmer Spectrum Two cihazını gösteren şekil.

2.13.Yağ Asidi Metil Ester Tayini (FAMES)

N ve Mg açılığında *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 türündeki lipit profili değişikliklerinin belirlenmesi amacıyla Trace 1310 gaz kromatografisi (Thermo Scientific) cihazı (Şekil 11) ile FAMES analizi gerçekleştirilmiştir. Yağ asitlerinin ekstraksiyonu, metilleştirilmesi ve analizi için Patel ve ark. (2018), tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır.

FAMES analizi için mikroalg örnekleri 680 nm dalga boyunda absorbanları 3 olacak şekilde hacimlendirilmiştir. Daha sonra liyofilize edilmiştir ve liyofilize edilen örnekler tartılmıştır. Daha sonra ependorflara 0,3 ml çizgisine gelecek şekilde boncuk eklenmiştir ve üzerine 200 ml solüsyon A (kloroform: metanol(1:2)) eklenmiştir. Homojenizatörde 2 tekrar olacak şekilde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler içindeki kısım olan 200 ml eppendorflara aktarılmıştır ve 800 ml ethanol ile boncuklar yıkanmıştır. Toplam hacim 2,5 ml olacak şekilde 1,5 ml solüsyon A eklenmiştir. 3000 xg' de 4° C, 10-15 dk arasında santrifüj edilmiştir ve süpernatantlar yeni tüpe aktarılmıştır. 1,5 ml solüsyon B (kloroform: metanol(1:1)) alınarak pellete yüklenmiş ve 4 dakika 30 rpm rotatorda karıştırılmıştır ve işlem 3 kere tekrar edilmiştir. Süpernatantlar bir falkon tüpü içerisinde birleştirilmiştir. Toplanan süpernatantlar yeni falkonlara filtre kağıdından süzülerek aktarılmıştır. Daha sonra filtre kâğıtları 4 ml Potasyum fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Elde edilen süpernatant ve potasyum fosfat karışımı rotatorda karıştırılmıştır. Daha sonra 3000 xg'de 4° C olacak şekilde 15 dk santrifüj edilmiştir. Faz farkı olan tüplerde üstteki şeffaf olan potasyum tamponu alınarak, altta kalan yeşil kısım (pellet) oda sıcaklığında vakum altında kurutulmuştur.

Transesterifikasyon Aşaması

-20 °C' den alınan kurutulmuş örnekler 1 ml metanolik NaOH ile çözündürülür ve Pyrex tüplerine aktarılır ve sonra 55°C'ye ısıttığımız su banyosunda 15 dakika bırakılır. 15 dk sonra örnekler su banyosundan alınarak üzerlerine 2 ml metanolik HCL eklenmiştir ve 20 saniye vortekslenmiştir. Sonra tekrar 15 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. 15 dk sonra alınmış ve üzerlerine 10 µl nanodekozonoik asit eklenmiştir. Daha sonra 1ml ddH₂O ve 2 ml hekzan eklenmiştir. 5 dk rotatorda döndürülmüştür ve 5 dk sonra üstteki yağlı görünen kısım alınıp yeni falkona aktarılmıştır. Tekrar 2 ml

hekzan eklenmiş ve 5 dk homojen karışım elde etmek için rotatorda karıştırılmıştır. Daha sonra tekrar üstteki yağlı kısım alınır ve havalandırmalı kurutmaya bırakılır. Kurutulan örnekler 100µl (%100) hekzan ile çözdürülerek GC-FID viyallere aktarılmıştır. Ölçüm için cihaza 130°C başlangıç sıcaklık, 240°C' ye kadar her 5°C de 5 dk beklenmesi talimatı işlenmiştir. Ölçüm sonucu elde edilen pikler analiz edilmiş, alan hesaplaması yapılarak belirlenen metil esterlerin yüzdeleri oransal olarak sunulmuştur. Böylelikle GC-FID (Gaz Kromatografi Alev İyonlaşmalı Dedektör) cihazında örneklerin yağ asidi içerik tayini yapılmıştır.

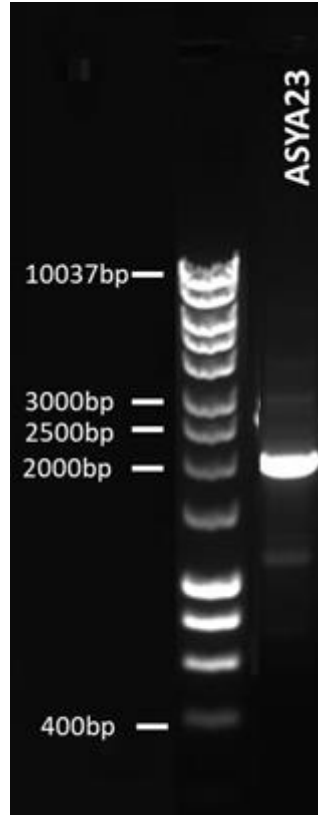


Şekil 11.Trace 1310 gaz kromatografisi (Thermo Scientific) görüntüsü

3. BULGULAR

3.1 *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 Tanımlamasına Ait Bulgular Ve Sonuçlar

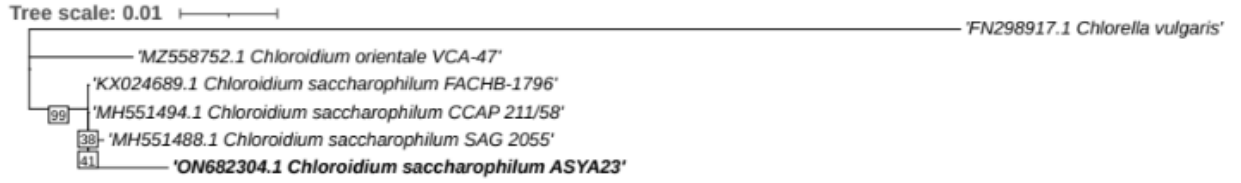
Chloroidium saccharophilum ASYA23 mikroalgi Prof. Dr. Turgay Çakmak tarafından Antarktika'nın Horseshoe adasında (67°49'23.6"S 67°18'20.9"W) deniz kenarındaki kayalıkların üzerinden toplanmıştır. Laboratuvara getirilen örnekler izole edilip saflaştırılarak kültüre alınmıştır. DNA ekstraksiyonu tamamlanan mikroalgin saflığı ve miktarı spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. DNA örneklerinde istenen bölümler PCR ile çoğaltılmıştır ve PCR sonrası elde edilen jel görüntüsü Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 12. *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 mikroalg DNA'sının PCR jel görüntüsü.

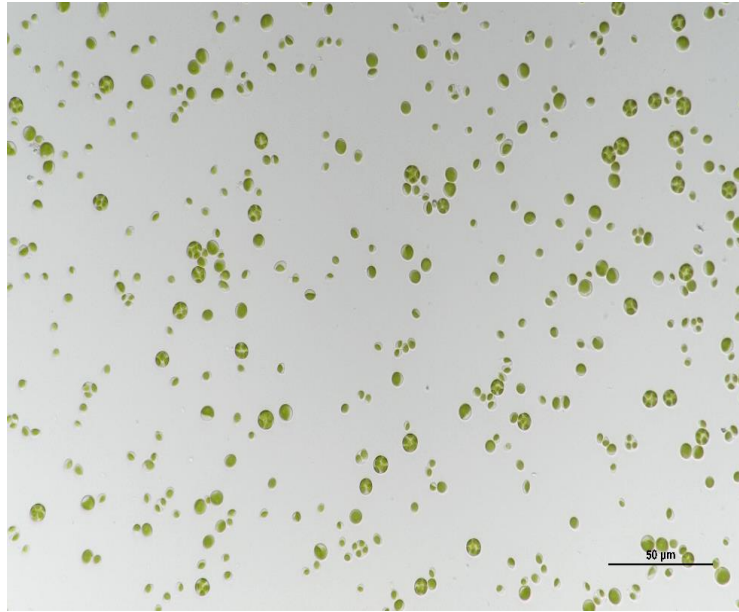
Kültüre alınan mikroalgin 18S rDNA bölgesinden elde edilen SANGER sekans analizi verileri NCBI sisteminde ON682304 erişim numarası ile kaydedilmiştir. Kayıt edilen sekans sonuçları NCBI/BLAST analizi ile en yakın türlerin eşleşen sekans dizileri sistemden alınmış ve FASTA formatında birleştirilmiş, UGENE programı kullanılarak Clustal W algoritması ile hizalanmıştır. Filogenetik ağaç Maksimum Likelihood yöntemi ve 100 Bootstrap tekrarı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 13). Üretilen

filogenetik ağaçların şekilsel olarak düzenlenmesi için ayrıca FigTree (v1.4.4) programı kullanılmıştır. Mikroalglerin aşağıda sunulduğu gibi morfolojik analizleri, filogenetik analiz sonuçları ile örtüşmektedir.



Şekil 13. *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 mikroalginin filogenetik ağacı.

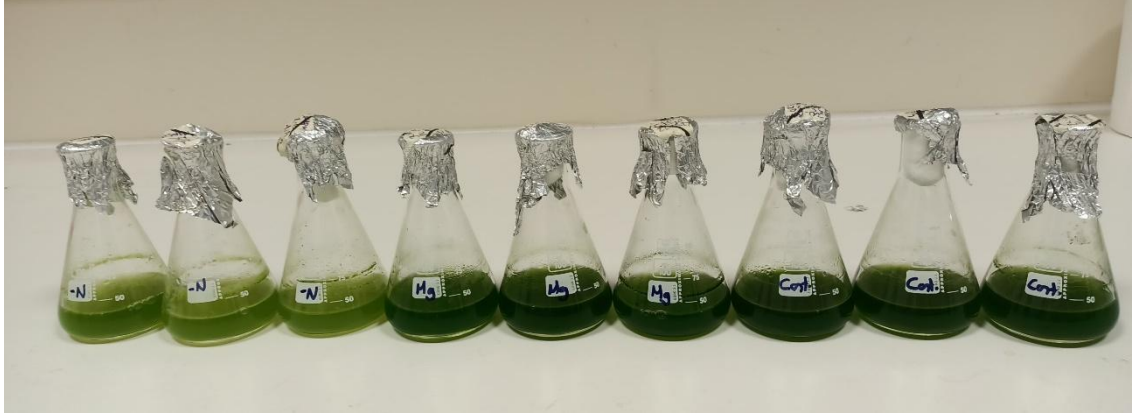
Chloroidium saccharophilum ASYA23'ün morfolojik olarak ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda hücreler elipsoidal ve küresel olabilmektedir. Hücre boyutları $4-10 \times 5-12 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. Kloroplastları tek, büyük, çepere yakın şekilde konumlanmıştır ve hücrenin çoğunu kaplamaktadır. Oval şekilde pirenoid varlığı gözlemlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 hücrelerinin ışık mikroskopisi görüntüsü. Mikroskop büyütmesi 10x40

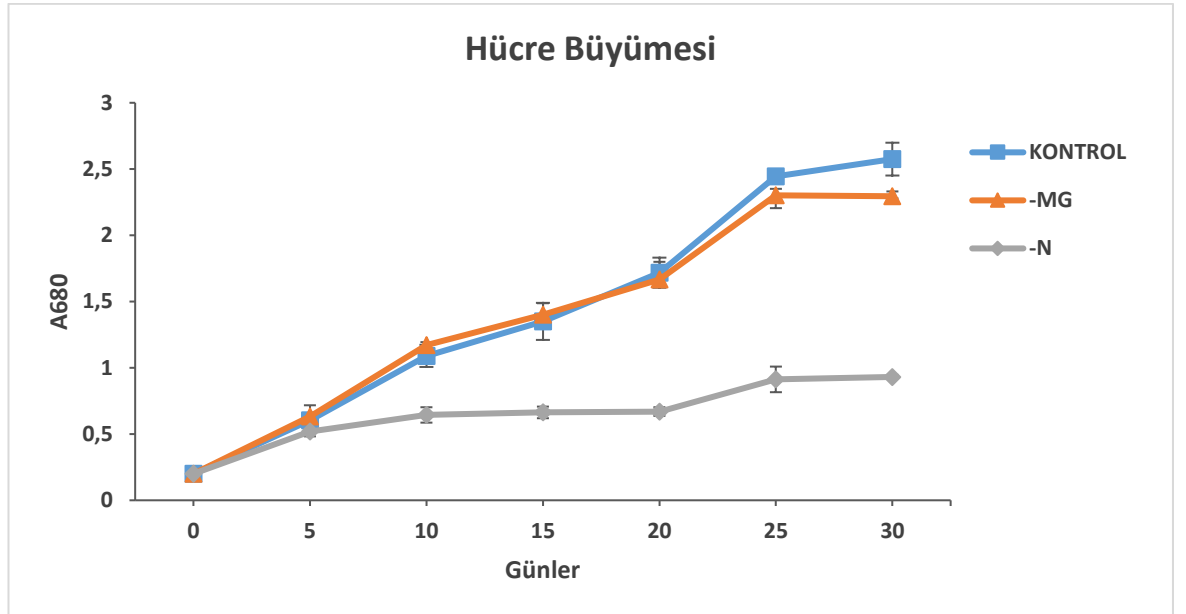
3.2 Mikroalglerin oğalmasında Meydana Gelen Değişimler

Azot ve magnezyum açlığına bırakılan ortamlarda kültüre alınan *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 türünün büyümesini izlemek amacıyla optik yoğunluk belirlenmiştir (şekil 15).



şekil 15. 20.günde çekilmiş mikroalg kültürlerinin görüntüsü

30 gün inkübe edilen örneklerin her 5 günde bir büyüme hızları, 680 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerlerine göre belirlenmiştir. Azot ve magnezyum açlığının mikroalglerin büyümeleri üzerinde önemli etkilerinin olduğu optik yoğunluk ile gözlemlenmiştir (şekil 16).



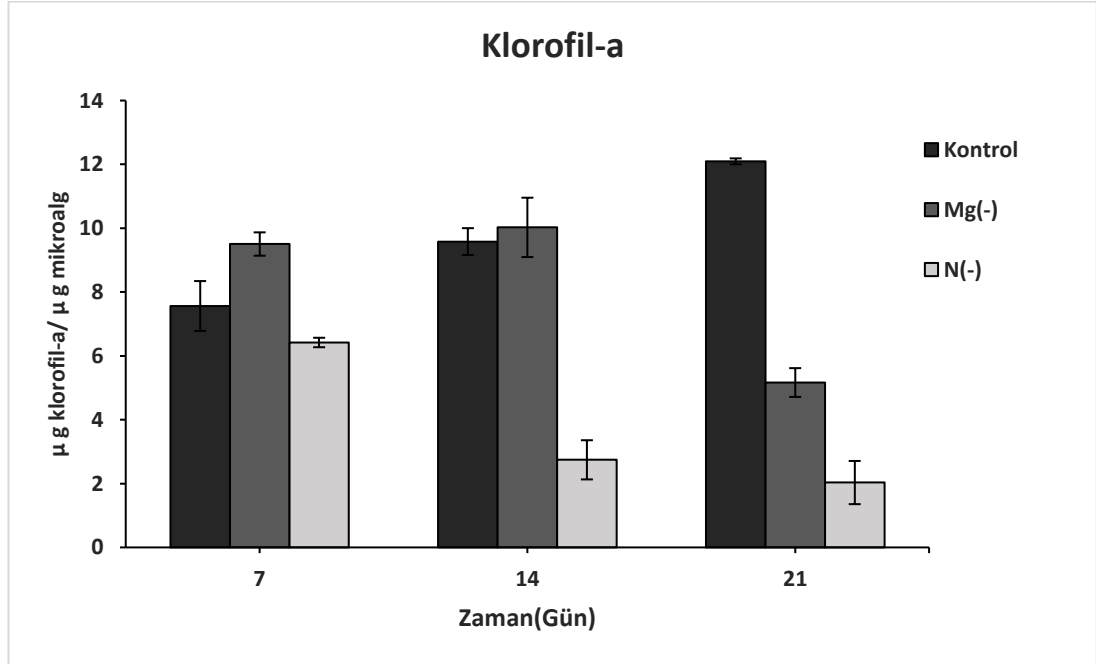
şekil 16. Mikroalglerin büyümeleri üzerine element açlığının etkileri.

Azot mikroalglerin biyokütlesini oluşturan protein, aminoasitler, nükleik asitler ve diğer N içeren bileşiklerin sentezi için gerekli olan temel makro besin kaynağıdır. Azot

açılığına bırakılan *Chloroidium saccharophilum* 5.güne kadar bir üstel eğri göstermiş fakat 5.günden sonra baskılanmış, hatta 20. Günde kontrole oranla yaklaşık olarak %168 oranında baskılanmıştır. 30. Güne kadar baskılanarak lineer evrede devam etmiştir.

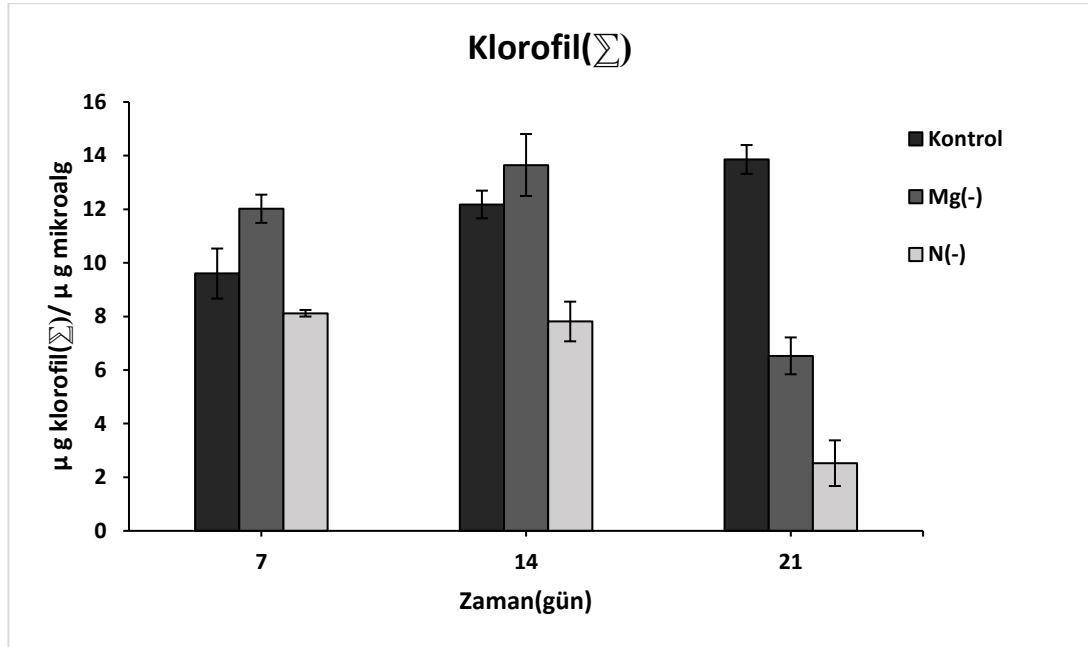
3.3 Mikroalglerin içerdikleri klorofil ve karotenoid miktarlarında meydana gelen değişimler

Şekil 17’de görüldüğü gibi N ve Mg açılığına bırakılan *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 türünün zamana bağlı olarak klorofil-a miktarında farklı yanıtlar oluşmuştur. Azot açılığına bıraktığımız hücrelerin 21. Gün klorofil-a oranı ile 7. gün klorofil-a oranı karşılaştırıldığında %216 oranında önemli bir düşüş gösterdiği kaydedilmiştir. N(-) grubunu kontrol ile kıyaslandığında 14. ve 21.günlerde sırasıyla %249 ve %495 oranında klorofil-a miktarında bir düşüş gözlemlenmiştir. Magnezyum açılığında ise 7 ve 14. gün önemli bir değişiklik olmazken 21.günde kayda değer bir değişim gerçekleşmiştir. Öyle ki 21.günün klorofil-a oranının,7.günkü klorofil-a oranından %84 oranında düşük gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman 7 ve 14. önemli olabilecek bir değişim gözlemlenmezken, 21.günde %134 oranında bir düşüş kaydedildi.



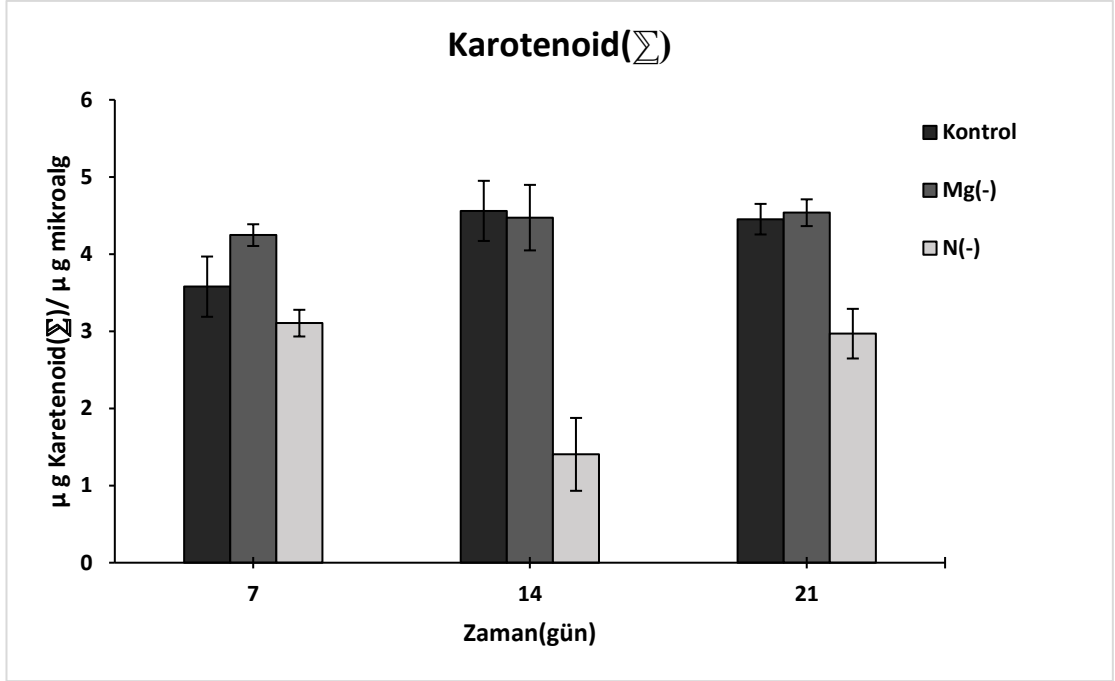
Şekil 17. Kontrol ortamı ve element açılığına bırakılan mikroalglerin içerdikleri klorofil-a miktarında meydana gelen değişimler

Azot ve magnezyum açlığı uyguladığımız mikroalglerin toplam klorofil miktarları gün bazında değişiklik göstermiştir (Şekil 18). Azot açlığına bırakılan mikroalglerde 7. günden itibaren toplam klorofil oranında düşüş gerçekleşmiştir ve en düşük seviye 7.güne oranla 21.günde yaklaşık %222 oranında gözlemlenmiştir. Kontrolle karşılaştırdığımızda 7.günde kayda değer bir değişim görülmezken 14. günde yaklaşık %56 ve 21. günde yaklaşık %449'luk önemli bir düşüş kaydedilmiştir. Magnezyum açlığında ise 7 ve 14. Günlerde önemli bir değişim görülmezken 21. günde 7. Güne oranla %84 oranında önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Kontrolle karşılaştırdığımızda ise 7 ve 14. Günlerde kayda değer bir değişim görülmezken 21.günde toplam klorofil oranında %52'lik bir düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 18. Kontrol ortamı ve element açlığına bırakılan mikroalglerin içerdikleri toplam klorofil miktarında meydana gelen değişimler

Toplam karotenoid içeriği Mg(-) ve N(-) kültürlerde zamana bağlı olarak miktarsal değişimler göstermiştir(Şekil 19). N(-) ortamda zamansal olarak 7.günden itibaren toplam karotenoid oranında değişimler gözlemlenmiştir. 7. günle oranlandığı zaman 14. Günde %121 oranında bir düşüş görülmüş fakat 21.günde bu oran %5 gerilemiştir. N(-) grubu kontrolle kıyasladığımızda 7.günde önemli bir değişim görülmezken, 14.günde yaklaşık %225 oranında bir düşüş görülmüştür ve 21.günde ise yaklaşık %50 oranında bir düşüş gerçekleşmiştir. Mg(-) ortamda kültürü yapılan mikroalglerde toplam karotenoid oranında önemli görülebilecek bir değişim gözlemlenmemiştir.

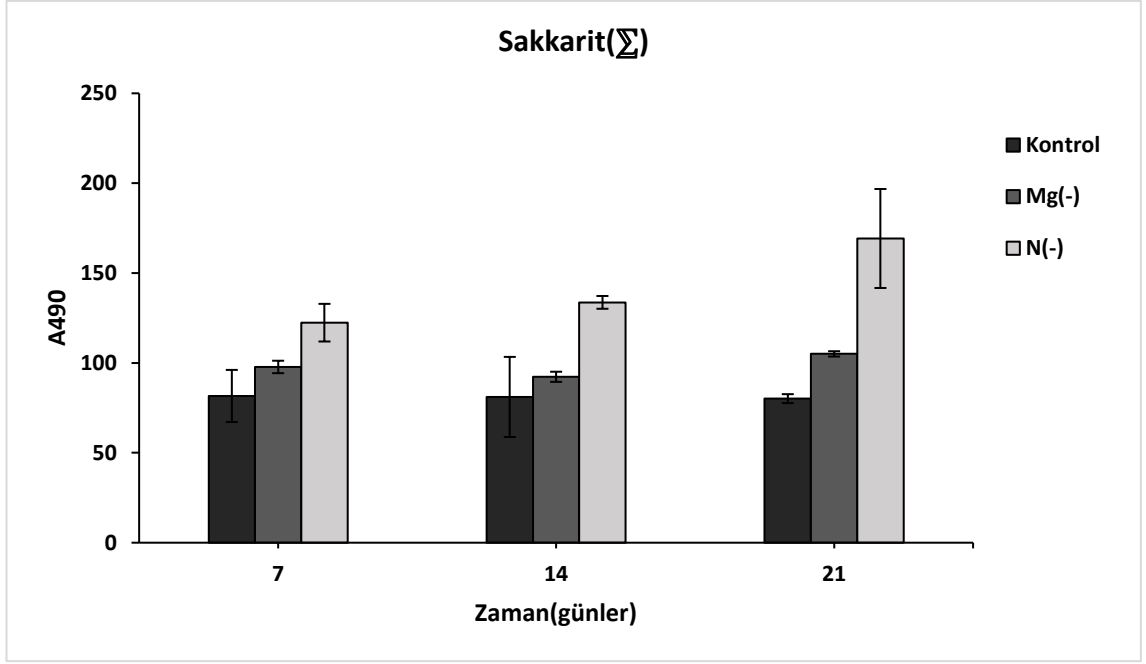


Şekil 19. Kontrol ortamı ve element açlığına bırakılan mikroalglerin içerdikleri toplam karotenoid miktarında meydana gelen değişimler

3. Mikroalglerin toplam sakkarit içeriklerinde meydana gelen değişiklikler

Azot açlığı, magnezyum açlığı ve kontrol grubu olarak oluşturulan deney düzeneğinde, hücrelerin 7, 14 ve 21. Günlerdeki sakkarit içerikleri analiz edildi ve Şekil 20’de görülen sonuçlar elde edildi. Farklı günlerde ölçülen sonuçlara bakıldığında Mg (-) ve kontrol gruplarında önemli bir değişim görülmezken, N(-) grup için 21. Günde 7. Güne kıyasla %38 oranında bir artış olduğu görülmektedir.

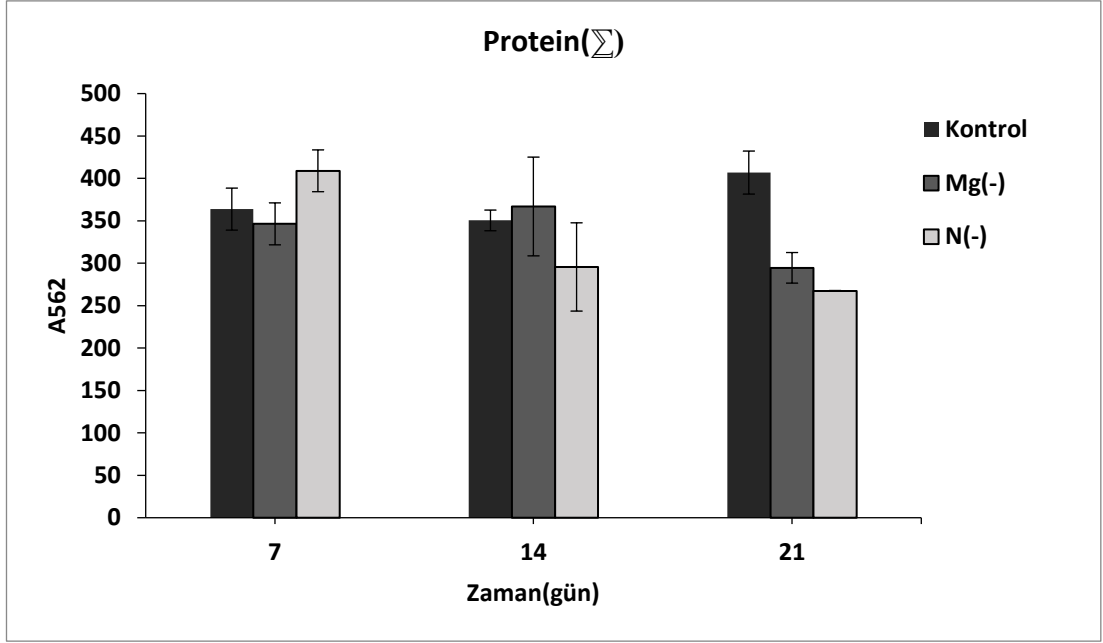
Farklı günlerdeki sonuçlar gün bazında değerlendirildiğinde sakkarit içeriğinin Mg(-) grubun sakkarit içeriği kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir fark görülmezken, N (-) grubun sonuçları kontrol grubuna göre artış göstermektedir.



Şekil 20. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin içerdikleri toplam sakkarit miktarında meydana gelen değişimler

3.5 Mikroalglerin protein içeriklerinde meydana gelen değişimler

Protein analizi için kontrol, Mg açlığı ve N açlığı olmak üzere üç ayrı deney grubu oluşturuldu ve üç ayrı zamanda protein içeriğinin ölçümü gerçekleştirildi ve Şekil 21'deki sonuçlar elde edildi. Sonuçlar analiz edildiğinde 7. ve 14. günlerde önemli bir fark görülmezken, 21. günde ki protein içerikleri kontrol grubu ile kıyaslandığında Mg(-) ve N(-) gruplarını sırasıyla % 38 ve %52 oranında azaldığı görülmektedir.



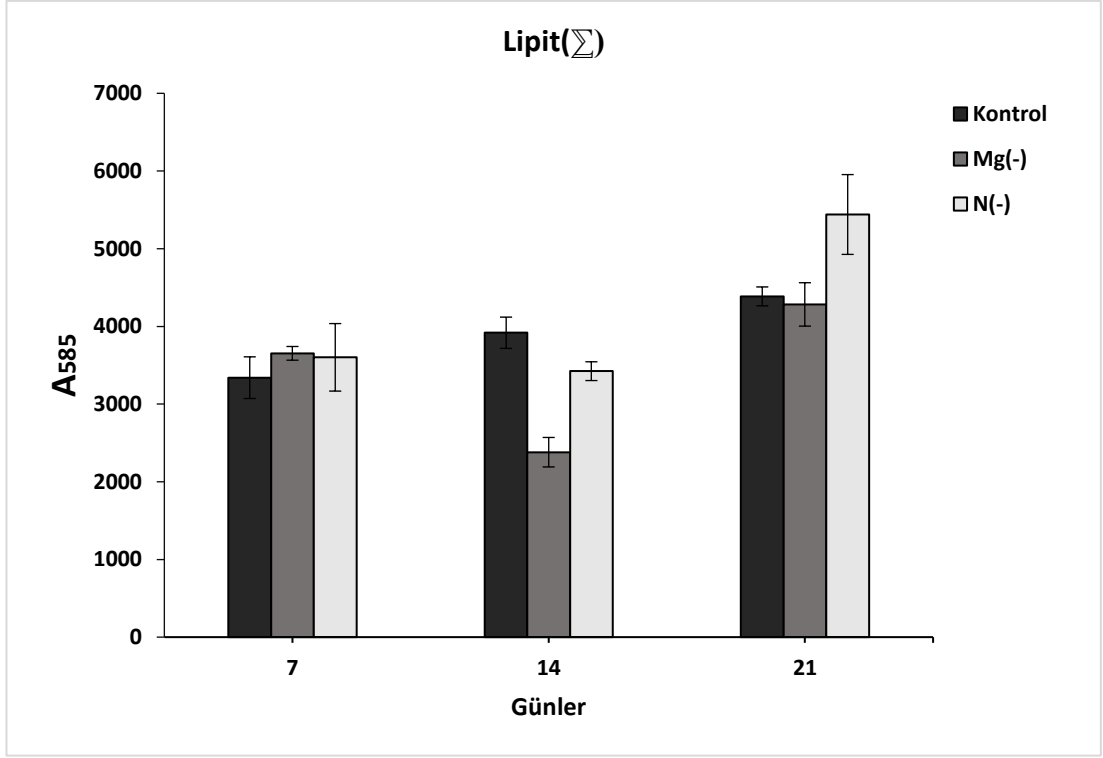
Şekil 21. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin protein içeriklerinde meydana gelen değişimler

3.6 Mikroalglerin nötral lipid içeriğinde meydana gelen değişimler

Stres koşulları altında mikroalglerin yaşamlarını devam ettirebilmesi için depo lipidleri olan nötral lipidleri biriktirdikleri bilinmektedir.

Mg(-) ve N(-) kültür ortamlarından örneklenen mikroalglerde zamana bağlı olarak nötral lipid oranlarında değişimler gözlemlenmiştir(Şekil 22). Mg(-) kültür ortamındaki mikroalglerde nötral lipid oranı zamansal olarak değişimler göstermiştir. 7. günde nötral lipid oranında bir değişim gözlemlenmezken, 7.güne oranla 14.günde %53 oranında bir düşüş yaşanmıştır fakat 21.günde %17 oranında bir artış görülmüştür. Kontrolle kıyasladığımız zaman ise sadece 14.günde %65 oranında önemli bir düşüş görülmüştür.

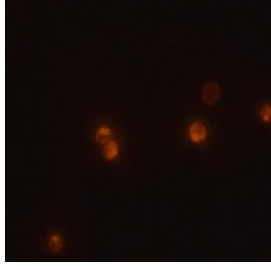
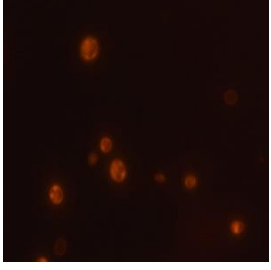
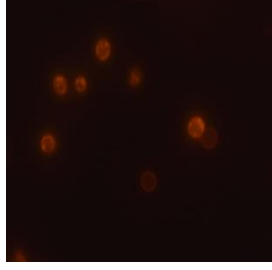
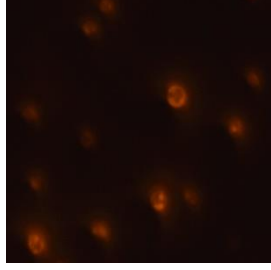
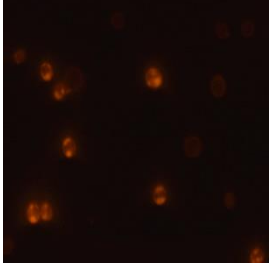
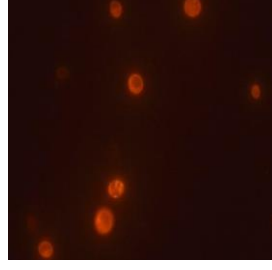
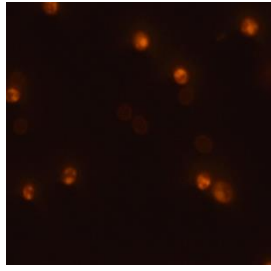
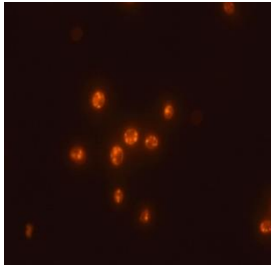
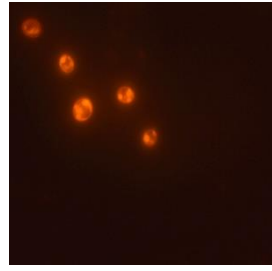
N(-) ortamda zamansal olarak 7. ve 14. günlerde önemli değişim görülmez iken 21.günde 7.güne oranla %51 oranında bir artış görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda 7. ve 14. günlerde önemli bir değişim görülmezken 21.günde %24 oranında bir artış gözlemlenmiştir.



Şekil 22. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin toplam nötral lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler

Çektiğimiz görüntülerde de nötral lipitler zamana bağlı olarak artış göstermiş ve N açlığına bağlı olarak daha fazla oranda nötral lipit biriktiği ortaya çıkmıştır. Bir sıralama yapılırsa nötral lipit oranında en çok N(-) ortamda, daha sonra Mg(-) ortamda ve en az kontrol grubu olarak nötral lipit birikimi gerçekleşmiştir(Tablo 4).

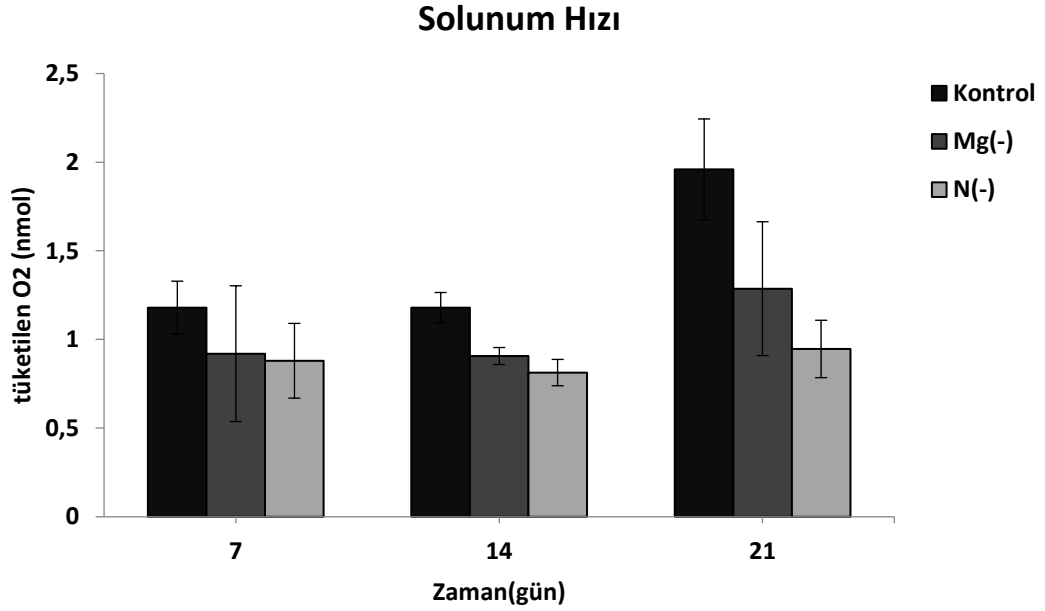
Tablo 4. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 hücrelerinin ZEISS Axio Imager 2 floresans mikroskopisi. Mikroskop büyütmesi 10x100 Nötral lipid cisimleri nil kırmızısı ile kırmızı renkte görüntülenmiştir

	7.gün	14.gün	21.gün
Kontrol			
Mg (-)			
N (-)			

3.7 Oksijen Evolusyonu

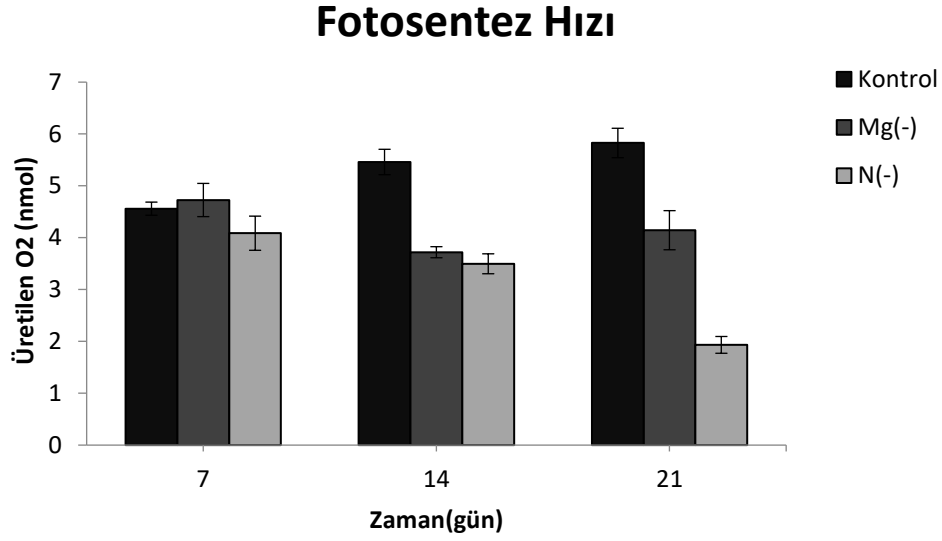
Chloroidium saccharophilum ASYA23 türünün günlere göre solunum hızına bakıldığında kontrol grubunun zaman içerisinde hücre sayısının artışına bağlı olarak, solunum hızında bir yükseliş görülmüş bu yükseliş 21.gün, 7.gün ile kıyaslandığında %66 oranında artmıştır. Mg (-) ortamda ise 7 ve 14. günler önemli bir değişiklik olmamış, fakat 21.gün 7. güne kıyasla %39,9oranında artış yaşanmıştır. N(-) ortamda ise günler arasında önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir. Grupları kendi aralarında kıyaslarsak N(-) ve Mg(-) ortamlarda yetişen hücrelerin kontrole oranla zamana bağlı olarak solunum hızında düşüş yaşanmıştır. Özellikle 21.günde bu oran şu şekilde göze çarpmaktadır; N(-) ortamda kontrole kıyasla %107,0 oranında düşük bir solunum hızı

gözlemlenmişken, Mg(-) ortamda ise %52 oranında bir solunum hızı düşüklüğü görülmüştür (Şekil 23).



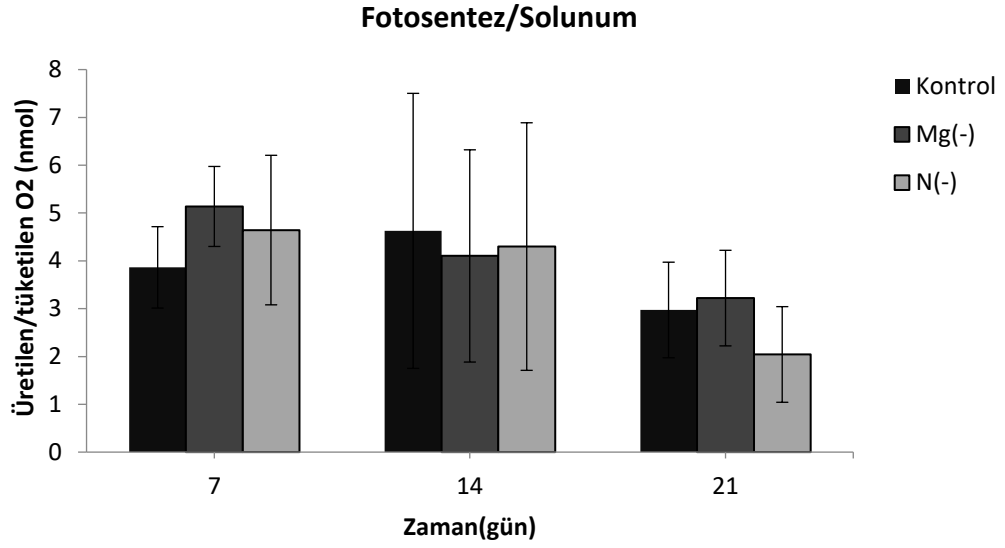
Şekil 23. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin solunum hızında meydana gelen değişiklikler

Chloroidium saccharophilum ASYA23 türü içerdiği klorofiller sayesinde fotosentez yapabilmektedirler. Uygulanan Mg(-) ve N(-) ortamlara hücreler, fotosentez bakımından farklı cevaplar vermişlerdir. Günlere göre kontrol grubunda fotosentez hızında bir yükseliş görülmüştür (Şekil 24). 7.günde üretilen oksijen miktarı 4,56 nmol iken, 21. günde %27,78 oranında yükselip 5,82 nmol'e ulaşmıştır. N(-) ortamda kültüre edilmiş grupta ise 7. gün ve 21. günü kıyasladığımızda ise %111,3 oranında önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Mg(-) ortamdaki grupta ise 7.güne oranla diğer günlerde bir düşüş görülmüştür. Kültür ortamlarını kendi aralarında kıyasladığımızda 7. Günde önemli bir değişiklik gözlemlenmez iken 14.gün ve 21.günde fotosentez hızında kontrole oranla önemli düşüşler gözlemlenmiştir. Özellikle 21.günde kontrol ile kıyaslandığında N(-) ortamda %201,2 ve Mg(-) ortamda ise %40,6 oranında düşüş görülmüştür.



Şekil 24. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin fotosentez hızında meydana gelen değişiklikler

Şekil 25’da gösterildiği gibi *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 türünün fotosentez/solunum oranlarına bakıldığında, zamanla düşüşler gözlemlenmiştir. Zamana bağlı olarak kontrol grubunda 7.güne oranla 14.günde bir yükseliş görülmüş fakat 21.günde %30 oranında bir düşüş görülmüştür. M(-) ortamda 7. güne oranla 14.günde %25,2 ve 21.günde %59,5 oranında bir düşüş gerçekleşmiştir. N(-) ortamda ise 7.güne kıyasla 14.günde önemli bir düşüş görülmezken 21.günde %127,4 oranında önemli bir düşüş görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda ise 7 ve 14. günlerde önemli bir değişiklik görülmezken 21. günde N(-) ortamda %45,6 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. N(-) kültürde üretilen/tüketilen oksijen miktarının 21. günde azaldığı görülmektedir.

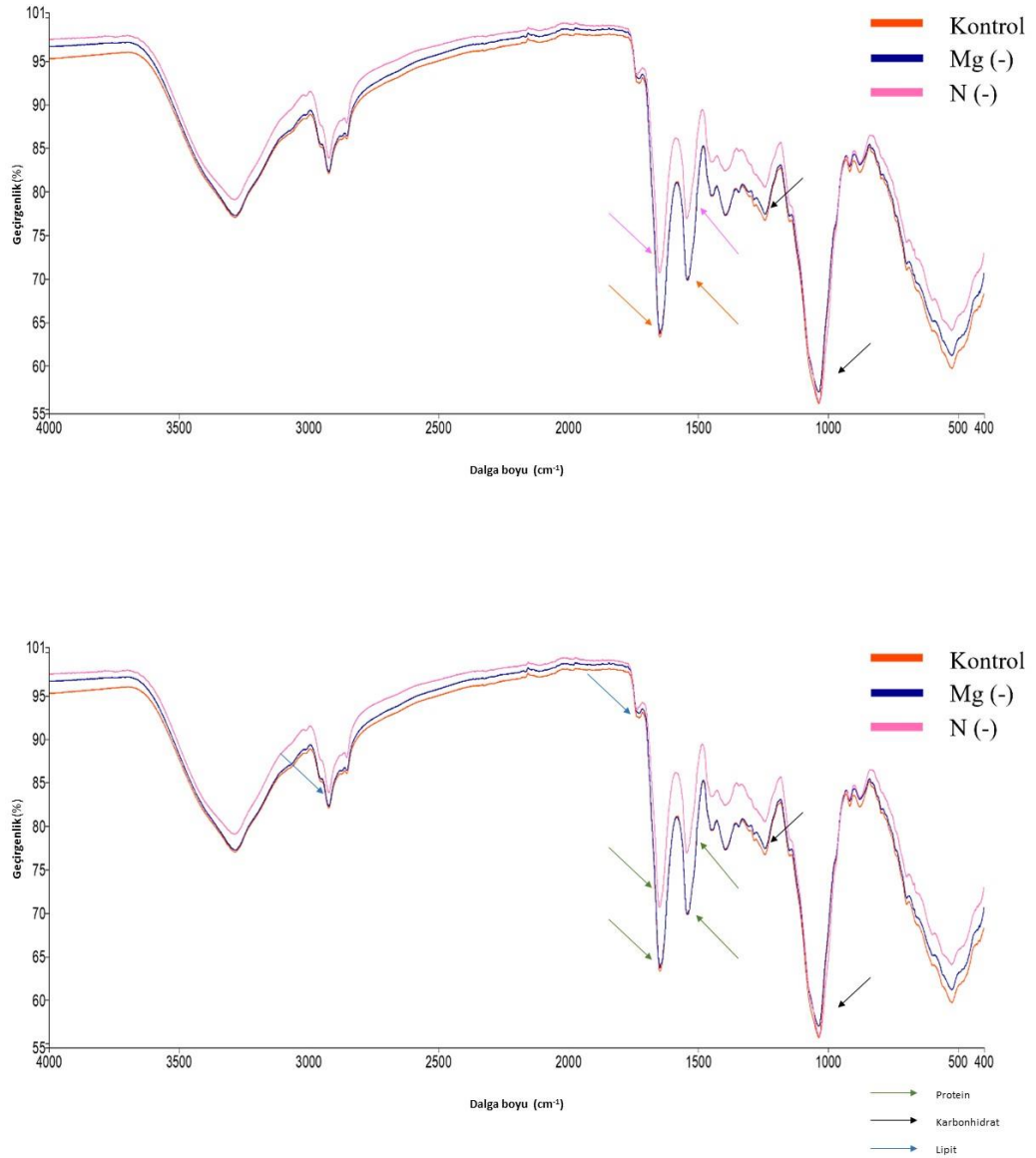


Şekil 25. Kontrol ortamı ve element açlığına cevapta mikroalglerin fotosentez/solunum hızında meydana gelen değişiklikler

3.8 FT-IR analiz sonuçları

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, biyokütledeki moleküllerin profilini inceleyerek makromoleküllerin ön tarama yapılmasına olanak tanımaktadır (Şekil 26). FTIR temelde moleküller arasındaki bağların, kızılötesi ışınları absorblama oranlarının yansımalarıdır ve moleküller arasındaki farklı bağların titreşim frekansları çeşitlilik göstermektedir. Moleküller arasındaki bağların frekanslarındaki bu farklılardan dolayı her bir molekül 4000-400 cm^{-1} spektrum aralığında farklı pikler göstermektedir. FTIR yöntemi tekstil, kozmetik, ilaç gibi birçok farklı alanda kullanılmasının yanı sıra mikroalglerin makromoleküler profillerinin analiz edilmesinde etkili ve önemli bir analiz olarak görülmektedir (Jiang ve ark., 2012). Mikroalglerin genel makromoleküler profillerinin FTIR yöntemi ile analizi diğer kimyasallar kullanılarak uygulanan yöntemlerden daha basittir bu yüzden hem insan gücü hem de maliyet kıyaslaması yapıldığında FTIR daha avantajlı bir yöntem olarak görülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile FTIR analizinin mikroalg karakterizasyonu için uygulanması gereken ilk analiz olduğu düşünülmektedir. Ancak şu anki kullanım potansiyelinin, genellikle kimyasal yöntemlerle elde edilen sonuçları doğrulayıcı nitelikte olduğu görülmektedir (Jebsen ve ark.,2012). Mikroalgler karbonhidrat, lipit, protein ve pigment içerikleri ile öne çıkmaktadırlar ve daha önceden yapılan çalışmalar sonucunda bu içerikler hakkında bilgi sağlayabilecek

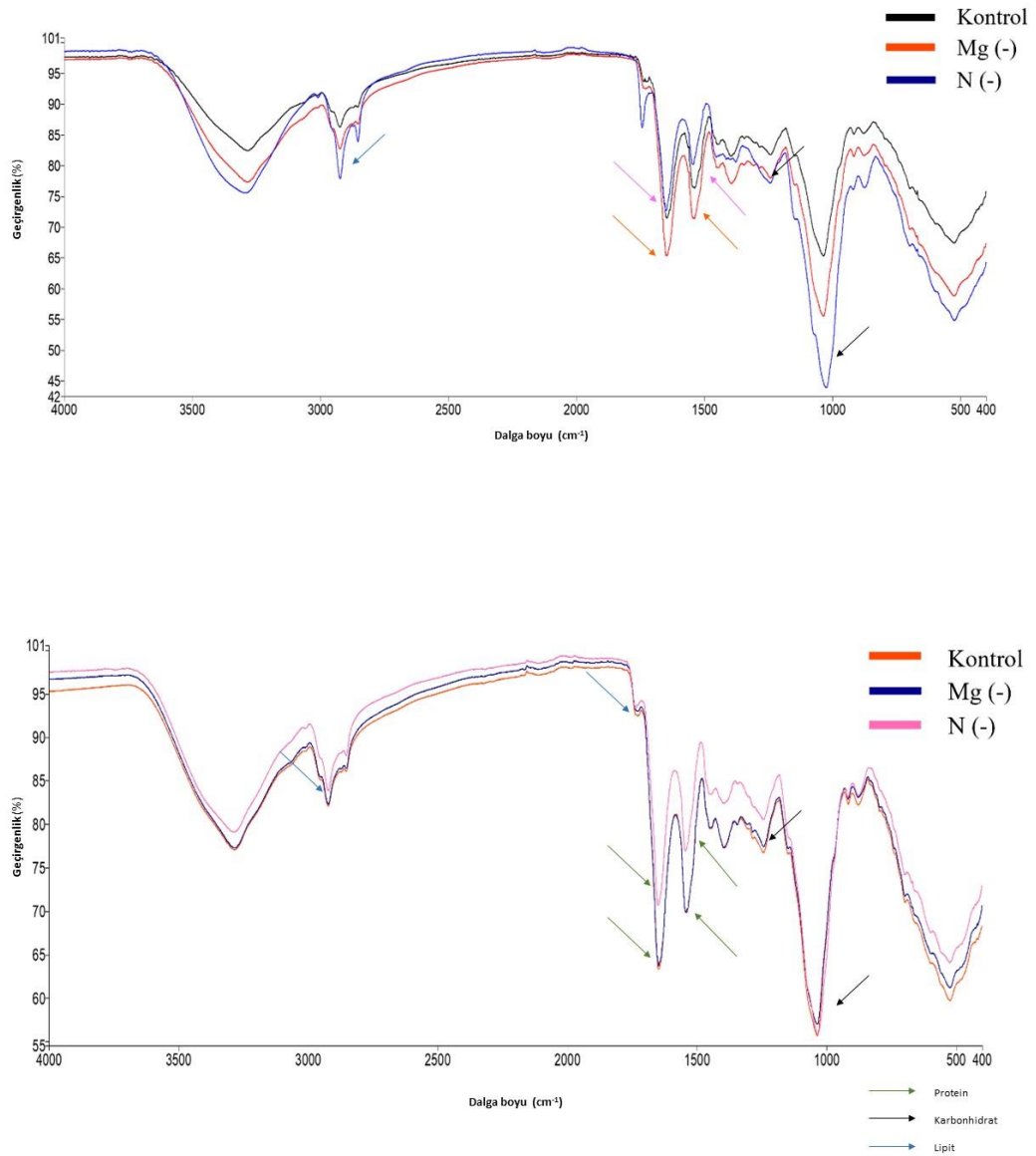
bazı temel spektrum pikleri belirlenmiştir. Bu piklerin çoğunun, mikroalgin FTIR sonucunda ortak olarak görüldüğü belirlenmiştir. Karbonhidrat içeriği hakkında bilgi almak istendiğinde $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ spektrum aralığı değerlendirilirken, lipit içeriği hakkında bilgi almak için $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ ve 1740 cm^{-1} spektrum değerleri incelenmektedir. $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ spektrum aralığındaki pikler metilen gruplarının varlığından dolayı oluşurken, 1740 cm^{-1} spektrum değerindeki pikler C=O bağının titreşim frekansından dolayı görülmektedir. 1645 cm^{-1} ve 1545 cm^{-1} spektrum değerlerindeki pikler sırasıyla Amit I ve Amit II pikleri olarak bilinmekte ve protein içeriği hakkında bilgi vermektedir. Amit I spektrum piki C=O molekülündeki bağının simetrik gerilme enerjisi sonucu oluşurken, Amit II spektrum piki N-H ve C-H moleküllerinde bağların simetrik gerilme enerjisinden dolayı oluşmaktadır (Meng ve ark., 2014; Miglio ve ark., 2013).



Şekil 26. Kontrol ortamı ve element açlığına maruz bırakılan mikroalglerden elde edilen 7. gün FTIR verileri

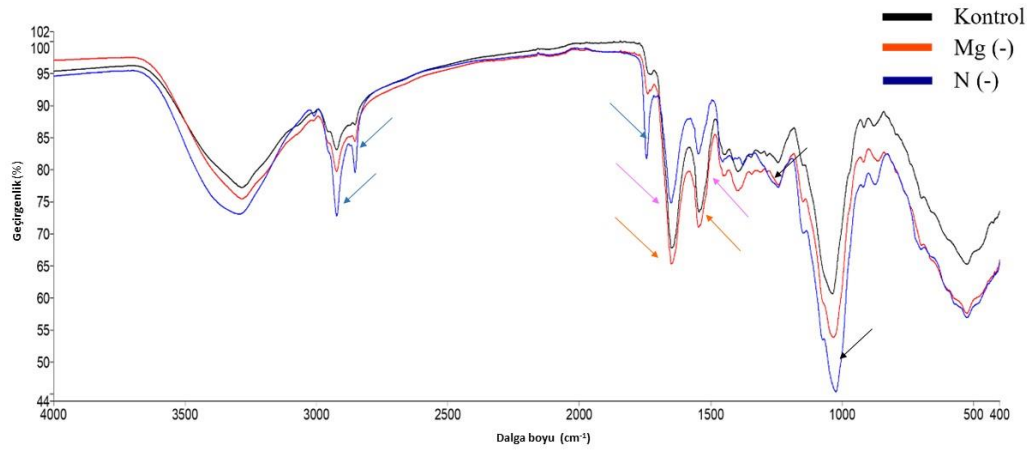
Şekil 26'deki spektrum sonucu, kontrol, Mg (-) ve N (-) ortamlardan 7. günde hasat edilen örneklerin FTIR sonucunu göstermektedir. Genel olarak bakıldığında çıkan spektrum piklerinin üç grupta da benzer olduğu görülmektedir. FTIR spektrum sonuçları incelendiğinde ve kimyasal yöntemlerle yapılan analizlerin sonuçları ile kıyaslandığında, kimyasal analiz sonuçlarını doğrulayan sonuçlar verdiği görülmektedir. Sakkarit içeriği hakkında bilgi veren 1140 cm^{-1} ve 1050 cm^{-1} spektrum

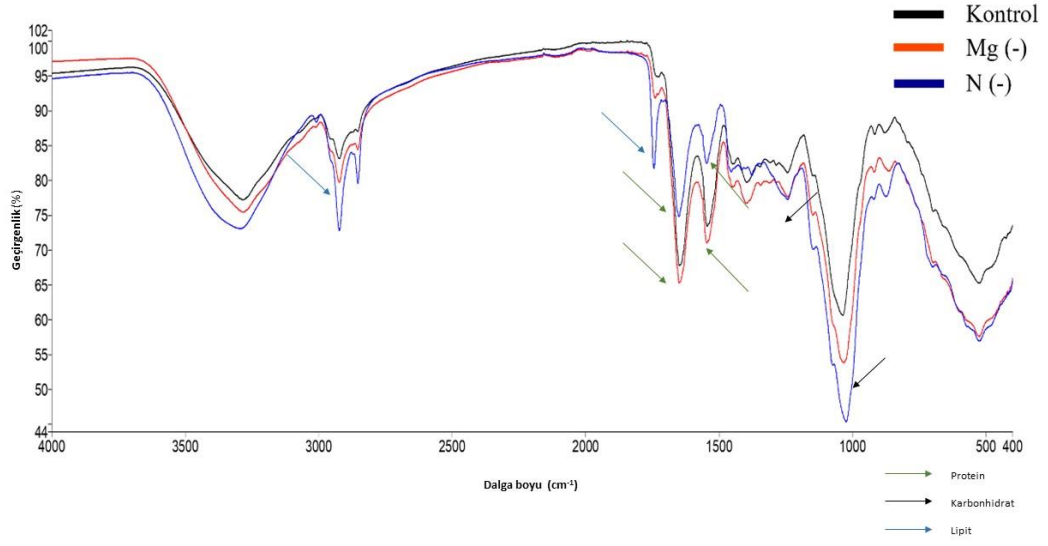
değerlerindeki sonuçlara göre üç deneysel grup arasında önemli bir fark görülmemektedir ve bu sonuç sakkarit analizi sonucu ile uyumlu olarak bulunmuştur. Lipit içeriğinin anlaşılabilmesi amacı ile 2900, 2850 ve 1740 cm^{-1} dalga boylarında ki pikler incelendiğinde önemli bir fark görülmemiştir. 1645 cm^{-1} ve 1545 cm^{-1} spektrum değerleri protein içeriği hakkında bilgi vermektedir ve N (-) grubu örneklerinin protein içeriğinin Mg (-) ve kontrol gruplarına göre azalmış olması beklenmektedir.



Şekil 27. Kontrol ortamı, ve element açlığına maruz bırakılan mikroalglerden elde edilen 14. gün FTIR verileri

14. gün örneklerinin FTIR sonuçları incelendiğinde (Şekil 27) N (-) grubu örneklerinde sakkarit içeriği Mg (-) ve kontrol grubu örneklerine göre daha fazla olduğu görülmektedir ve bu sonuçların kimyasal analiz sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir. Lipit içeriğini değerlendirmek için 2924 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} ve 1740 cm^{-1} spektrum değerlerindeki pikler incelenmiştir. Lipit içeriği bakımından üç deney grubu arasında çok fark görülmesede N (-) grupta, kontrol ve Mg (-) gruplarına göre biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. Sakkarit içeriği hakkında bilgi almak için $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ spektrum aralığındaki pikler incelenmiştir ve N (-), Mg (-) gruplarının sakkarit içeriğinin kontrol grubuna kıyasla daha fazla olması beklenmektedir.





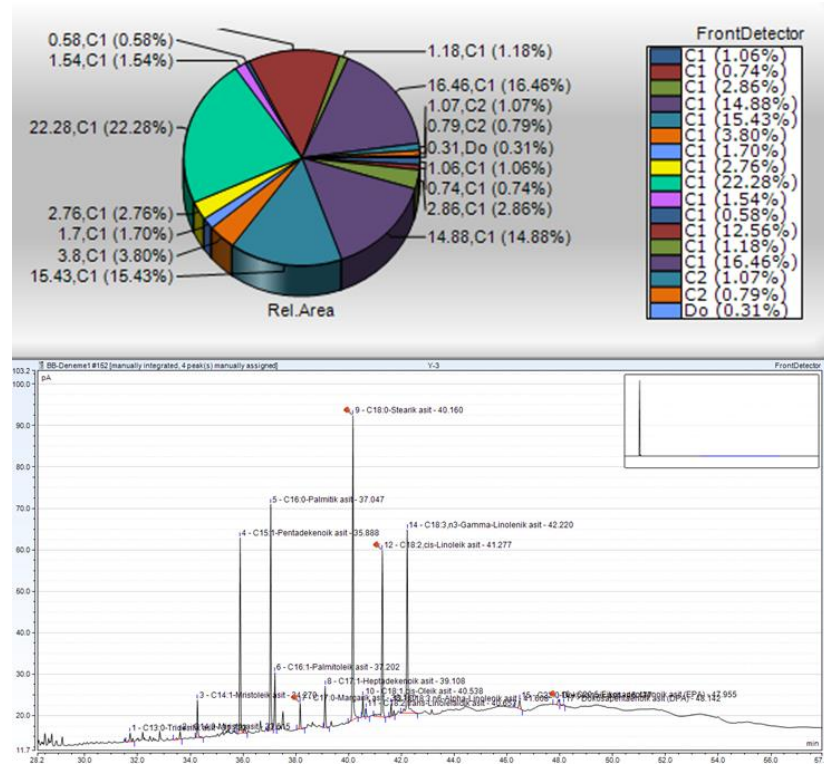
Şekil 28. Kontrol ortamı, ve element açlığına maruz bırakılan mikroalglerden elde edilen 21. gün FTIR verileri

Üç deneysel grup için 21. gündeki örneklerin FTIR sonuçları şekil 28’da’te görülmektedir ve spektrum sonuçlarına bakıldığında 1050 cm^{-1} spektrum değerindeki sakkarit içeriği hakkında bilgi veren pike bakıldığında N (-) grubun sakkarit içeriğinin daha fazla olması bekleniyor ve bu durum kimyasal analiz sonuçları ile kıyaslandığında sakkarit içeriğinin fazla olduğu doğrulanmaktadır. 1645 cm^{-1} ve 1545 cm^{-1} spektrum değerlerindeki pikler protein içeriği hakkında bilgi vermektedir ve spektrum sonuçları incelendiğinde N (-) grubu örneklerinde protein içeriğinin daha az olması beklenmektedir ve kimyasal analizden elde edilen sonuçlar da bunu doğrulamaktadır. Lipit içeriği için 2924 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} ve 1744 cm^{-1} spektrum değerlerindeki pikler incelenmektedir ve spektrum sonuçlarına göre N (-) grubunda lipit içeriğinin daha fazla olması beklenmektedir. N (-) grubunun sakkarit içeriğinin değerlendirilmesi için 1050 cm^{-1} spektrum değeri incelenmiştir ve sakkarit içeriğinin kontrol ve Mg (-) gruplarına göre fazla olduğu belirlenmiştir.

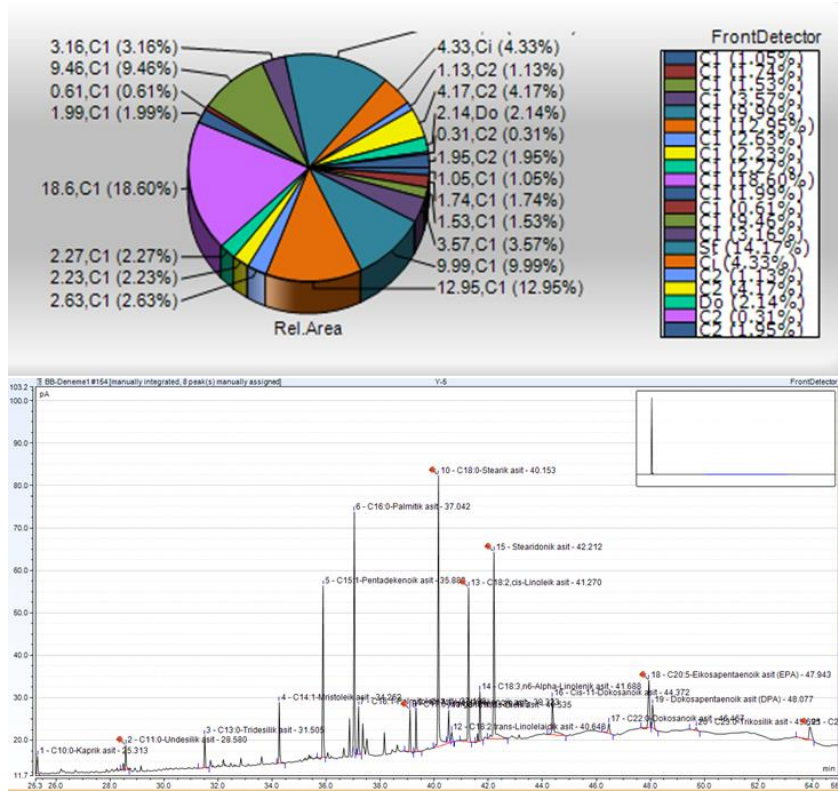
3.9 Büyüme ortamındaki element manipülasyonunun mikroalglerin içerdikleri yağ asidi metil ester (FAMES) profillerinde sebep olduğu değişimler

Azot ve magnezyum eksik olan besiyerlerinde kültüre edilen migroalglerin yağ asitlerindeki değişimlerini belirlemek için kültürün 21.gününde alınan örnekler Gaz Kromatografi Alev İyonlaşmalı Dedektör (GC-FID) cihazı ile incelenmiştir. Sonuçları

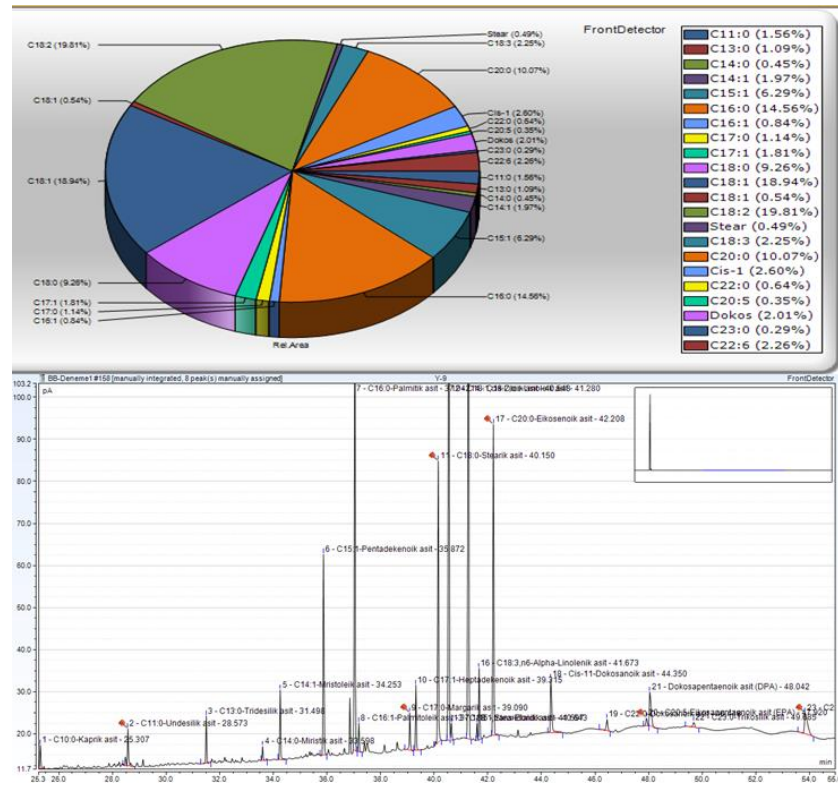
gösteren diagram ve grafikler; Kontrol grubu için Şekil 29'da, Mg (-) için Şekil 30'de ve N (-) için Şekil 31'de verilmiştir.



Şekil 29. Kontrol grubu mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen yüzdelik değişimler



Şekil 30. Mg (-)ortama cevapta mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen yüzdelik değişimler.



Şekil 31. N (-) ortama cevapta mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen yüzdelik değişimler.

Tekrarlı çalışmalar ile GC-FID cihazından alınan sonuçlara göre (Şekil 29, Şekil 30, Şekil 31); Azot ve magnezyum açlığına bırakılan *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 türüne ait ortalama yağ asidi profili Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Mikroalglerin FAMES içeriklerinde meydana gelen yüzdesel değişimler.

Yağ asidi(%)	KONTROL	Mg(-)	N(-)
C10:0-Kaprik asit	0,0	1,1	0,7
C11:0-Undesilik asit	0,0	2,6	1,5
C13:0-Tridesilik asit	2,0	2,2	1,1
C14:0-Miristik asit	0,4	0,1	0,5
C17:0-Margarik asit	1,2	2,1	1,2
C18:0-Stearik asit	22,7	16,2	9,5
C16:0-Palmitik asit	13,5	10,7	14,3
C20:0-Eikosenoik asit	4,2	0,0	0,0
C23:0-Trikosilik asit	0,1	0,4	0,3
C22:0-Dokosanoik asit	3,3	1,9	0,6
C14:1-Mristoleik asit	3,9	4,3	1,9
C15:1-Pentadekenoik asit	8,8	8,1	6,8
C16:1-Palmitoleik asit	2,9	2,5	0,9
C17:1-Heptadekenoik asit	3,2	2,4	1,6
C18:1,cis-Oleik asit	0,6	1,2	18,1
C20:1,Cis-11- Eikosenoik asit	1,8	4,9	2,7
C18:1,trans-Elaidik asit	1,3	1,6	0,6
C18:2,trans-Linolelaidik asit	0,5	0,4	0,0
C18:2,cis-Linoleik asit	9,0	9,1	19,9
C18:3,n6-Alpha-Linolenik asit	3,7	3,4	0,4
C18:4n3-Stearidonik asit	0,0	6,0	2,1
C18:3,n3-Gamma-Linolenik asit	8,7	8,1	10,9
Cis-11-Dokosanoik asit	0,1	0,0	0,0
C20:2,Cis-11,14- Eikosenoik asit	2,0	0,0	0,0
C20:5-Eikosapentaenoik asit (EPA)	0,9	3,4	0,3
22:5n3-Dokosapentaenoik asit (DPA)	2,5	3,8	1,9
C22:6-Dokosahekseonik asit (DHA)	2,7	3,6	1,3

Doymuş yağ asitlerinin (SFA) yüzdesel oranlarına baktığımızda (Tablo 5) C10:0 (kaprik asit) kontrol grubu mikroalglerde görülmezken Mg(-) ve N(-) ortamlarda kültüre alınan mikroalglerdesırasıyla 1,1 ve 0,7 oranında ortaya çıkmıştır ve yine aynı

şekilde C11:0 (undesilik asit) kontrol grubunda görülmezken Mg(-) ve N(-) ortamlarda kültüre alınan mikroalglerde sırasıyla 2,6 ve 1,5 oranında görülmüştür. C13:0 (tridesilik asit) hem kontrol grubunda hem de Mg(-) ve N(-) ortamlarda yetişen mikroalglerde görülmüş, sırasıyla 2,0 , 2,2 ve 1,5 oranlarında değerler kaydedilmiştir. C14:0 (miristik asit) kontrol grubunda 0,4 ve N(-) grupta 0,5 oranındayken, Mg(-) grupta 0,1 olarak bir düşüş kaydedilmiştir. C17:0(margarik asit) kontrol grubunda yüzdesel olarak 1,2 ve N(-) grupta 1,2 iken Mg(-) grupta 2,1 oranında yükseldiği gözlemlenmiştir. C18:0(stearik asit) kontrol grubunda 22,7 iken Mg(-) grupta 16,2 ve N(-) grupta 9,5 şeklinde bir gerileme kaydedilmiştir. Yağ asidi sonuçlarımızda yüzdesel olarak, kontrolde ve Mg(-) ortama cevapta mikroalglerde en yüksek yağ asidi, stearik asit olarak analiz edilmiştir. C16:0 (palmitik asit) kontrol grubunda 13,5 ve N(-) grupta 14,3 iken Mg(-) grupta 10,7 oranında bir düşüş görülmüştür. C20:0(eikosenoik asit) kontrol grubunda 4,2 oranındayken Mg(-) ve N(-) gruplarda görülmemiştir. C22:0(dokosanoik asit) kontrol grubunda 3,3 iken Mg(-) grupta 1,9 ve N(-) grupta 0,6 oranında bir düşüş görülmüştür. C23:0(trikosilik asit) kontrol grubunda 0,1 iken Mg(-) grupta 0,4 ve N(-) grupta 0,3 oranında bir yükseliş görülmüştür. Toplam doymuş yağ asitleri(SFA) oranına bakıldığında zaman da kontrol grubuna kıyasla Mg(-) grupta %37 oranında, N(-) grupta ise %29,7 oranında düşük çıkmıştır(Tablo 6.)

Tablo 6. Kontrol ortamı ve ortam element açlığına cevapta mikroalglerin içerdikleri doymuş (SFA), tekli doymamış (MUFA) ve çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) oranlarında meydana gelen değişimler

Yağ asidi(%)	KONTROL	Mg(-)	N(-)
Σ SFA	47,3	37,2	29,7
Σ MUFA	22,6	24,9	32,6
Σ PUFA	30,1	37,8	36,8
Doymamışlık Derecesi (DU)	82,8	100,6	106,2

Tekli doymamış yağ asitlerinin (MUFA) yüzdelik olarak içeriklerine baktığımız zaman (Tablo 5); C14:1(Mristoleik asit) kontrol grubunda 3,9 ve Mg(-) grupta 4,3 iken N(-) grupta 1,9'luk bir düşüş analiz edilmiştir. C15:1(Pentadekanoik asit) kontrolde ve

Mg(-) grupta en yüksek oranda çıkan tekli doymamış yağ asididir ve kontrol grubunda 8,8 ve Mg(-)'grupta 8,1 iken N(-) grupta oranında hafif bir düşüş görülmüştür ve 6,8'e gerilemiştir. C16:1(Palmitoleik asit) kontrolde 2,9 iken Mg(-) grupta 2,5 ve N(-) grupta 0,9 olarak analiz edilmiştir. C17:1(Heptadekanoik asit) kontrol grubunda 3,2 iken Mg(-) grupta 2,9 ve N(-) grupta 1,6 oranında görülmüştür. C18:1,cis (Oleik asit) kontrol grubunda 0,6 iken Mg(-) grupta 1,2 önemli bir artış görülmüş ve N(-) grupta 18,1 oranında önemli bir yükseliş görülmüştür. C18:1,trans (Elaidik asit) kontrol grubunda 1,3 iken Mg(-) grupta 1,6 ve N(-) grupta 0,6 olarak analiz edilmiştir. C20:1,cis-11(Eikosanoik asit) kontrol grubunda 1,8 iken Mg(-) grupta 4,9'lik bir önemli bir yükseliş görülmüş aynı şekilde N(-) grupta 2,7 oranında önemli bir yükseliş görülmüştür. Toplam tekli doymamış yağ asidi(MUFA) oranına bakıldığında zaman, kontrol grubu ile Mg(-) grup arasında önemli bir fark görülmezken, N(-) grup kontrol grubu ile kıyaslandığında %44,4 oranında artış gözlenmiştir (Tablo 6).

Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) yüzdesel içeriklerine baktığımız zaman (Tablo 5); C18:2,trans(Linoleik asit) kontrol grubunda 0,5 iken, Mg(-) grupta 0,4 görülmüş fakat N(-) grupta ise görülmemiştir. C18:2 cis (linoleik asit) kontrol grubunda 9,0 ve Mg(-) grupta 9,1 iken N(-) grupta 19,1 oranında önemli bir artış görülmüştür ve çoklu doymamış yağ asitleri arasında en yüksek oranda çıkmıştır. C18:3,n6-alfa (linolenik asit) kontrol grubunda 3,7 , Mg(-) grupta 3,4 iken N(-) grupta bir düşüş görülmüş ve 0,4 oranında analiz edilmiştir. C18:3,n3-gamma(linolenik asit) , kontrol grubunda 8,7 , Mg(-) grupta 8,1 iken N(-) grupta oranında bir yükselişle 10,9 oranında olduğu görülmüştür. C18:4n3(stearidonik asit) kontrol grubunda görülmezken iken Mg(-) grupta 6,0 ve N(-) grupta 2,1 oranında görülmüştür. 0,1 oranında eser miktarda kontrol grubunda görülen cis-11-dokosanoik asit, Mg(-) ve N(-) gruplarda görülmemiştir. C20:2,cis-11,14(Eiokosanoik asit) , kontrol grubunda 2,0 oranında görülmüş fakat diğer iki ortamda bulunmamıştır. C20:5 (Eikosapentaenoik asit(EPA)), kontrol grubunda 0,9 ve N(-) grupta 3,9 iken Mg(-) grupta 0,3 oranında önemli bir yükseliş göstermiştir. 22:5n3(Dokosapentaenoik asit(DPA)), kontrol grubunda 2,5 ve N(-) grupta 1,9 iken Mg(-) grupta 3,8 oranında bir yükseliş göstermiştir. C22:6(Dokosaheksanoik asit(DHA)), kontrol grubunda 2,7 iken Mg(-) grupta 3,6 ve N(-) grupta 1,3 oranında görülmüştür. Toplam PUFA oranını

kontrol grubu ile kıyasladığımız zaman N(-) grupta %22 oranında bir artış görülmüştür, Mg(-) grupta ise 25,7 oranında bir artış gözlenmiştir(Tablo 6).

Toplam yağ asidi değerlerine bakıldığında (Tablo 6); kontrol grubunda toplam doymuş yağ asidi (Σ SFA) %47,3 , tekli doymamış yağ asidi (Σ MUFA) %22,6 ve Çoklu doymamış yağ asitleri (Σ PUFA) %30,1 oranında analiz edilmiştir. Mg(-) grupta Σ SFA %37,2 ve Σ PUFA %37,8 oransal olarak birbirlerine yakın değerler vermişler ve Σ MUFA oranı ise %24,9 ile onlara kıyasla düşük çıkmıştır. N(-) grupta ise Σ SFA , Σ MUFA ve Σ PUFA oranları birbirine yakın sonuçlar vermiştir. Kontrol grubunda Σ SFA oranı daha yüksek iken Mg(-) ve N(-) gruplarda Σ PUFA oranı daha yüksek çıkmıştır. Σ MUFA oranı ise Mg(-) ve özellikle N(-) gruplarda kontrol grubuna kıyasla yüksek çıkmıştır. Doymamışlık derecesi kontrol grubunda %82,8 oranında iken Mg(-) grupta %100,6 ve N(-) grupta %106,2 olarak bir artış göstermiştir.

4. TARTIŞMA

Antarktika'nın Horseshoe adasında deniz kenarındaki kayalıklardan alınan örneklerin DNA izolasyonu ve sekanslama sonuçları sonucunda *Chloroidium saccharophilum* türü tanımlanmıştır. Mikroskop altında incelen örneklerin elipsoidal veya küresel olduğu, kloroplastların tek büyük, çepere yakın konumlandığı ve içlerinde oval şekilde pirenoid varlığı gözlemlenmiştir. Bu verilerimiz Darienko ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmadaki verilerle uymaktadır.

Azot açlığına bırakılan *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 türünün hücre yoğunluğunun baskılandığı gözlemlenmiştir. Literatür çalışmalarında yaygın olarak N açlığına bırakılan mikroalglerin büyümeyi durdurduğu bildirilmiştir (Pancha vd., 2014; Solovchenko ve ark.,2008). Santhakumaran ve ark.,(2020) *Chloroidium saccharophilum* türü üzerinde N konsantrasyonlarını 0, 1.5, 2.9 ve 4.5 olarak yaptıkları bir çalışmada N açlığına bırakılan mikroalg hücrelerinde büyümenin baskılandığını ve lineer evrede devam ettiğini bildirmişlerdir. Magnezyum açlığına bırakılan örneklerde ise büyümede önemli bir değişimin olmadığı görülmüştür.

Mohammad Matin ve arkadaşlarının yaptığı (2018) bir çalışmada Mg açlığına bırakılan *Chlorella sorokiniana*'nin kontrol grubuyla önemli bir farklılık göstermediğini gözlemlemişlerdir. Sonuçlar yaptığımız bu çalışmaya uymaktadır.

Yine yapılan başka bir çalışmada *Scenedesmus ophiurus*'un büyüme hızının Mg açlığına bağlı olarak çok değişmediğini söylemişlerdir (Hanifzadeh ve ark., 2018). Buda Mg açlığının *Chloroidium saccharophilum* mikroalginin yoğunluğu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

Magnezyum ve Azot eksik ortamlarda kültürü yapılan *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 türünün hücrelerinde klorofil-a oranında değişimler gözlemlenmiştir. Azot eksik kültür ortamındaki mikroalg hücrelerinde klorofil-a oranında zaman içerisinde düşüş görülmüştür. Mg(-) ortamda yetişen hücrelerde ise 21.gün sonunda bir düşüş görülmüştür. Daha önce *Chloroidium saccharophilum* üzerine yapılan bir çalışmada da N açlığına bırakılan mikroalglerin zaman bağlı olarak klorofil-a oranında önemli bir düşüş olduğu bildirilmiştir(Santhakumaran ve ark.,2020). *Isochrysis galbana* mikroalgi üzerine yapılan bir çalışmada, N açlığının mikroalglerin tüm fotosentetik pigmentlerinde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir(Zarrinmehr ve ark.,2020). Yaptığımız çalışmada da bu verilere uygun olarak N(-) ortamın, hücrelerde toplam klorofil oranında düşüşe sebep olduğu görülmüştür. Mg(-) ortamda yetişen hücrelerde de toplam klorofil oranında bir düşüş kaydedilmiştir. *Auxenochlorella protothecoides* türü üzerine yapılan bir çalışmada Mg açlığına bırakılan mikroalg türünün toplam klorofil oranında 6.1 kat azalma olduğu bildirilmiştir (Polat ve ark.,2020).Bu çalışmadaki veriler, çalışmamızdaki veriler ile uyusmaktadır. Coulombier ve ark.(2020) *Nepharoselmis* sp. mikroalgi üzerine yaptıkları bir çalışmada zamana bağlı olarak azalan N açlığından dolayı toplam karotenoid oranında düşüş gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da N(-) ortamda zamanla toplam karotenoid oranında düşüş görülmüştür. Mg(-) ortamda ise toplam karotenoid miktarında önemli bir değişim görülmemiştir. Yaptığımız sakkarit tayinlerinde Mg(-) ortamda kültüre alınan örneklerde önemli bir fark görülmedi fakat N(-) ortama cevapta ise sakkarit oranında önemli bir yükseliş görülmüştür.

Mg(-) ortam ve N(-) ortamlarda kültüre alınan örneklerin protein içeriğinde ise 21. günün sonunda önemli sayılabilecek bir düşüş yaşanmıştır. Daha önce *A.protothecoides* türü üzerine yapılan bir çalışmada farklı Mg konsantrasyonları uygulanmış ve en düşük protein oranı Mg açlığına bırakılan mikroalglerde görülmüştür (Canbulat ve ark., 2008). Bu sonuç, çalışmamızdaki Mg açlığı sonucunda çıkan verileri destekler niteliktedir. Azot elementi protein yapısındaki temel

elementlerden biri olduğundan dolayı N açlığına maruz bırakılan hücreler strese girer ve protein üretimlerinde azalış görülmesi beklenir. *Chlamydomonas reinhardtii* ve *Scenedesmus subspicatus*'ta nitrojen açlığına bağlı olarak toplam protein içeriğinde %15-18'lik bir azalma olduğu bildirilmiştir (Dean ve ark., 2010). Bu çalışmanın sonuçları incelendiğinde N açlığına maruz bırakılan hücrelerin protein içeriğinin azalması literatür bilgileri ile doğrulanmaktadır.

Nötral lipit içeriğinde ise zamansal olarak hem Mg(-) ortamda hemde N(-) ortamda kültüre alınan mikroalglerde bir birikim gerçekleştiği analiz edilmiştir. *Scenedesmos obliquus* ile yapılan bir çalışmada Mg konsantrasyonundaki değişikliklerin lipit üretkenliğini önemli derecede değiştirdiği gözlemlenmiştir. Fakat bu büyüme hızını çok etkilememiştir ve aynı çalışmada artan Mg oranına bağlı olarak lipit üretiminin artışı bildirilmiştir. (Esakkimuthu ve ark., 2016). Çalışmamızda M(-) ortamda kültüre alınan örneklerde zamana bağlı olarak bir artış görülsede kontrol grubuna kıyasla lipit artışı olmadığı görülmektedir. Breuer ve ark., (2012) yaptıkları bir çalışmada N(-) olan kültür ortamlarında *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*, *Neochloris oleoabundans* ve *Scenedesmus obliquus*'un, kuru ağırlıklarının %35'inden fazlasını triaçilgliserol (TAG) olarak biriktirdiklerini bildirilmişlerdir. Fotoğrafları çekilen nötral lipit görüntülerimizde bu verileri destekler niteliktedir.

Fotosentez solunum oranında ise N(-) kültürde üretilen/tüketilen oksijen miktarının 21. günde azaldığı görülmektedir. Jiang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da N açlığına bağlı olarak Fv/Fm(PSII maximum fotokimyasal verimliliği) değerlerinde düşüş olduğu gözlemlenmiş (Jiang ve ark., 2012) ve yine diğer bir çalışmada Hanifzadeh ve arkadaşların yaptığı bir çalışmada Fv/Fm değerlerinin 0,65 ten 0,26 ya düştüğünü bildirdikleri gözlemleri ile tutarlıdır. Ayrıca aynı çalışmada Mg açlığı üzerine yaptıkları gözlemlerde Fv/Fm oranlarında da bir düşüş görüldüğü ama N açlığı kadar önemli olmadığı bildirilmiştir (Hanifzadeh ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda ise elemen açlığına cevapta, kontrolle aralarında önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür.

Yapılan kimyasal analizlerden elde edilen sonuçlar FT-IR analizi ile de doğrulanmıştır. Magnezyum eksik ve azot eksik olarak farklı stres koşullarına maruz bırakılan örneklerin FT-IR analiz sonuçları incelendiğinde strese maruz bırakılan

grupların sakkarit ve lipit içeriklerinde artış gözlemlenirken, N açlığına maruz bırakılan grupta protein içeriğinin azaldığı görülmektedir. Besin eksikliği stresinin mikroalglerin metabolitleri üzerine olan etkisi bir çok çalışmada incelenmiştir ve besinlerin sınırlandırıldığı taktirde karbonhidrat, protein ve lipit gibi metabolitlerin miktarlarında değişimler olmaktadır. Karbonhidrat ve lipit içerikleri besin eksik, özellikle N eksik, koşullara maruz bırakıldığında artış gösterirken protein içeriğinde bir azalma olduğu bilinmektedir. FT-IR analizi metabolit profili hakkında doğrudan bilgi vermese de yapılan kimyasal analizlerin sonuçlarını doğrulamak için kullanılabilir.

Omega-3, omega-6 ve omega-9 yağ asitleri birçok fizyolojik ve biyokimyasal olayda görev almaktadır. Omega yağ asitlerinin, bağışıklık sistemini güçlendirdiği, beyin gelişimini sağladığı, koroner kalp hastalıklarını önlediği fonksiyonel olarak bilinmektedir. Ayrıca beyinde, gözlerde, plasentada toplandığı ve bunların fonksiyonlarını yerine getirmesinde yardımcı olduğu, kandaki yağ oranını düzenlediği söylenilmektedir (Canbulat ve ark.,(2008)). Yetersizliklerinde insanlarda bazı rahatsızlıklara neden olmaktadır. Bunlar arasında büyümede gerileme, bazı deri hastalıkları, kanserin bazı türleri, astım ve öğrenme geriliğide gerçekleşebilir (Lewis vd., 2000). Omega-3 yağ asitlerinden, C20:5 eikosapentaenoik asit (EPA), C22:6 dokosaheksaenoik asit(DHA), C18:3 alfa linoleik asit(ALA)'ın önemli olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmadaki bütün deney ortamlarımızda *Chloroidium saccharophilum* ASYA23 türünde EPA, DHA ve ALA yağ asitlerinin var olduğu analiz edilmiştir. Özellikle Mg(-) ortamda kültüre alınan mikroalglerde EPA ve DHA diğer iki ortama oranla daha yüksek miktarda bulunmuştur. ALA, hem kontrol grubunda hemde Mg(-) grupta, N(-) eksik grubuna göre daha yüksek çıkmıştır. Önemli omega-6 yağ asitleri, linoleik asit ve araşidonoik asittir. Çalışmamızdaki C18:2 cis linoleik asit yüksek oranda bulunmakta ve özelliklede N(-) ortamda yetiştirilen mikroalglerde daha yüksek çıkmıştır. Bir omega-9 olan 18:1 oleik asit, yapılan analizler sonucunda özellikle N(-) ortamda yetiştirilen mikroalglerde yüksek oranda bulunmuştur.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında yapılan psikofilik bir mikroalg olan *Chloroidium saccharophilum* Asya23 türünün N ve Mg açlığına bırakılarak uygulanan stres ortamı, 7.,14. ve

21.günlerde kontrol grubuyla kıyaslandığında farklı metabolik değişiklikler göstermiştir. N(-) ve Mg(-) açlığına bırakılan mikroalg hücrelerinin metabolik olarak gösterdiği değişimleri burada kısaca toparlarsak; N(-) kültür ortamında hücre büyümesinin 5.günden itibaren baskılandığı ve lineer evrede devam ettiği gözlemlenirken Mg(-) kültür ortamındaki hücrelerin kontrolle paralel bir büyüme gösterdiği ve önemli bir baskılanmanın olmadığı görülmüştür. Klorofil-a ve toplam klorofil içeriğinde Mg(-) kültür ortamındaki mikroalg hücrelerinde genellikle 7. ve 14.günde bir değişim görülmezken 21.günde kontrol grubuna oranla düşüş gözlemlenmiştir. N(-) kültür ortamındaki örneklerde ise 7. günden itibaren miktarlarında düşüş gözlemlenmiştir. Hem Mg(-) kültür ortamında hem de N(-) kültür ortamında büyütülen mikroalglerde 21.günde toplam klorofil, klorofil-a oranlarında istatistiksel olarak önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Toplam karotenoid oranında Mg(-) ortamda kültüre alınan örneklerde hem zamansal olarak hem de kontrolle kıyaslandığında önemli bir fark görülmezken, N(-) ortamda büyütülen mikroalglerde 14. günde önemli bir düşüş yaşanmış fakat 21.günde tekrar eski seviyesine geri çekilmiştir. Sakkarit oranında ise Mg(-) ortamdaki hücreler ile kontrol grubu arasında önemli bir değişim görülmezken, N(-) ortamda büyütülen mikroalglerde sakkarit miktarı kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Diğer taraftan Mg(-) ve N(-) ortamlarhücrelerde protein oranını da etkilemiş ve protein içeriğinin düşmesine neden olmuştur. Proteinlerin aksine Mg(-) ortamda kültüre alınan hücrelerde nötral lipit oranında önemli bir değişiklik olmazken, N(-) ortamdaki hücrelerde nötral lipit birikiminde önemli bir artış gerçekleşmiştir. Fotosentez solunum oranında ise zamana bağlı olarak bütün ortamlarda bir düşüş olmuştur. Lipit, protein ve sakkarit için yapılan FTIR spektrum sonuçları deneysel olarak yaptığımız sonuçları desteklemektedir. Son olarak element açlığına cevapta mikroalglerin içerdikleri FAME profilleri değerlendirildiğinde omega-3 yağ asitleri olan DHA ve EPA, omega-6 olan linoleik asit ve omega-9 olan oleik asitteki artışlar göze çarpmaktadır.

6.KAYNAKÇA

Aguilera, J., Francisco, J., Gordillo, L., Karsten, U., Figueroa, F. L., & Niell, F. X. (2000). Light quality effect on photosynthesis and efficiency of carbon assimilation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Journal of plant physiology*, 157(1), 86-92.

- Armbrust, E. The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* 459, 185–192 (2009). <https://doi.org/10.1038/nature08057>
- Aydın, G. S., Kocata, A., & Büyük&i, B. (2009). Effects of light and temperature on the growth rate of potentially harmful marine diatom: *Thalassiosira allenii* Takano (Bacillariophyceae). *African Journal of Biotechnology*, 8(19).
- Bell, P. R., & Hemsley, A. R. (2000). *Green plants: Their origin and diversity* (2nd ed). Cambridge University Press.
- Bicudo, C., & Menezes, M. (2006). *Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições*.
- Bidigare, R. R., Ondrusek, M. E., Kennicutt, M. C., Iturriaga, R., Harvey, H. R., Hoham, R. W., & Macko, S. A. (1993). Evidence a photoprotective for secondary carotenoids of snow algae 1. *Journal of Phycology*, 29(4), 427-434.
- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., & Wijffels, R. H. (2013). Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 143, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.105>
- BOLAT, İ., & Ömer, K. A. R. A. (2017). Bitki besin elementleri: Kaynakları, işlevleri, eksik ve fazlalıkları. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 19(1), 218-228.
- Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M., & Malcata, F. X. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1275-1288.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- Chen, Z., He, C., & Hu, H. (2012). Temperature responses of growth, photosynthesis, fatty acid and nitrate reductase in Antarctic and temperate *Stichococcus. Extremophiles*, 16(1), 127-133.
- Chloroidium saccharophilum* (W.Krüger) Darienko & al. : *AlgaeBase*. (t.y.). Geliş tarihi 30 Haziran 2022, gönderen https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=K96f0e71fabf75d43
- Coulombier, N., Nicolau, E., Le Déan, L., Barthelemy, V., Schreiber, N., Brun, P., ... & Jauffrais, T. (2020). Effects of nitrogen availability on the antioxidant activity and carotenoid content of the microalgae *Nephroselmis* sp. *Marine drugs*, 18(9), 453.
- Darienko, T., Gustavs, L., Mudimu, O., Menendez, C. R., Schumann, R., Karsten, U., Friedl, T., & Pröschold, T. (2010). *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxioophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 45(1), 79-95. <https://doi.org/10.1080/09670260903362820>
- de Castro Araújo, S., & Garcia, V. M. T. (2005). Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *Wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquaculture*, 246(1-4), 405-412.

ELEREN, S. Ç., & Burak, Ö. N. E. R. (2019). Sürdürülebilir ve çevre dostu biyoyakıt hammaddesi: mikroalgler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 25(3), 304-319.

Egorova, I. N., & Kulakova, N. V. (2022). Chloroidium saccharophilum (Chlorophyta) from the Lake Baikal shore (Republic of Buryatia, Russia). *Новости систематики низших растений*, 56, 255-272.

Fogliano, V., Andreoli, C., Martello, A., Caiazzo, M., Lobosco, O., Formisano, F., Carlino, P. A., Meca, G., Graziani, G., & Rigano, V. D. M. (2010). Functional ingredients produced by culture of Koliella antarctica. *Aquaculture*, 299(1-4), 115-120.

Gim, G. H., Ryu, J., Kim, M. J., Kim, P. I., & Kim, S. W. (2016). Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(5), 605-616.

González, M. A., Pröschold, T., Palacios, Y., Aguayo, P., Inostroza, I., & Gómez, P. I. (2013). Taxonomic identification and lipid production of two Chilean Chlorella-like strains isolated from a marine and an estuarine coastal environment. *AoB Plants*, 5.

Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs*, 9(4), 625-644.

Hanifzadeh, M., Garcia, E. C., & Viamajala, S. (2018). Production of lipid and carbohydrate from microalgae without compromising biomass productivities: Role of Ca and Mg. *Renewable Energy*, 127, 989-997.

Hasle, G. R., Syvertsen, E. E., Steidinger, K. A., Tangen, K., & Tomas, C. R. (1996). *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Elsevier.

Hawes, I. (1990). Effects of freezing and thawing on a species of Zygnema (Chlorophyta) from the Antarctic. *Phycologia*, 29(3), 326-331.

Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J.-S. (2013). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga Chlorella vulgaris FSP-E. *Bioresource technology*, 135, 157-165.

James. Beattie, Clark. Bricker, and David. Garvin *Analytical Chemistry* 1961 33 (13), 1890-1892 DOI: 10.1021/ac50154a030

Kim, D. G., Lee, C., Park, S.-M., & Choi, Y.-E. (2014). Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using Chlorella vulgaris. *Bioresource technology*, 159, 240-248.

Lee, R. E. (2018). *Phycology*. Cambridge University Press.

Levasseur, M. E., Morissette, J.-C., Popovic, R., & Harrison, P. J. (1990). Effects of long term exposure to low temperature on the photosynthetic apparatus of Dunaliella Tertiolecta (Chlorophyceae) 1. *Journal of phycology*, 26(3), 479-484.

Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.

- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in microbiology*, 7, 546.
- Olivieri, G., Gargano, I., Andreozzi, R., Marotta, A., Marzocchella, A., Pinto, G., & Pollio, A. (2012). Effects of CO₂ and pH on *Stichococcus bacillaris* in laboratory scale photobioreactors. *Chemical Engineering Transactions*.
- Osipova, S., Dudareva, L., Bondarenko, N., Nasarova, A., Sokolova, N., Obolkina, L., Glyzina, O., & Timoshkin, O. (2009). Temporal variation in fatty acid composition of *Ulothrix zonata* (Chlorophyta) from ice and benthic communities of Lake Baikal. *Phycologia*, 48(2), 130-135.
- Patel, M. K., Das, S., & Thakur, J. K. (2018). GC-MS-based analysis of methanol: chloroform-extracted fatty acids from plant tissues. *Bio-protocol*, 8(18), e3014-e3014.
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., & Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28, 192-199.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2007). Biologia vegetal. *Biologia vegetal*, 830-830.
- Reay, D. S., Priddle, J., Nedwell, D. B., Whitehouse, M. J., Ellis-Evans, J. C., Deubert, C., & Connelly, D. P. (2001). Regulation by low temperature of phytoplankton growth and nutrient uptake in the Southern Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 219, 51-64.
- Roleda, M. Y., Slocombe, S. P., Leahey, R. J., Day, J. G., Bell, E. M., & Stanley, M. S. (2013). Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource technology*, 129, 439-449.
- Round, F. E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1990). *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press.
- Rukminasari, N. (2013). Effect of temperature and nutrient limitation on the growth and lipid content of three selected microalgae (*Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis* sp. And *Scenedesmus* sp.) for biodiesel production. *International Journal of Marine Science*, 3.
- Satpati, G. G., & Pal, R. (2015). Rapid detection of neutral lipid in green microalgae by flow cytometry in combination with Nile red staining—an improved technique. *Annals of Microbiology*, 65, 937-949.
- Selvam G G & Sivakumar K (2014). Influence of seaweed extract as an organic fertilizer on the growth and yield of *Arachis hypogea* L. and their elemental composition using SEM-energy dispersive spectroscopic analysis. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 3(1): 18-22
- Scott, K. N. (2015). Ice and Mineral Resources. İçinde *Exploring the Last Continent* (ss. 487-504). Springer.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (1998). *Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; Close-Out*

Report (NREL/TP-580-24190, 15003040; s. NREL/TP-580-24190, 15003040).
<https://doi.org/10.2172/15003040>

Smith, R. E. H., Clement, P., Cota, G. F., & Li, W. K. W. (1987). Intracellular Photosynthate Allocation and the Control of Arctic Marine Ice Algal Production1. *Journal of Phycology*, 23(2), 124-132. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1987.tb04434.x>

Smith, R. E., Stapleford, L. C., & Ridings, R. S. (1994). The acclimated response of growth, photosynthesis, composition, and carbon balance to temperature in the psychrophilic ice diatom *Nitzschia seriata* 1. *Journal of phycology*, 30(1), 8-16.

Şimşek, Z. (1995). *Klemantin mandarininde bilezik alma, demir bileşikleri ve deniz yosunu özü uygulamalarının verim ve kalite üzerine etkileri* (Master's thesis, Akdeniz Üniversitesi).

Tang, E. P., Tremblay, R., & Vincent, W. F. (1997). CYANOBACTERIAL DOMINANCE OF POLAR FRESHWATER ECOSYSTEMS: ARE HIGH-LATITUDE MAT-FORMERS ADAPTED TO LOW TEMPERATURE? 1. *Journal of Phycology*, 33(2), 171-181.

Vona, V., Di Martino Rigano, V., Lobosco, O., Carfagna, S., Esposito, S., & Rigano, C. (2004). Temperature responses of growth, photosynthesis, respiration and NADH: Nitrate reductase in cryophilic and mesophilic algae. *New Phytologist*, 163(2), 325-331.

WEB1:<https://www.enchantedlearning.com/geography/continents/Land.shtml>
adresinden 01.05.2023 tarihinde erişilmiştir.

WEB2:<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c0/Antarctica.svg>
adresinden 01.05.2023 tarihinde erişilmiştir.

WEB3:https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=36296
adresinden 02.05.2023 tarihinde erişilmiştir.

WEB4: <https://eol.org/pages/3893> adresinden 05.05.2023 tarihinde erişilmiştir.

Wiencke, C., & Dieck, I. T. (1990). Temperature requirements for growth and survival of Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 557-577.

Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., & Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124, 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.003>

Dean, A. P., Sigee, D. C., Estrada, B., & Pittman, J. K. (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 101(12), 4499-4507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.065>

Görs, M., Schumann, R., Hepperle, D., & Karsten, U. (2010). Quality analysis of commercial *Chlorella* products used as dietary supplement in human nutrition. *Journal of Applied Phycology*, 22(3), 265-276. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9455-4>

- Guillard, R. R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. İçinde *Culture of marine invertebrate animals* (ss. 29-60). Springer.
- Harun, R., Davidson, M., Doyle, M., Gopiraj, R., Danquah, M., & Forde, G. (2011). Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass and bioenergy*, 35(1), 741-747.
- Hou, J., Zhang, P., Yuan, X., & Zheng, Y. (2011). Life cycle assessment of biodiesel from soybean, jatropha and microalgae in China conditions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 5081-5091.
- Jeffrey, S. W., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie Und Physiologie Der Pflanzen*, 167(2), 191-194. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)
- Lee, S. H., Kang, H. J., Lee, H.-J., Kang, M.-H., & Park, Y. K. (2010). Six-week supplementation with Chlorella has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. *Nutrition*, 26(2), 175-183.
- Maity, J. P., Bundschuh, J., Chen, C.-Y., & Bhattacharya, P. (2014). Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives—A mini review. *Energy*, 78, 104-113.
- Masojídek, J., Vonshak, A., & Torzillo, G. (2010). Chlorophyll Fluorescence Applications in Microalgal Mass Cultures. İçinde D. J. Suggett, O. Prášil, & M. A. Borowitzka (Ed.), *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications* (ss. 277-292). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9268-7_13
- Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S. K., Ghosh, A., & Mishra, S. (2015). Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae Scenedesmus sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 189, 341-348.
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water research*, 45(20), 6637-6649.
- Prajapati, S. K., Kaushik, P., Malik, A., & Vijay, V. K. (2013). Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1408-1425.
- Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied energy*, 88(10), 3411-3424.
- Richmond, A. (2008). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons.
- Rukminasari, N. (2013). Effect of temperature and nutrient limitation on the growth and lipid content of three selected microalgae (*Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis* sp. And *Scenedesmus* sp.) for biodiesel production. *International Journal of Marine Science*, 3.

- Santhakumaran, P., Kookal, S. K., Mathew, L., & Ray, J. G. (2020). Experimental evaluation of the culture parameters for optimum yield of lipids and other nutraceutically valuable compounds in *Chloroidium saccharophilum* (Kruger) comb. Nov. *Renewable Energy*, 147, 1082-1097. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.09.071>
- Sheng, J., Yu, F., Xin, Z., Zhao, L., Zhu, X., & Hu, Q. (2007). Preparation, identification and their antitumor activities in vitro of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chemistry*, 105(2), 533-539.
- Sialve, B., Bernet, N., & Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology advances*, 27(4), 409-416.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stark, A. H., Crawford, M. A., & Reifen, R. (2008). Update on alpha-linolenic acid. *Nutrition reviews*, 66(6), 326-332.
- van Dam, R. A., Harford, A. J., Lunn, S. A., & Gagnon, M. M. (2014). Identifying the cause of toxicity of a saline mine water. *PloS one*, 9(9), e106857.
- Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis arthrospira: Physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC press.
- Wang, Y., Chen, T., & Qin, S. (2012). Heterotrophic cultivation of *Chlorella kessleri* for fatty acids production by carbon and nitrogen supplements. *Biomass and bioenergy*, 47, 402-409.
- Watt, L. van der (2023, March 30). Antarctica. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/place/Antarctica>
- Wilson, K. E., & Huner, N. P. A. (2000). The role of growth rate, redox-state of the plastoquinone pool and the trans-thylakoid ΔpH in photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to growth irradiance and temperature. *Planta*, 212(1), 93-102. <https://doi.org/10.1007/s004250000368>
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Jia, Y. (2010). Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecological Engineering*, 36(4), 379-381.
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Aswathnarayana Gokare, R., & Ambati, R. R. (2021). Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview. *Cells*, 10(2), 393.
- Zeng, X., Danquah, M. K., Chen, X. D., & Lu, Y. (2011). Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(6), 3252-3260. macroalgae from Antarctica and southern Chile. *Marine ecology progress series*, 157-170.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Jia, Y. (2010). Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecological Engineering*, 36(4), 379-381.

Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Aswathnarayana Gokare, R., & Ambati, R. R. (2021). Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*, 10(2), 393. <https://doi.org/10.3390/cells100203>

ÖZGEÇMİŞ

Adı:Yalçın

Soyadı:GÜL

Mail: yalcingul@gmail.com

Eğitim Bilgileri:

Lisans: İstanbul Üniversitesi Biyoloji bölümü

Lisansüstü: İstanbul Medeniyet Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü

Deneyim

09.2017 - 10.2017-Zeytin Burnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi - Stajyer Biyolog

07.2018 - 08.2018-Özel Çapa Medilife Hastanesi - Laboratuvar Stajyeri

2020-2021-Nurettin Topçu Anadolu Lisesi - Biyoloji Öğretmenliği

09.2022-02.2023 - Teleperformance - Content Manager

03.2023-devam ediyor – Conectys - Content Manager

Kulüp

05.2017-05.2018-İÜGEN Kulübü - Proje koordinatörü

Sertifikalar

Pedagojik Formasyon (2022)

Yabancı dil

İngilizce(B2)