

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yasemin BULUT

***CHLORELLA*'DA (CHLOROPHYCEAE) YAĞ MİKTARINI ARTTIRMA
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CHLORELLA'DA (CHLOROPHYCEAE) YAĞ MİKTARINI ARTTIRMA
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Yasemin BULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**Bu tez / / Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.**

İmza

İmza

İmza

Prof. Dr.Oya IŞIK

Prof. Dr. Burhan ARIKAN

Doç. Dr. Fatma ÇEVİK

DANIŞMAN

ÜYE

ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü

İmza ve Mühür

**Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir.**

Proje No: SÜF.2008.YL.1

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS

CHLORELLA'DA (CHLOROPHYCEAE) YAĞ MİKTARINI ARTTIRMA OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Yasemin BULUT

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman: Prof. Dr.Oya IŞIK

Yıl : 2009, **Sayfa:** 62

Jüri : Prof. Dr.Oya IŞIK
Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Doç. Dr..Fatma ÇEVİK

Besin eksikliği ve farklı azot kaynağı faktörlerinin *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) türünde yağ içeriği ve protein miktarına olan etkilerini belirlemek amacıyla laboratuvar koşullarında yürütülen çalışmada, % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N , % 50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muameleleri uygulanmıştır. Son güne ait protein ve yağ değerleri sırası ile kontrol grubunda % 50.794, % 13.287, % 50 N eksikliğinde % 20.339, % 17.497 , % 100 N eksikliğinde % 13.013, % 35.599 , % 50 P + % 50 N eksikliğinde % 21.373, % 20.518, % 50 P eksikliğinde % 38.158, % 16.727 ve Nitrit eklemesinde % 41.025, % 13.041 olarak bulunmuştur. En yüksek yağ içeriği % 100 N eksikliği uygulanan grupta saptanmış olup bu gruba ait kuru madde ve klorofil-*a* değerleri sırası ile 0,18 g L⁻¹ ve 9,252 mg L⁻¹ olarak saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Chlorella vulgaris*, lipid, besin eksikliği ve nitrit uygulaması.

ABSTRACT

MSc / PhD THESIS

THE INVESTIGATIONS ON THE POSSIBILITY OF INCREASE LİPİD CONTENT OF CHLORELLA (CHLOROPHYCEAE)

Yasemin BULUT

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL APPLIED SCIENCE
UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Oya IŞIK
Year : 2009, **Page:** 62
Jury : Prof. Dr. Oya IŞIK
Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Assoc.Prof. Fatma ÇEVİK

The study at which the factors of , % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N , % 50 P deficiencies and nitrit addition were treated to *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) with the aim of to determine the effects of the defficient nutrient and different nitrogen source on lipid content and protein was carried out in laboratory conditions. Protein and lipid values of the last day were found as % 50.794 , % 13.287 for control group, % 20.339, % 17.497 for % 50 N(-),% 13.013, % 35.599 % 100 N(-),% 21.373, % 20.518 for % 50 P(-) + % 50 N(-),% 21.373, % 20.518 for % 50 P(-) and % 38.158, % 16.727 for the group nitrit added. The highest lipid content was recorded with the culture to which treated % 100 N(-) with 0,18 g L⁻¹ dry-weight and 9,252 mg L⁻¹ chlorophyll *a* content.

Key Words: *Chlorella vulgaris*, lipid, nutritional deficiencies and nitrit addition

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans öğrenimim süresince bana ilgisini ve desteğini hiç esirgemeyen, büyük bir sabır ve titizlikle bilgi ve tecrübelerini aktararak gelişmemi sağlayan, inandığım ve güvendiğim değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Oya IŞIK'a, tez çalışmam esnasında ilgisini ve yardımlarını gördüğüm, laboratuvar deneyim ve birikimlerinden yararlandığım değerli Araştırma Görevlisi Leyla USLU'ya, tez çalışmam süresince tüm varlıklarıyla her zaman yanımda olan değerli iş ortaklarım ve meslektaşlarım Su Ürünleri Yüksek Mühendisleri Müzeyyen KÖKSAL ve Hande OGUZ'a, engin düşüncelerini paylaşan ve manevi desteğini ilgisini gördüğüm değerli meslektaşlarım Ar. Gör. Barış DERİCİ ve Nurşen YILDIRIM'a analizlerim sırasında laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Bahçe Bitkileri bölümü hocalarımızdan Doç. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ, Doç. Dr. Yıldız AKAKAÇAR'a ve değerli yüksek lisans öğrencileri Selay ELDOĞAN, Özhan ŞİMŞEK, Tolga İZGÜ, Dilek TEKDAL'a, denemelerimin yürütülmesi ve analizler sırasında yardımlarını gördüğüm Yüksek lisans öğrencileri Biyolog Kübra KENDİRLİ, Su ürünleri mühendisleri Çiğdem ÇALIM, Fatoş ÇÖLKESEN DOĞRU, ve Su Ürünleri Mühendisleri Miray SARIKAYA, Burcu AK, Ahmet Mahmut AKSOY'a, tez çalışmamın başından itibaren bize her zaman yürekten inanan ve çalışmalarımızda gerek maddi gerekse manevi desteğini esirgemeyen SERPORT Firması yöneticisi rahmetli Serdar GİRİŞKEN'e, iş ortağı Zeynep TÜZÜN'e, Turgut DALLI'ya ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmam esnasında benimle birlikte olup cesaret veren, bana inanıp maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, asla beni yalnız bırakmayan hayatımdaki en değerli varlığım ailem; annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
1.GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL VE METOD.....	14
3. Materyal.....	14
3.1. <i>Chlorella vulgaris</i>	14
3.2. Metod.....	15
3.2.1.Üretim.....	15
3.2.2. Kültür Ortamı.....	18
3.2.3. <i>Chlorella vulgaris</i> Stok Kültürleri.....	19
3.2.4. Hasat	20
3.2.5. Kurutma.....	21
3.2.6. Deneme süresince günlük yapılan analizler.....	22
3.2.6.1. Kuru Madde Analizi.....	22
3.2.6.2. Klorofil Analizi.....	23
3.2.6.3. Optik Yoğunluk.....	24
3.2.7. Deneme Sonunda Yapılan Analizler	25
3.2.7.1. Lipit	25
3.2.7.2. Protein Analizi	26
4. BULGULAR.....	28
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Hücrelerde stres yaratacak muameleler.....	16
Çizelge 3.2. Jaworski <i>Chlorella vulgaris</i> ortamı Besi Ortamı.....	18
Çizelge 4.1. Uygulanan muamelelerin büyüme parametreleri üzerine etkilerinin Duncan test sonuçları.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. <i>Chlorella vulgaris</i>	10
Şekil 3.2. 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu altında raflara yerleştirilen kültürleri.....	15
Şekil 3.3. Denemede kullanılan <i>Chlorella vulgaris</i> kültürleri	17
Şekil 3.4. <i>C. vulgaris</i> 'e ait kullanılan stok kültürler.....	19
Şekil 3.5. <i>C. vulgaris</i> Kültürlerinin hasatı.....	20
Şekil 3.6. <i>C. vulgaris</i> kültürüne ait kurutulan örnekler.....	21
Şekil 3.7 <i>C. vulgaris</i> 'e ait kuru madde analizi.....	22
Şekil3.8. <i>C. vulgaris</i> kültürlerinin optik yoğunluk değerini ölçmede kullanılan spektrofotometre cihazı.....	24
Şekil 3.9. <i>C. vulgaris</i> 'e ait lipid analizi.....	25
Şekil 3.10 Protein analizinde kullanılan Khiel dal cihazı	27
Şekil 4.1. <i>C. vulgaris</i> kontrol grubu OD değerleri	28
Şekil 4.2. %50 N eksiltmesi yapılan <i>C.vulgaris</i> kültürlerinde OD değerleri.....	29
Şekil 4.3. %100 N eksiltmesi yapılan <i>C.vulgaris</i> kültürlerinde OD değerleri.....	29
Şekil 4.4 %50 N ve %50 P eksiltmesi yapılan <i>C.vulgaris</i> kültürlerinde OD değerleri.	30
Şekil 4.5. % 50 P eksiltmesi yapılan <i>C.vulgaris</i> kültürlerinde OD değerleri.....	30
Şekil 4.6. Nitrit eklenen <i>C.vulgaris</i> kültürlerinde OD değerleri.....	31
Şekil 4.7. Muamele gruplarına ait OD Değerleri.....	32
Şekil 4.8. <i>C. vulgaris</i> kontrol grubu kuru madde değerleri.....	33
Şekil 4.9. % 50 N eksiltmesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde kuru madde değerleri.....	33
Şekil 4.10. % 100N eksiltmesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde kuru madde değerleri.....	34
Şekil 4.11. % 50N + % 50P eksiltmesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde kuru madde değerleri.....	34
Şekil 4.12. <i>C. vulgaris</i> % 50 P eksik muamele grubu kuru madde değerleri.....	35
Şekil 4.13. Nitrit eklemesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde kuru madde Değerleri.....	35

Şekil 4.14. Tüm muamele gruplarında kuru madde değerleri.....	36
Şekil 4.15. <i>C. vulgaris</i> kontrol grubu pH değerleri.....	37
Şekil 4.16. % 50N eksiltmesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde pH değerleri.....	37
Şekil 4.17. % 100 N eksiltmesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde pH değerleri.....	38
Şekil 4.18. % 50N + % 50P eksiltmesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde pH değerleri.....	38
Şekil 4.19. % 50 P eksiltmesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde pH değerleri.....	39
Şekil 4.20. Nitrit eklemesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde pH değerleri.....	39
Şekil 4.21. Tüm muamele gruplarında pH değerleri.....	40
Şekil 4.22. <i>C. vulgaris</i> kontrol grubu kl-a değerleri.....	41
Şekil 4.23. % 50 N eksiltmesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde kl-a değerleri.....	41
Şekil 4.24. % 100 N eksiltmesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde kl-a değerleri.....	42
Şekil 4.25. % 50 N + % 50 P eksiltmesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde kl-a değerleri.....	42
Şekil 4.26. % 50 P eksiltmesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde kl-a değerleri.....	43
Şekil 4.27. Nitrit eklemesi yapılan <i>C. vulgaris</i> kültürlerinde kl-a değerleri.....	43
Şekil 4.28. Tüm muamele gruplarında kl-a değerleri.....	44
Şekil 4.29. Tüm muamele gruplarında % yağ değerleri.....	45
Şekil 4.30. Tüm muamele gruplarında kuru madde -% yağ değerleri.....	46
Şekil 4.31. Tüm muamele gruplarında kl-a ve % yağ değerleri.....	47
Şekil 4.32. Tüm muamele gruplarında % protein değerleri.....	49
Şekil 4.33. Tüm muamele gruplarında % protein ve % yağ değerleri.....	50

1.GİRİŞ

Algler çok uzun yıllardan beri farklı alanlarda kullanılmaktadırlar. Hücre içinde biriktirdikleri protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitamin, mineral, pigmentler ve daha pek çok önemli metabolitleri nedeniyle insanlar tarafından başlıca besin desteği olmak üzere değişik amaçlarla kullanılmaktadırlar.

Mikroalgler ile yapılan yoğun araştırmalar, özellikle siyanobakterilerle 1980'lerde başlamıştır ve son yıllarda mikroalgler kapsamlı araştırmaların odağı haline gelmişlerdir. Bunun nedeni, denemeler için gerekli olan algal biyokütle, laboratuvar ölçeğinde kolaylıkla kültüre edilebilmektedir. Az miktardaki materyal ile çok miktarda ekstrakt ve bileşik denenebilmektedir.

Son yıllarda, tek hücreli alglerin yağ ve yağ asidi ürünleri oldukça dikkat çekmiştir. İlk olarak Solar Enerji Araştırma Enstitüsü biyo yakıt olarak algal yağların kullanımı üzerinde durmuştur (Neenan ve ark., 1986).

Enerji kaynağı olarak yenilenebilir, toksik olmayan biyodizel yakıt kaynağı mikroalglerden yararlanma olanakları konusunda çalışmalar sürdürülmektedir. Bu amaçla yağ içeriği ve büyüme hızı yüksek mikroalg türlerinin belirlenmesi çalışmalarının yanında, hücre içinde mevcut yağ içeriğinin arttırılmasını uyaran stres koşullarının belirlenmesi araştırmaları da sürdürülmektedir.

Mikroalgler kara bitkileri gibi mikroalgler güneş ışığı ve karbondioksiti kullanarak yağ üretebilmeleri, fakat bununla birlikte saatler içerisinde bölünerek çoğalmaları ve yıl boyunca üretebilmeleri sebebiyle kara bitkilerinden daha fazla ürün verimliliğine sahip organizmalardır. Bu fotosentetik canlılar fotosentez sonucu ortama oksijen vermektedirler ve olumsuz çevre koşullarına karşı tepki olarak metabolizmalarında değişiklikler yapabilmektedirler. Chlorophyceae sınıfına ait *Chlorella* ve *Neochloris* türlerinin besin eksikliği olan ortamda kültüre alınmaları ile kuru hücre ağırlıklarında yağ oranlarını % 60 'a çıkardıkları belirlenmiştir (Siaut ve ark., 2007).

Çevresel koşullar ile birlikte kültür ortamında kullanılan besleyici elementler ve konsantrasyonları mikroalgal büyüme ve biyokimyasal yapı üzerinde değişikliklere neden olabilmektedir (Brown ve ark., 1993). Azot kaynağı ve farklı

konsantrasyonları'nın mikroalglerin büyüme ve biyokimyasal yapılarında etkili olduğu bilinmektedir. (Gökpınar, 1991; Fidalgo ve diğ., 1995; Valenzuela-Espinoza ve diğ., 1999; Xu ve diğ., 2001).

Nannochloropsis, klorofil-*b* içeriği, hücresel ksantofil gibi pigment bileşimlerinin yanı sıra, yağ asitlerinden özellikle yüksek eicosapentaenoik asit (20:5n-3) içeriği (Maruyama ve diğ., 1986) ve yüksek düzeylerdeki steroller (Gladu ve diğ., 1995) ile tanınmaktadır (Volkman ve diğ., 1993). *N. oculata* türünde klorofil-a, β -karoten, viyolaksantin ve vokeriyaksantin ana pigmentlerdir. Ayrıca bu alg türü kantaksantin ve astaksantin gibi sekonder karoten grupları da içermektedir (Lubián ve diğ., 2000). Azot kaynakları ve düzeyleri, alg kültürlerinde büyümeyi ve biyokimyasal yapıyı etkilemekte ve karoten miktarlarında değişikliklere sebep olmaktadır (Xu ve diğ., 2001, Lourenco ve diğ., 2002). Mikroalg kültürlerinde azot sınırlaması hücre sayısı ve klorofil-*a* miktarlarında azalmaya neden olurken, mikroalglerin biyokimyasal yapısındaki yağlar gibi organik karbon bileşikler oranlarında artışa neden olabilmektedir. Bununla birlikte kültürlerde klorofil *a* oranı azalırken karoten miktarının artmasına bağlı olarak renkte sararma gözlenmiştir (Shifrin ve Chisholm., 1981; Sukenik ve diğ., 1989). Mikroalg kültürlerinde hücreler tarafından kullanılabilen en önemli azot kaynakları nitrat azotu, amonyum azotu veüre azotu'dur (Gökpınar, 1991; Levasseur ve diğ., 1993; Grobbelaar., 2000).

Mikroalgal kütleden yağ eldesi konusunda dünyanın pek çok ülkesinde çalışmalar gizlilik içerisinde sürdürülmektedir. Yağ içeriği yüksek tür arayışının yanında mevcut türler içerisinde yağ içeriğini yükseltme olanakları konusu araştırılmaktadır. Mikroalgal hücrelerin üretiminde hasat işlemi, kültürünün nispeten maliyetli olması gibi sorunlar ile birlikte kara bitkilerine göre avantajlarının daha fazla olması ve hepsinden önemlisi suyu en verimli kullanan sistemler olmaları, araştırmacıların konuya olan ilgisini artırmaktadır. Büyük hacimlerde mikroalgal üretim, verimsiz arazilerde gerçekleştirilebilmektedir. Enerji kaynağı depo ürünleri, membran komponentleri gibi fonksiyonel olan lipidler ve yağ asitleri tüm bitki hücrelerinin bileşenleridir. Alglerde lipid sentezi yüksek bitkilerdeki yağ sentezi ile benzerdir (Chisti., 1980–81; Nagle ve Lemke., 1990; Sawayama ve ark., 1995).

Mikroalgler tarafından oluşturulan yağlar, sebze yağlarına benzer yağ asidi bileşimine sahiptir. Alglerin birçok varyetesi tarafından sentezlenebilen bazı önemli yağ asitleri de bulunmaktadır (Knothe ve ark., 1997).

Lipofilik organik solventlerle (Eter, petrol eteri, kloroform vs.) ekstrakte edilen lipidler ortak olarak “total lipidler” şeklinde adlandırılırlar. Lipidler polar (hidrofilik) kısımları (karboksilik grupları, alkoller, şekerler vs.) ve non-polar (lipofilik) C zincirlerine (yağ asitleri) bağlı olan polaritelerine göre sınıflandırılabilirler. Özellikle polar lipidler, gliseridler iken mikroalglerin non-polar lipidlerinin büyük bölümü trigliseridler ve serbest yağ asitleridir. Alglerde lipid içeriğinin oranı %1-40 arasında değişir ve bazı koşullarda kuru ağırlığının % 85'i kadar olabilir. Algal lipidler C12-C22 arasında C numaralarına sahip yağ asitleri ile esterleşmiş bazlar, şekerler veya gliserolden oluşur. Bazı Cyanobakteriler daha çok doymamış yağ asitleri (toplamın % 25-60'ı) içermektedirler (Jank ve ark., 2005 Dijkstra., 2006).

Besinsel ve çevresel faktörler, total yağ içeriği kadar yağ asitlerinin birbirlerine göre oranlarını da etkileyebilmektedir. Azot sınırlaması ile büyüyen birçok mikroalg türünde artan lipid içeriği gözlenmiştir. 1940'ların sonlarında azot açlığının lipid deposu üzerinde etkili olduğu saptanmış ve kuru ağırlıkta % 70-85 lipid düzeyi rapor edilmiştir. *Dunaliella sp.* veya *Tetraselmis suecica* gibi bazı alg türleri ise düşük lipid içermekte ve genellikle lipitten çok karbonhidratları üretmektedirler. Azotun dışında diğer bazı besin eksiklikleri de lipid içeriğinde düşüşe sebep olabilmektedir. Örneğin diatomlarda lipid miktarı silikon açlığı sırasında artabilir. Farklı azot rejimlerinin bazı alg türleri (*Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris*, *Anacystis nidulans*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria rubescens*, *Spirulina platensis*) nin lipid içeriği ve büyümesi üzerine etkileri çalışılmıştır (Piorreck, Baasch ve Pohl 1984). Bu çalışmalarda, düşük azot seviyelerinde Chlorophyceae'nin yüksek düzeyde total lipid (biomasın %45) içerdiğini ve bunun % 70'inin triasilgliseroller gibi (başlıca 16:0 ve 18:1 yağ asitlerini içeren) nötral lipidlerden oluştuğu belirlenmiştir. Yüksek azot seviyelerinde total lipid yüzdesinin % 20 civarına düştüğü ve bunun da doymamış C16 ve C18 yağ asitlerini içeren polar lipidlerden oluştuğu belirlenmiştir. Büyümenin ilk

aşamalarında algler, polar lipidleri ve doymamış yağ asitlerini fazla miktarlarda üretmektedirler (Piorreck, ve ark., 1984).

Azot açlığında *Porphyridium cruentum*'un total lipid içeriğini (tamamıyla nötral lipidler) 2 katına çıkardığı rapor edilmiştir. Azot beslenmesinden başka alglerde lipid üretimine etki eden diğer faktörler de tanımlanmıştır. Örneğin artan ışık şiddetinin *Chlorella*'da mono ve digalaktosidigliseridler kadar doymamış C16 ve C18 yağ asitlerinin oluşumunu arttırdığı bilinmektedir. Yağ asidi kompozisyonu üzerine değişen CO₂ miktarının etkisi *Chlorella fusca* için tanımlanmıştır. Havada ki % 1 CO₂ ile muamele edilen ve ototrofik olarak büyüyen hücrelerde 16:0, 16:3, 16:4, 18:2 ve 18:3 C'lu yağ asitleri gözlenmiştir. Glukoz eklenen kültürlerde 16:4 C'lu yağ asidi kaybolurken 18:3 C'lu yağ asidi azalmış ve diğerleri artmıştır (Piorreck, ve ark 1984).

Düşük sıcaklıkların bazı alglerin doymamış 18:0 C'lu yağ asiti sentezini artırdığı bilinmektedir. Örneğin *Dunaliella*'nın yağ asidi kompozisyonundaki değişikliklerin sebebi de yine düşük sıcaklık olarak açıklanmıştır. Chlorophyceae'deki linoleik asit (18:3) yüksek bitkilerdeki gibidir. Halbuki Bacillariophyceae'de palmitik asit (16:0), hexadeceonik asit (16:1) ve polyenoik asit (C20) major yağ asitleridir. Rhodophyceae sınıfından *Porphyridium sp.*, palmitik (16:0), oleik (18:1) ve linoleik asitler (18:2) kadar arachidonik asiti (20:4) yüksek düzeylerde içermektedir. Kırmızı alg *Porphyridium cruentum* optimum kültür sıcaklığı olan 25 °C' de total yağ asitlerinin % 36'sı civarında arachidonic asit içeren en zengin doğal kaynaktır. Düşük sıcaklıklarda (16 °C) bu miktar % 60'a çıkabilir. Chrysophyt'ler 22:4 ve 22:6 yağ asitlerini önemli miktarlarda içermektedirler ve Dinophyceae sınıfı 16, 18, 20 ve 22 C lu doymamış yağ asitlerini yüksek miktarda bulundurmaktadırlar (Chisti, 2007).

Algal lipidlerde bulunan doymamış yağ asitlerinin bazıları eczacılıkta önemlidir. Bunlar prostaglandinlerin, prostacyclinlerin ve leucotrieneslerin öncü maddeleridir ve bunlar eczacılık endüstrisinde giderek önemli olmaya başlamışlardır. Doymamış yağ asitleri; antihipertensifler için, hiperlipidemia'nın tedavisi için ve kolesterolü düşürmek için vs. uygulanmıştır. Algal lipidlerin gelecek için umut verici uygulamaları her zaman düşünülmelidir. Gelecekte bazı alg türleri yenilenebilir

enerji kaynağı olarak kullanılabileceklerdir. Mikroalglerden yakıt eldesi yeni bir fikir olmamakla birlikte, son zamanlarda petrol fiyatlarının artışı, küresel ısınmanın nedenlerinden biri olan yakıtlardan çıkan gazların zarar verici özellikleri ve su sıkıntısı konuya olan ilgiyi giderek artırmıştır. Biyodizel kanıtlanmış bir yakıttır. Elli yıldan daha fazla bir süredir biyodizel kullanımı ve üretim teknolojisi bilinmektedir. Yeni bir kaynak olarak düşünülen mikroalgler, tek başına biyodizel için kullanılabilir (Chisti ve ark., 2007).

Son yıllarda biyoyakıt ürünlerinin yetiştirilmesinde kullanılan gübrelerden kaynaklanan ve bir sera gazı olan azotprotoksit (N_2O) nedeniyle fosil yakıtların daha az kullanılması sonucunda sağlanan karbondioksit salımındaki düşüşün önemini yitirebileceğine dair raporlar yazılmaktadır (Pearce ve Aldhous, 2007). Mikroalg türleri üzerinde denenen muamelelerin başında N eksikliği gelmektedir. Bu durumda mikroalgal üretimin diğer avantajlarına azotu eksik besi ortamlarında yağ içeriklerini artırmalarını da eklemek mümkündür.

Mikroalg üretimi genellikle diğer tarım bitkilerinin üretimine göre daha pahalıdır. Fotosentetik büyüme için ışık, karbondioksit, su ve inorganik tuzlara gereksinimi vardır. Sıcaklık 20-30 °C arasında olmalıdır. Biyodizel üretiminde bu pahalı sistemin üretim maliyetinin minimize edilmesi güneş ışığı, deniz suyu ve yanan fosil yakıtlardan çıkan karbondioksitin kullanılması ile sağlanabilir. Alg üretiminde kullanılan kültür ortamı azot, fosfor, demir gibi başlıca elementleri içermektedir (Grobbelaar, 2004). Deniz suyu bahsedilen bu elementler ile beraber çok sayıda mikro besin elementini içermektedir. Denizel mikroalglerin kültüründe de bu elementlerin varlığı kültür ortamının maliyetini düşürebilmektedir. Mikroalgal biomasın kuru ağırlığının yaklaşık % 50 sini karbon oluşturmaktadır. Bu karbonun tümü karbondioksitten karşılanmaktadır (Sanchez Miron ve ark., 2003). 100 ton algal biomasın üretimi için 183 ton karbondioksit ihtiyacı duyulmaktadır. Güneş ışığı olduğu sürece alglerin büyümesi için karbondioksit gereksinimi vardır. Biodizel üretimi için gerekli olan karbondioksit fosil yakıtlardan çıkan gazdan temin edilebilir. Bu karbondioksitin maliyeti çok düşüktür ya da hemen hemen hiç yoktur Sawayama ve ark., 1995; Yun ve ark., 1997).

Alglerin atıksu arıtımı, gübre, insan gıdası, hayvan yemi, kozmetik sanayinde kullanılmasının yanında son yıllarda enerji kaynağı olarak yenilenebilir, toksik olmayan biodiesel yakıt kaynağı olarak değerlendirme olanakları araştırılmaktadır. Bu amaçla yağ içeriği ve büyüme hızı yüksek mikroalg türlerinin belirlenmesi çalışmaları ile birlikte, hücre içinde mevcut yağ içeriğinin arttırılmasını uyaran stres koşullarının belirlenmesi araştırmaları da sürdürülmektedir. Yeşil Algler grubundan olan *Chlorella vulgaris* bu konuda üzerinde çalışılan türlerden biri olup bu çalışma ile *Chlorella vulgaris* türünün yağ içeriğinin arttırılmasını uyaran stres koşullarından besin eksikliği ve nitrit uygulaması laboratuvar ortamında çalışılmıştır.

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

Tsuzuki ve ark., 1990 yılında yaptıkları çalışmada, *Chlorella vulgaris*'e uygulanan farklı CO₂ düzeylerinin yağ asitleri içeriğine olan etkilerini araştırmışlardır. Buna göre; CO₂ miktarı artışının yağ asitleri oranını arttırdığı ve linoleik asit ile α -linoleik asit oranının önemli derecede değiştiği saptanmıştır.

Reitan ve ark. 1994 yılında yaptıkları çalışmada, *Phaeodactylum tricornutum* ve *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae), *Isochrysis galbana* (clone T-Iso) ve *Pavlova lutheri* (Prymnesiophyceae), *Nannochloris atomus* (Chlorophyceae), *Tetraselmis* sp. (Prasinophyceae), ve *Gymnodinium* sp. (Dinophyceae) türlerini farklı miktarda besin sınırlamaları ile kültüre almışlar ve türlerin lipid ve yağ asitleri içeriğine bakmışlardır. *Isochrysis galbana* ve *Pavlova lutheri*'de lipid oranı kuru ağırlıkta %8.3-29.5 arasında değişim göstermiştir. Prymnesiophyceae'nin lipid içeriği Prasinophyceae ve Chlorophyceae'nin lipid içeriğinden genellikle daha yüksektir. Bacillariophyceae ve Prymnesiophyceae'de fosfor sınırlaması ile lipid içeriği artış gösterirken, *N. atomus* ve *Tetraselmis* sp. türlerinde lipid miktarı azalmıştır. Besleyici element sınırlamasının da çoğunlukla n-3 uzun zincirli doymamış yağ asitlerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Loseva ve ark., 1998 yılında yaptıkları bir çalışmada sıcaklığın ve tuz oranının *Chlorella* hücreleri oranına etkisini inceledikleri çalışmalarında yüksek sıcaklık (45°C) ve yüksek NaCl (450 μ M) stres faktörleri uygulamalarından sonra *Chlorella* büyümesini incelemişlerdir. Bunun için belirli aralıklarda yüksek sıcaklık ve yüksek NaCl uygulamaları yapılmış ve bu süreçten sonra tekrar normal koşullar sağlanarak *Chlorella* hücrelerinin durumu gözlenmiştir. Böylelikle canlının stres faktörlerine adaptasyon sürecinin uzunluğu ortaya çıkarılmıştır.

Richardson ve ark., 1999 yılında yaptıkları çalışmada azot eksiltmesinin tek hücreli algin yapısı ve büyümesi üzerindeki etkisini ortaya çıkarmışlardır. Azot eksikliği sonucunda hücre içeriği, kalori değerleri, klorofil yapısı ve lipid içeriği incelenmiş, *Chlorella* sp'nin % 3 oranında N eksiltmesiyle 6. günde maksimum yağ asidi üretmesinin mümkün olduğu belirlenmiştir.

Ilman ve ark., 2000 yılında yürüttükleri çalışmalarında eksik azot uygulamasının farklı *Chlorella* türlerinde büyüme ve lipid içeriğine etkisini incelemişlerdir. Buna göre; hem normal koşullarda hem de düşük N uygulamasında *C. vulgaris*'in çalışılan diğer dört türe göre en iyi gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada 5 türün kültüre alındığı bio-reaktör tanklarına N eksik besi ortamları hazırlanmış ve kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. *C. emersonii*'nin bu uygulamadan diğer türlere göre daha fazla etkilendiği ve hücre sayısındaki artışın diğer türlere göre en fazla olduğu ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca 5 farklı *Chlorella* türünde belirlenen % lipid değerlerinin *C. sorokiniana* dışındaki diğer dört türde (*C. vulgaris*; *C. minutissima*; *C. emersonii*, *C. protothecoides*) yaklaşık olarak 2'şer kat arttığı belirlenmiştir. *C. sorokiniana*'da ise bu değer hemen hemen kontrol grubu ile aynı düzeyde kalmıştır.

Fuentes ve ark., 2001 yılında yürüttükleri çalışmada denizel Eustigmatophyte *Nannochloropsis* spp. türünü sürekli aydınlatma ile kültüre almışlardır. Belirlenen ortalama biyomas içeriği % 37,6 karbonhidrat , % 28,8 ham protein ve % 18,4 toplam lipid olmuştur.

Renaud ve ark., 2002 yılında yaptıkları çalışmada *Isochrysis* sp, *Chaetoceros* sp., *Rhodomonas* sp. ve *Cryptomonas* sp. türlerini 5 farklı sıcaklık derecesinde (25, 27, 30, 33 ve 35 °C), %025 tuzluluk, 8.3 pH ve 80 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda, 12:12 aydınlık-karanlık periyodu uygulayarak kültüre almış ve kimyasal kompozisyon ile yağ asitleri kompozisyonunu incelemişlerdir. 25 °C'de *Chaetoceros* sp. %16.8 ile en yüksek lipid oranına sahipken, 27-30 °C'lerde en yüksek lipid oranı %21.7 ile *Isochrysis* sp.'de bulunmuştur.

Scragg ve Shales (2003) dizel motorların yağları gibi iş görecektir, parça içerikli uzun süre korunan yakıtlar üzerinde çalışmışlardır. Bir çok alg, örneğin *Chlorella vulgaris* gibi tek hücreli ve 5-10 mikron boyutunda ki tür, emülsiyonun içeriği bakımından uygun bulunmuştur. Araştırma sonucunda değişiklik yapılmayan tek silindirli dizel bir motorda *Chlorella vulgaris*'in yakıt olarak kullanılabilirliğini belirlemişlerdir.

Rodolfi ve ark, 2003 yılında yaptıkları çalışmada, 4 farklı mikroalg türünü (2 deniz türü ve 2 tatlı su türü) azot eksikliği uygulayarak alveolar panel sistemde yapay aydınlatma ve yeşil duvar panellerde dışarı ortamda kültüre almışlardır. *Nannochloropsis* sp., 4 gün sonra alveolar panel sistemde yüksek aydınlatma ile lipid oranını % 60'a yükseltmiştir. Yağ asidi kompozisyonu ise azot ve fosfor eksikliğinde kuru ağırlığının % 50 ve daha yukarısına ulaşmıştır.

Maccarthy ve Patterson 2004 yılında çalışmalarında *Chlorella* biyokimyasında besin ortamının katyon düzeylerinin etkisini araştırmışlardır. Bunun için düşük, orta ve yüksek dozda Mg^{+2} ve K^{+} ilavesi yapılmış ve *C. sorokiniana*'da sırasıyla toplam azot, lipid, toplam yağ asitleri, doymuş yağ asitleri, doymamış yağ asitleri ve doymamış ve doymuş yağ asitleri oranları incelenmiştir. Buna göre toplam azot, en yüksek değere (% 9.4) yüksek dozda Mg^{+2} ve K^{+} uygulamasında; toplam lipid, yağ asidi ve doymuş yağ asidi en yüksek değere sırasıyla % 38.6, % 8.8 ve % 5.0 değerine orta Mg^{+2} ve düşük K^{+} uygulamasında, doymamış yağ asidi oranı ise en yüksek (% 5.0) değere orta Mg^{+2} ve yüksek K^{+} uygulaması sonucunda olduğu ortaya konmuştur. Doymamış ve doymuş yağ asidi oranı ise en yüksek 2.1 oranı ile orta Mg^{+2} ve yüksek K^{+} uygulamaları sonucunda elde edilmiştir.

Miao ve Wu (2005) transesterifikasyon teknolojisi yoluyla bir mikroalg türü olan *Chlorella protothecoides*'den yüksek kalitede biyodizel elde etmek için çalışmışlardır. Araştırma sonunda heterotrofik olarak üretilen *Chlorella protothecoides* kültürlerinde yüksek yağ oranı (% 55) saptanmış ve aynı zamanda hücre yoğunluğu (15.5 g L^{-1}) nun önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, azot kaynakları ve konsantrasyonlarının *Nannochloropsis oculata* türünde karotenoidler ve klorofil-*a* içeriği üzerine etkileri incelenmiştir. *N. oculata*, laboratuvar koşullarında, 2 L'lik erlenlerde, F/2 besin ortamı ile zenginleştirilmiş steril deniz suyunda, % 2.5 tuzlulukta kültüre alınmıştır. Kültürler $18\pm1^{\circ}\text{C}$ sabit sıcaklıkta tutulmuştur. Azot kaynağı olarak sodyum nitrat, amonyum klorür ve üre kullanılmıştır. Azot kaynakları besin ortamlarına 882 ve 441 $\mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonlarında eklenmişlerdir. Denemeler sonunda β -karoten, klorofil-*a*, klorofil-*b*, violaksantin, kantaksantin, astaksantin, vokeriyaksantin ve zeaksantin *N.oculata*'da ana pigmentler olarak TLC yöntemi ile saptanmıştır. Toplam karotenoidler ve klorofil *a* düzeyleri bakımından en yüksek değerler 882 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NO^{3-} -N ile hazırlanan besin ortamında edilmiştir. Kuru maddede belirlenen karotenoid miktarı $4.17\pm0.37 \text{ mg g}^{-1}$ ve klorofil *a* içeriği ise $12.42\pm1.08 \text{ mg g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. *N. oculata* türü için inorganik azot kaynaklarından NO^{3-} -N ve NH_4^{+} -N ile büyüme ve biyokimyasal yapı açısından benzer sonuçlar elde edilmiştir. Fakat üre-N'nun bu tür için uygun kaynak olmadığı tespit edilmiştir (Durmaz, 2006).

Takagi ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları bir çalışma da *Dunaliella* hücrelerinde triacylglycerin ve lipidlerin birikmesinde tuz stresinin etkisini araştırmışlardır. 1.5 M'den daha yüksek NaCl konsantrasyonunun belirgin şekilde hücre büyümesini engellemesine rağmen, NaCl konsantrasyonunu 0.5'ten 1.0 M'e (Deniz suyuna eş) arttırılması sonucu logaritmik evrenin ortalarında 0.5 M tuz konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında daha yüksek hücre içi lipid saptanmıştır (% 60) veya 1.0 M NaCl konsantrasyonunda kültüre alındığında logaritmik evrenin sonunda lipid içeriğini daha fazla artırdığı (%70) belirlenmiştir.

Xu ve ark., 2006 yılında yaptıkları çalışmada yüksek kaliteli bio-dizel elde etmek amacıyla *C. protothecoides*'in heterotrofik ve ototrofik yetiştirme şartlarında bio-dizel olarak kullanım olanaklarını karşılaştırmışlardır. Buna göre *C. protothecoides*'in ototrofik olarak kültüre alındığında hücre içerisindeki protein oranının heterotrofik beslemeye göre 5 kat arttığı ($54.64 \text{ (Ot.)} / 10.28 \text{ (Het.)}$), ancak yağ

(lipid) oranının 4 kat (14.57 (Ot) / 55.20(Het)) ve karbonhidrat oranının 1.5 kat (10.62 (Ot) / 15.43 (Het)) olduğu kaydedilmiştir.

Petkov ve Garcia, 2007 yılında yaptıkları çalışmalarında, farklı *Chlorella* türlerindeki yağ oranını incelemişler ve daha önce yapılan benzer çalışmalarla karşılaştırmışlardır. Yağ oranlarını karşılaştırmak için, farklı *Chlorella* türlerini fotototrofik, heterotrofik ve dışarı koşullarında üretmişler, türler üzerinde N eksilmesi uygulayarak yağ içeriklerini incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre 20 karbonlu ve 4 ya da 5 çift bağlı yağ asidinin tür farklılığından kaynaklanmadığı düşünülmüştür. Tatlı su alglerinden *C. pyrenoidosa*'nın fotototrofik olarak yetiştirildiğinde N eksilmesi sonucunda yağ asidi miktarının arttığı da çalışma sonucunda ortaya konmuştur.

Yapılan bir çalışmada *Chaetoceros calcitrans* su ürünleri yetiştiriciliğinde canlı yem kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışmada laboratuvar koşulları altında farklı sıcaklık (20-25 ve 30°C), tuzluluk (%025-30) koşullarında ve CO₂ vererek havalandırma ile kültüre almışlar ve *C. calcitrans*'da büyüme, biyomas, karbohidrat, lipid ve protein miktarına etkilerine bakmışlardır. Büyüme ve biyomas değerleri karbondioksit ilavesinden etkilenirken, tuzluluk ve sıcaklık değişiminden çok az etkilenmiştir. Genelde, lipid ve karbohidrat içeriği, düşük sıcaklıklarda (20 ve 25 ° C) daha yüksek iken protein içeriği etkilenmemiştir. Karbondioksit eklemesi protein değerini artırırken, karbohidratı düşürmüş, lipid oranını değiştirmemiştir. Yüksek tuzlulukta karbohidrat artış göstermiş, protein ve lipid oranlarında düşüşler olmuştur. (Raghavan ve ark., 2008).

Chiu ve ark., 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada, *Nannochloropsis oculata*'nın lipid depolaması ve biyomas verimliliğinde CO₂ in etkilerini araştırmışlardır. *N. oculata* hücrelerinin lipid içeriği farklı büyüme safhalarında incelenmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki logaritmik fazdan duraklama fazına kadar lipid depolama *N. oculata* NTCU-3 de % 30,8 den % 50,4 e önemli derecede artış

göstermiştir. Mikroalg kültürleri % 2, % 5, % 10 ve % 15 CO₂ havalandırılmıştır. Maksimum biyomas ve lipid verimliliği % 2 CO₂ verilen kültürde olmuştur.

Li ve ark. (2008) yaptıkları bir çalışmada *Neochloris oleoabundans* türünü farklı azot kaynakları (nitrat, üre ve amonyum) kullanarak kültüre almış, hücre büyümesi ve lipid birikimi üzerine etkisini çalışmışlardır. En fazla biyomas nitrat ile 2.5 g/l olarak bulunurken, en düşük büyüme ise 1.1 g/l ile amonyumda bulunmuştur. En yüksek lipid oranının da %38 ile nitrat uygulamasında elde edildiğini bildirmişlerdir.

Weldy ve Huesemann 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada *Dunaliella salina*'yı iki farklı ışık yoğunluğunda (200 ve 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ve N sınırlaması yaparak fotobiyoreaktör sistemde kültüre almışlardır. Lipid miktarının değişimine bakmışlar ve yüksek ışık ve N eksiltmesinin olduğu kültürde büyüme fazının başında %16 olan lipid oranının durgunluk fazının başında %44'e çıktığını gözlemişlerdir ve bu oranın yüksek ışık altında %38'lerde kaldığını bildirmişlerdir. Mikroalglerden lipit üretimi ve uygun biodiesel üretimi, 1970'lerden beri çalışılmaktadır, fakat birçok alg türü için büyük ölçekli üretim ve büyüme koşullarının yüksek maliyeti yüzünden çalışmalar yarım kalmıştır. Yürütülen bir çalışmada, lipitler ve biodiesel üretiminin bir kaynağı olarak *Dunaliella salina*'ya odaklanılmıştır. Lipit üretimi için yüksek ışık ve azot eksikliği uygulanan kültür koşulları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki hücre lipid içerik oranı %16'dan 44'e artmış ve maksimum lipit konsantrasyonu 450 mg lipid/L olarak saptanmıştır. Üretilen yüksek lipit miktarları, verimsiz yığın-kültürü yapılabilen, steril olmayan açık havuzlarda, yenilenebilir yağ ve biodiesel üretimi için ekonomik bir kaynak olması bakımından güçlü potansiyele sahip bir tür olarak *D. salina*'nın uygunluğunu göstermiştir.

Pruvost ve ark. 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada mikroalg *Neochloris oleoabundans*'ın, özellikle triacylglyceroller (TAG) ve lipitleri biriktirme yeteneğine bakmışlardır. Besin sınırlaması olmadan en yüksek biyomas üretim verimliliği 16.5

$\text{g m}^{-2} \text{gün}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Lipit birikmesine neden olan azot açlığının etkileri bundan sonra araştırılmıştır. *N. oleoabundans*'da kuru maddede toplam %23 lipit içeriği, $3.8 \text{ g m}^{-2} \text{gün}^{-1}$ ile mineral sınırlaması olmadan elde edilmiştir.

Liang ve ark., 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada *Chlorella vulgaris*'de farklı büyüme koşulunda biomas ve lipid üretimini araştırmışlardır. Kültürler ototrofik ve heterotrofik olarak büyümeye alınmışlar, ototrofik büyüme ile daha yüksek lipid içeriği (% 38) sağlanmış, heterotrofik büyümede ise glukoz, asetat ve gliserol kullanımı ile çok daha az lipid üretimi olduğu saptanmıştır. Optimal hücre yoğunluğu (2 g l^{-1}) ve lipid üretimine ($54 \text{ mg}^{-1} \text{gün}^{-1}$) % 1 glikoz kullanımında ulaşılmıştır.

3.MATERYAL VE METOD**3.1.Materyal****3.1.1. *Chlorella vulgaris***

Çalışmada yeşil alger grubuna ait *Chlorella vulgaris* kullanılmıştır. *Chlorella vulgaris* sistematigi aşağıda ki gibidir. (Güner ve Aysel, 1989)

Alem : Protista (Bitkiler ve Hayvanlar)

Bölüm : Chlorophyta (Yeşil algler)

Sınıf : Chlorophyceae

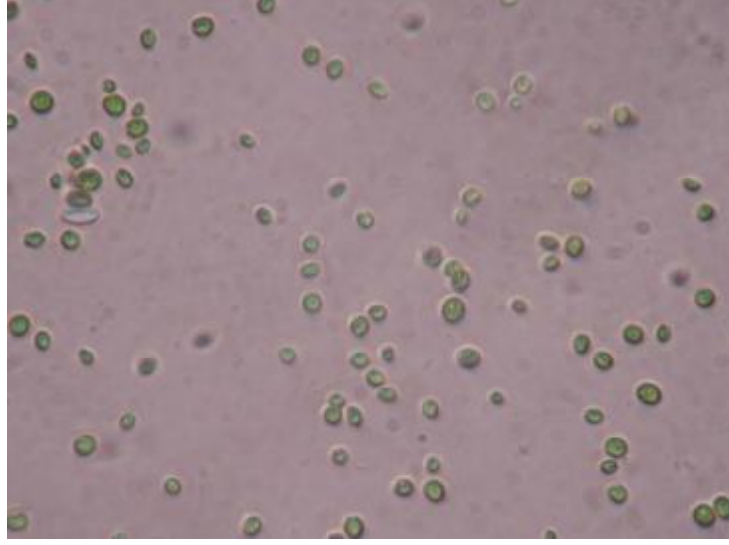
Takım: Chlorococcales

Aile : Oocystaceae

Cins : *Chlorella*

Tür : *Chlorella vulgaris*

Chlorella, tek hücreli olmakla birlikte vitamin, protein, mineral, aminoasitler, nükleik asitler (RNA, DNA), temel yağ asitleri, enzimler ve karotenoidlerin yoğun bir kaynağıdır. Bu besinleri saf, katkısız ve doğal olarak mükemmel bir denge içerisinde barındırır ve tek başına tam bir besindir. % 50-60 oranında proteinden oluşmakta olup klorofil'in doğada bilinen en yüksek oranlı kaynağıdır. Ayrıca demir, iyot, çinko, magnezyum, fosfor ve kalsiyum da içermektedir. *Chlorella*, sığır karaciğerinin içermekte olduğu B₁₂ vitamininden daha fazla B₁₂ vitamini içerir (Jensen,1987, Singh, 1998). Diğer algler arasında dağınık halde bulunur veya bazen hemen hemen saf halde büyüme gösterir. Kloroplastlar, kase görünümündedir (Şekil 3.1.). Zaman zaman pyrenoidler bulunmayabilir. Hücreler genellikle 5-8,5 µ çapında olup hücreleri küreseldir (Prescott,1962). İsmi, Latince'de 'küçük, taze yeşil' anlamına gelen ve bitkiler aleminde adını içinde taşıdığı klorofilden alan yeşil bir plankton cinsidir. Bilinen en eski canlılardan ve besin kaynaklarından biridir. İlk saf kültürü Hollandalı mikrobiyolog M. J. Beijerinck tarafından 1890 yılın da yapılmıştır.



Şekil 3.1. *Chlorella vulgaris*

3.2. Metod

3.2.1.Üretim

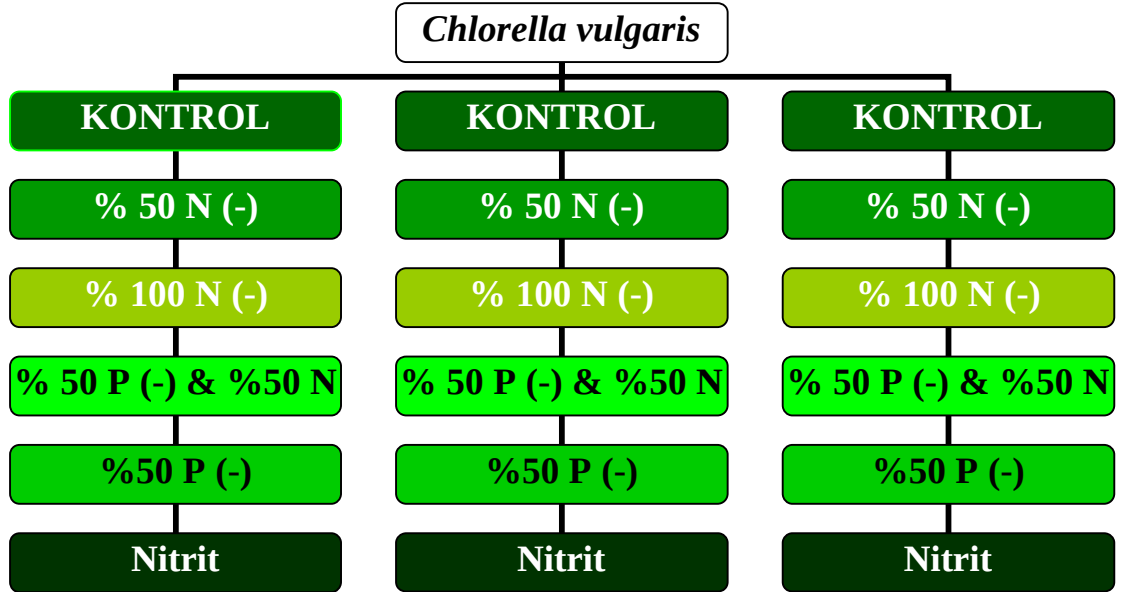
C. vulgaris yarı sürekli kültür yöntemi ile 3 tekrarlı olarak 8'er litrelik cam kavanozlarda kültüre alınmıştır. Kültürlerin bulunduğu ortam sıcaklığı 22 ± 2 °C olarak ayarlanmış ve $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu uygulanmıştır. Raflara yerleştirilen kültürlere bir kompresör aracılığı ile havalandırma sağlanmıştır (Şekil 3.2.)



Şekil 3.2. $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu altında raflara yerleştirilen kültürler.

Denemede yağ içeriğini artıracak farklı stres muameleleri uygulanmıştır. Uygulanan bu muameleler çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hücrelerde stres yaratacak olan muameleler ;



Kültürlerin aşı miktarları % 20 olacak şekilde 1,4 L aşı ve 5,6 L besi ortamı kullanılmıştır. Kültürlerde aydınlık-karanlık (16/8) uygulanmış olup *C.vulgaris* için aşının optik yoğunluk (OD) değeri 500 nm’de 1.1051 olarak okunmuştur (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Denemede kullanılan *Chlorella vulgaris* kültürleri.

Denemenin başladığı günden itibaren günlük olarak pH, optik yoğunluk ölçümleri yapılmış, kuru madde ve klorofil-*a* analizleri yapılarak miktarları belirlenmiştir. Denemenin bitiminden sonra elde edilen biyomas ile yağ ve protein analizleri yapılmıştır.

3.2.2. Kültür Ortamı

Üretimi yapılan *Chlorella vulgaris*'in besi ortamı olan Jaworski aşağıdaki besin elementlerinden oluşmaktadır. Jaworski ortamı çizelge 3.2. de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Jaworski Chlorella vulgaris Besi Ortamı

Jaworski Ortamı	
Stok Solüsyonlar	200 ml için (g)
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4,0
KH ₂ HO ₄	2,48
MgSO ₄ .7H ₂ O	10,0
NaHCO ₃	3,18
EDTA FeNa	0,45
EDTA Na ₂	0,45
H ₃ BO ₃	0,496
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,278
(NH ₄) 6Mo ₇ O ₂ 4.4H ₂ O	0,2
Cyanocobalamin (Vit.B ₁₂)	0,008
Thiamine HCL (Vit. B ₁)	0,008
Biotin	0,008
NaNO ₃	16,0
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	7,2
Her birinden	1 ml
Distile su	1,01

3.2.3. *Chlorella vulgaris* Stok Kùltürleri

Denemelerde aş1 olarak kullanılmak üzere üretilen *Chlorella vulgaris* türleri iklimlendirme cihazı kullanılarak 22 ± 2 °C sıcaklıkta, $80 \text{ (}\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}\text{)}$ aydınlık şiddetinde tutulmuş olup deneme süresince kùltürlere aydınlık-karanlık (16-8 saat) uygulanmıştır. Stoklar 250 ml'lik erlenler'de üretime alınmış ve laboratuvar koşullarında 500 ml, 2L'ye çoğaltılmış ve 8 litrelik kavanozların aşılmasında kullanılmışlardır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *Chlorella vulgaris*'e ait kullanılan stok kùltürler.

3.2.4 Hasat

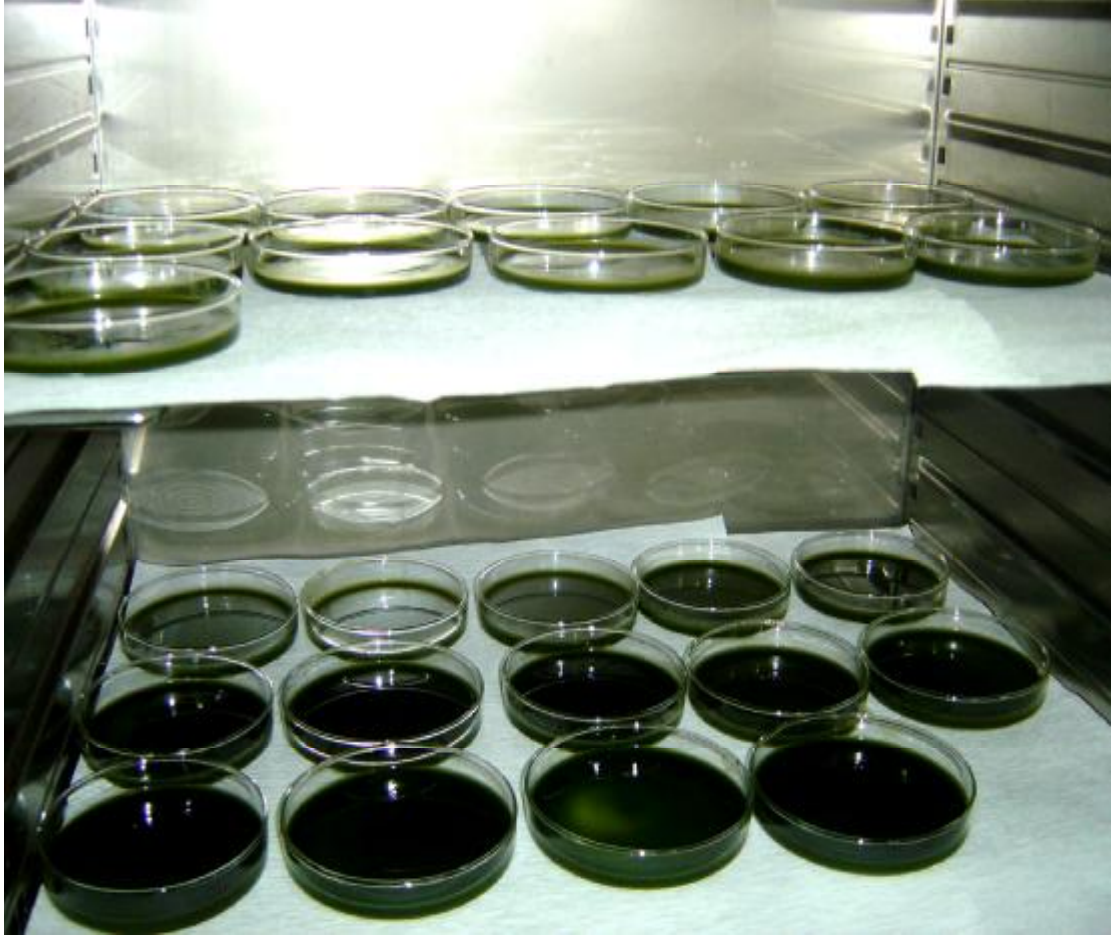
Kültürlerde logaritmik evrenin bitimi ve duraklama evresinin izlenmesi, klorofil-*a* ve optik yoğunluk değerlerine göre yapılmıştır. Denemenin sona erdirilmesinden hemen sonra büyük hacimler için uygun olan bir santrifüj kullanılmıştır ve kültürler 7500 rpm de 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. *Chlorella vulgaris* kültürlerinin hasatı.

3.2.5. Kurutma

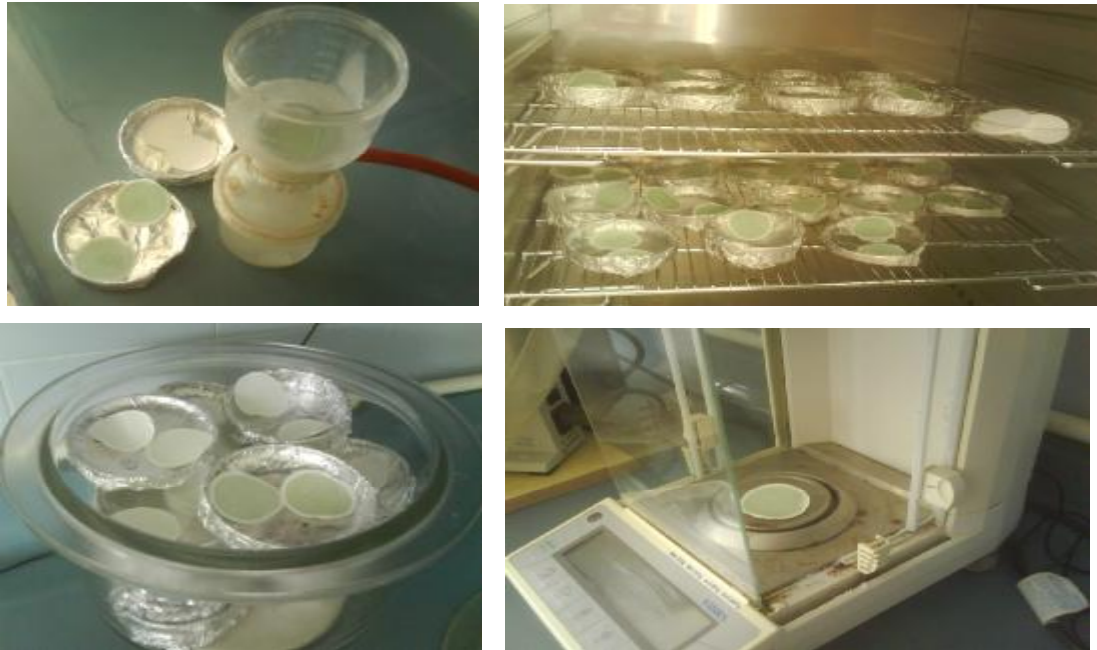
Santrifüj edilen her gruptaki yaş materyal cam petri kaplarında 55 °C’de iki saat süre ile kurutma dolabında kurutulmuştur (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 *Chlorella vulgaris* kültürüne ait kurutulan örnekler

3.2.6. Deneme Süresince Günlük Yapılan Analizler**3.2.6.1. Kuru Madde Analizi**

Kuru madde miktarlarının saptanması için, günlük olarak her kavanozdan 50'şer mL mikroalg kültürü alınmıştır. Daha önce 105 °C'de 1 saat etüvde tutulmuş, desikatörde soğutulmuş ve darası alınmış 0.45 µ göz açıklığındaki Whatman GF/C filtre kağıtlarından, süzme düzeneği ve bir su trombu kullanılarak oluşturulan vakum yardımıyla *Chlorella vulgaris* hücreleri ortamdan ayrılarak yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaştırılmış hücreler, HCL ile pH'ı 4 e ayarlanmış olan solüsyon ile yıkanmıştır. 0.001 g duyarlı terazide ağırlıkları alınmış petri kapları içerisinde belirli miktarlarda tartılarak, önceden 105 °C'ye getirilen etüvde 2 saat tutulmuştur. Bu süre sonunda petri kapları bir desikatöre konularak, oda sıcaklığına kadar soğumaları sağlanmış ve daha sonra 0.001 g duyarlı terazide tartımları yapılmıştır. Örnekler yaş iken yapılan tartım sonucu elde edilen rakamdan, kurutulduktan sonraki tartım değeri çıkarılarak kuru madde miktarı hesaplanmış ve % değerler elde edilmiştir (Vonshak., 1997) (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7 *Chlorella vulgaris*'e ait kuru madde analizi

3.2.6.2. Klorofil Analizi

Deneme boyunca klorofil-*a* miktarını belirlemek için her bir kavanozdan 10'ar ml örnek alınmıştır. Klorofil-*a* analizi için alınan 10 ml'lik örnek su trombu yardımıyla GF/6 filtre kağıdın dan süzölmüş, sonra filtre kağıtları oda sıcaklığında karanlıkta 2-4 saat kurumaya bırakılmıştır. Nispeten kuruyan filtre kâğıtları, içinde 10 ml % 90'luk aseton bulunan deney tüplerine konulmuştur. Asiditenin artması ve pigmentin zarar görmesini önlemek amacıyla filtre sırasında 2 damla % 1'lik MgCO₃ eklenmiştir. Ağızları mantar tıpa ile kapatılan deney tüpleri çalkalandıktan sonra buzdolabında (+4 °C) 24 saat karanlıkta bırakılmış ve ekstraksiyon süresi sonunda 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki berrak kısım alınarak spektrofotometrede 630, 645, 665, 750 nm'de absorpsiyon değerleri ölçölmüştür. Ölçölen değerler 750 nm'de ki absorbansın çıkarılmasıyla düzeltilerek aşğıdaki denkleme yerleştirilmiş ve klorofil-*a* miktarı hesaplanmıştır (Parsons ve Strickland, 1963).

$$\text{Chl.a} = 11.6 * D_{665} - 0.14 * D_{630} - 1.31 * D_{645}$$

$$\mu\text{g/L} = \frac{\text{Chl.a} * v}{1 * V}$$

V= Filtre edilen su örneğı(L)

v= Kullanılan asetonun hacmi (ml)

l= Küvetten geçen ışık yolu (cm)

3.2.6.3. Optik Yoğunluk

Optik yoğunluğu ölçmek için günlük olarak kültürler homojen olarak karıştırıldıktan sonra bir pipet yardımıyla 3 ml örnek alınmıştır. Tüplere alınan örnekler kuartz küvetlere konularak görünür spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır (Liu ve ark., 2007) (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. *Chlorella vulgaris* kültürlerinin optik yoğunluk değerini ölçmede kullanılan spektrofotometre cihazı.

3.2.7. Deneme Sonunda Yapılan Analizler

3.2.7.1 Lipit Analizi

Lipit analizi Bligh ve Dyer (1959)'in uyguladığı yönteme göre yapılmıştır. 0,2 g homojenize edilmiş örnek, üzerine 120 ml metanol/kloroform (1/2) eklendikten sonra Warring blender ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu örnekler üzerine 20 ml % 0,4'lük CaCl_2 solüsyonundan eklenerek süzme kağıdın dan (Scleicher&Schuell, 595^{1/2} 185 mm) süzülen örnekler, 105 °C'de 2 saat etüvde bekletilip darası alınmış olan balon jodelere süzdürülmüştür. Bu balonlar ağızları hava almayacak şekilde kapatılıp 1 gece karanlık bir ortamda bekletilmiş ve ertesi gün metanol-sudan oluşan üst tabaka bir ayırma hunisi yardımıyla alınmıştır. Balonların içinde kalan kloroform-lipit kısmından kloroform +60 °C'de su banyosunda rotary evaporatör kullanılarak uçurulmuştur. Daha sonra balonlar etüvde 1 saat süreyle 90 °C'de bekletilerek içerisindeki kloroformun tamamının uçması sağlanmış ve bir desikatör içerisinde oda sıcaklığına kadar soğutulup 0.1 mg duyarlı hassas terazide tartılmıştır. Lipit oranının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır (Şekil 3.9).

$$\text{Lipit miktarı (\%)} = \frac{[\text{Balon Darası(g)} + \text{Lipit(g)}] - [\text{Balon Darası (g)}]}{\text{Örnek Miktarı (g)}} \times 100$$

Örnek Miktarı (g)



Şekil 3.9. *Chlorella vulgaris*'e ait lipid analizi.

3.2.7.2. Protein Analizi

Toplam ham protein Kjeldahl metoduna (AOAC, 1998) göre Kjeldahl cihazında yapılmıştır (Şekil 3.10). Protein analizine başlamadan önce analiz için gerekli olan solüsyonlar hazırlanmıştır.

Solüsyonların Hazırlanması

- § % 40'lık NaOH hazırlanmıştır (40gr NaOH 100 ml tamamlandı).
- § Her örnek için 20 ml saf sülfirik asit hazırlanmıştır.
- § Her örnek için 25 ml özel hazırlanmış borik asit ağırlıklı çözelti kullanılmıştır.
- § Analiz için Khioldal protein katalizörü (2 gr) kullanılmıştır.

Protein Analizinin Yapılışı

- § Her bir örnek için 1'er gr kurutulmuş *Chlorella vulgaris* kullanılmıştır.
- § Khioldal tüplerine, kör hariç 1'er gr kurutulmuş *Chlorella vulgaris* örneği konulmuştur.
- § Körde dahil üzerlerine 2 gr Khioldal protein katalizörü ilave edilmiştir.
- § Körde dahil üzerlerine 20'şer ml'lik sülfirik asit ilave edilmiştir.
- § Yaklaşık 2-2,5 saat örnekler yakma ünitesine konulmuştur ve renkleri yeşil oluncaya kadar bekletilmiştir.
- § Yakma ünitesinden çıkarılan örneklerin biraz soğuması için beklenmiştir.
- § Soğuyan örneklerin üzerine 75 ml saf su eklenmiştir.
- § Örnek sayısı kadar erlen alınmış ve erlenlerin içerisine 25 ml özel hazırlanmış borik asit ağırlıklı çözeltiden ilave edilip Khioldal cihazında yerlerine yerleştirilmiştir.
- § Daha sonra biriktirilen solüsyona (N'lu bileşikler 200 ml ~) titrimetrik yöntemle örnek mor oluncaya kadar 25 ml-100 ml arasında HCl eklenmiştir.
- § Kör için 0.1 ml'lik HCl sarfiyatı olmuştur.

Örnekler aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır;

$$\%N = \frac{14.01 \times (A-B) \times M}{g \times 10} \times 100$$
$$\%Protein = \%N \times 6.25$$

A: Örnek için sarf edilen HCl miktarı

B: Kör için sarf edilen HCl miktarı

M: Asit molaritesi

g: Örnek miktarı



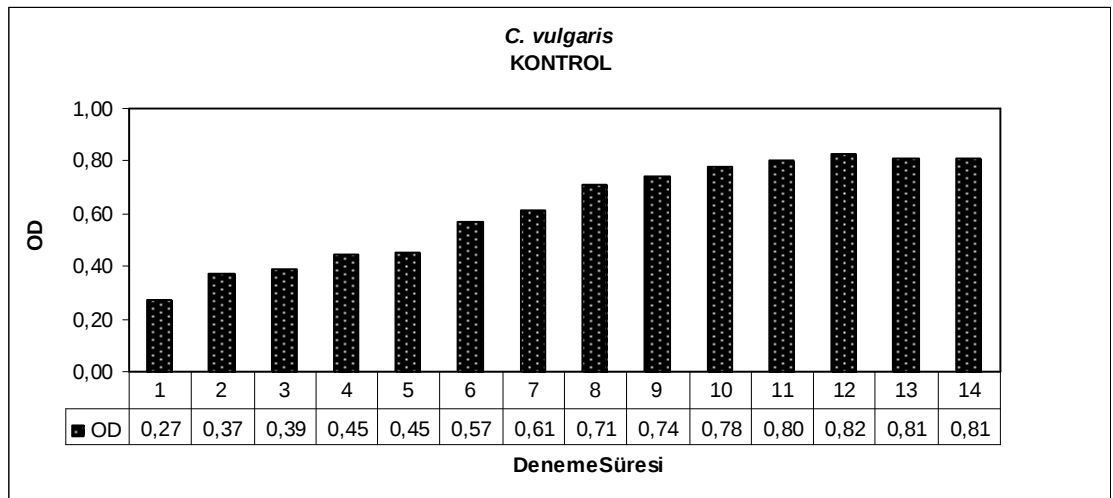
Şekil 3.10 Protein analizinde kullanılan Kjielhal cihazı.

4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Algal Biyoteknoloji Laboratuvarında besin eksikliğinin ve azot kaynağı olarak Nitrit kullanımının *Chlorella vulgaris* türünde yağ içeriğine etkisini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N , %50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muameleleri uygulanmıştır. Denemede sıcaklık (°C), aydınlık şiddeti ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ölçümleri yapılmış, günlük olarak pH, klorofil *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$), kuru ağırlık (g/mL^{-1}), optik yoğunluk, yağ(%) ve protein miktarları belirlenmiştir. Tüm muamele gruplarında $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu uygulanmıştır.

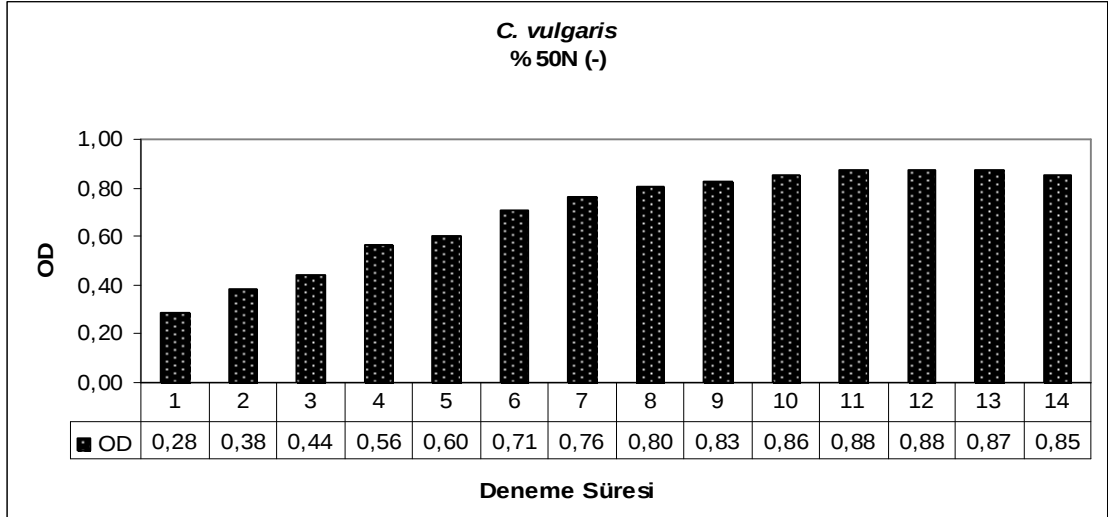
4.1. Optik Yoğunluk (OD)

Bu denemede kontrol grubu ile birlikte beş farklı muamele uygulanmıştır. Uygulanan muamelelerin *Chlorella vulgaris* kültürlerinde bir büyüme parametresi olan OD üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu muameleler; % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N ,%50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi olup kontrol grubuna ait en düşük ve en yüksek optik yoğunluk değerleri sırasıyla 0.27 ± 0.01 , 0.82 ± 0.11 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna ait deneme 14 gün sürmüştür. Kontrol grubu kültürlerine ait optik yoğunluğun değişim grafiği Şekil 4.1.'de verilmiştir.



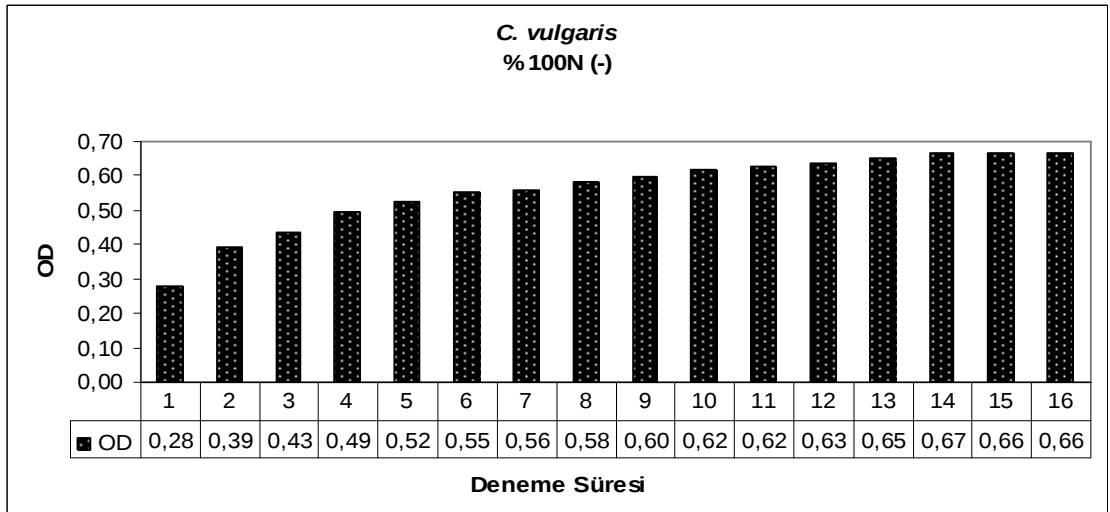
Şekil 4.1. *C. vulgaris* kontrol grubu OD değerleri.

C. vulgaris kültüründe, 14 gün süren % 50 N eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek optik yoğunluk değerleri sırasıyla 0.28 ± 0.04 , 0.88 ± 0.11 olarak bulunmuştur. %50 N eksikliğinin uygulandığı kültürlerle ait optik yoğunluğun değişim grafiği Şekil 4.2.'de verilmiştir.



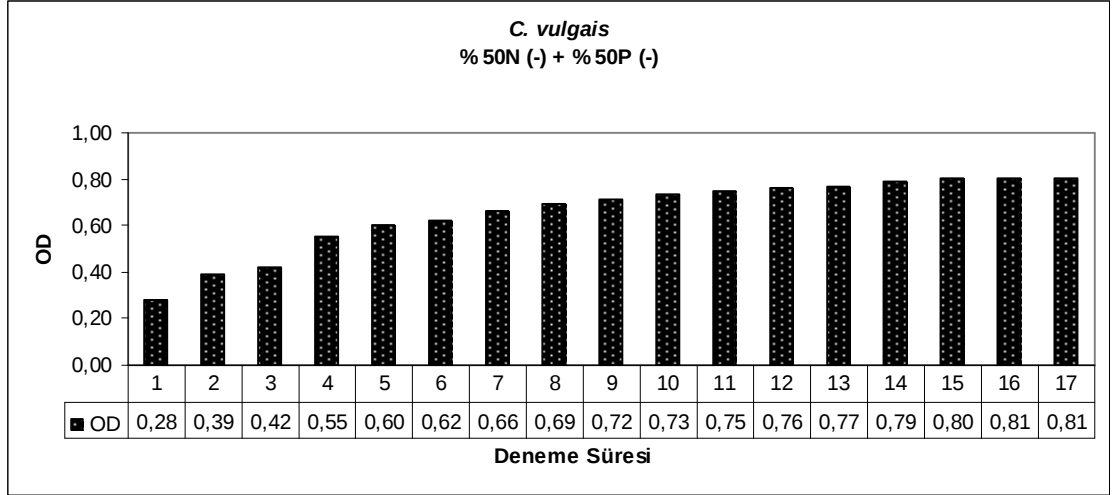
Şekil 4.2. %50 N eksilmesi yapılan *C.vulgaris* kültürlerinde OD değerleri.

C. vulgaris kültüründe, 16 gün süren % 100 N eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek optik yoğunluk değerleri sırasıyla 0.28 ± 0.001 , 0.67 ± 0.024 olarak bulunmuştur. % 100 N eksikliğinin uygulandığı kültürlerle ait optik yoğunluğun değişim grafiği Şekil 4.3.'de verilmiştir.



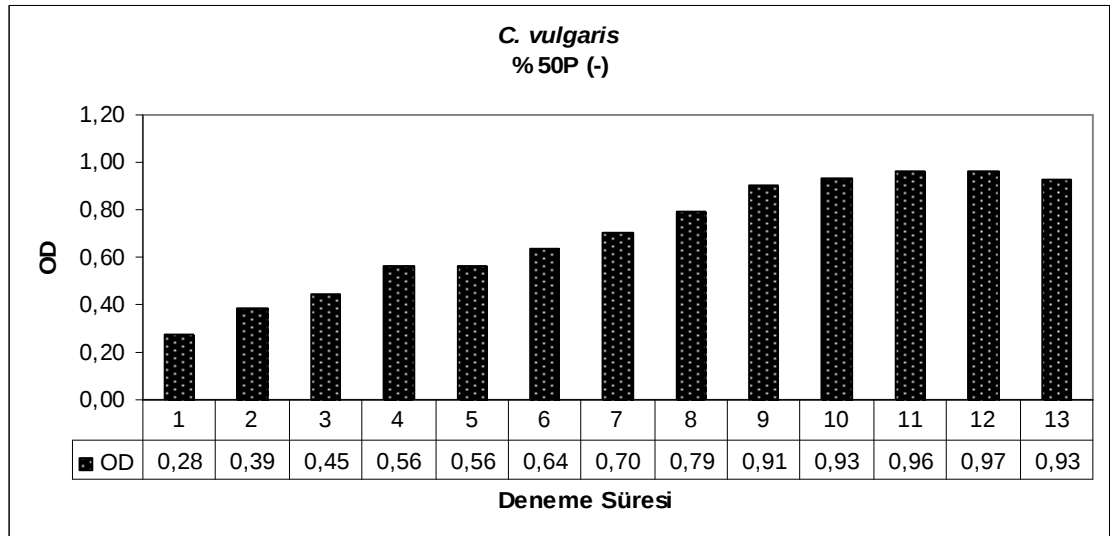
Şekil 4.3. %100 N eksilmesi yapılan *C.vulgaris* kültürlerinde OD değerleri.

C. vulgaris kültüründe, 17 gün süren % 50 N ve % 50 P eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek optik yoğunluk değerleri sırasıyla $0,28 \pm 0,007$, $0,81 \pm 0,080$ olarak bulunmuştur. % 50 N ve % 50 P eksikliğinin uygulandığı kültürlere ait optik yoğunluğun değişim grafiği Şekil 4.4.'de verilmiştir.



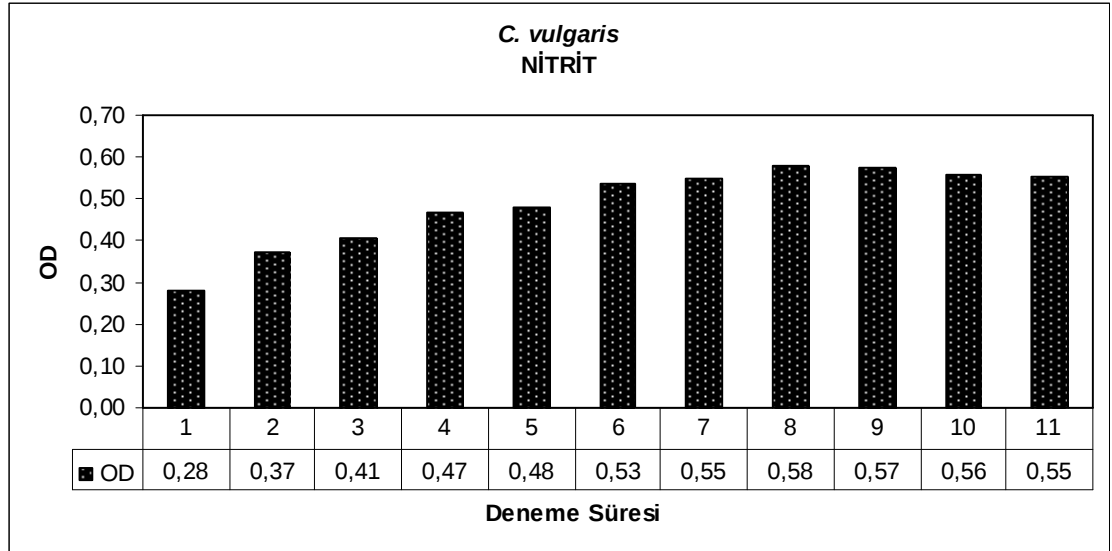
Şekil 4.4 %50 N ve %50 P eksiltmesi yapılan *C.vulgaris* kültürlerinde OD değerleri.

C. vulgaris kültüründe, 13 gün süren % 50 P eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek optik yoğunluk değerleri sırasıyla $0,28 \pm 0,07$, $0,97 \pm 0,067$ olarak bulunmuştur. % 50 P eksikliğinin uygulandığı kültürlere ait optik yoğunluğun değişim grafiği Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. % 50 P eksiltmesi yapılan *C.vulgaris* kültürlerinde OD değerleri.

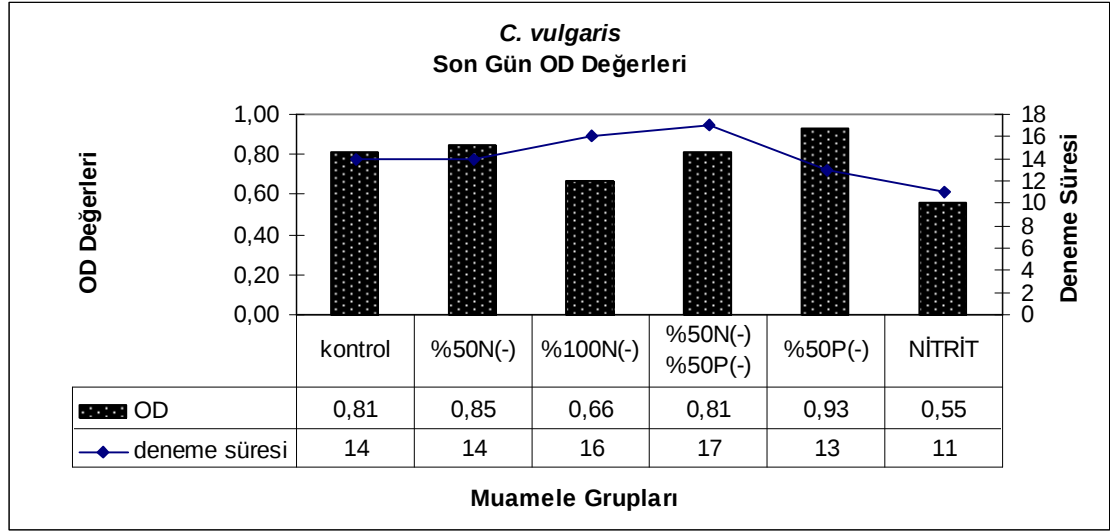
C. vulgaris kültüründe, 11 gün süren Nitrit uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek optik yoğunluk değerleri sırasıyla $0,28 \pm 0,006$, $0,58 \pm 0,033$ olarak bulunmuştur. Nitritin uygulandığı kültürlerle ait optik yoğunluğun değişim grafiği Şekil 4.6.'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Nitrit eklenen *C.vulgaris* kültürlerinde OD değerleri.

C. vulgaris kültüründe uygulanan % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N, %50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muamelelerinde son güne ait optik yoğunluk değerleri ve deneme süreleri sırası ile kontrol grubu için $0,81 \pm 0,1$ (14. gün), % 50 N $0,85 \pm 0,20$ (14. gün), % 100 N $0,66 \pm 0,17$ (16. gün), % 50 P + % 50 N $0,81 \pm 0,08$ (17. gün), %50 P $0,93 \pm 0,05$ (13 gün), ve Nitrit $0,55 \pm 0,02$ (11. gün) olarak bulunmuştur.

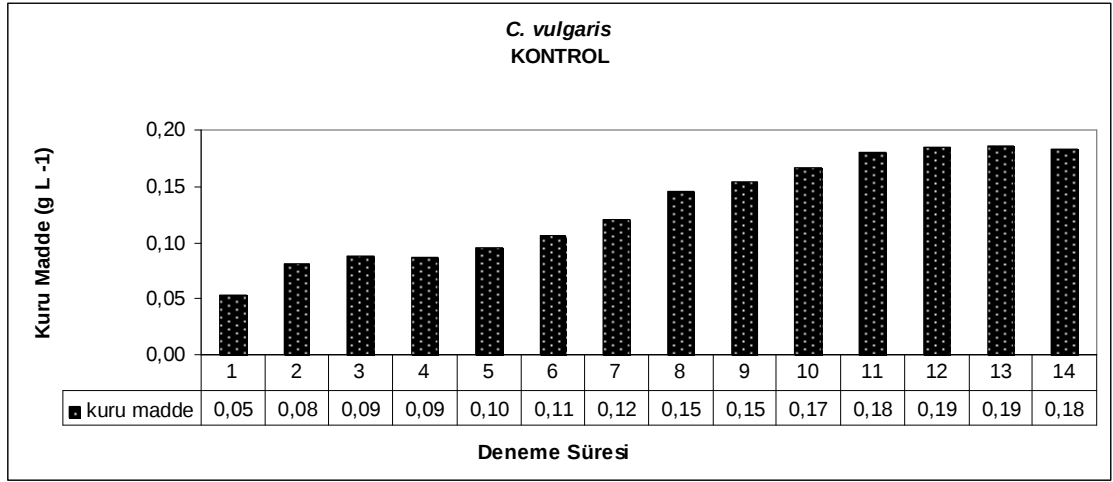
Muamele gruplarından en düşük optik yoğunluk değeri nitrit uygulanan grup da $0,55 \pm 0,02$ ve en yüksek optik yoğunluk değeri % 50 P eksikliği uygulanan grup da $0,93 \pm 0,05$ olarak bulunmuştur. *C.vulgaris* kültürlerine ait son gün optik yoğunluğun değişim grafiği Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Muamele gruplarına ait OD Değerleri.

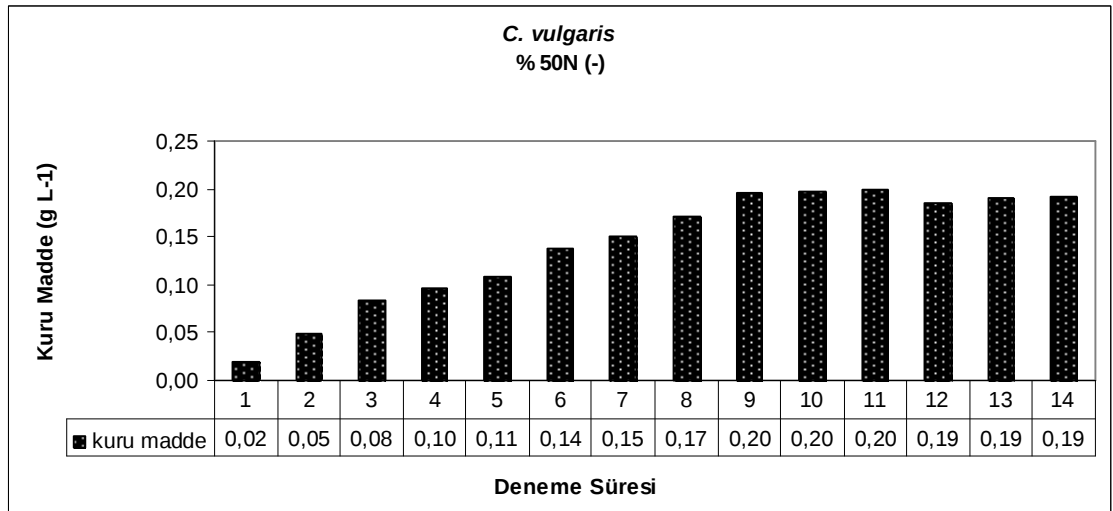
4.2. Kuru Madde

Uygulanan muamelelerin *C. vulgaris* kültürlerinde kuru madde miktarı üzerine etkileri istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Denemede, 14 gün süren kontrol grubunda başlangıç kuru madde miktarı $0,05\pm0,03$ g L⁻¹ iken en yüksek kuru madde değeri $0,19\pm0,02$ olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu kültürlerinde günlük kuru madde değişim grafiği Şekil 4.8.'de verilmiştir.



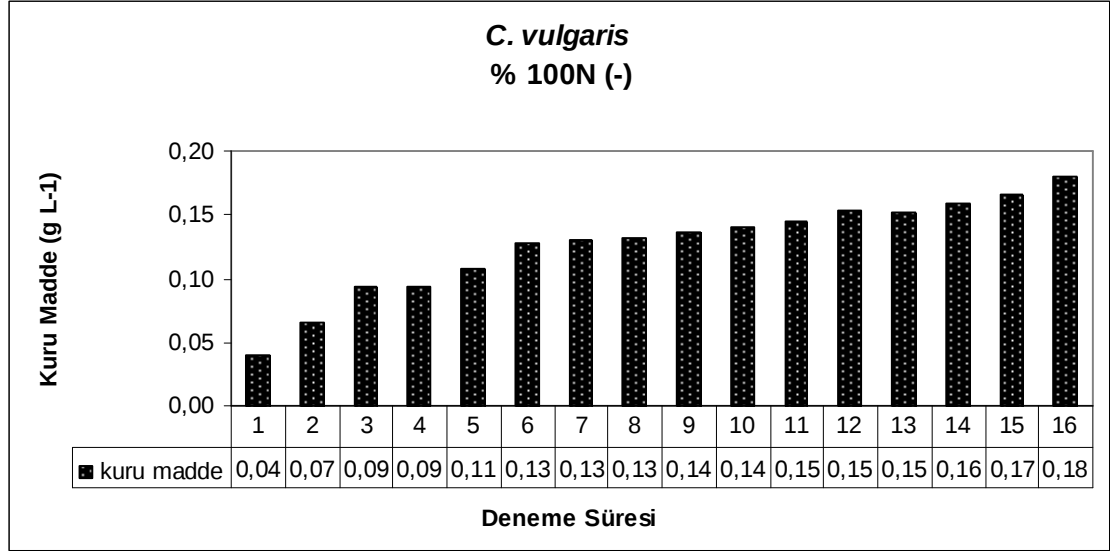
Şekil 4.8. *C. vulgaris* kontrol grubu kuru madde değerleri.

Ondört gün süren ve % 50 N eksikliği uygulanan *C. vulgaris* kültürlerinde en düşük ve en yüksek kuru madde değerleri sırasıyla $0,02\pm0,01$, $0,20\pm0,01$ g L⁻¹ olarak bulunmuştur. %50 N eksikliğinin uygulandığı kültürlere ait kuru madde değişim grafiği Şekil 4.9.'de verilmiştir.



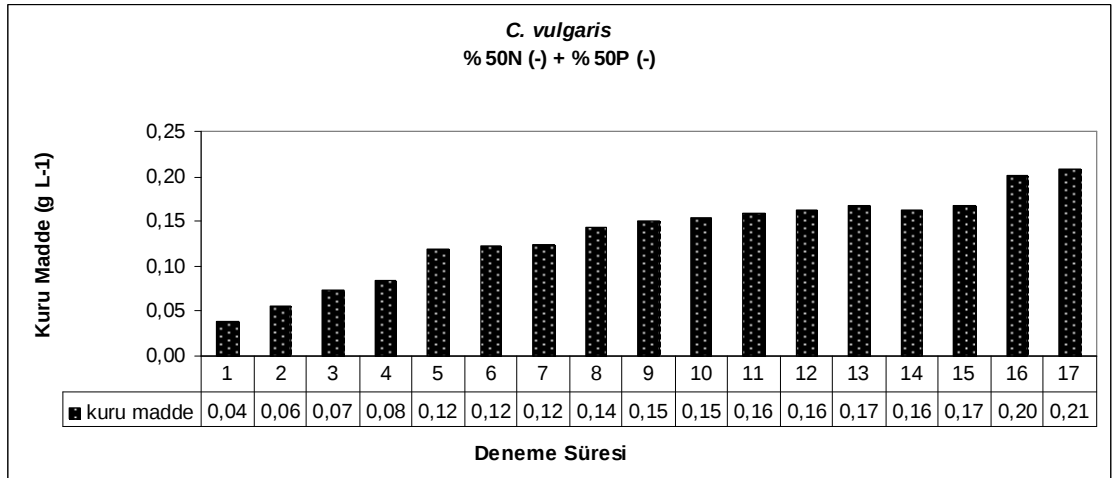
Şekil 4.9. % 50 N eksilmesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde kuru madde değerleri.

C. vulgaris kültüründe, 16 gün süren % 100 N eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek kuru madde değerleri sırasıyla $0,04 \pm 0,01$, $0,18 \pm 0,01$ g L⁻¹ olarak bulunmuştur. % 100 N eksikliğinin uygulandığı kültürlerle ait kuru madde değişim grafiği Şekil 4.10.'de verilmiştir.



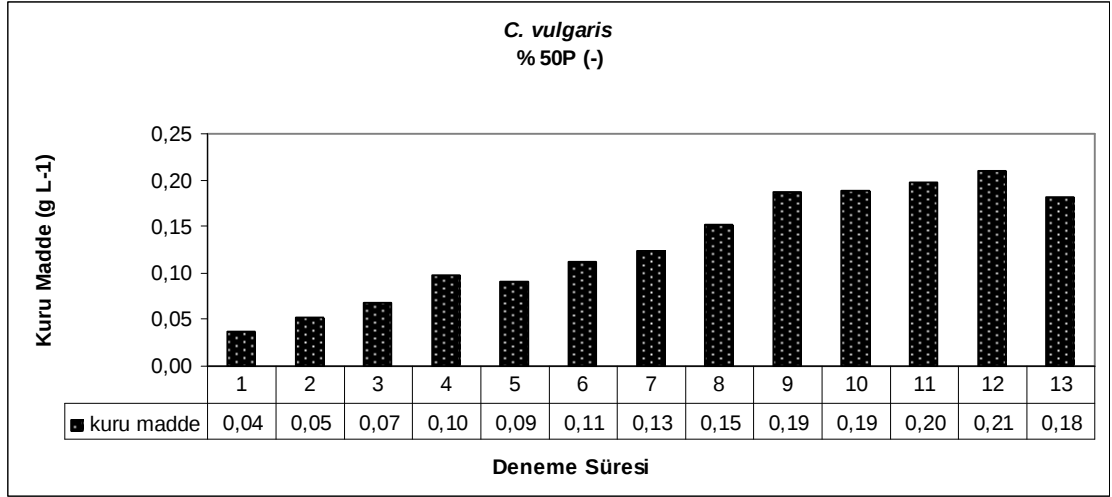
Şekil 4.10. % 100N eksiltmesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde kuru madde değerleri.

C. vulgaris kültüründe, 17 gün süren % 50 N ve % 50 P eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek kuru madde değerleri sırasıyla $0,04 \pm 0,01$, $0,21 \pm 0,05$ g L⁻¹ olarak bulunmuştur. % 50 N ve % 50 P eksikliğinin uygulandığı kültürlerle ait kuru madde değişim grafiği Şekil 4.11.'de verilmiştir.



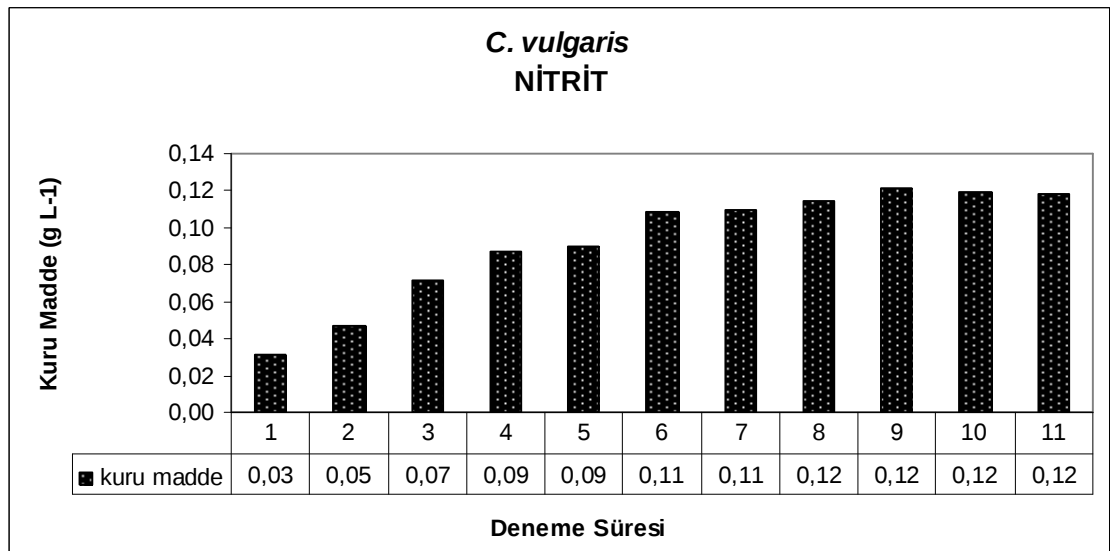
Şekil 4.11. % 50N + % 50P eksiltmesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde kuru madde değerleri.

C. vulgaris kültüründe, 13 gün süren % 50 P eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek kuru madde değerleri sırasıyla $0,04 \pm 0,0115$, $0,21 \pm 0,008$ g L⁻¹ olarak bulunmuştur. % 50 P eksikliğinin uygulandığı kültürlerle ait kuru madde değişim grafiği Şekil 4.12.'de verilmiştir.



Şekil 4.12. *C. vulgaris* % 50 P eksik muamele grubu kuru madde değerleri.

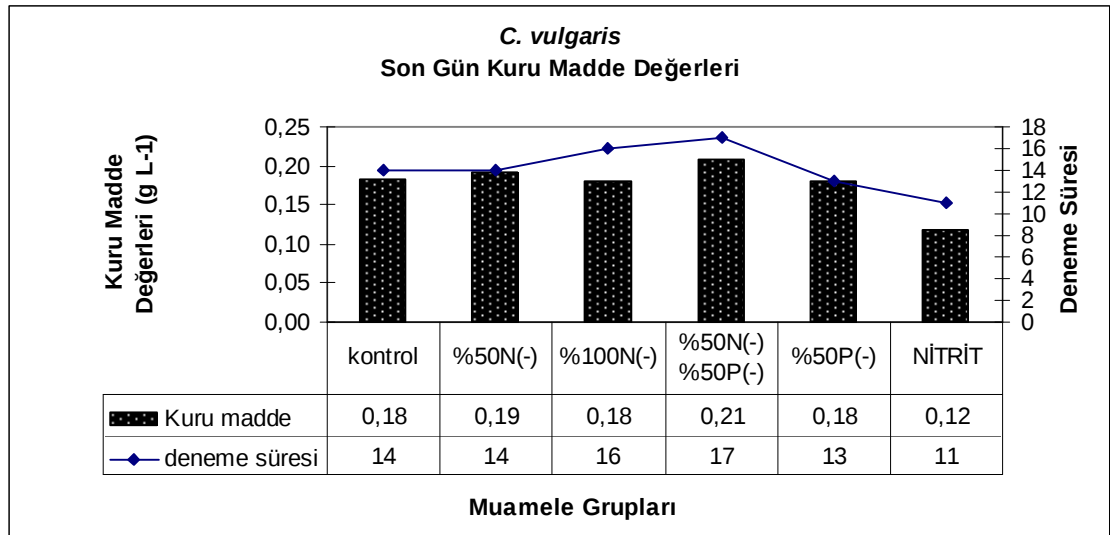
C. vulgaris kültüründe, 11 gün süren Nitrit eklemesi uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek kuru madde değerleri sırasıyla $0,03 \pm 0,01$, $0,12 \pm 0,01$ g L⁻¹ olarak bulunmuştur. Nitrit uygulanan kültürlerle ait kuru madde değişim grafiği Şekil 4.13.'de verilmiştir.



Şekil 4.13. Nitrit eklemesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde kuru madde değerleri.

C.vulgaris kültüründe uygulanan % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N , %50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muamelelerinden son güne ait kuru madde değerleri ve deneme süreleri sırası ile kontrol grubu için $0,18 \pm 0,02$ g L⁻¹ (14. gün), % 50 N $0,19 \pm 0,05$ g L⁻¹ (14. gün), % 100 N $0,18 \pm 0,008$ g L⁻¹ (16. gün), % 50 P + % 50 N $0,21 \pm 0,05$ g L⁻¹ (17. gün), %50 P $0,18 \pm 0,038$ g L⁻¹ (13. gün), ve Nitrit $0,12 \pm 0,007$ g L⁻¹ (11. gün) olarak bulunmuştur.

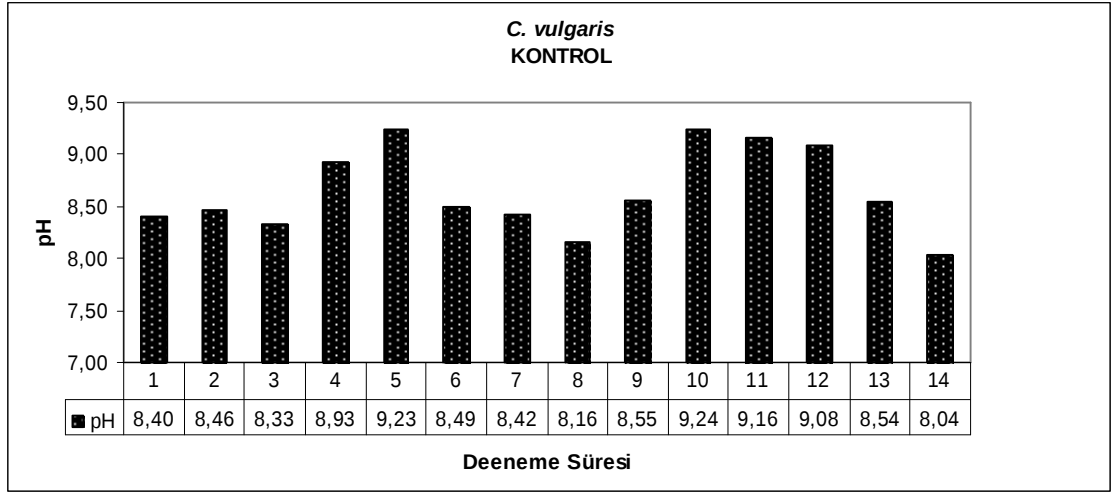
Muamele gruplarından en düşük kuru madde değeri nitrit uygulanan grupta $0,12 \pm 0,007$ g L⁻¹ ve en yüksek kuru madde değeri % 50 P + % 50 N eksikliği uygulanan grup da $0,21 \pm 0,05$ g L⁻¹ olarak bulunmuştur. *C.vulgaris* kültürlerine ait son gün kuru madde değişim grafiği Şekil 4.14.'de verilmiştir.



Şekil 4.14. Tüm muamele gruplarında kuru madde değerleri

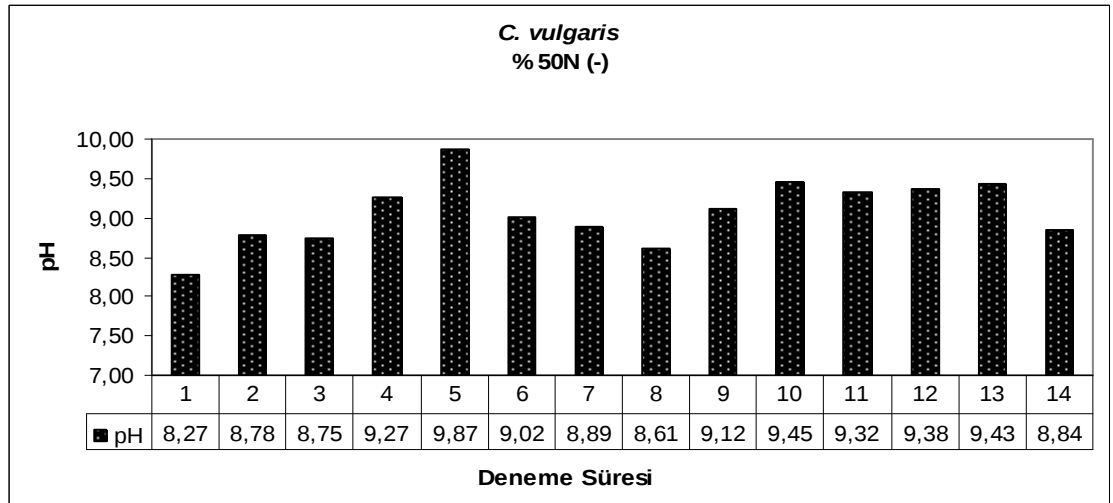
4.3. *C.vulgaris* Kültürüne Ait pH

Uygulanan muamelelerin *C. vulgaris* kültürlerinin pH değerleri üzerine etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Denemede kontrol grubuna ait en düşük ve en yüksek pH değerleri sırasıyla $8,16\pm0,41$, $9,24\pm0,41$ olarak bulunmuştur. Deneme süresince uygulanan muameleler ile karşılaştırılmak üzere kontrol grubu kültürlerine ait pH değişim grafiği Şekil 4.15.'de verilmiştir.



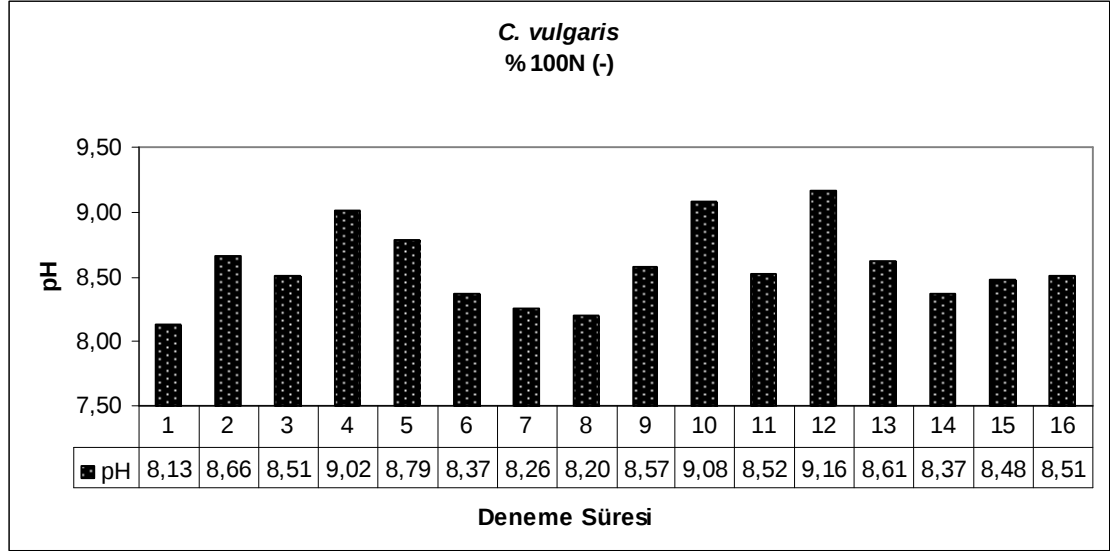
Şekil 4.15. *C. vulgaris* kontrol grubu pH Değerleri.

C. vulgaris kültüründe %50 N eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek pH değerleri sırasıyla $8,27\pm0,95$ ve $9,87\pm0,12$ olarak bulunmuştur. %50 N eksikliğin uygulandığı kültürlerine ait pH değişim grafiği Şekil 4.16.'da verilmiştir.



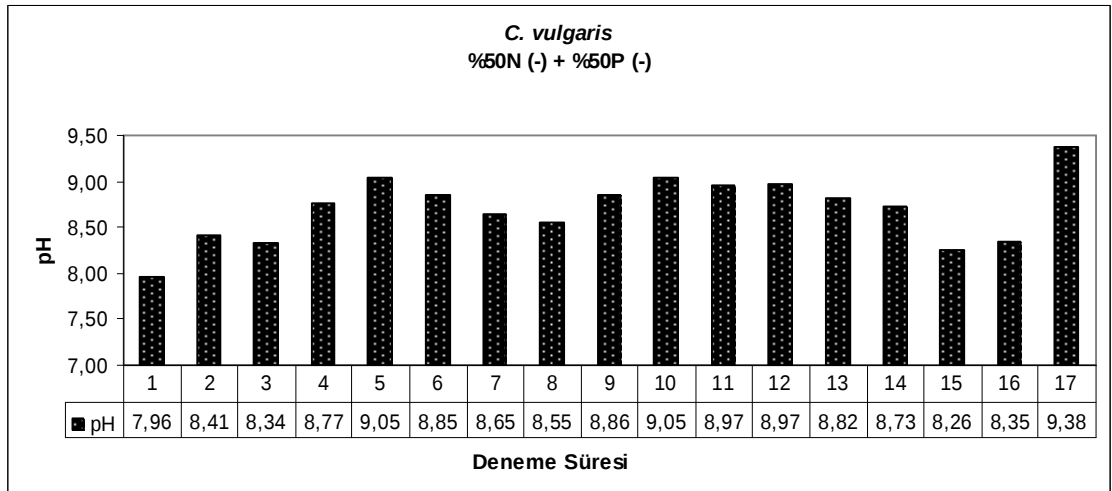
Şekil 4.16. % 50N eksilmesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde pH değerleri.

C. vulgaris kültüründe % 100 N eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek pH değerleri sırasıyla $8,13 \pm 0,07$ ve $9,16 \pm 0,17$ olarak bulunmuştur. % 100 N eksikliğinin uygulandığı kültürlere ait pH değişim grafiği Şekil 4.17.'de verilmiştir.



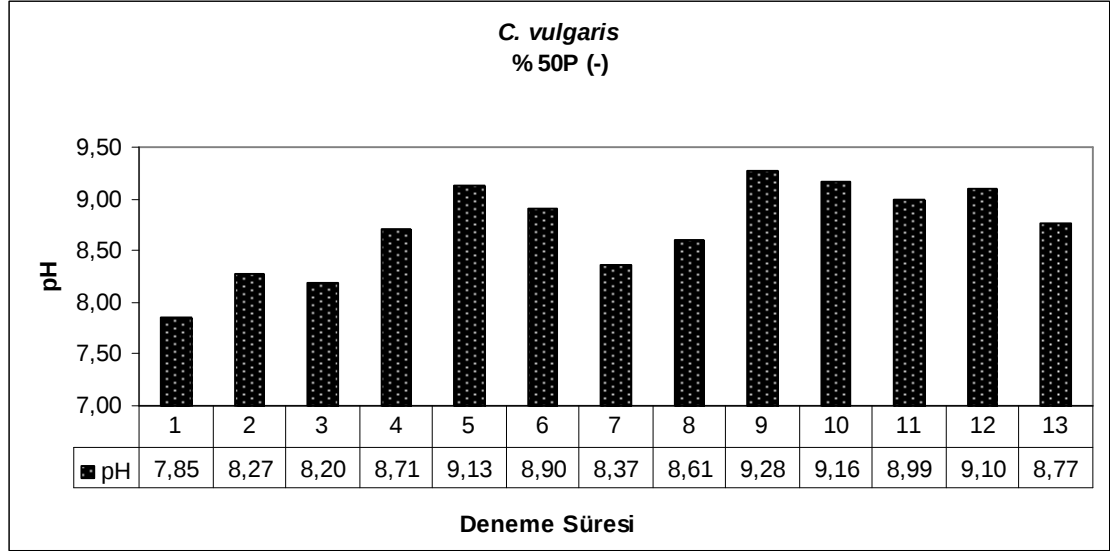
Şekil 4.17. % 100 N eksilmesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde pH değerleri.

C. vulgaris kültüründe % 50 N ve % 50 P eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek pH değerleri sırasıyla $7,96 \pm 0,015$ ve $9,38 \pm 0,07$ olarak bulunmuştur. % 50 N ve % 50 P eksikliğinin uygulandığı kültürlere ait pH değişim grafiği Şekil 4.18.'de verilmiştir.



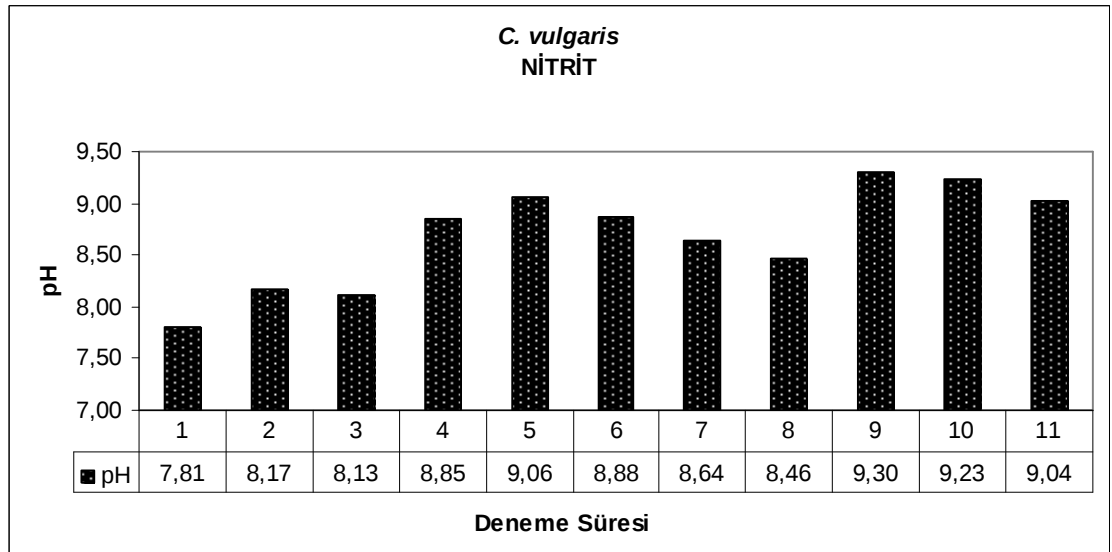
Şekil 4.18. % 50N + % 50P eksilmesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde pH değerleri.

C. vulgaris kültüründe % 50 P eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek pH değerleri sırasıyla $7,85 \pm 0,02$ ve $9,28 \pm 0,07$ olarak bulunmuştur. % 50 P eksikliğinin uygulandığı kültürlerle ait pH değişim grafiği Şekil 4.19.'da verilmiştir.



Şekil 4.19. % 50 P eksiltmesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde pH değerleri.

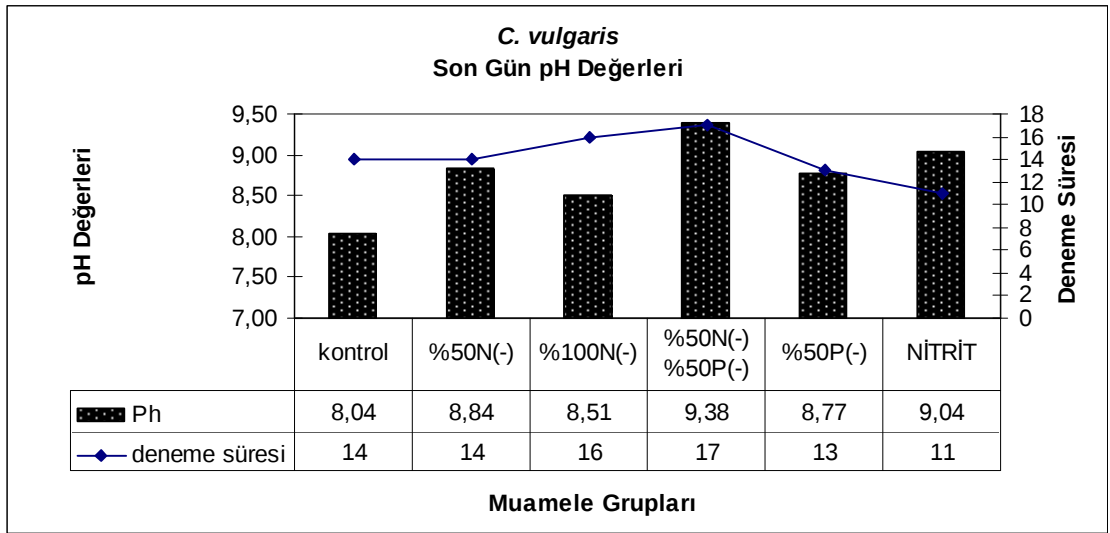
C. vulgaris kültüründe Nitrit uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek pH değerleri sırasıyla $7,81 \pm 0,05$ ve $9,30 \pm 0,07$ olarak bulunmuştur. Nitritin uygulandığı kültürlerle ait pH değişim grafiği Şekil 4.20.'de verilmiştir.



Şekil 4.20. Nitrik eklemesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde pH değerleri.

C.vulgaris kültüründe uygulanan % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N ,%50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muamelelerinden son güne ait pH değerleri ve deneme süreleri sırası ile kontrol grubu için $8,04 \pm 0,17$ (14. gün), % 50 N $8,84 \pm 0,62$ (14. gün), % 100 N $8,51 \pm 0,09$ (16. gün), % 50 P + % 50 N $9,38 \pm 0,07$ (17. gün), %50 P $8,77 \pm 0,14$ (13. gün), ve Nitrit $9,04 \pm 0,07$ (11. gün) olarak bulunmuştur.

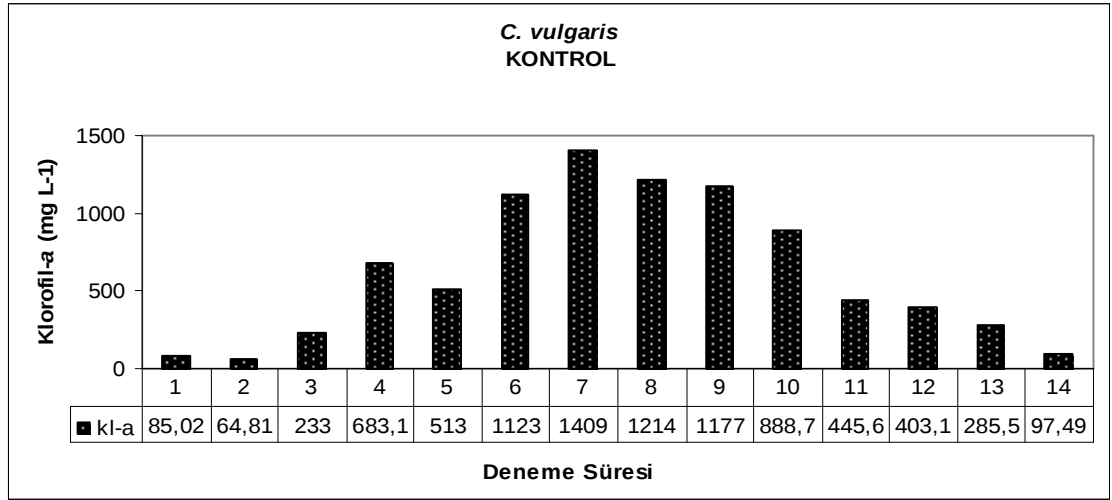
Muamele gruplarından kontrol grubu dışında, en düşük pH değeri %100 N uygulanan grupta $8,51 \pm 0,09$ ve en yüksek pH değeri %50 N + %50 P eksikliği uygulanan grup da $9,38 \pm 0,07$ olarak bulunmuştur. *C.vulgaris* kültürlerine ait son gün pH değişim grafiği Şekil 4.21.'de verilmiştir.



Şekil 4.21. Tüm muamele gruplarında pH değerleri

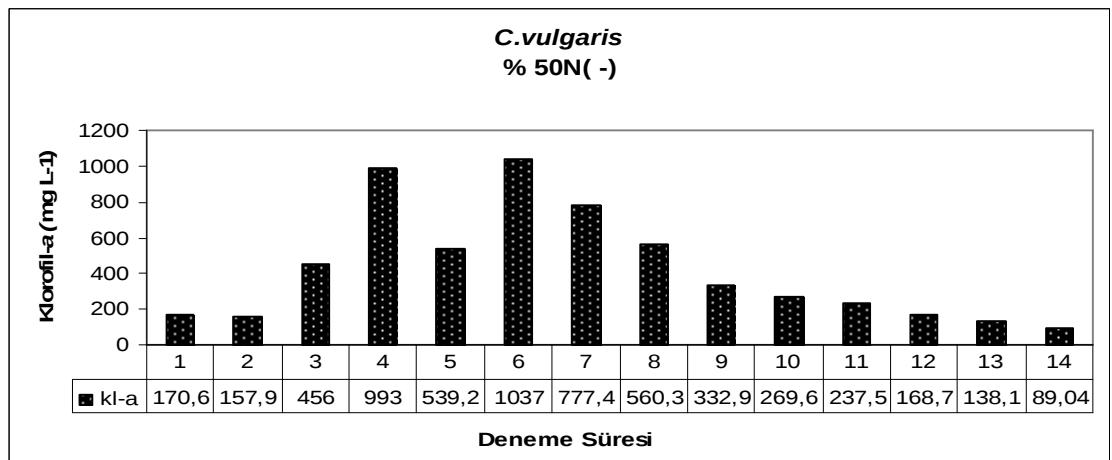
4.4. Klorofil-a

C. vulgaris kültürlerinin kl-a miktarları üzerine uygulanan muamelelerin etkisi istatistikî olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Denemede kontrol grubuna ait en düşük ve en yüksek kl-a değerleri sırasıyla $64,81 \pm 124,73 \mu\text{g L}^{-1}$, $1409,12 \pm 124,29 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Deneme süresince uygulanan muameleler ile karşılaştırılmak üzere kontrol grubu kültürlerine ait kl-a değişim grafiği Şekil 4.22.'de verilmiştir.



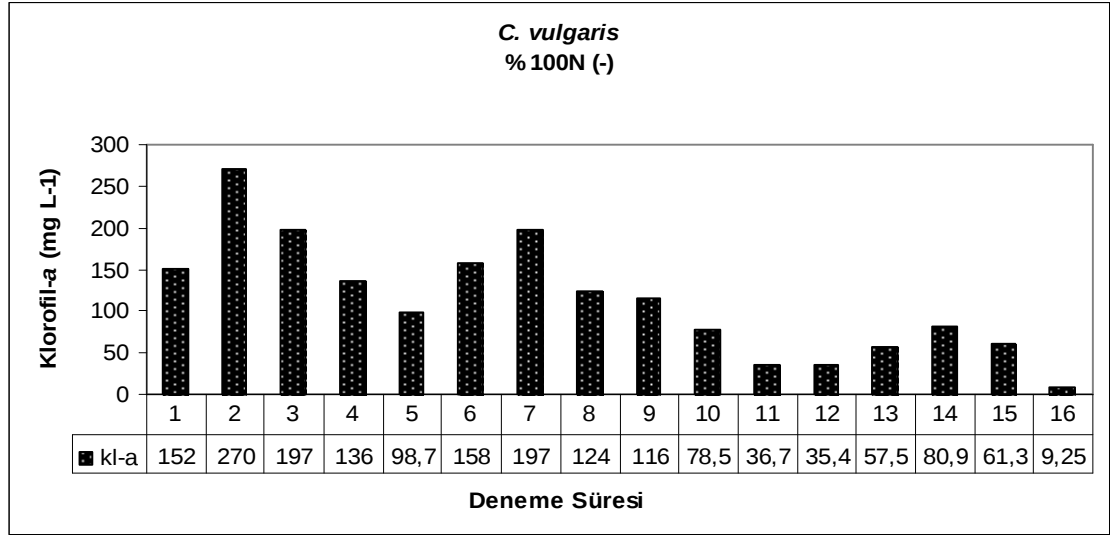
Şekil 4.22. *C. vulgaris* kontrol grubu kl-a Değerleri.

C. vulgaris kültüründe %50 N eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek kl-a değerleri sırasıyla $8904 \pm 56,65$ ve $1037 \pm 875,83 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. %50 N eksikliğin uygulandığı kültürlerine ait kl-a değişim grafiği Şekil 4.23.'de verilmiştir.



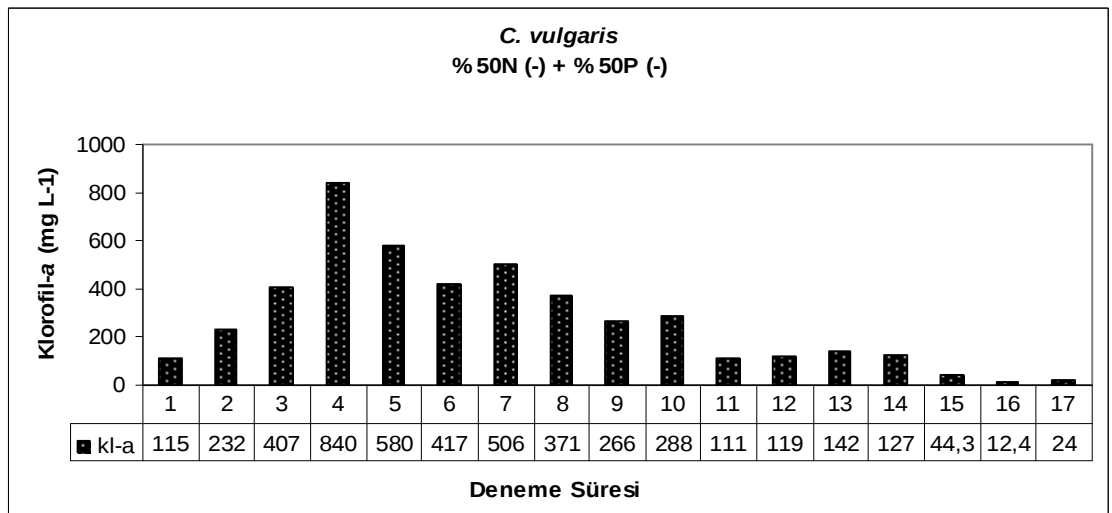
Şekil 4.23. % 50 N eksiltmesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde kl-a Değerleri.

C. vulgaris kültüründe % 100 N eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek kl-a değerleri sırasıyla $9,25 \pm 17,04$ ve $270 \pm 1,89 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. % 100 N eksikliğinin uygulandığı kültürlerle ait kl-a değişim grafiği Şekil 4.24.'de verilmiştir.



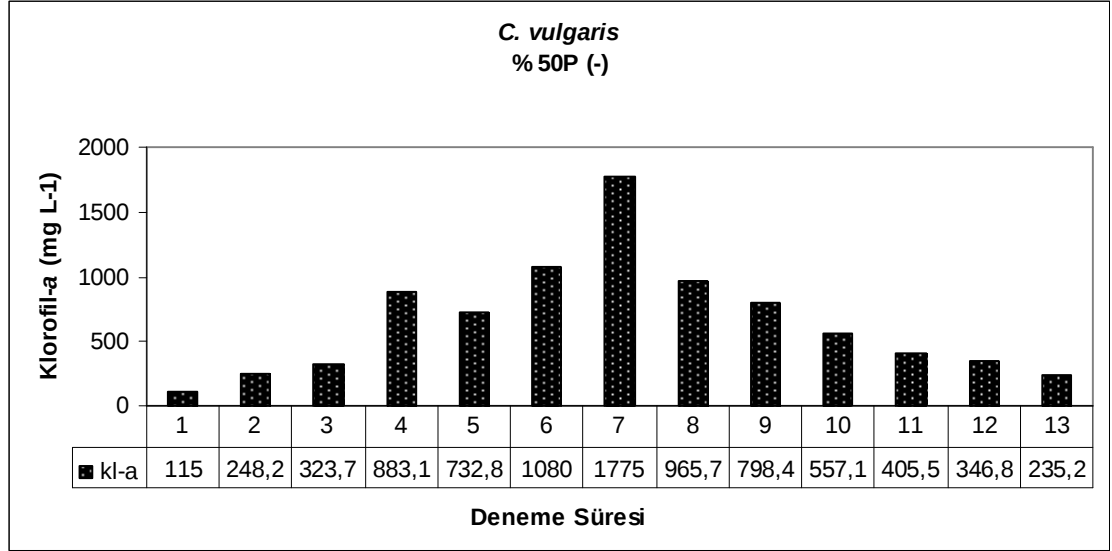
Şekil 4.24. % 100 N eksilmesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde kl-a Değerleri

C. vulgaris kültüründe % 50 N ve % 50 P eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek kl-a değerleri sırasıyla $12,4 \pm 0,07$ ve $840 \pm 356,88 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. % 50 N ve % 50 P eksikliği'nin uygulandığı kültürlerle ait kl-a değişim grafiği Şekil 4.25.'de verilmiştir.



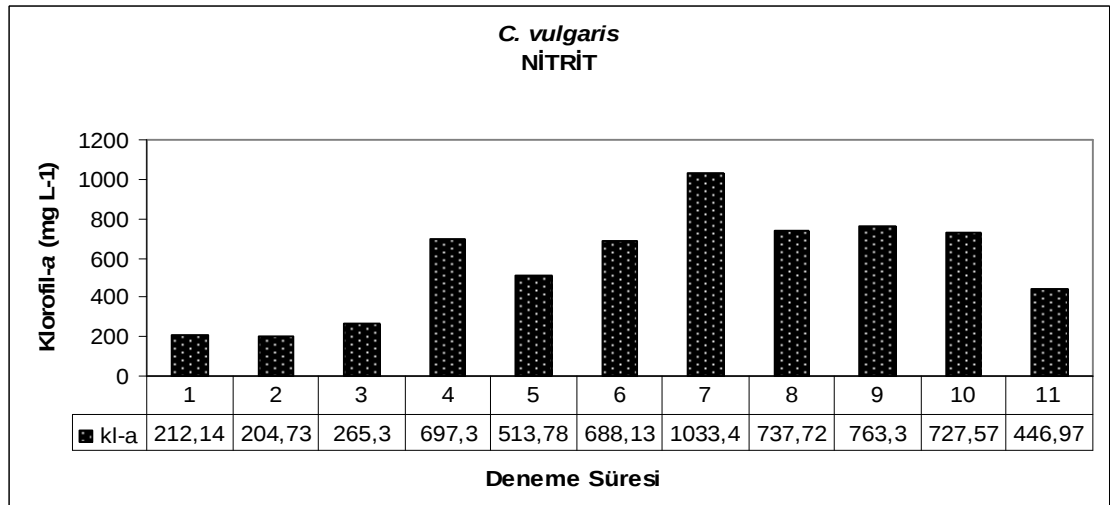
Şekil 4.25. % 50N + % 50P eksilmesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde kl-a değerleri.

C. vulgaris kültüründe % 50 P eksikliği uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek kl-a değerleri sırasıyla $115 \pm 21,24$ ve $1775 \pm 495,45 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. % 50 P eksikliğinin uygulandığı kültürlerle ait kl-a değişim grafiği Şekil 4.26.'de verilmiştir.



Şekil 4.26. % 50 P eksiltmesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde kl-a Değerleri

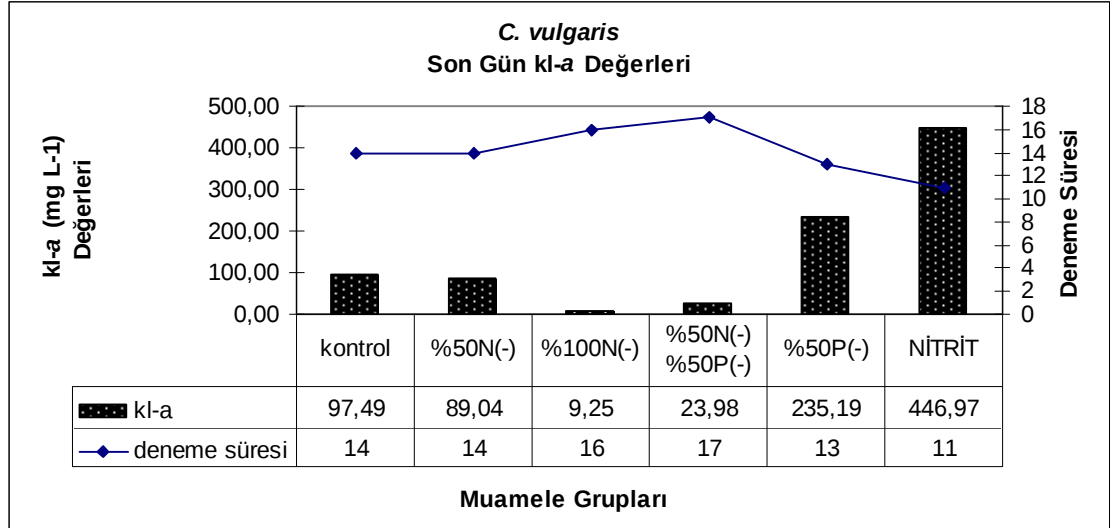
C. vulgaris kültüründe Nitrit uygulanan muamele grubuna ait en düşük ve en yüksek kl-a değerleri sırasıyla $204,73 \pm 28,38$ ve $1033,4 \pm 163,35 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Nitritin uygulandığı kültürlerle ait kl-a değişim grafiği Şekil 4.27.'de verilmiştir.



Şekil 4.27. Nitrit eklemesi yapılan *C. vulgaris* kültürlerinde kl-a Değerleri.

C.vulgaris kültüründe uygulanan % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N ,%50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muamelelerinden son güne ait kl-a değerleri ve deneme süreleri sırası ile kontrol grubu için $97,49 \pm 117,25 \mu\text{g L}^{-1}$ (14. gün), % 50 N $89,04 \pm 56,65 \mu\text{g L}^{-1}$ (14. gün), % 100 N $9,25 \pm 0,43 \mu\text{g L}^{-1}$ (16. gün), % 50 P + % 50 N $23,98 \pm 18,05 \mu\text{g L}^{-1}$ (17. gün), %50 P $235,19 \pm 95,31 \mu\text{g L}^{-1}$ (13. gün), ve Nitrit $446,97 \pm 316,17 \mu\text{g L}^{-1}$ (11. gün), olarak bulunmuştur.

Muamele gruplarından en düşük kl-a değeri % 100 N uygulanan grupta $9,25 \pm 0,43 \mu\text{g L}^{-1}$ ve en yüksek kl-a değeri nitrit uygulanan grupta $446,97 \pm 316,17 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. *C.vulgaris* kültürlerine ait son gün kl-a değişim grafiği Şekil 4.28.'de verilmiştir.

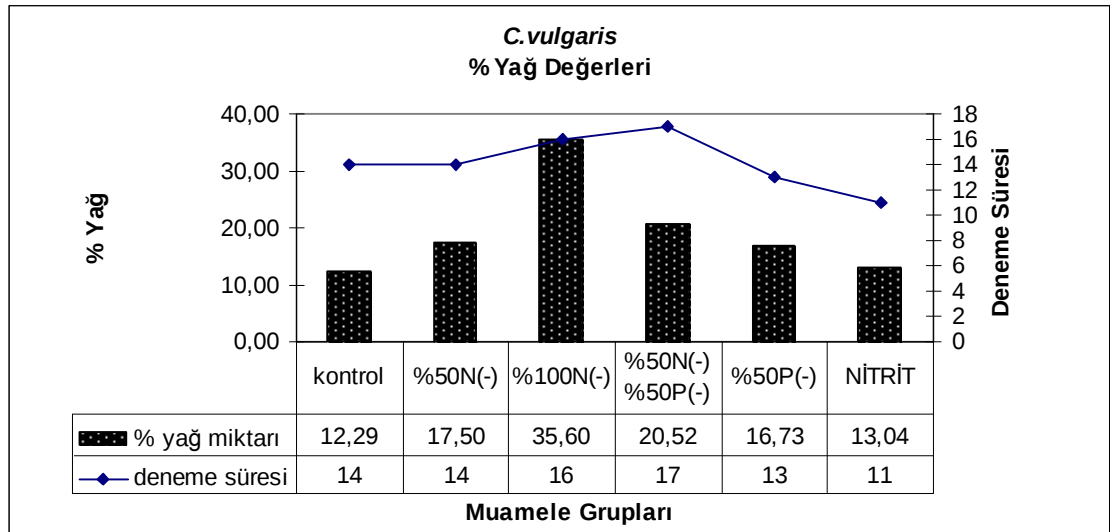


Şekil 4.28. Tüm muamele gruplarında kl-a Değerleri

4.5. Yağ Değerleri

Denemede uygulanan muamelelerin yağ değerleri üzerine önemli bir etkisi bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 4.1). Deneme sonunda *C.vulgaris* kültüründe, uygulanan % 50 N, % 100 N, % 50 P+% 50 N, %50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muamelelerinden % yağ değerleri ve deneme süreleri sırası ile kontrol grubu için $12,29\pm3$ (14. gün), % 50 N $17,50\pm4$ (14. gün), % 100 N $35,60\pm8$ (16. gün), % 50 P + % 50 N $20,52\pm1$ (17. gün), %50 P $16,73\pm2$ (13. gün) ve Nitrit $13,04\pm1$ mg L⁻¹ (11. gün), olarak bulunmuştur.

Muamele gruplarından en düşük % yağ değeri kontrol grubu hariç, nitrit uygulanan grupta $13,04\pm1$ mg L⁻¹ ve en yüksek % yağ değeri % 100 N eksikliği uygulanan grupta $35,60\pm8$ olarak bulunmuştur. *C.vulgaris* kültürlerine ait % yağ değişim grafiği Şekil 4.29.'de verilmiştir.

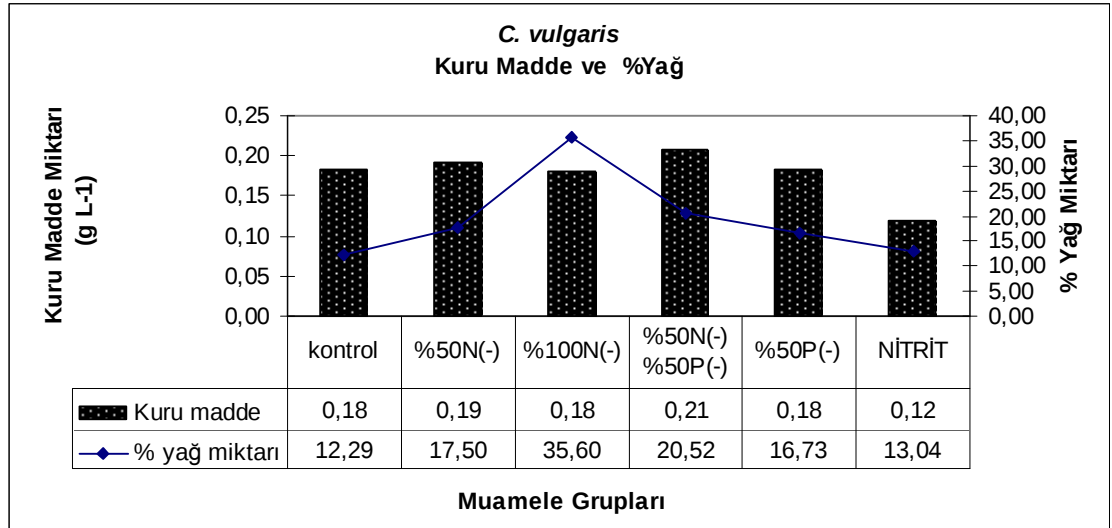


Şekil 4.29. Tüm muamele gruplarında % Yağ Değerleri

4.6. Kuru Madde ve Yağ Değerleri

Deneme sonunda *C.vulgaris* kültüründe, uygulanan % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N , %50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muamelelerinden kuru madde ve % yağ değerleri sırası ile kontrol grubu için $0,1833 \pm 0,02$ ve $12,29 \pm 3$ (14. gün), % 50 N $0,1916 \pm 0,05$ ve $17,49 \pm 4$ (14. gün), % 100 N $0,18 \pm 0,008$ ve $35,59 \pm 8$ (16. gün), % 50 P + % 50 N $0,21 \pm 0,005$ ve $20,51 \pm 1$ (17. gün) , %50 P $0,18 \pm 0,038$ ve $16,73 \pm 2$ (13. gün) ve Nitrit $0,118 \pm 0,007$ ve $13,04 \pm 1$ (11. gün) olarak bulunmuştur.

Muamele gruplarından en düşük % yağ değeri kontrol grubu hariç , nitrit uygulanan grupta $13,04 \pm 1$ olup bu muamele grubunun kuru madde değeri $0,118 \pm 0,007$ iken, en yüksek % yağ değeri %100 N eksikliği uygulanan grupta $35,59 \pm 8$ olup bu muamele grubunun kuru madde değeri $0,18 \pm 0,008$ olarak bulunmuştur. *C. vulgaris* kültürlerine ait % yağ ve kuru madde değişim grafiği Şekil 4.30.'de verilmiştir.

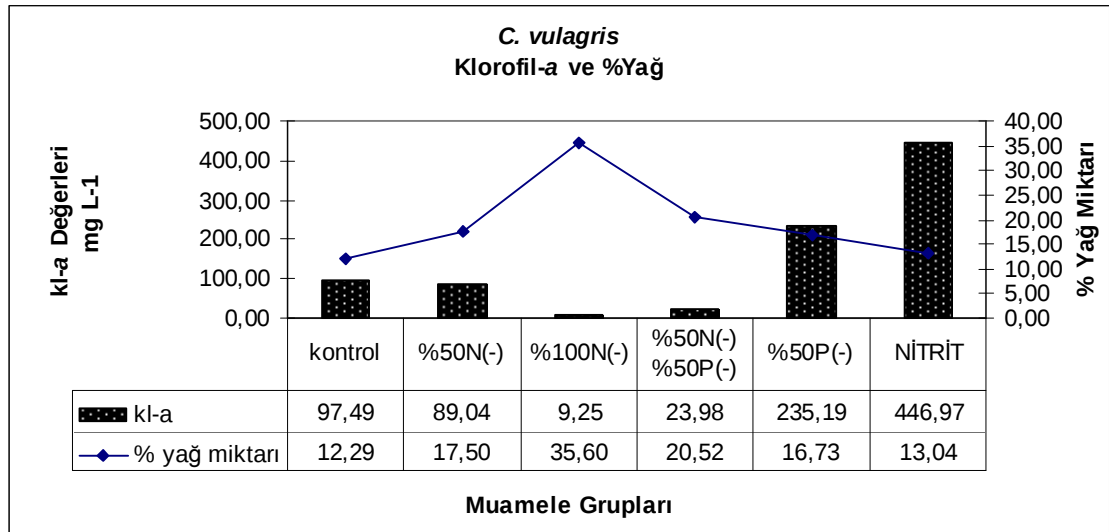


Şekil 4.30. Tüm muamele gruplarında Kuru Madde ve % Yağ Değerleri

4.7.Klorofil ve Yağ Değerleri

Deneme sonunda *C.vulgaris* kültüründe, uygulanan % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N ,%50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muamelelerinden kl-a ve % yağ değerleri sırası ile kontrol grubu için $97,492 \pm 117,25 \mu\text{g L}^{-1}$ ve $12,29 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ (14 gün), % 50 N $89,039 \pm 56,65 \mu\text{g L}^{-1}$ ve $17,50 \pm 4 \text{ g L}^{-1}$ (14. gün), % 100 N $9,25 \pm 0,43 \mu\text{g L}^{-1}$ ve $35,60 \pm 8 \text{ g L}^{-1}$ (16. gün), % 50 P + % 50 N $23,982 \pm 18,05 \text{ mg L}^{-1}$ ve $20,52 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ (17. gün) , %50 P $235,19 \pm 95,31 \mu\text{g L}^{-1}$ ve $16,73 \pm 2 \text{ g L}^{-1}$ (13. gün) , ve Nitrit $446,97 \pm 316,17 \mu\text{g L}^{-1}$ ve $13,04 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ (11. gün), olarak bulunmuştur.

Muamele gruplarından en düşük % yağ değeri kontrol grubu hariç, nitrit uygulanan grupta $13,04 \pm 1$ olup bu muamele grubunun kl-a değeri $446,972 \pm 316,17 \mu\text{g L}^{-1}$ iken, en yüksek % yağ değeri %100 N eksikliği uygulanan grupta $35,60 \pm 8 \text{ g L}^{-1}$ olup bu muamele grubunun kl-a değeri $9,25 \pm 0,43 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. *C.vulgaris* kültürlerine ait % yağ ve % kl-a değişim grafiği Şekil 4.31.'de verilmiştir.



Şekil 4.31. Tüm muamele gruplarında kl-a ve % Yağ Değerleri

Uygulanan muamelelerin son güne ait OD, pH ve klorofil *a* ve yağ miktarı üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Uygulanan muamelelerin büyüme parametreleri üzerine etkilerinin Duncan test sonuçları

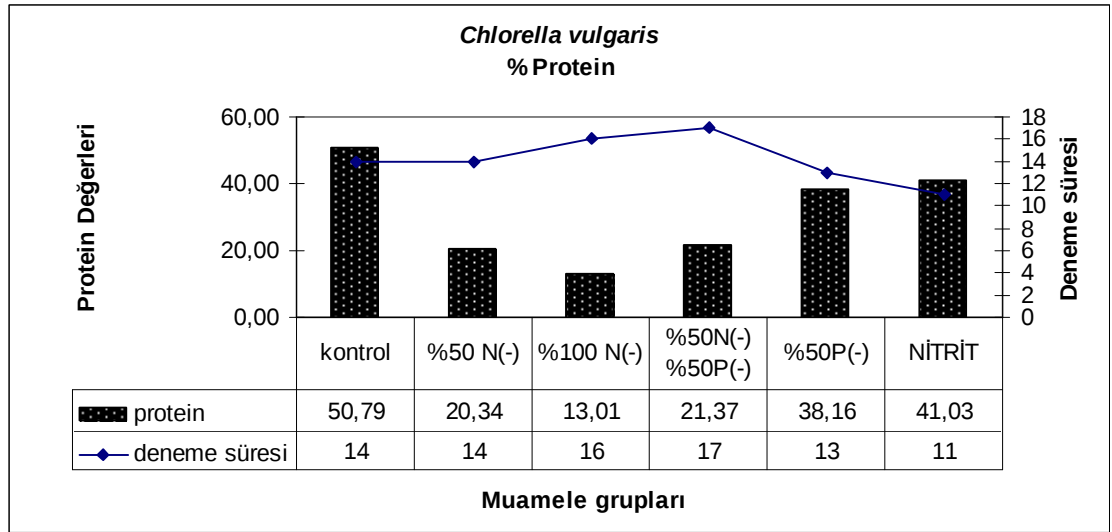
Muameleler						
Parametre	Kontrol	%50 N(-)	%100N(-)	%50 P(-)	%50 N(-) %50 P(-)	Nitrit
OD	0,81±0,1 ^{bc}	0,85±0,2 ^{bc}	0,66±0,17 ^{ab}	0,81±0,08 ^{bc}	0,93±0,05 ^c	0,55±0,02 ^a
pH	8,04±0,17 ^a	8,84±0,62 ^b	8,51±0,09 ^{ab}	9,38±0,07 ^c	8,77±0,14 ^b	9,04±0,07 ^{bc}
kl-a	97,49±117,25 ^a	89,04±56,9 ^a	9,25±0,43 ^a	23,9±18,05 ^a	235,2±95,31 ^{ab}	446,97±316,17 ^b
% Yağ	12,29±3 ^b	17,50±4 ^{bc}	35,60±8 ^a	20,52±1 ^c	16,73±2 ^{bc}	13,04±1 ^b

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0.05$).

4.8. Protein Değerleri

Deneme sonunda *C.vulgaris* kültüründe, uygulanan % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N ,%50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muamelelerinden Protein sırası ile kontrol grubu için 50,79 (14. gün) , % 50 N 20,34 (14. gün) , % 100 N 13,01 (16. gün) , % 50 P + % 50 N 21,37 (17. gün) , % 50 P 38,16 (13. gün) , ve Nitrit 41,03 (11. gün), olarak bulunmuştur.

Muamele grublarından en düşük % protein değeri % 100 N uygulanan grupta olup bu muamele grubunun protein değeri 13,01 iken, kontrol grubu dışında ki en yüksek % protein değeri nitrit uygulanan grupta olup bu muamele grubunun protein değeri 41,03 olarak bulunmuştur. *C.vulgaris* kültürlerine ait % protein değişim grafiği Şekil 4.32.'de verilmiştir.

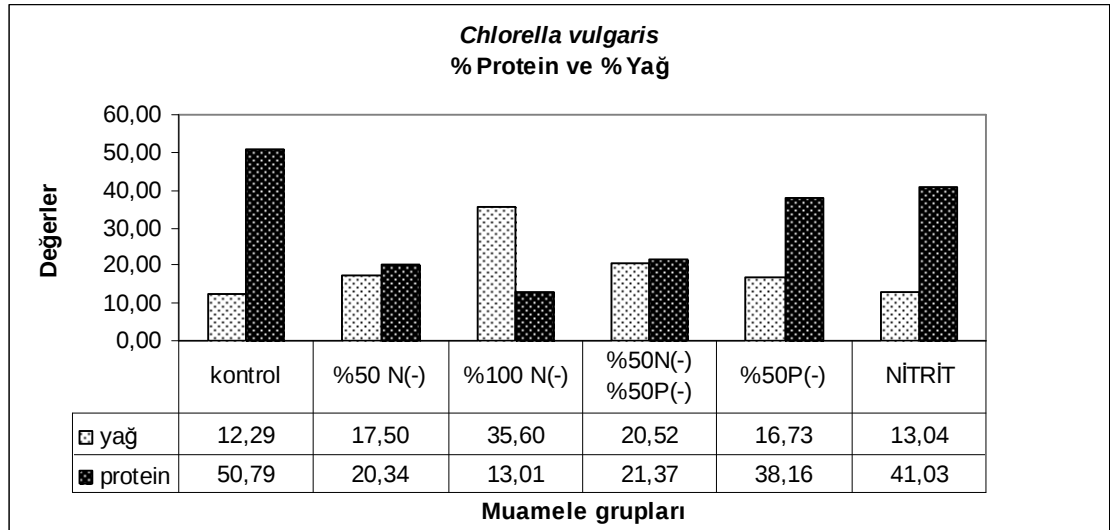


Şekil 4.32. Tüm muamele gruplarında % Protein Değerleri

4.9. Protein ve Yağ Değerleri

Deneme sonunda *C.vulgaris* kültüründe, uygulanan % 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N ,%50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muamelelerinden % protein ve % yağ değerleri sırası ile kontrol grubu için 50,79 ve 12,29 (14.gün) , % 50 N 20,34 ve 17,50 (14. gün), % 100 N eksikliği 13,01 ve 35,60 (16. gün) , % 50 P + % 50 N eksikliği 21,37 ve 20,52 (17. gün), %50 P eksikliği 38,16 ve 16,73 (13 gün), ve Nitrit 41,03 ve13,04 (11. gün), olarak bulunmuştur.

Muamele gruplarından en düşük % yağ değeri nitrit uygulanan grupta 13,04 olup bu muamele grubunun protein değeri 41,03 iken, en yüksek % yağ değeri %100 N eksikliği uygulanan grupta % 35,60 olup bu muamele grubunun protein değeri 13,01 olarak bulunmuştur. *C.vulgaris* kültürlerine ait % yağ ve % protein değişim grafiği Şekil 4.33.'de verilmiştir.



Şekil 4.33. Tüm muamele gruplarında % Protein ve % Yağ Değerleri

5.TARTIŞMA

Araştırmadan elde edilen bulgular, incelenen konulara göre aşağıda düzenlendiği şekilde tartışılmış ve gerekli sonuçlar çıkarılmaya çalışılmıştır.

Yeşil Algler grubundan olan *Chlorella vulgaris* türünün yağ içeriğinin arttırılmasını uyaran stres koşullarından besin eksikliği ve nitrit uygulaması laboratuvar ortamında çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda eksik azot uygulamasının 5 farklı *Chlorella* türlerinde (*C. sorokiniana*, *C. vulgaris*; *C. minutissima*; *C. emersonii*, *C. protothecoides*) büyüme ve lipid içeriğine etkisi incelenmiştir. Buna göre; hem normal koşullarda hem de düşük N uygulamasında *C. vulgaris*'in çalışılan diğer dört türe göre en iyi gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada 5 türün kültüre alındığı bio-reaktör tanklarına N eksik besli ortamları hazırlanmış ve kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. *C. emersonii*'nin bu uygulamadan diğer türlere göre daha fazla etkilendiği ve hücre sayısındaki artışın diğer türlere göre en fazla olduğu ortaya çıkartılmıştır. % lipid değerlerinin *C. sorokiniana* dışındaki diğer dört türde (*C. vulgaris*, *C. minutissima*, *C. emersonii*, *C. protothecoides*) yaklaşık olarak 2'şer kat arttığı belirlenmiştir. *C. sorokiniana*'da ise bu değer hemen hemen kontrol grubu ile aynı düzeyde kalmıştır (Ilman ve ark., 2000). Yapılan çalışmada stres faktörlerinden besin eksikliği (% 50 N, % 100 N, % 50 P + % 50 N, %50 P eksikliği) ve besin farklılığının (nitrit eklemesi) *Chlorella vulgaris* türünde hücresel yağ içeriğine etkisini belirlemek üzere planlanan çalışmada kültürlerde büyüme periyodu sonunda ortalama yağ miktarları karşılaştırılmıştır. Deneme sonunda *C.vulgaris* kültüründe, uygulanan % 50 N, % 100 N, % 50 P ve % 50 N, %50 P eksikliği ve Nitrit eklemesi muamelelerinden % yağ değerleri ve deneme süreleri sırası ile kontrol grubu için 12,29±3 (14. gün) iken, % 50 N eksikliğinde 17,50±4 (14. gün), % 100 N eksikliğinde 35,60±8 (16. gün), % 50 P + % 50 N eksikliğinde 20,52±1 (17. gün), %50 P eksikliğinde 16,73±2 (13. gün) ve Nitrit eklemesinde 13,04±1 mg L⁻¹ (11. gün) olarak bulunup, kültürlerde belirlenen ortalama % yağ değerleri arasında önemli bir fark olduğu saptanmıştır (p<0.05). Muamelelerden elde edilen sonuçlara göre uygulanan besin eksiklikleri ile stres oluşturulması *C. vulgaris* kültüründe yağ miktarında artışa neden olmuştur. Yapılan

bir çalışmada Azot kaynağı ve farklı konsantrasyonlarının, mikroalglerin büyüme ve biyokimyasal yapılarında etkili olduğu belirlenmiştir (Brown ve diğ., 1989; Gökpınar, 1991; Fidalgo ve diğ., 1995; Valenzuela-Espinoza ve diğ., 1999; Xu ve diğ., 2001). Bu çalışmada *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) 'in lipid içeriğini etkileyen stres koşullarından uygulanan beş farklı muameleden % 100 N eksikliği uygulamasının en yüksek yağ birikimine neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.29). Reitan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada farklı alg (*Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *Isochrysis galbana*, *Nannochloris atomus*, *Tetraselmis* sp., ve *Gymnodinium* sp.) türleri farklı miktarlarda azot sınırlaması ile kültüre alınmış ve bu türlerde lipid miktarları artış göstermiştir.

Alglerin yağ içeriğine bağlı biyoyakıt olarak değerlendirilmesi çalışmalarında yağ içeriği kadar sistemin ekonomik olabilmesi için elde edilecek biyokütle de önemlidir.. Yapılan çalışma da başlangıç kültürlerinde %20 oranında aşı kullanıldığından dolayı kültürlerde son gün kuru madde miktarları ekonomik yönden yeterli bulunmamıştır. Bu nedenle kuru madde miktarı ve yağ içeriği değerlendirmesi ayrıca yapılmalıdır. Birim hacimden daha fazla kuru biyomas ve yağ eldesi için kültürlerde aşı miktarının artırılması önerilmektedir. Besi ortamından azot kaynağının %100 eksilmesi ile yağ içeriğinin %35.60 a yükseltildiği kültürlerde kuru madde miktarı ortalama 0.18 g L⁻¹ olarak belirlenmiştir ve bu miktarın *C. vulgaris* için optimum koşulların sağlandığı kontrol grubu ile benzer olduğu görülmektedir (Şekil 4.14). Diğer muamele grupları arasında da kuru madde miktarlarında istatistiksel olarak fark belirlenmemiştir. Bugün pek çok ülkede *Chlorella* türünde biyoyakıt olarak kullanımı amacıyla yapılan yağ içeriğini artırma çalışmaları heterotrofik beslenme şekliyle de sürdürülmektedir. Fermentörlerde sürdürülen heterotrofik besleme, oldukça pahalı ve pratikte uygulanması zor bir kültür modeli olarak düşünülebilir. Besin maddesi olarak kullanılan organik maddeler ve kültürlerin aksenik sürdürülmesi başlıca zorluklar olarak görülebilir. Yapılan bir çalışmada *Chlorella vulgaris*'de farklı büyüme koşullarında biomas ve lipid üretimi araştırılmıştır. Heterotrofik büyüme ile daha yüksek lipid içeriği (% 38) sağlanmış, asetat, glukoz veya gliserol ile Ototrofik büyümede çok daha az lipid üretimi olduğu

karşılaştırılmıştır. Optimal hücre yoğunluğu (2 g l^{-1}) ve lipid üretimine ($54 \text{ mg}^{-1} \text{ gün}^{-1}$) % 1 glukoz kullanımında ulaşılmıştır (Liang ve ark. 2009).

Yapılan çalışmada kuru madde miktarları benzerliği, CO_2 tüketiminin de benzer olduğunu düşündürmektedir. PH değerleri de 4 grupta benzer bulunmuştur. Nitrit uygulaması yapılan grupta kuru madde miktarı düşük olmakla birlikte, en yüksek klorofil *a* değerine bu grupta saptanmıştır.

Yapılan bir başka çalışmada mikroalg kültürlerinde azot sınırlamasının, hücre sayısı ve klorofil-*a* miktarlarında azalmaya neden olduğu belirlenirken, mikroalglerin biyokimyasal yapısındaki yağlar gibi organik karbon bileşikleri oranlarında artış olduğu kaydedilmiştir. Bununla birlikte kültürlerde klorofil *a* oranı azalırken karoten miktarının artmasına bağlı olarak renkte sararma gözlenmiştir (Shifrin ve Chisholm, 1981; Sukenik ve diğ., 1989). Çalışmada kontrol grubu ile kıyaslandığında %50 azot - %50 fosfor eksilmesi ve nitrit eklemesi yapılan kültürlerde klorofil içeriğinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.28). Çalışma da Klorofil *a* düzeyi en düşük 9.25 mg L^{-1} değeri ile %100 N eksiltelen ve en yüksek yağ içeriğinin elde edildiği grupta belirlenmiştir. Azot eksikliği stresi hücrelerde klorofil *a* azalmasına neden olmuştur. Büyümenin sonlandığı güne ait klorofil *a* değerleri içerisinde en yüksek değer, azot kaynağı olarak nitrit in kullanıldığı kültürlerde 446.97 mg L^{-1} ile belirlenmiştir (Şekil 4.28). Nitrit uygulamasının hücrelerde yeşil pigment kl *a* içeriğini artırma yönünde tetiklediği düşünülmektedir. *Chlorella vulgaris* kültüründe N sınırlaması uygulanan muamelelerde klorofil *a* düzeylerinde düşüş gözlenmiştir ve aynı kültürlerde renkte sararma kaydedilmiştir.

Yeşil alg *Chlorella* %50-60 oranında protein içermekte olup klorofil'in doğada bilinen en zengin kaynağıdır (Jensen,1987, Singh, 1998). Lipid üretimi ve depolanması her tür için farklı faktörlerin etkisiyle olmaktadır. Genel olarak azot eksikliği, protein değerinde azalmayla sonuçlanır (Shifrin and Chisholm 1981). Bu çalışmada da kontrol grubu kültürlerde belirlenen protein miktarı %50.79 iken yağ içeriği %12.29 bulunmuştur. Yağ içeriğinin arttığı azot eklenmeyen kültürde ise protein %13.01 olarak saptanmıştır. %50 N, %50 P ve %50 N ve P eksilmesi yapılan gruplarda da protein içeriğinde azalma görülmektedir (Şekil 4.33). Miao ve Wu' nun 2005 yılında *Chlorella protothecoides* türü ile yaptıkları çalışmada, ototrofik olarak

büyümeye alındığında protein içeriği 52.64, lipid içeriği 14.57 iken heterotrofik olarak büyümeye alındığında kültürün protein içeriği 10.28 değerine düşerken, lipid içeriği 55.20 değerine yükselmektedir. Yürütülen bu çalışmada % 50 N, % 100 N ve % 50 N- % 50 P eksikliği uygulanan gruplarda protein içeriğinde bir azalma gözlemlenirken % yağ içeriklerinde de artış görülmektedir.

Enerji kaynağı olarak yenilenebilir, toksik olmayan biyodizel yakıt kaynağı mikroalglerden yararlanma olanakları konusunda çalışmalar sürdürülmekte olup bu konu da üzerinde çalışılan türlerden biri olan *Chlorella vulgaris* ile yapılan bir çalışma da dizel motorların yağları gibi iş görecektir, parça içerikli uzun süre korunan yakıtlar üzerinde çalışmışlardır. Birçok alg, örneğin *Chlorella vulgaris* gibi tek hücreli ve 5-10 mikron boyutunda ki tür, emülsiyonun içeriği bakımından uygun bulunmuştur. Araştırma sonucunda değişiklik yapılmayan tek silindirli dizel bir motorda *Chlorella vulgaris*'in yakıt olarak kullanılabilirliğini belirlemişlerdir (Scragg ve Shales., 2003).

Algal biyoteknolojide ticari öneme sahip alg türlerinden biri olan *Chlorella vulgaris* kültürlerine uygulanan stres faktörlerinin hücrelerdeki yağ içeriği üzerine etkisini belirlemek üzere gerçekleştirilen bu çalışma ile besin eksikliği uygulanan muamelelerden %100 N eksikliği muamelesi ile yağ içeriğini arttırdığı sonucuna varılmıştır. Laboratuvar koşullarında elde edilen % 35.60 yağ içeriği bulgusunun dışarı ortamda havuzlarda ve fotobiyoreaktör sistemlerde daha büyük hacimlerde denenmesi gereksinimi bulunmaktadır. Dışarı koşullarında sürekli kültürlerde ekonomik olarak elde edilecek başarı endüstriyel boyuta taşınabilecektir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bir tatlı su mikroalgi olan *Chlorella vulgaris*, laboratuvar koşullarında kültüre alınmış ve yağ içeriğine olan etkisini belirlemek amacıyla besin eksikliği ve besin farklılığı muameleleri uygulanmıştır. En yüksek yağ içeriği % 100 N eksikliği uygulanan grupta % 35.60 olarak saptanmış ve 0,18 g L⁻¹ kuru madde elde edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, bu sonuçların endüstriyel boyutlara taşınması amacıyla denemenin dışarı ortamda reaktör sistemlerde ve açık havuzlarda süreklilik çalışmaları önerilmektedir. Son yıllarda Enerji kaynağı olarak yenilenebilir, toksik olmayan biodiesel yakıt kaynaklarından mikroalglerden yararlanma olanakları araştırılmaktadır. Yağ içeriği ve büyüme hızı yüksek mikroalg türlerinin belirlenmesi çalışmalarının yanında, hücre içinde mevcut yağ içeriğinin arttırılmasını uyaran çeşitli stres koşullarının belirlenmesi araştırmaları da sürdürülmektedir. Dünyanın, % 70 i nin denizlerle kaplı olduğu gerçeği, bu sularda yaşayan alglerden yararlanma zorunluluğunu düşündürmektedir. Alglerin üretim avantajları ve hücreleri içinde ürettikleri metabolitlerden yararlanmamızı önemli kılmaktadır. Tükenebilir yakıt olan petrole alternatif bir yakıt kaynağı bulmak günümüzde insanların çabası halindedir. Ürün optimizasyonu anlamına da gelebilen biyoteknolojik çalışmalar kapsamında alglerin yakıt kaynağı olarak kullanılabilmesi yönünde yapılan her çalışma bu alana ışık tutacaktır. Bu çalışma sonucunda elde edilen yağ oranı ve biyokütle eldesinin iyileştirilmesi yönünde devam eden çalışmaların yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- AMOTZ-BEN, A., REBHUN, S., 1984. Effect of NaCl concentration on cadmium uptake by the halophilic alga *Dunaliella salina*. Marine ecology - progress series 215-219, 198.
- BEHRENS, PW., KYLE, DJ., 1996. Microalgae as a source of fatty acids. J Food Lipids 3:259-72.
- BROWN, M.R., 1991. The amino acid VE sugar composition of sixteen species of microalgae used in mariculture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 145: 79-99.
- BROWN, M.R., C.D., GARLAND, S.W., JEFREY, I.D., JAMESON, LEROI, J.M., 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *isochrysis* sp., *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. J. Appl. Phycal., 5: 285-296.
- BLIGH , E.G., ve DYER,W.J., 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37: 911-917.
- BOROWITZKA, M ., 2006. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. Springer Netherlands, Australia, 7:3-15.
- BEHROUZIAN, B., FAUCONNOT, L., DALIGAULT, F., CHAUVIN, C., PATIN, H., ve BUIST, P., 2001. Mechanism of fatty acid desaturation in the green alga *Chlorella vulgaris*. Eur. J. Biochem. 268: 3545-3549.
- CHISTIY. 1980–81. An unusual hydrocarbon. J Ramsay Soc 27–28: 24–6.
- DIJKSTRA, AJ., 2006 Revisiting the formation of trans isomers during partial hydrogenation of triacylglycerol oils. Eur J Lipid Sci Technol 108(3):249–64.
- DUERR, E.O., A. MOLNAR, SATO, V., 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. Journal of Marine Biotechnology, 7: 65-70.
- ESTEVEZ, M.S., MALANGA, G., ve PUNTARULA, S., 2001. iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. Plant Science. 161: 9–17
- FENG, F., YANG, W., JIANG, G., XU Y., ve KUANG, Y., 2005. Enhancement of fatty acid production of *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. Process Biochemistry 40: 1315–1318.

- FREDERICK, P.E., ve HEALT, R.L., 1970. Ozone-induced Fatty Acid and Viability Changes in Chlorella. Plant Physiol. 55: 15-19.
- NAVARRO-JUÁREZ, R., LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. C., CAMPRA-MADRID, P., ve REBOLLOSO-FUENTES, M.M., 2004. Functional properties of the biomass of three microalgal species. Doi:10.1016/j.j.foodeng..02.014.
- GÖKPINAR, Ş., 1991, Effect of change of temperature on inorganic nitrogen assimilation of five important sea flagellat in aquaculture. Dokuz Eylül Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, sayfa,88 (in Turkish).
- GROBBELAAR, J., NEDBAL, L., TICHY, V., 1996. influence of high frequency light/dark fluctuat ions on photosynthetic characteristics of microalgae photo acclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. J Appl Phycol 8:335–43.
- GROBBELAAR, J.U., 2004. Algal nutrition. in: Richmond A, editor. HVEbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.Blackwell;. p. 97–115.
- GUSCHINA, I.A., HARWOOD, J.L., 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryoticalgae. Prog Lipid 45:160–86.
- GÜNER, H., AYSEL, V., 1989. Tohumuz bitkiler sistematığı, Cilt.i. E.Ü. Fen Fak. Kitaplar Serisi 108, 245 s.
- HATANO, S., KABATA, K., ve SADAKANE, H., 1981. Transition of Lipid Synthesis from Chloroplasts to a Cytoplasmic System during Hardening in *Chlorella ellipsoidea*. Plant Physiol. 67: 216-220.
- ILLMAN, A.M., SCRAGG A.H., ve SHALES, S.W., 2000. increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. Enzyme and Microbial Technology. 27: 631-635.
- JANG, E.S., JUNG, M.Y., MIN, D.B., 2005. Hydrogenation for low trans and high conjugated fatty acids. Comp Rev Food Sci Saf;4: 22–30.
- KNOTHE, G., DUNN, R.O., BAGBY, M.O., 1997. Biodiesel: the use of vegetable oils and their derivatives as alternative diesel fuels. ACS Symp Ser;666:172–208.

- KULKARNI, MG., DALAI, AK., 2006. Waste cooking oil-an economical source for biodiesel: A review. *Chem Res* 45:2901–13.
- LI, Q., DU, W., LIU, D., 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbial Biotechnol* 80:749-756.
- LIANG, Y., SARKANY, N., CUI, Y., 2009. Biomass and lipid productivities of *Chorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* 31:1043-1049.
- LOSEVA, N.L., ALYABYEV, A.J., RACHIMOVA, G.G., ve ESTRINA, R.I., 1998. The effect of high temperature and salt on the metabolic heat rate of *Chlorella* cells. *Thermochimica Acta* 309: 129-131.
- LOURENCO, S., BARBARINO, E., MANCINI-FILHO, J., SCHINKE, K., AIDAR, E., 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: An evaluation for aquaculture. *Phycologia*, 41: 158-168.
- LUBIÁN, L.M., MONTERO, O., MORENO-GARRIDO, I., HUERTAS, I.E., SOBRINO, C., GONZALES-DEL, M., VALLE-PARES, G., 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *J. Appl. Phycol.* 12: 249–255.
- MACCARTHY, J.J., ve. PATTERSON, G.W., 1974. Effects of Cation Levels of the Nutrient Medium on the Biochemistry of *Chlorella*. *Plant Physiol.* 54: 133-135
- MARUYAMA, I., NAKAMURA, T., MATSUBAYASHI, Y., ve NAEDA, O, T., 1986. identification of the alga known as ‘marine chlorella’ as a member of the Eustigmatophyceae. *Jap. J. Phyco.* 34: 319-325.
- MIAO, X., WU, Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Biosource Technology* 97 841-846.
- MEHER, LC., VIDYA-SAGAR D., NAIK, S.N., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification — a review. *Renew Sustain Energy Rev* 10:248–68.
- NAGLE, N., LEMKE, P., 1990. Production of methyl-ester fuel from microalgae. *Appl Biochem Biotechnol* 24–5:355–61.

- NEENAN, B., FEINBERG, D., HILL, A., MCINTOSH, R., TERRY, K., 1986. Fuels from microalgae: Technology status, potential, and research requirements. Publ. No. SERi/SP-231-2550, Solar Energy Research institute,.
- OSiNGA, R., TRAMPER, J., WIFFELS, RH., 1999. Cultivation of marine sponges. *Mar Biotechnol*, 1: 509-532.
- PARSONS, T.R., ve STRICKLAND, J.D.H., 1963. Discussion of Spectrophotometric Determination of Marine Plant Pigments, with Revised Equations for Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids. *Journal of Marine Research*, Vol: 21, No: 3, p.115-163.
- PIORRECK, M., POHL, P., 1984. Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acid in green and bluegreen algae during one growth phase. *Phytochemistry* 23: 217-223
- PETKOV, G., ve GARCIA, G., 2007. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella* Biochemical Systematics VE Ecology. 35: 281 – 285.
- RAGHAVAN, G., HARIDEVI, C.K., GOPINATHAN, C.P., 2008. Growth V and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. *Aquaculture Research*, vol.39; 1053-1058p.
- RENAUD, M.S., THINH, V.L., LAMBRINIDIS, G., PARRY, L.D., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211 :195-214.
- RICHARDSON, B., D.M., ORCUTT, H.A., SCHWERTNER, C.L., MARTINEZ ve WICKLINE, H.E., 1969. Effects of Nitrogen Limitation on the Growth VE Composition of Unicellular Algae in Continuous Culture. *Applied Microbiology*. 18 (2): 245-250.
- RiNEHART, KL., NAMIKOSHI, M., CHOI, BW., 1994. Structure and biosynthesis of toxins from bluegreen algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 6: 159–176.
- SÁNCHEZ-MIRÓN A., CERÓN-GARCIA, M-C., 2003. Contreras Gómez A, García Camacho F, Molina Grima E, Chisti Y. Shear stress tolerance and

- biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem Eng J*;16:287–97.
- SAWAYAMA, S., INOUE, S., DOTE, Y., YOKOYAMA, S-Y., 1995. CO₂ fixation and oil production through microalga. *Energy Convers Manag*;36: 729–31.
- SCRAGG, A.H., J. MORRISON AND S.W. SHALES, 2003. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 884–889.
- SHEEKH, M.M.E., 2004. inhibition of the water splitting system by sodium chloride stress in the green alga *Chlorella vulgaris*. *Braz. J. Plant Physiol.* 16(1):25-29.
- SHIFRIN, N.S., CHISHOLM, S.W., 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and lightdark cycles. *J. Phycol.* 17:372–84.
- SiAUT, M., HEIJDE, M., MANGOGNA, M., MONTSANT, A., COESEL, S., ALLEN, A., MANFREDONIA, A., FALCIATORE, A., BOWLER, C., 2007. Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornutum*. *Gene*.doi:10.1016/j.gene.2007.05.022 Golden, CO, 149 pp.
- SUKENIK, A., CARMELI, Y., BERNER., T., 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 25: 686–692.
- SYRETT, B.P.J. ve H.A. WONG, 1963. The Fermentation of Glucose by *Chlorella vulgaris*. *Biochem. J.* 89: 308.
- TAKAGI, M., KARSENÖ, ve YOSHIDA, T., 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Doi:10.1263/jbb.101.223*.
- TSUZUKI, M., E. OHNUMA, N. SATO, T. TAKAKU ve A. KAWAGUCHI, 1990. Effects of CO₂ Concentration during Growth on Fatty Acid Composition in Microalgae. *Plant Physiol.* 93: 851-856.
- XU, N., ZHANG, X. FAN., X. HAN., L. ZENG., C. 2001. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsioidion* sp. (Eustigmatophyta). *J. Appl. Phycol.* 13: 463–469.

- XU, H., MIAO., X. ve WU., Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. Journal of Biotechnology. 126: 499–507
- WELDY, S.C., HUESEMANN, M., 2003. Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. 115-122.
- VOLKMAN, J.K., BROWN, M.R., DUNSTAN, G.A., JEFFREY, S.W., 1993. The Biochemical Composition of Marine Microalgae from the Class Eustigmatophyceae. Journal of Phycology, 29: 69-78.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana’da doğdum. İlkokul, orta ve lise öğrenimimi Adana’da tamamladım. 2001 yılında Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde lisans eğitimime başladım ve 2005 yılında Su Ürünleri Mühendisi olarak mezun oldum. 2005 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü biyoteknoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım.