



**STRES KOŞULLARININ BAZI MİKROALG TÜRLERİNDE LİPİT
VERİMİNE VE TRIAÇİLGLİSEROL (TAG) İÇERİĞİNE ETKİSİNİN GEN
EKSPRESYON DÜZEYİNDE ORTAYA KONULMASI VE YAĞ ASİDİ
PROFİLİ İLE İLİŞKİLİ BİYODİZEL KALİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

ENVER ERSOY ANDEDEN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Enver Ersoy ANDEDEN

13/07/2021

STRES KOŞULLARININ BAZI MİKROALG TÜRLERİNDE LİPİT VERİMİNE VE
TRİAÇİLGLİSEROL (TAG) İÇERİĞİNE ETKİSİNİN GEN EKSPRESYON
DÜZEYİNDE ORTAYA KONULMASI VE YAĞ ASİDİ PROFİLİ İLE İLİŞKİLİ
BİYODİZEL KALİTESİNİN ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)

Enver Ersoy ANDEDEN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2021

ÖZET

Mikroalgler, farklı stres koşulları altında biyodizelin ana kaynağı olan triaçilgliseroller, yüksek miktarda biriktirebilen organizmalardır. Bu çalışmada, farklı çevresel koşullardan izole edilmiş 30 mikroalg izolatu arasından yüksek triaçilgliserol üreticisi izolatların seçilerek, triaçilgliserol üretiminin yüksek olduğu ve ideal yağ asidi profilinin elde edilebileceği stres koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda, belirlenen stres koşullarının triaçilgliserol biyosentez yolağıyla ilişkili bazı genlerin ekspresyonuna olan etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmada, azot yokluğu ve karbonat-bikarbonat tamponu ile oluşturulan alkali pH (pH 10) stresleri ayrı ayrı veya kombine edilerek kullanılmıştır. Sadece azot yokluğu stresine kıyasla, kombine stres altında *Auxenochlorella protothecoides* KP7 ve *Chlorella vulgaris* KP2 suşlarının; lipit veriminde, triaçilgliserol içeriğinde ve nişasta içeriğinde artış olduğu saptanmıştır. En yüksek triaçilgliserol içeriği (%16,4) ve triaçilgliserol/toplam lipit oranı (%62,0), kombine stres altında *A. protothecoides* KP7 suşunda belirlenmiştir. Bu suşta, azot yokluğu veya kombine stres altında ekspresyon düzeylerinde en fazla artış olan genlerin; fosfoenolpirüvat karboksilaz, pirüvat dehidrogenaz kompleksi-E2, gliserol-3-fosfat dehidrogenaz ve malik enzim genleri olduğu saptanmıştır. Kombine stres altında, *A. protothecoides* KP7 yağından elde edilen biyodizelin test edilen tüm koşullar arasında; en düşük iyot değerine (97,64 g I₂/100 g), en yüksek oksidatif kararlılığa (7,29 saat) ve en yüksek setan sayısına (55,26) sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, alkali pH ve azot yokluğu kombine stresinin endüstriyel öneme sahip farklı türlerde de triaçilgliserol içeriğini ve biyodizel kalitesini arttırmak için iyi bir strateji olabileceği öngörülmektedir.

Bilim Kodu	: 20309
Anahtar Kelimeler	: Mikroalg, biyodizel, azot stresi, pH stresi, triaçilgliserol, yağ asidi, <i>Auxenochlorella protothecoides</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>
Sayfa Adedi	: 111
Danışman	: Prof. Dr. Belma ASLIM
2. Danışman	: Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

THE DETERMINATION OF THE EFFECT OF STRESS CONDITIONS ON LIPID
PRODUCTIVITY AND TRIACYLGLYCEROL (TAG) CONTENT IN SOME
MICROALGAE SPECIES AT THE GENE EXPRESSION LEVEL AND THE
INVESTIGATION OF BIODIESEL QUALITY ASSOCIATED WITH THE FATTY
ACID PROFILE

(Ph. D. Thesis)

Enver Ersoy ANDEDEN

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2021

ABSTRACT

Microalgae can accumulate substantial amounts of triacylglycerol, the primary feedstock for biodiesel production, under different stress conditions. This study aimed to determine the high triacylglycerol-producing isolates among 30 microalgae isolates obtained from different environments and the stress conditions, which induce triacylglycerol accumulation and provide the ideal fatty acid profile. It was also purposed to determine the effect of stress conditions on the expression of some triacylglycerol biosynthesis genes. In this study, exposure to alkaline pH (pH 10) using carbonate-bicarbonate buffer, nitrogen starvation, and both were applied to induce triacylglycerol accumulation in microalgae. Our results illustrated that the combination of nitrogen starvation and alkaline pH led to significant increases in lipid productivity, triacylglycerol accumulation, and starch content of *Auxenochlorella protothecoides* KP7 and *Chlorella vulgaris* KP2 strains compared with nitrogen starvation. The highest triacylglycerol content (16.4%) and triacylglycerol/total lipid ratio (62.0%) were determined in *A. protothecoides* KP7 under combined stress. In this strain, under nitrogen starvation or combined stress, expression levels of phosphoenolpyruvate carboxylase, pyruvate dehydrogenase complex-E2, glycerol-3-phosphate dehydrogenase, and malic enzyme genes showed the highest level of expression. Furthermore, under the combined stress, biodiesel from *A. protothecoides* KP7 oil was associated with the lowest iodine value (97.64 g I₂/100 g), highest oxidative stability (7.29 h), and highest cetane number (55.26) among the examined conditions. The use of the combination of nitrogen starvation and high pH stress for cultivation appears good strategy for enhancing triacylglycerol content and biodiesel quality in industrially relevant species.

Science Code : 20309
Key Words : Microalgae, biodiesel, nitrogen stress, pH stress, triacylglycerol, fatty acid, *Auxenochlorella protothecoides*, *Chlorella vulgaris*
Page Number : 111
Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLİM
Co-Supervisor : Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmamın her aşamasında engin bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, beni sürekli araştırmaya teşvik eden ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Belma ASLIM'a, ikinci danışmanım olan ve bana Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesinde araştırma yapma imkanını sunan, hem laboratuvarında hem de laboratuvar dışında desteğini her zaman gördüğüm değerli hocam Sayın Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK'e, tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Tahir ATICI'ya ve bazı analizleri yapmam için cihaz kullanımına izin veren Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD başkanı Sayın Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ'a, Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarında yapmış olduğum çalışmalarda yardımlarını aldığım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ümmügülüm TÜKENMEZ ve Öğr. Gör. Serap NİĞDELİOĞLU DOLANBAY'a, akademik kariyerim boyunca desteklerini esirgemeyen Sayın Uğur ve Vuranel OKAY ailesine, akademik kariyer yoluna birlikte çıktığımız, bu yolda ilgisini ve desteğini her zaman gördüğüm sevgili eşim Araş. Gör. Muazzez DERYA ANDEDEN'e ve tüm eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, bana inanan ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerime sunarım.

BAP projesi (NEUBAP15F26) ve TÜBİTAK projesi (116Y345) tarafından desteklenmiş olan tez çalışmamda; sarf malzeme alımı, cihaz alımı ve hizmet alımı konusunda maddi destek sağlayan, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Mikroalgler	5
2.1.1. Alglerin sınıflandırılması.....	6
2.1.2. Mikroalglerde karbon ve azot metabolizması	8
2.1.3. Mikroalglerde lipit ve TAG metabolizması	10
2.1.4. Mikroalglerde lipit ve TAG metabolizmasında rol olan genler ve moleküler mekanizması	12
2.2. Mikroalglerden Biyodizel Üretimi	15
2.3. Dünyada ve Ülkemizde Biyodizel Üretimi.....	18
2.4. Çevresel Streslerin Mikroalglerin Lipit Verimine ve TAG İçeriğine Etkisi	19
2.4.1. Azot stresinin mikroalglerin lipit verimine ve TAG üretimine etkisi.....	19
2.4.2. pH'nın mikroalglerin lipit verimine ve TAG üretimine etkisi	20
2.5. Mikroalglerde Yağ Asitleri ve Yağ Asitlerinin Biyodizel Kalitesine Etkisi	21
3. MATERYAL METOT	23

	Sayfa
3.1. Mikroalg İzolasyonları	23
3.2. Mikroalglerin Morfolojik Olarak Tanımlanması.....	25
3.3. Moleküler Tanımlama	25
3.3.1. DNA izolasyonu ve PCR.....	25
3.3.2. Sekans analizi ve filogenetik ağaç oluşturulması	26
3.4. Azot Yokluğu Stres Denemesinin Kurulması.....	27
3.5. Besiyerinde Farklı pH Uygulamaları	28
3.5.1. TAG içeriği ve biyokütle konsantrasyonu bakımından optimal pH'nın saptanması	28
3.5.2. Alkali pH stresinin oluşturulması	29
3.6. Analitik Yöntemler	30
3.6.1. Biyokütle veriminin Saptanması	30
3.6.2. Lipit veriminin saptanması	30
3.6.3. Toplam lipit miktarının saptanması	31
3.6.4. Nötral lipit miktarının saptanması	32
3.6.5. Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi tekniği ile TAG bantlarının görüntülenmesi	33
3.6.6. TAG miktarının saptanması	33
3.6.7. Klorofil, protein ve nişasta miktarının saptanması	34
3.7. Gen Ekspresyon Analizleri	37
3.7.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	37
3.7.2. Primer dizaynı	37
3.7.3. Real Time PCR ve sonuçların analizi	38
3.8. Yağ Asidi Metil Ester Analizleri	39
3.8.1. Toplam lipit ekstraksiyonu	39

	Sayfa
3.8.2. Yağ asidi metil esterleri'nin hazırlanması	40
3.9. YAME Profiline Göre Biyodizel Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi	41
3.10. İstatistik Analizler	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Mikroalg İzolatları ve İzolasyon Kaynakları.....	43
4.2. Lipit Verimi ve TAG İçeriği Bakımından Ön Seçilim.....	44
4.3. İzolatların Mikroskopik ve Moleküler Tanımlama Sonuçları	46
4.3.1. Mikroskopik tanımlama.....	46
4.3.2. Moleküler tanımlama.....	47
4.4. Seçilen Suşların TAG içerikleri ve Lipit Verimleri	50
4.5. Farklı pH Seviyelerinin <i>A. protothecoides</i> KP7 ve <i>C. vulgaris</i> KP2 Suşlarının TAG Akümülayonuna ve Biyokütle Üretimine Etkisi	52
4.6. pH ve Azot Yokluğu Stresinin <i>A. protothecoides</i> KP7 Suşunun Biyokütle Konsantrasyonuna Etkisi	56
4.7. pH ve Azot Yokluğu Stresinin <i>C. vulgaris</i> KP2 Suşunun Biyokütle Konsantrasyonuna Etkisi	57
4.8. pH ve Azot Yokluğu Stresinin <i>A. protothecoides</i> KP7 Suşunun Biyokimyasal Kompozisyonuna Etkisi	58
4.9. pH ve Azot Yokluğu Stresinin <i>C. vulgaris</i> KP2 Suşunun Biyokimyasal Kompozisyonuna Etkisi	59
4.10. pH ve Azot Yokluğu Stresinin <i>A. protothecoides</i> KP7 Suşunun TAG Akümülayonuna ve Lipit Verimine Etkisi.....	60
4.11. pH ve Azot Yokluğu Stresinin <i>C. vulgaris</i> KP2 Suşunun TAG Akümülayonuna ve Lipit Verimine Etkisi.....	62
4.12. <i>A. protothecoides</i> KP7 Suşunda TAG Biyosentezi ile İlişkili Olabilecek Bazı Genlerin Alkali pH ve Azot Yokluğu Stresi Altındaki Ekspresyon Seviyeleri.....	65
4.13. pH ve Azot Yokluğu Stresinin <i>A. protothecoides</i> KP7 Suşunun Yağ Asidi Profiline ve Biyodizel Kalitesine Etkisi	67

Sayfa

4.14. pH ve Azot Yokluğu Stresinin <i>C. vulgaris</i> KP2 Suşunun Yağ Asidi Profiline ve Biyodizel Kalitesine Etkisi	69
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	109



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Mikroalgler ile bitkilerin biyodizel üretimi bakımından karşılaştırılması .	16
Çizelge 2.2. Mikroalg türleri ve lipit içerikleri	17
Çizelge 3.1. Real-Time PCR için dizayn edilen primerler, gen bölgeleri, beklenen ürün büyüklükleri ve NCBI referans sekansları	38
Çizelge 4.1. 30 mikroalg izolatının izole edildikleri su kaynakları ve kültüre alındıkları besiyeri ortamları	43
Çizelge 4.2. Mikroalg izolatları ve <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cw15 referans suşunun azot yeterli (N+) ve azot yokluğu (N-) koşullarında elde edilen lipit içerikleri, biyokütle verimleri, lipit verimleri ve bağıl floresan birimi (RFU) değerleri	45
Çizelge 4.3. Mikroalg izolatlarının DNA sekans benzerlik sonuçları	49
Çizelge 4.4. <i>A. protothecoides</i> KP7 suşunun protein, nişasta ve toplam klorofil (klorofil -a + klorofil -b) içerikleri.....	59
Çizelge 4.5. <i>C. vulgaris</i> KP2 suşunun protein, nişasta ve toplam klorofil (klorofil-a + klorofil-b) içerikleri.....	60
Çizelge 4.6. <i>A. protothecoides</i> KP7 suşunun biyokütle verimi (mg/L/gün), lipit içeriği (%) ve lipit verimi (mg/L/gün)	62
Çizelge 4.7. <i>C. vulgaris</i> KP2 suşunun biyokütle verimi (mg/L/gün), lipit içeriği (%) ve lipit verimi (mg/L/gün).....	64
Çizelge 4.8. 10 genin pH6 N+, pH 6 N-, pH 10 N+ ve pH 10 N- koşullarında saptanan bağıl ekspresyon seviyeleri	65
Çizelge 4.9. <i>A. protothecoides</i> KP7 suşunun yağ asidi profili.....	68
Çizelge 4.10. <i>A. protothecoides</i> KP7 suşundan elde edilen yağ asidi metil esterlerinin tahmini biyodizel özellikleri	69
Çizelge 4.11. <i>C. vulgaris</i> KP2 suşunun yağ asidi profili	70
Çizelge 4.12. <i>C. vulgaris</i> KP2 suşundan elde edilen yağ asidi metil esterlerinin tahmini biyodizel özellikleri.....	70
Çizelge 5.1. <i>A. protothecoides</i> ve <i>C. vulgaris</i> türleri için azot yokluğu/azlığı koşullarında önceki çalışmalarda bildirilen lipit içerikleri ve lipit verimleri	79

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Mikroalglerin kullanım alanları.....	5
Şekil 2.2. Alglerin taksonomik sınıfları.....	6
Şekil 2.3. Mikroalglerde TAG biyosentez yolağı	11
Şekil 2.4. Transesterifikasyon reaksiyon şeması.....	15
Şekil 2.5. 2019 yılında biyodizel üretimi yapan ülkeler ve yıllık biyodizel üretim miktarları.....	18
Şekil 3.1. Triolein standart eğri grafiğı.....	34
Şekil 3.2. Aktin geni için Real-Time PCR sonucunda oluşan DNA'nın amplifikasyon grafiğı (a) ile erime eğrisi (b).....	39
Şekil 4.1. Mikroalglerin izole edildikleri su ortamları ve izolat sayıları	44
Şekil 4.2. ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesine göre tanımlanan mikroalg suşları için Maximum Composite Likelihood metodu ile oluşturulmuş filogenetik ağaç	49
Şekil 4.3. Mikroalg izolatlarının ve <i>C. reinhardtii</i> cw15 referans suşunun azot yeterli (N+) ve azot yokluğu (N-) koşullarında elde edilen lipit içerikleri (a), bağıl floresan birimi (RFU) değerleri (b), lipit verimleri (c) ve biyokütle verimleri (d)	51
Şekil 4.4. (a) <i>A. protothecoides</i> KP7 suşunun 6 farklı ortam pH'sında elde edilen biyokütle konsantrasyonları (mg/L), ve (b) bağıl floresan birimi (RFU) değerleri	53
Şekil 4.5. (a) <i>C. vulgaris</i> KP2 suşunun 6 farklı ortam pH'sında elde edilen biyokütle konsantrasyonları (mg/L) ve(b) bağıl floresan birimi (RFU) değerleri	55
Şekil 4.6. (a) <i>A. protothecoides</i> KP7 suşunun pH 6 N+, pH 6 N-, pH 10 N+ ve pH 10 N- koşullarında saptanan biyokütle konsantrasyonları (mg/L) ve (b) ortam pH'ları.....	56
Şekil 4.7. (a) <i>C. vulgaris</i> KP2 suşunun pH 8 N+, pH 8 N-, pH 9 N+ ve pH 9 N- koşullarında saptanan biyokütle konsantrasyonları (mg/L) ve (b) ortam pH'ları	57

Şekil

Sayfa

- Şekil 4.8. (a) *A. protothecoides* KP7 suşunun pH 6 N⁺, pH 6 N⁻, pH 10 N⁺ ve pH 10 N⁻ koşulları altında saptanan bağıl floresan birimi (RFU) değerleri, (b) nötral lipidlerinin HPTLC profili ve (c) % lipid içerikleri. (d) *A. protothecoides* KP7 suşunun pH 6 N⁻ ve pH 10 N⁻ koşulları altında belirlenen TAG içerikleri ve TAG/TL oranları 61
- Şekil 4.9. (a) *C. vulgaris* KP2 suşunun pH 8 N⁺, pH 8 N⁻, pH 9 N⁺ ve pH 9 N⁻ koşulları altında saptanan bağıl nötral lipid içeriği, (b) nötral lipidlerinin HPTLC profili ve (c) % lipid içerikleri. (d) *C. vulgaris* KP2 suşunun pH 6 N⁻ ve pH 10 N⁻ koşulları altında belirlenen TAG içerikleri ve TAG/TL oranları 64
- Şekil 4.10. (a) Asetil-CoA karboksilaz (ACC), (b) Diaçilgliserol O-açiltransferaz 1 (DGAT1), (c) Fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPC), (d) Pirüvat dehidrogenaz kompleksi E1 alt ünitesi (PDC-E1), (e) Pirüvat dehidrogenaz kompleksi E2 alt ünitesi (PDC-E2) ve (f) Pirüvat dehidrogenaz kinaz (PDK) genlerinin bağıl mRNA seviyeleri..... 66
- Şekil 4.11. (a) NADP-bağımlı malik enzim (kloroplastik), (b) NADP-bağımlı malik enzim, (c) Gliserol-3-fosfat açiltransferaz (GPAT3) ve (d) Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz (GPDH) genlerinin bağıl mRNA seviyeleri 67

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Ziga termal atık suyu (a), Koçpınar kaynak suyu (b), pH metre ile suyun sıcaklık ve pH ölçümü	23
Resim 3.2. F/2, Bold's basal, Jaworski's, BG11 ve TAP besiyerlerine ekilen su örnekleri.....	24
Resim 3.3. Agarlı besiyerine ekilen su örnekleri	24
Resim 3.4. Azot varlığında (N+) ve azot yokluğunda (N-) kültüre alınmış hücrelerin görüntüsü.....	27
Resim 3.5. Kanola yağının 5, 10, 20, 40 ve 80 µg konsantrasyonlarındaki renk değişimi (a) ve standart eğri grafiği (b)	31
Resim 3.6. Sığır serum albümin (BSA)'in 2,5, 5, 10, 20, 40 µg konsantrasyonlarındaki renk değişimi (a) ve standart eğri grafiği (b).....	35
Resim 3.7. Glikozun 2,5, 5, 10, 20, 40 ve 80 µg konsantrasyonlarındaki renk değişimi (a) ve standart eğri grafiği (b)	36
Resim 3.8. Toplam lipit ekstraksiyonu (a), transesterifikasyon sonrası YAME'nin ayrıştırılması (b) ve hekzan içerisinde elde edilen YAME (c)	40
Resim 3.9. Yağ asidi metil ester bantlarının HPTLC'de görüntülenmesi	40
Resim 4.1. Mikroalg izolatlarının ışık mikroskobu altında 1000× büyütme ile alınan görüntüleri: 1. KP2, 2. EA22, 3. M19, 4. B1, 5. S1, 6. KPX4, 7. EA25, 8. EA7 9. KP7	46
Resim 4.2. KP7 kodlu izolatın alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ile çekilmiş hücre fotoğrafları. (a) 9.3mm ×40 büyütme, (b) 9.3mm ×100 büyütme	47
Resim 4.3. Gradient PCR jel görüntüsü. 1: cw15 referans suşun DNA'sından elde edilen PCR ürünü, 2: KP2 kodlu izolatın DNA'sından elde edilen PCR ürünü	48
Resim 4.4. EA7, EA22, EA25 S1, M19, KP2, KPX4, KP7 ve B1 kodlu izolatların DNA'sından elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: 100 bp DNA uzunluk markörü	48
Resim 4.5. Mikroalg izolatlarının ve <i>C. reinhardtii</i> cw15 referans suşunun azot yeterli (N+) ve azot yokluğu (N-) koşullarında elde edilen nötral lipidlerinin HPTLC profili. STD: triolein, FFA: serbest yağ asidi, TAG: triaçilgliserol, DAG: diaçilgliserol, MAG: monoaçilgliserol, PL: fosfolipit	52

Resim	Sayfa
Resim 4.6. <i>A. protothecoides</i> KP7 suşunun 6 farklı pH’da azot varlığı (N+) ve yokluğu (N-) koşullarında elde edilen nötral lipidlerinin HPTLC profili	54
Resim 4.7. <i>C. vulgaris</i> KP2 suşunun 6 farklı pH’da azot varlığı (N+) ve yokluğu (N-) koşullarında elde edilen nötral lipidlerinin HPTLC profili	55



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
v/v	Hacimce yüzde
w/v	Ağırlık/Hacimce yüzde
β	Beta
μ L	Mikrolitre
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pH	Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesi
pmol	Pikomol
U	Ünite

Kısaltmalar

Açıklamalar

ACC	Asetil-CoA karboksilaz
ADU	Ortalama doymamış yağ asidi derecesi
ATP	Adenozin trifosfat
BHT	Bütil hidroksitolüen
BSA	Sığır serum albümin
CAM	Crassulacean asit metabolizması
CBB	Calvin–Benson–Bassham
CCM	karbondioksit-konsantre-edici mekanizmalar
cDNA	Tamamlayıcı DNA
DAG	Diaçilgliserol

Kısaltmalar**Açıklamalar**

DGAT1	Diaçilgliserol O-açiltransferaz 1
DHAP	Dihidroksiaseton fosfat
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EMP	Embdene Meyerhof Yolağı
FAS	Yağ asidi sentez enzimi
FESEM	Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu
G3P	gliserol-3-fosfat
GPAT	Gliserol-3-fosfat açiltransferaz
GPDH	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz
HPTLC	Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi
LD	Lipit droplet
LPA	lizofosfatidat
LPAT	lizofosfatidik asit açiltransferaz enzimi
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
MCMT	Malonil-CoA transaçilaz enzimi
ME	Malik enzim
mRNA	Mesajcı RNA
MUFA	Tekli doymamış yağ asitleri
OAA	Okzalasetat
OD	Optikal yoğunluk
PA	Fosfotidik asit
PAP	Fosfatidik asit fosfataz
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDK	Pirüvat dehidrogenaz kinaz
PDC-E1	Pirüvat dehidrogenaz kompleks-E1 ünitesi
PDC-E2	Pirüvat dehidrogenaz kompleksi-E2 ünitesi
PEP	Fosfoenolpirüvat

Kısaltmalar**Açıklamalar**

PEPC	Fosfoenolpirüvat karboksilaz
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
PPP	Pentoz Fosfat Yolağı
RFU	Bağıl floresan birimi
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
Rpm	1 dakikadaki devir sayısı
Rubisco	Ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz
SFA	Doymuş yağ asitleri
SPV	Sülfo-fosfo-vanilin
TAG	Triaçilgliserol
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü
TCA	Trikloroasetik asit
YAME	Yağ asidi metil esterleri

1. GİRİŞ

Dünya genelinde fosil yakıt kaynaklarının hızla tükenmesi ve fosil yakıtların çevresel zararlarından dolayı fosil yakıtlara alternatif olarak, yenilenebilir ve çevre dostu bir enerji kaynağı olan biyodizelin üretilmesi için mikroalglerin kullanılması ideal bir strateji olarak görülmektedir. Mikroalgler hızlı üremeleri ve ökaryotlarda depo lipidlerinin majör formu olan triaçilgliseroller (TAGs) yüksek miktarda biriktirmelerinden dolayı, üçüncü nesil biyodizel üretimi için sürdürülebilir kaynaklar arasında en umut verici organizmalardan birisidir. Mikroalg hücrelerinin ortalama lipid içerikleri optimal koşullar altında kuru ağırlığın %5 ile %20'si arasında değişmekte olup çeşitli kimyasal ve fizyolojik stres koşulları altında bu oran %50'nin üzerine çıkmakta hatta bazı türlerde (*Botryococcus* sp.) %80'lara kadar ulaşabilmektedir (Mata, Martins ve Caetano, 2010). Yağlı bitkilerle kıyaslandığında mikroalglerin; lipid içeriklerinin yüksek olması, kısa yaşam döngüsüne sahip olması, bol ve ucuz materyal olması, mevsimlerden daha az etkilenmesi, daha az çaba gerektirmesi, küçük alanda daha büyük ölçekte üretilmesi gibi çeşitli avantajları vardır (Chisti, 2007). Ayrıca, bazı stres koşulları altında mikroalglerin yağ asidi profili ile yağlı bitkilerin yağ asidi profili oldukça benzerlik göstermektedir (Draaisma ve diğerleri, 2013).

Mikroalgler; besin elementlerinin (azot, fosfor, sülfür, demir) azlığı veya yokluğu, yüksek tuzluluk, farklı ışık yoğunluğu, alkali veya asidik pH, yüksek veya düşük sıcaklık gibi olumsuz koşullarda yüksek oranda TAG ve lipid üretimi yapabilmektedir (Renaud, Thinh, Lambrinidis ve Parry, 2002; Li, Du ve Liu, 2008; Converti, Casazza, Ortiz, Perego ve Del Borghi, 2009; Bellou ve Aggelis, 2013). Azot yokluğu (N⁻) stresi mikroalglerde TAG akümülyasyonunu indükleyen en önemli stres faktörlerinden birisidir. (Fan ve diğerleri, 2012; Sharma, Schuhmann ve Schenk, 2012; Ren, Liu, Ma, Zhao ve Ren, 2013; Kajikava ve diğerleri, 2015). Ayrıca N⁻stresinde birçok mikroalg türünde biyodizel kalitesini arttıran tekli doymamış yağ asitleri (MUFA)'nin miktarında artış olurken, biyodizelin oksidasyon stabilitesini olumsuz etkileyen çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)'nin miktarında düşüş olmaktadır (Breuer, Lamers, Martens, Draaisma ve Wijffels, 2012).

Mikroalglerin üremesini etkileyen önemli fizyolojik faktörlerden birisi de pH'dır. pH, CO₂ ve besinlerin çözünürlüğünü ve kullanılabilirliğini belirlemektedir (Chen ve Durbin, 1994). Alkali pH, mikroalglerin CO₂'ye olan ilgisini azaltmakta ve hücre bölünmesini engellemekle

birlikte, hücre içinde TAG üretimini uyarmaktadır (Azov, 1982; Guckert ve Cooksey, 1990). Bunun yanı sıra, mikroalg kültür ortamının yüksek alkali pH (pH 10)'ya sahip olması başka organizmaların kontaminasyonunu engelleyebilmektedir (Bartley, Boeing, Dungan, Holguin ve Schaub, 2014). Alkali pH (pH 10) ve N⁻ kombine stres koşullarında *Coelastrella*, *Desmodesmus*, *Chlorella*, and *Scenedesmus* spp. mikroalg türlerinde TAG akümülyasyonunun arttığı rapor edilmiştir (Gardner, Peters, Peyton ve Cooksey, 2011; Skrupski, Wilson, Goff ve Zou, 2013; Xia, Yang, He ve Hu, 2015). Öte yandan, alkali pH ve N⁻ stresinin; nişasta, protein ve klorofil ve miktarları üzerine etkisi mikroalglerde çok az çalışılmıştır.

Mikroalglerde lipit metabolizmasıyla ilgili mekanizmanın iyi anlaşılması ve metabolik yolda değişikliğe gidilerek lipit üretiminin artırılması, 4. nesil biyodizel üretimi için önemli bir basamaktır. TAG biyosentezinde rol alan anahtar enzimlerin sentezinden sorumlu genlerin, strese bağlı ekspresyon seviyelerindeki artışının belirlenmesi, TAG miktarını ve biyodizelin ana bileşeni olan kısa zincirli yağ asitlerinin (C16, C18) miktarını arttırmaya yönelik genetik modifikasyonlara zemin hazırlayacaktır.

Farklı mikroalg türlerinde TAG biyosentezinde anahtar role sahip olduğu düşünülen bazı enzimler bildirilmiştir (Tan ve Li, 2016). TAG metabolik yolağıyla doğrudan ilişkili olan enzimler arasında; TAG biyosentezinin ilk ve son basamağını katalizleyen, asetil-CoA karboksilaz (ACC) ve diaçilgliserol O-açiltransferaz (DGAT) enzimleri yer almaktadır. Bu enzimlere ek olarak; TAG sentezinin ilk açılma reaksiyonunu katalizleyen, gliserol-3-fosfat açiltransferaz (GPAT) enzimi ve gliserol-3-fosfat oluşumunu katalizleyen, gliserol-3-fosfat dehidrogenaz (GPDH) enzimleri, TAG biyosentezinde yer alan diğer anahtar enzimler arasındadır. Öte yandan, TAG biyosentezini dolaylı yoldan etkileyen bazı enzimler de mevcuttur. Bu enzimlerden malik enzim (ME), yağ asidi biyosentezi için gerekli olan NADPH'yi sağlarken, pirüvat dehidrogenaz kompleksi (PDC) ise lipit biyosentezinde öncül bir molekül olan asetil-CoA'nın sentezlenmesini katalizler. PDC'nin negatif regülatörü olan pirüvat dehidrogenaz kinaz (PDK) enzimi ve fosfoenolpirüvat (PEP)'tan okzalasetat oluşumunu katalizleyen fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPC) enzimi diğer enzimler arasındadır. Literatürde, alkali pH ve N⁻ kombine stresine ve sadece alkali pH stresine maruz bırakılan mikroalglerde, ACC, DGAT, GPAT, GPDH, ME, PDC, PEPC ve PDK enzimlerini kodlayan genlerin ekspresyon seviyesinin belirlendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Biyodizel üretiminde kullanılacak mikroalg türlerinin seçiminde; hızlı büyüme oranı, yüksek lipid verimi, yüksek TAG içeriği, yüksek doymuş yağ asidi miktarı, düşük doymamış yağ asidi miktarı, ekstrem çevre şartlarında gelişebilme, kontaminasyonlara direnç, değişen çevre şartlarına tolerans, kolay hasat ve kolay lipid ekstraksiyonu önemli kriterlerdir. TAG'ler, %99 oranında biyodizele dönüşme oranına ve yüksek yağ asidi içeriğine sahip olduklarından kimyasal işlemler ile kolayca transesterifikasyona uğratarak biyodizelin çok amaçlı bir formu olan yağ asidi metil esterleri (YAME) elde edilmektedir (Williams ve Laurens, 2010). Mikroalglerden biyodizel üretimi laboratuvar koşullarında başarılı bir şekilde gerçekleştirilse de endüstriyel üretim için; üretim maliyetin azaltılması ve hem yüksek TAG içeriğine sahip hem de hızlı çoğalan mikroalg izolatlarının bulunması veya geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, farklı çevresel koşullardan izole edilmiş mikroalglerin biyodizel üretim potansiyellerine belirlemek, N yokluğu ile pH stresinin mikroalglerin; biyokütle konsantrasyonuna, TAG akümülyasyonuna, biyokimyasal kompozisyona ve yağ asidi profiline etkisini ortaya koymak ve TAG biyosentezinde anahtar role sahip bazı enzimlerin sentezinden sorumlu genleri belirlemektir. Çalışmada;

1. İç Anadolu bölgesinde bulunan ve tuz konsantrasyonu çok yüksek olan Tuz Gölü suyundan, Aksaray ilinde bulunan ve pH'sı 5,5 olan Koçpınar kaynak suyundan ve sıcaklığı 43°C olan Ziga termal-mineral suyu gibi farklı çevresel koşullardan ve diğer su kaynaklarından farklı mikroalg izolatları elde etmek,
2. N- stresinin, izolatların TAG ve lipid verimine olan etkisini ortaya koymak ve N- stresinde en yüksek lipid verimi ve TAG içeriğine sahip izolat/izolatları belirlemek,
3. Lipid ve TAG içeriği yüksek izolat/izolatları tür düzeyinde tanımlayarak, N- stresinin yanı sıra, besiyeri pH'sının da etkisini araştırmak ve seçilen izolatların en yüksek TAG ve lipid verimine sahip olduğu pH'yı belirlemek,
4. pH/N yokluğu ve bu iki stresin kombinasyonu koşullarının, yüksek TAG içeriğine sahip olan mikroalg suşunda; PEPC, PDC-E1, PDC-E2, GPDH, DGAT1, ME, ACC, GPAT ve PDK enzimlerinin sentezinden sorumlu genlerin ekspresyonuna olan etkisini ortaya koymak,
5. TAG içeriği ve lipid verimi yüksek mikroalg tür/türlerinin belirlenen en iyi pH ve azot stresinde, biyokimyasal kompozisyon ve yağ asidi profiline etkisini ortaya koymak,

6. N yokluğu ve pH stresi ile işkili yağ asit profili farklılığının, biyodizel kalitesi ile ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

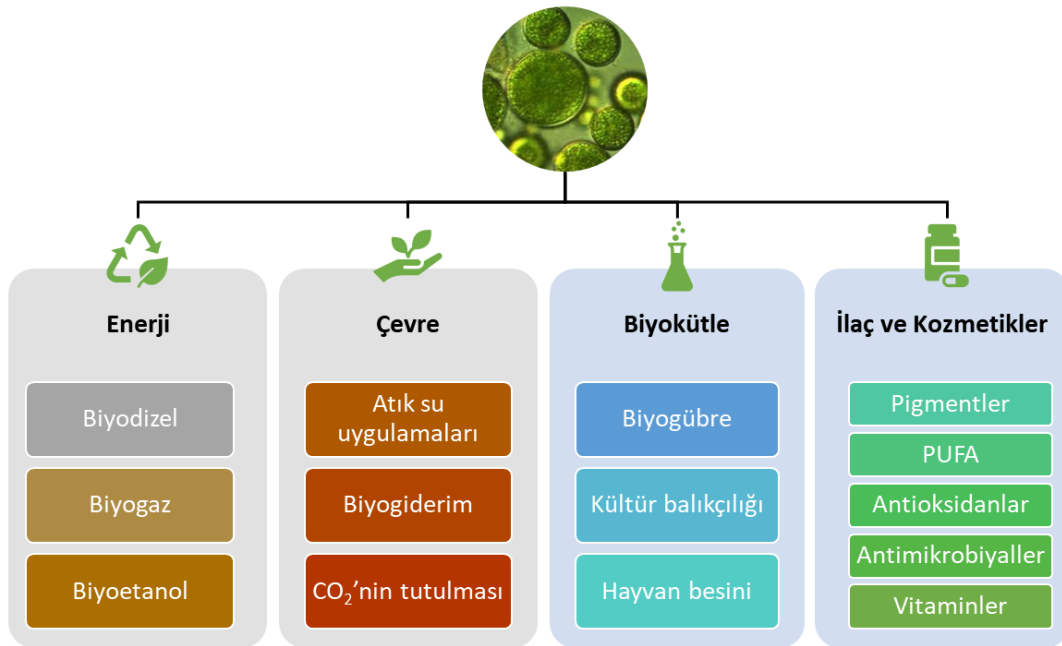
Bu amaç doğrultusunda, biyoyakıt üretiminde kullanma potansiyeli olan stres koşullarında lipit ve TAG metabolizmasının ortaya konması, standart ve yüksek veriminde biyodizel üreticisi mikroalg tür/türlerini ilgili sektöre kazandırmak hedeflenmiştir. Bir diğer hedef ise, stres koşullarıyla indüklenen TAG metabolik yoluyla ilişkili genlerin ekspresyon düzeyinde belirlenmesine bağlı olarak, yüksek verim ve kalitede biyodizel üreticisi suş elde edebilmektir. Bu şekilde elde edilecek biyodizel üreticisi suş ile, yüksek stabilitede ticari bir ürün geliştirmek mümkün olacaktır.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'nın 3001-Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı tarafından (proje no: 116Y345) ve Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından (proje no: TDP19F3) desteklenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Mikroalgler

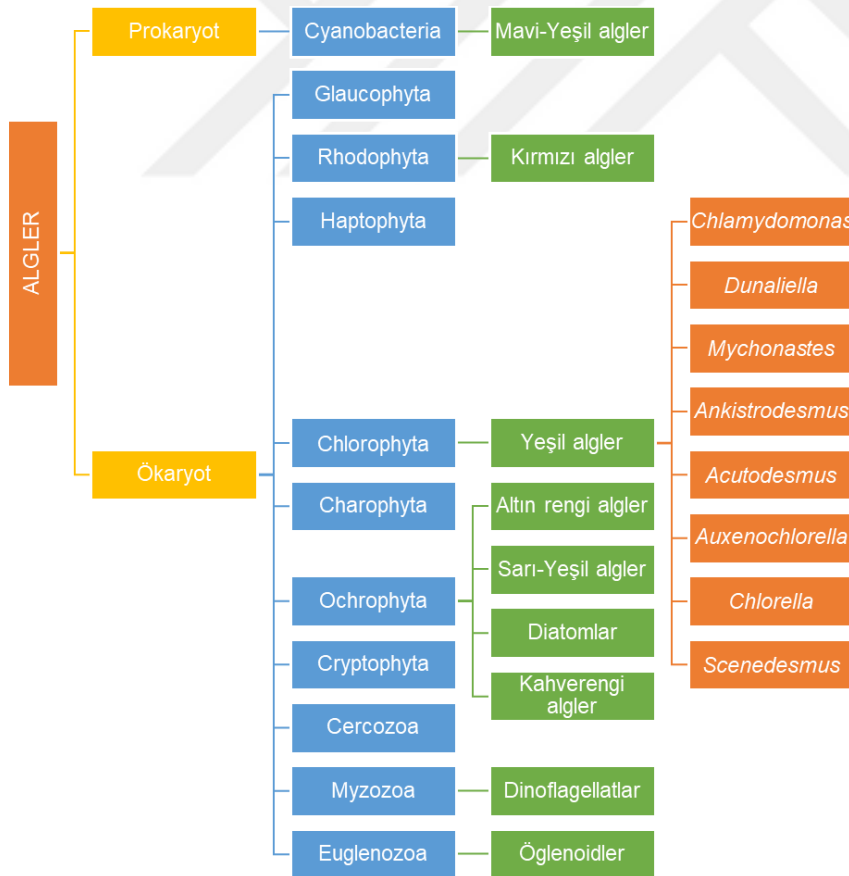
Mikroalgler; en eski yaşam formlarından olan, dünya ekosisteminde çeşitli su ortamlarında yaşayabilen, en az 30 bin türü tanımlanmış, prokaryotik veya ökaryotik fotosentetik canlılardır (Mata ve diğerleri, 2010). Mikroalgler ışık enerjisiyle birlikte CO₂'yi çeşitli biyoyakıtlara, gıdalara, yemlere ve yüksek ekonomik öneme sahip çeşitli ürünlere dönüştürebilecek hücre fabrikalarıdır (Chisti 2007). Bu fotosentetik mikroorganizmalar, biyogiderim uygulamalarında ve nitrojen fikse eden gübreler olarak kullanılmış faydalı mikroorganizmalardır. (Mallick, 2002; Suresh ve Ravishankar, 2004; Kalin, Wheeler ve Meinrath, 2004; Munoz ve Guieysse, 2006). Ayrıca mikroalgler; fosil yakıtlara göre biyolojik olarak daha hızlı parçalanabilen biyodizel, etanol, hidrojen ve/veya metan gibi farklı yakıt kaynakları için ham madde sağlayabilmesi, organik gübre ve yeşil kömür olarak kullanılabilmesi, omega-3 yağ asiti, sterol, karotenoid, astaksantin, lutein, fikosiyenin ve algüronik asit gibi yüksek ekonomik değeri olan maddelerce zengin olması nedeniyle önemli bir organizma grubudur (Şekil 2.1) (Spolaore, Joannis-Cassan, Duran ve Isambert, 2006; Khozin-Goldberg, Iskandarov ve Cohen, 2011).



Şekil 2.1. Mikroalglerin kullanım alanları

2.1.1. Alglerin sınıflandırılması

Tarihsel olarak, birçok araştırmacı tarafından algler için farklı sınıflandırmalar ortaya konulmuştur. Bu sınıflandırmalarda algler; fotosentetik pigmentlerin varlığına (klorofiller, karotenoidler ve fikobilinler), fotosentetik depolama ürününün kimyasal yapısına, fotosentetik membran (tilakoidler) organizasyonuna, kloroplastların membran yapısına, hücre duvarının kimyasına ve yapısına, üreme döngülerine ve kamçılı türlerde kamçı sayısı ve yapısı temelinde sınıflandırılmıştır. Yakın zamanda, filogenomik ölçekli filogenetik analizlerin yaygın kullanımından ve rRNA filogenilerinde büyük ölçüde artan takson örneklemeinden kaynaklanan gelişmeler neticesinde ve önceki yapılan sınıflandırmalar ışığında algler için; Cyanobacteria, Glaucophyta, Rhodophyta, Chlorophyta, Charophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Ochrophyta, Cercozoa, Myxozoa ve Euglenozoa gibi 11 ana şubeyi içeren bir sınıflandırma ortaya çıkmıştır (Barsanti ve Gualtieri, 2014; Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Alglerin taksonomik sınıfları (Barsanti ve Gualtieri, 2014)

Chlorophyta (Yeşil algler)

Chlorophyta şubesi, 7500'den fazla alg türü içeren en çeşitli alg grubu olarak kabul edilir. Chlorophyta şubesinde yer alan alglerin yaklaşık %10'u denizlerde, %90'ı tatlı sularda bulunmaktadır (Smith, 1955).

Yeşil algler, klorofil *a* ve *b* bulunduran, tek bir kloroplasta sahip olan, tek ve çok hücreli türleri bulunan fotosentetik ökaryotik mikroalglerdir. Diğer ökaryotik alglerden farklı olarak, nişastayı sitoplazmada değil genellikle bir pirenoidle ilişkili olarak kloroplastlarda depo ederler. Hücre duvarlarında genellikle, ana yapısal polisakkarit olarak selüloz bulunurken, bazı türlerin hücre duvarlarında selüloz yerine ksilanlar ve mannanlar bulunmaktadır (Huizing ve diğerleri, 1979). Genellikle, başlıca bulunan karatenoid çeşidi luteindir. *Dunaliella* cinsi yeşil alglerin, olumsuz kültür koşulları (yüksek tuzluluk, azot yoksunluğu) altında, tilakoidler arasında yüksek miktarda β -karoten akümüasyonu yaptığı, *Haematococcus* cinsi mikroalglerin ise lipit globüllerinde astaksantin akümüasyonu yaptığı rapor edilmiştir (Hagen ve diğerleri, 2000; Wang ve diğerleri, 2003). Chlorophyta şubesinin tek hücreli temsilcileri; *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* ve *Haematococcus pluvialis* olup, bu türler ticari üretimlerde kullanılmaktadır.

Chlorophyta'nın tek hücreli temsilcileri arasında en dikkat çekici tür olan *C. vulgaris*'in bilimsel sınıflandırması; Üst Alem: Eukaryota, Alem: Protista, Şube: Chlorophyta, Sınıf: Trebouxiophyceae, Takım: Chlorellales, Aile: Chlorellaceae, Cins: Chlorella, Tür: *Chlorella vulgaris*, şeklindedir. *C. vulgaris*, boyut olarak 2 ile 10 μm arasında değişen, hücre duvarına sahip, küre/elips şekilli, hareketsiz, kadeh şeklinde tek bir kloroplast ile tek bir pirenoid'e sahip olan tek hücreli mikroalgdir (Safi ve diğerleri, 2014). Kloroplastı, amiloz ve amilopektin bazlı nişasta granülleri içerirken, pirenoidi yüksek miktarda ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco) enzimleri içermektedir. Tek bir nükleus, kloroplast boşluğunda bulunan renksiz merkezi sitoplazmada yer almaktadır. Stigma ve kasılma vakuolleri genellikle yoktur. Tübüler ve dallanmış mitokondri, diktiyozomlar, birkaç vakuol, endoplazmik retikulum ve lipit cisimcikleri sitoplazmada mevcuttur.

C. vulgaris, bazı koşullar altında yüksek yağ içeriğine (Mata ve diğerleri, 2010) ve yüksek nişasta içeriğine sahip olması nedeniyle (Branyikova ve diğerleri, 2010), biyodizel ve biyoetanol gibi yakıtların üretimi için potansiyel mikroalg türleri arasında yer almaktadır.

(Hirano, Ueda, Hirayama ve Ogushi, 1997; Mallick, Mandal, Singh, Bishai ve Dash, 2012). Bunun yanı sıra yüksek protein (%42–58), zengin vitamin ve mineral içeriğinden ötürü, insan beslenmesinde gıda takviyesi veya katkı maddesi olarak pazarda bulunabilen birkaç mikroalg türünden biridir (Fradique ve diğerleri, 2010)

Bir diğer *Chlorella* cinsi olan *Auxenochlorella protothecoides* türü, Trebouxioophyceae familyasında yer alan, tek hücreli fakültatif heterotrof ökaryotik bir mikroalgdır. Hücreleri hareketsiz ve kokoid şekilli olup, tek ve kadeh şeklinde kloroplasta sahiptir. *Auxenochlorella*, üç katlı dış duvar tabakası ve pirenoidi olmamasıyla ile elektron mikroskobu altında karakterize edilebilir (Huss ve diğerleri, 2002). Hetetrofik koşullar altında hızlı üreyebilmesi ve yüksek miktarda lipid sentezleyebilmesi nedeniyle, mikroalg türleri arasında biyodizel üretimi için öne çıkan türler arasındadır (Li ve diğerleri, 2007).

2.1.2. Mikroalglerde karbon ve azot metabolizması

Fakültatif karbon metabolizması

Fotosentetik algler, bir dizi kimyasal ve redoks reaksiyonunu yürütmek için ışık enerjisini kullanarak atmosferik karbonu (CO_2) fikse ederler. Fikse edilen karbon, hücreye ATP, indirgeyici güç ve karbon iskeletleri sağlamak için kullanılacak olan depo moleküllere dönüştürülür. ATP ve NADPH, CO_2 fiksasyonundan sorumlu olan Calvin döngüsünü besler. Harici bir karbon kaynağı olmadığı sürece, fotosentez tek enerji kaynağıdır ve CO_2 fiksasyonu, tüm reaksiyonlar için karbon iskeleti sağlamaktadır. Calvin–Benson–Bassham (CBB) döngüsünde, CO_2 , Rubisco tarafından yakalanır ve bir dizi kimyasal reaksiyon sonucunda glikoza dönüştürülür (Wang, Stessman ve Spalding, 2015). Mikroalgler, Rubisco çevresindeki karbon konsantrasyonunu arttırmak için çeşitli karbondioksit-konsantre-edici mekanizmalara (CCM) sahiptirler. CCM, çevredeki düşük CO_2 konsantrasyonuna karşı geliştirilmiş olan biyolojik bir adaptasyondur (Moroney ve Ynalvez, 2007). Genellikle, ortamdaki CO_2 seviyesinin %2-5 seviyelerinde olması mikroalglerin üremesine ve fotosentezine olumlu katkı yaptığı, yüksek CO_2 seviyelerinde ise hücresel pH homeostazının bozulduğu düşünülmektedir (Sun ve diğerleri, 2018).

Heterotrofik karbon metabolizması

Heterotrofik yetiştirme birçok mikroalg türü için uygun değildir. Ancak bazı türler tamamen karanlık bir ortamda bir organik karbon kaynağı ile etkili bir üreme gösterebilirler. Mikroalglerin heterotrofik kültüründe karbon kaynağı olarak genellikle glikoz, asetat ve gliserol kullanılmaktadır (Perez-Garcia, Escalante, de-Bashan ve Bashan, 2011). Glikoz, mikroalglerin heterotrofik kültüründe en yaygın kullanılan karbon kaynağıdır. Glikoz, mikroalgler tarafından karanlıkta Pentoz Fosfat Yolağı (PPP) ile, ışıktaki ise Embdene Meyerhof Yolağı (EMP) yoluyla metabolize edilir (Neilson and Lewin, 1974). Algler glikozu karanlıkta ve anaerobik koşullarda metabolize edemezler. Bununla birlikte, aerobik koşullarda glikozun %85'inden fazlasını asimile ederek, glikozu çoğunlukla süktroz ve nişastaya dönüştürürler (Tanner, 2000).

Bir diğer yaygın kullanılan karbon kaynağı da asetat (asetik asit)'tir. Asetat, monokarboksilik/proton taşıyıcı protein vasıtasıyla hücre içine alınır ve hücre içine alındıktan sonra asetil-CoA sentaz enzimi aracılığıyla, koenzim A molekülü asetilasyona uğratarak asetil-CoA oluşturulur (Boyle and Morgan, 2009). Asetat, genellikle metabolik olarak iki yolla oksitlenir; (a) glioksizomlarda glioksilat döngüsü ile malata dönüştürülür ve mitokondride trikarboksilik asit döngüsü (TCA) ile sitrata dönüştürülür. Genel olarak, asetat asimilasyonu yaparak üreyen mikroalgler, glioksilat döngüsü yoluna sahip olmalıdır (Neilson and Lewin, 1974).

Azot metabolizması

Hayatın temel yapı taşları olan; proteinlerin, enzimlerin, klorofillerin, enerji transfer moleküllerinin (ATP, ADP), genetik materyallerin (RNA, DNA) sentezi için azot gereklidir (Rimmer ve Shorttle, 2019). Azot, karbon ve oksijenden sonra alglerde kütlece en çok bulunan üçüncü elementtir (Giordano, 2013). Ökaryotik algler, diazotrofik bir bakteri ile simbiyotik bir ilişkide olmadıkları sürece, moleküler azotu (N_2) kullanamazlar (Schmidt ve diğerleri, 2013). *Rhizosolenia* ve *Hemiaulus* gibi siyanobakteriyel simbiyontlara sahip bazı diatomlar, nitrojenaz yardımıyla N_2 'yi asimile edebilirler (Markou ve diğerleri, 2014).

Ökaryotik mikroalgler tarafından kullanılan en yaygın inorganik azot formları, çoğunlukla amonyum (NH_4^+), nitrat (NO_3^-) ve nitrit (NO_2^-)'tir (Galván ve diğerleri 1996). Algler için

inorganik nitrojen kaynakları arasında en çok tercih edileni amonyumdur, çünkü hücre içine alımı çok az enerji gerektirir. NH_4^+ , nükleik asitler, proteinler ve diğer organik moleküller için temel bir ön birleşiktir ve çoğunlukla alglerde NH_4^+ alınımı, NH_4^+ taşıyıcılarını içeren AMT/MEP membran protein ailesi vasıtasıyla gerçekleşmektedir. (Andrews ve diğerleri, 2013). Hücre içine alınan NH_4^+ , esas olarak glutamin sentaz ve glutamat sentaz enzimlerinin reaksiyonlarını içeren, GS-GOGAT yoluyla asimile edilir (Mifflin ve Lea, 1982).

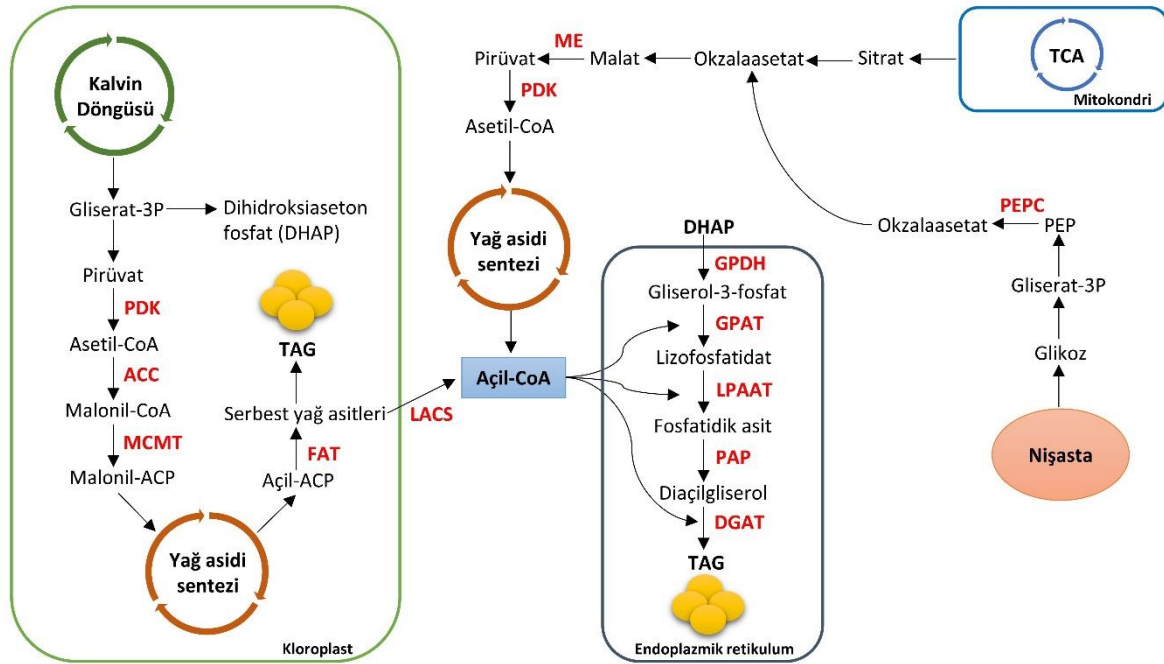
Fotosentetik ökaryotlarda, nitrat asimilasyonu iki taşıma ve iki indirgeme adımı ile gerçekleştirilir: Nitrat hücreye taşınır, ardından sitozolik nitrat redüktaz enzimi, nitratın nitrite indirgenmesini katalizler. Daha sonra, nitrit kloroplasta taşınır ve burada nitrit redüktaz enzimi aracılığıyla nitrit amonyuma indirgenir. Yapısal olarak bakıldığında, *C. reinhardtii*'de nitrat ve/veya nitrit taşınmasında NRT1, NRT2 ve NAR1 olmak üzere üç protein ailesi rol oynamaktadır (Fernandez ve Galvan, 2007).

2.1.3. Mikroalglerde lipit ve TAG metabolizması

Mikroalglerde yağ asitlerinin sentezi bitkilere benzer şekilde plastidlerde gerçekleşir. Sentezlenen yağ asitleri sitozole geçer ve endoplazmik retikulum membranında bulunan bazı enzimler tarafından katalizlenen bir dizi reaksiyon sunucunda TAG'ye dönüştürülür (Şekil 2.3). Buna ek olarak; bitkilerde görülmeyen ve *Chlamydomonas reinhardtii*'de N- stresi altında kloroplastlarda gerçekleşen “*de novo* TAG sentezi” de rapor edilmiştir (Moellering ve Benning, 2010; Miller ve diğerleri, 2010). Mikroalglerde TAG sentezinde iki ana metabolik yolağın olduğu ve bu yolların; “Kennedy ya da G3P yolağı” ile “Monoağılglicerol yolağı” olduğu bildirilmiştir (Kennedy, 1961; Ratledge, 1988; Ohlrogge ve Browse, 1995; Hu ve diğerleri, 2008).

Kloroplastlarda gerçekleşen *de novo* TAG sentezi'nin ilk aşamasında, asetil-CoA karboksilaz (ACC) enzimi asetil CoA'yı malonil CoA'ya dönüştürür. İkinci aşamada malonil-CoA transaçilaz enzimi (MCMT), malonil-CoA'yı malonil-ACP (açıl taşıyıcı protein)'ye dönüştürür. Daha sonra yağ asiti sentez enzimi (FAS), malonil-ACP ve asetil-CoA'yı substrat olarak kullanarak açıl zincirlerinin uzamasını katalizler. Bu reaksiyon sonucunda açıl-ACP formundaki yağ asitleri gliserol-3-fosfat (G3P)'in açılınması için kullanılır. G3P, GPAT enzimi aracılığıyla açılınarak lizofosfatidik asit (LPA)'e dönüştürülür. LPA, lizofosfatidik asit açıltransferaz (LPAT) enzimi aracılığıyla açılınarak

fosfatidik asit (PA)'e dönüştürülür. Oluşan PA, fosfataz enzimi aracılığıyla diaçilgliserol (DAG)'e dönüştürülür. DAG, diaçilgliserol açiltransferaz (DGAT) enzimi ile TAG'ye dönüştürülür. Sentezlenen TAG, sitozole geçer ve lipit droplet (LD) içerisinde depolanır (Ohlrogge ve Browse, 1995; Hu ve diğerleri, 2008; Tan ve Lee, 2016).



Şekil 2.3. Mikroalglerde TAG biyosentez yolağı

Fan, Andre ve Xu (2011), *Chlamydomonas reinhardtii*'de N- stresinde TAG sentezinin, kloroplastlarda yağ asitlerinin “*de novo*” olarak sentezlemesine bağlı olduğunu rapor etmişlerdir. Yağ asitleri (açıl-ACP formunda olan) kloroplastlarda G3P'nin birbirini izleyen açillenme reaksiyonları için direk olarak kullanılabilir ve bunun sonucunda DAG oluşur. DAG'ler kloroplastlarda esas olarak fotosentetik membranların yapısına katılır. DAG'ler ayrıca *Chlamydomonas*'da kloroplastik TAG sentezi için öncül moleküldür (Fan ve diğerleri, 2011; Goodson, Roth, Wang ve Goodenough ve diğerleri, 2011).

Kloroplastlarda sentezlenen serbest yağ asitleri, sitoplazmaya geçer ve burada uzun-zincir açıl-KoA sentaz (LACS) enzimi ile moleküle bir koenzim-A eklenerek, açıl-CoA üretilir. (Mashek, Li ve Coleman, 2007). Sentezlenen açıl-CoA endoplazmik retikuluma geçerek, açıl vericisi olarak iş görür. Endoplazmik retikuluma TAG sentezi, sırasıyla 3 açillenme reaksiyonu sonucunda gerçekleştirilir. İlk reaksiyonda; G3P, GPAT enzimi aracılığıyla açillenerek lizofosfatidat (LPA)'a dönüşür. İkinci reaksiyonda; lizofosfatidik asit

açıltransferaz enzimi (LPAT), LPA'ya bir yağ asidi ekler ve PA oluşur. Üçüncü reaksiyonda; fosfatidik asit fosfataz (PAP) enzimi, PA molekülünden bir fosfat grubunu uzaklaştırarak, DAG sentezini katalizler. Son aşamada ise DAG, DGAT enzimi aracılığıyla açillenerek TAG sentezi gerçekleştirilir (Huerlimann ve Heimann, 2013; Li-Beisson, Beisson ve Riekhof, 2015).

2.1.4. Mikroalglerde lipit ve TAG metabolizmasında rol olan genler ve moleküler mekanizması

Diaçilgliserol açıltransferaz (DGAT) enzimi

DGAT enzimi, TAG biyosentezinin son aşaması olan DAG'den TAG oluşumunu katalizleyen enzimdir (Şekil 2.3). Alglerde lipit metabolizmasıyla ilgili gen aileleri genellikle yüksek bitkilerden daha az olmasına rağmen Msanne ve diğerleri (2012), *Chlamydomonas reinhardtii* türünde sadece DGAT enzimini kodlayan 6 genin olduğunu (1 tane *DGAT1* geni, 5 tane *DGAT2* geni) ve her genin ekspresyon seviyesinin N- stresinde farklı olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan iki bağımsız çalışmada, hem tip-1 hem de tip-2 (*DGAT1* ve *DGAT2*) genlerinin N- başta olmak üzere; demir, fosfor, çinko ve sülfür yokluğunda da indüklendiği bildirilmiştir (Miller ve diğerleri, 2010; Boyle ve diğerleri, 2012).

Asetil-CoA karboksilaz (ACC) enzimi

ACC enzimi kloroplastlarda gerçekleşen *de novo* yağ asiti sentezi'nin ilk aşaması olan asetil CoA'nın malonil CoA'ya dönüşmesini katalizleyen enzimdir (Şekil 2.3). Fan ve diğerleri (2014), *Chlorella pyrenoidosa*'da N- stresinde ACC genlerinin ekspresyon seviyesinde önemli ölçüde artış olduğunu rapor etmişlerdir.

Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz (GPDH) ve gliserol-3-fosfat açıltransferaz (GPAT) enzimleri

GPDH, dihidroksiaseton fosfat (DHAP) ve NADH'dan, gliserol-3-fosfat (G3P) ve NAD sentezini katalizleyen enzimdir (Şekil 2.3). G3P, mikroalglerde gliserolipid ve gliserol sentezi için önemli bir öncül maddedir. GPAT enzimi TAG sentezinin ilk açillenme reaksiyonun katalizler. Bu reaksiyon sonucunda G3P açillenerek lizofosfatidat (LPA)'a

dönüşür. Boyle ve diğerleri (2012) ile Hsieh, Su ve Chien (2012) yaptıkları çalışmalarda, GPAT geninin aşırı ekspresyonunda TAG içeriğinde sırasıyla 1,5 kat ve %30-40'lık bir artış olduğunu rapor etmişlerdir. Yao ve diğerleri (2014) tarafından yapılan çalışmada, *P. tricornutum*'da G3PDH geninin aşırı ekspresyonunda, nötral lipit içeriğinde 1.9 katlık artış olduğu bildirilmiştir.

Malik enzim (ME)

ME, malatın pürivata dönüşmesini katalizleyen enzimdir ve bu dönüşüm sonucunda pürivat, NADPH ve CO₂ açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan NADPH, yağ asidi sentezinde indirgeyici güç olarak kullanılan önemli bir metabolittir (Şekil 2.3). Son yıllarda yapılan çalışmalarla ME ekspresyonu artırılmış transgenik mikroalglerde, nötral lipit miktarında önemli ölçüde artış olduğu bildirilmiştir. Xue ve diğerleri (2016) tarafından yapılan çalışmada, genetik mühendisliği ile *Chlorella pyrenoidosa*'da ME'den sorumlu genin ekspresyon seviyesi ve enzim aktivitesi artırılmış ve optimal koşullarda toplam lipit miktarının %40,9'a (kuru hücre ağırlığının) çıktığı, nötral lipit miktarının da 3,2 kat arttığı, N- koşullarında ise bu oranın %58,7'ye ve 4,6 kat'a çıktığı rapor edilmiştir.

Pürivat dehidrogenaz kompleksi (PDC) ve Pürivat dehidrogenaz kinaz (PDK) enzimi

PDC, pürivatın asetil-CoA, CO₂ ve NADH (H⁺)'ye dönüşümünü katalizleyen multienzim sistemidir (Patel ve Roche, 1990; Şekil 2.3). PDC üç ana üiteden oluşur. E1 ünitesinde (pürivat dehidrogenaz) pürivatın dekarboksilasyonu gerçekleşir ve bunun sonucunda hidroksietil tiamin pirofosfat oluşur. E2 ünitesinde (dihidrolipoil transasetilaz) hidroksietil grubu lipoik asite transfer edilerek asetil dihidrolipoamid oluşturulur. Asetil dihidrolipoamid'deki asetil grubunun CoA'ya transfer edilmesiyle asetil-CoA oluşturulur. E3 ünitesinde (dihidrolipoil dehidrogenaz) dihidrolipoamid'in tekrardan yükseltgenmesi ile NADH oluşturulur. Yüksek bitkilerde PDC'nin iki farklı izoformu vardır. Bunlardan birisi mitokondri diğeri de kloroplastta yer almaktadır. Mitokondrial PDC, karbon metabolitlerinin solunum yolağına girmesini belirlerken, kloroplastik PDC, *de novo* yağ asidi sentezi için asetil-CoA ve NADH sağlamaktadır (Camp ve Randall, 1985).

PDK, mitokondrial PDC E1 ünitesini fosforilleyerek bu üniteyi inaktif hale getirir. Bu yüzden PDK, PDC'nin negatif regülatördür (Sudgen ve diğerleri, 2003). Son yıllarda

bitkilerde yapılan çalışmalarda, PDK'nin fazla eksprese olmasının PDC aktivitesini ve tohum yağ içeriğini azalttığı bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2011). *Phaeodactylum tricornutum*'da yapılan bir çalışmada ise PDK geni manipüle edilmiş mutant hücrelerde nötral lipid akümülayonunun arttığı rapor edilmiştir (Ma ve diğerleri 2014). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, *Nannochloropsis salina*'da PDK geninin susturulması sonucu TAG biyosentezinin arttığı rapor edilmiştir (Ma ve diğerleri, 2017).

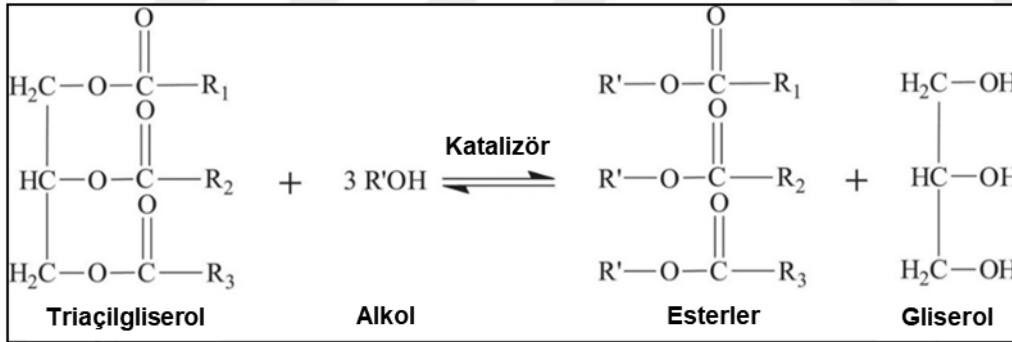
Fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPC)

PEPC, HCO_3^- ve Mg^{2+} varlığında fosfoenolpirüvat (PEP)'in β -karboksilasyonunu katalizleyerek, okzalasetat (OAA) oluşumunu sağlayan enzimdir (Chollet, Vidal ve O'Leary, 1996; Şekil 2.3). PEPC, C4 fotosentezinde ve crassulacean asit metabolizmasında (CAM), fotosentetik CO_2 asimilasyonunun ilk fiksasyon basamağını katalizler (Chollet ve diğerleri, 1996). Bu enzim C3 bitkilerinde ve fotosentetik olmayan organizmalarda anaplerotiktir ve TCA döngüsünü çeşitli metabolik yollardan elde edilen ara ürünler ile besler. PEPC enzimi; bitkiler, algler, siyanobakteriler ve fotosentetik bakteriler olmak üzere tüm fotosentetik organizmalarda bulunurken, fotosentetik olmayan bakteri ve protozoa'larda da bulunmaktadır. *Chlamydomonas reinhardtii*'de PEPC'nin iki izoformu (PEPC1 ve PEPC2) bulunmaktadır. C4 bitkilerinde bulunan PEPC'nin bikarbonata olan ilgisi, C3 bitkilerinde bulunan PEPC'nin bikarbonata olan ilgisinden 10 kat daha fazladır (Ting ve Osmond, 1973).

Yüksek bitkilerde ve mikroalglerde yapılan çalışmalarda PEPC enzim aktivitesiyle lipid akümülayonu arasında ters bir ilişki olduğu rapor edilirken, bazı çalışmalarda ise nitrojen azlığı stresinde PEPC'nin protein seviyesinde artış olduğu bildirilmiştir. *Chlamydomonas reinhardtii*'de PEPC1 geni, düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri etkileşimi (CRISPRi) tekniği kullanılarak inhibe edilmiş ve lipid içeriğinde 74.4% artış sağlandığı rapor edilmiştir (Kao ve Ng, 2017). Öte yandan Moellering, Ouyang, Mamedov ve Chollet (2007), *Chlamydomonas reinhardtii*'de iki PEPC izoformunun protein seviyelerinin, nitrojen azlığında (0.5 mM NH_4Cl) en yüksek düzeyde olduğunu rapor etmişlerdir.

2.2. Mikroalglerden Biyodizel Üretimi

Biyodizel; bitkilerden, hayvanlardan, alglerden, mayalardan ve bakterilerden elde edilen yağların, bir katalizör (enzim, asit veya baz) eşliğinde etanol veya metanol ile reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan ve yakıt olarak kullanılan bir üründür. Biyodizel; hayvansal, bitkisel veya atık yağlarda bulunan uzun zincirli yağ asitlerinin mono-alkil esterleri olarak da tanımlanmaktadır. Yenilebilir, yanıcı olmayan ve toksik olmayan çevre dostu bir yakıt olmasının yanı sıra; yüksek parlama noktası, biyolojik olarak parçalanabilmesi, zararlı gaz salınımının az olması gibi bazı avantajları vardır (Balat, 2011; Fazal ve diğerleri, 2013) Biyodizel, seri olarak 3 geri dönüşümlü transesterifikasyon reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan bir üründür (Şekil 2.4). Bu reaksiyonlarda trigliserit digliserite, digliserit monogliserite ve monogliserit de esterlere (biyodizel) ve gliserol (yan ürün)'e dönüşür. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için kısa zincirli bir alkol (metanol), bir katalizör (NaOH, H₂SO₄, enzim) ve ısı kullanılmaktadır. Alkol ve yağ oranı teorik olarak 3:1 molar oranında olsa da uygulamalarda genellikle 6:1 molar oranı kullanılmaktadır. Teorik olarak 1 kg yağdan 1 kg biyodizel elde edilmektedir (Mata ve diğerleri, 2010).



Şekil 2.4. Transesterifikasyon reaksiyon şeması (Mata ve diğerleri, 2010)

Mikrobiyal yağlar ya da tek hücre yağları; bakteri, maya, mantar ve mikroalglerden elde edilmektedir. Maya, mantar ve mikroalgler bileşimi bitkisel yağlara benzeyen TAG'leri sentezleyebilirken, bakterilerin çoğu spesifik yağları sentezleyebilmektedirler. Mikroalgler; yağ asiti profilinin bitkisel yağlara benzerlik göstermesi, spesifik alg türlerine ve onların ortam koşullarına bağlı olmak üzere %2-75 arasında değişen lipid üretimine sahip olması, hatta bazı sıra dışı koşullar altında kuru ağırlığının %80'ından daha fazla yağ üretebilmesi, farklı çevresel koşullarda yaşayabilmesi ve kısa sürede üremeleri nedeniyle biyodizel üretim potansiyeli yüksek olan organizmalardır (Li ve diğerleri, 2008; Rodolfi ve diğerleri, 2009).

Geleneksel biyodizel esas olarak soya yağı, kanola yağı, ayçiçeği yağı, palm yağı ve atık yağlardan elde edilmektedir. Ancak yağlı bitkilerin ekilmesi için çok büyük alanlara ihtiyaç duyulması ve biyodizel üretimi için bitkisel yağlar kullanıldığında maliyetin tüm üretim maliyetinin %70-85'ini bulması nedeniyle; araştırmacılar mikroalg, maya, bakteri ve mantar gibi daha ucuz yağ kaynak materyallerine yönelmişlerdir (Liang, Zhang, Gu ve Cong, 2013). Bitkilerle kıyaslandığında mikroalglerden üretilen biyodizelin önemli avantajları vardır. Bu avantajlar;

- ✓ Bir yıl boyunca üretim yapılabilme kapasitelerinden dolayı; mikroalglerin yağ üretim verimi, yağlı tohum bitkilerinden çok daha fazladır. Örneğin; mikroalglerin açık havuz kültüründen yıllık elde edilen biyodizel 12.000 L/ha iken, kolza tohumundan elde edilen biyodizel miktarı 1190 L/ha'dır (Schenk ve diğerleri, 2008, Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Mikroalgler ile bitkilerin biyodizel üretimi bakımından karşılaştırılması

Kaynak material	Tohum yağ içeriği (%)	Yağ miktarı (L/ha*)	Kullanılan alan (m ² /kg)	Biyodizel verimi (kg biyodizel/ha*)
Mısır (<i>Zea mays</i>)	44	172	66	152
Hint keneviri (<i>Cannabis sativa</i>)	33	363	31	321
Soya (<i>Glycine max</i>)	18	636	18	562
Hint fıstığı (<i>Jatropha curcas</i>)	28	741	15	656
Ketencik (<i>Camelina sativa</i>)	42	915	12	809
Kanola (<i>Brassica napus</i>)	41	974	12	862
Ayçiçeği (<i>Helianthus annuus</i>)	40	1.070	11	946
Hint yağı (<i>Ricinus communis</i>)	48	1.307	9	1.156
Palm yağı (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5.366	2	4.747
Mikroalg (düşük yağ içerikli)	30	58.700	0,2	51.927
Mikroalg (normal yağ içerikli)	50	97.800	0,1	86.515
Mikroalg (yüksek yağ içerikli)	70	136.900	0,1	121.104

*: hektar alan

(Mata ve diğerleri, 2010)

- ✓ Mikroalgler sıvı ortamlarda yetiştikleri halde karasal bitkilerden daha az suya ihtiyaç duyarlar (Dismukes, Carrieri, Bennette, Ananyev ve Posewitz, 2008).
- ✓ Mikroalgler tuzlu sularda veya tarıma elverişsiz alanlarda üretilerler (Searchinger ve diğerleri, 2008).
- ✓ Mikroalgler hızlı üreme potansiyeline sahiptirler ve belirli koşullar altında genel olarak birçok tür kuru ağırlığının %20–50'si arasında değişen oranlarda yağ üretim kapasitesine sahiptir (Spolaore ve diğerleri, 2006).

- ✓ Mikroalg kültürü için gerekli olan besin maddeleri, atık sulardan elde edilebilir (Cantrell, Ducey, Ro ve Hunt, 2008).
- ✓ Mikroalg kültürü herbisit ve pestisit uygulaması gerektirmez. (Rodolfi ve diğerleri, 2009).
- ✓ Mikroaglerden yağ ekstraksiyonu yapıldıktan sonra kalan atık biyokütleden gıda veya gübre olarak kullanılabilecek protein ile birlikte, fermentasyon tekniği kullanılarak etanol veya metanol elde edilebilir (Hirano, Ueda, Hirayama ve Ogushi, 1997).

Mikroalgler tarafından üretilen lipitler, depo lipitleri (nötral lipitler) ve yapısal lipitler (polar lipitler) olarak iki gruba ayrılabilir. Depo lipitleri esas olarak TAG formunda olup ağırlıklı olarak doymuş yağ asitleri ve bazı doymamış yağ asitlerinden oluşur. Yapısal lipitler ise genellikle çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)'nden oluşur. Polar lipitler (fosfolipitler) ve steroller, hücre membranının ve organel membranlarının seçici geçirgenliğinde rol alan lipitlerdir. Yapısal görevlerinin yanı sıra sfingolipitler ve inositol lipitler hücre sinyal yollarında görev alırlar (Carreira, Ventura, Varela ve Silva, 2015).

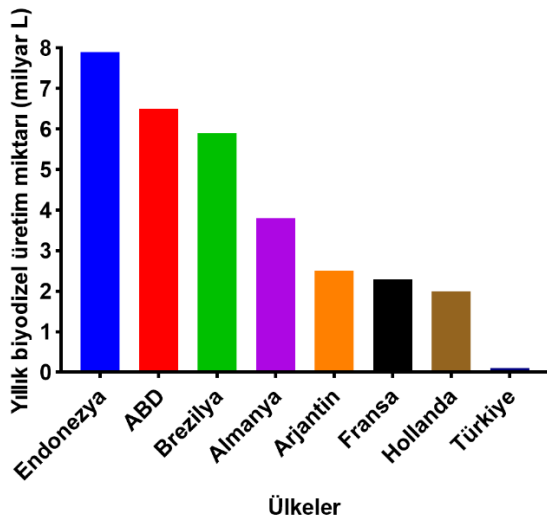
Nötral lipitlerden TAG'ler metabolik enerji için kolayca parçalanabilen depo ürünleridir (Gurr, Harwood ve Frayn, 2002). Genellikle ışıktaki sentezlenirler ve sitozolik yağ küreleri şeklinde depolandıktan sonra, karanlıkta polar lipitlerin sentezi için tekrar kullanılırlar (Thompson, 1996). TAG'ler kimyasal işlemler ile kolayca transesterifikasyona uğratarak biyodizelin çok amaçlı bir formu olan YAME elde edilmektedir. Biyodizel üretim potansiyeli yüksek olan bazı mikroalg türleri; *C. vulgaris*, *C. protothecoides*, *Scenedesmus* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis oculata*, *Haematococcus pluvialis*'dir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Mikroalg türleri ve lipit içerikleri

Mikroalg türleri	Lipit içeriği (%)	Referanslar
<i>Chlorella</i> sp.	32,6-66,1	Hsieh ve Wu (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0-58,0	Mata ve diğerleri, (2010)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	56,0	Wan ve diğerleri, (2012)
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6-57,8	Mata ve diğerleri, (2010)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	15,6-34,9	Damiani, Popovich, Constenla ve Leonardi, (2010)
<i>Neochloris oleabundans</i>	19,0-56,0	Gouveia, Marques, Da Silva ve Reis, (2009)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	21,0-58,0	Abou-Shanab ve diğerleri, (2011)
<i>Scenedesmus</i> sp.	43,4	Ren ve diğerleri, (2013)
<i>Tetraselmis tetrahele</i>	29,2-30,3	Araujo, Matos, Gonçalves, Fernandes ve Farias, (2011)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,7	Rodolfi ve diğerleri, (2009)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	15,5-60,3	Araujo ve diğerleri, (2011)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,8-23,0	Araujo ve diğerleri, (2011)

2.3. Dünyada ve Ülkemizde Biyodizel Üretimi

Dünyada biyodizel üretimi 2000 yılında yaklaşık 0,9 milyar L iken, 2019 yılında bu rakam yaklaşık 46 milyar L'ye ulaşmıştır (Knoema, 2019). 2019 yılı verilerine göre dünya genelinde başlıca biyodizel üreten ülkeler; Endonezya (7,9 milyar L), ABD (6,5 milyar L), Brezilya (5,9 milyar L), Almanya (3,8 milyar L), Arjantin (2,5 milyar L), Fransa (2,3 milyar L), ve Hollanda (2,0 milyar L)'dır (Statistica, 2019; Knoema, 2019) (Şekil 2.5). Türkiye ise biyodizel üretimi bakımından bu ülkelerin çok gerisinde olup 2019 yılı verilerine göre yıllık üretimin yaklaşık 0,14 milyar L olduğu rapor edilmiştir (Knoema, 2019).



Şekil 2.5. 2019 yılında biyodizel üretimi yapan ülkeler ve yıllık biyodizel üretim miktarları (Statistica, 2019; Knoema, 2019)

Ülkemizde bulunan çeşitli su kaynaklarından izole edilen mikroalgler kullanılarak biyodizel üretimi ile ilgili yapılmış çalışma sayısı sınırlıdır (Demirbaş, 2008; Karatay ve Dönmez, 2011). Bununla birlikte literatürde Tuz gölünden izole edilmiş *Dunaliella* sp. ve *Dunaliella salina* türlerinin kullanıldığı bazı çalışmalar mevcuttur (Çelekli ve Dönmez, 2006; Kaçka ve Dönmez, 2008; Yilancioglu, Cokol, Pastirmaci, Erman ve Cetiner, 2014). Ancak, bu çalışmalarda tuz gölünden izole edilmiş olan *Dunaliella* türlerinin biyodizel üretimi bakımından karakterizasyonu yapılmamıştır. Bununla birlikte, literatürde Koçpınar kaynak suyundan mikroalg izolasyonu yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bakımdan bu çalışma ile düşük pH ve yüksek tuzluluk özelliğinde olan su ortamlarından izole edilen bazı mikroalglerin N- altında lipit verimi ve TAG içerikleri saptanmış, daha sonraki

aşamada ise N⁻ ve yüksek alkali pH kombine stresinde lipit verimi ve TAG içerikleri ile birlikte YAME profilleri çıkartılarak biyodizel üretimi bakımından karakterizasyonları yapılmıştır.

2.4. Çevresel Streslerin Mikroalglerin Lipit Verimine ve TAG İçeriğine Etkisi

Mikroalgler; besin elementlerinin (azot, fosfor, sülfür, demir, çinko) azlığı veya yokluğu, yüksek tuzluluk, yüksek ve düşük ışık yoğunluğu, alkali veya asidik pH, yüksek veya düşük sıcaklık gibi olumsuz koşullarda yüksek oranda TAG ve lipit üretimi yapabilmektedir (Renaud ve ark., 2002; Li ve ark.,2008; Converti ve ark., 2009; Bellou ve Aggelis, 2013).

2.4.1. Azot stresinin mikroalglerin lipit verimine ve TAG üretimine etkisi

Azot stresi süresince mikroalglerde üremenin yavaşladığı, otofaji programının indüklendiği, fotosentez hızının düştüğü ve hücre içinde yağ ve nişasta birikiminin olduğu bildirilmiştir (Wang, Ullrich, Joo, Waffenschmidt ve Goodenough, 2009; Juergens ve diğerleri, 2014). *C.reinhardtii*'de N⁻ stresinde fotosentez veriminin düşmesinin, fotosentetik elektron akışı aracılığıyla hem NADPH hem de ATP üretimi için gerekli sitokrom *b₆f* komplekslerinin parçalanması sonucu olduğu rapor edilmiştir. Alglerde lipit ve TAG metabolizmasını etkileyen en önemli stres faktörünün nitrojen yokluğu/azlığı stresi olduğu ve siyanobakteriler, diatomlar ve yeşil algler grubunda olan birçok alg türünde nitrojen stresine yanıt olarak önemli ölçüde lipit birikimi ve özellikle de TAG birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Kajikava ve diğerleri, 2015). Fakhry ve Maghraby (2015) tarafından yapılan çalışmada, besiyerinde %25 nitrojen varlığında *Nannochloropsis salina*'nın kuru hücre ağırlığının %56,1'inin lipit, %15,1'inin de TAG olduğunu, optimal koşullara göre hem lipit hem de TAG içeriğinde 1,5 kat artış olduğu bildirilmiştir. Simionato ve diğerleri (2013), *Nannochloropsis gaditana*'da N⁻ stresinde kuru hücre ağırlığının %38'i kadar TAG birikimi olduğunu rapor etmişlerdir. Ren ve diğerleri (2013), besiyerindeki NaNO₃ konsantrasyonunu 1,0 g L⁻¹'den 0,2 g L⁻¹'ye düşürdüklerinde *Scenedesmus* sp. R16 suşunda toplam lipit içeriğinin %13,7'den %52,6'ya yükseldiğini rapor etmişlerdir.

Bazı mikroalg türlerinde, N⁻ stresinin lipit verimini arttırdığı, bazı türlerde ise azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. Chu ve diğerleri (2013), *C. vulgaris*'in 14 günlük N⁻ stresi sonunda lipit veriminin 43,17 mg/L/gün'den 58,39 mg/L/gün'e yükseldiğini, Wang ve diğerleri (2019),

Nannochloropsis oceanica'da azot sınırlaması koşullarında lipit miktarı artmasına rağmen, biyokütle düştüğü için lipit veriminde bir artış olmadığını rapor etmişlerdir. Griffiths, van Hille ve Harrison (2012), 11 farklı mikroalg türü ile yaptıkları çalışmada; azot varlığı koşullarına kıyasla, azot sınırlaması koşullarında 8 mikroalg türünün lipit verimlerinde artış, 3 mikroalg türünün lipit verimlerinde ise azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

N⁻ stresi mikroalglerin yağ asiti kompozisyonunu da değiştirmektedir. *Chlamydomonas reinhardtii*'de N⁻ stresinde TAG'nin yağ asidi profilinde özellikle C16:0, C16:1, C18:1 ve C18:2 yağ asitlerinin miktarında artış olduğu bildirilmiştir (Siaut ve diğerleri, 2011). Breuer ve diğerleri (2012) 9 farklı mikroalg türü ile yaptıkları çalışmada, N⁻ stresine maruz bırakılan yeşil alglerde özellikle C18:1 yağ asidi miktarında artış olurken C18:2 ve C18:3 yağ asitlerinin miktarında ise düşüş olduğunu bildirmişlerdir.

2.4.2. pH'nın mikroalglerin lipit verimine ve TAG üretimine etkisi

Mikroalglerin üremisini ve metabolizmasının etkileyen fizyokimyasal etmenlerden birisi de pH'dır (Sommer, 1999). Mikroalglerin birçoğu nötral pH'da en iyi üreme gösterirken, besiyerinde oluşacak pH değişimleri alglerde metabolik inhibasyona yol açıp üremeyi kısıtlayabilir (Goldman, 1982.; Azov, 1982). Mikroalglerin kullandıkları karbon kaynakları, kültür ortamında pH'yı değiştirmektedir. *Chlorella vulgaris*'in ototrofik, heterotrofik ve mixotrofik kültüründe karbon kaynaklarının pH üzerine etkisi incelenmiş ve karbon kaynağı olarak atmosferik CO₂ kullandığında 6 gün sonra pH'nın 10'a yükseldiği, heterotrofik ve mixotrofik ortamda karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığında ise pH'nın 7 civarında kaldığı saptanmıştır. Ototrofik kültürde CO₂'nin fazla asimilasyonu pH'yı yükseltirken, heterotrofik ve mixotrofik kültürde pH'nın düşmesi organik karbon metabolizması sonucunda açığa çıkan H⁺ iyonlarından olabileceği rapor edilmiştir (Kong ve diğerleri, 2011).

Yüksek pH'larda, mikroalgler için karbon kaynağının karbonat formundaki birleşikler olduğu ve mikroalglerin serbest CO₂'ye afinitesinin düştüğü bildirilmiştir (Steemann Nielsen, 1975; Azov, 1982). Ayrıca alkali pH koşullarında ana hücrelerin hücre duvarlarında esnekliğin arttığı, bunun da yeni oluşan sporların dışarıya çıkmasını engellediği, bu yüzden de hücre döngüsü zamanının uzadığı rapor edilmiştir (Guckert ve Cooksey, 1990). Öte

yandan alkali pH'nın bir başka sonucu olarak TAG miktarında artış, polar lipid miktarında da azalma olduğu bildirilmiştir (Guckert ve Cooksey, 1990).

Mikroalglerde başlangıç pH'sı lipid verimi için önemli bir faktördür. Mikroalglerden *Scenedesmus* cinsi türlerin optimal lipid verimlerinin pH 6–10 arasında olduğu en yüksek lipid veriminin ise pH 9'da saptandığı bildirilmiştir (Ren ve diğerleri, 2013). Bir başka çalışmada, *Scenedesmus obliquus*'un farklı pH seviyelerinde (pH 5, 7, 9) kültüre alındığında, biyokütle veriminin pH 7'de, TAG içeriğinin ise pH 9'da en yüksek seviyeye ulaştığı rapor edilmiştir (Breuer, Lamers, Martens, Draaisma ve Wijffels diğerleri, 2013). *Chlorella* sp.'de başlangıç pH'sı 8 olduğunda maksimum lipid veriminin elde edildiği bildirilmiştir (Rai, Gautam ve Sharma, 2015). Bartley ve diğerleri (2014)'nin *Nannochloropsis oculata*'da yaptıkları çalışmada, pH 10'da üremenin olmadığı, en iyi üremenin ise pH 8 ve pH 9'da olduğu bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada; pH 7, 8 ve 9'daki yağ asidi profillerinde önemli ölçüde bir değişiklik olmadığı rapor edilmiştir. Eibl ve ark. (2014), *Scenedesmus* sp. Lig 290 izolatını, pH'sı 3, 4 ve 7 olan besiyerinde 35 gün ürettiklerini ve bu süre sonunda; pH 7'de kuru hücre ağırlığının %16'sı kadar, pH 3'te ise %27'si kadar lipid olduğunu, bunun yanı sıra pH 7'ye oranla pH 3'te FAME içeriğinde özellikle biyodizel kalitesini arttıran C16 ve C18 yağ asitlerinde önemli ölçüde artış olduğunu rapor etmişlerdir.

Sadece N⁻ stresine kıyasla, N⁻ ve alkali pH ile birlikte oluşturulan kombine stresin, TAG içeriğindeki artışta daha güçlü bir yanıt oluşturduğu bildirilmiştir (Gardner ve diğerleri, 2011; Santos, Janssen, Lamers, Evers ve Wijffels, 2012). Bunun yanı sıra, besiyerine sodyum bikarbonat ilavesinin birçok mikroalg türünde TAG birikimini teşvik ettiği bildirilmiştir (Lohman ve diğerleri, 2015).

2.5. Mikroalglerde Yağ Asitleri ve Yağ Asitlerinin Biyodizel Kalitesine Etkisi

Mikroalglerde sentezlenen yağ asitlerinin birçoğu bitkilere benzer şekilde C16 ve C18 yağ asitlerinden oluşmaktadır. Birçok mikroalg türünde baskın olarak doymuş yağ asitleri (SFA) ve tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) sentezlenmektedir. Alglerde majör yağ asitleri; *Chlorophyceae* familyası üyelerinde C16:0, C18:1, C18:2, C18:3 ω 3; *Bacillariophyceae* familyası üyelerinde C16:0, C16:1, C20:5 ω 3, C22:6 ω 3; *Euglenophyceae* familyası üyelerinde C16:0, C18:1, C18:2, C18:3 ω 3'dir (Cobelas ve Lechado, 1989).

Hücre içi lipit ve nötral lipit miktarının fazla olması, mikroalglerden biyodizel üretimi için önemli bir kriter olmasına karşın, mikroalgal yağların yağ asidi profilinin de biyodizel kalitesi için uygun kompozisyonda olması gerekmektedir. Mikroalglerden biyodizel üretimi için en uygun yağ asitlerinin miristik asit (C14:0) palmitik asit (C16:0), palmitoleik asit (C16:1), stearik asit (C18:0), oleik asit (C18:1), linoleik asit (C18:2) ve linoleik asit (C18:3) olduğu rapor edilmiştir (Schenk ve diğerleri, 2008; Knothe, 2009). Doymamış yağ asiti akümüasyonu yapan hücrelerin biyodizel üretimi için ideal organizmalar olduğu ve MUFA'ların miktarındaki artışın biyodizel kalitesini arttıran bir parametre olduğu bildirilmiştir (Li, Zheng ve Chen, 2013; Ahmad, Sharma, Daniell ve Kumar, 2015). Biyodizelde PUFA ve SFA'nın düşük seviyelerde olmasının oksidasyon kararlılığını ve düşük sıcaklıktaki akış problemlerini düşürdüğü, MUFA'lardan C16:1 ve C18:1 yağ asitlerinin yüksek miktarlarda olmasının oksidasyon kararlılığına ve düşük sıcaklıktaki akışa pozitif katkı yaptığı bildirilmiştir (Knothe, 2009; Hoekman, Broch, Robbins, Cenicerros ve Natarajan, 2012).

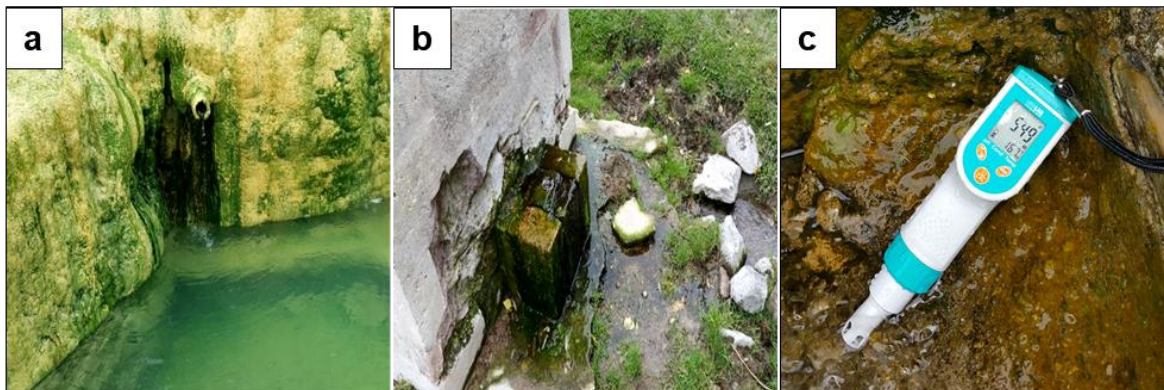
Yağ asidi zincir uzunluğunun ve doymamış yağ asidi miktarının; viskozite, yoğunluk, setan sayısı, bulutlanma noktası, iyot değeri ve üst ısı değer gibi biyodizel özelliklerinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Tan ve Lin, 2011; Hoekman ve diğerleri, 2012). C18:2 ve C18:3 yağ asitlerince zengin biyodizel numuneleri, zayıf oksidasyon kararlılığına sahip olma eğilimindedirler. Setan sayısı ikiden fazla çift bağa sahip çoklu doymamış yağ asitleri ve kısa zincirli yağ asitlerinin miktarındaki artış ile düşmektedir. Yeterli setan sayısının iyi bir motor performansı için gerekli olduğu bildirilmiştir. (Ramos, Fernández, Casas, Rodríguez, Pérez, 2009; Tong, Hu, Jiang ve Li, 2011). Genellikle yağ asidi zincir uzunluğu arttıkça; setan sayısı, viskozite ve bulutlanma noktası artarken, doymamış yağ asidi miktarı arttıkça setan sayısı, viskozite ve bulutlanma noktası düşmektedir. (Francisco, Neves, Jacob-Lopes ve Franco, 2010; Hoekman ve diğerleri, 2012). Ancak yoğunluk, iyot değeri ve üst ısı değer doymamış yağ asitleri arttıkça artmakta, uzun zincirli yağ asitleri arttıkça düşmektedir (Refaat, 2009). Bu nedenle uzun zincirli yağ asitleri ve tekli doymamış yağ asitleri, biyodizelin düşük sıcaklıkta performansı ve oksidatif kararlılığı için tercih edilmektedir. (Refaat, 2009; Francisco ve diğerleri, 2010).

3. MATERİYAL METOT

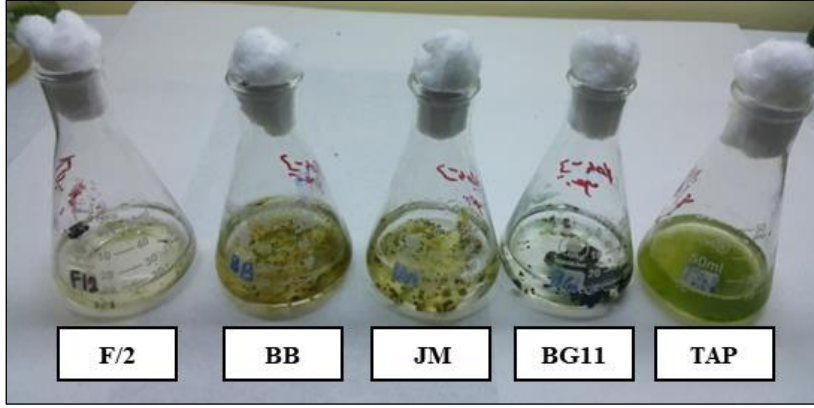
3.1. Mikroalg İzolasyonları

Mikroalg izolasyonları; Aksaray-Koçpınar köyünde bulunan kaynak suyundan, Aksaray-Ziga kaplıcaları termal atık suyundan, Tuz Gölü'nden, Nevşehir'in Gülşehir ilçesinde bulunan bir fabrikanın atık suyundan, Adıyaman'da bulunan Gölbaşı Gölü'nden, Konya'da bulunan Cihanbeyli Gölet'inden ve Beyşehir Gölü'nden, Fethiye'de bulunan Saklıkent Kanyon'dan ve Antalya'nın Belek ilçesinde yer alan Beşgöz Nehri'nden alınan su örneklerinden yapılmıştır.

Koçpınar kaynak suyu (16°C, pH 5,55), Ziga Kaplıcaları termal atık suyu (43°C, pH 6,75) ve Tuz Gölü'nden (18°C, pH 6,5) alınan su örneklerinin, pH ve sıcaklık değerleri el tipi pH metre cihazı ile örnek alımı sırasında belirlenmiştir (Resim 3.1). Diğer lokasyonlardan alınan su örnekleri için bu işlem yapılamamıştır. Su örnekleri, istasyonların bir noktasından en fazla 50 mL olacak şekilde, herhangi bir su örneklem aracı kullanılmadan, istasyonlarda bulunan suyun farklı derinliklerinden alınmıştır. Alınan su örnekleri laboratuvarında; 30 mL BG11 (Rippka, Deruelles ve Waterbury, 1979), Bold's basal (Nichols ve Bold, 1965), TAP (Gorman ve Levine, 1965) Jaworski's (Schlösser, 1982), f/2 (Guillard ve Ryther, 1962) sıvı besiyerlerine 5 mL aktarılmış ve sonrasında mikroalgler 23°C'de ve ışık altında (philips-extreme cool daylight-1050 lm) laboratuvarında üretilmiştir (Resim 3.2).

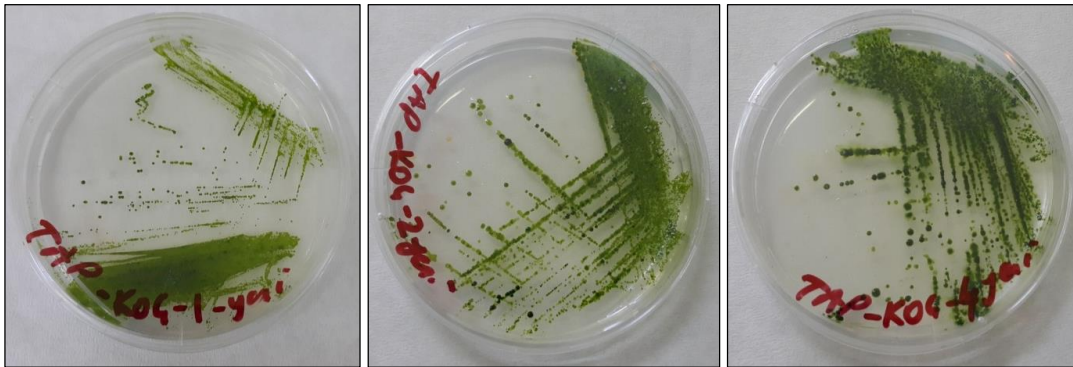


Resim 3.1. Ziga termal atık suyu (a), Koçpınar kaynak suyu (b), pH metre ile suyun sıcaklık ve pH ölçümü (c)



Resim 3.2. F/2, Bold's basal, Jaworski's, BG11 ve TAP besiyerlerine ekilen su örnekleri

Üreme ortamları, izolatların doğal ortamlarına yakın olması için Ziga termal atık suyundan alınan örnekler 40°C'de ve ışık altında, Tuz Gölünden alınan su örnekleri; içerisinde 1,5 M NaCl bulunan modifiye edilmiş Johnson's sıvı besiyerlerine (Borowitzka, 1988) ekilmiş ve oda sıcaklığında ve ışık altında üremeye bırakılmıştır. Sıvı besiyerinde üretilmiş karışık kültürlerden, hangi sıvı besiyerinde üreme varsa o sıvı besiyerinin içerisinde %1,5 oranında agar olan katı besiyerlerine, istisna olarak Ziga termal atık suyundan alınan su örnekleri ise içerisinde %3,0 oranında agar bulunan katı besiyerlerine çizgi ekimi yapılmıştır (Resim 3.3). Ekim yapıldıktan sonra üreme olan petrilere, tek koloni alınarak sıvı besiyerlerine aktarım yapılmış ve aktarım yapılan sıvı besiyerleri, oda sıcaklığında ve ışık altında üremeye bırakılmıştır.



Resim 3.3. Agarlı besiyerine ekilen su örnekleri

İzolatların muhafazası için; içerisinde %1,5 oranında agar bulunan yatık agarlı besiyerlerine hücreler ekilmiş ve yatık agarda çoğaltım sağlandıktan sonra, tüpler +4°C'ye kaldırılmıştır. Ortalama olarak 3 ayda bir besiyeri yenilenerek mikroalglerin muhafazası sağlanmıştır.

Farklı su ortamlarından izole edilmiş mikroalg izolatlarına ek olarak, Minnesota Üniversitesi Chlamydomonas Kaynak Merkezi'nden temin edilen *Chlamydomonas reinhardtii* CC-400 (cw15 mt+) mutant suşu da çalışmaya dahil edilmiştir. Bu suş, N- stresinde iyi bir TAG üreticisi olduğu için (Siaut ve diğerleri, 2011) çalışmanın ilk aşaması olan tüm izolatlar arasından lipit verimi ve TAG içeriği yüksek olan izolatların seçilimi çalışmasında, TAG içeriği bakımından referans suş olarak kullanılmıştır.

3.2. Mikroalglerin Morfolojik Olarak Tanımlanması

İzolatların hücre morfolojisinden faydalanarak tanımlama yapılabilmesi için; Olympus marka (Olympus BX53) ışık mikroskobu altında ve $\times 1000$ büyütmede hücreler incelenmiştir. Mikroalglerin morfolojik tanımlamasında, Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Tahir ATICI'dan yardım alınmıştır. Ayrıca, biyodizel üretim potansiyeli en yüksek olan izolatın hücre morfolojisi, Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM, Hitachi Regulus 8230) ile görüntülenmiştir. Mikroalg hücreleri agarlı besiyerinden alındıktan sonra, kritik nokta kurutucu cihaz (Leica EM CPD300) ile kurutulmuş ve FESEM ile $9,3 \text{ mm} \times 40$ ve $9,3 \text{ mm} \times 100$ büyütme altında görüntülenmiştir. Bu işlemler, Osmangazi Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından yapılmıştır.

3.3. Moleküler Tanımlama

3.3.1. DNA izolasyonu ve PCR

Lipit verimi ve/veya TAG içeriği yüksek olan bazı izolatlar DNA düzeyinde tanımlanmıştır. Mikroalglerden DNA izolasyonu, Genomic DNA Purification Kit (Thermo, K0512) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 50 mL mikroalg kültürü santrifüjle toplandıktan sonra sıvı azotla dondurulmuş ve havan içerisinde parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler 1,5 mL polipropilen tüplere alındıktan sonra, Genomic DNA Purification Kit'inin önerdiği metot izlenerek DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'nın miktarı agaroz jelde DNA bantlarının kalınlıklarına göre tahmini olarak yapılmış ve PCR için kullanılacak tüm DNA'lar yaklaşık 10 ng/ μ l olacak şekilde ayarlandıktan sonra PCR aşamasına geçilmiştir.

Moleküler tanımlama için; ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesini çoğaltan ve White, Bruns, Lee ve Taylor (1990) tarafından dizayn edilmiş olan; ITS1: 5'-AGGAGAAGTCGTAACAAGGT-3' ve ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' primerleri kullanılmıştır. ITS primerlerinin bağlanma sıcaklığını belirlemek için 5 farklı sıcaklıkta (55°C, 57°C, 59°C, 61°C ve 63°C) PCR cihazında (Bioer, XP cycler) gradient PCR yapılmıştır.

Amplifikasyon için; 1,25 µL ileri ve geri primerler (5 pmol), dNTP (2,5 mM) 2,5 µL, Buffer (10×) 5 µL, MgCl₂ (25 mM) 1,75 µL, *Taq* DNA polimeraz (5 U/µL) 0,5 µL, ultra saf su (45,75 µL) ve DNA 2 µL olacak şekilde PCR karışımı hazırlanmıştır. PCR sıcaklık döngüsü ise; 94°C'de 5 dk (1 döngü), 94°C'de 45s, 59°C'de 45s, 72°C'de 45s (40 döngü), 72°C'de 5 dk (1 döngü) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinden 10 µL alınarak, 5 µL jel yükleme boyası ile karıştırılmış ve %2'lik agaroz jelde 130 V'de 50 dk yürütülmüştür. Elektroforez sonrasında jel etidyum bromür boyası ile boyandıktan sonra UV transillüminatör cihazında görüntülenmiştir. PCR sonucunda tek ve yeterli kalınlıkta bant elde edildikten sonra, PCR ürünleri çift yön sekanslama için Sentebiolab firmasına gönderilmiştir. Firmadan gelen sekans bilgileri NCBI veri bankasında bulunan sekanslar ile BLAST analizi yapılmış ve eşleşen türler ile benzerlik yüzdeleri saptanmıştır (Hadi ve diğerleri, 2016).

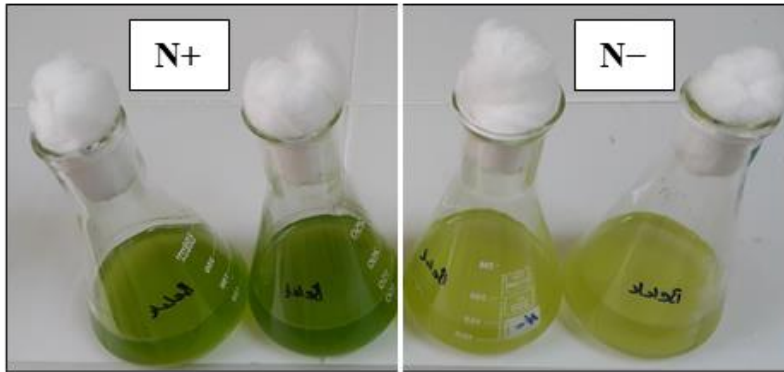
3.3.2. Sekans analizi ve filogenetik ağaç oluşturulması

Tüm izolatlar arasında lipit verimi ve TAG içeriği en yüksek olan 9 izolatın DNA düzeyinde tanımlaması yapılmıştır. PCR sonucunda elde edilen sekansların, NCBI veritabanında bulunan mikroalg DNA sekansları ile olan benzerlikleri NCBI/BLAST programı kullanılarak saptanmıştır. Bunun sonucunda en yüksek benzerlik skorlarını gösteren izolatların sekansları, NCBI GenBank veri tabanından alınarak, mikroalg izolatları için elde edilen sekanslar ile birlikte MEGA (v10.0) programı içerisine eklenmiştir. Eklenen tüm sekanslar için, programda yer alan ClustalW modülü ile çoklu dizi hizalaması gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağaç, Tamura-Nei modeline dayanan Maximum Likelihood yöntemi ve 1000 Bootstrap tekrarı kullanılarak oluşturulmuştur (Hadi ve diğerleri, 2016).

3.4. Azot Yokluğu Stres Denemesinin Kurulması

Farklı besiyerlerinde üreyen izolatlarda N⁻ stresi oluşturmak için; BG11 besiyeri NaNO₃ eklenmeden, TAP besiyeri NH₄Cl ve (NH₄)₆MoO₃ eklenmeden, modifiye edilmiş Johnson's besiyeri ise KNO₃ eklenmeden hazırlanmıştır (Zhang, Chen, He ve Wang, 2013; Deng, Fei ve Li, 2011). N⁻ stres denemesi kurulmadan önce, strese maruz bırakılacak mikroalg izolatları en iyi üreme gösterdikleri sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. İçerisinde sıvı kültürlerin olduğu erlenler bir foto-inkübatör cihazında (Minitron, Infors HT); 23°C'de, 12 saat ışık:12 saat karanlık periyodunda (ışık yoğunluğu 86 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 100 rpm çalkalama hızında 10–15 gün süreyle çoğaltılmıştır. Çoğalan kültürden 20 mL alınarak hücreler santrifüjle toplanmış ve üst fazları atılmıştır. Atılan üst faz yerine, içerisinde azot kaynağı bulunmayan 20 mL taze besiyeri eklenmiş ve hücreler bu besiyeri ile süspanse edilmiştir. Süspanse edilen hücreler, 250 mL'lik erlenler içerisinde hazırlanmış olan ve içerisinde azot kaynağı bulunmayan 100 mL besiyerlerine aktarılmıştır. Tüm izolatlar, N⁻ stres denemesiyle birlikte aynı anda azot varlığı (N⁺) koşullarında da kültüre alınmıştır. Her izolat için, azot kaynağı bulunan ve azot kaynağı bulunmayan besiyerlerine, tek bir stok kültürden iki paralelli olarak ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan hücrelerin optikal yoğunluğu (OD), 680 nm'de yaklaşık 0,2 olacak şekilde ayarlanmıştır (Zhu ve diğerleri, 2016).

Hücrelerin ekildiği erlenler foto-inkübatörde; 23°C'de, 12 saat ışık:12 saat karanlık periyodunda (ışık yoğunluğu 86 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 100 rpm çalkalama hızında 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. 7 günlük kültür süresi sonunda, azot kaynağı bulunan ve azot kaynağı bulunmayan besiyerlerinde çoğalan hücreler toplanmış ve bu hücrelerde; biyokütle verimi, % lipit miktarı, lipit verimi ve bağlı nötral lipit miktarı saptanmıştır.



Resim 3.4. Azot varlığında (N⁺) ve azot yokluğunda (N⁻) kültüre alınmış hücrelerin görüntüsü

7 günün sonunda, azot stresine maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen klorozis (klorofillerin parçalanması)'den dolayı, N⁺'daki hücrelere kıyasla kültürde önemli ölçüde renk değişimi meydana gelmiştir (Sauer, Schreiber, Schmid, Völker ve Forchhammer, 2001; Resim 3.4).

3.5. Besiyerinde Farklı pH Uygulamaları

3.5.1. TAG içeriği ve biyokütle konsantrasyonu bakımından optimal pH'nın saptanması

Alkali pH stresi tüm izolatlar arasından N⁻ koşullarında TAG içeriği ve lipit verimi en yüksek olan *Chlorella vulgaris* KP2 ve *Auxenochlorella protothecoides* KP7 suşları için oluşturulmuştur. Her iki suş için alkali pH stresi oluşturulmadan önce, TAG miktarının ve biyokütle konsantrasyonunun en yüksek olduğu optimal pH'sının saptanması için bir ön çalışma yapılmıştır. Her iki suş için de başlangıç hücre yoğunluğu, 680 nm'de OD = 0,2 olacak şekilde ayarlanmıştır.

A. protothecoides KP7 suşu için, TAP besiyerinde hem N⁺'da hem de N⁻'de 7 farklı pH denemesi (pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) kurulmuştur. TAP besiyerinde 7 farklı pH, asetik asit veya KOH kullanılarak oluşturulmuştur.

C. vulgaris KP2 suşu için, BG11 besiyerinde hem N⁺'da hem de N⁻'de 7 farklı pH denemesi (pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) kurulmuştur. Besiyerinde pH 6, 7, 8 ve 9'u ayarlamak için hazırlanan BG11 besiyeri içerisine trizma base (2,42 g L⁻¹, w/v) eklendikten sonra, besiyerleri HCl ile pH 5, 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmıştır. Besiyerinde pH 10 ve pH 11 oluşturmak için saf su yerine karbonat-bikarbonat tamponu kullanılmıştır. Böylece, 7 farklı pH'nın, N⁺ ve N⁻ koşullarında 7 gün süresince büyük ölçüde sabit kalması sağlanmıştır (Skrupski ve diğerleri, 2012).

Denemelerin kurulması için; 10-15 gün boyunca optimal koşullarda kültüre alınmış hücreler, 3500 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak toplanmıştır. Toplanan hücrelerin üst fazları atılarak, atılan üst fazlar yerine hangi pH denemesi kuruluyorsa o pH'ya sahip taze besiyeri eklenmiştir. Taze besiyeri ile süspanse edilen hücreler farklı pH'lara sahip besiyerlerine ekilmiş ve foto-inkübatörde; 23°C'de, 12 saat ışık:12 saat karanlık periyodunda (ışık

yoğunluğu $86 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 100 rpm çalkalama hızında 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. 7 gün sonunda alınan hücrelerde; biyokütle konsantrasyonu ve bağlı nötral lipid miktarı saptanmıştır.

3.5.2. Alkali pH stresinin oluşturulması

TAG miktarının ve biyokütle konsantrasyonunun en iyi olduğu pH'nın saptanması için yapılmış ön çalışma sonrasında, *A. protothecoides* KP7 suşu için bikarbonat aracılı alkali pH stresi oluşturulmuştur. Bunun için azot kaynağı içeren ve azot kaynağı içermeyen TAP besiyeri, bikarbonat-karbonat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. *A. protothecoides* KP7 suşunda alkali pH stresinin etkisini araştırmak için; bu suşun optimal koşullarda üreyen hücrelerinden logaritmik büyüme fazının sonunda eşit sayıda hücre alınmış ve pH'sı 6 olan ve içerisinde azot kaynağı bulunan TAP besiyerine (pH 6 N+), pH'sı 6 olan içerisinde azot kaynağı olmayan TAP besiyerine (pH 6 N-), pH'sı 10 olan içerisinde azot kaynağı bulunan bikarbonat-karbonat tamponlu TAP besiyerine (pH 10 N+), ve pH'sı 10 olan içerisinde azot kaynağı olmayan bikarbonat-karbonat tamponlu TAP sıvı besiyerine (pH 10 N-) ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan hücreler foto-inkübatörde; 12 saat ışık/12 saat karanlık periyodunda (ışık yoğunluğu $86 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 100 rpm çalkalama hızında, 23°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır (Santos ve diğerleri, 2012).

C. vulgaris KP2 suşu için ise optimal koşullarda üreyen mikroalg hücrelerinden logaritmik büyüme fazının sonunda eşit sayıda hücre alınmış ve pH'sı 8 olan ve içerisinde azot kaynağı bulunan BG11 besiyerine (pH 8 N+), pH'sı 8 olan içerisinde azot kaynağı olmayan BG11 besiyerine (pH 8 N-), pH'sı 9 olan içerisinde azot kaynağı bulunan BG11 besiyerine (pH 9 N+) ve pH'sı 9 olan içerisinde azot kaynağı olmayan BG11 sıvı besiyerine (pH 9 N-) ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan hücreler foto-inkübatörde; 12 saat ışık/12 saat karanlık periyodunda (ışık yoğunluğu $86 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 100 rpm çalkalama hızında, 23°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır (Al-Safaar ve diğerleri, 2016).

A. protothecoides KP7 ve *C. vulgaris* KP2 suşları için 7. günde toplanmış olan hücreler kullanılarak; TAG miktarı, total lipid miktarı, lipid verimi, protein, nişasta ve klorofil miktarları ile yağ asidi profilleri saptanmıştır.

3.6. Analitik Yöntemler

3.6.1. Biyokütle veriminin Saptanması

Tüm izolatlarda biyokütle verimi aşağıdaki eşitlik (1) yardımıyla saptanmıştır.

$$\text{Biyokütle verimi (mg/L/gün)} = \frac{N_2 - N_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Formülde yer alan; N_2 : t_2 zamanındaki biyokütle konsantrasyonu (mg/L), N_1 : t_1 zamanındaki biyokütle konsantrasyonu (mg/L)'dur (Zhu ve diğerleri, 2016).

T_1 zamanındaki başlangıç biyokütlesini (N_1) belirlemek için; optimal koşullarda çoğaltılmış stok kültürden 20 mL alınmış ve hücreler 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra, üst faz atılmıştır. Sadece hücre bulunan tüplere saf su eklenerek saf suyla iki kez yıkama yapılmıştır. İstisna olarak tuz gölünden izole edilen izolatlarda, ozmotik strese dolaylı hücreler 0,5 M amonyum formatla yıkanmıştır. Yıkanan hücreler tekrar toplandıktan sonra, boş ağırlığı hassas terazide tartılmış olan 1,5 mL polipropilen tüplere aktarılmıştır. İçerisinde hücre bulunan tüpler etüvde 65°C'de yaklaşık 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Kuru hücrelerin bulunduğu tüpler tekrar hassas terazide tartılmış ve ağırlıkları kaydedilmiştir. İçerisinde kuru mikroalg kütlesi bulunan tüpün ağırlığından, aynı tüpün boş ağırlığı çıkarılarak hücrelerin kuru ağırlığı saptanmıştır (Hempel, Petrick ve Behrendt, 2012).

T_2 zamanındaki biyokütleyi (N_2) belirlemek için; 7 günlük inkübasyonun sonunda hem N^+ hem de N^- besiyerlerinde çoğalan hücrelerdeki her erlenden (her izolat için 2 erlen N^+ , 2 erlen N^-) 3'er defa 20'er mL kültür otomatik pipetle çekilmiş ve kuru ağırlıkları yukarıda belirtildiği şekliyle saptanmıştır.

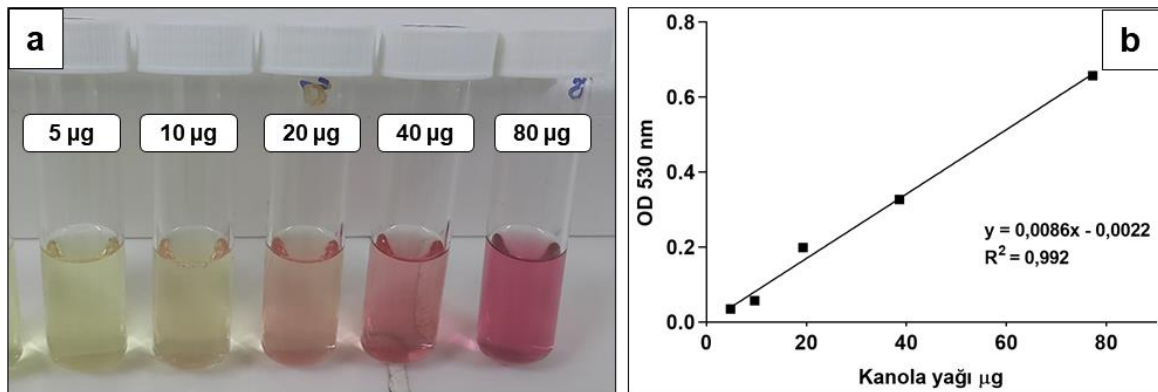
3.6.2. Lipit veriminin saptanması

Tüm izolatlarda lipit verimi aşağıdaki eşitlik (2) kullanılarak saptanmıştır (Zhu ve diğerleri, 2016). Aşağıda verilmiş olan eşitlikte yer alan biyokütle veriminin nasıl saptandığı, Bölüm 3.6.1'de, kuru hücre ağırlığında % lipit miktarının nasıl saptandığı ise Bölüm 3.6.3'de açıklanmıştır.

Lipit verimi (mg/L/gün) = Biyokütle verimi (mg/L/gün) × kuru hücre ağırlığında % lipit miktarı (2)

3.6.3. Toplam lipit miktarının saptanması

Toplam lipit miktarının saptanması için spektrofotometrik bir yöntem olan sülfö-fosfovanilin (SPV) yöntemi kullanılmıştır (Mishra ve diğerleri, 2014). Standartlar için, kanola yağının; 5 µg, 10 µg, 20 µg, 40 µg ve 80 µg konsantrasyonları kullanılmıştır. İçerisinde belirtilen konsantrasyonlarda kanola yağı bulunan cam tüplerin içerisine 100 µL saf su ve 2 mL sülfürik asit (%95–98) eklenmiş ve tüpler 95°C'de 10 dk sıcak su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüpler buz üzerinde 10 dk soğutulmuş ve soğutulan tüplerin içerisine 5 mL fosforik asit/vanilin çözeltisi eklendikten sonra tüpler 30°C'de 15 dk bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda tüplerin içerisinden 1 mL örnek alınarak, spektrofotometre cihazında (T60-PG INSTRUMENTS) ve 530 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Kör için içerisinde sadece 100 µL saf su olan cam tüpler kullanılmıştır. Analizler üç tekrarlı yapılmış ve her numune için 530 nm'de okunan OD değerlerinin ortalaması alınmıştır. Ortalama OD değerinden, kör için saptanan ortalama OD değeri çıkarıldıktan sonra elde edilen OD değerleri ile bir standart eğri grafiği çizilmiştir (Resim 3.5b). Kanola yağının 5, 10, 20, 40 ve 80 µg konsantrasyonlarındaki renk değişimleri Resim 3.5a'da verilmiştir.



Resim 3.5. Kanola yağının 5, 10, 20, 40 ve 80 µg konsantrasyonlarındaki renk değişimi (a) ve standart eğri grafiği (b)

Örnekler için; 1 mL hücre alınarak santrifüj edilmiş ve üst faz atılmıştır. Tüpte kalan hücre pelletinin üzerine 100 µL saf su eklenmiş ve hücreler cam tüplere alınmıştır. Bu aşamadan sonra kanola yağı için uygulanan işlemler, içerisinde hücre bulunan cam tüpler için de

uygulanmıştır. Örnekler için saptanan OD değerlerinden, kör için saptanan ortalama OD değeri çıkarılmış ve bulunan değerler standart eğri grafiğinden elde edilen eşitliğe konularak 1 mL hücredeki μg lipit miktarı saptanmıştır. Elde edilen miktar aşağıdaki eşitlik (3) kullanılarak kuru hücre ağırlığının %'si olarak ifade edilmiştir.

$$\% \text{ Lipit miktarı} = 100 \times \text{lipit miktarı } (\mu\text{g}) / 1 \text{ mL hücrenin kuru ağırlığı } (\mu\text{g}) \quad (3)$$

SPV yönteminin en önemli avantajı, 1 mL hücredeki lipit miktarının bile saptanabilmesidir. Gravimetrik yöntemde lipit miktarının saptanabilmesi için yüksek miktarda kuru alg biyokütlesine ihtiyaç vardır. Ayrıca, SPV yöntemi lipit moleküllerine oldukça spesifik olup; proteinler ve karbonhidratlar ile reaksiyon vermemektedir (Byreddy, Gupta, Barrow ve Puri, 2016). Gravimetrik yöntemde ise çok hassas bir çalışma yapılmadığı sürece lipit haricindeki diğer moleküllerin de ekstrakte edilmesi mümkün olmakta ve tartım sırasında bu moleküllerin de ağırlıkları lipit molekülleriyle birlikte tartılmaktadır. SPV yönteminin avantajları ve gravimetrik yöntemin bazı dezavantajlarından dolayı, bu tez çalışmasında lipit miktarının tayin edilmesi için SPV yönteminin kullanılması tercih edilmiştir.

3.6.4. Nötral lipit miktarının saptanması

Hücrelerde relatif nötral lipit miktarının saptanması için; N– stres denemesinin ve optimal besiyeri denemesinin sonlandırıldığı gün her kültürden üç defa olmak üzere 1 mL hücre alınarak -25°C 'de muhafaza edilmiştir. Analiz yapılacağı gün hücreler oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra, 3500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst fazlar atılmıştır. Tüp içerisinde kalan hücre peleti üzerine 1 mL Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) eklenmiş ve hücreler PBS ile süspanse edilmiştir. PBS ile süspanse edilmiş olan hücrelerin sayısı, otomatik hücre sayıcı cihaz (LUNA-II-Logos Biosystems) kullanılarak belirlenmiştir. Siyah mikropolanın her kuyusuna yaklaşık 1×10^6 sayıda hücre eklenmiştir. Siyah mikropolanın kuyularına hücre ile birlikte toplam 145 μL PBS çözeltisi, 50 μL Dimetil Sülfoksit (DMSO) ve 5 μL Nile Red stok solüsyonu (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aseton nile red çözeltisi) eklenmiştir (Chen, Zhang, Song, Sommerfeld ve Hu, 2009). Kör için mikropolaka kuyularına 145 μL PBS, 50 μL DMSO ve 5 μL Nile Red (Sigma, 72485) boyası eklenmiştir. Hazırlanan mikropolaka 15 dk 40°C 'de bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra spektrofloreometre cihazında (Gemini XPS-Molecular Devices) eksitasyon: 520, emisyon: 580 nm'ye ayarlanarak okuma yapılmıştır. Örnek okumalarından elde edilen RFU değerlerinden, kör için elde edilen RFU değerleri

çıkarılmıştır. Spektroflorometrik okumalar Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

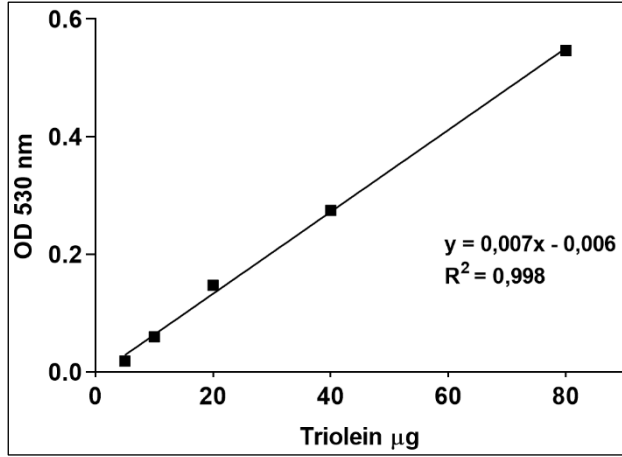
3.6.5. Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi tekniği ile TAG bantlarının görüntülenmesi

TAG bantlarının, yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC)'nde görüntülenmesi için ilk olarak TAG lipid ekstraksiyonu yapılmıştır. Toz haline getirilmiş kuru biyokütleden, 2 mg tartılarak polipropilen tüplere aktarılmış ve tüplerin içerisine %0,01 butilhidroksitoluen (BHT) bulunan 250 µL hekzan: isopropanol (3:2, v/v) karışımı eklenmiştir (Hara ve Radin, 1978). 15 dk boyunca TAG lipid ekstraksiyonu yapıldıktan sonra, 5000 rpm'de 1 dk santrifüj edilen tüplerin üst fazları başka tüpe aktarılmıştır. Tüp içerisinde kalan biyokütleden, iki defa daha ekstraksiyon yapılarak toplam üç defa ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen ekstrakt, azot altında uçurma cihazı (KD200, ALLSHENG) kullanılarak tamamen uçurulduktan sonra kloroformda çözdürülmüştür. TAG lipid ekstraktları HPTLC tabakaya (Merck, 113748) 5 µL yüklenmiş ve HPTLC tankı içerisinde hekzan: dietileter: asetik asit (70:30:1, v/v/v) karışımı içerisinde yaklaşık 10–15 dk yürütülmüştür. Yürütülen HPTLC tabaka, 100 mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (%10, w/v) ve fosforik asit (%8, v/v) karışımı içerisinde 10 sn bekletilmiş ve boyanan tabaka etüvde 180°C'de 7 dk bekletildikten sonra, TAG bantlarının görünür hale gelmesi sağlanmıştır (Hildebrandt, Bickmeyer ve Kühnlein, 2011).

3.6.6. TAG miktarının saptanması

TAG miktarını belirlemek için, HPTLC ve SPV tekniklerini içeren yeni bir yöntem uygulanmıştır. İlk aşamada, 5 µL nötral lipid ekstraktı HPTLC ile ayrılmış ve daha sonra plaka iyot buharı ile boyanmıştır. Triolein ile aynı hızda olan bantlar TAG bantları olduğu için, boyama işleminden hemen sonra bu bantlar kurşun kalemle işaretlenmiş ve iyot tamamen uçtuktan sonra işaretli kısımlar tabakadan kazınarak alınmıştır.

Alınan fraksiyonlar polipropilen tüplere aktarılmıştır. Polipropilen tüplerin içerisine 250 µL tolüen eklenmiş ve tüpler 2500 rpm'de 2 dk santrifüj edildikten sonra tolüen fazı başka bir cam tüpe aktarılmış ve azot altında uçurulmuştur. İkinci aşamada, Bölüm 3.6.3'de anlatıldığı gibi SPV yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Triolein standart eğri grafiği

Absorbans okumaları 530 nm'de yapılmış ve ekstrakt içindeki TAG içeriği, farklı konsantrasyonlarda triolein içeren standart bir eğri grafiğinden elde edilen eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır (Şekil 3.1). Bulunan TAG içeriği kuru hücre ağırlığının yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.6.7. Klorofil, protein ve nişasta miktarının saptanması

Bu analizler, tüm izolatlar arasından biyodizel üretim potansiyeli yüksek olan *C. vulgaris* KP2 ve *A. protothecoides* KP7 suşları için yapılmıştır. *C. vulgaris* KP2 suşu için pH 8 N+, pH 8 N-, pH 9 N+ ve pH 9 N- koşullarında kültürü alınmış hücrelerde, *A. protothecoides* KP7 suşu için pH 6 N+, pH 6 N-, pH 10 N+ ve pH 10 N- koşullarında kültüre alınmış hücrelerde klorofil, protein ve nişasta miktarları saptanmıştır.

Klorofil miktarının saptanması

Klorofil miktarının saptanması için, 1 mL hücre kültürü 3500 rpm'de 5 dk santrifüjle çöktürüldükten sonra üst faz atılmış ve hücre pelleti üstüne aseton (%80, v/v) eklenmiştir. Aseton eklenmiş tüpler buz içerisine yerleştirildikten sonra ultrasonik homojenizasyon cihazı kullanılarak (Bandelin Sonopuls-HD 2070), %5 x 10 döngü/%100 güç ayarında 10 dk boyunca sonikasyon yapılmıştır. Sonikasyondan sonra örnekler santrifüj edilmiş ve üst faz alınarak spektrofotometre cihazında 663 nm ve 646 nm dalga boylarında absorbans ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri aşağıda verilen, Lichtenthaler ve Alan (1983) tarafından rapor edilmiş olan eşitliklere (4), (5) konularak toplam klorofil miktarı (klorofil a

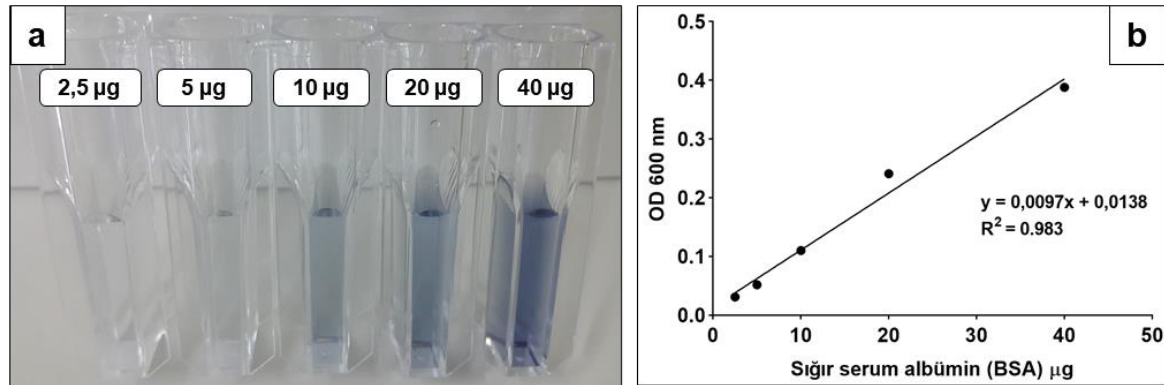
+ klorofil b) saptanmıştır. Saptanan değer, 1 mL hücre kültür ekstraktında bulunan μg klorofil miktarını ifade etmektedir.

$$\text{Klorofil-a} = 12,21A_{663} - 2,81A_{646} \quad (4)$$

$$\text{Klorofil-b} = 20,13A_{646} - 5,03A_{663} \quad (5)$$

Protein miktarının saptanması

Protein miktarının saptanması için, ilk aşamada protein ekstraksiyonu yapılmıştır. Protein ekstraksiyonu, Slocombe, Ross, Thomas, McNeill ve Stanley (2013) tarafından rapor edilmiş olan metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu metot doğrultusunda; tüp içerisinde bulunan 2 mg kuru biyokütle üzerine, 0,2 mL %24 Trikloroasetik Asit (TCA) eklenmiş ve tüpler 95°C’de 15 dk bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra tüpler içerisine 0,6 mL saf su eklenmiş ve tüpler 4°C’de 13.000 rpm’de 25 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden alınan örneklerde üst faz atıldıktan sonra tüp içerisinden kalan kütlenin üzerine 0,5 mL Lowry-D çözeltisi eklenmiştir. Lowry-D çözeltisi eklenmiş tüpler 55°C’de 2 saat alkali inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüpler 13.000 rpm’de 25 dk oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra üst faz alınmıştır. Alınan üst fazlar protein miktarının saptanması için –25°C’de muhafaza edilmiştir.



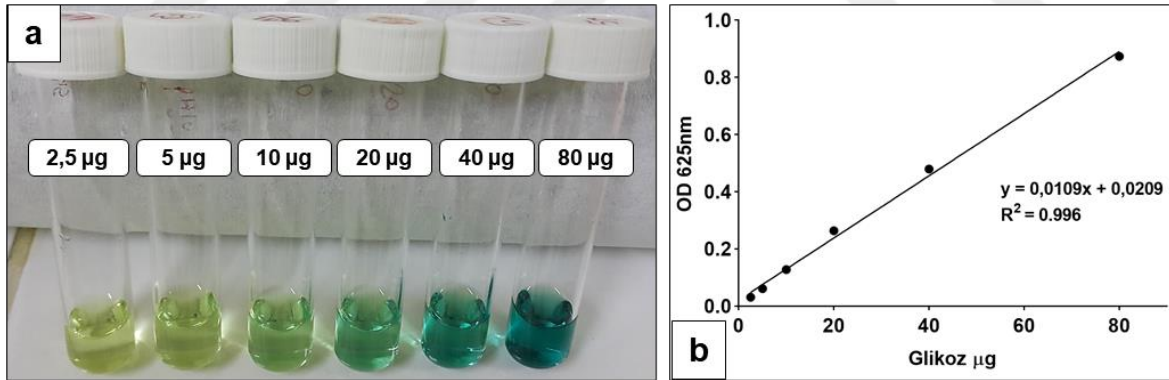
Resim 3.6. Sığır serum albümin (BSA)’in 2,5, 5, 10, 20, 40 μg konsantrasyonlarındaki renk değişimi (a) ve standart eğri grafiği (b)

Protein miktarı, Price (1965) tarafından modifiye edilmiş Lowry yöntemi kullanılarak saptanmıştır. 50 μL protein ekstaktı üzerine 950 μL Lowry-D çözeltisi eklenmiş ve tüpler 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüpler içerisine 0,1 mL Folin-Ciocalteu fenol çözeltisi eklenmiştir. Tüpler 30 dk bekletildikten sonra 600 nm’de

spektrofotometre cihazında absorbans ölçümü yapılmıştır. Protein standart çözeltisi olarak sığır serum albümin (BSA)'in farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılmıştır (Resim 3.6b). Protein miktarı, kuru hücre ağırlığının yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

Nişasta miktarının saptanması

Nişasta miktarının saptanması için, Brányiková ve diğerleri (2011) tarafından rapor edilmiş olan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemde ilk olarak; 2 mg kuru örnek polipropilen tüplere alınmış ve tüpler içerisine 1,8 mL etanol (%80, v/v) eklendikten sonra, örnekler 68°C'de 15 dk bekletilmiştir. Beklemeden sonra örneklerin üst fazları atılmıştır. Bu işlem toplam 3 kez yapılarak klorofilin tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra, tüpte kalan örnek üzerine perklorik asitten (%30, v/v) 1,8 mL eklenmiş ve tüpler 15 dk boyunca karıştırılmıştır. 15 dk karıştırılan tüpler santrifüj edildikten sonra üst fazları alınmıştır. Bu işlem de toplam 3 kez yapılmıştır. Ekstraksiyon sonucu elde edilen toplam ekstraktan 0,5 mL alınarak başka tüpe aktarılmış ve bu tüplere 2,5 mL antron çözeltisi eklenerek örnekler 100°C'de 8 dk bekletilmiştir.



Resim 3.7. Glukozun 2,5, 5, 10, 20, 40 ve 80 µg konsantrasyonlarındaki renk değişimi (a) ve standart eğri grafiği (b)

Bu işlemden sonra, tüpler oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiş ve her tüpten 1 mL sıvı alınarak, spektrofotometre cihazında 625 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Standart madde olarak glukozun 2,5 µg ile 80 µg arasında değişen konsantrasyonları kullanılmıştır (Resim 3.7b). Nişasta miktarı kuru hücre ağırlığının yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.7. Gen Ekspresyon Analizleri

3.7.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Gen ekspresyon çalışması sadece N⁻ ve alkali pH kombine stresinde TAG içeriği en yüksek olan *A. protothecoides* KP7 suşu için yapılmıştır. Bu suşun; pH 6 N⁺, pH 6 N⁻, pH 10 N⁺ ve pH 10 N⁻ koşullarında 7 gün kültüre alınan hücreleri kullanılarak, TAG biyosenteziyle ilişkili olabilecek bazı genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri saptanmıştır.

RNA izolasyonu için; pH 6 N⁺, pH 6 N⁻, pH 10 N⁺ ve pH 10 N⁻ koşullarında 7 gün kültüre alınan hücreler toplandıktan sonra sıvı azotla dondurulmuş ve parçalanmıştır. Parçalanmış örneklerin üzerine trizol çözültisi (15596026-Invitrogen) eklenmiş ve üretici firmanın önerdiği yöntem kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'nın kalitesi ve miktarı Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök hücre Merkezinde bulunan nanodrop cihazı (BioSpec-nano-Shimadzu) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda OD 260/280 oranı 2.0'a yakın olan örnekler cDNA sentezi için seçilmiştir. cDNA sentezi için 1000 ng RNA kullanılmış ve sentez RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (Thermo)'nin önerdiği metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7.2. Primer dizaynı

Çalışmada; PEPC, PDC-E1, PDC-E2, GPDH, DGAT1, ME, ACC, GPAT3, ME_{kloroplastik} ve PDK olmak üzere toplam 10 hedef gen ile birlikte referans gen olarak seçilmiş olan Aktin geni için primer dizayn yapılmıştır. Tüm primerler NCBI gen bankasında *Auxenochlorella protothecoides* türü için mevcut olan mRNA sekanslarından, NCBI Primer-BLAST programı kullanılarak dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primerler ve sekansları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

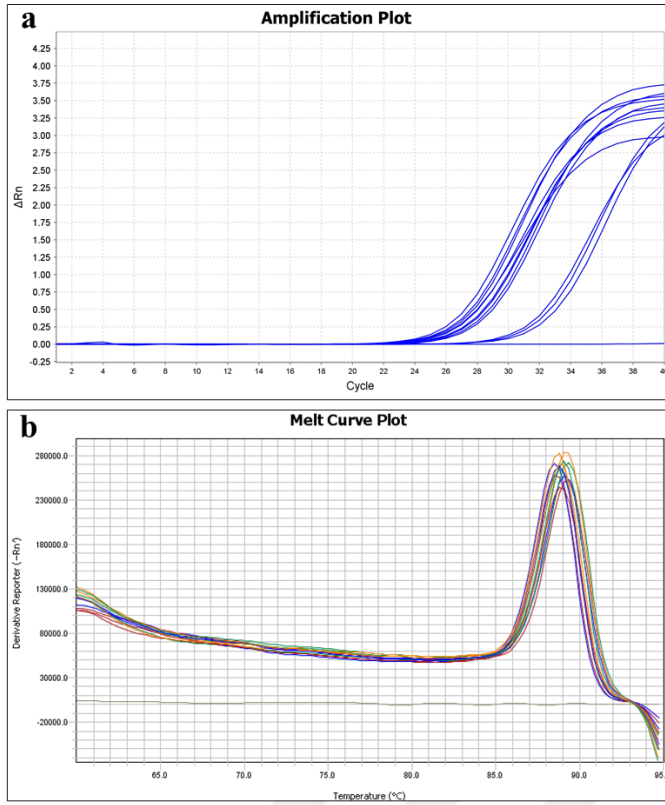
Çizelge 3.1. Real-Time PCR için dizayn edilen primerler, gen bölgeleri, beklenen ürün büyüklükleri ve NCBI referans sekansları

Gen bölgesi	Primer sekansı (5'→3')	Beklenen ürün büyüklüğü (bp)	NCBI referans sekansı
Aktin	F: GGACCTGTACGGCAACATT R: GCCACCACCTTGATCTTCAT	120	XM_011403467.1
Asetil-CoA karboksilaz (ACC)	F: GGCGTGGTGGAGATCAAGTT R: TTGGTGCCTCCCTCCTTCTT	98	XM_011400985.1
NADP-bağımlı malik enzim (ME)	F: TCGAGGACTTTGAGACGAGC R: CCCTGGATGTTCGTTCGTTGAA	85	XM_011400389.1
Diaçilgliserol O-açıltransferaz 1 (DGAT1)	F: AGCCCACCATCCATAACAGC R: GAACATGAGCAGCCAGAGGT	113	XM_011403730.1
Fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPC)	F: GAGCTGGTGTCTCAAGGTGAT R: ATGTCGCGGATGGTCTTCAG	146	XM_011403121.1
Pirüvat dehidrogenaz kompleksi (PDC-E2)	F: GTGGAGAAGCAGATGACCGT R: TATACCAGCTGCTCTGGGGA	119	XM_011403417.1
Gliserol-3-fosfat açıltransferaz (GPAT3)	F: GACGAGCCCTGGAATTGGAA R: CAGGGGGAAGATGATTGCGT	84	XM_011401675.1
Kloroplastik-NADP-bağımlı malik enzim (ME _{kloroplastik})	F: CATCTACCCAGGCTTGTGCC R: CCTGTCTCATCTGTGACCG	115	XM_011403611.1
Pirüvat dehidrogenaz kinaz (PDK)	F: CTGTATGCGCGGTACTTTGG R: CCAAGGCGATTCAAGTGCAG	89	XM_011401915.1
Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz (GPDH)	F: TGAAGGCGACCAACGACATT R: TGATGACGTGCTTCTCGGTC	129	XM_011400604.1
Pirüvat dehidrogenaz kompleksi (PDC-E1)	F: CCCTTCGACATGCAGACCAT R: TGGTCCAGGTTCGTGAACAG	140	XM_011399671.1

3.7.3. Real Time PCR ve sonuçların analizi

Real-Time PCR için reaksiyon başına; 2 µL cDNA, 0,75 µL ileri ve geri primer (5 pmol), 10 µL Sybr Green master mix'i (4309155-Applied Biosystems) ve 7,25 µL ultra saf su kullanılmıştır. Real-Time PCR cihazında (QuantStudio 5-Applied Biosystems) sıcaklık döngüleri; 94°C'de 10 dk ön denatürasyon (1 döngü), 94°C'de 15 s denatürasyon/59°C'de 1 dk bağlanma (40 döngü) ve erime eğri analizi (60°C–94°C, +1°C/s) olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 3.2). Referans gen olarak aktin geni, kontrol grubu olarak pH 6 N+ koşulu kullanılmıştır. Genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ aşağıdaki eşitlikler (14–17) yardımıyla hesaplanmıştır (Rao, Huang, Zhou ve Lin, 2013).

- Kontrol ΔCT = Kontrol CT (hedef gen) – Kontrol CT (referans gen) (14)
- Örnek ΔCT = Örnek CT (hedef gen) – Örnek CT (referans gen) (15)
- $\Delta\Delta CT$ = (Örnek ΔCT) ort. – (Kontrol ΔCT) ort. (16)
- Hedef genin mRNA miktarı = $2^{-\Delta\Delta CT}$ (17)



Şekil 3.2. Aktin geni için Real-Time PCR sonucunda oluşan DNA'nın amplifikasyon grafiği (a) ile erime eğrisi (b)

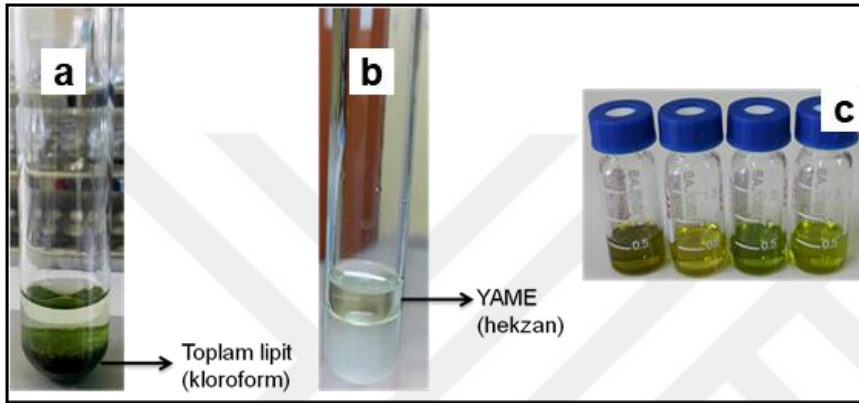
3.8. Yağ Asidi Metil Ester Analizleri

3.8.1. Toplam lipid ekstraksiyonu

YAME analizleri için öncelikli olarak toplam lipid ekstraksiyonu yapılmıştır. Toplam lipid ekstraksiyonu, Bligh ve Dyer (1959)'ın geliştirdiği, Lu ve diğerleri (2012) tarafından modifiye edilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon için, kuru ve parçalanmış mikroalg örnekleri cam tüplere alındıktan sonra, tüpler içerisine metanol:kloroform (2:1, v/v) karışımı eklenmiş ve 1 saat boyunca lipid ekstraksiyonu yapılmıştır. Daha sonra, faz ayrımı için cam tüplerin içerisine saf su eklenmiş ve karıştırılan tüpler 2500 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra lipid moleküllerin olduğu organik faz cam pipetle çekilmiş ve başka bir cam tüpe aktarılmıştır (Resim 3.8a). Kalan biyokütleden iki defa daha ekstraksiyon yapılarak toplam üç kez ekstraksiyon yapılmıştır. Tek tüpte birleştirilen lipid ekstraktları azot altında uçurulduktan sonra toluende çözdürülmüştür.

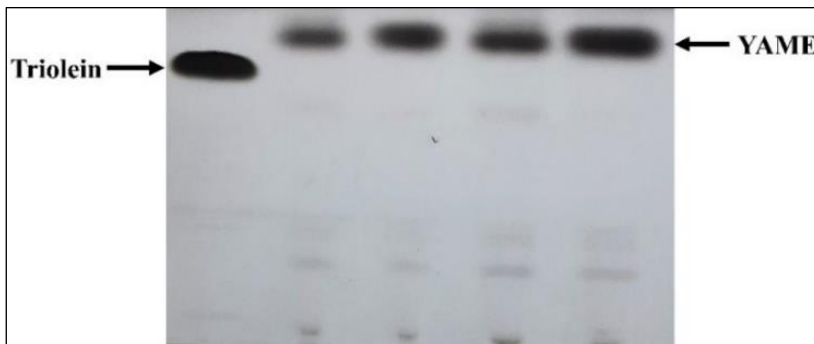
3.8.2. Yağ asidi metil esterleri'nin hazırlanması

Tolüende çözdürülen lipit ekstraktları üzerine, içerisinde %2,5 oranında sülfürik asit bulunan metanolden 1,5 mL eklenmiş ve cam tüpler 50°C'de yaklaşık 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Msanne ve diğerleri, 2012). İnkübasyondan alınan örneklerin üzerine 0,5 mL su ve 0,7 mL hekzan eklenmiştir. Karıştırılan tüpler 2500 rpm'de 1 dk santrifüj edildikten sonra, hekzan fazı çekilerek başka tüpe aktarılmıştır (Resim 3.8b).



Resim 3.8. Toplam lipit ekstraksiyonu (a), transesterifikasyon sonrası YAME'nin ayrıştırılması (b) ve hekzan içerisinde elde edilen YAME (c)

Bu aşamadan sonra transesterifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir (Resim 3.9). Transesterifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi durumunda, YAME bantlarının HPTLC tabakada trioleinden daha yukarıda olması beklenmektedir. Bu kontrolden sonra YAME numuneleri, yağ asidi analizlerinin yapılması için Düzen Norwest firmasına gönderilmiştir.



Resim 3.9. Yağ asidi metil ester bantlarının HPTLC'de görüntülenmesi

3.9. YAME Profiline Göre Biyodizel Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi

Biyodizel kalite parametrelerinin belirlenmesi için yapılacak analizlerde yüksek miktarda biyodizele ihtiyaç duyulmasından ve bu miktarda biyodizel üretiminin laboratuvar koşullarında çok uzun ve zorlu bir süreç olmasından dolayı, birçok araştırmacı biyodizel kalite özelliklerini çeşitli eşitlikler yardımıyla hesaplamışlardır (Song, Pei, Hu ve Ma, 2013; Selvarajan ve diğerleri, 2015). Bu eşitlikler yardımıyla elde edilen biyodizelin kalitesi, YAME profiline göre tahmini olarak ortaya konabilmektedir. Bu çalışmada; kinematik viskozite, yoğunluk, bulutlanma noktası, setan sayısı, iyot değeri, üst ısı değeri ve oksidasyon kararlılığı değerleri, Hoekman ve diğerleri (2012) tarafından geliştirilmiş aşağıdaki eşitlikler (7-12) ile Park ve diğerleri (2008), tarafından geliştirilmiş eşitlik (13) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{ADU (ortalama doymamış yağ asidi derecesi)} = \sum M \times Y_i \quad (6)$$

M, karbon-karbon çift bağ sayısını, Y_i , her yağ asidi için ağırlık kısmını ifade etmektedir.

$$\text{Kinematik viskozite} = -0,6313x + 5,2065 \quad (7)$$

$$\text{Yoğunluk} = 0,0055x + 0,8726 \quad (8)$$

$$\text{Bulutlanma noktası} = -13,356x + 19,994 \quad (9)$$

$$\text{Setan sayısı} = -6,6684x + 62,876 \quad (10)$$

$$\text{İyot değeri} = 74,373x + 12,71 \quad (11)$$

$$\text{Üst ısı değeri (HHV)} = 1,7601x + 38,534 \quad (12)$$

7'den 12'ye kadar olan eşitliklerde "x" yerine ADU sayısı yazılarak kalite özellikleri hesaplanmıştır.

$$\text{Oksidasyon kararlılığı} = 117,9295/X + 2,5905 \quad (0 < 100) \quad (13)$$

Bu formülde "X" linoleik (C18:2) ve linolenik (C18:3) yağ asitlerinin toplam yüzdesini ifade etmektedir.

3.10. İstatistik Analizler

Tüm istatistik analizler GraphPad programı (v8.0) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPTLC analizleri hariç tüm analizler üç tekrarlı olacak şekilde yapılmış ve elde edilen veriler ortalama ve standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir. N⁺ ve N⁻ koşullarına tabi tutulan 30 mikroalg izolatında; % lipit miktarı, biyokütle verimi, lipit verimi ve relatif nötral lipit miktarı bakımından istatistiksel farklılık “unpaired two-tailed t-tests” yöntemi kullanılarak saptanmıştır. *A. protothecoides* KP7 ve *C. vulgaris* KP2 suşlarının; N⁺, N⁻, alkali pH ve alkali pH/N⁻ kombine stresine maruz bırakılan hücrelerinde; % lipit miktarı, biyokütle verimi, lipit verimi, relatif nötral lipit miktarı, yağ asidi miktarı, nişasta, protein ve klorofil miktarları bakımından istatistiksel farklılık “two-way ANOVA” yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. N⁻ koşullarında farklı pH’lar arasında TAG üretimi bakımından istatistiksel farklılık “one-way ANOVA” yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Ayrıca, gen ekspresyon çalışmasında, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında ilgili genlerin ekspresyon düzeylerindeki istatistiksel farklılık “two-way ANOVA” yöntemi kullanılarak ortaya konmuştur.

4. BULGULAR

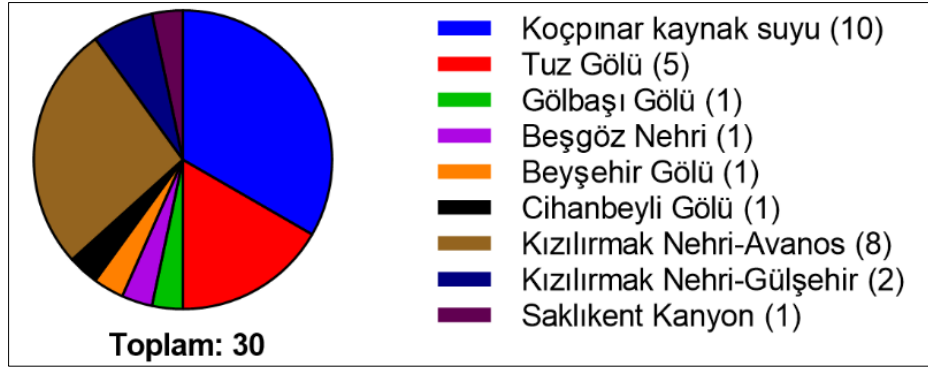
4.1. Mikroalg İzolatları ve İzolasyon Kaynakları

Bu çalışmada çeşitli su ortamlarından izole edilmiş ve besiyerinde iyi üreme gösteren toplam 30 mikroalg izolatı kullanılmıştır. Buna göre; Aksaray ilinin Koçpınar Köyü'nde bulunan bir kaynak suyundan **10**, Nevşehir'in Avanos ilçesinde bulunan Kızılırmak Nehir'inden **8**, Tuz Gölünden **5**, Nevşehir'in Gülşehir ilçesinde yer alan Kızılırmak Nehir'inden **2**, Adıyaman'da bulunan Gölbaşı Gölünden **1**, Muğla'da yer alan Saklıkent Kanyon-Karaçay Nehir'i **1**, Konya'da bulunan Cihanbeyli Gölü'nden **1**, Konya'da yer alan Beyşehir Gölü'nden **1** ve Antalya'da bulunan Beşgöz Nehir'inden izole edilen **1** mikroalg izolatı çalışmaya dahil edilmiştir (Çizelge 4.1). En fazla mikroalg izolasyonu Koçpınar kaynak suyundan (**10**) ve Kızılırmak Nehri-Avanos'tan (**8**) elde edilmiştir (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. 30 mikroalg izolatının izole edildikleri su kaynakları ve kültüre alındıkları besiyeri ortamları

İzolat kodları	Lokasyon	Coğrafi pozisyon	Kültür ortamı
KP2	Koçpınar kaynak suyu-Aksaray	38°13'09.5"N 34°11'31.4"E	BG11
KP3	Koçpınar kaynak suyu-Aksaray	38°13'09.5"N 34°11'31.4"E	BG11
KP5/1	Koçpınar kaynak suyu-Aksaray	38°13'09.5"N 34°11'31.4"E	BG11
KP5/2	Koçpınar kaynak suyu-Aksaray	38°13'09.5"N 34°11'31.4"E	BG11
KPX1	Koçpınar kaynak suyu-Aksaray	38°13'09.5"N 34°11'31.4"E	BG11
KPX3	Koçpınar kaynak suyu-Aksaray	38°13'09.5"N 34°11'31.4"E	BG11
KPX4	Koçpınar kaynak suyu-Aksaray	38°13'09.5"N 34°11'31.4"E	BG11
KPX5	Koçpınar kaynak suyu-Aksaray	38°13'09.5"N 34°11'31.4"E	BG11
KPX6	Koçpınar kaynak suyu-Aksaray	38°13'09.5"N 34°11'31.4"E	BG11
KP7	Koçpınar kaynak suyu-Aksaray	38°13'09.5"N 34°11'31.4"E	TAP*
M12	Koçpınar kaynak suyu-Aksaray	37°47'55.2"N 37°38'47.3"E	BG11
S1	Saklıkent Kanyon-Karaçay Nehri-Muğla	36°28'25.0"N 29°24'06.6"E	BG11
M16	Cihanbeyli Gölü-Konya	38°38'34.7"N 32°55'07.3"E	BG11
B1	Beşgöz Nehri-Antalya	36°52'09.8"N 30°58'24.2"E	BG11
M19	Beyşehir Gölü-Konya	37°48'38.8"N 31°31'24.4"E	BG11
G1	Kızılırmak Nehri-Gülşehir	38°44'57.0"N 34°39'09.2"E	BG11
G2	Kızılırmak Nehri-Gülşehir	38°43'06.3"N 34°49'52.4"E	BG11
EA7	Kızılırmak Nehri-Avanos	38°43'06.3"N 34°49'52.4"E	BG11
EA13	Kızılırmak Nehri-Avanos	38°43'06.3"N 34°49'52.4"E	BG11
EA21	Kızılırmak Nehri-Avanos	38°43'06.3"N 34°49'52.4"E	BG11
M11	Kızılırmak Nehri-Avanos	38°43'06.3"N 34°49'52.4"E	BG11
EA20	Kızılırmak Nehri-Avanos	38°43'06.3"N 34°49'52.4"E	BG11
EA22	Kızılırmak Nehri-Avanos	38°43'06.3"N 34°49'52.4"E	BG11
EA15	Kızılırmak Nehri-Avanos	38°43'06.3"N 34°49'52.4"E	BG11
EA25	Kızılırmak Nehri-Avanos	38°43'06.3"N 34°49'52.4"E	BG11
EA1	Tuz Gölü-Aksaray	38°47'31.0"N 33°20'57.3"E	MJM**
TG1	Tuz Gölü-Aksaray	38°47'31.0"N 33°20'57.3"E	MJM
TG4	Tuz Gölü-Aksaray	38°47'31.0"N 33°20'57.3"E	MJM
TG5	Tuz Gölü-Aksaray	38°47'31.0"N 33°20'57.3"E	MJM
TG6	Tuz Gölü-Aksaray	38°47'31.0"N 33°20'57.3"E	MJM

*: Tris-Asetat-Fosfat, **: Modifiye edilmiş Johnson besiyeri



Şekil 4.1. Mikroalgelerin izole edildikleri su ortamları ve izolat sayıları

4.2. Lipit Verimi ve TAG İçeriği Bakımından Ön Seçilim

Tüm izolatların biyodizel üretim potansiyelleri bakımından ön seçilimi için, izolatların N+ ve N- koşullarında; %lipit miktarları, biyokütle verimleri, lipit verimleri ve bağıl floresan birimi (RFU) değerleri saptanmıştır (Çizelge 4.2). Her izolat için elde edilen bağıl floresan birimi (RFU) değeri, o izolatın bağıl nötral lipit içeriğini temsil etmektedir. Elde edilen sonuçlara göre; 30 mikroalg izolatının N- koşulları altında lipit miktarlarının %6,84 ile 31,96 arasında değiştiği, N+ koşullarında ise %3,44 ile 10,86 arasında değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek lipit içeriği, N- stresi altında KPX3 (%31,96), KPX1 (%30,68) ve KP2 (%28,56) kodlu izolatlarda saptanmıştır. KPX3 ve KPX1 kodlu izolatların lipit içerikleri yüksek olmasına rağmen, yaklaşık 1 mg/L/gün lipit verimleri ile diğer izolatlara göre oldukça düşük lipit verimine sahip oldukları belirlenmiştir. N- koşulları altında lipit verimleri tüm izolatlar için 0,085 ile 7,98 mg/L/gün arasında değişirken, N+ koşullarında 0,082 ile 2,60 mg/L/gün arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek lipit verimine sahip izolatların KP7 (7,983 mg/L/gün) ve KP2 (4,56 mg/L/gün) kodlu izolatlar olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda, KP7 ve KP2 kodlu izolatların, 368,01 ve 138,43 RFU değerleri ile tüm izolatlar arasında en yüksek nötral lipit içeriğine sahip oldukları belirlenmiştir. RFU değerleri N- koşulları altında tüm izolatlar için 0,57 ile 368,01 arasında değişirken, N+ koşullarında bu değerler 0,19 ile 43,43 arasında değişkenlik gösterdiği bulunmuştur.

Lipit verimi ve bağıl nötral lipit içeriği bakımından elde edilen ön tarama sonuçları; N- stresinin, çalışmada kullanılan mikroalg izolatlarının çoğunda lipit verimini ve bağıl nötral lipit içeriğini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir.

Çizelge 4.2. Mikroalg izolatları ve *Chlamydomonas reinhardtii* cw15 referans suşunun azot yeterli (N+) ve azot yokluğu (N-) koşullarında elde edilen lipit içerikleri, biyokütle verimleri, lipit verimleri ve bağlı floresan birimi (RFU) değerleri

<u>İzolatlar/Kültür koşulları</u>	<u>Lipit içeriği</u> (% kuru hücre ağırlığı)	<u>Biyokütle verimi</u> (mg/L/gün)	<u>Lipit verimi</u> (mg/L/gün)	<u>Bağlı floresan birimi</u> (RFU)
<u>Tatlı su izolatları</u>				
KP2 N+	8,91 ± 0,48	29,32 ± 1,57	2,60 ± 0,14	9,16 ± 0,72
KP2 N-	28,56 ± 1,16 ^a	16,00 ± 0,80 ^a	4,56 ± 0,33 ^a	138,43 ± 1,19 ^a
KP3 N+	5,38 ± 0,86	27,00 ± 4,40	1,53 ± 0,10	1,89 ± 0,12
KP3 N-	17,73 ± 1,11 ^a	19,00 ± 1,00 ^a	3,47 ± 0,15 ^a	2,15 ± 1,58 ^e
KP5/1 N+	4,45 ± 0,51	22,00 ± 1,30	0,983 ± 0,10	1,90 ± 1,03
KP5/1 N-	21,61 ± 1,30 ^a	8,00 ± 1,40 ^a	1,550 ± 0,12 ^a	0,57 ± 0,37 ^e
KP5/2 N+	4,53 ± 0,80	19,00 ± 2,10	0,750 ± 0,13	43,434 ± 2,00
KP5/2 N-	13,10 ± 1,56 ^a	11,00 ± 2,00 ^a	1,350 ± 0,17 ^c	59,522 ± 3,82 ^a
KPX1 N+	6,61 ± 1,24	13,00 ± 0,50	0,848 ± 0,17	5,56 ± 0,84
KPX1 N-	30,68 ± 2,14 ^a	3,00 ± 1,60 ^a	1,036 ± 0,15 ^e	40,78 ± 1,85 ^a
KPX3 N+	10,86 ± 0,81	19,00 ± 2,10	2,080 ± 0,12	9,02 ± 1,86
KPX3 N-	31,96 ± 3,66 ^a	4,00 ± 1,00 ^a	1,027 ± 0,25 ^a	106,95 ± 8,80 ^a
KPX4 N+	4,10 ± 1,11	20,00 ± 1,40	0,858 ± 0,24	8,18 ± 0,70
KPX4 N-	20,96 ± 1,44 ^a	11,00 ± 1,30 ^a	2,325 ± 0,32 ^a	74,66 ± 9,41 ^a
KPX5 N+	10,02 ± 1,69	11,00 ± 0,80	1,075 ± 0,16	5,04 ± 1,36
KPX5 N-	25,73 ± 2,92 ^a	6,00 ± 1,20 ^a	1,360 ± 0,17 ^d	35,34 ± 5,98 ^a
KPX6 N+	10,23 ± 1,27	19,00 ± 1,90	1,773 ± 0,17	4,81 ± 0,41
KPX6 N-	16,56 ± 2,09 ^b	10,00 ± 1,70 ^a	1,980 ± 0,12 ^e	13,64 ± 4,08 ^b
KP7 N+	6,83 ± 0,38	59,00 ± 3,20	4,033 ± 0,216	102,98 ± 10,30
KP7 N-	24,15 ± 1,70 ^a	33,00 ± 3,50 ^a	7,983 ± 0,564 ^a	368,01 ± 37,47 ^a
M12 N+	4,65 ± 0,74	22,00 ± 2,00	0,983 ± 0,240	10,88 ± 2,43
M12 N-	15,48 ± 1,19 ^a	13,00 ± 0,05 ^a	2,135 ± 0,250 ^a	10,98 ± 1,16 ^e
S1 N+	6,58 ± 1,04	27,00 ± 0,80	1,807 ± 0,303	1,86 ± 0,08
S1 N-	13,15 ± 0,78 ^a	24,00 ± 1,50 ^b	3,353 ± 0,127 ^b	8,94 ± 0,06 ^a
EA7 N+	4,30 ± 0,26	26,00 ± 2,10	1,132 ± 0,119	10,52 ± 2,08
EA7 N-	15,66 ± 0,86 ^a	21,00 ± 2,30 ^b	3,560 ± 0,036 ^a	27,67 ± 4,32 ^a
EA13 N+	4,50 ± 0,23	26,00 ± 2,00	1,078 ± 0,143	4,71 ± 0,84
EA13 N-	11,84 ± 1,25 ^a	15,00 ± 2,30 ^a	1,742 ± 0,080 ^a	6,53 ± 0,76 ^e
M16 N+	3,73 ± 0,41	24,00 ± 1,30	0,885 ± 0,083	6,52 ± 0,31
M16 N-	14,43 ± 1,47 ^a	13,00 ± 0,90 ^a	1,945 ± 0,134 ^a	9,28 ± 1,68 ^e
G2 N+	3,44 ± 0,43	28,00 ± 1,50	0,850 ± 0,147	9,74 ± 0,90
G2 N-	10,70 ± 0,57 ^a	19,00 ± 1,00 ^a	2,038 ± 0,168 ^a	23,39 ± 0,59 ^a
EA21 N+	5,04 ± 1,34	12,00 ± 2,20	0,583 ± 0,171	1,50 ± 0,06
EA21 N-	13,19 ± 1,24 ^a	14,00 ± 1,60 ^d	1,893 ± 0,236 ^a	5,66 ± 0,15 ^b
M11 N+	4,88 ± 0,82	27,00 ± 2,10	1,348 ± 0,258	1,73 ± 0,61
M11 N-	14,35 ± 0,94 ^a	15,00 ± 0,80 ^a	2,155 ± 0,101 ^a	6,32 ± 2,15 ^e
M19 N+	5,97 ± 0,48	20,00 ± 2,00	1,180 ± 0,123	4,23 ± 0,12
M19 N-	16,06 ± 1,13 ^a	16,00 ± 1,50 ^b	2,485 ± 0,101 ^a	10,24 ± 1,50 ^d
B1 N+	5,36 ± 0,73	19,00 ± 1,25	1,002 ± 0,148	1,61 ± 0,22
B1 N-	17,03 ± 0,92 ^a	10,00 ± 1,00 ^a	2,553 ± 0,254 ^a	10,05 ± 1,03 ^a
EA20 N+	3,60 ± 1,18	12,00 ± 1,40	0,413 ± 0,101	0,61 ± 0,57
EA20 N-	18,60 ± 1,53 ^a	7,00 ± 2,50 ^c	1,610 ± 0,115 ^a	5,66 ± 2,84 ^e
EA22 N+	4,33 ± 0,60	36,00 ± 1,70	1,323 ± 0,229	1,94 ± 0,18
EA22 N-	17,57 ± 1,05 ^a	15,00 ± 0,50 ^a	2,673 ± 0,220 ^a	19,30 ± 3,40 ^a
G1 N+	3,82 ± 1,28	13,00 ± 1,85	0,515 ± 0,234	1,85 ± 0,30
G1 N-	6,84 ± 0,76 ^b	9,00 ± 2,70 ^d	0,580 ± 0,145 ^e	5,94 ± 1,57 ^c
EA15 N+	4,58 ± 0,50	33,00 ± 1,20	1,498 ± 0,113	6,42 ± 1,28
EA15 N-	15,94 ± 1,24 ^a	15,00 ± 0,80 ^a	2,252 ± 0,166 ^a	8,26 ± 1,81 ^e
EA 25 N+	4,78 ± 0,32	30,00 ± 1,80	1,440 ± 0,131	11,48 ± 1,85
EA 25 N-	16,22 ± 1,04 ^a	16,00 ± 1,80 ^a	2,597 ± 0,208 ^a	11,76 ± 2,85 ^e
<u>Tuzlu su izolatları</u>				
EA1 N+	6,16 ± 0,15	11,00 ± 0,50	0,663 ± 0,04	6,94 ± 1,88
EA1 N-	9,80 ± 1,32 ^b	5,00 ± 1,10 ^a	0,470 ± 0,11 ^d	12,90 ± 2,09 ^c
TG1 N+	3,73 ± 1,40	5,00 ± 1,40	0,083 ± 0,06	0,19 ± 0,09
TG1 N-	9,16 ± 1,40 ^a	3,00 ± 0,80 ^e	0,196 ± 0,05 ^d	3,15 ± 1,08 ^c
TG4 N+	5,86 ± 0,87	10,00 ± 1,30	0,515 ± 0,07	3,06 ± 0,72
TG4 N-	7,56 ± 0,60 ^c	8,00 ± 0,80 ^e	0,595 ± 0,12 ^e	3,89 ± 0,81 ^e
TG5 N+	4,01 ± 0,80	10,00 ± 0,70	0,413 ± 0,08	1,22 ± 0,84
TG5 N-	8,52 ± 1,29 ^a	1,00 ± 0,80 ^a	0,085 ± 0,06 ^a	5,48 ± 0,37 ^d
TG6 N+	5,27 ± 0,56	12,00 ± 0,60	0,610 ± 0,04	0,61 ± 0,77
TG6 N-	13,10 ± 0,61 ^a	2,00 ± 0,80 ^a	0,610 ± 0,06 ^e	0,87 ± 0,40 ^e
<u>Referans suş</u>				
cw15 N+	9,85 ± 0,43	82,00 ± 1,30	8,070 ± 0,34	9,59 ± 1,89
cw15 N-	21,05 ± 1,11 ^a	22,00 ± 1,00 ^a	4,602 ± 0,28 ^a	82,05 ± 12,56 ^a

a: $P < 0.0001$, b: $P < 0.0002$, c: $P < 0.0021$, d: $P < 0.0332$, e: önemli ölçüde fark yok

Bununla birlikte, 25 tatlı su mikroalg izolatu ile kıyaslandığında, tuz gölünden izole edilen 5 izolatu oldukça düşük lipit verimi ve lipit içeriğine sahip olduğu saptanmıştır. Ön çalışma sonuçlarına dayanarak; 30 mikroalg izolatu arasından bağıl nötral lipit içeriği ve/veya lipit verimi en yüksek olan KP2, KPX4, KP7, EA7, EA22, EA25, B1, S1 ve M19 kodlu toplam 9 izolat seçilmiş ve bu izolatlar DNA düzeyinde tanımlanmıştır.

4.3. İzolatların Mikroskopik ve Moleküler Tanımlama Sonuçları

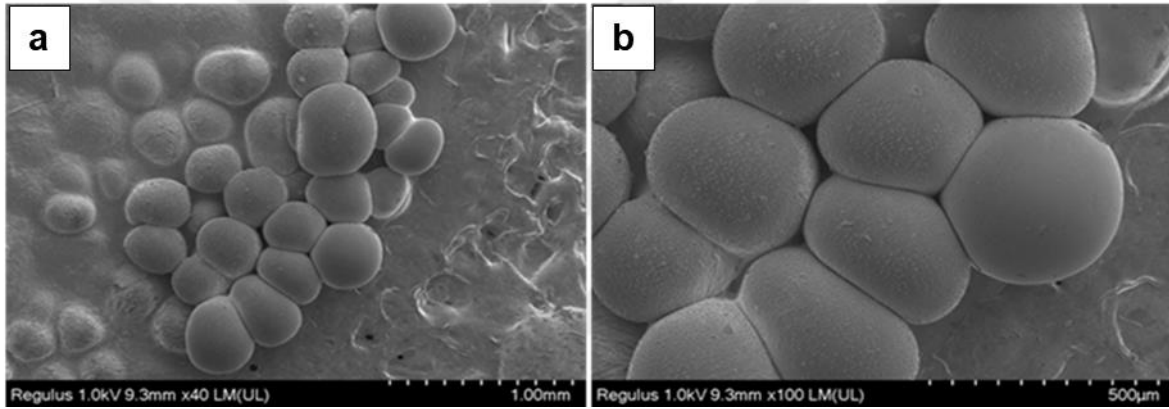
4.3.1. Mikroskopik tanımlama

30 mikroalg izolatu arasından seçilen KP2, KPX4, KP7, EA7, EA22, EA25, B1, S1 ve M19 kodlu 9 izolat, ışık mikroskobu altında hücre morfolojisine göre tanımlanmıştır. Mikroskopik analizler sonucunda mikroalg izolatları; kloroplast şekillerine, hücre şekillerine, kamçı bulundurup bulundurmamalarına gibi morfolojik farklılıklara göre cins düzeyinde tanımlanmıştır. Buna göre; KP2, KPX4 kodlu izolatların *Chlorella* cinsine, S1, EA7 ve EA22 kodlu izolatların *Scenedesmus* cinsine, EA25 ve M19 izolatların ise *Ankistrodesmus* cinsine ait oldukları teşhis edilmiştir (Resim 4.1).



Resim 4.1. Mikroalg izolatlarının ışık mikroskobu altında 1000× büyütme ile alınan görüntüleri: 1. KP2, 2. EA22, 3. M19, 4. B1, 5. S1, 6. KPX4, 7. EA25, 8. EA7 9. KP7

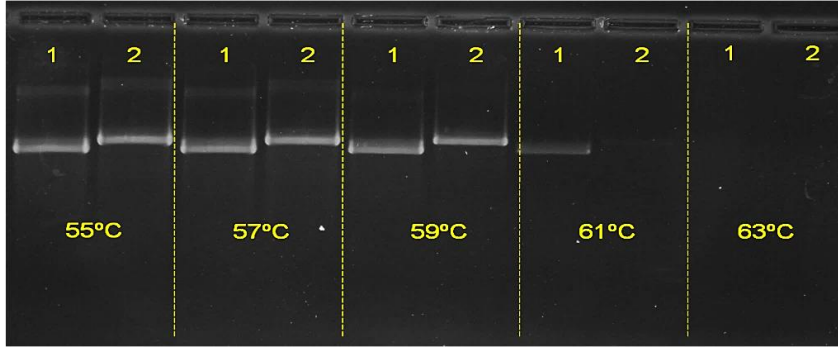
Sadece B1 kodlu izolat bu aşamada morfolojik olarak tanımlanamamıştır. B1 kodlu izolatın, sekans analiz sonuçları ile mikroskobik görüntülerinin karşılaştırılması sonucunda, bu izolatın *Mychonastes* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Işık mikroskobunda yapılan görüntülemelere ek olarak, KP7 kodlu izolatın hücre morfolojisi FESEM ile görüntülenmiştir (Resim 4.2). N+ ve N- koşullarında en yüksek lipit verimine sahip olması ve devam çalışmaları bu izolat ile devam edileceğinden KP7 kodlu izolatın hem ışık mikroskobunda hem de FESEM ile incelenmiştir. KP7 kodlu izolatın hem ışık mikroskobunda hem de FESEM altında çekilmiş hücre görüntüsünde; tek ve kadeh şeklindeki kloroplastı, kamçılı olmaması ve kokoid şekilli olması nedeniyle bu izolat *Chlorella* cinsi olarak tanımlanmıştır.



Resim 4.2. KP7 kodlu izolatın alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ile çekilmiş hücre fotoğrafları. (a) 9.3mm x40 büyütme, (b) 9.3mm x100 büyütme

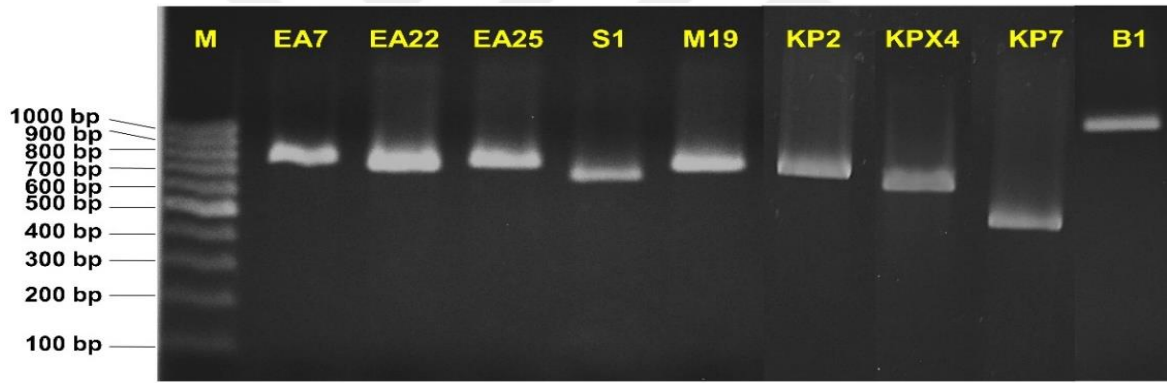
4.3.2. Moleküler tanımlama

Tüm izolatlar, ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesine göre tanımlanmıştır. ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesinin PCR’de sağlıklı bir şekilde çoğaltılabilmesi için, ilk aşamada primerlerin en iyi bağlanma sıcaklığı tespit edilmiştir. Bunun için cw15 referans suşunun ve KP2 izolatının DNA’sı kullanılarak 5 farklı sıcaklıkta Gradient PCR yapılmıştır. PCR sonucunda; 55 ve 57 °C sıcaklıklarda spesifik olmayan bantların olması, 61 ve 63 °C sıcaklıklarda ise amplifikasyonun olmaması nedeniyle en iyi bağlanma sıcaklığı olarak 59 °C seçilmiştir (Resim 4.3).



Resim 4.3. Gradient PCR jel görüntüsü. 1: cw15 referans suşun DNA'sından elde edilen PCR ürünü, 2: KP2 kodlu izolatın DNA'sından elde edilen PCR ürünü

Gradient PCR sonrasında tüm izolatların DNA'sı ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesi için PCR ile çoğaltılmış ve yapılan PCR sonucunda sekanslama için yeterli ve spesifik PCR ürünleri elde edilmiştir (Resim 4.4).

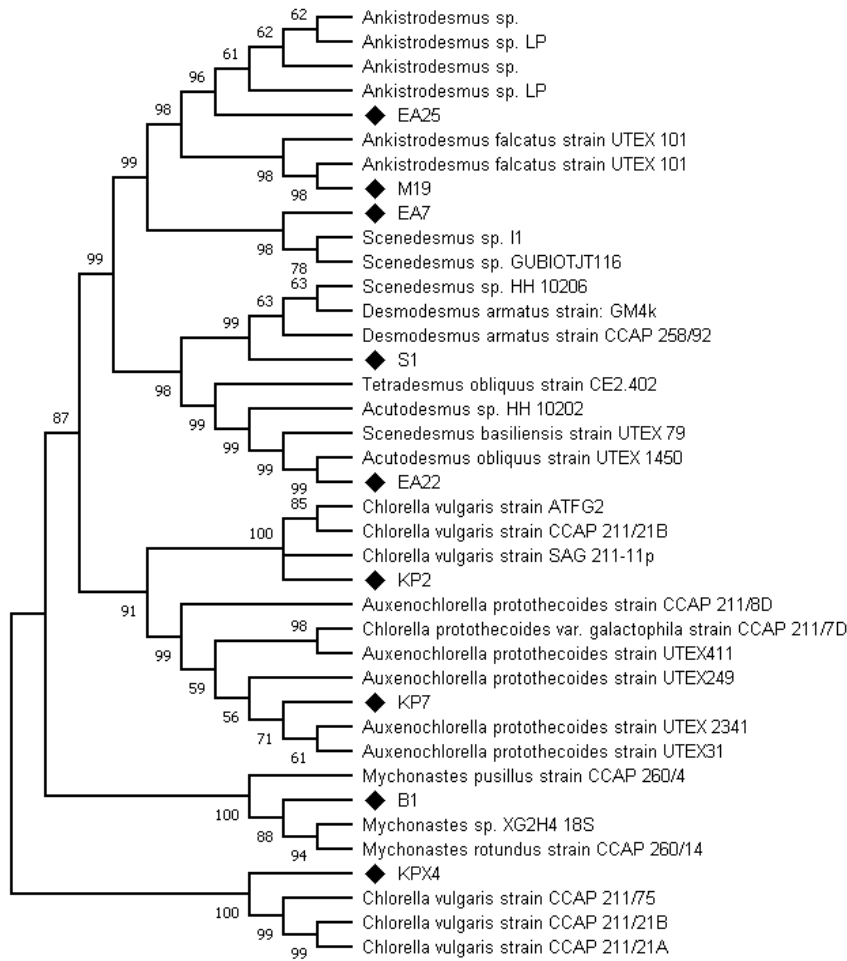


Resim 4.4. EA7, EA22, EA25 S1, M19, KP2, KP4, KP7 ve B1 kodlu izolatların DNA'sından elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: 100 bp DNA uzunluk markörü

PCR ürünlerinin sekans analizinden sonra, sekansların başlangıcında ve sonunda yer alan ve sekans kalitesi kötü olan baz dizileri, bir programla (Sequencher 5.4.6) çıkarıldıktan sonra, NCBI-BLAST programında analiz edilmiştir. EA7 kodlu izolat hariç, kalan 8 izolat GenBank veritabanında eşleşme gösterdikleri mikroalg cins veya türleri ile %100-99 benzerlik aralığı esas alınarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.3). Buna göre; KP2 ve KP4 kodlu izolatlar *Chlorella vulgaris*, KP7 kodlu izolat *Auxenochlorella protothecoides*, S1 ve EA7 kodlu izolatlar *Scenedesmus* sp., EA25 kodlu izolat *Ankistrodesmus* sp., M19 kodlu izolat *Ankistrodesmus falcatus*, B1 kodlu izolat *Mychonastes* sp. ve EA22 kodlu izolat *Acutodesmus* sp. olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.3. Mikroalg izolatlarının DNA sekans benzerlik sonuçları

İzolat kodları	Eşleşen en yakın türler	Hizalama sekans uzunluğu	Hizalama sekans kapsamı (%)	Benzerlik (%)	GenBank erişim numarası
S1	<i>Scenedesmus</i> sp. HH 10206	604 bp	99	99,83	MT340974
EA22	<i>Acutodesmus</i> sp. HH 10202	642 bp	100	100,00	MT340977
EA7	<i>Scenedesmus</i> sp. GUBIOTJT116	663 bp	100	98,64	MT340978
EA25	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> strain UTEX 101	654 bp	98	99,06	MT340972
M19	<i>Ankistrodesmus</i> sp. LP	665 bp	95	99,25	MT340976
B1	<i>Mychonastes</i> sp. XG2H4	503 bp	100	99,40	MT340973
KP2	<i>Chlorella vulgaris</i> strain SAG 211-11p	698 bp	100	99,86	MT340975
KPX4	<i>Chlorella vulgaris</i> strain CCAP 211/11B	519 bp	95	99,20	MT340971
KP7	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> UTEX 2341	423 bp	100	99,76	MT331816



Şekil 4.2. ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesine göre tanımlanan mikroalg suşları için Maximum Composite Likelihood metodu ile oluşturulmuş filogenetik ağaç

9 mikroalg izolatına ait sekanslar için erişim numaraları alınmış ve bu erişim numaraları NCBI veri tabanına kaydedilmiştir (Çizelge 4.3). Bununla birlikte, 9 mikroalg izolatının yer aldığı bir filogenetik ağaç oluşturulmuş ve 1000 tekrara dayalı Bootstrap değerleri, oluşturulan filogenetik ağacın kolları üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.2). Elde edilen

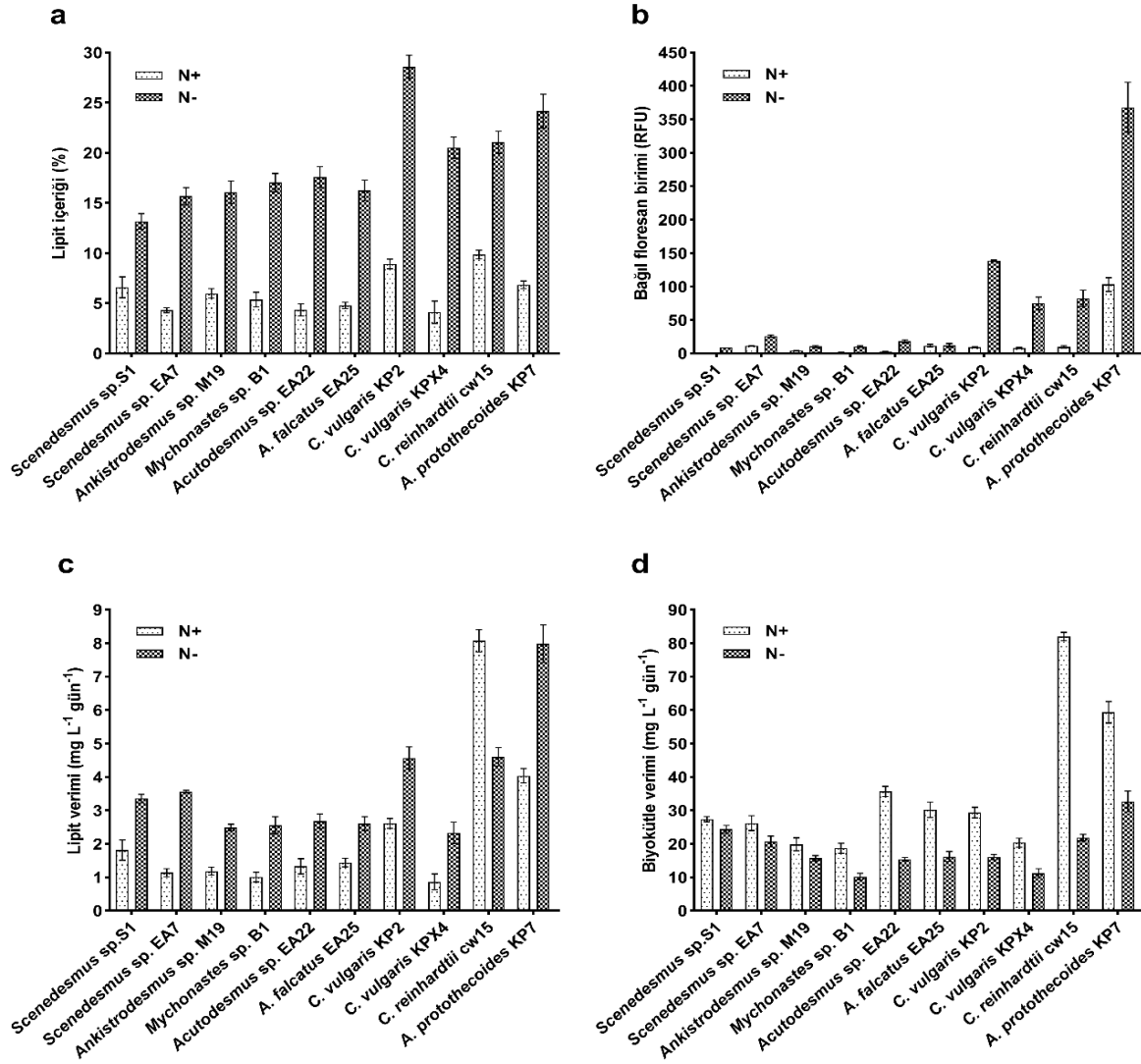
filogenetik ağacın, sekans benzerlik sonuçlarını büyük oranda desteklediği belirlenmiştir (Şekil 4.2). İstisna olarak, S1 kodlu izolatın *Scenedesmus* sp. HH 10206 türü ile yüksek oranda eşleşme göstermesine rağmen filogenetik ağaç incelendiğinde bu izolatın *Desmodesmus armatus* türüne de filogenetik olarak yakın olduğu tespit edilmiştir.

4.4. Seçilen Suşların TAG içerikleri ve Lipit Verimleri

30 mikroalg izolatı arasından bağıl nötral lipit içeriği ve lipit verimine göre seçilen ve DNA düzeyinde tanımlanmış olan 9 mikroalg türü ile *C. reinhardtii* cw15 referans suşunun; bağıl nötral lipit içeriği, bağıl TAG içeriği, % lipit miktarı, biyokütle verimi ve lipit verimi değerleri Şekil 4.3’de verilmiştir. Bağıl nötral lipit içerikleri RFU değerlerine göre, bağıl TAG içerikleri ise HPTLC analizi sonucunda elde edilen TAG bantlarının kalınlığına göre değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; seçilen 9 mikroalg suşunun hepsinde N⁻ stresine bağlı olarak % lipit içeriğinde önemli ölçüde artış olmuştur. N⁻ koşulları altında en yüksek % lipit içeriğine sahip suşların, *C. vulgaris* KP2 (%28,56) ve *A. protothecoides* KP7 (%24,15) suşları olduğu ve bu suşların, *C. reinhardtii* cw15 (%21,05) suşundan daha yüksek lipit içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. N⁺ koşulları ile kıyaslandığında, N⁻ stresinde *C. vulgaris* KP2 suşunun % lipit miktarında %19’luk, *A. protothecoides* KP7 suşunun % lipit miktarında ise %18’lik bir artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3a). En düşük % lipit içeriğine sahip izolatların ise *Scenedesmus* sp. S1 (%13,15) and *Scenedesmus* sp. EA7 (%15,66) türleri olduğu saptanmıştır.

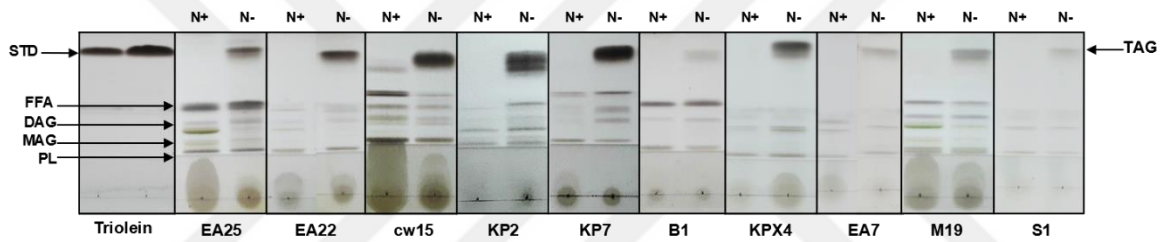
N⁺ koşullarında en yüksek biyokütle verimine sahip olan suşların, *A. protothecoides* KP7 (59,00 mg/L/gün) ve *C. vulgaris* KP2 (29,32 mg/L/gün) suşları olduğu, bu suşların *C. reinhardtii* cw15 (82,00 mg/L/gün) referans suşundan daha düşük biyokütle verimine sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3d). N⁻ koşullarında ise en yüksek biyokütle verimine sahip suşun, *A. protothecoides* KP7 (33,00 mg/L/gün) olduğu, en düşük biyokütle verimine sahip izolatın ise *Mychonastes* sp. B1 olduğu belirlenmiştir (10 mg/L/gün).



Şekil 4.3. Mikroalg izolatlarının ve *C. reinhardtii* cw15 referans suşunun azot yeterli (N+) ve azot yokluğu (N-) koşullarında elde edilen lipit içerikleri (a), bağlı floresan birimi (RFU) değerleri (b), lipit verimleri (c) ve biyokütle verimleri (d)

Lipit verimi sonuçlarına göre; N- koşullarında en yüksek lipit verimine sahip suşların; *A. protothecoides* KP7 (7,98 mg/L/gün), ve *C. vulgaris* KP2 (4,56 mg/L/gün) suşları olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3c). N- koşullarında, *A. protothecoides* KP7 suşunun lipit veriminin, *C. reinhardtii* cw15 suşunun lipit veriminden (4,60 mg/L/gün) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Zıt bir şekilde, N+ koşullarında 9 mikroalg izolatı arasında en yüksek lipit verimine sahip suş *A. protothecoides* KP7 (4,03 mg/L/gün) iken, bu suşun lipit veriminin *C. reinhardtii* cw15 suşundan (8,07 mg/L/gün) daha düşük lipit verimine sahip olduğu saptanmıştır. N+ koşulları ile kıyaslandığında, N- koşulları altında 9 mikroalg izolatının hepsinde lipit veriminde önemli ölçüde artış olurken, *C. reinhardtii* cw15 referans suşunun lipit veriminde önemli ölçüde düşüş olduğu bulunmuştur.

Nile red boyama yöntemiyle elde edilen RFU değerlerine göre, N⁻ koşulları altında en yüksek nötral lipid içeriğine sahip suşların; *A. protothecoides* KP7 (RFU: 368,01), *C. vulgaris* KP2 (RFU: 138,43) ve *C. vulgaris* KPX4 (RFU: 74,66) suşları olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3b). *C. reinhardtii* cw15 (RFU: 82,05) suşu ile kıyaslandığında, *A. protothecoides* KP7 ve *C. vulgaris* KP2 suşlarının daha yüksek nötral lipid içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bulguyu destekler şekilde, HPTLC analizleri sonucunda; N⁻ koşullarında *C. vulgaris* KP2 ve *A. protothecoides* KP7 suşlarının, çalışmada referans suş olarak kullanılan *C. reinhardtii* cw15 suşundan daha yüksek TAG içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir (Resim 4.5). Ayrıca, elde edilen RFU değerleri ile mikroalglerin TAG içerikleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu ve nötral lipidlerin çoğunlukla TAG'lerden oluştuğu tespit edilmiştir.



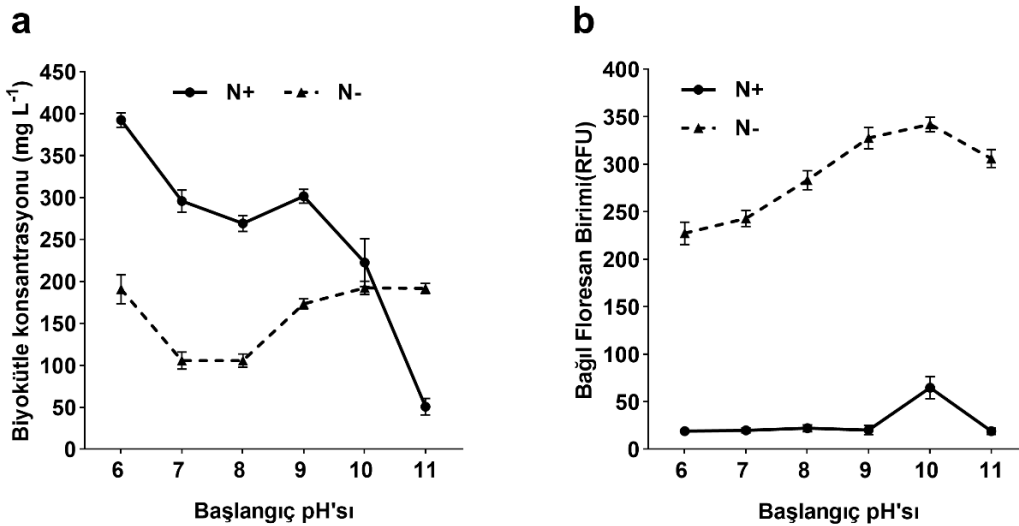
Resim 4.5. Mikroalg izolatlarının ve *C. reinhardtii* cw15 referans suşunun azot yeterli (N⁺) ve azot yokluğu (N⁻) koşullarında elde edilen nötral lipidlerinin HPTLC profili. STD: triolein, FFA: serbest yağ asidi, TAG: triaçilgliserol, DAG: diaçilgliserol, MAG: monoaçilgliserol, PL: fosfolipit

30 mikroalg izolatı kullanılarak yapılan seleksiyon çalışması sonucunda; N⁻ stresinde TAG içeriği ve lipid verimi en yüksek olan *A. protothecoides* KP7 ve *C. vulgaris* KP2 suşları biyodizel üretimi bakımından potansiyel suşlar olarak seçilmiştir. Bundan sonraki aşamada bu suşlarda alkali pH'nın ve alkali pH/N⁻ kombine stresinin; TAG üretimine, büyümeye, biyokimyasal kompozisyona (nişasta, protein, klorofil miktarları) ve yağ asidi profiline etkisi araştırılmıştır.

4.5. Farklı pH Seviyelerinin *A. protothecoides* KP7 ve *C. vulgaris* KP2 Suşlarının TAG Akümülayonuna ve Biyokütle Üretimine Etkisi

Bu çalışmada, *A. protothecoides* KP7 ve *C. vulgaris* KP2 suşlarında, en yüksek biyokütle konsantrasyonu ve TAG akümülayonunun olduğu besiyeri pH'sının saptanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; *A. protothecoides* KP7 ve *C. vulgaris* KP2

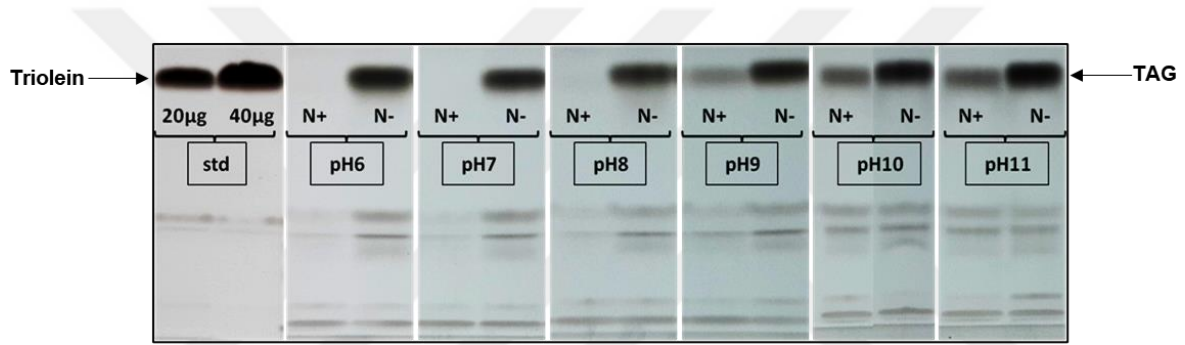
suşlarında biyokütle ve TAG üretimi bakımından en iyi pH'nın seçimi için, besiyerinde 7 farklı pH'da (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) hem N+ hem de N- koşullarında bir ön çalışma yapılmıştır. Suşların nötral lipid miktarları RFU değerlerine göre, TAG miktarları ise HPTLC'de TAG bantlarının kalınlığına göre kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda; her iki suş için de pH 5'de üreme gözlenmediğinden, bu pH seviyesi için mikroalglerin TAG üretimi açısından da bir değerlendirme yapılamamıştır. *A. protothecoides* KP7 suşu için; N+ koşulları altında 7 günlük kültür sonunda en iyi üremenin pH 6'da olduğu ve bu koşullarda net biyokütle konsantrasyonunun 392,3 mg/L olduğu saptanmıştır. Besiyeri pH'sının 6'dan 8'e yükselmesiyle birlikte biyokütle konsantrasyonunun 392,3 mg/L'den 269,0 mg/L'ye azaldığı, pH 8'den pH 9'a biyokütle konsantrasyonunda dikkate değer olmayan bir artış gözlenirse de pH 10 ile birlikte biyokütle konsantrasyonunun tekrardan azalmaya devam ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.4a).



Şekil 4.4. (a) *A. protothecoides* KP7 suşunun 6 farklı ortam pH'sında elde edilen biyokütle konsantrasyonları (mg/L), ve (b) bağlı floresan birimi (RFU) değerleri

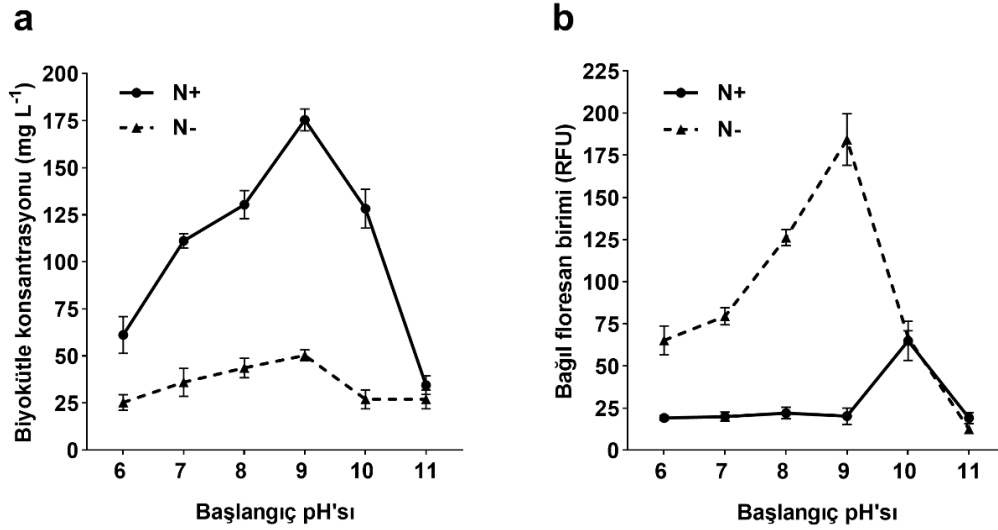
N+ koşulları altında, en düşük biyokütle konsantrasyonları pH 10 (222,3 mg/L) ve pH 11 (50,6 mg/L)'de saptanmıştır. Bunun yanı sıra, N- stresi altında besiyeri pH'sının 6'dan 8'e yükselmesiyle biyokütle konsantrasyonunun 195,3 mg/L'den 105,6 mg/L'ye düştüğü, pH 8'den pH 11'e biyokütle konsantrasyonunda tekrardan bir artış olduğu ve pH 11'de biyokütle konsantrasyonunun 191,5 mg/L'ye ulaştığı belirlenmiştir. N- stresi altında, en yüksek net biyokütle konsantrasyonu 195,3 mg/L ile pH 6'da, en düşük net biyokütle konsantrasyonları ise 105,7 mg/L ile pH 7 ve 8'de saptanmıştır.

RFU değerlerine göre; N⁻ stresi altında nötral lipid içeriğinin, besiyeri pH'sının 6'dan 11'e yükselmesiyle arttığı belirlenmiştir. N⁻ stresi altında, en yüksek nötral lipid miktarı pH 10'da (RFU: 341,9), en düşük nötral lipid miktarı (RFU: 227,6) ise pH 6'da belirlenmiştir. Bunun yanı sıra N⁻ stres koşullarına kıyasla, N⁺ koşullarında pH 10 hariç tüm pH'larda nötral lipid içeriğinin oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. N⁺ koşullarında en yüksek nötral lipid içeriği pH 10'da (RFU: 64,9), en yüksek nötral lipid içeriği ise pH 11'de (RFU: 19,1)'de saptanmıştır. Ayrıca, HPTLC analizi sonucunda en yüksek TAG içeriğinin N⁻ stres koşullarında pH 10 ve pH 11'de olduğu gözlenmiştir (Resim 4.6). Ön çalışma bulguları, *A. protothecoides* KP7 suşunda biyokütle üretimi için en iyi kültür koşulunun pH 6 N⁺ olduğunu, nötral lipid üretimi için de en iyi koşulun pH 10 N⁻ koşulu olduğunu göstermiştir.



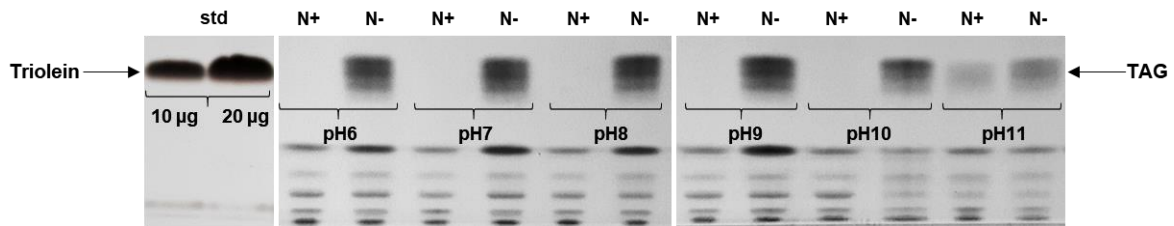
Resim 4.6. *A. protothecoides* KP7 suşunun 6 farklı pH'da azot varlığı (N⁺) ve yokluğu (N⁻) koşullarında elde edilen nötral lipidlerinin HPTLC profili

A. protothecoides KP7 suşundan elde edilen bulguların aksine, *C. vulgaris* KP2 suşunda biyokütle konsantrasyonu pH'6'dan pH 9'a doğru artış göstermiş ve tüm koşullar arasında en yüksek biyokütle konsantrasyonu (175,3 mg/L) N⁺ koşullarında pH 9'da saptanmıştır (Şekil 4.5a). Bununla birlikte N⁺ koşullarında, pH'nın 9'dan 10'a yükselmesiyle birlikte biyokütle konsantrasyonu düşmeye başlamış ve N⁺ koşullarında en düşük biyokütle konsantrasyonu (34,5 mg/L) pH 11'de bulunmuştur. N⁺ koşuluna benzer şekilde, N⁻ stresi altında *C. vulgaris* KP2 suşunun biyokütle konsantrasyonu, pH 6'dan 9'a doğru artış göstermiş ve pH 9'dan 11'e doğru ise tekrardan düşüş olduğu saptanmıştır. N⁻ stresi altında en yüksek biyokütle konsantrasyonu (50,3 mg/L) pH 9'da, en düşük biyokütle konsantrasyonu (27 mg/L) ise pH 11'de belirlenmiştir.



Şekil 4.5. (a) *C. vulgaris* KP2 suşunun 6 farklı ortam pH'sında elde edilen biyokütle konsantrasyonları (mg/L) ve(b) bağıl floresan birimi (RFU) değerleri

N⁻ stresi altında, *C. vulgaris* KP2 suşunun nötral lipid miktarı, pH'nın 6'dan 9'a yükselmesiyle artış gösterse de ortam pH'sının 10'a yükselmesiyle tekrardan azalma göstermiştir. Buna göre, *C. vulgaris* KP2 suşunda en yüksek nötral lipid içeriği (RFU: 184,3) N⁻ stresinde pH 9'da, en düşük nötral lipid içeriği (RFU:12,5) ise N⁻ stresinde pH 11'de saptanmıştır (Şekil 4.5b). N⁺ koşullarında ise en yüksek nötral lipid içeriği (RFU: 64,8) pH 10'da kaydedilmiştir. HPTLC analiz sonuçları RFU değerlerini büyük ölçüde desteklemiş ve TAG bantlarının kalınlığına göre en yüksek TAG içeriğinin pH 9 N⁻ koşulunda, en düşük TAG içeriğinin de pH 11 N⁻ koşulunda olduğu gözlenmiştir (Resim 4.7).



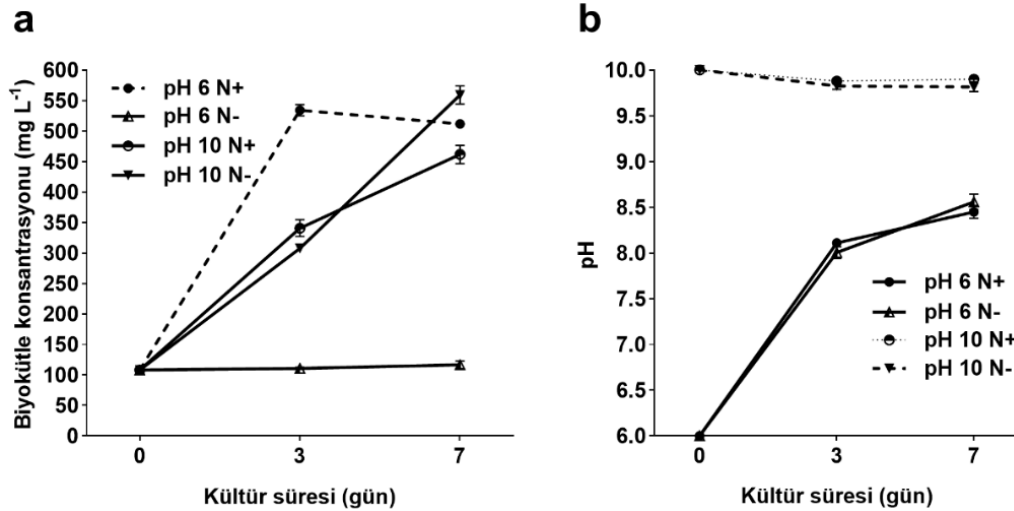
Resim 4.7. *C. vulgaris* KP2 suşunun 6 farklı pH'da azot varlığı (N+) ve yokluğu (N-) koşullarında elde edilen nötral lipidlerinin HPTLC profili

Sonuç olarak; *C. vulgaris* KP2 suşunda, biyokütle üretimi için en iyi kültür koşulunun pH 9 N⁺ koşulu olduğunu, nötral lipid üretimi için de en iyi koşulun pH 9 N⁻ koşulu olduğu belirlenmiştir. Ön çalışma bulgularından yola çıkarak, bundan sonraki aşamalarda *A. protothecoides* KP7 suşu için hem N⁺ hem de N⁻ koşullarında ve besiyerinde pH 6 ve pH

10 olmak üzere iki farklı pH’da, *C. vulgaris* KP2 suşu için de hem N+ hem de N- koşullarında besiyerinde pH 8 ve pH 9 olmak üzere iki farklı pH’da deneyler gerçekleştirilmiştir.

4.6. pH ve Azot Yokluğu Stresinin *A. protothecoides* KP7 Suşunun Biyokütle Konsantrasyonuna Etkisi

Bu çalışmada, N+ ve N- koşullarında karbonat-bikarbonat tamponu ile oluşturulan alkali pH (pH 10)’nın, *A. protothecoides* KP7 suşunun biyokütle konsantrasyonuna etkisi araştırılmıştır. Biyokütle konsantrasyonlarındaki değişimler, mikroalg suşunun lipid verimini de etkileyeceğinden, bu etkinin ortaya konması biyodizel verimi açısından da önemlidir. Tüm kültür koşullarında *A. protothecoides* KP7 suşunun başlangıç biyokütle konsantrasyonları 108 mg/L olarak ölçülmüştür. Yapılan analizler sonucunda; pH 6 N+ koşulları altında biyokütle konsantrasyonunun, kültürün 3. gününde yaklaşık 426,2 mg/L artarak 534,2 mg/L’ye ulaştığı belirlenmiştir. 3. günden sonra kültürün biyokütle konsantrasyonunda bir artış olmadığı ve 7. günün sonunda biyokütle konsantrasyonunda bir azalma olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6a).



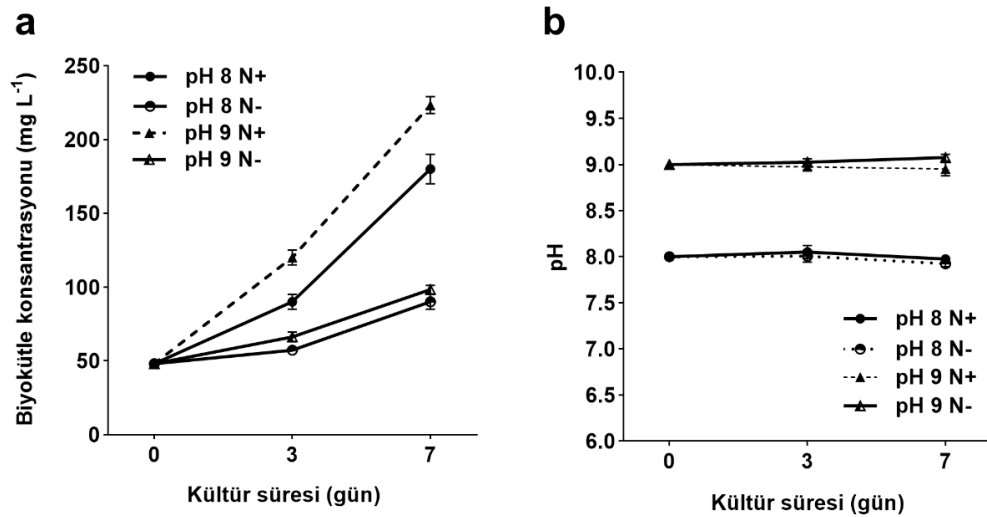
Şekil 4.6. (a) *A. protothecoides* KP7 suşunun pH 6 N+, pH 6 N-, pH 10 N+ ve pH 10 N- koşullarında saptanan biyokütle konsantrasyonları (mg/L) ve (b) ortam pH’ları

En yüksek net biyokütle konsantrasyonu (451,2 mg/L) ise 7. günün sonunda pH 10 N- kültüründe bulunmuştur. pH 10 N- kültüründen elde edilen biyokütle veriminin; pH 6 N+ (57,6 mg/L/gün), pH 9 N+ (43,1 mg/L/gün), pH 10 N+ (1,2 mg/L/gün), pH 6 N- (50,5 mg/L/gün) ve 7. günde pH 9 N- (24,1 mg/L/gün) kültürlerinden elde edilen biyokütle verimlerinden önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha yüksek olduğu saptanmıştır. Test edilen tüm

koşullar arasında, en düşük biyokütle konsantrasyonuna sahip olan kültürün pH 10 N+ kültürü olduğu belirlenmiştir. pH 10 N+ kültüründeki biyokütle konsantrasyonu, 3. ve 7. günlerde neredeyse aynı kalmış ve biyokütle konsantrasyonları sırasıyla 110,8 mg/L ve 116,6 mg/L olarak saptanmıştır. Ayrıca tüm kültür koşulları arasında pH dalgalanması, sadece pH 6 N+ ve pH 6 N- kültürlerinde gözlenmiştir. Bu koşullarda, besiyeri pH'sının, 3. günde pH 8'e yükseldiği ve 7. günde ise pH'nın yaklaşık 8,5 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6b).

4.7. pH ve Azot Yokluğu Stresinin *C. vulgaris* KP2 Suşunun Biyokütle Konsantrasyonuna Etkisi

Bu çalışmada; Tris-HCl tamponu ile oluşturulan alkali pH (pH 9)'nın, hem N+ hem de N- koşullarında *C. vulgaris* KP2 suşunun biyokütle konsantrasyonuna etkisi araştırılmıştır. *C. vulgaris* KP2 suşunda tüm kültür koşullarının başlangıç biyokütle konsantrasyonu 48,0 mg/L olarak ölçülmüş ve tüm kültür koşullarında 7. güne kadar biyokütle konsantrasyonunda artış gözlenmiştir. Tüm koşullar arasında, en yüksek biyokütle konsantrasyonu (223,3 mg/L), 7. günün sonunda pH 9 N+ kültüründe kaydedilmiştir.



Şekil 4.7. (a) *C. vulgaris* KP2 suşunun pH 8 N+, pH 8 N-, pH 9 N+ ve pH 9 N- koşullarında saptanan biyokütle konsantrasyonları (mg/L) ve (b) ortam pH'ları

İkinci en yüksek artış, pH 8 N+ koşullarında olup bu koşullarda biyokütle konsantrasyonu 180,0 mg/L olarak belirlenmiştir. En düşük biyokütle konsantrasyonları, 7. günün sonunda pH 8 N- (90,0 mg/L) ve pH 9 N- (98,3 mg/L) kültürlerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.7a). Tüm koşullar arasında, 7. günün sonunda pH 9 N+ kültüründen elde edilen biyokütle

veriminin; pH 8 N⁺ (18,4 mg/L/gün), pH 8 N⁻ (6,0 mg/L/gün) ve pH 9 N⁻ (7 mg/L/gün) kültürlerinden elde edilen biyokütle verimlerinden önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte tüm kültürlerde, kültür süresi boyunca pH'nın değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.7b).

Her iki suş için de biyokütle konsantrasyonu bakımından elde edilen bulgular, *A. protothecoides* KP7 suşunun N⁻ ve alkali pH kombine stresine toleransının, *C. vulgaris* KP2 suşundan daha yüksek olduğunu göstermiştir.

4.8. pH ve Azot Yokluğu Stresinin *A. protothecoides* KP7 Suşunun Biyokimyasal Kompozisyonuna Etkisi

Bu çalışma, pH ve N⁻ stres koşullarının *A. protothecoides* KP7 suşunun protein, nişasta ve toplam klorofil (klorofil-a + klorofil-b) içeriklerine etkisi ve bu etki ile TAG üretimi arasındaki ilişkinin ortaya konması amacı ile yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, mikroalg hücreleri pH 6 N⁺/N⁻ ve pH 10 N⁺/N⁻ koşullarında 7 gün boyunca kültüre alınmıştır. 7 gün sonunda toplanan hücrelerde; protein, nişasta ve toplam klorofil (klorofil-a + klorofil-b) içerikleri belirlenmiştir. Buna göre; tüm koşullar arasında en yüksek protein içeriği, pH 6 N⁺ (%25,5) ve pH 10 N⁺ (%26,9) kültürlerinde saptanmıştır. pH 6 N⁻ ve pH 10 N⁻ kültürlerinin protein içerikleri, 7. günün sonunda önemli ölçüde azalırken test edilen tüm koşullar arasında en düşük protein içeriği, 7. günde pH 10 N⁻ kültüründe (% 8,9) belirlenmiştir ($p < 0,05$). Bununla birlikte, pH 6 N⁺ ve pH 10 N⁺ kültürlerine kıyasla, 7. günün sonunda pH 6 N⁻ ve pH 10 N⁻ kültürlerinin protein içeriklerinde dikkate değer bir azalma ($p < 0,05$) olmuştur (Çizelge 4.4).

Öte yandan pH 6 N⁻ ve pH 10 N⁻ kültürlerinin nişasta içeriklerinde 7. günün sonunda önemli ölçüde artış olduğu ($p < 0,05$) ve bu kültürlerin nişasta içeriklerinin %19,8 ve %20,4 olduğu belirlenmiştir. En düşük nişasta içeriğine sahip kültürler, pH 6 N⁺ ve pH 10 N⁺ kültürleri olup bu kültürlerin nişasta içerikleri sırasıyla %1,5 ve %1,2'dir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *A. protothecoides* KP7 suşunun protein, nişasta ve toplam klorofil (klorofil -a + klorofil -b) içerikleri

Kültür koşulları	Protein içeriği (%)	Nişasta içeriği (%)	Klorofil içeriği (mg g ⁻¹)
pH 6 N+	25,5 ± 1,6	1,50 ± 0,2	13,45 ± 1,5
pH 6 N-	11,8 ± 4,2	19,8 ± 3,2	5,2 ± 0,4
pH 10 N+	26,9 ± 2,4	1,2 ± 0,1	22,1 ± 3,5
pH 10 N-	8,9 ± 0,4	20,4 ± 3,2	3,6 ± 0,5

Protein içeriğindeki azalmaya benzer şekilde, pH 6 N- ve pH 10 N- kültürlerinin toplam klorofil (klorofil-a + klorofil-b) içeriğinde önemli ölçüde düşüş olmuş ve en düşük toplam klorofil miktarı 7. günün sonunda pH 10 N- kültüründe (3,6 mg g⁻¹) saptanmıştır. Bunun aksine, en yüksek toplam klorofil içeriği (24,7 mg g⁻¹) 7. günün sonunda pH 10 N+ kültüründe saptanmıştır (Çizelge 4.4).

4.9. pH ve Azot Yokluğu Stresinin *C. vulgaris* KP2 Suşunun Biyokimyasal Kompozisyonuna Etkisi

Bu çalışma ile pH ve N- stresinin, *C. vulgaris* KP2 suşunun protein, nişasta ve toplam klorofil (klorofil-a + klorofil-b) içeriğine etkisi ve bu etki ile TAG üretimi arasındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, mikroalg hücreleri pH 8 N+/N- ve pH 9 N+/N- koşullarında 7 gün boyunca kültüre alınmıştır. 7 gün sonunda toplanan hücrelerde; protein, nişasta ve toplam klorofil (klorofil-a + klorofil-b) içerikleri belirlenmiştir. Buna göre; en yüksek protein içeriği her iki pH için de N+ koşulları altında saptanmış ve pH 8 N+ ve pH 9 N+ kültürlerinde saptanan protein içerikleri, 7. günün sonunda sırasıyla %40,9 ve %37,5 olmuştur (Çizelge 4.5). Bununla birlikte, pH 8 N+ ve pH 9 N+ kültürlerine kıyasla, pH 8 N- ve pH 9 N- kültürlerinin protein içeriklerinde, 7. günün sonunda önemli ölçüde azalma olmuştur ($p < 0,05$). Test edilen tüm koşullar arasında en düşük protein içeriği, 7. günde pH 9 N- kültüründe (% 20,4) saptanmıştır ($p < 0,05$).

Bununla birlikte, pH 8 N- ve pH 9 N- kültürlerinin nişasta içeriklerinde, 7. günün sonunda önemli ölçüde artış olduğu ve bu kültürlerin nişasta içeriklerinin %10,5 ve %11,8 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5; $p < 0,05$). En düşük nişasta içeriği, pH 8 N+ ve pH 9 N+ koşullarında kültüre alınan hücrelerde tespit edilmiştir. Bu kültürlerin nişasta içeriklerinin 7. günün sonunda sırasıyla %6,5 ve %4,8 olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.5. *C. vulgaris* KP2 suşunun protein, nişasta ve toplam klorofil (klorofil-a + klorofil-b) içerikleri

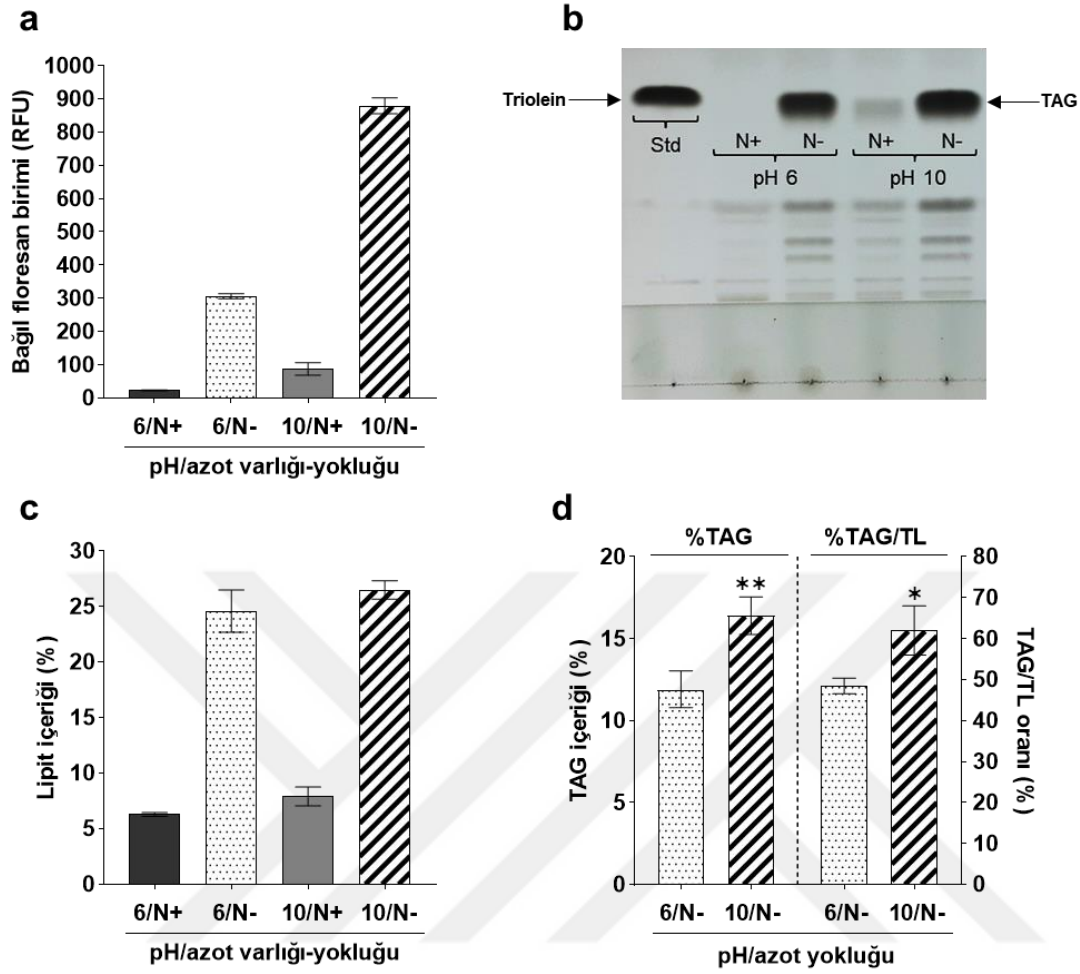
Kültür koşulları	Protein içeriği (%)	Nişasta içeriği (%)	Klorofil içeriği (mg g ⁻¹)
pH 8 N+	40,9 ± 1,8	6,5 ± 0,2	48,8 ± 6,5
pH 8 N-	26,2 ± 0,7	10,5 ± 0,9	40,1 ± 2,0
pH 9 N+	37,5 ± 1,0	4,8 ± 0,2	51,6 ± 2,6
pH 9 N-	20,4 ± 0,9	11,8 ± 0,4	35,1 ± 2,6

Protein içeriğindeki azalmayla birlikte, pH 8 N- ve pH 9 N- kültürlerinin toplam klorofil (klorofil-a + klorofil-b) içeriğinde de önemli ölçüde düşüş olduğu saptanmış ve 7. günün sonunda en düşük toplam klorofil miktarı pH 9 N- kültüründe (35,1 mg g⁻¹) ölçülmüştür. Bunun aksine en yüksek toplam klorofil içeriği, 7. günün sonunda pH 9 N+ kültüründe (51,6 mg g⁻¹) saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Bu bulgular, N- ve alkali pH kombine stresinin hem *C. vulgaris* KP2 suşunda hem de *A. protothecoides* KP7 suşunda; protein ve klorofil içeriğinde düşüşe, nişasta içeriğinde ise artışa neden olduğunu göstermiştir. Bu da alkali pH ve N- stres kombinasyonuna maruz kalan hücrelerdeki karbon akışının, nitrojen bakımından zengin bileşiklerden (protein ve klorofil) nitrojen içermeyen bileşiklere (TAG ve nişasta) doğru yönlendirilmiş olabileceğine işaret etmektedir.

4.10. pH ve Azot Yokluğu Stresinin *A. protothecoides* KP7 Suşunun TAG Akümülayonuna ve Lipit Verimine Etkisi

Bu çalışmada, karbonat-bikarbonat tamponu oluşturulmuş alkali pH (pH 10) ve N- kombine stresi ile *A. protothecoides* KP7 suşunda TAG üretimini ve lipit verimini arttırmak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; *A. protothecoides* KP7 suşu pH 6 N+, pH 6 N-, pH 10 N+ ve pH 10 N- koşullarında 7 gün boyunca kültüre alınmıştır. Bağlı nötral lipit içerikleri RFU değerlerine göre, bağlı TAG içerikleri ise HPTLC analizi sonucunda elde edilen TAG bantlarının kalınlığına göre değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, sadece pH 6 N- ve pH 10 N- kültürleri için % TAG içerikleri, % lipit içeriği ve % TAG içeriğine göre ise triaçilgliserol/toplam lipit (TAG/TL) oranı belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda; pH 6 N+ kültürünün nötral lipit içeriğinde kültür süresince önemli ölçüde bir değişim olmadığı, pH 10 N+, pH 6 N- ve pH 10 N- kültürlerinin nötral lipit içeriklerinde ise önemli ölçüde ($p < 0,05$) artış olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.8. (a) *A. protothecoides* KP7 suşunun pH 6 N+, pH 6 N-, pH 10 N+ ve pH 10 N- koşulları altında saptanan bağıl floresan birimi (RFU) değerleri, (b) nötral lipidlerinin HPTLC profili ve (c) % lipid içerikleri. (d) *A. protothecoides* KP7 suşunun pH 6 N- ve pH 10 N- koşulları altında belirlenen TAG içerikleri ve TAG/TL oranları

pH 6 N+ kültüründeki bulgularla karşılaştırıldığında, 7 günlük kültürün sonunda hücrelerin floresan emisyonu; pH 10 N+, pH 6 N- ve pH 10 N- kültürlerinde sırasıyla yaklaşık 3,8, 13 ve 38 kat artış göstermiştir (Şekil 4.8a). RFU değerlerindeki bu artış HPTLC analizleri ile doğrulanmıştır (Şekil 4.8b). En yüksek RFU değerine sahip olan pH 10 N- (RFU = 879,0) ve pH 6 N- (RFU = 306,0) kültürlerinin TAG içeriklerinin de yüksek olduğu ve pH 10 N+ (RFU = 87,3) kültürlerinin TAG bantlarının da yüksek yoğunlukta olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8b). HPTLC profilinde görüldüğü üzere, pH 6 ve 10'da N- kültürlerinde bant yoğunluğundaki artışa karşın, pH 6 N+ kültüründe hiçbir bant yoğunluğu görülmezken, pH 10 N+ kültüründe ise çok düşük bir bant yoğunluğu görülmüştür. Bu bulguları, RFU verileri de desteklemiş olup, pH 6 ve pH 10 N+ kültürlerinde nötral lipid miktarının çok düşük olması sebebi ile bu kültürler için TAG miktarı ve triaçilgliserol/toplam lipid oranları

hesaplanamamış ve Şekil 4.8d'deki grafiğe bu sonuçlar dahil edilmemiştir. Çalışmada sadece en yüksek RFU değerlerine sahip olan pH 6 N⁻ ve pH 10 N⁻ kültürlerinin TAG içerikleri belirlenmiştir. Buna göre; pH 6 N⁻ ve pH 10 N⁻ kültürlerinin, sırasıyla kuru ağırlıklarının %11,9'u ve %16,4'ü kadar TAG içeriğine sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.8d). Bununla birlikte TAG/toplam lipit oranını, pH 6 N⁻ ve pH 10 N⁻ kültürlerinde sırasıyla yaklaşık %48,0 ve %62,0 olduğu saptanmıştır. pH 6 N⁻ kültürü ile kıyaslandığında, pH 10 N⁻ kültürünün TAG içeriğinde %4,5, TAG/toplam lipit oranında %13,5 artış olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). *A. protothecoides* KP7 suşunun toplam lipit içeriği, en iyi artışı pH 6 N⁻ ve pH 10 N⁻ kültür ortamlarında göstermiştir (Şekil 4.8c; $p < 0,05$).

Çizelge 4.6. *A. protothecoides* KP7 suşunun biyokütle verimi (mg/L/gün), lipit içeriği (%) ve lipit verimi (mg/L/gün)

Kültür koşulları	Biyokütle verimi (mg/L/gün)	Lipit içeriği (%)	Lipit verimi (mg/L/gün)
pH 6 N ⁺	57,6 ± 0,4	6,3 ± 0,2	3,6 ± 0,1
pH 6 N ⁻	50,5 ± 2,1	23,7 ± 1,5	11,9 ± 0,1
pH 10 N ⁺	1,2 ± 0,9	7,9 ± 0,8	0,1 ± 0,06
pH 10 N ⁻	64,4 ± 2,1	26,5 ± 0,8	17,1 ± 0,6

Bununla beraber, *A. protothecoides* KP7 suşu en yüksek toplam lipit içeriğini (%26,5) ve en yüksek lipit verimini (17,1 mg/L/gün), pH 10 N⁻ kültür koşulunda göstermiş olup, denenen diğer kültür koşullarına göre bu kültür koşulunda lipit veriminin önemli ölçüde ($p < 0,05$) yüksek olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.6).

Elde edilen bulgular, N⁻ koşullarının *A. protothecoides* KP7'nin TAG üretimini ve lipit verimini artırma üzerine önemli etkisinin olduğunu, alkali pH stresıyla bu etkinin sinerjik olarak daha da arttığını göstermiştir. Ayrıca N⁻ stresinden bağımsız olarak, tek başına yüksek pH stresinin (pH 10 N⁺ koşulu) *A. protothecoides* KP7'de TAG birikimini indüklediği belirlenmiştir.

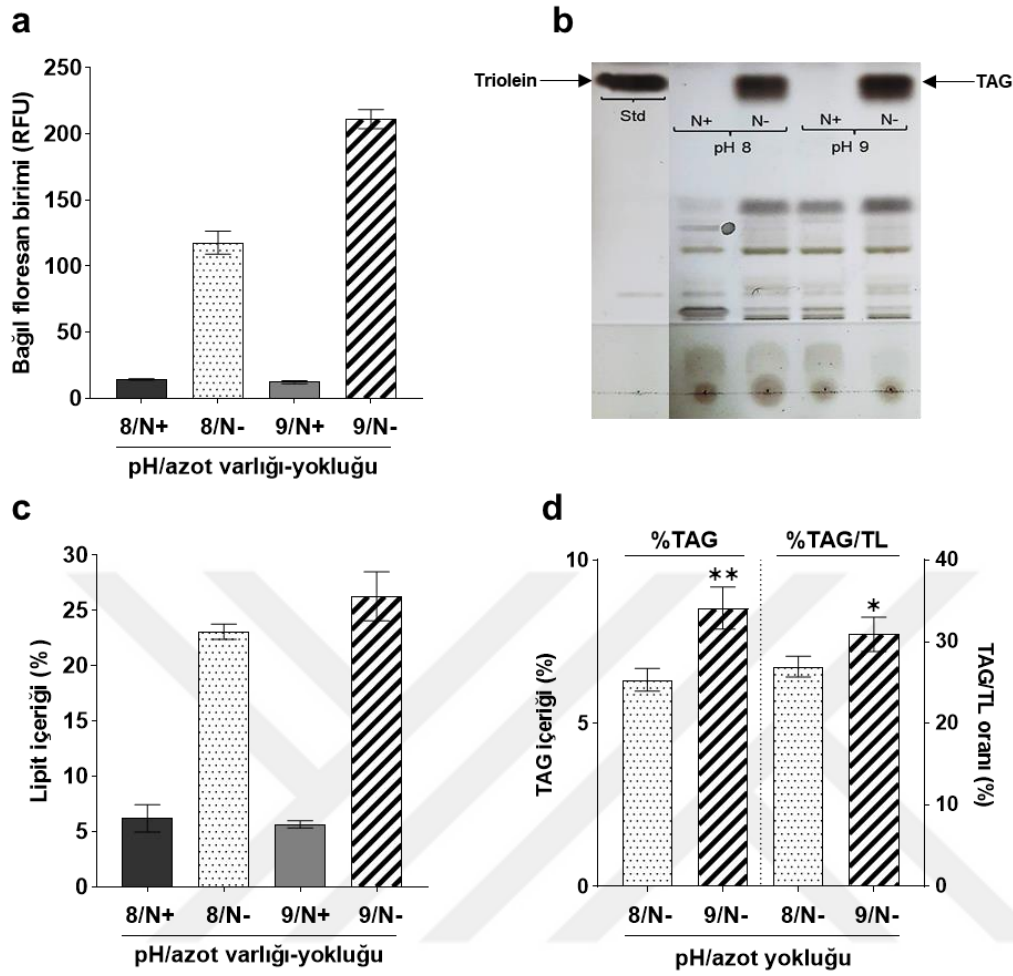
4.11. pH ve Azot Yokluğu Stresinin *C. vulgaris* KP2 Suşunun TAG Akümülayonuna ve Lipit Verimine Etkisi

Bu çalışmada, alkali pH ve N⁻ kombine stresi uygulayarak, *C. vulgaris* KP2 suşunun TAG üretimini ve lipit verimini arttırmak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; *C. vulgaris* KP2 suşu pH 8 N⁺, pH 8 N⁻, pH 9 N⁺ ve pH 9 N⁻ koşullarında 7 gün boyunca kültüre alınmıştır.

Bağıl nötral lipid içerikleri RFU değerlerine göre, bağlı TAG içerikleri ise HPTLC analizi sonucunda elde edilen TAG bantlarının kalınlığına göre değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, sadece pH 8 N⁻ ve pH 9 N⁻ kültürleri için % TAG içerikleri ve % triaçilgliserol/toplam lipid (TAG/TL) oranı belirlenmiştir.

Yapılan analizler sonucunda; kültür süresince pH 8 N⁺ ve pH 9 N⁺ kültürlerinin nötral lipid içeriklerinde bir değişiklik olmadığı, pH 8 N⁻ ve pH 9 N⁻ kültürlerinin nötral lipid içeriklerinde ise önemli ölçüde ($p < 0,05$) artış olduğu saptanmıştır. pH 8 N⁺ kültüründen elde edilen RFU verileriyle karşılaştırıldığında, pH 8 N⁻ ve pH 9 N⁻ kültürlerinde RFU değerlerinde sırasıyla yaklaşık 8,4 ve 15,1 katlık artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9a). RFU değerlerindeki bu artışın, nötral lipidlerden özellikle TAG'lerin miktarındaki artışa işaret ettiği, HPTLC analizleri ile doğrulanmıştır (Şekil 4.9b). *A. protothecoides* KP7 suşuna benzer şekilde, HPTLC profilinde N⁻ stresi altında pH 8 ve 9'da TAG bantlarının yoğunluğunda aşırı bir artış olurken, pH 8 ve pH 9 N⁺ kültürlerinde TAG bantları görülmemiştir. Bu sonuçları, RFU sonuçları da desteklemiş olup, pH 8 ve pH 9 N⁺ kültürlerinde nötral lipid miktarının çok düşük olması sebebi ile bu kültürler için % TAG miktarı ve % TAG/TL oranları hesaplanamamış ve Şekil 4.9d'deki grafiğe bu sonuçlar dahil edilmemiştir.

Çalışmada sadece en yüksek RFU değerlerine sahip olan pH 8 N⁻ (RFU = 117,7) ve pH 9 N⁻ (RFU = 211,0) kültürlerinin, TAG içerikleri belirlenmiştir. Buna göre; pH 8 N⁻ ve pH 9 N⁻ kültürlerinin, kuru ağırlığının %6,3'ü ve %8,5'i kadar TAG içeriğine sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9d). Ayrıca TAG/toplam lipid oranının pH 8 N⁻ ve pH 9 N⁻ kültürlerinde sırasıyla yaklaşık %27,0 ve %31,0 olduğu saptanmıştır. pH 8 N⁻ kültürü ile kıyaslandığında, pH 9 N⁻ kültürünün TAG içeriğinde yaklaşık %2,2, TAG/toplam lipid oranında yaklaşık %4 artış olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.9. (a) *C. vulgaris* KP2 suşunun pH 8 N+, pH 8 N-, pH 9 N+ ve pH 9 N- koşulları altında saptanan bağlı nötral lipit içeriği, (b) nötral lipitlerinin HPTLC profili ve (c) % lipit içerikleri. (d) *C. vulgaris* KP2 suşunun pH 6 N- ve pH 10 N- koşulları altında belirlenen TAG içerikleri ve TAG/TL oranları

Test edilen tüm koşullar arasında, en yüksek toplam lipit içeriği (%26,26) ve en yüksek lipit verimi (2,0 mg/L/gün) pH 9 N- kültüründe saptanmıştır. (Şekil 4.9c; $p < 0,05$). Benzer şekilde, tüm koşullar arasında en yüksek lipit verimi değeri, pH 9 N- kültüründe saptanmış ve diğer koşullardan önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *C. vulgaris* KP2 suşunun biyokütle verimi (mg/L/gün), lipit içeriği (%) ve lipit verimi (mg/L/gün)

Kültür koşulları	Biyokütle verimi (mg/L/gün)	Lipit içeriği (%)	Lipit verimi (mg/L/gün)
pH 8 N+	18,4 ± 0,8	6,0 ± 0,8	1,1 ± 0,2
pH 8 N-	6,0 ± 0,7	26,6 ± 2,1	1,6 ± 0,3
pH 9 N+	25,1 ± 0,8	5,0 ± 0,3	1,3 ± 0,1
pH 9 N-	7,2 ± 0,4	27,6 ± 1,6	2,0 ± 0,3

Elde edilen bulgular, N⁻ koşullarında alkali pH'nın, *A. protothecoides* KP7 suşunda olduğu gibi *C. vulgaris* KP2 suşunda da TAG üretimi ve lipit verimi üzerine sinerjik bir etki yaptığını göstermiştir. *A. protothecoides* KP7 suşu ile kıyaslandığında; *C. vulgaris* KP2 suşunun, N⁻ ve alkali pH koşullarında oldukça düşük lipit verimine, TAG içeriğine ve TAG/toplam lipit oranına sahip olduğu belirlenmiştir.

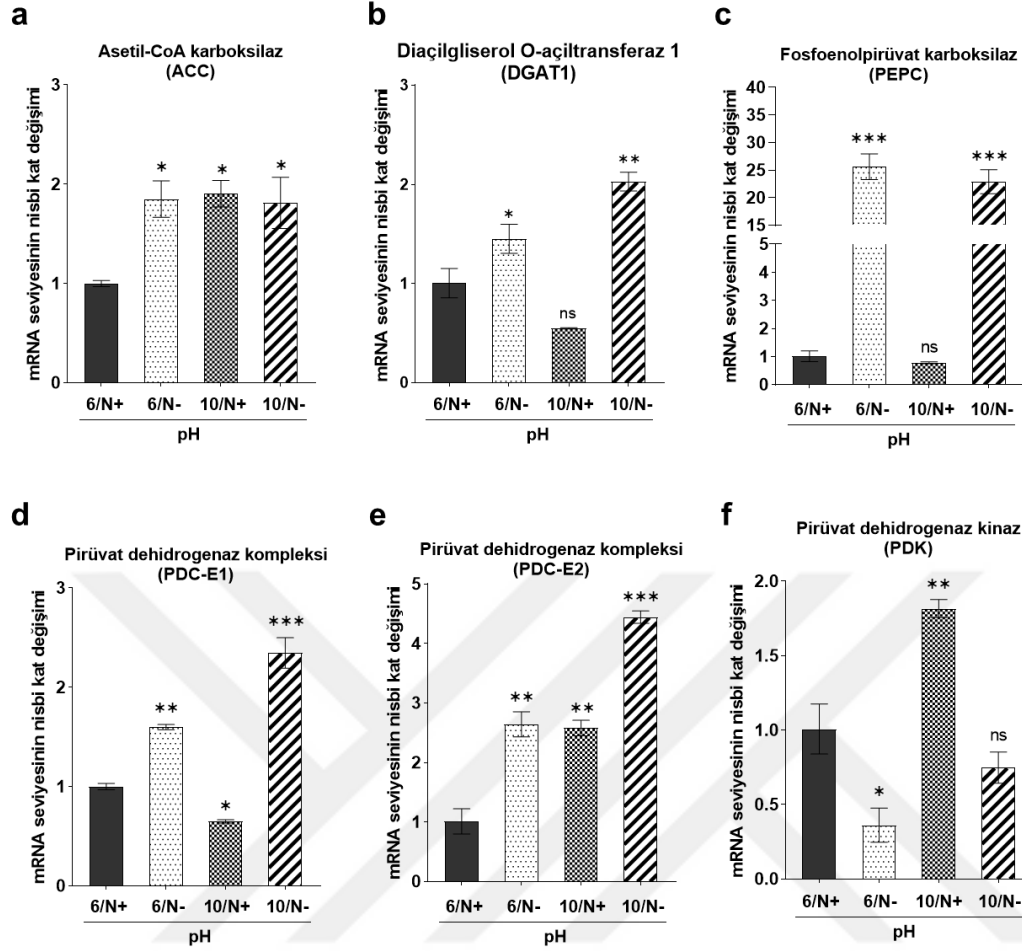
4.12. *A. protothecoides* KP7 Suşunda TAG Biyosentezi ile İlişkili Olabilecek Bazı Genlerin Alkali pH ve Azot Yokluğu Stresi Altındaki Ekspresyon Seviyeleri

Bu çalışma, hem N⁻ stresinde hem de alkali pH/azot yokluğu kombine stresinde yüksek TAG içeriğine sahip olan *A. protothecoides* KP7 suşunda toplam 10 genin mRNA ekspresyon seviyesindeki değişim ile TAG akümüülasyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılmıştır. Bu analizlerde, *A. protothecoides* KP7 suşunun, N⁻ stresi (pH 6 N⁻), sadece alkali pH stresi (pH 10 N⁺), N⁻/alkali pH kombine stresi (pH 10 N⁻) ve stres faktörü olmayan (pH 6 N⁺) koşullarda 7 gün kültüre alınmış hücreleri kullanılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; N⁻ stresi altında hem pH 6'da hem de pH 10'da ekspresyon seviyesinde en yüksek artış olan genin PEPC geni olduğu, bu genin mRNA ekspresyon seviyesinin pH 6 N⁻ koşulunda ortalama 25,63 kat, pH 10 N⁻ koşulunda ise ortalama 22,89 kat artış gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.10c). pH 10 N⁻ koşuluna göre, bu genin ekspresyon seviyesinin, pH 6 N⁻ koşulunda daha fazla indüklendiği göz önünde bulundurulduğunda; bu genin ekspresyon seviyesindeki artışın daha çok N⁻ stresinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.8. 10 genin pH6 N⁺, pH 6 N⁻, pH 10 N⁺ ve pH 10 N⁻ koşullarında saptanan bağlı ekspresyon seviyeleri

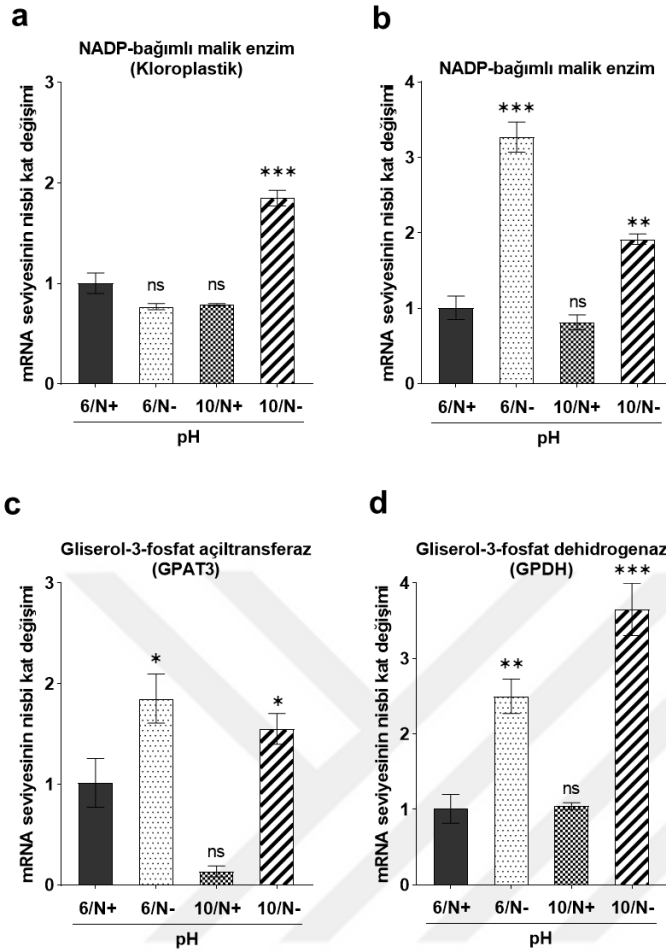
Hedef Gen	mRNA ekspresyonundaki kat değişimi			
	pH 6 N ⁺	pH 6 N ⁻	pH 10 N ⁺	pH 10 N ⁻
Asetil-CoA karboksilaz (ACC)	1,0 ± 0,03	1,85 ± 0,19*	1,90 ± 0,14*	1,81 ± 0,26*
NADP-bağımlı malik enzim (ME)	1,0 ± 0,15	3,20 ± 0,20***	0,80 ± 0,10 ^{ns}	1,92 ± 0,07**
Diaçilgliserol O-açıltransferaz 1 (DGAT1)	1,0 ± 0,15	1,45 ± 0,15*	0,60 ± 0,07*	2,21 ± 0,09**
Fosfoenolpiruvat karboksilaz (PEPC)	1,0 ± 0,19	25,63 ± 2,35***	0,80 ± 0,05 ^{ns}	22,89 ± 2,18***
NADP-bağımlı malik enzim (ME _{kloroplastik})	1,0 ± 0,10	0,77 ± 0,03 ^{ns}	0,79 ± 0,01 ^{ns}	1,85 ± 0,08***
Gliserol-3-fosfat açıltransferaz (GPAT3)	1,0 ± 0,24	1,85 ± 0,25*	0,14 ± 0,05 ^{ns}	1,55 ± 0,15*
Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz (GPDH)	1,0 ± 0,19	2,45 ± 0,23**	1,05 ± 0,047 ^{ns}	3,65 ± 0,35***
Pirüvat dehidrogenaz kompleksi (PDC-E2)	1,0 ± 0,21	2,64 ± 0,21**	2,60 ± 0,13**	4,44 ± 0,11***
Pirüvat dehidrogenaz kompleksi (PDC-E1)	1,0 ± 0,03	1,60 ± 0,26**	0,65 ± 0,27*	2,37 ± 0,15***
Pirüvat dehidrogenaz kinaz (PDK)	1,0 ± 0,16	0,36 ± 0,12*	1,82 ± 0,06**	0,75 ± 0,10 ^{ns}

*** P=0,0002, ** P=0,0021, * P=0,0332, ns: önemli ölçüde fark yok



Şekil 4.10. (a) Asetil-CoA karboksilaz (ACC), (b) Diaçilgliserol O-açiltransferaz 1 (DGAT1), (c) Fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPC), (d) Pirüvat dehidrogenaz kompleksi E1 alt ünitesi (PDC-E1), (e) Pirüvat dehidrogenaz kompleksi E2 alt ünitesi (PDC-E2) ve (f) Pirüvat dehidrogenaz kinaz (PDK) genlerinin bağlı mRNA seviyeleri

PEPC geninden sonra en yüksek kat artışı, pH 10 N⁻ koşulunda PDC-E2 (4,4 kat) ve GPDH (3,65 kat) genlerinde saptanmıştır (Şekil 4.10e; Çizelge 4.8). Öte yandan, sadece N⁻ stresinde de bu genlerin ekspresyon seviyelerinde de önemli ölçüde ($p < 0,05$) artış (2,64 kat ve 2,45 kat) olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, PDC-E2 ve GPDH genlerinin ekspresyon seviyesinde etkin faktörün N⁻ stresi olduğunu, alkali pH stresinin de bu etkiye katkı yaptığına işaret etmektedir. Bununla birlikte, özellikle PDC-E2 geninin, sadece alkali pH stresinde de ekspresyon seviyesinin artmasının (2,60 kat); bu genin ekspresyonunun ağırlıklı olarak pH stresinden etkilendiğini ve bu genin ekspresyonunda, alkali pH ve N⁻ kombine stresinin etkisinin daha fazla olabileceğini düşündürmüştür. PDC-E2 geni ile birlikte test edilen tüm koşullarda ekspresyon seviyesinde önemli ölçüde artış olan bir diğer gen de ACC genidir.



Şekil 4.11. (a) NADP-bağımlı malik enzim (kloroplastik), (b) NADP-bağımlı malik enzim, (c) Gliserol-3-fosfat açıltransferaz (GPAT3) ve (d) Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz (GPDH) genlerinin bağıl mRNA seviyeleri

Sonuç olarak; pH 6 N⁻ koşulunda; PEPC, PDC-E2, GPDH, DGAT1, ME, ACC ve GPAT3 olmak üzere toplam 7 genin, pH 10 N⁻ koşulunda ise bu 7 gen ile birlikte ME_{kloroplastik} geninin, mRNA ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre önemli ölçüde artış olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Elde edilen bu bulgular doğrultusunda; hem N⁻ stresinde hem de N⁻/alkali pH kombine stresinde ekspresyon seviyesinde artış olan; PEPC, PDC-E1, PDC-E2, ME, DGAT, ACC ve GPDH genlerinin, TAG biyosenteziyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

4.13. pH ve Azot Yokluğu Stresinin *A. protothecoides* KP7 Suşunun Yağ Asidi Profiline ve Biyodizel Kalitesine Etkisi

Alkali pH ve N⁻ stresinin, *A. protothecoides* KP7 suşunun yağ asidi profiline etkisi ve yağ asidi profilinden yola çıkarak tahmini olarak hesaplanan bazı biyodizel özelliklerine etkisi

araştırılmıştır. Mikroalg yağlarından kullanılabilir biyodizel elde etmek için, mikroalg yağlarının yağ asidi profilinin de uygun kompozisyona sahip olması gereklidir. Mikroalg yağının bileşiminde MUFAs (C18:1, C16:1) miktarının fazla, PUFAs (C18:2, C18:3) miktarının az olması, biyodizel üretimi için tercih edilen bir özelliktir.

Yapılan analizler sonucunda; pH 6 N+ kültüründe üç ana yağ asidinin; C18:3 (%44,9), C18:2 (%30,2) ve C16:0 (%10,8) olduğu ve pH 10 N- kültüründe bu yağ asitlerinin oranında önemli ölçüde farklılık olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). pH 6 N- ve pH 10 N- kültürlerinde en fazla bulunan yağ asidinin, oleik asit (C18:1) olduğu, bu yağ asidinin pH 6 N- kültüründeki yüzdesinin %54,7, pH 10 N- kültüründeki yüzdesinin %57,5 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. *A. protothecoides* KP7 suşunun yağ asidi profili

Yağ asitleri	pH 6		pH 10	
	N+	N-	N+	N-
C12:0	1,4 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,0
C14:0	1,1 ± 0,3	1,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1
C16:0	10,8 ± 0,7	12,7 ± 0,1	13,2 ± 0,1	12,5 ± 0,1
C16:1	6,5 ± 0,5	1,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1
C18:0	2,1 ± 0,8	1,5 ± 0,1	4,2 ± 0,3	1,5 ± 0,1
C18:1	2,8 ± 0,3	54,7 ± 0,1	33,9 ± 0,5	57,5 ± 0,1
C18:2	30,2 ± 0,5	20,8 ± 0,1	24,4 ± 0,2	19,5 ± 0,1
C18:3	44,9 ± 0,9	6,8 ± 0,1	18,9 ± 0,5	5,6 ± 0,1
C20:0	0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
C20:1	0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0
C22:0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
SFAs (%) ^a	15,4	16,3	19,1	16,3
MUFAs (%) ^b	9,3	55,9	37,4	58,4
PUFAs (%) ^c	75,1	27,6	43,3	25,1

a: doymuş yağ asitleri, b: tekli doymamış yağ asitleri, c: çoklu doymamış yağ asitleri

pH 10 N- koşullarında, C18:1 yağ asidi oranındaki önemli artışı, linoleik asit (C18:2) ve linolenik asit (C18:3) oranlarındaki eşzamanlı bir azalma takip etmiştir ($p < 0,05$). Bu azalma sonucunda, pH 10 N- kültüründe C18:2 ve C18:3 yağ asitlerinin yüzdeleri sırasıyla %19,5 ve %5,6 olmuştur. Bunun yanı sıra, N- stres koşullarına benzer şekilde pH 10 N+ koşullarında da C18:1 yüzdesinde artış, C18:2 ve C18:3 yağ asitleri oranlarında azalma olduğu saptanmıştır. En yüksek ve en düşük PUFA yüzdeleri sırasıyla pH 6 N+ (%75,1) ve pH 10 N- (%25,1) kültürlerinde saptanırken, MUFA'nın en yüksek ve en düşük oranları pH

10 N⁻ (%58,4) ve pH 6 N⁺ (%9,3) kültürlerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Tüm kültür koşulları arasında, pH 6 N⁻ ve pH 10 N⁻ kültürleri için tahmini olarak elde edilen; kinematik viskozite, yoğunluk, bulutlanma noktası, setan sayısı, iyot değeri, üst ısı değeri ve oksidasyon kararlılığı değerlerinin hem ABD (ASTM D6751) hem de Avrupa (EN 14214) standartlarında belirtilen referans değerleri karşıladığı saptanmıştır (Çizelge 4.10). Özellikle pH 10 N⁻ kültüründen elde edilen YAME, test edilen tüm koşullar arasında en düşük iyot değeri (97,64 g I₂/100 g), en yüksek oksidasyon kararlılığı (7,29 saat) ve en yüksek setan sayısı (55,26) ile arzu edilen biyodizel özelliklerini sergilemiştir.

Çizelge 4.10. *A. protothecoides* KP7 suşundan elde edilen yağ asidi metil esterlerinin tahmini biyodizel özellikleri

Biyodizel özellikleri	pH 6		pH 10		EN 14214	ASTM D6751
	N ⁺	N ⁻	N ⁺	N ⁻		
KV 40°C (mm ² /s)	3,92	4,46	4,30	4,49	3,5–5,0	1,9–6,0
SG (kg/L)	0,884	0,879	0,880	0,879	0,86–0,90	0,85–0,90
CP (°C)	-7,31	4,25	0,91	4,74	–	–
CN	49,25	55,01	53,35	55,26	En az 51	En çok 47
IV (g I ₂ /100 g)	164,73	100,40	118,99	97,64	En çok 120	–
HHV (MJ/kg)	42,13	40,61	41,05	40,54	–	–
OS (h)	4,16	6,86	5,31	7,29	En az 6	En az 3

KV: kinematik viskozite, SG: özgül ağırlık, CP: bulutlanma noktası, CN: setan sayısı, IV: iyot değeri, HHV: üst ısı değeri, OS: oksidasyon kararlılığı

4.14. pH ve Azot Yokluğu Stresinin *C. vulgaris* KP2 Suşunun Yağ Asidi Profiline ve Biyodizel Kalitesine Etkisi

pH ve N⁻ stresinin, *C. vulgaris* KP2 suşunun yağ asidi profiline etkisi ve yağ asidi profilinden yola çıkarak tahmini olarak hesaplanan bazı biyodizel özelliklerine etkisi araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda; hem N⁺ hem de N⁻ koşullarında her iki pH için de yağ asidi profillerinin oldukça benzer olduğu belirlenmiştir. N⁺ koşullarında hem pH 8 hem de pH 9 için majör yağ asitlerinin sırasıyla C16:0 (%21,86-%18,55), C18:2 (%27,62-%26,03) ve C18:3 (%40,50-%44,37) olduğu saptanmıştır, N⁻ koşullarında ise her iki pH için de C18:1 yağ asidi miktarında önemli ölçüde artış, C18:2 ve C18:3 yağ asidi miktarlarında ise önemli ölçüde düşüş olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.11. *C. vulgaris* KP2 suşunun yağ asidi profili

Yağ asitleri	pH 8		pH 9	
	N+	N-	N+	N-
C12:0	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,01	1,53 ± 0,2	0,26 ± 0,1
C14:0	0,18 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,24 ± 0,1	0,20 ± 0,1
C16:0	21,20 ± 0,5	21,80 ± 0,9	18,55 ± 0,8	19,87 ± 0,9
C16:1	2,10 ± 0,6	1,25 ± 0,1	1,83 ± 0,1	0,8 ± 0,1
C18:0	2,56 ± 0,2	3,89 ± 0,4	2,06 ± 0,5	2,9 ± 0,3
C18:1	4,80 ± 0,5	32,80 ± 0,5	4,89 ± 0,8	32,21 ± 0,1
C18:2	27,62 ± 0,9	16,13 ± 0,5	26,03 ± 0,3	14,35 ± 0,5
C18:3	40,50 ± 0,8	23,20 ± 0,9	44,37 ± 0,7	27,31 ± 0,6
C20:0	0,12 ± 0,02	0,17 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,11 ± 0,01
C20:1	0,0 ± 0,0	0,13 ± 0,02	0,0 ± 0,0	0,10 ± 0,01
C22:0	0 ± 0	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01
SFAs (%) ^a	24,21	26,21	22,67	24,23
MUFAs (%) ^b	6,90	34,18	6,72	33,11
PUFAs (%) ^c	68,12	39,33	70,40	41,66

a: doymuş yağ asitleri, b: tekli doymamış yağ asitleri, c: çoklu doymamış yağ asitleri

Buna göre, pH 8 N- ve pH 9 N- kültürlerinde C18:1 yağ asidi miktarlarının sırasıyla %32,80 ve %32,21, C18:3 yağ asidi miktarlarının %23,20 ve %27,31, C18:2 yağ asidi miktarlarının ise %16,13 ve %14,35 olduğu belirlenmiştir. En yüksek ve en düşük PUFA yüzdeleri sırasıyla pH 9 N+ (%70,40) ve pH 8 N- (%39,33) kültürlerinde saptanırken, MUFA'nın en yüksek ve en düşük oranları pH 8 N- (%34,18) ve pH 9 N+ (%6,72) kültürlerinde belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.12. *C. vulgaris* KP2 suşundan elde edilen yağ asidi metil esterlerinin tahmini biyodizel özellikleri

Biyodizel özellikleri	pH 8		pH 9		EN 14214	ASTM D6751
	N+	N-	N+	N-		
KV 40°C (mm ² /s)	4,05	4,35	4,00	4,30	3,5–5,0	1,9–6,0
SG (kg/L)	0,883	0,88	0,883	0,881	0,86–0,90	0,85–0,90
CP (°C)	-4,53	1,82	-5,63	0,80	–	–
CN	50,63	53,80	50,08	53,29	En az 51	En çok 47
IV (g I ₂ /100 g)	149,29	113,89	155,42	119,61	En çok 120	–
HHV (MJ/kg)	41,77	40,93	41,91	41,06	–	–
OS (h)	4,32	5,59	4,27	5,42	En az 6	En az 3

KV: kinematik viskozite, SG: özgül ağırlık, CP: bulutlanma noktası, CN: setan sayısı, IV: iyot değeri, HHV: üst ısı değeri, OS: oksidasyon kararlılığı

Tüm kültür koşulları arasından, pH 8 N- ve pH 9 N- kültürleri için tahmini olarak elde edilen; kinematik viskozite, yoğunluk, bulutlanma noktası, setan sayısı, iyot değeri, üst ısı

değer ve oksidasyon kararlılığı değerlerinin ASTM D6751 standartlarında belirtilen referans değerler aralığında olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.12). Özellikle pH 8 N- kültüründen elde edilen YAME'nin, test edilen tüm koşullar arasında en düşük iyot değeri (113,89 g I₂/100 g), en yüksek oksidasyon kararlılığı (5,59 saat) ve en yüksek setan sayısı (53,80) ile arzu edilen biyodizel özelliklerine sahip olduğu belirlenmiştir.





5. TARTIŞMA

Genellikle hızlı üreyen mikroalglerin düşük yağ içeriğine sahip olduğu, yüksek yağ içeriğine sahip olan mikroalglerin ise yavaş üreyen türler olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, mikroalg biyodizelinin pazarlanması için yüksek biyokütle ve lipid konsantrasyonlarına sahip olan doğru türlerin belirlenmesi önemlidir (Alalwan, Alminshid ve Aljaafar, 2019). Bunun yanı sıra, geniş ölçekte biyodizel üretimi için biyodizele %99 oranında dönüşebilen TAG lipidlerini, yüksek oranda içeren mikroalg suşlarının keşfedilmesi veya geliştirilmesi gereklidir. Bu bağlamda, TAG biyosentez yolağında rol alan anahtar genlerin saptanması ve bu genlerde yapılacak genetik modifikasyon çalışmaları ile TAG içeriği ve biyokütle konsantrasyonu yüksek olan mutant suşların elde edilmesi mümkün olabilecektir (Fukuda ve diğerleri, 2018).

Mikroalgler farklı stres koşulları altında yüksek miktarda lipid, özellikle de TAG biriktirmeleri nedeniyle biyodizel üretimi için umut vadeden alternatif kaynaklardan birisidir. Besiyeri bileşenlerinin (azot, fosfor, sülfür vb.) ve kültür koşullarının (ışık yoğunluğu, pH, sıcaklık vb.) manipülasyonu, mikroalglerde lipid ve TAG üretimini uyarmak için yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardan birisidir. N⁻ stresi, mikroalglerde TAG birikimini tetikleyen en etkili streslerden birisi olmasıyla birlikte, protein sentezi, klorofil sentezi ve fotosentetik performansı sınırlayarak mikroalglerde hücre büyümesini baskılayan bir stres faktörüdür (Zhao ve diğerleri, 2017). Bunun yanı sıra besiyeri pH'sı, kültür ortamında bulunan inorganik karbon türlerinin (CO₂/HCO₃⁻/CO₃²⁻) ve makro besinlerin (nitrat, fosfat) alımını etkilediği için alg büyümesini etkileyen önemli bir fizyolojik faktördür (Beardall ve Raven, 2016).

Son yıllarda literatürde ekstrem çevre koşullarından izole edilen mikroalg türlerinin yüksek yağ içeriğine sahip oldukları rapor edildiğinden (Thangavel ve diğerleri, 2018), bu tez çalışmasında yüksek sıcaklık (Ziga kaplıcaları atık suyu, 43°C), yüksek tuzluluk (Tuz Gölü) ve düşük pH (Koçpınar kaynak suyu, pH 5,5) özelliklerine sahip su kaynakları dahil olmak üzere toplam 10 farklı su kaynağından mikroalg izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, izole edilmiş olan mikroalgler arasından besiyerinde en iyi üreme gösteren 30 mikroalg izolatu kullanılmıştır. Bu bağlamda, 10 farklı su kaynağı arasından sadece Ziga kaplıcaları atık suyundan izole edilen mikroalgler çok yavaş üreme gösterdikleri için

çalışmaya dahil edilmemiştir. 30 mikroalg izolatu arasında N⁻ stres koşullarında yapılan seleksiyon çalışması sonucunda TAG içeriği ve lipit verimi en yüksek olan 9 mikroalg izolatu seçilmiş ve bu izolatlara ITS1-5.8S-ITS2 sekans bölgesine göre tanımlanmıştır. ITS1-5.8S-ITS2 sekans bölgesi, mikroalg türlerinin DNA barkodlaması için yaygın olarak kullanılan bir lokustur (Hadi ve diğerleri, 2016). Bu çalışmada, 9 mikroalg izolatından 7'si, ITS1-5.8S-ITS2 sekansına göre başarılı bir şekilde tanımlanırken, *Scenedesmus* cinsi olarak tanımlanmış olan EA7 ve S1 kodlu izolatlara tam olarak tanımlanabilmesi için daha fazla veriye ihtiyaç olduğu görülmüştür. *Scenedesmus* cinslerinin tanımlanmasında *rbcL*, *tufA*, *16S* ve ITS gibi birden fazla gen lokusunun sekanslanmasının, tanımlamada daha etkili bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (Zou ve diğerleri, 2016). Bu bağlamda; EA7 ve S1 kodlu izolatlara tam olarak tanımlanabilmesi için ITS ile birlikte *rbcL* ve *tufA* gibi farklı gen lokuslarının da sekanslanmasının gerekli olduğu öngörülmektedir.

30 mikroalg izolatu arasından, TAG miktarına ve lipit verimine göre seçilen 9 izolatu hepsi tatlı su kaynaklarından izole edilmiş olup, Tuz Gölünden izole edilen 5 izolatu TAG içeriklerinin en düşük seviye olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 9 mikroalg suşu arasından TAG içeriği en yüksek olan 2 suş (*C. vulgaris* KP2 ve *A. protothecoides* KP7), Koçpınar kaynak suyundan izole edilmiştir. Bu bulguyu destekler şekilde, Breuer ve diğerleri (2012) yaptıkları çalışmada, kullandıkları suşlar arasında N⁻ stresi altında bazı tuzlu su mikroalglerinin (*Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis aff. galbana*), tatlı su mikroalglerine (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella zofingiensis*) göre çok daha düşük TAG içeriğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

30 mikroalg izolatu arasından seçilen 9 mikroalg izolatından; *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Acutodesmus* ve *Chlorella* cinslerinin Türkiye'deki farklı çevresel su kaynaklarından izole edildiği birçok çalışma rapor edilmiştir (Maraşlıoğlu, Soylu ve Gönülol, 2011; Onay, Sonmez, Oktem ve Yucel, 2014; Akgül, Kizilkaya, Akgül ve Erduğan, 2017). Öte yandan, Türkiye'deki su kaynaklarından *Mychonastes* cinsinin izole edildiğinin bildirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte, bu çalışmada TAG içeriği en yüksek tür olan *A. protothecoides* türünün, Türkiye'deki herhangi bir çevresel ortamdan izole edildiğine dair bir rapora rastlanılmamıştır. Bu bakımdan, bu tez çalışması, *A. protothecoides* ve *Mychonastes* türlerinin Türkiye'deki bir su kaynağından izole edildiğinin bildirildiği ilk çalışmadır.

Tez çalışmasında, en yüksek TAG içeriğine sahip olan *C. vulgaris* KP2 ve *A. protothecoides* KP7 suşlarının, N⁻ altında *C. reinhardtii* cw15 mutant suşundan daha yüksek TAG içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. *C. reinhardtii* cw15 suşunun yüksek TAG içeriğine sahip olduğu bildirilmiş olan önceki çalışmalarda (Wang ve diğerleri, 2009; Siaut ve diğerleri 2011), bu suşun TAG miktarı N⁻ stresi altında sırasıyla ve 10 µg/10⁶ hücre ve 40 µg/10⁶ hücre olarak ölçülmüştür. Bu tez çalışmasında ise *C. reinhardtii* cw15 suşunun TAG içeriğinin belirlenmesinde RFU değeri ve HPTLC’de elde edilen TAG bant kalınlıkları referans alındığından, bu suş için TAG miktarlarının önceki raporlarla karşılaştırılması mümkün olmamıştır.

Öte yandan, seçilen 9 izolatın hepsinde N⁻ stresine bağlı olarak lipit veriminde artış olurken, *C. reinhardtii* cw15 suşusun lipit veriminde N⁻ stresi altında düşüş olduğu görülmüştür. *C. reinhardtii* cw15 suşu N⁺ koşullarında biyokütle konsantrasyonu en yüksek olan suş (82 mg/L/d) iken, N⁻ stresi altında biyokütle konsantrasyonunda yaklaşık 3,72 katlık bir azalma olduğu saptanmıştır. N⁻ stresine bağlı olarak, üremenin çok yavaşlamasından ve % lipit miktarındaki artışın az olmasından dolayı, *C. reinhardtii* cw15 suşunun lipit veriminde azalma olduğu düşünülmektedir. Ancak, literatürde *C. reinhardtii* cw15 suşunun N⁺ ve N⁻ koşullarında lipit veriminin saptandığı bir çalışmaya rastlanmadığından, bu durumla ilgili daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

N⁻ stres denemesi sonucunda seçilmiş olan *C. vulgaris* KP2 ve *A. protothecoides* KP7 suşlarında TAG içeriği ve biyokütle konsantrasyonu bakımından optimal pH’nın belirlenmesi için yapılan çalışma sonucunda; *C. vulgaris* KP2 suşunda en yüksek biyokütle konsantrasyonu N⁺ koşulları altında pH 9’da saptanmıştır. Benzer rapor, Gong, Feng, Kang, Luo ve Yang (2014) tarafından rapor edilmiş olup *C. vulgaris*’in pH kontrollü ve pH kontrolsüz kültürlerinde, en fazla hücre yoğunluğunun pH 9 ve pH 10’da olduğu bildirilmiştir. Öte yandan, bu tez çalışmasında içerisinde azot kaynağı bulunan karbonat-bikarbonat tamponlu besiyerlerinde (pH 10 N⁺ ve pH 11 N⁺), *C. vulgaris* KP2 suşunun üremesinin yavaşladığı gözlenmiştir. Bu bulgunun aksine, kültür ortamına bikarbonat ilavesinin *C. vulgaris*’de biyokütle konsantrasyonunu arttırdığına dair bazı raporlar literatürde mevcuttur. Lohman ve diğerleri (2015), *C. vulgaris* türü ile yaptıkları çalışmada, besiyerinde farklı karbonat ve bikarbonat konsantrasyonları kullandıklarını ve tüm koşullar arasında en yüksek biyokütle konsantrasyonunu (600 mg/L), içerisinde 50 mM bikarbonat bulunan besiyerinde (pH 9,82) elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu rapordan yola çıkarak; bu

çalışmada *C. vulgaris* KP2 suşunun karbonat-bikarbonat tamponlu besiyerinde biyokütle konsantrasyonunda düşüş olması, BG11 besiyerinde bulunan sodyum bikarbonat konsantrasyonunun (12,5 mM) yeterli seviyede olmamasıyla açıklanabilir.

Optimal pH çalışmasının ardından, *A. protothecoides* KP7 suşu için en yüksek biyokütle konsantrasyonu ve TAG içeriği, karbonat-bikarbonat tamponu ile oluşturulmuş alkali pH (pH 10) ve N⁻ stres kombinasyonu koşulları altında (pH 10 N⁻) elde edilmiştir. Benzer şekilde yakın tarihli bir raporda, N⁻ koşulları altında besiyerine sodyum bikarbonat (100 mM) ilavesinin, *Dunaliella salina*'nın biyokütle ve lipit seviyelerinde kontrol kültürlerine kıyasla önemli ölçüde ($p < 0,05$) artışa neden olduğu bildirilmiştir (Srinivasan ve diğerleri, 2018). Ayrıca N⁻ stresi altında TAG birikimindeki artışın, birçok mikroalg suşunda biyokütle konsantrasyonunu da arttırdığı rapor edilmiştir (Breuer ve diğerleri, 2012).

Öte yandan, *A. protothecoides* KP7 suşunun pH 10 N⁻ koşullarında üreyebildiği, pH 10 N⁺ koşullarında üreyemediği gözlenmiştir. Bu fenomenle ilgili olarak; N⁻ stresinin tetiklediği çeşitli hücresel yanıtların, *A. protothecoides* KP7 suşunun yüksek alkali pH'ya toleransına katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir. N⁻ stresinin plazma membranından hücrelere önemli miktarda Ca²⁺ akışını indüklediği ve sitozolik Ca²⁺ seviyesindeki artışın bir Ca²⁺ sinyali olarak hizmet ettiği bildirilmiştir (Chen, Zhang, He ve Wang, 2014). Bununla birlikte *Saccharomyces cerevisiae* türünde yüksek pH stresi altında sitozolik kalsiyum miktarındaki artışın, kalsinörin yolağını aktive ettiği ve bu yolağın aktive olmasının alkali pH adaptasyonunu sağladığı rapor edilmiştir (Viladevall ve diğerleri, 2004). Bu raporlara dayanarak, *A. protothecoides*'de alkali pH adaptasyonunda yer alan kalsiyum aracılı sinyal yolaklarının N⁻ ile tetiklenmiş olabileceği söylenebilir. Ancak, *A. protothecoides*'in yüksek pH'ya adaptasyonunda, karbonat-bikarbonat tamponu içeren ve azot kaynağı bulunmayan kültür ortamının rolünü anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Birçok mikroalg türünde, azot yokluğunun protein içeriğinde azalmaya yol açtığını bildirilmiştir (Michelon ve diğerleri, 2016; Gao ve diğerleri, 2019). Mikroalgler, N⁻ stresinde bölünmelerini sürdürmek için hücre içi azotlu bileşikler (amino asitler, proteinler, klorofil) geri dönüştürürler (Arora, Pienkos, Pruthi, Poluri ve Guarnieri, 2018). Bu çalışmada, *A. protothecoides* KP7'nin pH 10 N⁻ kültürünün 7. gündeki protein içeriği, pH 6 N⁺ kültürünün protein içeriğinden önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha düşük bulunmuştur. Benzer şekilde *C. vulgaris* KP2'nin pH 9 N⁻ kültüründeki protein içeriği, 7. günde pH 9 N⁺

kültürünün protein içeriğinden önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha düşük bulunmuştur. Her iki suş için de en yüksek TAG içeriğine sahip kültürlerin en düşük protein içeriğine sahip olmasının, N- stresi altında metabolik karbon akışının proteinden TAG sentezine doğru yönlendirilmiş olabileceğine işaret etmektedir.

Olumsuz kültür koşulları altında TAG akümülyasyonunun yanı sıra, birçok mikroalg türü hücre içinde yüksek miktarda nişasta da biriktirebilir (Siaut ve diğerleri, 2011). Hatta nişastanın bazı mikroalg türlerinde azot yoksunluğu sırasında yüksek miktarlarda biriken ilk makromolekül olduğu bildirilmiştir (Klein, 1987). Bu raporları destekler şekilde, pH 10 N- koşulları altında 7. günün sonunda *A. protothecoides* KP7'nin nişasta içeriği (20.4%), TAG içeriğinden (%16,4) daha yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde *C. vulgaris* KP2 suşunda da 7. günün sonunda pH 9 N- kültürünün nişasta içeriği (%11,8), TAG içeriğinden (%8,5) daha yüksek bulunmuştur.

Klorofil içeriği, fotosentetik etkinlik ve nitrojen eksikliğinin fizyolojik bir göstergesidir (Ding ve diğerleri, 2005). N- stresi altında, mikroalglerde klorofil sentezi ve fotosentez performansının düştüğü bildirilmiştir (Zhao ve diğerleri, 2017). N- stresinde, klorofilin karbon dönüşümü için parçalandığı ve geri dönüştürülmüş fazla karbonun, TAG gibi depolama bileşiklerinin sentezi için substrat ve enerji kaynağı sağladığı bildirilmiştir (Msanne ve diğerleri, 2012). Bu raporları destekler şekilde, *A. protothecoides* KP7 suşu için en yüksek TAG içeriğine sahip olan pH 10 N- kültüründeki klorofil miktarının ($3,6 \text{ mg g}^{-1}$), pH 6 N+ ($13,45 \text{ mg g}^{-1}$) ve pH 10 N+ ($22,1 \text{ mg g}^{-1}$) kültürlerinin klorofil miktarlarından önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha düşük olduğu saptanmıştır. *C. vulgaris* KP2 suşu için de benzer sonuçlar alınmış ve en yüksek TAG içeriğine sahip olan pH 9 N- kültürünün klorofil miktarının ($35,1 \text{ mg g}^{-1}$), pH 8 N+ ve pH 9 N+ kültürlerinin klorofil miktarlarından ($48,8 \text{ mg g}^{-1}$, $51,6 \text{ mg g}^{-1}$) önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

A. protothecoides KP7 suşunda, en yüksek TAG içeriği pH 10 N- kültüründe saptanmış ve pH 10 N- kültürünün TAG içeriği, pH 6 N- kültüründen önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada; *A. protothecoides* türünün TAG akümülyasyonuna, alkali pH ve azot yokluğu kombine stresinin etkisi ilk kez araştırılmıştır. Öte yandan diğer mikroalg türlerinde de bununla ilgili bazı çalışmalar mevcuttur. Bulgularımızı destekler şekilde, Gardner ve diğerleri (2011) tarafından yapılan çalışmada; *Scenedesmus* sp. WC-1 ve *Coelastrella* sp. PC-3 türlerinde TAG içeriğinin artırılmasında yüksek alkali pH ($\text{pH} >$

10) ve azot azlığı stres kombinasyonunun, sadece alkali pH'dan veya sadece azot azlığı stresinden daha etkili bir yöntem olduğu rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada, Xia ve diğerleri (2015), *Desmodesmus* sp. NMX451 türünün bikarbonat aracılı yüksek alkali pH (pH > 10) ve N- kombine stresindeki TAG içeriğinin, sadece N- stresinden daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.

A. protothecoides KP7 suşunun pH 10 N- koşullarında TAG içeriği (%16,4) ve TAG/toplam lipit oranı (%62,0) bazı raporlardan daha yüksek olsa da toplam lipit miktarının (%26,5) literatürde *A. protothecoides* türü için rapor edilmiş olan lipit miktarlarına göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bu çalışmalardan birisinde, *A. protothecoides*'in N- koşullarında ve heterotrofik kültüründe, %55,2'ye kadar lipit içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir (Xu, Miao ve Wu, 2006). Başka bir çalışmada, *A. protothecoides*'in heterotrofik kültüründe; en yüksek lipit içeriğinin %31, en yüksek TAG içeriğinin %12 ve TAG/TL oranının %40 olduğu bildirilmiştir (Rosenberg ve diğerleri (2014). Bir diğer çalışmada ise *A. protothecoides*'in fototrofik kültüründe ve N- stresinde lipit miktarının %55, TAG miktarının %39, TAG/TL oranının ise %71 olduğu rapor edilmiştir (Sun, Zhou, Gerken, Chen ve Liu, 2015).

C. vulgaris KP2 suşunun, pH 9 N- koşullarında elde edilen toplam lipit içeriği (%27,6), bazı önceki raporlar ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Dos Santos, Kunigami, Aranda ve Teixeira (2016), *C. vulgaris* türü için N- stresinde en yüksek lipit içeriğinin %25,4 olduğunu bildirmişlerdir. Lv ve diğerleri (2010) ise azot sınırlaması koşullarında *C. vulgaris* türünün %20 lipit içeriğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Yakın zamanda yapılan bir araştırmada, N- altında ve ototrofik koşullarda *Chlorella vulgaris*'in %19,4 lipit içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir (Shen ve diğerleri, 2019). Öte yandan bulgularımızdan çok daha yüksek lipit ve TAG içeriğine sahip *C. vulgaris* türleri de rapor edilmiştir. Belotti, Bravi, de Caprariis, de Filippis ve Scarsella (2013), *C. vulgaris*'in ototrofik ve azot azlığı kısıtlaması altında %43 lipit içeriğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise N- stresinde *C. vulgaris* türünün TAG içeriğinin kuru hücre ağırlığının %40'ından fazla olduğunu bildirmişlerdir (Breuer ve diğerleri, 2012).

Mikroalg türlerinin biyodizel üretim kapasitesini tahmin etmek için önemli parametrelerden birisi de lipit verimliliğidir. *A. protothecoides* KP7 suşu için test edilen tüm koşullar arasında en yüksek lipit verimi (17,1 mg/L/gün), pH 10 N- kültüründe gözlenmiştir. *A. protothecoides* türü ile yapılan bazı çalışmaların bulgularıyla karşılaştırıldığında (Chen ve

Walker, 2011; Feng, Walker, Bridges, Thornton ve Gopalakrishnan, 2014; Patel, Matsakas, Rova ve Christakopoulos, 2018), bu tez çalışmasında elde edilen lipid verimi değerlerinin, bildirilenlerden (2.400 mg/L/gün, 950 mg/L/gün, 1.130 mg/L/gün) oldukça düşük olduğu gözlenmiştir (Çizelge 5.1). Yüksek lipid verimi elde edilen bu çalışmalarda; *A. protothecoides* çeşitli karbon kaynakları (Glikoz, ham gliserol, bira fermantasyon atığı, odun biyokütlesinden elde edilen hidrolizatlar gibi) ve azot kaynağı olarak maya özütü kullanılarak heterotrofik koşullar altında kültürlenmiştir. *A. protothecoides*'in ototrofik kültürünün nadir bir çalışması, N⁻ stresi altında lipid veriminin 274,15 mg/L/gün olduğunu rapor etmiştir (Binnal ve Babu, 2017).

Çizelge 5.1. *A. protothecoides* ve *C. vulgaris* türleri için azot yokluğu/azlığı koşullarında önceki çalışmalarda bildirilen lipid içerikleri ve lipid verimleri

Mikroalgler	Azot Stresi	Kültür koşulu	Lipit verimi (mg/L/gün)	Lipit içeriği (%)	Referans
<i>C. vulgaris</i> KP2	N ⁻ /pH 9	Ototrofik	2,0	27,6	Bu çalışma
<i>A. protothecoides</i> KP7	N ⁻ /pH 10	Miksotrofik	17,1	26,5	Bu çalışma
<i>C. vulgaris</i> UTEX 395	N ⁻	Fototrofik	3,0	–	Griffiths, Van Hille ve Harrison (2014b)
<i>C. vulgaris</i> UTEX 395	NA	Ototrofik	41,0	54,0	Mujtaba ve diğerleri (2012)
<i>C. vulgaris</i> NIES-227	N ⁻	Ototrofik	14,9	19,4	Shen ve diğerleri (2019)
<i>C. vulgaris</i> NIES-227	N ⁻	Miksotrofik	130,1	62,6	Shen ve diğerleri (2019)
<i>C. vulgaris</i>	NA	Ototrofik	40,0	20,0	Lv ve diğerleri (2010)
<i>C. vulgaris</i> AG10032	NA	Ototrofik	77,8	43,0	Belotti ve diğerleri (2013)
<i>C. vulgaris</i>	N ⁻	Ototrofik	19,0	–	Griffiths, Van Hille ve Harrison (2014a)
<i>C. vulgaris</i> CCAP 211/11B	N ⁻	Ototrofik	20,9	17,6	Wong ve diğerleri (2017)
<i>A. protothecoides</i> SAG 211-7a	NA	Heterotrofik	1.130	64,5	Patel ve diğerleri (2018)
<i>A. protothecoides</i> UTEX 256	NA	Heterotrofik	2.400	61,5	Chen ve Walker (2011)
<i>A. protothecoides</i> UTEX 256	NA	Heterotrofik	950,0	52,5	Feng ve diğerleri (2014)
<i>A. protothecoides</i> SAG 211-10C	N ⁻	Ototrofik	274,2	73,5	Binnal ve Babu (2017)

–: rapor edilmemiş, N⁻: azot yokluğu, NA: azot azlığı

C. vulgaris KP2 suşu için pH 9 N⁻ koşullarında elde edilen lipid verimi (2,00 mg/L/gün) değeri, Çizelge 5.1’de rapor edilen bazı bulgulardan yüksek olsa da bu suşun biyodizel üretimi için oldukça düşük lipid verimine sahip olduğu görülmektedir. Besiyerinde bulunan karbon kaynaklarının ve karbon/azot oranının, mikroalglerin biyokütle verimi ve lipid verimi üzerinde önemli bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Silaban, Bai, Gutierrez-Wing, Negulescu ve Rusch, 2014; Patel ve diğerleri, 2018). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, *Chlorella* sp. HS2 suşunun kültüründe, besiyerinde optimal konsantrasyonlarda glikoz, sodyum nitrat ve dipotasyum fosfat kullanıldığında, 5370 mg/L/gün biyokütle verimi elde edildiği rapor

edilmiştir (Kim ve diğerleri, 2019). Ayrıca, Shen ve diğerleri (2019), *C. vulgaris* NIES-227 suşu için BG11 besiyerinde ototrofik koşullarda 14,9 mg/L/gün lipit verimi elde ettiklerini, mikсотrofik koşullarda ve N⁻ stresi altında ise 130,1 mg/L/gün lipit verimi elde ettiklerini bildirmişlerdir.

A. protothecoides ve *C. vulgaris* türlerinin heterotrofik ve mikсотrofik koşullarda iyi üredikleri göz önünde bulundurulduğunda; çalışmada kullanılan *A. protothecoides* KP7 ve *C. vulgaris* KP2 suşları için besiyerinde farklı karbon kaynaklarının kullanımı ve karbon/azot oranının optimize edilmesi gibi yaklaşımların, her iki suşun da lipit verimine katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.

Mikroalglerde biyokütle ve lipit akümülayonunu arttırmak için moleküler yaklaşımların kullanılması, 4. nesil biyodizel üretimi için önemli bir basamaktır. TAG biyosenteziyle ilişkili anahtar genlerin belirlenmesi, TAG biyosentezini arttırmak için yapılacak olan genetik modifikasyonlara zemin hazırlayacaktır. Bu bağlamda, çalışmada en yüksek TAG içeriğine sahip olan *A. protothecoides* KP7 suşunda bazı genlerin TAG senteziyle ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmada, hem pH 6 N⁻ hem de pH 10 N⁻ koşulları altında en yüksek ekspresyon seviyesi, PEPC geninde saptanmıştır. Elde edilen bulgular, bu genin N⁻ stresinde indüklendiğini ve TAG senteziyle ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu bulguyu destekler şekilde, PEPC geninin N⁻ stresinde ekspresyon düzeyinde artış olduğu bazı çalışmalarda bildirilmiştir. Mamedov, Moellering ve Chollet (2005), *Chlamydomonas reinhardtii*'de bulunan iki PEPC geninin (*Ppc1* ve *Ppc2*), mRNA ekspresyon seviyelerinin azot azlığı koşullarında en yüksek düzeyde olduğunu Northern blot tekniği ile göstermişlerdir. Moellering ve diğerleri (2007), *Chlamydomonas reinhardtii*'de iki PEPC izoformunun protein seviyelerinin azot azlığında en yüksek düzeyde olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmalarda PEPC enziminin N⁻ stresinde indüklendiği rapor edilmekle birlikte bu enzimin TAG senteziyle ilişkisi olduğu bildirilmemiştir. Bu çalışmaların yanı sıra, PEPC enzimini kodlayan genler ile lipit sentezi arasında ters ilişki olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur. Deng, Li ve Fei (2011), *Chlamydomonas reinhardtii*'de azot azlığında *Pepc2* geninin mRNA seviyesinde %63–%91 arasında düşüş olduğunu ve bu genin RNAi tekniği ile susturulduğunda, mikroalgin lipit içeriğinde %14–28 artış olduğunu bildirmişlerdir. Wang ve diğerleri (2017), *Chlamydomonas reinhardtii*'de iki PEPC genini yapay miRNA'lar ile inhibe ettiklerini ve bunun sonucunda toplam yağ asidinde %28,7–48,6 arasında artış olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise *Chlamydomonas*

reinhardtii'de *Pepc1* geni CRISPR tekniği kullanılarak inhibe edilmiş ve lipit içeriğinde %74,4 artış sağlandığı rapor edilmiştir (Kao ve Ng, 2017).

Bu çalışmada, N⁻ stresi altında PEPC geninin mRNA ekspresyon seviyesindeki aşırı artış ile TAG sentezi arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığının kesin olarak belirlenebilmesi için; bu genin protein düzeyinde ekspresyon seviyesinin ve enzim aktivitesinin saptanması veya bu genin susturularak TAG seviyesindeki değişimlerin ortaya konması gibi devam çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

PEPC geninden sonra, ekspresyon seviyesinde en fazla artış olan PDC-E2 geninin, test edilen tüm koşullarda (pH 6 N⁻, pH 10 N⁺, pH 10 N⁻) ekspresyon seviyesinde artış olması ve en yüksek artışın pH 10 N⁻ koşullarında olması, bu genin TAG biyosenteziyle ilişkili olabileceği ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Bununla birlikte, N⁻ stresi bu genin ekspresyon seviyesini arttırsa da bu artışın, alkali pH ve N⁻ stres kombinasyonu ile daha fazla olması ve sadece alkali pH stresinde bile bu genin ekspresyon seviyesinde artış olması, bu genin ekspresyonunda alkali pH stresinin önemli bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir. Öte yandan, literatürde PDC-E2 ünitesinin N⁻ stresinde mRNA düzeyinin saptandığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Önceki çalışmalarda, PDC-E1 ünitesi, yapay miRNA ile bloke edilmiş *Chlamydomonas reinhardtii* hücrelerinde, toplam lipit miktarının %25–40 arasında düştüğü rapor edilmiştir (Shtaida ve diğerleri, 2014). Başka bir çalışmada ise *Neochloris oleoabundans*'da PDC kompleksi ile ilişkili genlerin, azot azlığında yüksek düzeyde ifade edildiği rapor edilmiştir (Rismani-Yazdi ve diğerleri, 2012). Bu raporlarla birlikte bu çalışmadan elde edilen bulgular, PDC kompleksinin TAG sentezinde önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir.

Çalışmada ekspresyon seviyesinde önemli ölçüde artış olan bir diğer gen de GPDH genidir. Bu genin pH 10 N⁻ koşullarında ekspresyon seviyesinin dikkate değer şekilde artması, TAG senteziyle yüksek oranda ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir. Bu düşüncüyü destekler şekilde, Yao ve diğerleri (2014) tarafından yapılan çalışmada, GPDH geninin aşırı ekspresyonunda, *P. tricornutum* mikroalg türünün nötral lipit içeriğinde 1,9 katlık artış olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Gao ve diğerleri (2014) tarafından yapılan çalışmada, *A. protothecoides*'in TAG metabolizmasında GPDH ve ACC enzimlerinin anahtar enzimlerden olduğunu ve bu enzimlerin hem mRNA hem de protein düzeylerinde artış olduğunu rapor etmişlerdir.

Alglerde lipit metabolizmasıyla ilgili gen aileleri genellikle yüksek bitkilerden daha az olmasına rağmen, *Chlamydomonas reinhardtii* türünde sadece DGAT enzimini kodlayan 6 genin olduğunu (1 tane DGAT1 geni, 5 tane DGAT2 geni) ve her genin ekspresyon seviyesinin N⁻ stresinde farklı olduğu rapor edilmiştir (Msanne ve diğerleri, 2012). Bu çalışmada, DGAT1 geninin pH 6 N⁻ ve pH 10 N⁻ koşullarında ekspresyon seviyesinde önemli ölçüde ($p < 0,05$) artış olduğu saptanmıştır. Yapılan iki bağımsız çalışmada, hem tip-1 hem de tip-2 DGAT genlerinin (DGAT1 ve DGAT2) azot yokluğunda indüklendiği bildirilmiştir (Miller ve diğerleri, 2010; Boyle ve diğerleri, 2012).

N⁻ koşullarında ekspresyon seviyesinde yüksek artış olan bir diğer gen ise ME'dir. Kloroplastik ME, sadece pH 10 N⁻ koşulunda artış gösterirken, stoplazmik ME hem pH 6 N⁻ hem de pH 10 N⁻ koşullarında artış göstermiştir. Bu bulgu hem kloroplastik hem de stoplazmik ME genlerinin TAG sentezi ile yüksek oranda ilişkili olabileceğine işaret etmektedir. Son yıllarda yapılan gen ekspresyon ve genetik modifikasyon çalışmaları bu bulguyu desteklemektedir. Fan ve diğerleri (2014)'nin *Chlorella pyrenoidosa*'da yaptıkları iki farklı çalışmada; N⁻ stresinde ME genlerinin (*me g6562* ve *me g3137*) *de novo* TAG biyosentez yoluyla yüksek oranda ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada genetik mühendisliği ile *Chlorella pyrenoidosa*'da ME'den sorumlu genin ekspresyon seviyesi ve enzim aktivitesi arttırılmış ve optimal koşullarda toplam lipit miktarının %40,9'a (kuru hücre ağırlığının) çıktığı, nötral lipit miktarının da 3,2 kat arttığı, azot yokluğu koşullarında ise bu oranın %58,7'ye ve 4,6 kat'a çıktığı rapor edilmiştir (Xue ve diğerleri, 2016).

Hem pH 6 N⁻ hem de pH 10 N⁻ koşullarında, ekspresyon seviyesinde önemli ölçüde ($p < 0,05$) artış olan genlerden birisi de GPAT genidir. Tez bulgularını destekler şekilde, GPAT geninin TAG senteziyle ilişkili olduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Boyle ve diğerleri (2012) ile Hsieh ve diğerleri (2012) yaptıkları çalışmalarda GPAT geninin aşırı ekspresyonunda, TAG içeriğinde sırasıyla 1,5 kat ve %30–40'lık bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

Özet olarak, *A. protothecoides* KP7 suşu için en yüksek TAG içeriğinin belirlendiği koşul olan pH 10 N⁻ koşulunda, ekspresyon seviyesinde önemli ölçüde artış olduğu belirlenmiş olan; PEPC, PDC kompleksi, GPAT, GPDH ve ME genlerinin TAG biyosentezinde anahtar genler olabileceği ihtimali üzerinde durulmakla birlikte, bu ihtimalin güçlendirilmesi için protein düzeyinde devam çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Mikroalg yağlarından yüksek kalitede biyodizel elde etmek için mikroalg yağların yağ asidi profilinin belirli bir kompozisyona sahip olması gereklidir. Tekli doymamış yağ asitleri (MUFA)'ndan özellikle oleik asit (18:1) açısından zengin olan mikroalg lipidler, biyodizelin soğuk akış özelliğini ve oksidasyon kararlılığını arttırdığı için, biyodizel üretimi için uygun yağ asitleri olarak kabul edilmektedir (Knothe, 2009). Buna karşılık çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) seviyesi yüksek olan biyodizel, oksidasyona çok duyarlıdır (Falk ve Meyer-Pittroff, 2004). *A. protothecoides* KP7'nin pH 6 N⁺ kültürünün C18:1 (%2,8), C18:2 (%30,2) ve C18:3 (%44,9) yağ asitleri oranlarıyla kıyaslandığında; pH 10 N⁻ kültüründe C18:1 oranında (%57,5) aşırı bir artış olurken, C18:2 (%19,5) ve C18:3 (%5,6) yağ asitlerinin oranında ise azalma olmuştur. Benzer şekilde, Xu ve diğerleri (2006) N⁻ altında heterotrofik olarak kültürlen *A. protothecoides* türünde majör yağ asidinin C18:1 (%60,84) olduğunu rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada, N⁻ stres koşullarında kültüre alınan *A. protothecoides* CS-41 suşunun yağ asidi metil ester (YAME)'inde; C18:1 oranının %51,3 olduğu, C18:2 ve C18:3 yağ asitlerinin oranının ise sırasıyla %10,2 ve %8,1 olduğu bildirilmiştir (Sun ve diğerleri, 2015).

A. protothecoides KP7 suşunun yağ asit profilinde meydana gelen değişime benzer şekilde, *C. vulgaris* KP2 suşunda da N⁻ stresinde C18:1 seviyesinde artış olurken, C18:2 ve C18:3 yağ asitlerinin seviyesinde azalma olmuştur. *C. vulgaris* KP2'nin yağ asidi profili, daha önce literatürde *C. vulgaris* türü için N⁻ stresi altında bildirilmiş olan ve baskın yağ asitlerinin C18: 1 (%42,77), C16:0 (%19,70), C18:3 (%16,24) ve C18:2 (%9,54) olduğu bir raporla tutarlılık göstermiştir (Adamakis ve diğerleri, 2018). Ayrıca, her iki suş için de alkali pH ve N⁻ stres kombinasyonunun hem PUFA'yı düşürmede hem de MUFA seviyelerini artırmada güçlü bir etkisi olduğu saptanmıştır. N⁻ stresi altında PUFA içeriğinin azalması, oksidatif hasarın veya membran lipidlerinin, TAG'ye dönüştürülmesinin bir sonucu olabileceği bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2012; Chokshi, Pancha, Ghosh ve Mishra, 2017).

YAME'nin biyodizel özelliklerinin belirlenmesindeki temel özelliklerinden birisi de YAME'nin doymamışlık derecesidir. YAME'nin doymamışlık derecesi azaldıkça; setan sayısı, oksidasyon kararlılığı ve kinematik viskozite değerlerinin arttığı, iyot değerinin ise azaldığı rapor edilmiştir (Hoekman ve diğerleri, 2012). *A. protothecoides* KP7 suşundan elde edilen YAME'nin tahmini biyodizel özellikleri, hem ABD (ASTM D6751) hem de Avrupa (EN 14214) standartları tarafından belirlenen biyodizel özelliklerini karşılamaktadır. Daha yüksek setan sayısına ve oksidasyon kararlılığına sahip biyodizel, büyük ölçekli üretimde

herhangi bir sıvı yakıtın daha iyi kendiliğinden tutuşma kalitesine ve depolama süresine karşılık gelmektedir (Azam, Waris ve Nahar, 2005). *A. protothecoides* KP7 suşu için pH 10 N⁻ koşulunda elde edilmiş olan YAME'nin tahmini setan sayısı (55,26) ve oksidasyon kararlılığı (7,29 saat) değerleri, hem ASTM D6751 (47, 3 saat) hem de EN 14214 (51, 6 saat) biyodizel standartlarında bu özellikler için belirtilmiş olan alt sınır değerlerin üstündedir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen setan sayısı değeri (55,26); Sun ve diğerleri (2015 ve Patel ve diğerleri (2018) tarafından *A. protothecoides* türleri için rapor edilmiş olan setan sayısı değerlerinden (54,76, 53,25) daha yüksektir.

Öte yandan, *C. vulgaris* KP2 suşu için pH 9 N⁻ koşulları altında, elde edilen YAME'nin setan sayısı değeri (53,29), hem ASTM D6751 (CN > 47) hem de EN 14214 (CN > 51) standartlarını karşılarken, oksidasyon kararlılığı değeri (5,42 saat) sadece ASTM D6751 (OS > 3 saat) standardında belirtilen alt sınırın biraz üstündedir. Ayrıca bu suşun, N⁻ koşulları altında her iki pH içinde elde edilen YAME profilinde C18:3 yağ asidi oranı %12'nin üstünde olduğu için EN 14214 standardını (C18:3 ≤ %12) karşılamamaktadır. Bunun aksine *A. protothecoides* KP7 suşundan elde edilen YAME, sahip olduğu C18:3 yağ asidi oranından (%5,6) dolayı EN 14214 standardını karşılamaktadır.

Düşük iyot değeri, düşük NO_x emisyonu ile ilişkilidir (Bart, Palmeri ve Cavallaro, 2010). *A. protothecoides* KP7 suşunda pH 10 N⁻ koşulları altında elde edilen YAME'nin iyot değeri (97.64 g I₂/100 g), EN 14214 standardı için belirtilmiş olan üst sınırdan (IV < 120 g I₂/100 g) daha düşüktür. Bununla birlikte, bulgularımızdan daha düşük iyot değerine sahip (92,75 g I₂/100 g) *A. protothecoides* türü bildirilmiştir (Patel ve diğerleri, 2018). *C. vulgaris* KP2 suşu için ise pH 9 N⁻ koşulları altında elde edilen YAME'nin iyot değeri (119.61 g I₂/100 g), EN 14214 biyodizel standardı için belirtilmiş olan üst sınıra oldukça yakındır.

Biyodizel kalitesi için önemli olan özelliklerden birisi de üst ısı değeri. Hong, Lee ve Lee (2015), biyodizelin üst ısı değeri ne kadar yüksekse, aynı motor gücü için yakıt tüketiminin o kadar düşük olduğunu bildirmişlerdir. Geleneksel biyodizellerin üst ısı değerlerinin tipik olarak 39–41 MJ/kg aralığında olduğu (Demirbas, 2008) ve algal biyodizelin üst ısı değerinin 40.66 MJ/kg olduğu bildirilmiştir (Karmakar, Kundu ve Rajor, 2018). Bu çalışmada, *A. protothecoides* KP7 suşundan elde edilen YAME'nin tahmini üst ısı değerleri, test edilen koşullar arasında 40,54–42,13 MJ/kg arasında, *C. vulgaris* KP2 suşu için ise bu değerler 40.93–41.91 MJ/kg arasında değişkenlik göstermiştir.

Sonuç olarak; *A. protothecoides* KP7 suşunun alkali pH (pH 10) ve N⁻ kombine stresi altında hücre içinde önemli miktarda TAG birikimi yapması, ideal yağ asidi profiline ve biyodizel özelliklerine sahip olması, bu suşun biyodizel üretimi için aday bir suş olabileceğini göstermektedir. TAG içeriğine ek olarak, *A. protothecoides* KP7 ve *C. vulgaris* KP2 suşları, test edilen bazı koşullarda önemli miktarlarda protein ve nişasta üretmiştir. Bu metabolitlerin; biyoyakıt, gıda takviyesi, hayvan yemi ve nutrasötik olarak kullanılabilme potansiyelleri bulunmaktadır. (García, de Vicente ve Galán, 2017). Ayrıca, *A. protothecoides* türü N⁻ stresi altında ve yüksek alkali pH'da kültüre alındığında çevresindeki mikrobiyolojik kontaminantlardan daha az etkilenecektir (Bartley ve diğerleri, 2014). Karbonat-bikarbonat tamponu ile takviye edilmiş azot kaynağı içermeyen kültür ortamının, farklı mikroalg türlerinde de TAG üretimini arttırmak ve miksotrofik koşullar altında biyolojik kontaminantları en aza indirmek için iyi bir strateji olabileceği düşünülmektedir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ülkemizin enerjide dışa bağımlılığının fazla olması ve biyodizel üretiminde diğer ülkelerin oldukça gerisinde kalması göz önünde bulundurulduğunda, biyodizel üretiminde kullanılabilecek alternatif kaynakların keşfedilmesi gerekmektedir. Mikroalglerin bazı koşullar altında yağlı bitkilerden daha yüksek TAG içeriğine ve lipit verimine sahip olması ve yağ asidi profillerinin bitkisel yağlara benzerlik göstermesi nedeniyle; mikroalg kaynaklı biyodizel, geleneksel biyodizele iyi bir alternatif olarak görülmektedir. Son yıllarda, biyodizel üretiminde kaynak materyal olarak kullanılabilecek mikroalg türlerinin, TAG içeriğini ve lipit verimini arttırmak için farklı kültür koşullarında yetiştirme ve genetik mühendisliği ile mutant mikroalg türlerinin geliştirilmesi üzerine çalışmalar hız kazanmıştır. Bu tez çalışmasında, farklı su kaynaklarından izole edilmiş 30 mikroalg izolatının TAG içeriği ve lipit verimi bakımından karakterizasyonu yapılmış ve karbonat-bikarbonat tamponlu alkali pH (pH 10) ve N- kombine stresinin *A. protothecoides* türünün; lipit verimine, TAG içeriğine, biyokimyasal kompozisyonuna, yağ asidi profiline, biyodizel kalitesine ve PEPC, PDC-E1, PDC-E2, GPDH, DGAT1, ME, ACC, GPAT ve PDK enzimlerinin sentezinden sorumlu genlerinin ekspresyon seviyesine etkisi ilk kez araştırılmıştır. Bu araştırma bulguları, karbonat-bikarbonat tamponu ile oluşturulmuş alkali pH (pH 10) ile N- kombine stresinin, *A. protothecoides* türünde TAG içeriğini ve biyodizel kalitesini arttırmak için iyi bir strateji olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte; bu çalışma ile alkali pH ve N- stres koşullarında mikroalglerin TAG akümüasyonu ile nişasta, protein ve klorofil miktarları arasındaki ilişki ortaya konmuş ve TAG biyosentezi ile ilişkili bazı anahtar genler saptanmıştır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçlarından elde edilen veriler doğrultusunda aşağıdaki çıkarımlar yapılmıştır.

1. 30 mikroalg izolatı arasından yapılan seçim çalışması sonucunda, özellikle Koçpınar kaynak suyundan izole edilen mikroalglerin çoğunda N- stresi altında TAG üretiminin iyi olduğu, Tuz gölünden izole edilen mikroalglerin ise iyi bir TAG üreticisi olmadığı tespit edilmiştir.
2. 30 mikroalg izolatı arasından TAG ve lipit verimi en yüksek olan suşların *C. vulgaris* ve *A. protothecoides* olduğu saptanmıştır.

3. *C. vulgaris* suşu için biyokütle konsantrasyonun ve TAG içeriğinin en yüksek olduğu pH'nın pH 9, *A. protothecoides* suşu için biyokütle konsantrasyonunun en yüksek olduğu pH'nın pH 6, TAG içeriğinin en yüksek olduğu pH'nın ise pH 10 olduğu belirlenmiştir.
4. Karbonat-bikarbonat tamponu ile oluşturulan alkali pH stresinin *A. protothecoides* suşunun TAG içeriğinde, biyokütle konsantrasyonunda ve lipit veriminde önemli ölçüde arttırdığı, bunun aksine *C. vulgaris* KP2 suşunun TAG içeriğini ve biyokütle konsantrasyonunu arttırmadığı belirlenmiştir.
5. *A. protothecoides* KP7 suşunun N+ koşullarında sadece alkali pH stresine maruz bırakılan hücrelerinde de TAG sentezinin indüklendiği tespit edilmiştir.
6. Seçilen her iki suş için de N⁻ veya N⁻ ve alkali pH kombine stresinde TAG sentezi ile birlikte nişasta sentezinin de indüklendiği, hatta nişasta sentezinin TAG sentezinden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra protein ve klorofil miktarında önemli ölçüde azalma olduğu tespit edilmiştir.
7. Seçilen her iki suş için de N⁻ veya N⁻ ve alkali pH kombine stresinde mikroalglerde meydana gelen biyokimyasal kompozisyonundaki değişimlere dayanarak; stres altında hücrelerdeki metabolik karbon akışının azotlu bileşiklerden (klorofil, protein), azotsuz bileşiklere doğru (nişasta, TAG) yönlendirilmiş olabileceği sonucuna varılmıştır.
8. Seçilen her iki suş için de N⁻ veya N⁻ ve alkali pH kombine stresinde mikroalglerde C18:1 yağ asidi miktarında artış, C18:2 ve C18:3 yağ asidi miktarında azalma olduğu, buna bağlı olarak PUFA seviyesinde azalma MUFA seviyesinde ise artış olduğu belirlenmiştir.
9. *A. protothecoides* KP7 suşunda sadece alkali pH stresinde, N⁻ stresine benzer şekilde C18:1 yağ asidi miktarında artış, C18:2 ve C18:3 yağ asidi miktarında azalma olduğu belirlenmiştir.
10. *A. protothecoides* KP7 suşunda N⁻ ve alkali pH kombine stresine maruz bırakılan hücrelerin yağlarından elde edilen biyodizelin, kinematik viskozite, yoğunluk, bulutlanma noktası, setan sayısı, iyot değeri, üst ısı değeri ve oksidasyon kararlılığı değerlerinin hem ABD (ASTM D6751) hem de Avrupa (EN 14214) standartlarında belirtilen referans değerlerini karşıladığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, N⁻ ve alkali pH kombine stresinde setan sayısı ve oksidasyon kararlılığının arttığı ve iyot değerinin düştüğü belirlenmiştir.
11. *A. protothecoides* KP7 suşunda; PEPC, PDC-E2, ME, DGAT, ACC ve GPDH genlerinin TAG biyosenteziyle yüksek oranda ilişkili olabileceği belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde aşağıdaki maddeler önerilmiştir.

1. *A. protothecoides* KP7 suşunun N⁻ ve alkali pH kombine stresi altında TAG içeriğinin yüksek olması ve elde edilen biyodizelin kalite özelliklerinin oldukça iyi olması bu suşun biyodizel üretim potansiyelinin olduğunu göstermiştir. Ancak geniş ölçekte biyodizel üretimi için bu suşun lipid verimini arttıracak farklı stratejilerin de geliştirilmesi gerekmektedir.
2. Bu bağlamda; *A. protothecoides* KP7 suşunda alkali pH koşulları altında farklı karbon kaynaklarının kullanımı ve besiyerinde N⁻ stresi yerine eser miktarda azot kullanımının, lipid verimini arttıracak bir strateji olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte tez çalışmasında TAG biyosenteziyle yüksek oranda ilişkili olduğu saptanmış olan genlerin manipülasyonu ile ilgili yapılacak olan devam çalışmaları ile TAG içeriği yüksek ve hızlı üreyen mutant mikroalg suşlarının da geliştirilmesinin mümkün olabileceği öngörülmektedir. Öte yandan, tez çalışmasında TAG biyosentezi ile ilişkili olabileceği saptanmış olan PEPC, PDC-E2, ME, DGAT, ACC ve GPDH genlerinin, protein düzeyinde devam çalışmalarının yapılması, gen ekspresyon düzeyinde elde edilen bulguların desteklenmesi açısından önemlidir.
3. Bunun yanı sıra stres koşulları altında nişasta biyosentezinin TAG biyosentezinden daha fazla olması göz önünde bulundurulduğunda, genetik mühendisliği teknikleri ile nişasta biyosentezinin bloke edilmesinin, TAG biyosentezini arttıracak bir başka yaklaşım olabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abou-Shanab, R. A. I., Matter, I. A., Kim, S. N., Oh, Y. K., Choi, J., and Jeon, B. H. (2011). Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 3079–3085.
- Adamakis, I.-D., Lazaridis, P. A., Terzopoulou, E., Torofias, S., Valari, M., Kalaitzi, P., Rousonikolos, V., Gkoutzikostas, D., Zouboulis, A., and Zalidis, G. (2018). Cultivation, characterization, and properties of *Chlorella vulgaris* microalgae with different lipid contents and effect on fast pyrolysis oil composition. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(23), 23018–23032.
- Ahmad, I., Sharma, A. K., Daniell, H., and Kumar, S. (2015). Altered lipid composition and enhanced lipid production in green microalga by introduction of brassica diacylglycerol acyltransferase 2. *Plant Biotechnology Journal*, 13(4), 540–50.
- Akgul, F., Kizilkaya, I. T., Akgul, R., and Erdugan, H. (2017). Morphological and molecular characterization of *Scenedesmus*-like species from Ergene river basin (Thrace, Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(3), 609–619.
- Al-Safaar, A. T., Al-Rubiaee, G. H., and Salman, S. K. (2016). Effect of pH condition on the growth and lipid content of microalgae *Chlorella vulgaris* & *Chroococcus minor*. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 7(11), 1138–1143.
- Alalwan, H. A., Alminshid, A. H., and Aljaafari, H. A. S. (2019). Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Renewable Energy Focus*, 28, 127–139.
- Andrews, M., Raven, J. A., and Lea, P. J. (2013). Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of Applied Biology*, 163(2), 174–199.
- Araujo, G. S., Matos, L. J. B. L., Gonçalves, L. R. B., Fernandes, F. A. N., and Farias, W. R. L. (2011). Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology*, 102(8), 5248–5250.
- Arora, N., Pienkos, P. T., Pruthi, V., Poluri, K. M., and Guarnieri, M. T. (2018). Leveraging algal omics to reveal potential targets for augmenting TAG accumulation. *Biotechnology Advances*, 36(4), 1274–1292.
- Azam, M. M., Waris, A., and Nahar, N. M. (2005). Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass and Bioenergy*, 29(4), 293–302.
- Azov, Y. (1982). Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), 1300–1306.
- Balat, M. (2011). Potential alternatives to edible oils for biodiesel production - A review of current work. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 1479–1492.
- Barsanti, L., and Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology* (Second Edition). Boca Raton: CRC press, 361.

- Bart, J. C. J., Palmeri, N., and Cavallaro, S. (2010). *Biodiesel science and technology: from soil to oil* (First Edition). New York: Woodhead Publishing, 864.
- Bartley, M. L., Boeing, W. J., Dungan, B. N., Holguin, F. O., and Schaub, T. (2014). pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1431–1437.
- Beardall, J., and Raven, J. A. (2016). Carbon acquisition by microalgae. In M. A. Borowitzka, J. Beardall, and J. A. Raven (Eds.), *The Physiology of Microalgae* (First Edition). Switzerland: Springer, pp. 89–99.
- Bellou, S., and Aggelis, G. (2012). Biochemical activities in *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis salina* during lipid and sugar synthesis in a lab-scale open pond simulating reactor. *Journal of Biotechnology*, 164(2), 318–329.
- Belotti, G., Bravi, M., de Caprariis, B., de Filippis, P., and Scarsella, M. (2013). Effect of nitrogen and phosphorus starvations on *Chlorella vulgaris* lipids productivity and quality under different trophic regimens for biodiesel production. *American Journal of Plant Sciences*, 04(12), 44–51.
- Binnal, P., and Babu, P. N. (2017). Statistical optimization of parameters affecting lipid productivity of microalga *Chlorella protothecoides* cultivated in photobioreactor under nitrogen starvation. *South African Journal of Chemical Engineering*, 23, 26–37.
- Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(1), 911–917.
- Borowitzka, M. A. (1988). Algal growth media and sources of cultures. In M. A. Borowitzka, and L. J. Borowitzka, (Eds.), *Micro-algal biotechnology* (First Edition). Cambridge: Cambridge University Press, pp. 456–465.
- Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J., and Kessly, D. (1990). Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 2(2), 111–119.
- Boyle, N. R., and Morgan, J. A. (2009). Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Systems Biology*, 3(1), 1–14.
- Boyle, N. R., Page, M. D., Liu, B., Blaby, I. K., Casero, D., Kropat, J., Cokus, S. J., Hong-Hermesdorf, A., Shaw, J., Karpowicz, S. J., Gallaher, S. D., Johnson, S., Benning, C., Pellegrini, M., Grossman, A., and Merchant, S. S. (2012). Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 15811–15825.
- Brányiková, I., Maršáľková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., and Vítová, M. (2011). Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 766–776.
- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., and Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124, 217–226.

- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., and Wijffels, R. H. (2013). Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 143, 1–9.
- Byreddy, A. R., Gupta, A., Barrow, C. J., and Puri, M. (2016). A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 125, 28–32.
- Camp, P. J., and Randall, D. D. (1985). Purification and characterization of the pea chloroplast pyruvate dehydrogenase complex: a source of acetyl-CoA and NADH for fatty acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 77(3), 571–577.
- Cantrell, K. B., Ducey, T., Ro, K. S., and Hunt, P. G. (2008). Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities. *Bioresource Technology*, 99(17), 7941–7953.
- Carreira, A. C., Ventura, A. E., Varela, A. R., and Silva, L. C. (2015). Tackling the biophysical properties of sphingolipids to decipher their biological roles. *Biological Chemistry*, 396(6-7), 597–609.
- Çelekli, A., and Dönmez, G. (2006). Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 183–189.
- Chen, C. Y., and Durbin, E. G. (1994). Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 109(1), 83–94.
- Chen, H., Zhang, Y., He, C., and Wang, Q. (2014). Ca^{2+} signal transduction related to neutral lipid synthesis in an oil-producing green alga *Chlorella* sp. C2. *Plant and Cell Physiology*, 55(3), 634–644.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., and Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 41–47.
- Chen, Y. H., and Walker, T. H. (2011). Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnology Letters*, 33(10), 1973–1983.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306.
- Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., and Mishra, S. (2017). Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 60.
- Chollet, R., Vidal, J., and O’Leary, M. H. (1996). Phospho enol pyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1), 273–298.
- Chu, F.-F., Chu, P.-N., Cai, P.-J., Li, W.-W., Lam, P. K. S., and Zeng, R. J. (2013). Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. *Bioresource Technology*, 134, 341–346.

- Cobelas, M. A. (1989). Lipids in microalgae. A review I. Biochemistry. *Grasas y Aceites*, 40, 118–145.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., and Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146–1151.
- Damiani, M. C., Popovich, C. A., Constenla, D., and Leonardi, P. I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. In *Bioresource Technology*, 101(11), 3801–3807
- Demirbas, A. (2008). Biodiesel. *Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines* (First Edition). London: Springer-Verlag London, 111–119.
- Deng, X., Fei, X., and Li, Y. (2011). The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(3), 260–270.
- Deng, X., Li, Y., and Fei, X. (2011). The mRNA abundance of *pepc2* gene is negatively correlated with oil content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1811–1817.
- Ding, L., Wang, K. J., Jiang, G. M., Biswas, D. K., Xu, H., Li, L. F., and Li, Y. H. (2005). Effects of nitrogen deficiency on photosynthetic traits of maize hybrids released in different years. *Annals of Botany*, 96(5), 925–930.
- Dismukes, G. C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G. M., and Posewitz, M. C. (2008). Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 235–240.
- Dos Santos, R. R., Kunigami, C. N., Aranda, D. A. G., and Teixeira, C. M. L. L. (2016). Assessment of triacylglycerol content in *Chlorella vulgaris* cultivated in a two-stage process. *Biomass and Bioenergy*, 92, 55–60.
- Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., Slegers, P. M., Brentner, L. B., Roy, A., and Barbosa, M. J. (2013). Food commodities from microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 169–177.
- Eibl, J. K., Corcoran, J. D., Senhorinho, G. N. A., Zhang, K., Hosseini, N. S., Marsden, J., Laamanen, C. A., Scott, J. A., and Ross, G. M. (2014). Bioprospecting for acidophilic lipid-rich green microalgae isolated from abandoned mine site water bodies. *Amb Express*, 4(1), 1–8.
- Fakhry, E. M., and El Maghraby, D. M. (2015). Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina*. *Botanical Studies*, 56(1), 1–8.
- Falk, O., and Meyer-Pittroff, R. (2004). The effect of fatty acid composition on biodiesel oxidative stability. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(12), 837–843.

- Fan, Jianhua, Cui, Y., Wan, M., Wang, W., and Li, Y. (2014). Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–14.
- Fan, Jilian, Andre, C., and Xu, C. (2011). A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, 585(12), 1985–1991.
- Fan, Jilian, Yan, C., Andre, C., Shanklin, J., Schwender, J., and Xu, C. (2012). Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, 53(8), 1380–1390.
- Fazal, M. A., Haseeb, A. S. M. A., and Masjuki, H. H. (2013). Corrosion mechanism of copper in palm biodiesel. *Corrosion Science*, 67, 50–59.
- Feng, X., Walker, T. H., Bridges, W. C., Thornton, C., and Gopalakrishnan, K. (2014). Biomass and lipid production of *Chlorella protothecoides* under heterotrophic cultivation on a mixed waste substrate of brewer fermentation and crude glycerol. *Bioresource Technology*, 166, 17–23.
- Fernandez, E., and Galvan, A. (2007). Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2279–2287.
- Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., and Raymundo, A. (2010). Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1656–1664.
- Francisco, É. C., Neves, D. B., Jacob-Lopes, E., and Franco, T. T. (2010). Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(3), 395–403.
- Fukuda, S., Hirasawa, E., Takemura, T., Takahashi, S., Chokshi, K., Pancha, I., Tanaka, K., and Imamura, S. (2018). Accelerated triacylglycerol production without growth inhibition by overexpression of a glycerol-3-phosphate acyltransferase in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12.
- Galván, A., Quesada, A., and Fernández, E. (1996). Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 2088–2092.
- Gao, C., Wang, Y., Shen, Y., Yan, D., He, X., Dai, J., and Wu, Q. (2014). Oil accumulation mechanisms of the oleaginous microalga *Chlorella protothecoides* revealed through its genome, transcriptomes, and proteomes. *BMC Genomics*, 15(1), 1–14.
- Gao, F., Yang, H. L., Li, C., Peng, Y. Y., Lu, M. M., Jin, W. H., Bao, J. J., and Guo, Y. M. (2019). Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*, 282, 118–124.
- García, J. L., de Vicente, M., and Galán, B. (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1017–1024.

- Gardner, R., Peters, P., Peyton, B., and Cooksey, K. E. (2011). Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. *Journal of Applied Phycology*, 23(6), 1005–1016.
- Giordano, M. (2013). Homeostasis: an underestimated focal point of ecology and evolution. *Plant Science*, 211, 92–101.
- Goldman, J. C., Azov, Y., Riley, C. B., and Dennett, M. R. (1982). The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 57(1), 1–13.
- Gong, Q., Feng, Y., Kang, L., Luo, M., and Yang, J. (2014). Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. *Energy Procedia*, 61, 2012–2015.
- Goodson, C., Roth, R., Wang, Z. T., and Goodenough, U. (2011). Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. *Eukaryotic Cell*, 10(12), 1592–1606.
- Gorman, D. S., and Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(6), 1665–1669.
- Gouveia, L., Marques, A. E., Da Silva, T. L., and Reis, A. (2009). *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: A suitable renewable lipid source for biofuel production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(6), 821–826.
- Griffiths, M. J., van Hille, R. P., and Harrison, S. T. L. (2012). Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 989–1001.
- Griffiths, M. J., Van Hille, R. P., and Harrison, S. T. L. (2014a). The effect of degree and timing of nitrogen limitation on lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 6147–6159.
- Griffiths, M. J., Van Hille, R. P., and Harrison, S. T. L. (2014b). The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 2345–2356.
- Guckert, J. B., and Cooksey, K. E. (1990). Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition. *Journal of Phycology*, 26(1), 72–79.
- Guillard, R. R., and Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229–239.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L., and Frayn, K. N. (2002). *Lipid biochemistry* (Fifth Edition). Oxford: Blackwell Science, 314.

- Hadi, S. I. I. A., Santana, H., Brunale, P. P. M., Gomes, T. G., Oliveira, M. D., Matthiensen, A., Oliveira, M. E. C., Silva, F. C. P., and Brasil, B. S. A. F. (2016). DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLoS ONE*, 11(2), e0149284.
- Hagen, C., Grünewald, K., Schmidt, S., and Müller, J. (2000). Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. *European Journal of Phycology*, 35(1), 75–82.
- Hara, A., and Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, 90(1), 420–426.
- Hempel, N., Petrick, I., and Behrendt, F. (2012). Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1407–1418.
- Hildebrandt, A., Bickmeyer, I., and Kühnlein, R. P. (2011). Reliable *Drosophila* body fat quantification by a coupled colorimetric assay. *PloS One*, 6(9), e23796.
- Hirano, A., Ueda, R., Hirayama, S., and Ogushi, Y. (1997). CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy*, 22(2–3), 137–142.
- Hoekman, S. K., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., and Natarajan, M. (2012). Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 143–169.
- Hong, I. K., Lee, J. R., and Lee, S. B. (2015). Fuel properties of canola oil and lard biodiesel blends: Higher heating value, oxidative stability, and kinematic viscosity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 22, 335–340.
- Hsieh, C. H., and Wu, W. T. (2009). Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology*, 100(17), 3921–3926.
- Hsieh, H.-J., Su, C.-H., and Chien, L.-J. (2012). Accumulation of lipid production in *Chlorella minutissima* by triacylglycerol biosynthesis-related genes cloned from *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Microbiology*, 50(3), 526–534.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., and Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54(4), 621–639.
- Huerlimann, R., and Heimann, K. (2013). Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(1), 49–65.
- Huizing, H. J., Rietema, H., and Sietsma, J. H. (1979). Cell wall constituents of several siphonous green algae in relation to morphology and taxonomy. *British Phycological Journal*, 14(1), 25–32.

- Huss, V. A. R., Ciniglia, C., Cennamo, P., Cozzolino, S., Pinto, G., and Pollio, A. (2002). Phylogenetic relationships and taxonomic position of *Chlorella*-like isolates from low pH environments (pH < 3.0). *BMC Evolutionary Biology*, 2(1), 1–9.
- İnternet: Knoema. Biodiesel production by country from 2000 to 2019. URL: <https://knoema.com/atlas/topics/Energy/Renewables/Biodiesel-production>, Son Erişim Tarihi: 17.06.2021.
- İnternet: Statista. Biodiesel production worldwide from 2000 to 2019. URL: <https://www.statista.com/statistics/274163/global-biofuel-production-in-oil-equivalent/>, Son Erişim Tarihi: 17.06.2021.
- Juergens, M. T., Deshpande, R. R., Lucker, B. F., Park, J. J., Wang, H., Gargouri, M., Omar Holguin, F., Disbrow, B., Schaub, T., Skepper, J. N., Kramer, D. M., Gang, D. R., Hicks, L. M., and Shachar-Hill, Y. (2015). The regulation of photosynthetic structure and function during nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 167(2), 558–573.
- Kaçka, A., and Dönmez, G. (2008). Isolation of *Dunaliella* spp. from a hypersaline lake and their ability to accumulate glycerol. *Bioresource Technology*, 99(17), 8348–8352.
- Kajikawa, M., Sawaragi, Y., Shinkawa, H., Yamano, T., Ando, A., Kato, M., Hirono, M., Sato, N., and Fukuzawa, H. (2015). Algal dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase, triacylglycerol accumulation regulator1, regulates accumulation of triacylglycerol in nitrogen or sulfur deficiency. *Plant Physiology*, 168(2), 752–764.
- Kalin, M., Wheeler, W. N., and Meinrath, G. (2005). The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. *Journal of Environmental Radioactivity*, 78.2: 151–177
- Kao, P. H., and Ng, I. S. (2017). CRISPRi mediated phosphoenolpyruvate carboxylase regulation to enhance the production of lipid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*, 245, 1527–1537.
- Karatay, S. E., and Dönmez, G. (2011). Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. *Applied Energy*, 88(11), 3632–3635.
- Karmakar, R., Kundu, K., and Rajor, A. (2018). Fuel properties and emission characteristics of biodiesel produced from unused algae grown in India. *Petroleum Science*, 15(2), 385–395.
- Kennedy E. P. (1961). Biosynthesis of complex lipids. *Federation proceedings*, 20, 934–940.
- Khozin-Goldberg, I., Iskandarov, U., and Cohen, Z. (2011). LC-PUFA from photosynthetic microalgae: Occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 905–915.
- Kim, H. S., Park, W.-K., Lee, B., Seon, G., Suh, W. I., Moon, M., and Chang, Y. K. (2019). Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp. HS2 using screening, statistical assessment, and validation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.

- Klein, U. (1987). Intracellular carbon partitioning in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 85(4), 892–897.
- Knothe, G. (2009). Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy and Environmental Science*, 2(7), 759–766.
- Kong, W., Song, H., Cao, Y., Yang, H., Hua, S., and Xia, C. (2011). The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. *African Journal of Biotechnology*, 10(55), 11620–11630.
- Li, Q., Du, W., and Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 749–756.
- Li, R.-J., Hu, Z.-Y., Zhang, H.-S., Zhan, G.-M., Wang, H.-Z., and Hua, W. (2011). Cloning and functions analysis of a pyruvate dehydrogenase kinase in *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, 30(8), 1533–1540.
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., and Chen, S. (2013). High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Bioresource Technology*, 131, 60–67.
- Li, Xiaobo, Moellering, E. R., Liu, B., Johnny, C., Fedewa, M., Sears, B. B., Kuo, M. H., and Benning, C. (2012). A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, 24(11), 4670–4686.
- Li, Xiufeng, Xu, H., and Wu, Q. (2007). Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4), 764–771.
- Li-Beisson, Y., Beisson, F., & Riekhof, W. (2015). Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 82(3), 504–522.
- Liang, K., Zhang, Q., Gu, M., and Cong, W. (2013). Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 311–318.
- Lichtenthaler, H. K., and Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(5), 591–592.
- Lohman, E. J., Gardner, R. D., Pedersen, T., Peyton, B. M., Cooksey, K. E., and Gerlach, R. (2015). Optimized inorganic carbon regime for enhanced growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* Luisa Gouveia. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 82.
- Lu, S., Wang, J., Niu, Y., Yang, J., Zhou, J., and Yuan, Y. (2012). Metabolic profiling reveals growth related FAME productivity and quality of *Chlorella sorokiniana* with different inoculum sizes. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(7), 1651–1662.

- Lv, J.-M., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., Zhang, L., and Chen, H.-L. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, 101(17), 6797–6804.
- Ma, X., Yao, L., Yang, B., Lee, Y. K., Chen, F., and Liu, J. (2017). RNAi-mediated silencing of a pyruvate dehydrogenase kinase enhances triacylglycerol biosynthesis in the oleaginous marine alga *Nannochloropsis salina*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12.
- Ma, Y. H., Wang, X., Niu, Y. F., Yang, Z. K., Zhang, M. H., Wang, Z. M., Yang, W. D., Liu, J. S., and Li, H. Y. (2014). Antisense knockdown of pyruvate dehydrogenase kinase promotes the neutral lipid accumulation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–9.
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals*, 15(4), 377–390.
- Mallick, N., Mandal, S., Singh, A. K., Bishai, M., and Dash, A. (2012). Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(1), 137–145.
- Mamedov, T. G., Moellering, E. R., and Chollet, R. (2005). Identification and expression analysis of two inorganic C- and N-responsive genes encoding novel and distinct molecular forms of eukaryotic phosphoenolpyruvate carboxylase in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, 42(6), 832–843.
- Maraşlıoğlu, F., Soyulu, E. N., and Gönüloğlu, A. (2011). Chlorococcal chlorophyte composition, community structure, and seasonal variations in the shallow lakes of the Kızılırmak Delta, Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 35(1), 117–124.
- Mashek, D. G., Li, L. O., and Coleman, R. A. (2007). Long-chain acyl-CoA synthetases and fatty acid channeling. *Future Lipidology*, 2(4), 465–476.
- Mata, T. M., Martins, A. A., and Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232.
- Michelon, W., Da Silva, M. L. B., Mezzari, M. P., Pirolli, M., Prandini, J. M., and Soares, H. M. (2016). Effects of Nitrogen and Phosphorus on Biochemical Composition of Microalgae Polyculture Harvested from Phycoremediation of Piggery Wastewater Digestate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(7), 1407–1419.
- Mifflin, B. J., and Lea, P. J. (1982). Ammonia assimilation and amino acid metabolism. In Boulter D., Parthier B. (Eds.), *Nucleic Acids and Proteins in Plants I*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 5–64.
- Miller, R., Wu, G., Deshpande, R. R., Vieler, A., Gartner, K., Li, X., Moellering, E. R., Zauner, S., Cornish, A. J., Liu, B., Bullard, B., Sears, B. B., Kuo, M. H., Hegg, E. L., Shachar-Hill, Y., Shiu, S. H., and Benning, C. (2010). Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiology*, 154(4), 1737–1752.

- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., and Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 155, 330–333.
- Moellering, E. R., and Benning, C. (2010). RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 9(1), 97–106.
- Moellering, E. R., Ouyang, Y., Mamedov, T. G., and Chollet, R. (2007). The two divergent PEP-carboxylase catalytic subunits in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* respond reversibly to inorganic-N supply and co-exist in the high-molecular-mass, hetero-oligomeric Class-2 PEPC complex. *FEBS Letters*, 581(25), 4871–4876.
- Moroney, J. V., and Ynalvez, R. A. (2007). Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 6(8), 1251–1259.
- Msanne, J., Xu, D., Konda, A. R., Casas-Mollano, J. A., Awada, T., Cahoon, E. B., and Cerutti, H. (2012). Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry*, 75, 50–59.
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C. G., and Lee, K. (2012). Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, 123, 279–283.
- Muñoz, R., and Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*, 40(15), 2799–2815.
- Neilson, A. H., and Lewin, R. A. (1974). The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia*, 13(3), 227–264.
- Nichols, H. W., and Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *Journal of Phycology*, 1(1), 34–38.
- Ohlrogge, J., and Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7), 957.
- Onay, M., Sonmez, C., Oktem, H. A., and Yucel, A. M. (2014). Thermo-resistant green microalgae for effective biodiesel production: isolation and characterization of unialgal species from geothermal flora of Central Anatolia. *Bioresource Technology*, 169, 62–71.
- Park, J. Y., Kim, D. K., Lee, J. P., Park, S. C., Kim, Y. J., and Lee, J. S. (2008). Blending effects of biodiesels on oxidation stability and low temperature flow properties. *Bioresource Technology*, 99(5), 1196–1203.
- Patel, A., Matsakas, L., Rova, U., and Christakopoulos, P. (2018). Heterotrophic cultivation of *Auxenochlorella protothecoides* using forest biomass as a feedstock for sustainable biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 169.
- Patel, M. S., and Roche, T. E. (1990). Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes 1. *The FASEB Journal*, 4(14), 3224–3233.

- Peccia, J., Haznedaroglu, B., Gutierrez, J., and Zimmerman, J. B. (2013). Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 31(3), 134–138.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., De-Bashan, L. E., and Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36.
- Price, C. A. (1965). A membrane method for determination of total protein in dilute algal suspensions. *Analytical Biochemistry*, 12(2), 213–218.
- Rai, M. P., Gautam, T., and Sharma, N. (2015). Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 15(4), 260.
- Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casas, A., Rodríguez, L., and Pérez, Á. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 100(1), 261–268.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., and Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71–85.
- Ratledge, C., and Wilkinson, S. G. (1988). An overview of microbial lipids. *Microbial lipids*, 1, 3–22.
- Refaat, A. A. (2009). Correlation between the chemical structure of biodiesel and its physical properties. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 6(4), 677–694.
- Ren, H. Y., Liu, B. F., Ma, C., Zhao, L., and Ren, N. Q. (2013). A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: Effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 143.
- Renaud, S. M., Thinh, L. Van, Lambrinidis, G., and Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211(1–4), 195–214.
- Rimmer, P. B., and Shorttle, O. (2019). Origin of life's building blocks in carbon-and nitrogen-rich surface hydrothermal vents. *Life*, 9(1), 12.
- Rippka, R., Deruelles, J., and Waterbury, J. B. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111(1), 1–61.
- Rismani-Yazdi, H., Haznedaroglu, B. Z., Hsin, C., and Peccia, J. (2012). Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 1–16.

- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., and Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100–112.
- Rosenberg, J. N., Kobayashi, N., Barnes, A., Noel, E. A., Betenbaugh, M. J., and Oyler, G. A. (2014). Comparative analyses of three *Chlorella* species in response to light and sugar reveal distinctive lipid accumulation patterns in the microalga *C. sorokiniana*. *PLoS ONE*, 9(4), e92460.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., and Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278.
- Santos, A. M., Janssen, M., Lamers, P. P., Evers, W. A. C., and Wijffels, R. H. (2012). Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. *Bioresource Technology*, 104, 593–599.
- Sauer, J., Schreiber, U., Schmid, R., Völker, U., and Forchhammer, K. (2001). Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* pcc 7942. low-level photosynthesis as a mechanism of long-term survival. *Plant Physiology*, 126(1), 233–243.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., and Hankamer, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, 1(1), 20–43.
- Schlösser, U. G. (1982). Sammlung von Algenkulturen. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 95(1), 181–276.
- Schmidt, S., Raven, J. A., and Paungfoo-Lonhienne, C. (2013). The mixotrophic nature of photosynthetic plants. *Functional Plant Biology*, 40(5), 425–438.
- Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R. A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., Tokgoz, S., Hayes, D., and Yu, T. H. (2008). Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science*, 319(5867), 1238–1240.
- Selvarajan, R., Felföldi, T., Tauber, T., Sanniyasi, E., Sibanda, T., and Tekere, M. (2015). Screening and evaluation of some green algal strains (Chlorophyceae) isolated from freshwater and soda lakes for biofuel production. *Energies*, 8(7), 7502–7521.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., and Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532–1553.
- Shen, X.-F., Qin, Q.-W., Yan, S.-K., Huang, J.-L., Liu, K., and Zhou, S.-B. (2019). Biodiesel production from *Chlorella vulgaris* under nitrogen starvation in autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic cultures. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1589–1596.

- Shtaida, N., Khozin-Goldberg, I., Solovchenko, A., Chekanov, K., Didi-Cohen, S., Leu, S., Cohen, Z., and Boussiba, S. (2014). Downregulation of a putative plastid PDC E1 α subunit impairs photosynthetic activity and triacylglycerol accumulation in nitrogen-starved photoautotrophic *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6563–6576.
- Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y., and Peltier, G. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*, 11(1), 7.
- Silaban, A., Bai, R., Gutierrez-Wing, M. T., Negulescu, I. I., and Rusch, K. A. (2014). Effect of organic carbon, C: N ratio and light on the growth and lipid productivity of microalgae/cyanobacteria coculture. *Engineering in Life Sciences*, 14(1), 47–56.
- Simionato, D., Block, M. A., La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G., and Morosinotto, T. (2013). The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryotic Cell*, 12(5), 665–676.
- Skrupski, B., Wilson, K. E., Goff, K. L., and Zou, J. (2013). Effect of pH on neutral lipid and biomass accumulation in microalgal strains native to the Canadian prairies and the Athabasca oil sands. *Journal of Applied Phycology*, 25(4), 937–949.
- Slocombe, S. P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., and Stanley, M. S. (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology*, 129, 51–57.
- Smith, D. M., and Allen, S. J. (1955). Cryptogamic botany. *Bryophytes and Pteridophytes*, McGraw-Hill Publications in the Botanical Sciences.
- Sommer, U. (1999). A comment on the proper use of nutrient ratios in microalgal ecology. *Archiv fur Hydrobiologie*, 146, 55–64.
- Song, M., Pei, H., Hu, W., and Ma, G. (2013). Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 141, 245–251.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.
- Srinivasan, R., Mageswari, A., Subramanian, P., Suganthi, C., Chaitanyakumar, A., Aswini, V., and Gothandam, K. M. (2018). Bicarbonate supplementation enhances growth and biochemical composition of *Dunaliella salina* V-101 by reducing oxidative stress induced during macronutrient deficit conditions. *Scientific Reports*, 8(1), 6972.
- Sugden, M. C., and Holness, M. J. (2003). Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 284(5 47–5), E855–E862.

- Sun, H., Zhao, W., Mao, X., Li, Y., Wu, T., and Chen, F. (2018). High-value biomass from microalgae production platforms: strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–23.
- Sun, Z., gang Zhou, Z., Gerken, H., Chen, F., and Liu, J. (2015). Screening and characterization of oleaginous *Chlorella* strains and exploration of photoautotrophic *Chlorella protothecoides* for oil production. *Bioresource Technology*, 184, 53–62.
- Suresh, B., and Ravishankar, G. A. (2004). Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(2–3), 97–124.
- Tan, K. W. M., and Lee, Y. K. (2016). The dilemma for lipid productivity in green microalgae: Importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–14.
- Tan, Y., and Lin, J. (2011). Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. *Bioresource Technology*, 102(21), 10131–10135.
- Tanner, W. (2000). The *Chlorella* hexose/H⁺-symporters. *International Review of Cytology*, 200, 101–41.
- Thangavel, K., Krishnan, P. R., Nagaiah, S., Kuppusamy, S., Chinnasamy, S., Rajadorai, J. S., Olaganathan, G. N., and Dananjeyan, B. (2018). Growth and metabolic characteristics of oleaginous microalgal isolates from Nilgiri biosphere Reserve of India. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–17.
- Thompson, G. A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1302(1), 17–45.
- Ting, I. P., and Osmond, C. B. (1973). Photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylases: Characteristics of alloenzymes from leaves of C3 and C1 plants. *Plant Physiology*, 51(3), 439–447.
- Tong, D., Hu, C., Jiang, K., and Li, Y. (2011). Cetane number prediction of biodiesel from the composition of the fatty acid methyl esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 415–423.
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barceló, A., and Ariño, J. (2004). Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43614–43624.
- Walsh, J. J. (1976). Steemann Nielsen, E. 1975. Marine photosynthesis with special emphasis on the ecological aspects. *Limnology and Oceanography*.
- Wan, M. X., Wang, R. M., Xia, J. L., Rosenberg, J. N., Nie, Z. Y., Kobayashi, N., Oyler, G. A., and Betenbaugh, M. J. (2012). Physiological evaluation of a new *Chlorella sorokiniana* isolate for its biomass production and lipid accumulation in photoautotrophic and heterotrophic cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(8), 1958–1964.

- Wang, C., Chen, X., Li, H., Wang, J., and Hu, Z. (2017). Artificial miRNA inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase increases fatty acid production in a green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 91.
- Wang, X., Fosse, H. K., Li, K., Chauton, M. S., Vadstein, O., and Reitan, K. I. (2019). Influence of nitrogen limitation on lipid accumulation and EPA and DHA content in four marine microalgae for possible use in aquafeed. *Frontiers in Marine Science*, 6, 95.
- Wang, Y., Stessman, D. J., and Spalding, M. H. (2015). The CO₂ concentrating mechanism and photosynthetic carbon assimilation in limiting CO₂: how *Chlamydomonas* works against the gradient. *The Plant Journal*, 82(3), 429–448.
- Wang, Z. T., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S., and Goodenough, U. (2009). Algal lipid bodies: Stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 8(12), 1856–1868.
- Williams, P. J. L. B., and Laurens, L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy and Environmental Science*, 3(5), 554–590.
- Wong, Y., Ho, Y. H., Ho, K. C., Leung, H. M., and Yung, K. K. L. (2017). Growth medium screening for *Chlorella vulgaris* growth and lipid production. *Journal of Aquaculture and Marine Biology*, 6(1), 143.
- Xia, L., Yang, H., He, Q., and Hu, C. (2015). Physiological responses of freshwater oleaginous microalgae *Desmodesmus* sp. NMX451 under nitrogen deficiency and alkaline pH-induced lipid accumulation. *Journal of Applied Phycology*, 27(2), 649–659.
- Xu, H., Miao, X., and Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126(4), 499–507.
- Xue, J., Wang, L., Zhang, L., Balamurugan, S., Li, D. W., Zeng, H., Yang, W. D., Liu, J. S., and Li, H. Y. (2016). The pivotal role of malic enzyme in enhancing oil accumulation in green microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–9.
- Yao, Y., Lu, Y., Peng, K. T., Huang, T., Niu, Y. F., Xie, W. H., Yang, W. D., Liu, J. S., and Li, H. Y. (2014). Glycerol and neutral lipid production in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* promoted by overexpression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 110.
- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., and Cetiner, S. (2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PLoS ONE*, 9(3), e91957.
- Zhang, Y.-M., Chen, H., He, C.-L., and Wang, Q. (2013). Nitrogen starvation induced oxidative stress in an oil-producing green alga *Chlorella sorokiniana* C3. *PloS One*, 8(7), e69225.

- Zhao, L.-S., Li, K., Wang, Q.-M., Song, X.-Y., Su, H.-N., Xie, B.-B., Zhang, X.-Y., Huang, F., Chen, X.-L., and Zhou, B.-C. (2017). Nitrogen starvation impacts the photosynthetic performance of *Porphyridium cruentum* as revealed by chlorophyll a fluorescence. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.
- Zhu, J., Chen, W., Chen, H., Zhang, X., He, C., Rong, J., and Wang, Q. (2016). Improved productivity of neutral lipids in *Chlorella* sp. A2 by minimal nitrogen supply. *Frontiers in Microbiology*, 7, 557.
- Zou, S., Fei, C., Wang, C., Gao, Z., Bao, Y., He, M., and Wang, C. (2016). How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: a case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (Chlorophyceae). *Scientific Reports*, 6(1), 1–13.





GAZİ GELECEKTİR...