

CHLORELLA VULGARIS'İN GLİSEROL, PİGMENT VE PROTEİN İÇERİĞİ ÜZERİNDE BAZI STRES FAKTÖRLERİNİN ETKİLERİ

Yazar
GÖKÇE KENDİRLİOĞLU ŞİMŞEK



BİDGE Yayınları

***CHLORELLA VULGARIS*'İN GLİSEROL, PİGMENT VE PROTEİN İÇERİĞİ ÜZERİNDE BAZI STRES FAKTÖRLERİNİN ETKİLERİ**

Yazar: GÖKÇE KENDİRLİOĞLU ŞİMŞEK

ISBN: 978-625-372-796-3

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 25.06.2025

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



İçindekiler

1. Giriş.....	5
2. Materyal ve Metot	41
2.1 Chlorella vulgaris' in Temini.....	41
2.2 Chlorella vulgaris' in İzolasyonu	41
2.3 Stok Kültürlerin Hazırlanması	42
2.4 Farklı Işık Dalgaboyunda Kültür Ortamlarının Hazırlanması	42
2.5 Farklı pH' lı Sıvı Besiyerlerinin Hazırlanması	43
2.6 Farklı Azot Kaynaklarının Kullanıldığı Besiyerlerinin Hazırlanması	43
2.7. Farklı Azot Konsantrasyonlarında Besiyerlerinin Hazırlanması	44
2.8 Farklı PO ₄ Konsantrasyonlarında Besiyerlerinin Hazırlanması	44
2.2. Analitik Ölçümler.....	44
3. Bulgular.....	50
3.1 Işık Dalga boyunun <i>C.vulgaris</i> 'in Gelişim, Protein, Gliserol ve Pigment (astaksantin ve klorofil a, b) Miktarına Etkisi	50
3.2 pH'ın <i>C.vulgaris</i> 'in Gelişim, Protein, Gliserol ve Pigment (astaksantin ve klorofil a, b) Miktarına Etkisi.....	64
3.3 Farklı Azot Kaynaklarının <i>C.vulgaris</i> ' in Gelişim, Protein, Gliserol ve Pigment (astaksantin ve klorofil a,b) Miktarına Etkisi	75

3.4 Farklı Azot Konsantrasyonlarının <i>C.vulgaris</i> ' in Gelişim, Protein, Gliserol ve Pigment (astaksantin ve klorofil a, b) Miktarına Etkisi.....	88
3.5 Farklı Fosfat Konsantrasyonlarının <i>C.vulgaris</i> 'in Gelişim, Protein, Gliserol ve Pigment (astaksantin ve klorofil a, b) Miktarına Etkisi.....	98
4. Tartışma ve Sonuç	107
Kaynaklar	120

1. Giriş

Yaklaşık 4,5 milyar yıl yaşa sahip olan dünyamız, 510.072 milyon km²'lik bir alanda, 7,5 milyar insanın yaşadığı ve günümüzde güneş sisteminde yaşamın var olduğu tek gezegen olarak bilinmektedir. Nüfus artış hızının yıllık ortalama %1,15 olduğu dünyamızda, nüfusun 2055 yılında yaklaşık 9 milyara ulaşması beklenmektedir. Bu nüfus artışına paralel olarak, besin ve enerji ihtiyacına olan talep bugün karşı karşıya kaldığımız sorunların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Artan dünya nüfusunun beraberinde getirdiği problemlerin çözümü ile ilgili çalışmalar, günümüzde bilim insanlarının temel çalışma konularını oluşturmaktadır.

Özellikle sanayileşme ve nüfus artışına paralel olarak tarım alanlarının hızla azalıyor olması açlık problemlerini de beraberinde getirmektedir. Artan besin ihtiyacını karşılayabilmek amacı ile birim alandan daha fazla verim alabilmek için yapılan çalışmaların başında tohum ıslahı ile çeşitli hastalık ve zararlılara karşı pestisit uygulamaları gelmektedir. Ancak, sanayi atıkları ve kontrolsüz bir şekilde kullanılan pestisitler tarımsal alanları bir daha kullanılamayacak şekilde kirletmektedir. Karasal ortamda kullanılan bu maddeler, yağmur ve yer altı suları ile alıcı ortama karışarak sucul ortamın da kirletmesine neden olarak insanoğlunun geleceğini tehdit eder düzeye gelmektedir. Nüfus artışının beraberinde getirdiği problemlerden birisi de artan enerji ihtiyacıdır.

Hem enerji ihtiyacının artması hem de kullanılabilir tarım alanlarının azalması ile ortaya çıkan besin eksikliği problemlerinin çözümü noktasında insanoğlu alternatif besin ve enerji kaynakları arayışına girmiştir.

Bu arayışların başında yenilenebilir, çevre dostu enerji ve protein kaynağı ürünler üzerinde durulmaktadır. Dünya nüfusundaki hızlı artış ve enerji ihtiyacının yanı sıra karasal kökenli beslenmede yetersizlik ve fosil yakıtlardan enerji temininin yarattığı küresel iklim değişikliği de alternatif kaynaklara yönelimi kaçınılmaz kılmaktadır. Çevre kirliliği, açlık problemi ve artan enerji ihtiyacını karşılamak üzere yapılan çalışmalarda en dikkat çekici kaynakların başında alglerin olabileceği fikri bilim insanlarının dikkatini çekmektedir. Algler hücre içinde depoladıkları değerli metabolitler, yüksek protein içeriği ve hızlı çoğalmaları sebebiyle diğer organizmalardan bir adım öne çıkarmaktadırlar. Alglerin bu özelliklerinden faydalanılarak açlık sorunun üstesinden gelebilmek amacıyla tek hücre proteini (THP) üretimi için önemli çalışmalar yapılmaktadır (Cirik ve Gökpınar, 2006). Zengin protein içeriğinin yanında, mikroalglerin yağ içerikleri bakımından da avantajlı organizmalar oldukları bilinmektedir.

Karasal bitkilerle kıyaslandığında mikroalglerin yağ oranının çevresel faktörlere bağlı olarak ciddi şekilde arttığı belirtilmektedir.

Protein ve lipid içeriklerinin yanı sıra alglerin ihtiva ettiği pigmentler de diğer bitkisel organizmalara göre büyük farklılıklar göstermekte ve alg grupları arasında da pigment çeşitliliği bakımından önemli değişikliklerin olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Siaut vd., 2007). Aquatik ortamdaki biyokütlenin çok önemli bir kısmını oluşturan algler yaklaşık 30.000 tür ile temsil edilirler. Çok değişik morfolojik ve biyokimyasal yapıya sahip olan bu organizmaların çok azının ekofizyolojik özellikleri incelenmiştir. Chlorophyta şubesine dahil olan *C. vulgaris*, tek hücreli, elipsoid, küresel veya düz hücrelerden oluşan, tek kromatoforlu yeşil alg türüdür. Beyerinck tarafından 1890 yılında tanımlanmasından sonra deskripsiyonu çok az değişiklik göstermiştir (Beyerinck,1890; Shihira, 1965). *C. vulgaris*; hücreleri küremsi, 5-8µm ile 5-10µm büyüklüğünde, kloroplastları paryetal ya da prenoidsiz yapıda, morfolojik olarak ise küresel tiptedir (Prescott, 1968; Baydar,1990). Üreme döngüsünün karasal bitkilerle kıyaslandığında oldukça kısa olduğu ve 18-24 saat arasında hücre döngüsünü tamamladıkları bilinmektedir (Yamamoto vd., 2004).

Chlorella vulgaris, kısa sürede çoğalma avantajının yanı sıra vitamin, protein, amino asitler, nükleik asitler, temel yağ asitleri, enzimler ve karetenoidler bakımından da oldukça zengin biyokimyasal içeriğe sahip bir yeşil alg türüdür. Bu zengin biyokimyasal içeriğinden dolayı oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir.

C. vulgaris'in insan gıdası ve hayvan yemi olarak kullanılması, ürettiği pigment maddelerinin (karotenler, ksantofiller) hayvan dokularına ve kümes hayvanlarının yumurtalarına renk kazandırması, çeşitli antibiyotikler içermesi bakımından gelecek vadeden bir alg türü olduğu ifade edilmektedir (Santhosh vd., 2016).

C. vulgaris, büyük ölçekli ticari üretimi olan özellikle lipit ve astaksantin için önemli mikroalg türü olarak kabul edilmektedir (Halim vd., 2012; Praveenkumar vd., 2014). Son yıllarda, *C. vulgaris*'in ağır metalleri absorbe edebildiğinin anlaşılması üzerine yapılan çalışmalar başarılı sonuçlar vermiş ve atık suların temizlenmesinde ve ileri biyolojik arıtma sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Chu vd., 2009; Ruiz-Marin vd., 2010).

Alglerin protein, lipid ve pigmentleri ile ihtiva ettikleri diğer metabolitlerin içeriği, bulunduğu habitatın fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olarak önemli değişiklikler göstermektedir. Alg türlerinin kimyasal kompozisyonları (lipit, karotenoid v.s.) ve büyüme oranları habitat koşullardan etkilenmektedir. Işık, sıcaklık, pH, nutrientler ve suyun tuz konsantrasyonu gibi fiziksel ve kimyasal faktörlerin; mikroalglerin büyüme, fizyolojik aktiviteler ve biyokimyasal kompozisyonlar üzerinde etkili oldukları yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Ben-Amotz ve Shaish, 1992; Asulabh vd., 2012).

Işık, fotosentezdeki rolü ile karasal ekosistemlerde olduğu gibi sucul ekosistemdeki organizmaları da doğrudan etkileyen en önemli çevresel faktörlerden birisidir. Işık hem fotosentetik organizmalar için önemli enerji kaynağı hem de fotosentez hızını etkileyen ve mikroalgal hücre büyümesini ve metabolik aktivitelerini etkileyen en önemli çevresel faktörlerdendir (Wahidin vd., 2013). Işık, cisimleri görmeyi, renkleri ayırt etmeyi sağlayan fiziksel bir enerji, bir ışımanın ışık kaynağından çıktıktan sonra, cisimlere çarparak veya direkt olarak yansması sonucu canlıların görmesini sağlayan olgudur. Yunancada ışık “celeritas” (hız) anlamına gelir. Einstein'ın $E=mc^2$ kütle-enerji eşdeğerliğindeki “c” ışık hızını ifade eder. Işık da diğer elektromanyetik ışınlamalar gibi foton adı verilen "paketlerden" meydana gelir. Fotonlar ise, dalgaların ve parçacıkların özelliklerini ifade etmektedirler (Carvalho vd., 2011).

Görülebilir ışığın dalga boyu, 380 nm ile (UV'ye yaklaştıkça) 750 nm (veya kızıl ötesi ışık yakını) arasındadır. Görülebilir ışık, fotosentetik algler için temel enerji kaynağıdır. Bu enerjiyi fotosentetik işlemlerde kullanarak organik madde sentezleyebilmektedirler (Carvalho vd., 2011). Ayrıca alg kültürleri optimum gelişim için belli dalga boyundaki bir ışık kaynağına gereksinim duyarlar. 600-700 nm dalga boyundaki ışık, fotosentezde etkili olmasına rağmen, mikroalgal büyüme oranının en fazla 400-500 nm dalga boyu aralığında olduğu belirtilmektedir (Kommareddy ve Anderson, 2004).

Mikroalg kùltürlerinde en az %5-10 fotonluk mavi ışık, fotosentezin yanı sıra diğerk metabolik fonksiyonlar için gereklidir. Ancak, beyaz ışığın da biyoreaktörlerde kullanılmasının alglerin gelişimini teşvik ettiğı bildirilmektedir (Kommareddy ve Anderson, 2004).

Hücre, ışık karşısında inorganik karbonu metabolize ederek, diğerk nutrientler ile organik madde sentezini gerçekleştirir. Bu nedenle mikroalg kùltürlerinin aydınlatılmasında dikkate alınan faktörler; spektral aralık, spektral kalite, fotoperyot ve ışık şiddetidir. Işık şiddeti ve süresi mikroalgal üretimin verimliliğı açısından önemlidir. Sıvı kùltürlere uygulanan ışık şiddeti, kùltürün derinliğine ve yoğunluğuna bağılı olarak değışiklik gösterir. Kùltür derinliğı ve yoğunluğı artışına bağılı olarak ışık şiddeti de arttırılmalıdır. Ancak, ışık şiddetindeki artış doygun ışık yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra da devam ederse, fotosentezin sınırlayıcı etkisi (fotoinhibisyon) başlaması kaçınılmaz olur (Kommareddy ve Anderson, 2004).

Işık, fotosentetik organizmaların canlılığını sürdürebilmeleri için zorunlu bir parametredir. Fotosentetik büyüme her bir hücrenin kullandığı ışık enerjisiyle orantılı olduğı için, bütün fotosentetik canlılarda olduğı gibi mikroalgal üretimlerde de ışığın optimum seviyelerde sağlanması şarttır.

Birçok araştırmacı ışık kaynağının, alglerde fotosentezi doğrudan etkilediğini belirterek alglerin gelişiminde ışık yoğunluğunun etkisini araştırmış ve ışık yoğunluğunun mikroalglerde fotosentez oranını etkilediğini tespit etmişlerdir (Juneja vd., 2013). Yapılan çalışmalar, fotosentez hızının ışık yoğunluğu ile doğrusal olarak arttığı ancak yüksek ışık yoğunluğunun ise fotosentezi inhibe edebildiğini ortaya koymuştur (Cirik ve Gökpınar, 2006). Işığın yoğunluğu ve süresinin mikroalg kültürlerin verimliliği açısından önemli olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Cirik ve Gökpınar, 2006). Yüksek ışık şiddetinde olduğu gibi düşük ışık yoğunluklarının da fotosentezi sınırlayıcı bir faktör olduğu belirtilmektedir. Bu sınırlayıcı etkinin, ortamdaki hücre konsantrasyonunun bir sonucu olarak hücrelerin birbirini gölgelemesi ve ışığa doymuş hale gelen hücrelerin daha fazla ışık enerjisi kullanamaması nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir (Cirik ve Gökpınar, 2006). Direkt güneş ışığı, alg kültürleri için sınırlayıcı etki yapabilmektedir. Bu sebeple ışık şiddetinin, hücre konsantrasyonuna göre ayarlanması gereken bir değişken olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Cirik ve Gökpınar, 1993; Richmond, 2000; Sukatar, 2002; Vonshak ve Torzillo, 2003).

Fotosentetik mikroorganizmaların optimal büyüme oranlarını sağlamak için kullanılacak ışık kaynağının seçiminde yüksek elektriksel etki, düşük sıcaklık yayımı, güvenilirlik, stabilitenin yüksek olması, kullanım ömrünün uzun olması, düşük fiyat ve ilgili mikroorganizmaların absorpsiyon aralıkları arasında

olmasına dikkat edilmesi gerektiği bildirilmektedir (Bertling vd., 2006). Ayrıca, etkili beyaz ışığın dizaynı ve seçimi mikroalg türlerine (farklı mikroalg türlerinin ışık gereksinimlerine ve esas pigment maddelerini bünyelerinde barındırmalarına), ışık kaynağının tipi ve yoğunluğuna, ışığın spektral kalitesine bağlı olduğu bu parametrelerin mikroalg türlerinin büyümesi ve metabolizması için hayati öneme sahip olduğuna vurgu yapılmıştır (Bertling vd., 2006).

Mikroalg türleri, fotosentez için genellikle 400 ile 700 nm dalga boyları arasında ışığı kullanırken, fotosentezde absorbe edilen dalga boyları türe bağlı olarak değişiklik gösterir. Bazı çalışmalarda alglerin farklı dalga boylarındaki ışıklarda da gelişim gösterdikleri rapor edilmiştir. Kırmızı (600-700 nm) ve mavi ışıklar (400-500 nm) mikroalglerin büyümesini teşvik eden ışıklardır ve mikroalglerin büyüme oranları ve lipid içeriğini önemli ölçüde etkileyen faktörlerin başında geldiği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Chen vd., 2011; Wang ve Lan, 2011; Das vd., 2011; Cheirsilp ve Torpee, 2012). Mikroalgal hücre büyüme oranları ve lipid içeriği, ışığın dalga boyunun yanı sıra, ışık şiddeti ve ışığın frekansı gibi parametrelerden etkilenir (Wang vd., 2007; Brindley vd., 2011; Tang vd., 2012). Gonçalves vd. (2014), 36 ile 180 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de ışık ışınımında bir artışın spesifik büyüme hızını arttırdığını ve daha yüksek ışık ışınımının *Chlorella vulgaris* ve *Pseudokirchneriella subcapitata*'nın biyokütle üretkenliğini arttırdığını bildirmiştir.

Sucul ekosistemin primer üreticisi rolünü üstlenen algler için etkili bir diğer önemli faktör ise ortamın pH'sıdır. pH, bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimidir. Açılımı "Power of Hydrogen" (Hidrojenin Gücü)'dir. pH kavramı ilk kez Danimarkalı kimyager Søren Peder Lauritz Sørensen tarafından Carlsberg Laboratuvarı'nda 1909 yılında tanımlanmıştır (url.1). pH değeri algal kültür ortamının en önemli faktörlerinden biridir çünkü pH, yalnız ortamın bileşimini etkilemekle kalmaz, ömrünü de etkiler. Hücre dışı pH veya ortam pH'sındaki değişimler mikroalglerin önemli hücresel işlevleri olan CO₂ alımı, diğer iyon ve besin maddelerinin alımı, hücre içi fonksiyonları ve hücre duvarı özellikle fotosentezle ilişkili enzimleri etkilemektedir (Juneja vd., 2013). Biyoteknolojik süreçlerin optimizasyonu, ilgili mikroorganizmanın performansını maksimize eden optimum koşulların oluşturulması ile ilgilidir.

Bu bağlamda pH, mikroalgal büyümeyi kontrol eden en önemli parametrelerden biridir. Genellikle 6-10 arası pH pek çok mikroalg türünün tercih ettiği aralıktır. Diyatomeleler ve siyanobakterilere ait bazı türler, nötr ve alkali pH ortamlarında iyi şekilde gelişme gösterirken bazı türler hafif asitten nötr pH'ya, bazı türler de alkali pH'lardan nötr pH'ya geçildiğinde daha düşük gelişim gösterirler (Rai ve Rajashekhar, 2014; Rai vd., 2015;).

Çoğu durumda, mikroalgler optimum gelişimlerini 7.0'a yakın pH değerlerinde gerçekleştirmekle beraber, aynı cinsin farklı türlerinin de optimum gelişimlerini farklı pH'da gerçekleştirdikleri bilinmektedir (Weisse ve Stadler, 2006). Örneğin, *Dunaliella acidophila* gelişimi için optimum pH 0 - 3.0 arasında iken, mikroalg türü *Dunaliella salina*'nin optimum gelişimini pH 11.5'ye yakın bir pH'da gerçekleştirdiği bildirilmektedir (Varshney vd, 2014). Bazı *Chlorella* türlerinin pH kontrollü biyoreaktörlerde kültüre alındığında, pH 2.5'te optimal bir şekilde gelişim gösterdiği belirtilirken, Liang vd.'nin çalışmasında (2011), laboratuvar koşullarında yetiştirilen bir *C. protothecoides*'in büyümesi için optimal pH'ın 5.0 olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, mikroalglerin adepte olduğu ortamlara bağlı olarak, her türün büyüyebileceği ve canlılığını sürdürebileceği farklı bir pH aralığına sahip olduğu bilinmektedir.

Işık ve pH gibi faktörlerin yanında bütün canlılarda olduğu gibi mikroalglerin de canlılıklarını sürdürebilmeleri için gerekli temel ihtiyaçları arasında belirli nutrientlerin temini yer almaktadır. Bu bağlamda azot ve fosfor esas elementler arasında ihtiyaç duyulan nutrientler arasında ilk sıradadır. Azot (N) ve fosfor (P), mikroalgal hücre metabolizmasını kontrol eden iki önemli makronutrienttir.

Azot; protein, klorofil, RNA, DNA vb. gibi birçok makromolekülün vazgeçilmezi ve mikroalglerin en önemli besin    elerinden birisi olması ile protein sentezinin ve pigment yapımının da temel yapı taşıdır (Jackson vd., 2015).

Alglerin büyümesi için gerekli olan en önemli besin    elerinden biri olan azot ve kullanılabilirli indeki değişiklikler, sucul ekosistemlerde fitoplankton ve fitobentik organizmaların kompozisyonunu önemli ölçüde kontrol eder (Reynolds, 2006; Chia vd., 2011). Sucul ortamdaki azot de i ikli ine cevap olarak, mikroalg hücreleri bir dizi metabolik aklımasyona uğrarlar ve bu da genellikle hücresel biyomolekül bileşiminde değişiklikler ile sonuçlanır (Illman vd., 2000; Gushina ve Harwood, 2006; Widjaja vd., 2009; Chia vd., 2013a). Azot sınırlamasının etkisiyle, mikroalglerin hücre bölünmesi pahasına mücadele etmesi ve adapte olması için bu değişikliklerin gerekli olduğu bildirilmektedir (Bono vd., 2013). Azot sınırlandırması veya yoksunluğu, fotosentez, protein sentezi ve lipid ile karbonhidrat sentezindeki artı a neden olmaktadır (Li vd., 2012; Simionato vd., 2013). Yapılan çalışmaların önemli bir bölümünde, lipid verimini arttırmak için sıklıkla N veya P eksikliği kullanılmıştır. Ancak yüksek lipid üretkenliği sağlamak için sinerjistik faydalanma ile ilgili çalışmalar yetersizdir (Belotti vd., 2013; Kamalanathan vd., 2015; Singh vd., 2015).

Azot eksikliği, protein sentezi, fotosentez hızı, asetilhidrolazın aktivasyonu, fosfolipid hidrolizinin uyarılması için asetil-CoA'nın hücre içi seviyelerinde artışı ve asetil-CoA'yı TAG'lere dönüştüren digliseridasetiltransferaz (DGAT) 'ın aktivasyonunu azaltarak metabolik dengesizliğe neden olur (Xin vd., 2010). Oleaginous mikroalgler olarak isimlendirilen yağ oranı oldukça yüksek mikroalgler tarafından biriktirilen triaçilgliserol (TAG), biyodizel üretimi için en uygun yağ stoğu olarak kullanılmaktadır (Wijffels ve Barbosa, 2010). Yapılan birçok çalışmada, azot sınırlamasının veya eksikliğinin, mikroalglerde TAG birikimini indüklemekteki en etkili yaklaşımlardan biri olduğunu ileri sürülmektedir (Griffiths vd., 2012).

Azot eksikliği, biyodizel elde etmek amacıyla mikroalglerin biyokütle değerini arttırmak için en yaygın kabul gören stratejidir (Hu vd., 2008). Azot yetersizliğinde, birçok mikroalgin, yüksek miktarda depo lipid birikimini triaçilgliserol (TAG) içeren biyodizele dönüştürmek için metabolik yollarını uyarlama yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir (Hu vd., 2008; Lv vd., 2010; Breuer vd., 2012).Çeşitli mikroalg türlerinde TAG, hücre ağırlığının büyük bir kısmını (% 40-50) oluşturabilir, bu nedenle bu oleaginous türlerde TAG, ana karbon ve enerji depolama formu olarak düşünülür (Li vd., 2000; Breuer vd., 2012). Bununla birlikte, azot yetersizliğinde TAG birikiminin artışı tek metabolik tepki olarak görülmeyebilir.

Bu gibi durumlarda, karbonhidrat miktarlarının da (esas olarak nişasta) *Chlorella vulgaris*'te ağırlığının % 50'sine yaklaştığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Li vd., 2000; Hu vd., 2008; Lv vd., 2010; Ho vd., 2013; Breuer vd., 2012). Azot sınırlaması veya eksikliği, mikroalglerdeki karbon dağılımını etkiler (Li. vd., 2014). Mikroalg tarafından fotosentez yoluyla sabitlenen karbon kaynağı çoğunlukla lipidleri, proteinleri ve karbonhidratları sentezlemek için kullanılır. Bu nedenle bu ana bileşiklerin oranındaki değişiklikler mikroalglerdeki karbon dağılımına yansiyabilir. Azot eksikliği, yüksek demir miktarı, yoğun aydınlatma vb. gibi birçok stratejinin biomas ve lipid artışındaki etkileri pek çok çalışmada incelenmiştir (Liu vd., 2008; Yeesang ve Cheirsilp, 2011; Wang vd., 2012).

Azot ve fosfor, genellikle suda yaşayan alglerin birincil üretimi için sınırlandırıcı nutrientlerdir (Dodds vd., 2002; Juneja vd., 2013; Mischler vd., 2014; Yin-Hu vd., 2012). Fosfat (PO_4) aynı zamanda kültür ortamında organizmanın metabolik büyümesinin kontrolünde temel bileşenlerden birini oluşturmaktadır. Fosfat, fosfolipidlerin, nükleik asitlerin ve ester fosforun oluşması için çok önemlidir (Roopnarain vd., 2014).

Mikroalgal biyomasta, toplam kuru biyokütlenin yaklaşık % 1'i kadar P bulunur, ancak fosfor tüketimi, mikroalgal hücreler tarafından P'nin "lüks alımı" nedeniyle daha fazladır (Yin- Hu vd., 2012). Fosfor, fotosentez sürecinde önemli bir bileşen ve algal büyümede önemli bir besin maddesidir.

Ayrıca fosfor, nitrat absorpsiyonu, enerji transferi, sinyal iletimi ve fotosentetik solunum için temel nutrienttir (Singh vd., 2015).

Akuatik ortamda meydana gelen tüm bu değişimler sucul organizmaları doğrudan etkiler. Özellikle algal kültür ortamında bu faktörlerdeki değişimin sonuçlarını daha net gözlemleyebilmek mümkündür. Bu parametrelerdeki değişimler sadece organizmanın gelişimini değil aynı zamanda biyokimyasal yapısını da etkilemektedir (Siaut vd., 2007).

Algler; lipit ve gliserol içeriği ile enerji kaynağı, protein ve pigment içeriği ile gıda alanlarında dikkat çekmeyi başarmıştır. Gelişmekte olan ülkelerin tartışmasız temel sorunları arasında yer alan çevre kirliliğinin üstesinden gelinmesinde doğayla dost enerji üretimi denilince akıllara artık biyoyakıtlar gelmektedir. Bu yakıt formunun doğaya dost olmasının yanısıra ülke ekonomisini de sarsmayan bir yöne sahip olması onu ön plana çıkarmaktadır. Biyodizel üretiminin bazı ülkelerde önemli miktarlarda üretiliyor olması bir yan ürün olarak elde edilen gliserolün de değerlendirilmesine yönelik çalışmaları yoğunlaştırmaktadır. Gliserol, biyodizel üretiminde önemli bir yan üründür. Biyodizel üretiminde gliserol ile metanolün reaksiyonu sonucunda yağ asidi metil esterleri (FAME) ve gliserol meydana gelmektedir.

Bu dönüşüm reaksiyonları transesterifikasyon olarak adlandırılmaktadır ve katalizör kullanarak metanol ve gliserolün kimyasal reaksiyonla yer değiştirmesi esasına dayanmaktadır. Transesterifikasyon prosesinde metanol yerine etanol, propanol, bütanol da kullanılabilir.

Katalizör olarak ise bazik katalizör (potasyum hidroksit, sodyum hidroksit ve sodyum metoksit), asit katalizör (hidroklorik asit, sülfürik asit, sülfonik asit fosforik asit), lipazları içeren enzimatik katalizör ve inorganik heterojen katalizörler (katı faz katalizörü) kullanılmaktadır (Pragya vd., 2013).

Mikroalg esaslı biyodizel üretimi genel olarak, mikroalglerden yağların ekstraksiyonu, fazla solventin giderilmesi, homojen veya heterojen katalizör ile katalize edilen biyodizelin üretimi aşamalarından oluşmaktadır (Hossain vd., 2008; Li vd., 2011). Konvansiyonel transesterifikasyon yöntemiyle biyodizel üretimine kıyasla ultrasonik ve mikrodalga transesterifikasyon yöntemi ile daha yüksek biyodizel verimi elde edilmiş ve daha ekonomik olduğu daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Hossain vd., 2008; Li vd., 2011). Gliserol, sıvı halde bulunan trihidroksi alkoldür. Gliserol'ün üç boyutlu yapısı incelendiğinde 1. ve 3. karbon atomlarının aynı özellikte olmadığı belirlenmiştir. Gliserol sentezinde, enzimler bu iki C arasındaki farkı kolaylıkla ayırt ederek sadece birini tanırlar.

Gliserol üretiminde kullanılan algler gelişimleri için inorganik karbon kaynaklarının yanı sıra ışığa ihtiyaç duymaktadırlar ve gliserolü fotosentezin bir yan ürünü olarak üretmektedirler (Becker, 1994). Belli stres koşulları altında alg türlerinin belirli metabolitleri aşırı ürettiği ya da farklı metabolitlerle bu koşula cevap verdiği tespit edilmiştir. Örneğin; *Dunaliella* türleri yüksek tuz konsantrasyonlarına tolerans yeteneğini veya değişen tuz konsantrasyonlarına uyumunu, içinde biriktirdiği uygun bir çözünen madde ile yani gliserol ile sağlanmaktadır. Burada gliserol, osmoregülasyonu sağlayan çözünmüş bir ajan olarak görev yapmaktadır. Gliserol çok fazla çözünen bir polihidrik alkol olup, diğer çözünen polihidroksi alkollerle karşılaştırıldığında, metabolik olayları en az inhibe eden alkol olarak karşımıza çıkmaktadır (Borowitzka ve Borowitzka, 1988).

Dünyada üretilen gliserolün endüstride birçok kullanım alanı mevcuttur. Üretilen bu gliserolün üçte biri alkid reçinelerin üretiminde kullanılırken diğer üçte ikisinin büyük bir kısmı ilaç yapımında ve tütün endüstrisinde, kozmetikte, besinlerin korunmasında, patlayıcı üretiminde, biyolojik besi ortamlarının hazırlanmasında, deri sanayinde, tekstil endüstrisi gibi geniş kullanım alanlarında elverişli bir yere sahiptir.

Beslenme, enerji ihtiyacının yanı sıra aslında insanoğlunun temel ihtiyaçların başında yer almaktadır.

Özellikle küresel ısınmanın olumsuz etkisi tarım alanlarında su kullanımına yönelik sınırlamaları da beraberinde getirmiş ve bu anlamda alternatif beslenme kaynakları arayışını sürdürmek, kalabalık toplumlarda temel besin ögesi olan protein sıkıntısının giderilme yolu açısından oldukça mantıklı bir hal almıştır. Algler biyolojik aktivitesi yüksek biyoaktif bileşikler bulunduran gözde alternatif gıda kaynaklarındandır. Yaklaşık olarak %60'ı proteinden oluşan bu organizmalar stres koşullarına tabi tutulduklarında içerdikleri protein miktarı daha da artabilmektedir. Alg biyokütlesinin protein içeriği, bulunduğu ortamdaki potasyum ve azot gibi besin kaynaklarının kullanılabilmesine bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca, büyüme fazında alınan ışığın miktarı ve kalitesi de protein içeriği üzerinde etkilidir (Gantar ve Svircsev, 2008). Pek çok mikroalgin protein takviyesi amacı ile tüketildiği bilinmektedir. Bu mikroalgler arasında *Spirulina*'nın yüksek protein içeriğinden dolayı yetiştirildiği ve hücre duvarının %86 sindirilebilirliğe sahip, insan vücudu tarafından kolayca absorbe edilebilen polisakaritler içeren bir mikroalg olduğu ve bu sebeple diyet takviyesi olarak gıdalarda tablet, pul ve toz şeklinde kullanılmakta olduğu bildirilmektedir (Sjors ve Alessvero, 2010).Tek hücre proteinleri gelecekte canlıların protein gereksinimlerinin karşılanmasında sınırsız olanaklar sağlayacak üstünlüklere sahiptir.

Tek hücre proteini kullanımı gıda sıkıntısını çözüm açısından önemli bir alternatiftir ve alg türleri tek hücre protein kaynağı olabilmeleri açısından önemli organizmalardır. *Scenedesmus* dünyanın çeşitli bölgelerinde besin olarak kullanıldığı için THP kaynağı olarak önemli bir algdır (İnanç, 1994). Gıda olarak kullanımında sindirim açısından oluşan riskleri ortadan kaldırmak için alg hücrelerinin buharda ısıtılarak, öğütülerek ya da üre ile işleme tabi tutularak parçalanması durumunda, hücre içindeki protein serbest forma geçebilmekte ve sindirilme oranı yükselebilmektedir.

Algler, pigment çeşitliliği açısından en zengin organizmalar arasında yer alırlar ve pigmentler alglerin primer sınıflandırmalarında kullanılan önemli kriterlerdendir. Bütün fotosentetik organizmaların temel pigmenti olan klorofil a'nın yanında alglerin ihtiva ettikleri pigmentler alg gruplarında çeşit ve miktar bakımından değişiklik gösterir. Bütün alg grupları yapılarında klorofil-a bulundururken, yüksek bitkilerde olduğu gibi Chlorophyta ve Euglenophyta üyeleri klorofil-a'nın yanında klorofil-b, Bacillariophyta üyeleri ise klorofil-a ve b'nin yanında klorofil-c, klorofil-d ve klorofil-e pigmentlerine de sahiptirler (Tunail, 2009). Genellikle klorofilin hücre kuru ağırlığının % 0.5-1.5'ünü oluşturduğu ifade edilmektedir (Gouveria vd. 2008). Ayrıca, klorofil-a miktarının önemli bir verimlilik parametresini olduğu bilinmektedir.

Fitoplankton biyokütlesi, tüm fitoplankton hücrelerinin sahip olduğu fotosentetik pigment olan klorofil-a ile ölçülebilir (Newton, 2002). Klorofil-a veya toplam klorofil miktarı, fotosentez ve solunum oranlarını ($\text{mol O}_2/\text{mg Kl-a. saat}$) ve metabolik olarak aktif biyokütle ile karasal ve su ekosistemlerinin verimliliğini (gC./mg Kl-a. gün) hesaplamak için standart olarak kullanılmaktadır (Ritchie, 2006). Klorofil, mikroalgler tarafından üretilen değerli pigmentlerden biridir. Genellikle doğal renklendirici olarak tercih edilir.

Ayrıca hücre yenileme ve yaraların iyileşme sürecini hızlandırdığından dolayı farmakolojik ürünlerde kullanımı oldukça yaygındır. Ülser tedavisi ve ağız sepsislerinde de klorofilden faydalanılmaktadır (Scotter vd., 2005).

Klorofilin yanında karotenoidler de alglerin sahip olduğu önemli pigmentlerdendir. Özellikle astaksantin, antioksidan özelliği ile gelecek vadeden bir karotenoidtir. Astaksantin (3,3' dihidroksi- β , β -karoten-4,4'-dion) molekülü benzoid halkasının 3 ve 3'' pozisyonlarında yer alan iki asimetrik C atomuna sahiptir. Bu karbon atomlarının asimetri merkezine bağlanan hidroksil grupları (-OH) molekülün farklı izomerlerinin oluşumuna neden olur. Eğer hidroksil grubu (-OH) düzlemin izdüşümüne yukardan bağlanırsa R konfigürasyonu, aşağıdan bağlanırsa S konfigürasyonu oluşur. Bu şekilde astaksantin (3R,3'R) , (3S,3'S) ve (3R,3'S) olmak üzere üç farklı esterleşmiş izomeri gösterilir.

Haematococcus pluviialis'de biriken astaksantin esterleşmiş şekillerde olup, (3S,3'S) formu daha baskın durumdadır (Renstrom vd., 1981; Grung vd., 1992; Lorenz, 1999). Astaksantin, mikroalg türlerinden elde edilen ve doğal bir pigment olan güçlü bir biyoaktif maddedir. Mikroalglerde uygun üreme koşulları altında kloroplastta primer karotenoidler sentezlenirken, stres koşulları altında kloroplast dışında sitoplazmada da sekonder karotenoidler sentezlenir. Başlıca karotenoidler arasında likopen, ksantofil (lutein), β -karoten, violaksantin, zeaksantin ve astaksantin yer alır (Cohen, 2000). Astaksantin kimyasal sentetik formda ve doğal formda olmak üzere iki tipte bulunur. Sentetik formda olanlar, doğal olmayan konfigürasyonda astaksantin bileşikleri içerir. Mikroorganizma kullanılarak üretilen doğal kaynaklı astaksantin formu bu nedenle daha değerlidir (Margalith,1999; Boussiba, 2000; Hagen, 2001).

Ketokarotenoidler arasında yer alan astaksantin, dejeneratif hastalıkları önleyebilen güçlü antioksidan özelliklerinden dolayı son yıllarda dikkat çekmektedir (Guerin vd., 2003).

Ketokarotenoid olan astaksantin, antikanser özelliği ve bağışıklığın güçlendirilmesi gibi özellikleri nedeniyle dikkat çekmektedir (Lorenz ve Cysewski, 2000; Guerin vd., 2003). Astaksantin, lipid peroksidasyonuna ve oksidatif strese karşı hücre zarını ve dokuyu koruma özelliği bilinmektedir. Yüksek antioksidan aktivite gösterir. Antioksidan aktivite, hidroksil, peroksil gibi serbest

radikallere karşı hücreyi koruma görevidir. Serbest radikaller bünyelerinde çiftleşmemiş elektron içeren atomlar ya da bileşiklerdir. Bunlar protein, enzim gibi yapılardan elektron alarak kendi yapısının elektron çiftini tamamlarken diğer yapıda dejenerasyona neden olur.

Astaksantin antioksidan aktivitesi, Vitamin-E'den 500 kat, β -karoten'den 10 kat, lutein'den 4 kat daha etkilidir (Miki, 1991; Naguib, 2000; Hagen vd., 2001; Altuğ, 2001; Chen vd., 2003). Astaksantin, akuakültür ve gıda sanayiinde pigment kaynağı olarak kullanılırken, kozmetik ve farmasötik sanayinde de yüksek antioksidan aktivitesi nedeni ile uygulama alanı bulmaktadır (Lorenz ve Cysewski, 2000b; Fabregas, 2001; Chen vd., 2003).

Günümüzde değerli metabolitleri yapısında bulunduran, besin eksikliği ve temiz enerji açığını ortadan kaldıracabilecek fosil yakıtlardan kaynaklanan kirlenmenin üstesinden gelebilmek amacıyla algler en dikkat çekici organizmalar arasında yer almaktadırlar. Alglerin bu özellikleri göz önüne alınarak ihtiva ettikleri protein, lipit, gliserol ve pigment miktarı üzerinde etkili olan faktörlerin belirlenmesi amacı ile son yıllarda önemli çalışmalar yapılmaktadır. Yaptığımız çalışma da biyokimyasal içerik bakımından oldukça zengin olan *Chlorella vulgaris*'in kültür ortamında yapılacak fiziksel ve kimyasal değişiklerin, bu mikroalgin biyokimyasal içeriği üzerindeki etkilerinin neler olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca, belirli stres koşulları oluşturularak *C. vulgaris*'in değerli metabolit miktarlarının artırılmasına yönelik parametrelerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Ip vd., (2004), *Chlorella zofingiensis*'de mikсотrofik kültür ortamında farklı glikoz ve azot konsantrasyonlarında, hücre yoğunluğu, astaksantin ve klorofil miktarındaki değişimi belirlemek amacıyla, 0-40 g/L glikoz ve 0-1.1 g /L konsantrasyonda azot içeren kültür ortamları hazırlamışlardır. Kontrol grubu olarak glikoz ilavesi yapılmamış ve azot konsantrasyonu değiştirilmemiş kültürler kullanmışlar ve başlangıçta 0.1 g gl⁻¹ verimlilikte olan hücresel gelişimin, glikoz konsantrasyonu 5 g/L olan kültürlerde maksimum miktara ulaştığını ve bu maksimum değerin bu konsantrasyonda 3 gün süreyle aynı kaldığını ve daha sonra hızla azaldığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, en yüksek astaksantin miktarını 30 g/L glikoz konsantrasyonunda gözlemlerken klorofil miktarının maksimum değere düşük glikoz konsantrasyonlu (5 g/L) ortamlarda ulaştığını tespit etmişlerdir. Yüksek glikoz konsantrasyonlu kültürlerde, maksimum astaksantin miktarlarına ulaşılmasa da kültür sürecinin daha uzun süre devam ettiğini ifade etmişlerdir. Yüksek glikoz ve düşük azot konsantrasyonlarının alg kültürlerinde astaksantin üretimini etkilediği sonucuna varmışlardır.

Qin vd., (2008), ışık şiddeti ve sıcaklığın *Scenedesmus obliquus*'un hücre sayısı, astaksantin ve protein miktarı üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında iki aşamalı kültür ortamları

kullanmışlardır. Bu iki aşamalı olarak hazırlanan kültür ortamlarının ilkinde 30 °C’de $180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 48 saatlik bir inkübasyon süresine sahip bir kültür ortamı hazırlanırken ikincisinde 25 °C’de $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 72 saatte inoküle etmişlerdir. *Scenedesmus obliquus*’e ait bu kültürlerin astaksantin akümüülasyonu, hücre sayısı ve protein miktarını analiz edilmişler, birinci aşamada ilk 24 saatten sonra hücre sayısının başlangıç değerinin altına düştüğünü ($1.605 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) tespit etmişler ve protein miktarının da benzer şekilde 88.75 mg/g’dan 54.79 mg/g’a azaldığını belirlemişlerdir.

İkinci aşamada ise birinci aşamanın aksine hücre sayısı ilk 60 saatte $1.6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ’ye ulaşırken sonraki 12 saatte bu artışın devam ettiğini, protein miktarının ise 42 saatten sonra hızla 94.36 mg/g’dan 185.84 mg/g’ye artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Astaksantin miktarının ise; birinci aşamada inkübasyon boyunca arttığını ikinci aşamada 24. saatten sonra azaldığını rapor etmişlerdir.

Ip vd., (2005), peroksinitrit ve nitril klorid’in *Chlorella zofingiensis*’de astaksantin, protein ve kuru ağırlık üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Karanlık, heterotrofik kültür ortamında beş gün boyunca gözlemler yapmışlardır. Nitril klorid, NaClO ve NaNO_2 ’nin reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Bu sebeple hazırladıkları kültürlerde NaClO konsantrasyonunu sabit tutulmuşlar, sadece NaNO_2 konsantrasyonu değiştirerek deneylerini yapmışlardır. Peroksinitrit’in farklı konsantrasyonlarının (0-10mM)

uygulandığı kültürlerde kuru ağırlığın, azot konsantrasyonundaki artışa paralel olarak 8.92'den 60.88 mg g⁻¹ e yükseldiğini ve başlangıçta 1.57 mg g⁻¹ olan astaksantin miktarının ise 2.07 mg g⁻¹ ile 1mM konsantrasyonda en yüksek değere ulaştığını tespit etmişlerdir. Nitril klorid'in farklı konsantrasyonlarının uygulandığı kültürlerde ise kuru ağırlığın konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığını, astaksantin miktarının ise başlangıçta 1.36 mg g⁻¹'dan 0.1mM konsantrasyonda 1.84 mg g⁻¹ olan maksimum değere ulaştığını belirtmişlerdir.

Sarada vd., (2002), tuzluluk ve farklı azot kaynakları kullanılarak oluşturulan kültür ortamlarında *Haematococcus pluvialis*'de biomas, astaksantin ve klorofil miktarlarındaki değişiklikleri incelemişlerdir. Hazırlanan bu kültür ortamları sodyum asetatlı ortam ve sodyum asetatla birlikte farklı tuzluluk konsantrasyonuna sahip ortamlardan oluşturulmuştur. Yine aynı çalışmada, başka bir faktör olan azot kaynağının etkisi de incelemiş ve amonyum nitrat, potasyum nitrat, sodyum nitrat ve kalsiyum nitrat ile farklı azot kaynaklı kültür ortamları oluşturmuşlardır. Klorofil miktarının en yüksek olduğu (12.4 mg/L) kültürlerin sodyum nitratla hazırlananlar olduğunu tespit etmişler, tuzluluk denemelerinde ise 4-8 günlük süreçte astaksantin miktarının %0.5 tuzluluk ve sodyum asetatlı kültürlerde maximum değere ulaştığını belirlemişlerdir.

Orosa vd., (2005), NaNO_3 'ün farklı konsantrasyonları ve karbon kaynağı olarak malonat, asetat ve nitrat'ın farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı kültürlerinde *Haematococcus pluvialis*'in gelişim oranları ve astaksantin miktarını belirlemek amacıyla 16 gün boyunca denemeler yapmışlar, asetat, malonat, nitratlı kültürlerin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı örneklerde başlangıç değeri $0.12 \mu\text{d}^{-1}$ gelişim oranına sahip kültürlerde, nitratlı ortamda maksimum miktara ($0.46 \mu\text{d}^{-1}$) 1 g l^{-1} konsantrasyonda ulaşılırken asetatlı ve malonatlı kültürlerin her ikisinde de 0.64 ve $0.56 \mu\text{d}^{-1}$ olan maksimum gelişim oranının 0.25 gl^{-1} konsantrasyonda elde edildiğini belirtmişlerdir. Farklı NaNO_3 konsantrasyonu uygulanan kültürlerde 11. güne kadar önemli bir değişiklik gözlemlenmediği ve bu süreçten sonra hücre sayısının artış gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Liu vd., (2012), endüstriyel bir atık olan melasın, kültür ortamında karbon kaynağı olarak kullanımının *Chlorella zofingiensis* üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla *Chlorella zofingiensis*'in farklı melas konsantrasyonlarındaki hücresel gelişimi, astaksantin ve lipit miktarlarındaki değişimi belirlemek amacıyla kültür koşulları oluşturmuşlardır. Glikoz, fruktoz ve sükroz gibi şeker kaynaklarını barındıran melas $5-50 \text{ gL}^{-1}$ aralığındaki konsantrasyonlarına seyreltilmiş ve başlangıçta 0.5 gL^{-1} olan kuru ağırlık miktarının 30 gL^{-1} konsantrasyonlu melas ortamında maksimum değere ulaştığını belirtmişlerdir. Astaksantin ve lipit miktarının ise melas konsantrasyonundaki artışa paralel

olarak arttığını ve 50 gL⁻¹ melas konsantrasyonunda maksimum değere ulaştığını belirtmişlerdir.

Giannelli vd., (2015), astaksantin üretim kapasitesini artırılmasında sıcaklık faktörünün etkilerini incelemişler ve farklı sıcaklık aralıkları seçerek bu aralıklarda astaksantin miktarındaki değişimleri tespit etmişlerdir. 20, 23.5, 27, 30.5 °C sıcaklıklarda maksimum hücre konsantrasyonlarının sırasıyla; 1.67 x10⁶, 1.28x10⁶, 1.27x10⁶, 6.04x10⁶ hücre/ml⁻¹ olduğunu belirlemiş ve inkübasyon süresinin 7. gününe kadar astaksantin miktarının sabit kaldığını 7. günden sonra yüksek sıcaklıklarda astaksantin miktarının yaklaşık %37 olduğunu tespit etmişlerdir.

Sun vd., (2008), farklı şeker kaynaklarının *Chlorella zofinginesis*'in gelişimi ve astaksantin miktarı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Laktoz, glikoz, mannoz, fruktoz, sükroz ve galaktoz gibi şeker türleri, 50 gL⁻¹ konsantrasyonda besiyeri ortamına ilave etmiş, en iyi gelişim ve maksimum astaksantin miktarını belirlemişlerdir. Kuru ağırlık ölçümlerinde glikoz (10.63 gL⁻¹) ve mannozun (10.17 gL⁻¹) hücrel gelişim için en iyi karbon kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Astaksantin miktarının ise kuru ağırlık tespitinde olduğu gibi glikoz ve mannoz ile hazırlanan ortamlarda en yüksek değere ulaştığını tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonucu olarak laktozun en fakir karbon kaynağı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Khalil vd., (2010), *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil*'in 4-10 aralığındaki pH'larda gösterdikleri hücrel

gelişim ve biyokimyasal içeriklerindeki değişimi ortaya koymak amacıyla 10 günlük deney süresince kuru ağırlık, pigment ve antioksidan miktarlarındaki farklılıkları gözlemişlerdir. *Dunaliella bardawil* için maksimum kuru ağırlık değerine pH 7-7.5 aralığında ulaşıldığını, *Chlorella ellipsoidea*'de pH artışına paralel olarak kuru ağırlık miktarının arttığını belirtmişlerdir.

Pigment (klorofil a ve b) miktarının *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil*'da pH 4, 6 ve 7'de yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. *Chlorella ellipsoidea*'da protein miktarının pH 4, 6 ve 9'da sırasıyla 61.9, 82.8, 74.6 mg/g olduğunu, karbonhidrat miktarının ise protein miktarının aksine pH 9'da 85.1mg/g maksimum değerine ulaştığını tespit etmişlerdir.

Gong vd., (2014), stres koşullarının mikroalglerin biyokimyasal yapısı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla *Chlorella vulgaris* üzerinde araştırmalar yapmışlardır. Bu araştırmada mikroalglerden elde edilen biyodizelin maliyetini azaltma hususunda anahtar role sahip olan hücresel gelişimin önemi sebebiyle *Chlorella vulgaris*'i farklı stres koşullarına tabi tutulmuşlar ve kültür ortamlarının aydınlatılmasında 3960, 7920 ve 11920 lüks şiddetinde ışık kaynakları kullanılmışlardır. Ayrıca pH'nın etkilerini ortaya koyabilmek için pH 7, 8, 9 ve 10 değerinde kültür ortamları hazırlanmışlardır. 20 günlük inokülasyon süresi sonunda sadece pH faktörlü ortamda, pH 10'da gelişim maximum olurken,

3690 l x ışıktada hücre sayısının benzer şekilde yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Sakarika vd., (2016), *Chlorella vulgaris*'in optimum pH değerini belirlemek için yaptıkları çalışmada dokuz farklı pH değerine sahip sıvı kültür hazırlamışlardır. Bu amaçla, heterotrofik koşullarda 20-25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda, sülfür sınırlaması yapılmış *C. vulgaris* kültür ortamlarında optimum pH'ı belirlenmeye çalışmışlardır. Dar aralıklı pH (3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9.5, 11) denemelerinde inkübasyon süresi sonunda pH artıkça gelişim oranının arttığını tespit etmişlerdir. pH 5-7 aralığında gelişim süresinin 10 gün devam ettiğini, pH 7-8'de 8. günün sonunda gelişimin durduğu belirlemişlerdir.

Rafiqul vd., (2005) *Spirulina plantesis* ve *Spirulina fusiformis*'in biyokimyasal değişimi ve hücresel gelişim oranına sıcaklık, ışık, pH gibi ayırt edici çevresel faktörlerin katkısını araştırmışlardır.

Zarouk ortamında 32  C, 2500 l x ışık ve pH 9'da *Spirulina fusiformis*'in hücresel gelişiminin optimum olduğu, *Spirulina plantesis*'in ise 37  C, 2500 l x ışık ve pH 10'da optimum büyümeye ulaştığı belirlenmiş ve çevresel faktörlerin bu organizmalar üzerindeki etkisi ortaya koymuşlardır.

Li vd., (2008) yeşil alg türü olan *Neochloris oleoabundans*'in hücre gelişimi ve lipid birikimine azot kaynağının etkisini belirlemek amacıyla üre, amonyum bikarbonat ve sodyum nitrat gibi farklı azot

kaynakları denemiş ve en iyi azot kaynağı belirlendikten sonra farklı konsantrasyonlardaki (3, 5, 10, 15, 20 mM) gelişim ve lipid miktarlarını tespit etmişlerdir. Çalışma sonunda kuru ağırlık miktarlarına göre değerlendirme yapılarak en iyi azot kaynağının (2.5 g/l) sodyum nitrat olduğu belirlenmiştir ve farklı konsantrasyon denemelerinde maksimum kuru ağırlık miktarına 3.15 g/l ile sodyum nitratın 10 mM konsantrasyonunda ulaşıldığını ifade etmişlerdir. Lipid miktarının ise konsantrasyon miktarı arttıkça azaldığı ve 20 mM konsantrasyonda minimum değerde olduğunu rapor etmişlerdir.

Converti vd., (2009), biyodizel üretiminde önemli bir yeri olan mikroalglerde lipid ve hücresel gelişimin artırılması amacıyla *Chlorella vulgaris* ve *Nannochloropsis oculata*'da sıcaklık ve azot konsantrasyonlarındaki değişiminin etkisini ortaya koymak amacıyla 15, 20, 25, 30, 35, 38 °C sıcaklıkta ve farklı NaNO₃ konsantrasyonunda sıvı kültür ortamları hazırlamışlardır. *C.vulgaris* için 25 °C sıcaklığın gelişim açısından daha elverişli olduğu ve lipid miktarları kıyaslandığında yine aynı sıcaklıkta maksimum değer olan 14.71 (glipid(100 g kuru alg)⁻¹) miktarına ulaşıldığını tespit etmişlerdir. *N. oculata*'da ise en iyi gelişim ve lipid miktarının 15 °C de elde edildiği ve konsantrasyon kıyaslamalarında *Chlorella vulgaris* 'de 0.14 µ^a(gün⁻¹) en iyi gelişim oranına NaNO₃'ün 1.5 gL⁻¹ konsantrasyonunda *N. oculatada* ise 0.3 gL⁻¹ konsantrasyonda maksimum değerde olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mujtaba vd., (2012), iki aşamalı olarak kültüre alınan *C. vulgaris*'in lipit ve gelişim miktarlarını kıyaslanmışlardır. Bu aşamalardan ilkinde 2 mg/L PO₄, 100 µmol m⁻²/s ışık yoğunluğu, 0.25 vvm CO₂ yoğunluğuna sahip kültür ortamında inoküle edilen *Chlorella vulgaris*'in kuru ağırlığında başlangıç miktarına göre %43 artış meydana gelirken, lipit miktarını ise 77.8 mg/L olarak belirlemişlerdir. İkinci hazırlanmış kültür ortamı olan 5 mg/L NO₃, 2 mg/L PO₄, 100 µmol m⁻²/s ışık yoğunluğu ve 0.25 vvm CO₂ ihtiva eden kültür ortamında ise kuru ağırlığın başlangıç miktarına göre %53 arttığını, lipit miktarının ise 77.1 mg/L olarak maksimum seviyeye ulaştığını belirtmişlerdir.

Arora vd., (2016), *Chlorella minutissima*'nın azot ve fosfat sınırlaması yapılan kültürlerindeki gelişimini izlemişlerdir. Bu çalışmada, 10 günlük deney sürecinde farklı azot-fosfat kombinasyonları denemişler (N⁺P⁺, N⁺P⁻, N⁺P^L, N^LP⁺, N^LP^L) ve 5. günden itibaren hızlı bir değişimin olduğunu ortaya koymuşlardır. Deneme süresinin sonunda en iyi gelişimin N⁺P⁺ koşulunda gerçekleştiğini (1.2 ±0.04 g/L), maksimum lipit miktarına ise N^LP^L kombinasyonunda ulaşıldığını tespit etmişlerdir.

Wu ve Xiaoling Miao (2014), azot konsantrasyonunun biyodizelin niteliği üzerindeki etkilerini incelemek üzere yaptıkları çalışmada farklı azot konsantrasyonlarına sahip sıvı kültürlerde 14 gün süreyle çeşitli analizler yapmışlardır. Bu çalışmada 0, 0.3, 0.6, 0.9 ve 1.5 g/L azot konsantrasyonuna sahip kültür ortamlarına alınan

Chlorella pyrenoidosa ve *Scenedesmus obliquus*'da 14 gün süreyle kuru ağırlık, protein, lipit, karbonhidrat gibi metabolitlerin miktarındaki değişimi incelemişlerdir. *Chlorella pyrenoidosa*'da 1.5 g/L azot konsantrasyonlu sıvı besi yerlerinde kuru ağırlık ve protein miktarının maksimum değere ulaştığını, *Scenedesmus obliquus* için ise bu maksimum konsantrasyon değerinin kuru ağırlık için 0.6 g/L ve protein için ise 1.5 g/L olduğunu tespit etmişlerdir.

Mohammadi vd., (2016), *C.vulgaris*'in lipit ve biomas üretkenliği üzerine etkili parametreleri ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışmada farklı sıcaklık değerleri, ışık şiddeti, fotoperiyot ve karbonat konsantrasyonları gibi faktörleri ele almışlardır. Sadece sıcaklık faktöründe değişiklik yapılan kültür ortamlarında, 25, 30, 35°C sıcaklıklarda biomas ve lipit miktarları incelenmiş, 30 °C'de optimum gelişim ve maksimum klorofil miktarına ulaşılmıştır. 25°C'den 35°C doğru değişen sıcaklık değişikliklerinde lipit miktarının %12.2'den %7.1'e azaldığı belirlenmiştir. Farklı karbonat konsantrasyonlarında ise, maksimum gelişim oranının 0.2 g/L konsantrasyonunda gerçekleştiği *C. vulgaris* için optimum ışık şiddetinin 3500 lüks ve fotoperiyotun ise 12:12 (A/K) olduğu rapor etmişlerdir.

Chu vd., (2013), sıvı kültür ortamındaki azot ve fosfor miktarının biomas ve lipit miktarı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. *C. vulgaris* kültürleri için 5 farklı sıvı kültür ortamı hazırlamışlardır. Bu kültür ortamları; kontrol grubu, N-P, N-PL, N-P-

gibi kültür ortamlarından oluşmuş ve 14 gün boyunca bu kültür ortamlarından alınan örneklerde biomas ve lipit miktarlarını kıyaslamışlardır. En iyi gelişimin görüldüğü kültür ortamının N-P⁻ ve kontrol grubu olduğunu ifade etmişlerdir. Başlangıçta %24.6 olan total lipit miktarının 14. günün sonunda N-P⁻ ortamda %54.88 ile maksimum değere ulaştığını tespit etmişlerdir.

Chakraborty vd., (2016), mikroalglerden biyodizel üretimi amacı ile sıvı besiyerlerinde üretilen *Chlorella minutissima*'nın lipit artırımı olanaklarının incelendiği çalışmada, sıcaklık, ışık yoğunluğu, azot-fosfat konsantrasyonu gibi parametrelerde yapılan değişiklikler ve bu değişikliklerin lipit üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada, 15, 20, 25, 30, 35°C sıcaklıkta, 0-3 mM fosfat, 0-25 mM azot, 60-160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda değişiklikler yapmışlardır.

Optimum sıcaklık değerinin 25 °C ve ışık şiddeti ise 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ olarak belirlenen kültür ortamlarında 1.8 mM fosfat ve 25 mM azot konsantrasyonlarında maksimum biyomasa (1.2 g/l) ulaşıldığını ifade etmişlerdir. Ayrıca kültür ortamlarında azot konsantrasyonundaki artışın lipit miktarında azalmaya sebep olduğunu maksimum lipit miktarının 5 mM azot, 0.5 mM fosfat konsantrasyon, 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 35 °C sıcaklıktaki ortamlarda elde edildiğini belirtmişlerdir.

Ördög vd., (2016), sıcaklık ve azot eksiliğinin lipit, protein ve biomas üzerindeki etkilerini *Chlorella*'nın üç farklı türünde

incelemişlerdir. *Chlorella* türlerini, sıcaklık (20, 25, 30 °C) ve azot eksikliğinin (%2, 3,10); lipid, protein ve biomas miktarında sebep olduğu değişimi kıyaslanmak üzere farklı kültürlere almışlar ve tüm türlerde altıncı günün sonunda 25 °C sıcaklıkta ve %10 azot konsantrasyonunda kuru ağırlığın (mg/L) maksimum değere ulaştığını tespit etmişlerdir. Çalışmada, lipid miktarlarının azot konsantrasyonu artıka azaldığı ve protein miktarının ise arttığını ifade etmişlerdir.

González-Garcinuño vd., (2014), *Scenedesmus abundans* ve *Chlorella ellipsoidea*’da lipid miktarı ve hücre yoğunluğuna, farklı azot kaynaklarının etkilerini inceledikleri çalışmada; *Chlorella ellipsoidea*’da azot kaynağı olarak NH_4NO_3 ’ın kullanıldığı kültür ortamlarında hücre sayısının ve lipid miktarının maksimum olduğunu, *Scenedesmus abundans* da ise %6.6 lipid/biomas değeri ile lipid miktarının maksimuma ulaştığı, $45.25 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ biomas verimliliğinin de yine aynı azot türü olan NH_4NO_3 ’lü kültürlerde maksimum olduğunu tespit etmişlerdir. Lipit artışı için en iyi azot kaynağının NH_4NO_3 olduğunun tespit edilmesinden sonra farklı azot konsantrasyonu denemeleri yapmışlar ve *S. abundans*’ın %0.1 konsantrasyonunda, *C. ellipsoidea*’nın ise % 0.01 amonyum nitrat konsantrasyonunda maksimum hücre sayısına ulaştığını tespit etmişlerdir.

Feng vd., (2012), azot ve fosfor gibi temel nutrientlerin *Chlorella zofingiensis*’in kuru ağırlık ve lipid birikimi üzerindeki

etkilerini inceledikleri çalışmada, farklı fosfor ve azot konsantrasyonlarına sahip sıvı besi yerleri oluşturularak denemeler yapmışlar ve kuru ağırlık analizlerinde NaNO_3 ile hazırlanan kültür ortamlarında 1.0 g/L konsantrasyonda, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ile hazırlananlarda ise 0.01 g/L'de maksimum miktara ulaşıldığını belirtmişlerdir. Çalışmanın sonucunda lipit ve hücre sayısı bakımından azotun fosfata kıyasla daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Das vd., (2011), farklı dalga boyundaki ışığın mikroalglerin gelişimi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada, 470 nm dalga boyuna sahip mavi led ile yapılan aydınlatmada *Nannochloropsis* sp. de, fototrofik koşullar altında, kırmızı, yeşil ve beyaz ledlere kıyasla, yüksek palmitoleik asit ve düşük EPA içeriği; miksotrofik büyümede mavi, yeşil ve beyaz ışıktaki düşük yağ asiti; fototrofik koşullar altında da benzer yağ asiti içeriği elde edildiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada 550 nm dalga boyuna sahip yeşil led ile aydınlatılan *Nannochloropsis* sp. kültürlerinde ise fototrofik koşullar altında floresan ve kırmızı, beyaz ledlere kıyasla yüksek araşidonik asit içeriği tespit etmişlerdir. 680 nm dalga boyuna sahip kırmızı led ile aydınlatmada ise fototrofik koşullar altında, mavi, yeşil, beyaz ledlere kıyasla, *Nannochloropsis* sp. de yüksek oleik asit içeriğinin olduğunu ifade etmişlerdir.

Liang vd., (2009), *Chlorella vulgaris*'de farklı büyüme koşullarında biomas ve lipit üretimindeki değişimleri

araştırmışlardır. Kùltürler ototrofik ve heterotrofik olarak büyümeye alınmış, ototrofik büyüme ile daha yüksek lipit içeriğinin (% 38) sağlandığı, heterotrofik büyümede ise glikoz, asetat ve gliserol kullanımı ile çok daha az lipit üretimi olduğunu saptanmışlardır. Optimal hücre yoğunluğu (2 g l^{-1}) ve lipit üretimine ($54 \text{ mg}^{-1} \text{ gün}^{-1}$) % 1 glikoz kullanımında ulaşıldığını belirtmişlerdir.

Petkov ve Garcia (2007), farklı *Chlorella* türlerindeki lipit oranını incelemişlerdir. Lipit oranlarını karşılaştırmak için, farklı *Chlorella* türlerini fototrofik, heterotrofik ve dış ortam koşullarında üretmişler, türler üzerinde N eksiltmesi uygulayarak yağ içeriklerini incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre 20 karbonlu ve 4 ya da 5 çift bağılı yağ asidinin tür farklılığından kaynaklanmadığı değerlendirilmiş ve tatlı su alglerinden *C. pyrenoidosa*'nın fototrofik olarak yetiştirildiğinde N eksiltmesinin yağ asidi miktarının artışına sebep olduğunu tespit etmişlerdir.

Wang vd., (2007), yaptıkları çalışmada, fototrofik kùltür koşulunda kırmızı (620-645nm), mavi (460-475nm), yeşil (515-540nm), sarı (587-595nm) ve beyaz (380-760nm) renklerdeki led ışık kaynağı kullanımının, *Spirulina platensis*'in gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Işık kaynağı olarak 5 voltluk ve maksimum $3000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluklu led ampuller seçmişler ve çalışmanın sonucunda beş günlük inokùlasyon süresi boyunca en iyi gelişimi, kırmızı led ışıkla aydınlatılan kùltürlerde elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Katsuda (2004), fotosentetik bir mikroalg türü olan *H. pulvialis*'in potansiyel bir astaksantin kaynağı olduğunu belirterek hücre içerisindeki astaksantin miktarını artırmak için mikroalg kültür denemelerinde farklı stres faktörleri kullanılarak denemeler yapmış ve yapılan çalışmada kırmızı (625nm), yeşil (525nm), mavi-mor (410nm) ve mor (380nm) renkli led aydınlatmalar kullanarak *H. pulvialis*'in ışık stresi koşuluna verdiği cevabı araştırmıştır. Çalışmada bu koşullarda değişen hücre sayısı ve astaksantin miktarları değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonunda hücre konsantrasyonunun (0.025 mg kuru ağırlık cm⁻³) kırmızı ışıktaki astaksatin miktarının ise mavi led aydınlatmalı ortamda maksimum değere ulaştığını tespit etmiştir.

Mohsenpour ve Willoughby (2013), *Chlorella vulgaris*'i fotobiyoreaktörlerde kültüre alarak ortamın ışık renginin hücre sayısı, pigment miktarı üzerindeki etkilerini araştırmışlar, kırmızı, mavi, yeşil, sarı, turuncu ışık renginde ve düşük ya da yüksek yoğunluktaki ışıktaki kültür ortamları hazırlamışlardır. Hem yüksek hem de düşük ışık yoğunluğunda ve mavi, sarı, turuncu ve kırmızı geniş spektrumlu ışık kaynaklarına kıyasla, yeşil ışıktaki yüksek klorofil birikimi elde edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca 14 gün devam eden inokülasyon süresi sonunda maksimum hücre sayısına ise kırmızı ışıktaki ulaşıldığını ortaya koymuşlardır.

Keeling (2013); Marriott ve Blankenship (2011), Işık kaynağından yayılan ve alglerdeki klorofil molekülleri tarafından

tutulan, mavi veya kırmızı dalga boylu birçok fotonun, hücresel yapı, pigment kompozisyonu ve kloroplast üzerinde etkili olduğunu belirterek alg türlerinin en iyi büyüme gerçekleştirmek için, ya mavi ışık (420–470 nm) ya da kırmızı ışığı (660 nm) tercih ettiğini tespit etmişlerdir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Chlorella vulgaris' in Temini

Tatlı sularda geniş yayılım gösteren *Chlorella vulgaris* 'i de içerisinde bulunduran plankton örnekleri Keban Baraj Gölü'nden toplanmıştır. Toplanan fitoplankton örneklerinden mikroskopik ve kültürel metotlarla *C. vulgaris* izole edilmiştir.

2.2 Chlorella vulgaris' in İzolasyonu

C. vulgaris örnekleri plankton ağı yardımıyla araziden toplandı ve Fırat Üniversitesi Algal Biyoteknoloji Laboratuvarı'na getirilerek inverted mikroskop altında mikropipetler yardımı ile alınarak fitoplankton örnekleri içerisinde *C. vulgaris* izole edildi.

100 ml Jaworski sıvı besiyeri 250 mililitrelik erlenlere konulduktan sonra bu ortama 2 gr agar-agar (Difco) ilave edildi. Hazırlanan erlenlerin ağzı sıkıca kapatılarak 120 °C 1 atm basınçta 30 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besi yerleri 40-45 °C sıcaklıkta el yakmayacak kadar soğutuldu, petrilere

dökülerek kapakları kapatıldı ve homojen şekilde besiyerinin dağılması için düz zeminde çalkalandı. Bir sonraki güne kadar bekletilen katı besiyeri ortamına alglerin bulunduğu örneklerden steril öze ile yayma yöntemi kullanılarak ekim yapıldıktan sonra petri kutuları 23 ± 1 °C $55\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışıktta 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyotta iklimlendirme kabinine bırakıldı. Yaklaşık beş gün iklimlendirme kabininde bekletilen petrilere kolonilerin oluşmaya başladığı görüldü. Bu koloniler mikroskopta incelenerek *C.vulgaris* olduğu belirlenen kolonilerden öze ile tekrar örnekler alınarak petrilere ekimler yapıldı, bu işlem birkaç kez tekrar edilerek petrilere yalnızca *Chlorella vulgaris*' in üremesi sağlandı.

2.3 Stok Kültürlerin Hazırlanması

Petri kutularındaki kolonilerinden öze yardımı ile *C. vulgaris* örnekleri alınarak Jaworski sıvı besi ortamına aşılama yapıldı. Aşılama yapılan bu erlenler 23 ± 1 °C $55\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışıktta 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyodunda iklimlendirme kabininde beklemeye bırakıldı. Sıvı kültürler günde üç kez çalkalanarak stok *C. vulgaris* kültürleri hazırlandı.

2.4 Farklı Işık Dalgaboyunda Kültür Ortamlarının Hazırlanması

C. vulgaris'in hücre sayısı, protein, gliserol ve pigment (Astaksantin ve klorofil a, b) miktarlarına ışığın dalga boyunun etkisini belirlemek amacıyla; beyaz, kırmızı, yeşil ve mavi renklerle

aydınlatılan iklimlendirme kabinine, içerisine 150 mL Jaworski sıvı besiyeri ve 50 mL de stok *C. vulgaris* kültüründen ilave edilen erlenler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık peryotta (16A/8K), 23±1 derece sıcaklığa ayarlanmış olan iklimlendirme kabinine yerleştirildi

2.5 Farklı pH' lı Sıvı Besiyerlerinin Hazırlanması

pH'ın *Chlorella vulgaris*'in hücre sayısı, protein, gliserol ve pigment (Astaksantin ve klorofil a, b) miktarlarına etkilerini araştırmak için 4, 6, 7, 8 ve 10 pH' ya sahip sıvı besi ortamları hazırlandı. Jaworski sıvı besi ortamının pH ayarlaması için %5'lik NaOH- HCl kullanıldı. Kontrol kültürü olarak standart Jaworski sıvı besi ortamı kullanıldı. Kontrol grubunun pH'ı, pH metre ile llerek 7.2 olarak belirlendi.

2.6 Farklı Azot Kaynaklarının Kullanıldığı Besiyerlerinin Hazırlanması

Farklı azot kaynaklarının *Chlorella vulgaris*'in protein, hücre sayısı, gliserol ve pigment miktarına olan etkisini belirlemek için standart Jaworski besiyerindeki tüm azot kaynakları çıkarıldı ve yerine aynı miktarda NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ ve NH₄NO₃ konularak farklı N kaynaklı besiyerleri oluşturuldu. Kontrol grubu olarak standart Jaworski besiyeri kullanıldı.

2.7. Farklı Azot Konsantrasyonlarında Besiyerlerinin Hazırlanması

Azot kaynağı çalışmasının ardından en iyi azot kaynağının NH_4NO_3 olduğu belirlendi ve bu azot kaynağı için en iyi konsantrasyonun bulunmasına yönelik ön çalışmalar yapıldı. Bunun için 0.3, 0.9, 1.5 g/L azot konsantrasyonlarında hazırlanan sıvı besiyeri ortamları hazırlandı. *C. vulgaris* örnekleri farklı azot konsantrasyonuna sahip sıvı besi yerlerinde geliştirilerek protein, hücre sayısı, gliserol ve pigment miktarındaki değişiklikler incelendi.

2.8 Farklı PO_4 Konsantrasyonlarında Besiyerlerinin Hazırlanması

PO_4 'ın *Chlorella vulgaris*' in protein, hücre sayısı, gliserol ve pigment miktarına olan etkisini belirlemek için standart Jaworski besiyerindeki KH_2PO_4 konsantrasyonları değiştirilerek farklı PO_4 konsantrasyonlarına sahip sıvı besiyerleri oluşturuldu.

KH_2PO_4 (0.01, 0.04, 0.2 g/L) konsantrasyonlarında Jaworski's sıvı besi yerleri hazırlandı. Kontrol kültürleri için ise standart Jaworski sıvı besi ortamı kullanıldı.

2.2. Analitik Ölçümler

2.2.1. Hücre Sayımı

Sıvı besiyerindeki *Chlorella vulgaris*'in hücre sayımı on gün süreyle mikroskopta hemositometre ile yapıldı ve her bir kültürden alınan üçer örnek sayılarak bulunan değerlerin aritmetik ortalaması alındı ve standart sapmaları hesaplandı. Ayrıca, aynı kültürlerden alınan örneklerin optik yoğunluğu belirlemek için de on gün süresince Jenway 6105 marka spektrofotometrede absorbans değerleri okundu. Bu absorbans değerleri mikroskopta yapılan ölçümlerle karşılaştırıldı ölçümler ve mikroskoptaki hücre sayımları üç tekrarlı olarak yapıldı ve aritmetik ortalamaları alınarak hücre sayıları belirlendi (APHA, 1985).

2.2.2 Pigment Analizi

Klorofil analizi için *C. vulgaris*'in sıvı kültürlerinden 10 ml alınarak 0.45µl por açıklığına sahip filtre kağıtlarından süzüldü ve örnekler oda sıcaklığında 2 saat kurumaya bırakıldı. Kuruyan filtre kağıtları, içinde 10 ml aseton bulunan deney tüplerine konulup ağzıları sıkıca kapatılarak çalkalandıktan sonra 4°C buzdolabında 24 saat karanlıkta bekletildi. Buzdolabından çıkarılan örnekler 3500 rpm' de 5 dakika santrifüj (SCILOGEX) edildikten sonra üstteki berrak kısım alınarak spektrofotometrede 630, 645, 665 ve 750 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu değerler 750 nm'de okunan absorbans değerlerinden çıkarılıp düzeltildi ve denkleme yerleştirilerek klorofil a ve b miktarları hesaplandı (Strickland ve Parson, 1963).

Hesaplama:

$$\text{Klorofil a} = 11,6 \times D665 - 0,14 \times D630 - 1,31 \times D645$$

$$\text{Klorofil b} = 20,7 \times D645 - 4,34 \times D665 - 4,42 \times D630$$

$$\mu\text{g klorofil (a,b)} / \text{L} = \text{klorofil (a,b)} \times v / l \times V$$

$$V (\text{L}) = \text{Filtre edilen su örneği}$$

$$v (\text{ml}) = \text{Kullanılan aseton}$$

$$l (\text{cm}) = \text{Işık yolu}$$

2.2.3. Astaksantin Analizi

C. vulgaris örneklerdeki astaksantin miktarını belirlemek için Boussiba metodu kullanıldı (Boussiba ve Vonshak, 1991). Hazırlanan kültür örneklerinden 5 ml deney tüplerine alınarak 10 dakika 4000 rpm’de santrifüj edildi. Deney tüplerindeki supernatant kısım dökülüp çökeltiliye %30’luk metanol ve %5’lik KOH ilave edildikten sonra 65°C su banyosunda 15 dakika bekletildi. Tüplerdeki supernatant kısım tekrar döküldü ve saf su ile santrifüjde 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra çökeltiliye 5 ml DMSO eklendi. Ardından 10 dakika sonikasyon (3,0 kHz) işlemi uygulandı (BANDELIN SONOPLUS UW 2070). Örnekler 490 nm’de absorbansları belirlendi. Astaksantin miktarı aşağıdaki denklem yardımı ile hesaplandı (Davies, 1976);

$$c(\text{mg/L}) = 4,5 \times A_{490} \times V_a / V_b$$

c = Birim hacimdeki astaksantin konsantrasyonu

V_a = extre edilen örneğin hacmi

V_b = kültür rneği hacmi

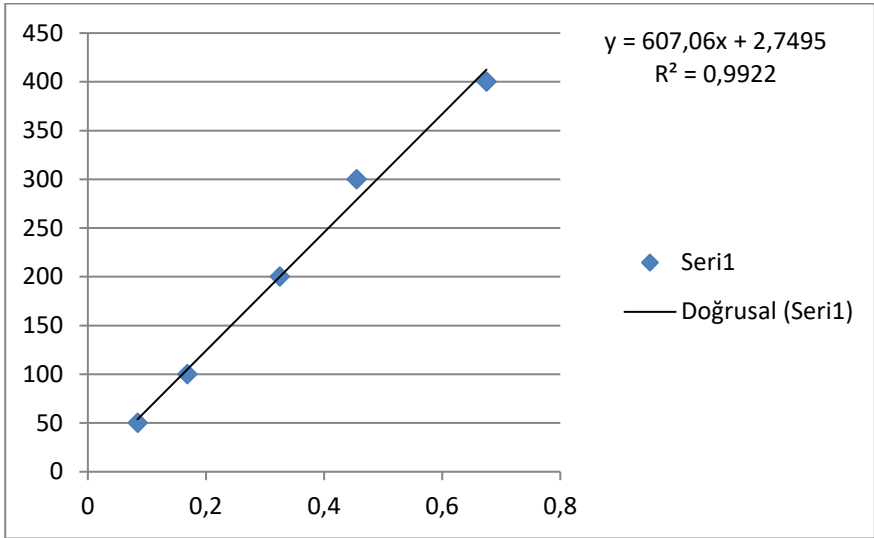
A_{490} = 490 nm de okunan absorbans değeri

2.2.4. Protein Analizi

Chlorella vulgaris kültürlerinde protein miktarlarındaki değişimi belirlemek amacıyla 1 ml örnek deney tüplerine alınarak üzerine 100µl DOC ilave edildikten sonra 10 dakika kadar örnekler beklemeye bırakıldı. Ardında deney tüplerine 100 µl TCA eklenip 5 dakika daha beklenilerek 7500 rpm’de örnekler santrifüj edildi.

Deney tüplerindeki örneklerin supernatant kısmı döküldü ve çökelti üzerine 1 ml Lowry zeltisi ilave edilerek 30 dakika beklemeye bırakıldı. Bekleme süresinin sonunda deney tüplerine hızlıca 500 µl Folin zeltisi ilave edildi ve 750 nm’de spektrofotometrede okumalar yapıldı (Lowry, 1951). Protein miktarlarının hesaplanması için hazırlanan protein standart eğrisi kullanıldı (şekil. 2.1).

şekil 1. Protein Standart Eğrisi



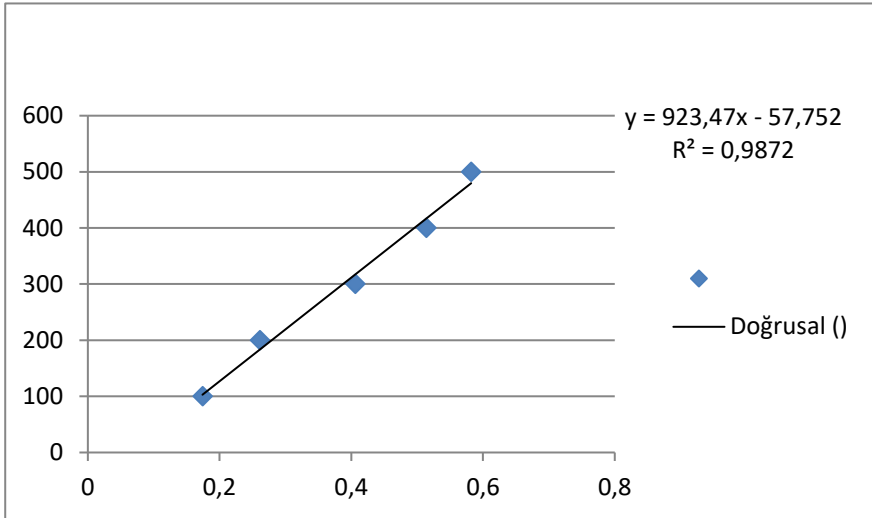
2.2.5. Gliserol Analizi

C. vulgaris örneklerinin gliserol miktarı Sturgeon vd., (1979) metodu ile belirlendi. Bunun için gliserol standart eğrisi ve fosfat tamponları hazırlandı. Gliserol standart eğrisini oluşturmak için 1 ml gliserol 1 lt saf su suda seyreltildi ve ardından bu çözelti belli konsantrasyonlarda hazırlanıp 570'nm de spektrofotometrede okundu. Standart eğri çizildi ve böylece hesaplamalarda kullanılan denklem elde edildi.

Fosfat tamponu ise 5-15mM ve pH 7 olacak şekilde; 0,39 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0,895 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ erlene konulup 1 lt

safsu ilave edilerek karıştırıldı. Hazırlanan tamponun pH'sı pH metre ile 7'ye ayarlandı. (Şekil 2.2)

Şekil 2. Gliserol Standart Eğrisi



Gliserol analizi için 2 ml örnek tüplere alındı ve 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Supernatant kısımlar atıldıktan sonra 5 mM fosfat tamponu ilave edilerek yıkama işlemi yapıldı. Tekrar santrifüj işlemi yapılmasının ardından çökeltiliye 1 ml 15 Mm fosfat tamponu ilave edilerek 1 saat bekletildi. 5000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj yapıldıktan sonra üst kısım döküldü ve çökeltili 1 ml saf su ile seyreltilti. Ardından 100 µl %30 luk TCA ilave edilerek tekrar 5000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi ve üst fazdan 200 µl alınarak üzerine 100 µl %1 lik NaIO₄ ilave edilip 15 dakika boyunca bekletildi.

%5'lik 100 µl Na₂SO₃ ilavesinin ardından 5 dakika daha bekletildi ve yeniden deney tüplerine her tüpten 100 µl alınarak pipetleme yapıldı. Deney tüplerine 50 µl %10'luk kromotropik asit ilave edilerek iyice karıştırıldı ve yavaşça 500 µl H₂SO₄ ilave edilerek tüplerin ağzı sıkıca kapatıldı. Örnekler su banyosunda 10 dakika bekletildi ve su banyosundan çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Soğuyan tüplerdeki örnekler 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Deney hazırlık sürecinde hazırlanan gliserol standart eğrisindeki denklem ($y=923,47x-57,752$) ile gliserol miktarları hesaplandı.

3. Bulgular

Bu çalışmada *C.vulgaris*'in hücre sayısı, pigment (astaksantin ve klorofil a, b), protein ve gliserol miktarı üzerinde farklı dalgaboyuna sahip ışığın, pH'ın, farklı azot kaynaklarının, fosfat ve azot konsantrasyonlarının etkileri incelenmiştir.

3.1 Işık Dalga boyunun *C.vulgaris*'in Gelişim, Protein, Gliserol ve Pigment (astaksantin ve klorofil a, b) Miktarına Etkisi

3.1.1 Işık Dalga boyunun *C. vulgaris*' in Gelişimi Üzerindeki Etkisi

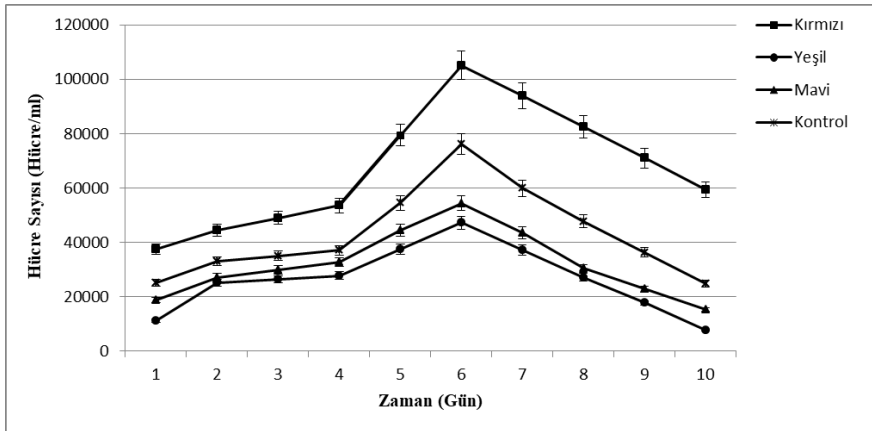
Farklı dalga boyuna sahip ışık ile aydınlatılan sıvı kültürlerde *C.vulgaris*'in büyüme karakteristiklerini araştırmak üzere, kırmızı (660nm), mavi (450nm), yeşil (550nm) ve beyaz ışık (400-700nm) ile aydınlatılan sıvı kültür ortamlarındaki *Chlorella vulgaris*'in on

gün süresince hücre sayılarındaki değişimler her gün alınan örneklerde incelenmiştir. Stok kültürlerden alınarak farklı dalga boyundaki ışık ile aydınlatılan kültürlerle inoküle edilen *C. vulgaris*'in bütün kültürlerde inokülasyonun yapıldığı gün hücre sayısının 11000 hücre/ml olduğu tespit edilmiştir. Aşılamayı takip eden 1. günde kontrol kültürlerinde hücre sayısı ortalama 25204 hücre/ml olurken, yeşil ışık ile aydınlatılan kültürlerde 11307 hücre/ml, mavi ışık ile aydınlatılanlarda 18834 hücre/ml ve kırmızı ile aydınlatılanlarda ise 37653 hücre/ml olduğu görülmüştür. İkinci gün farklı ışık kaynakları ile aydınlatılan kültürlerin hepsinde *C. vulgaris*'in gelişimi devam etmiş ve kontrol kültürlerinde 33021 hücre/ml, mavi ışık ile aydınlatılan kültürlerde 27230 hücre/ml, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda 25204 hücre/ml ve kırmızı ışık ile aydınlatılan kültürlerde ise 44602 hücre/ml'ye ulaşılmıştır. Hücre sayısındaki artış bütün kültürlerde üçüncü ve dördüncü günde de devam ederek beşinci günde kontrol kültürlerinde 54590 hücre/ml'ye, yeşil ışık ile aydınlatılan kültürlerde 37508 hücre/ml, mavi ışık ile aydınlatılanlarda 44601 hücre/ml ve kırmızı ile aydınlatılan *C. vulgaris* kültürlerinde ise 79.349 hücre/ml'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Altıncı güne kadar hücre sayıları sürekli olarak artan kültürlerde altıncı gün yapılan sayımlarda kontrol kültürlerinde hücre sayısının ortalama 76106 hücre/ml olduğu, yeşil ışık ile aydınlatılan kültürlerde 54472 hücre/ml, mavi ışık ile aydınlatılanlarda 47207 hücre/ml ve kırmızı ile aydınlatılanlarda ise

105122 hücre/ml olduğu görülmüştür. Altıncı günden sonra ise *C. vulgaris* kültürlerinde hücre sayısının giderek azaldığı belirlenmiştir.

Çalışma süresi sonunda, en yüksek hücre sayısının kırmızı ışıkla aydınlatılan kültürlerde, en düşük büyümenin ise yeşil ışıkla aydınlatılan kültürlerde gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 3.1.). İnokülasyon günü 11000 hücre/ml olan *Chlorella vulgaris*' in sıvı kültürlerde maksimum sayıya ulaştıkları altıncı günde artış oranlarının kontrol kültürlerinde ortalama % 591, kırmızı ışık ile aydınlatılan kültürlerde % 855, yeşil ışık ile aydınlatılan kültürlerde % 329 ve mavi ışık ile aydınlatılan kültürlerde ise % 395 olduğu, en yüksek artış oranının kırmızı ışık ile aydınlatılan kültürlerde, en düşük hücre artışının ise yeşil ışık ile aydınlatılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Şekil 3.1. Farklı dalga boyuna sahip ışık kaynaklarının *C. vulgaris*'in hücre sayısına etkisi



3.1.2 Işıık Dalga boyunun *C. vulgaris*'in Protein Miktarına Etkisi

Işıık dalga boyunun *Chlorella vulgaris*'in protein miktarı üzerindeki etkisini incelemek üzere beyaz, mavi, yeşil ve kırmızı ışıık ile aydınlatılan sıvı kùltùrlerden on gün süresince alınan örneklerde total protein analizleri yapılmıştır. Bütün kùltùrlerde inokùlasyonun yapıldığı gün total protein miktarının 30.00 µg/ml olduğu, aşılamayı takip eden birinci günde kontrol grubunda protein miktarının 72.81 µg/ml olduğu, yeşil ışıık ile aydınlatılan sıvı kùltùrlerde 34.95 µg/ml, mavi ışıık ile aydınlatılan kùltùrlerde 56.77 µg/ml ve kırmızı ışıık ile aydınlatılan kùltùrlerde ise protein miktarının 108.34 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Bütün kùltùrlerde protein miktarındaki artış ikinci gün de devam etmiş, kontrol kùltùrlerinde protein miktarı 129.64 µg/ml'ye ulaşırken kırmızı ışıık ile aydınlatılan kùltùrlerdeki artış daha yüksek olmuş ve 213.80 µg/ml olarak kaydedilmiştir.

Yeşil ışıık ile aydınlatılan kùltùrlerde protein miktarı 44.36 µg/ml ve mavi ışıık ile aydınlatılanlarda ise 80.45 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Sıvı kùltùrlere *C. vulgaris*'in aşılmasını takip eden üçüncü günde protein miktarındaki artış devam etmiş ve kontrol kùltùrlerinde 149.21 µg/ml, mavi ışıık ile aydınlatılanlarda 88.35 µg/ml, yeşil ışıık ile aydınlatılan kùltùrlerde 56.68 µg/ml olurken kırmızı ışıık ile aydınlatılan kùltùrlerde 219.92 µg/ml olarak kaydedilmiştir. İnokùlasyonu takip eden dördüncü günde kùltùrlerde protein miktarındaki artışın devam ettiği, kontrol kùltùrlerinden alınan örneklerde protein miktarının 168.78 µg/ml olduğu, mavi ışıık

ile aydınlatılan kültürlerde protein miktarının 96.26 µg/ml, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda 69.01 µg/ml ve kırmızı ışık ile aydınlatılanlarda ise protein miktarının 226.04 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. *Chlorella vulgaris* kültürlerinde zamana bağlı olarak protein miktarındaki artışın beşinci günde de devam ettiği görülmüştür.

Altıncı günde yapılan analizlerde protein miktarındaki artışın bütün kültürlerde maksimum düzeye ulaştığı, kontrol kültürlerinde protein miktarının 182.34 µg/ml olduğu, mavi ışık ile aydınlatılan kültürlerde protein miktarının 124.03 µg/ml, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda 104.72 µg/ml ve kırmızı ışık ile aydınlatılanlarda ise protein miktarının ise 266.04 µg/ml olduğu tespit edilmiştir.

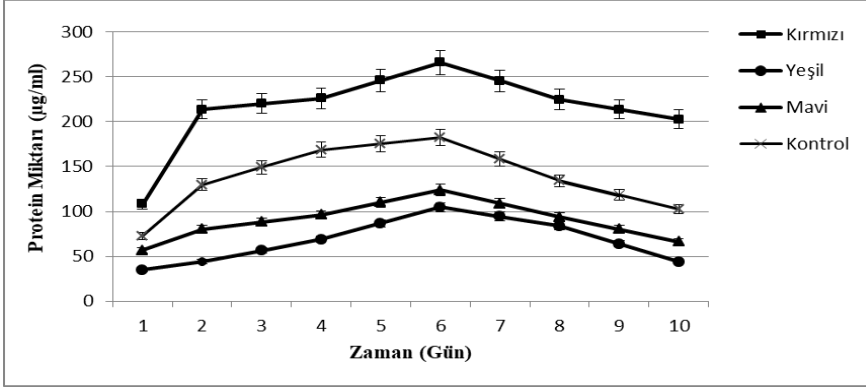
Altıncı günde kırmızı ışık ile aydınlatılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinden alınan örneklerde protein miktarının maksimum düzeyde olduğu görülmüştür.

Bütün kültürlerde aşılamaı takip eden altıncı güne kadar protein miktarında artışlar gözlenirken, altıncı günden sonra araştırma süresi sonuna kadar protein miktarında azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.2.). Sıvı besi ortamına aşılamanın yapıldığı güne oranla altıncı günde alınan örneklerde kontrol kültürlerindeki protein miktarında ortalama % 507 mavi ışık ile aydınlatılanlarda % 313, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda % 249 ve kırmızı ışık ile aydınlatılanlarda ise % 786 oranında artış olduğu belirlenmiştir.

Chlorella vulgaris kültürlerinde protein miktarındaki en iyi artışın kırmızı ışık ile aydınlatılan kültürlerde olduğu ve

inokülasyonu takip eden altı günlük sürede bu artışın olduğu, daha sonraki sürede protein miktarının azaldığı tespit edilmiştir.

Şekil 3.2. Farklı dalga boyuna sahip ışık kaynaklarının *C. vulgaris*'in protein miktarına etkisi



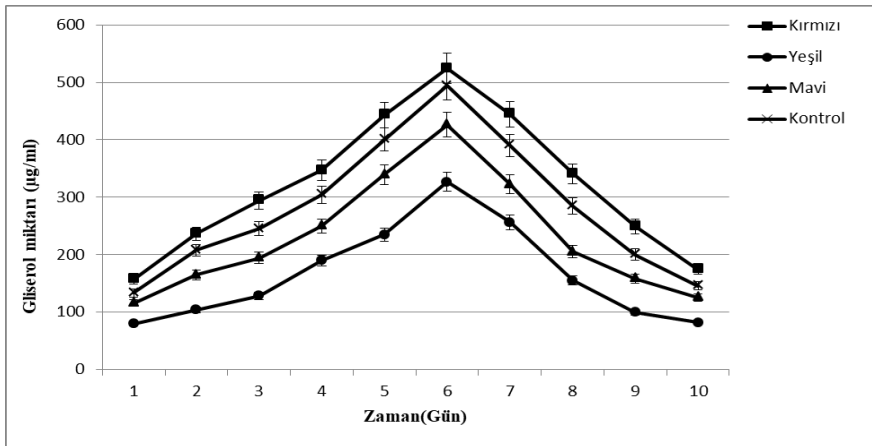
3.1.3 Işık Dalga boyunun *C. vulgaris*' in Gliserol Miktarına Etkisi

C. vulgaris'in gliserol miktarı üzerinde ışık dalga boyunun etkileri on gün süresince sıvı kültürlerden alınan örneklerde incelendi. Farklı dalga boyuna sahip ışıkla aydınlatılan kültürlerde inokülasyonun yapıldığı gün gliserol miktarı 70.75 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Birinci günde kontrol grubunda 133.32 µg/ml olan gliserol miktarı kırmızı ışıkla aydınlatılan kültürlerde 156.94 µg/ml'ye, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda 80.23 µg/ml'ye ve mavi ile aydınlatılan kültürlerde ise 115.54 µg/ml'ye ulaşmıştır. İkinci ve üçüncü günde gliserol miktarında tüm örneklerde ortalama 70.00

$\mu\text{g/ml}$ 'lik artışlar gözlenmiş ve çalışmanın dördüncü gününde gliserol miktarları kontrol grubunda 304.22 $\mu\text{g/ml}$, kırmızı ışıkla aydınlatılan kültürlerde 346.98 $\mu\text{g/ml}$, yeşil ile aydınlatılanlarda 189.87 $\mu\text{g/ml}$ ve mavi ışık ile aydınlatılan *C.vulgaris* kültürlerinde ise 250.02 $\mu\text{g/ml}$ olduğu tespit edilmiştir.

Gliserol miktarı, tüm kültürlerde altıncı günde maksimum değere ulaşmıştır (Şekil 3.3.) Altıncı günde kontrol grubunda gliserol miktarı 494.05 $\mu\text{g/ml}$, kırmızı ışık ile aydınlatılan kültürlerde 524.22 $\mu\text{g/ml}$, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda 326.85 $\mu\text{g/ml}$ ve mavi ışıkla aydınlatılan kültürlerde 426.32 $\mu\text{g/ml}$ 'ye ulaşırken en yüksek gliserol miktarı kırmızı ışık ile aydınlatılan kültürlerde elde edilmiştir. Altıncı günden sonra gliserol miktarı azalmaya başlamış ve inkübasyonun son gününde kontrol grubunda 145.65 $\mu\text{g/ml}$ olan gliserol miktarı, kırmızı ışıkla aydınlatılan kültürlerde 174.45 $\mu\text{g/ml}$ 'ye, yeşil ile aydınlatılan kültürlerde 82.35 $\mu\text{g/ml}$ 'ye ve mavi ile aydınlatılan sıvı kültürlerde ise 125.36 $\mu\text{g/ml}$ 'ye düştüğü tespit edilmiştir.

Şekil 3.3. Farklı dalga boyuna sahip ışık kaynaklarının C. vulgaris'in gliserol miktarına etkisi



3.1.4 Işık Dalga boyunun *C. vulgaris*'in Astaksantin Miktarına Etkisi

Astaksantin alglerdeki önemli pigmentlerden birisidir. Özellikle son yıllarda astaksantin üzerinde yapılan çalışmalarda dejeneratif hastalıkları önlediği ve oksidatif strese karşı hücreleri koruyucu özelliği ile dikkat çekmektedir. *Chlorella vulgaris*' deki pigmentler arasında bulunan bu karotenoid' in farklı dalga boyuna sahip ışıktan ne şekilde etkilendiğini ortaya koyabilmek için, kültürler beyaz, kırmızı, mavi ve yeşil ışık ile aydınlatılan iklimlendirme kabininde on günlük bir sürede gelişime tabi tutulmuşlardır.

Aşılamanın yapıldığı gün 6.50 mg/L olan astaksantin miktarı birinci gün kontrol kültürlerinde 16.50 mg/L, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda 14.40 mg/L, mavi ile aydınlatılanlarda 19.70 mg/L ve kırmızı ışık ile aydınlatılan kültürlerde ise 13.10 mg/L olarak

tespit edilmiştir. Astaksantin miktarındaki artış ikinci gün de devam ederek kontrol kültürlerinde 17.90 mg/L'ye ulaşırken mavi ışık ile aydınlatılanlarda 20.90 mg/L olarak belirlenmiştir. Yeşil ışık ile aydınlatılan kültürlerde astaksantin miktarının 13.80 mg/L ve kırmızı ışık ile aydınlatılanlarda ise 12.90 mg/L olduğu tespit edilmiştir.

Üçüncü günde *Chlorella vulgaris* kültürlerinden alınan örneklerde kontrol kültürlerinde astaksantin miktarının 19.62 mg/L, mavi ışık ile aydınlatılanlarda 23.32 mg/L, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda 15.77 mg/L ve kırmızı ışık ile aydınlatılanlarda ise 13.60 mg/L olduğu belirlenmiştir.

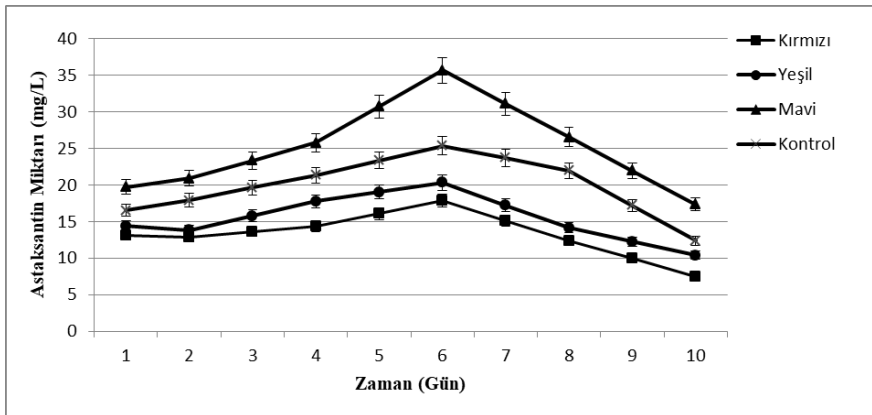
Kültürlerdeki astaksantin miktarının dördüncü günde de artmaya devam ederek kontrol kültürlerinde 21.35 mg/L, mavi ışık ile aydınlatılanlarda 25.75 mg/L, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda 17.75 mg/L ve kırmızı ışık ile aydınlatılanlarda ise 14.30 mg/L olduğu görülmüştür.

İnkübasyonu takip eden beşinci günde kontrol kültürlerinde astaksantin miktarı 23.35 mg/L olurken mavi ışık ile aydınlatılanlarda 30.70 mg/L, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda 19.02 mg/L ve kırmızı ile aydınlatılanlarda 16.07 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Bütün kültürlerde maksimum astaksantin değerlerine altıncı günde ulaşılırken en fazla astaksantin miktarının mavi ışık ile aydınlatılan kültürlerde olduğu görülmüştür (Şekil 3.4.).

Altıncı günde kontrol kültürlerde astaksantin miktarı 25.35 mg/L, mavi ışık ile aydınlatılan kültürlerde 35.65 mg/L, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda 20.30 mg/L ve kırmızı ışık ile aydınlatılanlarda kültürlerde ise astaksantin miktarının 17.85 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Altıncı günden sonra yapılan ölçümlerinde bütün kültürlerde astaksantin miktarının azaldığı görülmüştür.

Chlorella vulgaris kültürlerinde inokülasyonu takip eden ve altıncı günde maksimum değerine ulaşan astaksantin; kontrol kültürlerinde % 290, mavi ışık ile aydınlatılanlarda % 448, yeşil ışık ile aydınlatılanlarda % 212 ve kırmızı ışık ile aydınlatılanlarda ise % 174 oranında arttığı tespit edildi. *Chlorella vulgaris* kültürlerinde astaksantin miktarındaki en iyi artışın mavi ışık ile aydınlatılan kültürlerde olduğu ve inokülasyonu takip eden altı günlük sürede astaksantin miktarının sürekli olarak arttığı ancak daha sonra bütün kültürlerde astaksantin miktarının sürekli olarak azaldığı tespit edildi.

Şekil 3.4. Farklı dalga boyuna sahip ışık kaynaklarının C. vulgaris'in astaksantin miktarına etkisi



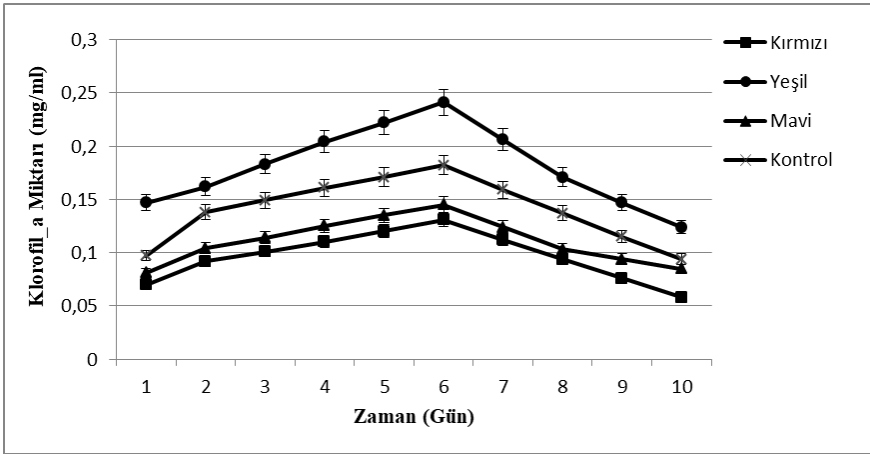
3.1.5 Işık Dalga boyunun *C. vulgaris*'in Klorofil a Miktarına Etkisi

On günlük inkübasyon süresi boyunca farklı dalgaboyuna sahip ışık kaynakları ile aydınlatılan sıvı kültürlerde, gerçekleştirilen pigment analizlerinde klorofil a değerinde altı gün boyunca artışa rastlanılmıştır. Birinci gün gerçekleştirilen klorofil analizlerinde kontrol grubunda klorofil a miktarı 0.097 mg/ml olarak hesaplanırken, kırmızı ışıkla aydınlatılan kültürlerde 0.070 mg/ml, mavi ışıkla aydınlatılanlarda 0.081 mg/ml ve yeşil ışık ile aydınlatılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde klorofil a miktarının 0.147 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. İkinci günde klorofil a miktarında artışlara rastlanılmış ve kontrol grubunda 0.138 mg/ml olan klorofil a miktarı kırmızı ve mavi ışıkla aydınlatılan kültürlerde 0.092 mg/ml ve 0.104 mg/ml'ye artış gösterirken yeşil ışıkla aydınlatılan kültürlerde klorofil a miktarının 0.162 mg/ml olduğu görülmüştür.

Üçüncü ve dördüncü günlerde de artışını devam ettiren klorofil a miktarının kontrol grubunda 0.171 mg/ml olduğu, kırmızı, mavi ve yeşil ışıkla aydınlatılan kültürlerde ise sırasıyla; 0.120 mg/ml, 0.135 mg/ml ve 0.222 mg/ml olduğu tespit edildi. Altıncı günde maksimum düzeye ulaşan klorofil a miktarları arasında en yüksek değerin yeşil ışıkla aydınlatılan kültürlerde olduğu belirlenmiştir.

Altıncı günde yeşil ışıkla aydınlatılan kültürlerde klorofil a miktarı 0.241 mg/ml'ye ulaşırken kırmızı ve mavi ışıkla aydınlatılan kültürler ile kontrol grubunda ise; 0.131 mg/ml, 0.145 mg/ml ve 0.182 mg/ml olduğu görülmüştür (Şekil.3.5). Altıncı günden sonra klorofil a miktarında çalışmanın son gününe kadar azalmalar gözlenmiştir.

Şekil 3.5. Farklı dalga boyuna sahip ışık kaynaklarının C. vulgaris'in klorofil a miktarına etkisi



3.1.6 Işık Dalga boyunun *C. vulgaris*' in Klorofil b Miktarına Etkisi

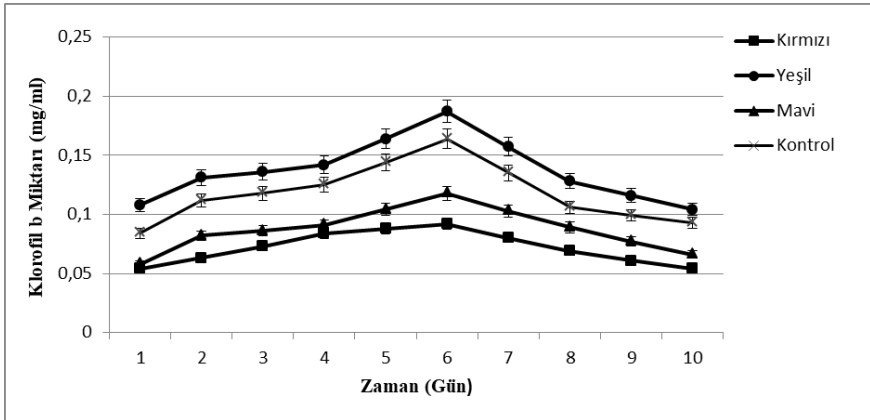
Işık dalga boyunun *C. vulgaris*'in klorofil b miktarı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla on gün süresince sıvı kültürlerden alınan örneklerde analizler yapılmıştır. Gerçekleştirilen pigment analizleri neticesinde klorofil b değerlerinin ilk gününde kontrol grubunda 0.084 mg/ml, kırmızı, mavi, yeşil ışıkla aydınlatılan kültürlerde ise sırasıyla; 0.054 mg/ml, 0.058 mg/ml ve 0.108 mg/ml olduğu belirlenmiştir.

İkinci günde ise; kontrol grubunda 0.112 mg/ml, kırmızı ışıkla aydınlatılan kültürlerde 0.054 mg/ml, mavi ve yeşil ışıkla aydınlatılan kültürde 0.058 mg/ml ve 0.108 mg/ml klorofil b miktarına ulaşılmıştır. Üçüncü ve dördüncü günlerde klorofil b miktarının arttığı beşinci günde kontrol grubunda 0.144 mg/ml, kırmızı ışık ile aydınlatılan kültürlerde 0.088 mg/ml, mavi ve yeşil

ışık ile aydınlatılan kültürlerde ise 0.104 mg/ml ve 0.164 mg/ml olduğu tespit edilmiştir.

Altıncı günde maksimum değere ulaşan klorofil b miktarının maksimum değere yeşil ışık ile aydınlatılan kültürlerde ulaşıldığı gözlenmiştir (0.187 mg/ml). Altıncı günde kontrol grubunda 0.164 mg/ml olan klorofil b değeri, mavi ve kırmızı ışık ile aydınlatılan kültürlerde 0.118 mg/ml ve 0.092 mg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil. 3.6). Altıncı günden sonra azalan klorofil b miktarı ilk güne göre altıncı günde yeşil ışık ile aydınlatılan kültürlerde %73.14'lük artış göstermiş ve yeşil ışığın klorofil b miktarındaki artışı teşvik ettiği görülmüştür.

Şekil 3.6. Farklı dalga boyuna sahip ışık kaynaklarının C. vulgaris'in klorofil b miktarına etkisi



3.2 pH'ın *C.vulgaris*'in Gelişim, Protein, Gliserol ve Pigment (astaksantin ve klorofil a, b) Miktarına Etkisi

3.2.1 pH'ın *C. vulgaris*'in Gelişimi Üzerine Etkisi

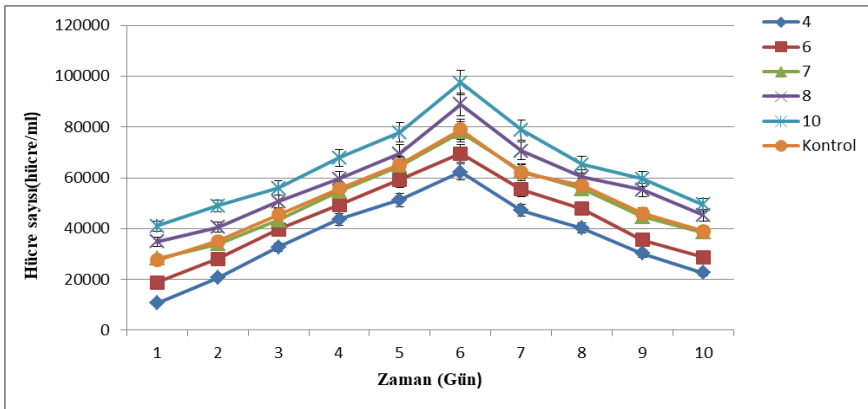
pH'ın *Chlorella vulgaris*' in hücre gelişimi üzerindeki etkisini incelemek amacı ile stok kültürlerden farklı pH'ya sahip sıvı kültürlerle inokülasyon yapılmış ve hücre sayısında meydana gelen değişimler on günlük deney süresince takip edilmiştir. İnokülasyonun yapıldığı gün bütün kültürlerdeki *C. vulgaris*'in hücre sayısının 9500 hücre/ml olduğu belirlenmiştir. Birinci günde hücre sayısının kontrol kültürlerinde 27640 hücre/ml, pH 4 olan kültürlerde 10653 hücre/ml, pH 6'da 18734 hücre/ml, pH'sı 7 olan sıvı kültürlerde 28206 hücre/ml, pH 8 olan kültürlerde 34840 hücre/ml ve pH 10 olan kültürlerde ise 40980 hücre/ml'ye ulaştığı görülmüştür. İnkübasyonun ikinci gününde yapılan sayımlarda bütün sıvı kültürlerde hücre sayılarının arttığı, kontrol kültürlerinde hücre sayısının 35000 hücre/ml'ye ulaştığı görülürken pH'ın 4 olduğu kültürlerde 20600 hücre/ml, pH 6'da 28000 hücre/ml, pH 7'de 33860 hücre/ml, pH 8'de 40500 hücre/ml, pH'ın 10 olduğu kültürlerde ise 48890 hücre/ml olduğu tespit edilmiştir. Üçüncü ve dördüncü günde hem kontrol hem de farklı pH'ya sahip kültürlerde *Chlorella vulgaris*'in hücre sayılarının arttığı görülmüştür.

Çalışmanın beşinci gününde kontrol grubunda ve pH değeri 7 olan sıvı besi yerlerinde *Chlorella vulgaris*' in hücre sayılarının birbirine yakın artış göstermeye devam ettiği, *C. vulgaris*'in pH 4'de

51250 hücre/ml ve pH 6'da 59200 hücre/ml, pH 8'de 69500 hücre/ml ve pH 10'da ise 77890 hücre/ml olduğu tespit edilmiştir. Hücre sayısının maksimum olduğu altıncı günde, kontrol grubunda hücre sayısı 79000 hücre/ml iken pH 4, 6 ve 7'de sırasıyla; 62200 hücre/ml, 69600 hücre/ml, 78000 hücre/ml, pH 8 ve 10'da ise; 88960 hücre/ml ve 97400 hücre/ml olduğu görülmüştür.

Altıncı günden sonra farklı pH'lara sahip tüm kültürlerde *Chlorella vulgaris*'in hücre sayısında azalmalar tespit edilmiştir (Şekil.3.7) İnokülasyon yapıldığı gününe kıyasla altıncı güne kadar kontrol grubunda ortalama %732'lik bir artışa rastlanılırken pH 4'de %554, pH 6'da % 632, pH 7'de %721, pH 8'de %836, pH 10'da %925 artış olduğu belirlenmiştir.

Şekil 3.7. Farklı besiyeri pH'sının *C.vulgaris*'in hücre sayısına etkisi



3.2.2 pH'ın *C. vulgaris*'in Protein Miktarına Etkisi

Alg türlerinin gelişim ve biyokimyasal içeriğini etkileyen önemli faktörlerden biri olan pH'ın etkisini araştırmak üzere farklı pH'lara sahip kültür ortamları hazırlanmıştır. On gün boyunca her gün düzenli olarak gerçekleştirilen analizlerde kültür ortamındaki protein miktarları tespit edilmiştir. Sıvı kültürlerle *Chlorella vulgaris*'in aşılmasının yapıldığı ilk günde protein miktarının 40.52 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Aşılamaı takip eden birinci günde kontrol kültürlerinde protein miktarının 81.80 µg/ml olduğu, pH 7'de protein miktarının 80.13 µg/ml olduğu görülmüştür. pH 4'de 104.98 µg/ml, pH 6'da ise 90.75 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Kültürlerin pH'sı bazık ortama doğru gittiğinde protein miktarının daha az artış gösterdiği ve pH 8'de 80.13 µg/ml, pH 10'da ise 62.13 µg/ml olduğu görülmüştür.

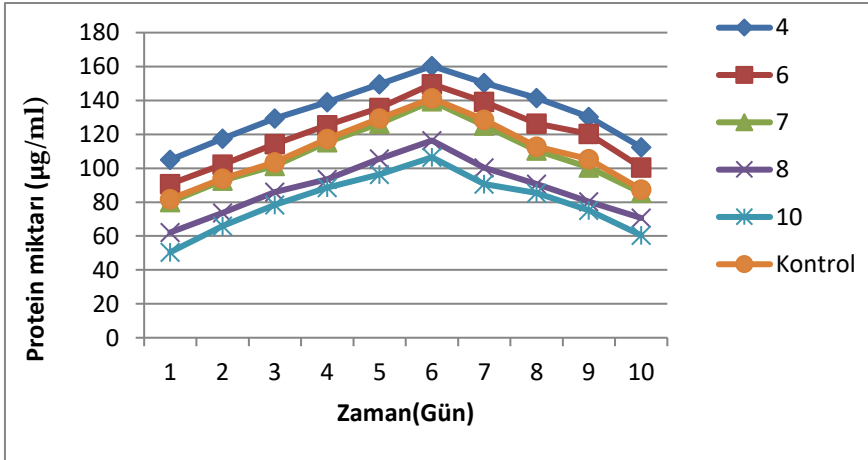
Protein miktarı, hücre sayısının aksine pH değerinin asidik olduğu sıvı besi yerlerinde daha yüksek miktarlara ulaşmış ve ikinci günde kontrol grubunda protein miktarı 93.85 µg/ml iken pH 4, 6, 7, 8 ve 10'da ise sırasıyla; 117.47 µg/ml, 102.24 µg/ml, 92.73 µg/ml, 73.74 µg/ml ve 65.95 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Aşılamaı takip eden üçüncü ve dördüncü günlerde ise kültürlerde protein miktarındaki artış devam etmiş ve altıncı günde pH 4 değerine sahip kültürlerde protein miktarı en yüksek değere ulaşmış ve pH değeri 4, 6, 7, 8 ve 10 olan kültürlerde maksimum

olan protein değerleri (160.32 $\mu\text{g/ml}$, 149.65 $\mu\text{g/ml}$, 139.56 $\mu\text{g/ml}$, 116.35 $\mu\text{g/ml}$, 106.45 $\mu\text{g/ml}$) tespit edilmiştir.

İnokulasyonu takip eden altıncı günde kontrol grubunda protein miktarı 141.23 $\mu\text{g/ml}$ 'ye ulaşırken pH değeri 4 olan kùltùrlerde protein miktarının 160.32 $\mu\text{g/ml}$ olduğu gùrùlmùřtur. Altıncı günden sonra bùtùn kùltùrlerde protein miktarının azaldığı gùrùlmùřtur. İnokulasyonun yapıldığı gün ile protein değerlerinin maksimuma ulaştığı altıncı günde protein miktarındaki artış oranının pH 4'te % 295, pH 6' de %269, pH 7'de %244, pH 8'de %187, pH 10 ise %162 olduğu tespit edilmiştir (şekil 3.8).

şekil 3.8. Farklı besiyeri pH'sının C.vulgaris'in protein miktarına etkisi



3.2.3 pH' ın *C. vulgaris*' in Gliserol Miktarına Etkisi

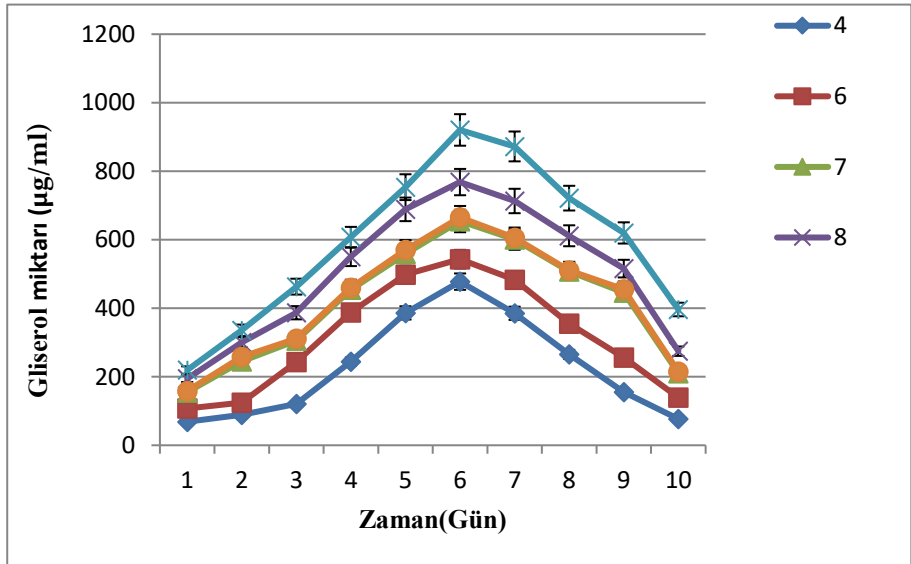
Günümüzde yaşadığımız en önemli problemlerin başında doğayla dost olmayan ve önemli çevre problemlerine neden olan

enerji kaynaklarının kullanımı gelmektedir. Bu önemli problemin üstesinden gelmek amacıyla geliştirilen çözümler arasında, doğayla dost biyoyakıtların yaygın olarak kullanılması gelmektedir. Biyoyakıt formu doğaya dost olmasının yanında ülke ekonomisini de sarsmayan bir yöne sahip olmalıdır. Biyodizel üretim aşamalarında gliserol dikkate değer öneme sahiptir. *Chlorella vulgaris*'in gliserol içeriği üzerinde pH'nın etkilerini incelemek amacıyla farklı pH değerlerine sahip kültür ortamları hazırlanarak inokülasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. İnokülasyonun yapıldığı gün bütün sıvı kültürlerde gliserol miktarının 50.70 µg/ml olduğu tespit edilmiştir.

İnokülasyonu takip eden birinci günde gliserol miktarının kontrol kültürlerinde 158.50 µg/ml değerine ulaştığı pH 4'de 68,76 µg/ml ve pH 6'da 107.39 µg/ml, pH 7'de 154.77 µg/ml, pH 8'de 194.48 µg/ml ve pH 10'da ise 219.42 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci gününde ise kültürlerden alınan örneklerde gliserol miktarının artmaya devam ettiği ve kontrol kültürlerinde 257.89 µg/ml olduğu görülmüştür. Aynı gün gliserol miktarının pH 4 olduğu kültürlerde 89.35 µg/ml, pH 6'da 124.17 µg/ml pH 8'de 300.35 µg/ml ve pH 10 da ise 335.50 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Aşılamayı takip eden üçüncü, dördüncü ve beşinci günlerde bütün kültürlerde gliserol miktarı artmaya devam ettiği ve altıncı günde maksimum değerlerine ulaştığı tespit edilmiştir. Altıncı günde özellikle pH değerinin 10 olduğu sıvı kültürlerde gliserol miktarının maksimum olduğu görülmüştür. Altıncı günde; kontrol kültürlerinde

gliserol miktarının 665.32 $\mu\text{g/ml}$ olduğu, pH 4, 6, 7, 8 ve 10 pH’da gliserol miktarlarının; 477.73 $\mu\text{g/ml}$, 543.29 $\mu\text{g/ml}$, 654.64 $\mu\text{g/ml}$, 768.32 $\mu\text{g/ml}$ ve 920,47 $\mu\text{g/ml}$ olduğu tespit edilmiştir. Altıncı günden sonra bütün kültür ortamlarında gliserol miktarında azalmaların olduğu gözlemlenmiştir. İnokülasyonun yapıldığı gün ile maksimum gliserol miktarının tespit edildiği altıncı günde pH 10 olan kültürlerde gliserol miktarının artış oranının yaklaşık %319 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.9).

Şekil 3.9. Farklı besiyeri pH’sının *C.vulgaris*’in gliserol miktarına etkisi



3.2.4 pH’nın *C. vulgaris*’ in Astaksantin Miktarına Etkisi

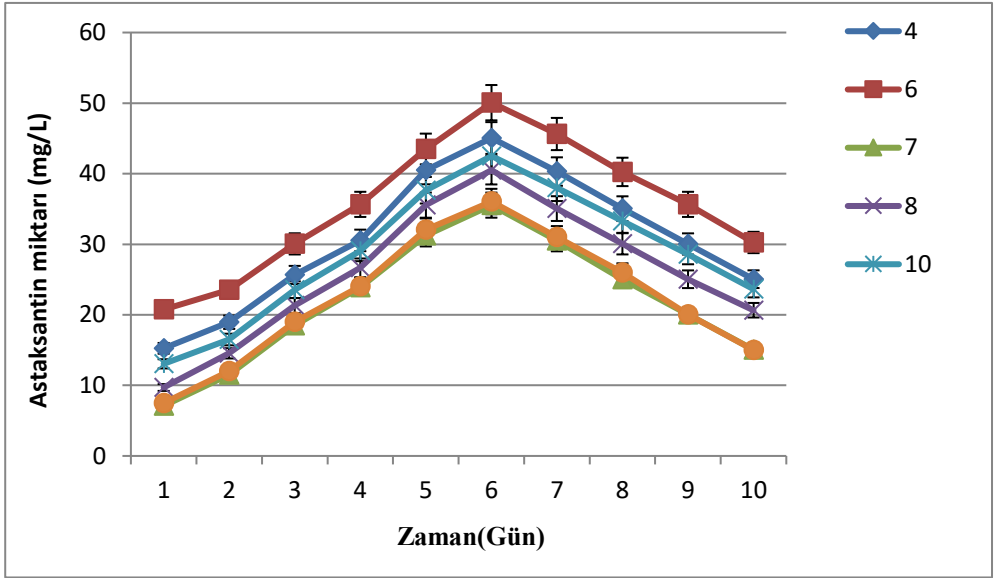
Chlorella vulgaris kültürlerinde astaksantin miktarı üzerinde pH’nın etkileri on gün süresince incelenmiştir. Stok *C. vulgaris*

kültürlerinden alınan örnekler pH değerleri farklı hazırlanmış kültür ortamlarına ilave edilmiş ve astksantin miktarında meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. İnokülasyonun yapıldığı günü tüm kültürlerde astaksantin miktarının 5.50 mg/L olduğu, takip eden birinci günde pH değeri 4 olan kültürlerde astaksantin miktarının 15.25 µg/ml, pH 6'da 20.75 mg/L olduğu, pH 7'de 7.1 µg/ml, pH 8'de 9.7 µg/ml ve pH10'da ise 13.05 mg/L'ye ulaştığı tespit edilmiştir. İkinci günde, pH 6 ve 10'da astaksantin miktarında dikkate değer artışlar gözlenmiştir. pH 7 ve altındaki pH'lara sahip kültürlerde (pH 4 ve 6 'da) astaksantin miktarı 18.95 mg/L, 23.55 mg/L'ye yükselmiş, pH 8 ve 10'da ise; 14.54 mg/L, 16.50 mg/L'ye ulaşmıştır.

Çalışmanın üçüncü gününde ikinci günde olduğu gibi kontrol ve pH 7'de astaksantin miktarları birbirine oldukça yakın olurken, pH 6'da astaksantin miktarının maksimum (30.05 mg/L) olduğu belirlenmiştir.

Beşinci günde astaksantin miktarı pH'6 da 43.50 mg/L, pH 4'de 40.52 mg/L'ye ulaşmıştır. pH 7 ve kontrol grubunda, aynı günde astaksantin miktarları; 31.25 mg/L ve 32.05 mg/L olarak tespit edilirken, pH 8'de 35.54 mg/L ve pH 10'da ise 37,65 mg/L olarak hesaplanmıştır. Maksimum değerlere ulaşılan altıncı günden sonra astaksantin miktarı bütün kültürlerde azalmış ve astaksantin miktarındaki azalma çalışmanın son gününe kadar devam etmiştir (Şekil 3.10).

Şekil 3.10. Farklı besiyeri pH'sının *C.vulgaris*'in astaksantin miktarına etkisi



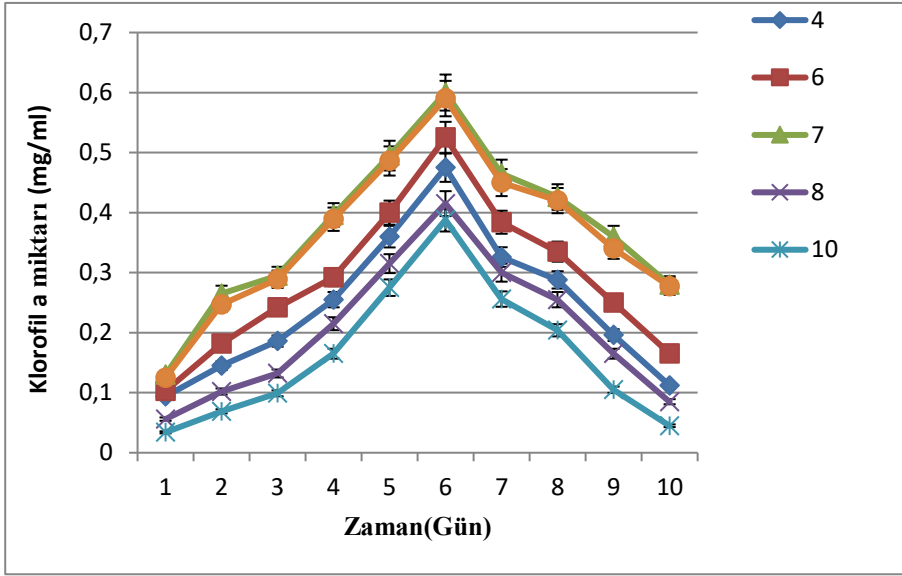
3.2.5 pH'ın *C. vulgaris*' in Klorofil a Miktarına Etkisi

pH'ın *Chlorella vulgaris* kültürlerinde pigment miktarı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla on gün araştırma süresince klorofil a ölçümleri yapılmıştır. Stok kültürlerden farklı pH değerlerine sahip sıvı kültürlerle *Chlorella vulgaris* ekimleri yapıldığında bütün kültürlerde klorofil a miktarının 0.025 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. İnokülasyonu takip eden birinci günde klorofil a miktarının kontrol grubunda 0.125 mg/ml'ye yükseldiği, pH 4, 6, 7, 8 ve 10'da ise sırasıyla; 0.094 mg/ml, 0.103 mg/ml, 0.130 mg/ml, 0.056 mg/ml ve 0.034 mg/ml olduğu belirlenmiştir.

İkinci ve üçüncü günde klorofil a miktarı pH 7 ve kontrol grubunda maksimuma ulaşırken (0.265 mg/ml ve 0.247 mg/ml), pH 6'da 0.182 mg/ml olduğu tespit edilmiştir.

Dördüncü günde pH 4'de klorofil a miktarı 0.255 mg/ml ve pH 6'da 0.292 mg/ml pH 8'de 0.215 mg/ml ve pH 10'da ise 0.165 mg/ml'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Beşinci günde de dördüncü günde olduğu gibi bütün kültürlerde klorofil a miktarının arttığı ve altıncı günde maksimum miktara ulaştığı görülmüştür (Şekil 3.2.5.1) İnokülasyonu takip eden altıncı günde kontrol kültürlerinde klorofil a miktarının 0.590 mg/ml, pH 4'de 0.475 mg/ml, pH 6'da 0.525 mg/ml, pH 7'de 0.600 mg/ml, pH 8'de 0.415 mg/ml ve pH 10'da 0.388 mg/ml'ye ulaştığı tespit edilmiştir. On gün boyunca devam edilen ölçümlerde klorofil a miktarının altıncı günden sonra azalmaya başladığı ve en düşük klorofil a miktarının aşılamaadan sonraki onuncu günde pH değeri 10 olan kültürlerde (0.045 mg/ml) olduğu görülmüştür (Şekil 3.11).

Şekil 3.11. Farklı besiyeri pH'sının *C.vulgaris*'in klorofil a miktarına etkisi



3.2.6 pH'nın *C. vulgaris*' in Klorofil b Miktarına Etkisi

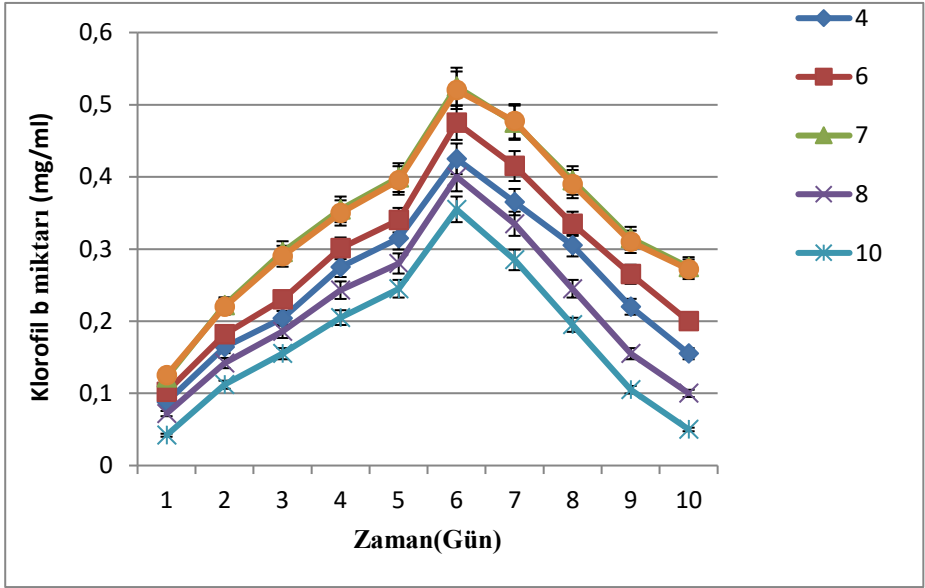
Yeşil alglerdeki önemli pigmentlerinden olan klorofil b üzerinde pH'nın etkilerini incelemek amacı ile kontrol ve beş farklı pH'ya sahip sıvı besi yerleri hazırlanarak on gün süresince her gün alınan örneklerde klorofil b miktarları ölçülmüştür.

İnokülasyonun yapıldığı gün kültürlerin tümünde klorofil b miktarının 0.040 mg/ml olduğu belirlenirken inokülasyonu takip eden birinci günde klorofil b miktarı pH değeri 4 olan kültürlerde 0.088 mg/ml, pH 6'da 0.102 mg/ml, pH 7'de 0.122 mg/ml pH 8'de 0.072 mg/ml ve pH 10'da ise 0.042 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

Aşılamayı takip eden ikinci ve üçüncü günde de klorofil b miktarında artışın devam ettiği gözlenmiş, dördüncü günde klorofil b miktarının kontrol kültürlerinde 0.350 mg/ml, pH 4'de 0.275 mg/ml, pH 6'da 0.301 mg/ml, pH 7'de 0.355 mg/ml, pH 8'de 0.243 mg/ml ve pH 10'da ise 0.205 mg/ml olduğu görülmüştür. Beşinci günde yapılan ölçümlerde, kontrol kültürlerinde 0.395 mg/ml, pH 7'de ise 0.399 mg/ml olduğu, pH 4'de 0.315 mg/ml, pH 6'da 0.340 mg/ml, pH 8'de 0.280 mg/ml ve pH 10'da ise 0.245 mg/ml'ye ulaştığı belirlenmiştir.

Klorofil a miktarında olduğu gibi klorofil b miktarında da altıncı günde maksimum pigment miktarları hesaplanmıştır. Altıncı güne kadar miktarı artarak devam eden klorofil b miktarının kontrol kültürlerinde 0.520 mg/ml, pH 4'de 0.425 mg/ml, pH 6'da 0.475 mg/ml, pH 7'de 0.525 mg/ml pH 8'de 0.400 mg/ml ve pH 10'da ise 0.355 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. İnokülasyonun yapıldığı ilk güne kıyasla klorofil b miktarının pH 4'te % 382, pH 6'da % 365 pH 7'de %330, pH 8 ve 10 da % 455 ,%755, kontrol grubunda ise % 316 arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.12).

Şekil 3.12. Farklı besiyeri pH'sının *C.vulgaris*'in klorofil b miktarına etkisi



3.3 Farklı Azot Kaynaklarının *C.vulgaris*' in Gelişim, Protein, Gliserol ve Pigment (astaksantin ve klorofil a,b) Miktarına Etkisi

3.3.1 Farklı Azot Kaynaklarının *C. vulgaris*' in Hücresel Gelişimine Etkisi

Azot, mikroalglerin hücre metabolizmasını kontrol eden en önemli nutrientlerden birisidir. Azot; protein, klorofil, RNA, DNA vb. gibi birçok makromoleküllerin temel yapıtaşıdır.

Mikroalglerin gelişme ortamındaki azot değişkenliğine cevap olarak, hücrelerin bir dizi metabolik aklimasyona uğradıkları

ve bu da genellikle hücresel biyomolekül bileşiminde değişiklikler ile sonuçlandığı bildirilmektedir (Illman ve ark., 2000; Gushina ve Harwood, 2006; Widjaja ve ark., 2009; Chia ve ark., 2013a).

Algal biyoteknolojide geniş bir kullanım alanı bulunan *C.vulgaris*'in kültür ortamlarındaki azot kaynağını değiştirerek oluşturulan stres koşullarının çoğalma üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Stok kültürlerden *C. vulgaris* inokülasyonun yapıldığı gün hücre sayısı 11000 hücre/ml olarak belirlenmiştir. Birinci günde kontrol grubunda hücre sayısı 27000 hücre/ml iken azot kaynağı olarak amonyum nitrat'ın kullanıldığı kültürlerde 32000 hücre/ml, amonyum sülfatın kullanıldığı kültürlerde 18000 hücre/ml ve sodyum nitratın kullanıldığı kültürlerde ise hücre sayısı 12000 hücre/ml'ye ulaşmıştır. İnokülasyonu takip eden ikinci günde azot kaynağı olarak amonyum nitratın kullanıldığı kültürlerde hücre sayısının yaklaşık iki katına ulaşarak 64000 hücre/ml olduğu, azot kaynağı olarak amonyum sülfatın olduğu kültürlerde 41000 hücre/ml, azot kaynağı olarak sodyum nitratın kullanıldığı kültürlerde 26000 hücre/ml ve kontrol kültürlerinde ise 49000 hücre/ml olduğu tespit edilmiştir. Aşılamayı takip eden üçüncü ve dördüncü günlerde de *C. vulgaris*'in hücre sayıları artmaya devam etmiş ve özellikle azot kaynağı olarak amonyum nitratın kullanıldığı kültürlerde dikkate değer artışın olduğu belirlenmiştir. Beşinci günde kontrol grubunda dördüncü güne kıyasla yaklaşık 10000 hücre civarında bir artışa rastlanılmış, amonyum nitratın azot kaynağı olarak kullanıldığı kültürlerde hücre sayısının 85000 hücre/ml,

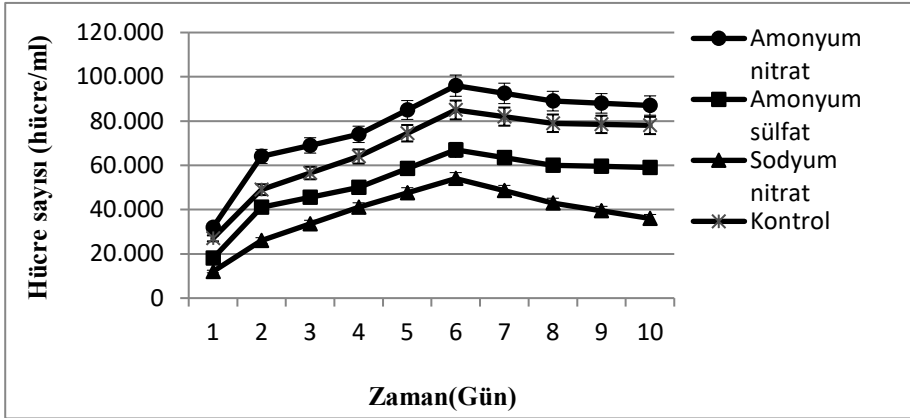
amonyum sülfat ve sodyum nitratlı kültürlerde ise mililitrede 58500 ve 47500 hücre sayısına ulaşılmıştır.

Araştırma süresince maksimum hücre yoğunluğunun tespit edildiği altıncı günde amonyum nitratın azot kaynağı olarak kullanıldığı kültürlerde 96000 hücre/ml, amonyum sülfat kullanılan kültürlerde 67000 hücre/ml, sodyum nitrat kullanılan kültürlerde 54000 hücre/ml ve kontrol grubunda ise 85000 hücre/ml olduğu tespit edilmiştir (şekil 3.13).

Altıncı günden sonra hücre sayısında azalmalar gözlemlenmiş ve çalışmanın son gününde kontrol grubunda hücre sayısı 78000 hücre/ml, amonyum nitratın kullanıldığı kültürlerde 87.000 hücre/ml, amonyum sülfat ve sodyum nitratlı kültürlerde ise 59.000 ve 36.000 hücre/ml olarak tespit edilmiştir. Altıncı günden sonra bütün kültürlerde hücre sayısının azaldığı tespit edilmiştir.

Çalışma tamamlandığında inokülasyon gününe kıyasla altıncı günde amonyum nitratın azot kaynağı olarak kullanıldığı kültürlerde hücre sayısında ortalama %772 artışın olduğu görülmüştür.

Şekil 3.13. Farklı azot kaynaklarının *C.vulgaris*' in hücre sayısına etkisi

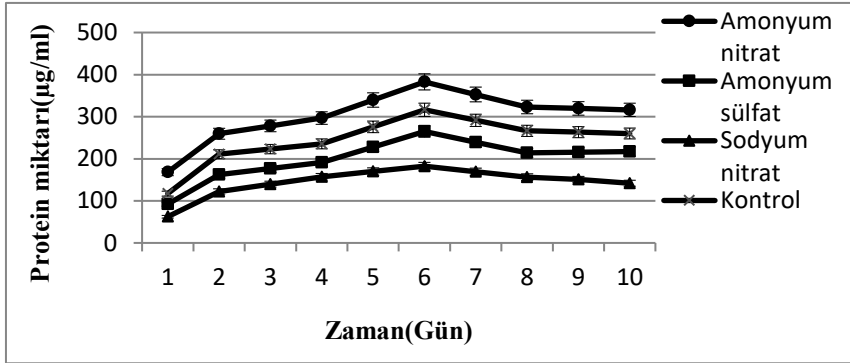


3.3.2 Farklı Azot Kaynaklarının *C. vulgaris*' in Protein Miktarına Etkisi

Yapılan çalışmalar çevresel faktörlerle birlikte kültür ortamlarında kullanılan nutrientlerin de mikroalglerin biyokimyasal kompozisyonu üzerinde değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Farklı azot kaynakları kullanılarak oluşturulan sıvı kültürlerle *C. vulgaris*'in stok kültürlerinden yapılan inokülasyonda bütün kültürlerde protein miktarının 55.00 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. İnokülasyonu takip eden birinci gün amonyum nitratın azot kaynağı olarak kullanıldığı kültürlerde protein miktarı 168.17 µg/ml, amonyum sülfatlı kültürlerde 92.37 µg/ml, sodyum nitratın azot kaynağı olarak kullanıldığı kültürlerde 62.35 µg/ml iken kontrol gruplarında protein miktarının 117.27 µg/ml olduğu belirlenmiştir.

İkinci ve üçüncü günlerde kültürlerden alınan örneklerde protein miktarında artışın devam ettiği belirlenmiş ve azot kaynağı olarak amonyum nitratın kullanıldığı kültürlerde protein miktarının kontrol grubu dahil olmak üzere tüm kültürlerden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Dördüncü günde amonyum nitratla hazırlanan kültürlerde maksimum protein miktarı olan 296.70 µg/ml'ye ulaşılırken bunu kontrol grubu (235.25 µg/ml) takip etmiştir. Farklı azot kaynakları kullanılarak hazırlanan kültürlerde maksimum protein miktarlarına altıncı günde ulaşılmıştır. Altıncı günde azot kaynağı olarak amonyum nitratın kullanıldığı kültürlerde protein miktarının 352.82 µg/ml, amonyum sülfatlı kültürlerde 264.83 µg/ml, sodyum nitrat ile hazırlanan kültürlerde 182.37 µg/ml, kontrol grubunda ise protein miktarının 316.43 µg/ml olduğu görülmüştür. İnokülasyondan altıncı güne kadar bütün kültürlerde protein miktarında artış olmasına karşılık azot kaynağı olarak amonyum nitratın kullanıldığı sıvı kültürlerde bu artış oranının % 589 olduğu, kontrol gruplarında % 470, amonyum sülfat ve sodyum nitratın azot kaynağı olarak kullanıldığı kültürlerde ise % 377 ve % 228 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.14).

Şekil 3.14. Farklı azot kaynaklarının *C.vulgaris*’in protein miktarına etkisi



3.3.3 Farklı Azot Kaynaklarının *C. vulgaris*’ in Gliserol Miktarına Etkisi

Farklı azot kaynakları ile hazırlanan kültürler aşılardan stok *C. vulgaris* kültürlerinde gliserol miktarındaki değişiklikler on gün süresince incelenmiş ve farklı azot kaynaklarının gliserol miktarını etkiledikleri görülmüştür.

Stok kültürlerden inokülasyonun yapıldığı gün 95.65 µg/ml olan gliserol miktarının inokülasyonu takip eden birinci günde amonyum nitratın azot kaynağı olarak kullanıldığı kültürlerde 295.77 µg/ml, amonyum sülfatla hazırlanan kültürlerde 145.12 µg/ml, sodyum nitratla hazırlanan kültürlerde 101.58 µg/ml ve kontrol grubunda ise 222.36 µg/ml olduğu tespit edilmiştir.

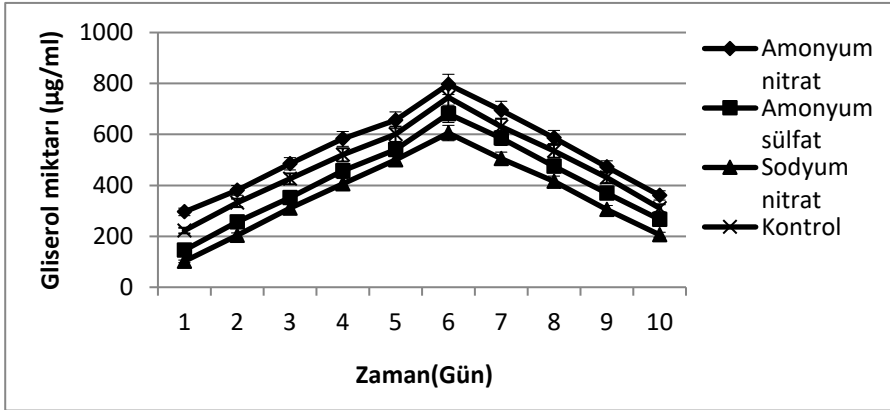
İkinci günde kontrol grubunda 331.18 µg/ml olan gliserol miktarı azot kaynağı olarak amonyum nitratın kullanıldığı

kültürlerde 380.26 µg/ml ve amonyum sülfatla hazırlanan kültürlerde 255.77 µg/ml'ye ulaşırken en düşük gliserol miktarı sodyum nitratla hazırlanan kültürlerde tespit edilmiştir (202.85 µg/ml).

Aşılamayı takip eden altıncı güne kadar bütün kültürlerde gliserol miktarı artmış ve altıncı günde maksimum miktara ulaşmıştır.

Altıncı günde kontrol grubunda 745.65 µg/ml olan gliserol miktarı, amonyum nitratla hazırlanan kültürlerde 796.32 µg/ml, amonyum sülfatlı kültürlerde 680.65 µg/ml ve Sodyum nitratla hazırlanan kültürlerde ise 605.32 µg/ml'ye ulaşmış ve bütün kültürlerde altıncı günde maksimum değerler tespit edilmiştir (Şekil 3.15). Araştırma süresince her gün gerçekleştirilen analizler sonucunda, gliserol miktarının azot kaynağı olarak amonyum nitratın kullanıldığı *C. vulgaris* kültürlerinde diğer kültürlere oranla daha fazla artış gösterdiği belirlenmiştir.

Şekil 3.15. Farklı azot kaynaklarının *C.vulgaris*'in gliserol miktarına etkisi



3.3.4 Farklı azot kaynaklarının *C. vulgaris*'in Astaksantin Miktarına Etkisi

Farklı azot kaynakları kullanılarak hazırlanan kültür ortamlarına stok *Chlorella vulgaris* kültürlerinden ekim yapılmış ve inokülasyon sonrası bütün kültürlerde astaksantin miktarının 8.50 mg/L olduğu tespit edilmiştir.

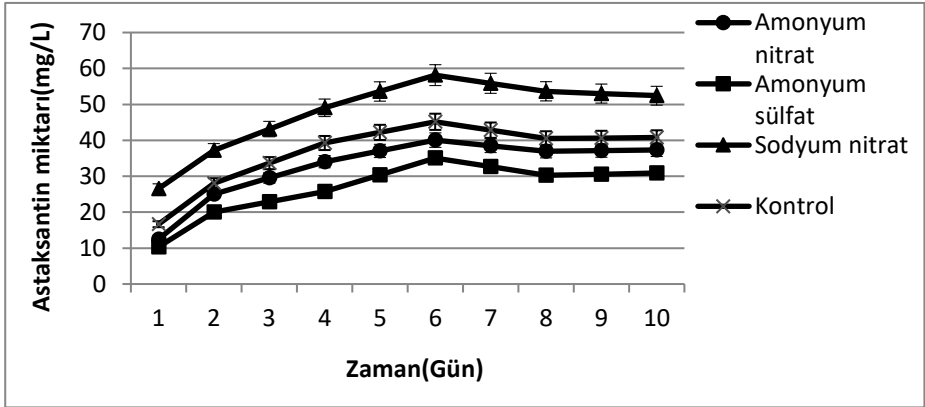
Çalışmanın birinci gününde amonyum nitratin azot kaynağı olarak kullanıldığı kültürlerde astaksantin miktarı 12.50 mg/L, amonyum sülfatin kullanıldığı kültürlerde 10.35 mg/L, sodyum nitratin kullanıldığı kültürlerde 26.55 mg/L ve kontrol grubunda ise 16.65 mg/L olduğu görülmüştür.

İnokülasyonu takip eden ikinci günde sodyum nitratla hazırlanan kültürlerde astaksantin miktarının tüm kültürlerden daha

yüksek olduğu tespit edilmiştir (37.22 mg/L). Aynı gün astaksantin miktarının kontrol grubunda 28.05 mg/L, amonyum nitratla hazırlanan kültürlerde 25.05 mg/L, amonyum sülfatla hazırlanan kültürlerde 20.00 mg/L'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Üçüncü ve dördüncü günlerde de astaksantin miktarındaki artış sürmüş beşinci günde kontrol grubunda 42.20 mg/L olan astaksantin miktarı amonyum nitratla hazırlanan kültürlerde 37.05 mg/L, amonyum sülfatlı kültürlerde 30.40 mg/L ve sodyum nitratla hazırlanan kültürlerde ise 53.59 mg/L olarak belirlenmiştir. Maksimum astaksantin miktarlarına altıncı günde ulaşılmıştır.

İnokülasyonu takip eden altıncı günde astaksantin miktarının azot kaynağı olarak sodyum nitratın kullanıldığı kültürlerde 58.13 mg/L, kontrol grubunda 45.15 mg/L, amonyum nitratla hazırlanan kültürlerde 40.05 mg/L ve amonyum sülfatlı kültürlerde 35.05 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Altıncı günden sonra çalışmanın son günü olan onuncu güne kadar astaksantin miktarında azalmalar gözlemlenmiş ve son gününde astaksantin miktarı kontrol grubunda 40.75 mg/L olurken amonyum nitratta 37.35 mg/L, amonyum sülfatlı kültürlerde 30.90 mg/L ve sodyum nitratla hazırlanan kültürlerde ise 52.42 mg/L olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonunda astaksantin miktarı bakımından inokülasyon gününe kıyasla %516 artışla en yüksek astaksantin miktarı altıncı günde azot kaynağı olarak sodyum nitratın kullanıldığı kültürlerde elde edilmiştir (Şekil 3.16).

Şekil 3.16. Farklı azot kaynaklarının *C.vulgaris*'in astaksantin miktarına etkisi



3.3.5 Farklı Azot Kaynaklarının *C. vulgaris*'in Klorofil a Miktarına Etkisi

On gün boyunca farklı azot kaynakları ile hazırlanan *C. vulgaris* kültürlerinde klorofil a miktarındaki değişiklikler incelenmiştir. İnokülasyonun yapıldığı gün bütün kültürlerde klorofil a miktarının 0.030 mg/ml olduğu, inokülasyonu izleyen birinci günde kontrol grubunda klorofil a miktarının 0.109 mg/ml, amonyum nitratla hazırlanan kültürlerde 0.070 mg/ml, amonyum sülfatlı kültürlerde 0.045 mg/ml ve sodyum nitratla hazırlananlarda ise 0.175 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. İnokülasyonu takip eden ikinci gününde, kontrol grubunda klorofil a miktarı 0.125 mg/ml, sodyum nitratla hazırlanan kültürlerde 0.186 mg/ml, amonyum nitrat 0.088 mg/ml ve amonyum sülfatla hazırlanan kültürlerde ise 0.072 mg/ml'ye ulaştığı belirlenmiştir.

Aşlamayı takip eden üçüncü ve dördüncü günde de klorofil a miktarında artışlar devam etmiş ancak sodyum nitratla hazırlanan kültürlerde diğer kültürlere kıyasla klorofil a miktarının daha fazla artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Beşinci günde sodyum nitratla hazırlanan kültürlerde klorofil a miktarının 0.233 mg/ml olduğu, kontrol grubunda 0.165 mg/ml ve amonyum nitrat ile hazırlanan kültürlerde 0.114 mg/ml ve amonyum sülfatla hazırlanan kültürlerde ise 0.098 mg/ml olduğu görülmüştür. Bütün kültürlerde altıncı günde klorofil a miktarının maksimum olduğu görülmüştür.

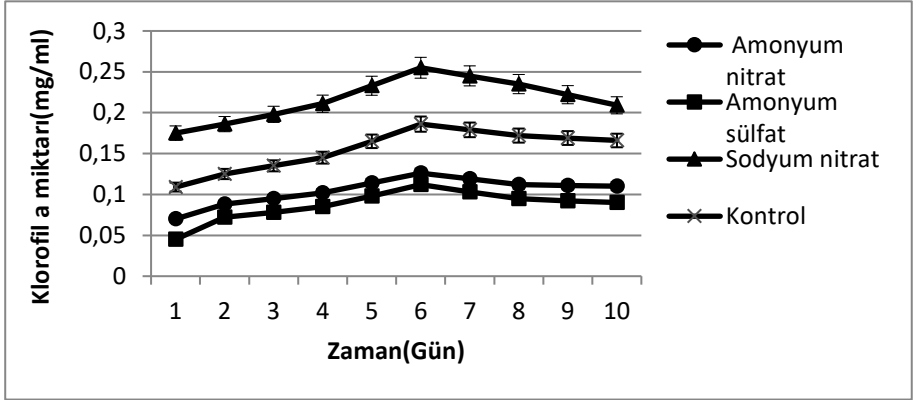
Altıncı günde azot kaynağı olarak sodyum nitratın kullanıldığı kültürlerde klorofil a miktarının 0.255 mg/ml, kontrol grubunda 0.186 mg/ml, amonyum nitratlı kültürlerde 0.126 mg/ml ve amonyum sülfatlı kültürlerde ise 0.112 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

Altıncı günde bütün kültürlerde maksimum miktara ulaşan klorofil a daha sonraki günlerde azalmış ve çalışmanın son günü olan onuncu günde azot kaynağı olarak sodyum nitratın kullanıldığı kültürlerde 0.209 mg/ml'ye, kontrol grubunda 0.166 mg/ml'ye düşmüştür.

Araştırma süresince inokülasyon anından maksimum değerlerin hesaplandığı altıncı güne kadar klorofil a miktarının sodyum nitratlı kültürlerde ortalama %750, kontrol grubunda %520,

amonyum nitratlı kültürlerde %320, amonyum sülfatla hazırlanan kültürlerde ise %273 arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.17).

Şekil 3.17. Farklı azot kaynaklarının *C.vulgaris*'in klorofil a miktarına etkisi



3.3.6 Farklı Azot Kaynaklarının *C. vulgaris*'in Klorofil b Miktarına Etkisi

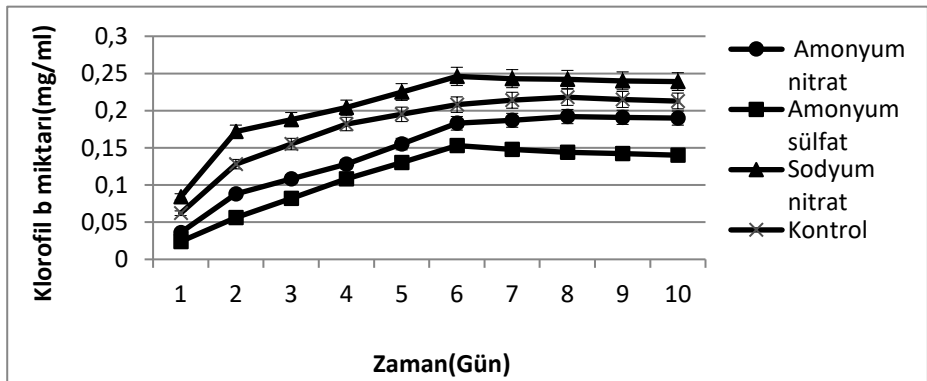
Farklı azot kaynaklarının *C. vulgaris*'in klorofil b miktarı üzerindeki etkileri on gün süreyle incelenmiştir. Stok *C. vulgaris* kültürlerinden inokülasyonun yapıldığı gün klorofil b miktarının 0.020 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. İnokülasyonu takip eden birinci gün klorofil b miktarının kontrol kültürlerinde 0.062 mg/ml, amonyum nitratla hazırlanan kültürlerde 0.036 mg/ml, amonyum sülfatlı kültürlerde 0.024 mg/ml ve sodyum nitratlı kültürlerde ise 0.084 mg/ml olduğu görülmüştür. İnokülasyonu takip eden ikinci ve üçüncü günlerde klorofil b miktarının arttığı dördüncü günde klorofil b miktarının kontrol grubunda 0.182 mg/ml, azot kaynağı olarak

sodyum nitratın kullanıldığı kültürlerde 0.204 mg/ml, amonyum nitratla hazırlananlarda 0.128 mg/ml ve amonyum sülfatla hazırlananlarda ise 0.108 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Beşinci günde klorofil b miktarındaki artış devam etmiş ve altıncı günde tüm kültürlerde maksimum klorofil b miktarı hesaplanmıştır. Altıncı günde kontrol grubunda klorofil b miktarının 0.183 mg/ml, sodyum nitratla hazırlanan kültürlerde 0.246 mg/ml, amonyum nitratlı kültürlerde 0,183 mg/ml ve amonyum sülfatlı kültürlerde ise 0.153 mg/ml olduğu tespit edilmiştir.

Araştırma süresince klorofil b miktarının azot kaynağı olarak sodyum nitratın kullanıldığı kültürlerde daima tüm kültürlerden yüksek olmuş ve altıncı günden sonra klorofil b miktarı sürekli olarak azaldığı görülmüştür. (Şekil 3.18).

Şekil 3.18. Farklı azot kaynaklarının C.vulgaris'in klorofil b miktarına etkisi



3.4 Farklı Azot Konsantrasyonlarının *C.vulgaris*' in Gelişim, Protein, Gliserol ve Pigment (astaksantin ve klorofil a, b) Miktarına Etkisi

3.4.1 Farklı Azot Konsantrasyonlarının *C.vulgaris*' in Gelişimine Etkisi

C. vulgaris'in gelişimi, protein, gliserol ve pigment miktarları üzerinde azot kaynaklarının etkilerinin incelenmesinde amonyum nitratin etkisinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

Amonyum nitratin farklı konsantrasyonlarının *C.vulgaris*'in gelişim, protein, gliserol ve pigment (astaksantin ve klorofil a, b) miktarı üzerindeki etkilerini araştırmak amacı ile amonyum nitratin farklı konsantrasyonları (0.3 g/L, 0.9 g/L, 1.5 g/L) kullanılarak sıvı besi ortamları hazırlanmış ve kültürlerde hücre sayısında meydana gelebilecek değişiklikler incelenmiştir. Amonyum nitratin farklı konsantrasyonlarının *C. vulgaris*'in hücre sayısı üzerindeki etkilerini araştırmak amacı ile stok kültürlerden amonyum nitratin farklı konsantrasyonlarına sahip kültür ortamlarına aşılama yapılmış ve inokülasyon yapıldığı gün bütün kültürlerde *C. vulgaris*'in hücre sayısının 4.200 hücre/ml olduğu görülmüştür. İnokülasyonu takip eden birinci günde kontrol grubunda 13500 hücre/ml, 0.3 g/L amonyum nitrata sahip kültürlerde 4500 hücre/ml, 0.9 g/L konsantrasyonda 6400 hücre/ml, 1.5 g/L konsantrasyonda ise 9800 hücre/ml'ye ulaşıldığı tespit edilmiştir.

İkinci günde kontrol grubunda 16900 hücre/ml olan hücre sayısı, 0.3 g/L konsantrasyonda 6900 hücre/ml, 0.9 g/L konsantrasyonda ise 8500 hücre/ml, 1.5 g/L 12100 hücre/ml'ye artış gösterirken bu artışlar üçüncü günde de devam etmiş en yüksek hücre sayısı kontrol grubundan (17.550 hücre/ml) görülmüş ve 1.5 g/L amonyum nitrat konsantrasyonuna sahip kültürlerde 13.750 hücre/ml'ye ulaşmıştır. Dördüncü günde yapılan sayımlarda hücre sayısındaki artışın devam ettiği ve kontrol grubunda 18200 hücre/ml, 0.3 g/L konsantrasyonda 9129 hücre/ml, 0.9 g/L'de 11800 hücre/ml, 1.5 g/L konsantrasyonda ise 15400 hücre/ml'ye ulaşmıştır. İnokülasyonu takip eden beşinci günde tüm kültürlerde yaklaşık 3.000 hücre/ml'lik artışlar olurken, altıncı günde kontrol grubunda hücre sayısının 22100 hücre/ml, 0.3 g/L konsantrasyonda 14900 hücre/ml, 0.9 g/L 17200 hücre/ml, 1.5 g/L konsantrasyonda ise 21000 hücre/ml olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.19).

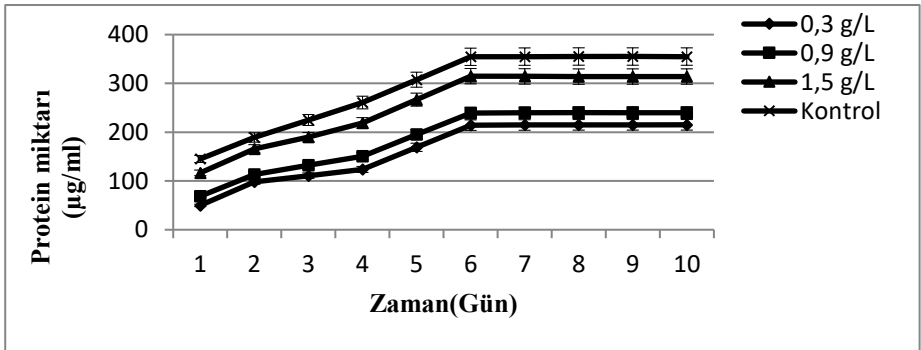
Çalışmanın sekizinci ve son gününde kontrol grubunda hücre sayısı 22100 ve 22180 hücre/ml olarak hesaplanırken kontrol grubunda olduğu gibi tüm konsantrasyonlarda altıncı günde elde edilen değerlere yakın değerlerin olduğu görülmüştür. İnokülasyon gününe kıyasla kontrol grubunda altıncı güne kadar %426 artış gözlemlenirken bu grubu %400 artışla 1.5 g/L konsantrasyonlu kültürler takip etmiş, 0.9 g/L ve 0.3 g/L konsantrasyona sahip kültürlerde ise %309 ve %254'lük artışların olduğu belirlenmiştir.

Şekil 3.19 Farklı azot konsantrasyonlarının *C.vulgaris*' in hücre sayısına etkisi

Farklı amonyum nitrat konsantrasyonları ile hazırlanmış Jaworski besi ortamında geliştirilen *Chlorella vulgaris*'in protein miktarında meydana gelen değişiklikler on gün süreyle incelenmiştir. Stok *C. vulgaris* kültürlerinden inokülasyonun yapıldığı gün protein miktarının 45.00 µg/ml olduğu, inokülasyonu takip eden birinci günde kontrol grubunda protein miktarının 145.08 µg/ml, 0.3 g/L amonyum nitratla hazırlanan kültürlerde 49.84 µg/ml, 0.9 g/L konsantrasyonlu kültürlerde 68.69 µg/ml ve 1.5 g/L konsantrasyonda ise 116.58 µg/ml'ye kadar ulaştığı tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci gününde kontrol grubunda ve diğer tüm kültürlerde yaklaşık 40 µg/ml'lik bir artış gözlemlenmiş ve artış üçüncü günde de devam etmiştir. Üçüncü günde kontrol grubunda protein miktarının 224.93 µg/ml, sırasıyla 0.3 g/L'de 110.83 µg/ml, 0.9 g/L 131.94 µg/ml ve 1.5 g/L konsantrasyonda ise 189.93 µg/ml olarak belirlenmiştir. Dördüncü ve beşinci günlerde protein miktarındaki artış devam etmiş ve altıncı günde maksimum değere ulaşmıştır. İnokülasyonu takip eden altıncı günde protein miktarı, kontrol grubunda 354.59 µg/ml, 0.3 g/L konsantrasyonda 214.39 µg/ml, 0.9 g/L konsantrasyonda 239.14 µg/ml ve 1.5 g/L konsantrasyonda ise 314.77 µg/ml'ye ulaşmıştır.

Altıncı günden çalışmanın bittiği güne kadar protein miktarının aynı kaldığı ve çalışmanın son gününde protein miktarının kontrol grubunda 355.00 $\mu\text{g/ml}$, 0.3 g/L konsantrasyonda 215.11 $\mu\text{g/ml}$, 0.9 g/l de 240.00 $\mu\text{g/ml}$ ve 1.5 g/L azot konsantrasyonlu kültürlerde ise 314.06 $\mu\text{g/ml}$ olduğu tespit edilmiştir. İnokülasyon gününe kıyasla maksimum protein miktarlarının hesaplandığı altıncı güne kadar protein miktarında kontrol grubunda %687 artış, 0.3 g/L, 0.9 g/L, 1.5 g/L konsantrasyonlu kültürlerde ise; % 376, % 431, % 599 artışlar gözlenmiştir. (Şekil 3.20)

Şekil 3.20. Farklı azot konsantrasyonlarının C.vulgaris'in protein miktarına etkisi



3.4.3 Farklı Azot Konsantrasyonlarının *C.vulgaris'* in Gliserol Miktarına Etkisi

Mikroorganizmaların çoğu izledikleri farklı metabolik yollarla hücrelerinde gliserol biriktirmektedirler. *Chlorella vulgaris*'in stres koşulları altında gliserol üretimindeki artışı

belirlemek amacıyla, farklı amonyum nitrat konsantrasyonlu kültürler hazırlanarak bu kültürlere *C. vulgaris* inokülasyonu yapılmış ve on gün süreyle gliserol miktarında meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir.

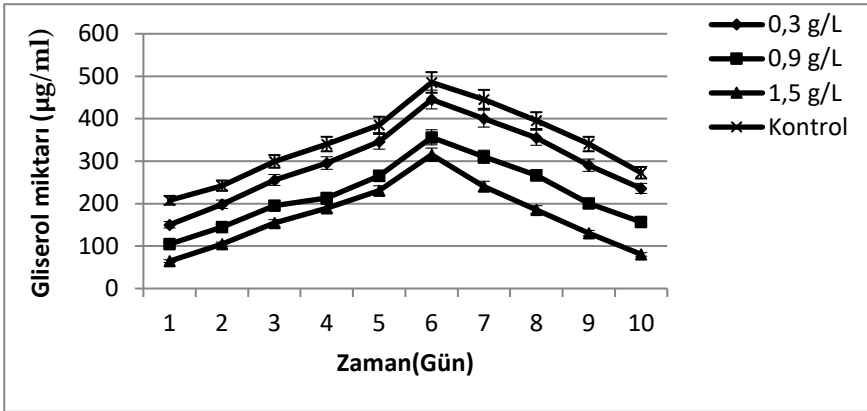
Stok *C. vulgaris* kültürlerinden inokülasyon yapıldığı gün gliserol miktarının 60.45 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. İnokülasyondan sonraki ilk yirmi dört saatte kontrol grubunda bu değerin 207.75 µg/ml'ye ulaştığı gözlenirken, 0.3 g/L konsantrasyonlu kültürlerde 150.15 µg/ml, 0.9 g/L konsantrasyonda 104.65 µg/ml ve 1.5 g/L konsantrasyonda ise 64.45 µg/ml olarak belirlenmiştir. İkinci gün gliserol miktarının kontrol grubunda 242.25 µg/ml, 0.3, 0.9, 1.5 g/L konsantrasyonlarda ise; 198.45 µg/ml, 144.40 µg/ml, 104.32 µg/ml olduğu tespit edilmiştir.

İnokülasyonu takip eden dördüncü günde kontrol grubunda gliserol miktarının 340.25 µg/ml ve 0.3 g/L'de 295.55 µg/ml, 0.9 g/L'de 213.25 µg/ml ve 1.5 g/L konsantrasyonlu kültürlerde ise 188.75 µg/ml'ye ulaşmıştır. Gliserol miktarı altıncı güne kadar artmaya devam etmiş ve altıncı günde maksimum değere ulaşmıştır. Altıncı günde kontrol grubunda 485.42 µg/ml olan gliserol miktarı, 0.3 g/L amonyum nitratlı kültürlerde 445.15 µg/ml, 0.9 g/L'de 356.05 µg/ml ve 1.5 g/L konsantrasyonlarda ise 315.15 µg/ml ile maksimum değere ulaştığı görülmüştür (şekil 3.21).

Altıncı günden sonra gliserol miktarı tüm kültürlerde azalmış ve çalışmanın son gününde gliserol miktarının kontrol grubunda

272.75 $\mu\text{g/ml}$, 0.3 g/L konsantrasyonda 235.85 $\mu\text{g/ml}$, 0.9 konsantrasyonda 156.6 $\mu\text{g/ml}$ ve 1.5 g/L konsantrasyonda ise 80.25 $\mu\text{g/ml}$ olduğu tespit edilmiştir. İnokülasyon gününe kıyasla altıncı günde kontrol grubunda %703'lük artış, 0.3 g/L konsantrasyonda %636, 0.9 g/L konsantrasyonda %488, 1.5 g/L %421 artışın olduğu belirlenmiştir.

Şekil 3.21. Farklı azot konsantrasyonlarının *C.vulgaris*'in gliserol miktarına etkisi



3.4.4. Farklı Azot Konsantrasyonlarının *C.vulgaris*'in Astaksantin Miktarına Etkisi

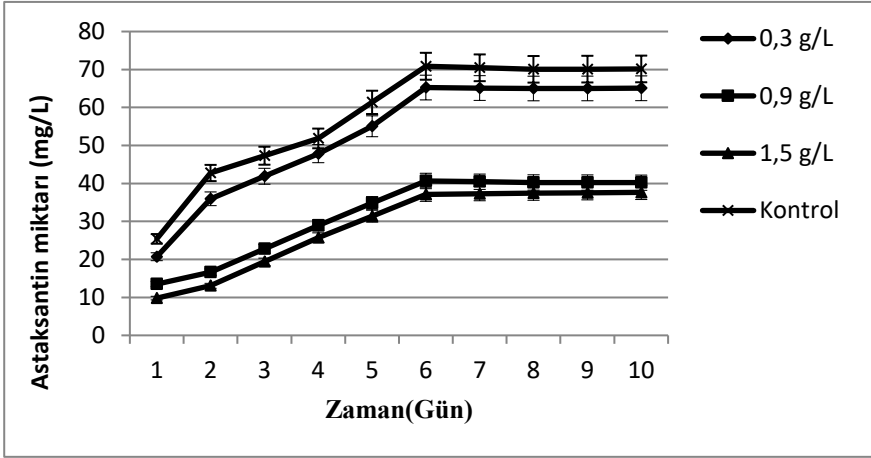
Chlorella vulgaris'in astaksantin miktarı üzerinde farklı azot konsantrasyonlarının etkisi on gün süre ile incelenmiştir. *C. vulgaris*'in stok kültürlerinden farklı azot konsantrasyonlarına sahip sıvı kültürlerle inokülasyonun yapıldığı gün 8.50 mg/L olan astaksantin miktarının çalışmanın ilk gününde kontrol grubunda 25.40 mg/L'ye 0.3 g/L amonyum nitrat konsantrasyonuna sahip sıvı

kültürlerde 20.70 mg/L, 0.9 g/L’de 13.50 mg/L ve 1.5 g/L amonyum nitratı sahip kültürlerde ise 9.80 mg/L’ye ulaştığı tespit edilmiştir. İkinci gün astaksantin miktarında fark edilir bir artışa rastlanılmış, bu artış üçüncü ve dördüncü günde de devam etmiştir. Dördüncü günde kontrol grubunda astaksantin miktarı 51.85 mg/L ve amonyum nitratın 0.3 g/L olduğu kültürlerde 47.85 mg/L olurken 0.9 g/L’de 28.95 mg/L ve 1,5 g/L amonyum nitrat bulunan kültürlerde ise 25.70 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Altıncı günde tüm kültürlerde astaksantin miktarı maksimum değere ulaşmış ve kontrol grubunda 70.85 mg/L, 0.3 g/L konsantrasyonda 65.25 mg/L, 0.9 g/L konsantrasyonda 40.65 mg/L olan astaksantin miktarı, en düşük 1.5 g/L amonyum nitrat miktarına sahip kültürlerde tespit edilmiştir (37.15 mg/L). Altıncı günden çalışmanın son gününe kadar astaksantin miktarlarında önemli bir değişiklik gözlenmemiş, onuncu günde kontrol grubu kültürlerde astaksantin miktarının 70.15 mg/L olduğu 0.3 g/L amonyum nitrat miktarına sahip kültürlerde 65.05 mg/L, 0.9 g/L’de 40.20 mg/L ve 1.5 g/L’de ise 37.65 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Chlorella vulgaris kültürlerinde astaksantin miktarındaki artış önemli olmuş ve inokülasyonun yapıldığı gün ile altıncı gün arasında kontrol grubunda %733, 0.3 g/L konsantrasyonda % 667, 0.9 g/L’da %378 ve 1.5 g/L konsantrasyonda ise % 337’lik artışın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.22).

Şekil 3.22. Farklı azot konsantrasyonlarının *C.vulgaris*’in astaksantin miktarına etkisi

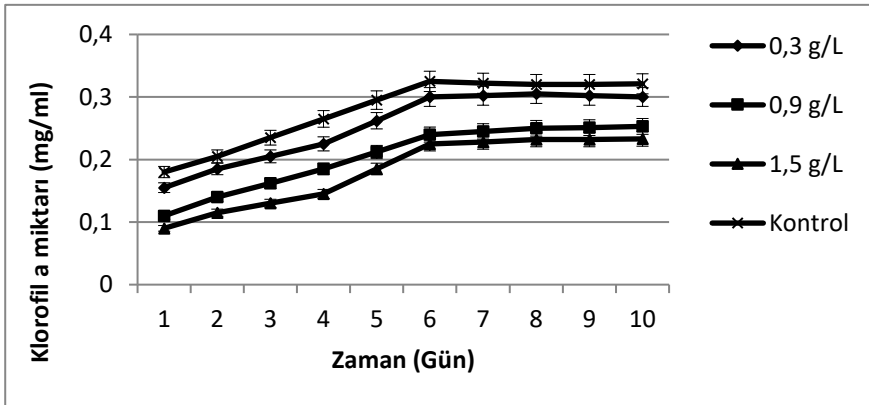


3.4.5 Farklı Azot Konsantrasyonlarının *C.vulgaris*’ in Klorofil a Miktarına Etkisi

Chlorella vulgaris kültürlerinde azot miktarının klorofil a üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile farklı konsantrasyonlarda amonyum nitrat kullanılarak hazırlanan kültürlere ekim yapılmış ve *C. vulgaris*’in klorofil a miktarındaki değişimler on gün süresince tespit edilmiştir. Stok *Chlorella vulgaris* kültürlerinden alınarak hazırlanan sıvı kültürlerde inokülasyonun yapıldığı gün klorofil a miktarının 0.080 mg/ml olduğu, inokülasyonu takip eden birinci gün kontrol grubunda 0.180 mg/ml olan klorofil a miktarının, 0.3 g/L amonyum nitrat bulunan kültürlerde 0.155 mg/ml, 0.9 g/L’de 0.110 mg/ml ve 1.5 g/L’de ise 0.090 mg/ml olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci gününde kontrol grubunda klorofil a miktarının

0.205 mg/ml 0.3 g/L amonyum nitrat bulunan kültürlerde 0.185 mg/ml, 0.9 g/L'de 0.140 mg/ml ve 1.5 g/L'de ise 0.115 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Üçüncü ve dördüncü günde artış göstermeye devam eden klorofil a değerleri beşinci günde kontrol grubunda 0.295 mg/ml, 0.3 g/L konsantrasyonda 0.262 mg/ml, 0.9 g/L konsantrasyonda 0.212 mg/ml ve 1.5 g/L amonyum nitrat ihtiva eden kültürlerde ise 0.185 mg/ml olarak belirlenmiştir. İnokülasyonun altıncı gününde klorofil a miktarı maksimuma ulaşmıştır (Şekil 3.23). Kontrol grubunda klorofil a miktarı 0.325 mg/ml, 0.3 g/L amonyum nitratlı kültürlerde 0.300 mg/ml, 0.9 g/L'da kültürlerde 0.240 mg/ml ve 1.5 g/L konsantrasyonda hazırlanan kültürlerde ise 0.225 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Altıncı günden sonra çalışmanın son gününe kadar klorofil a miktarında önemli bir değişim görülmemiştir.

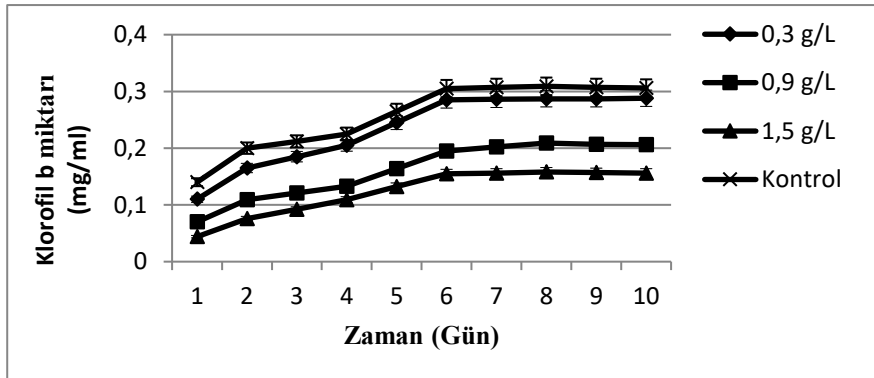
Şekil 3.23. Farklı azot konsantrasyonlarının C.vulgaris'in klorofil a miktarına etkisi



3.4.6 Farklı Azot Konsantrasyonlarının *C.vulgaris*'in Klorofil b Miktarına Etkisi

Amonyum nitrat miktarının klorofil b miktarı üzerindeki etkileri *Chlorella vulgaris* kültürlerinde on gün süresince incelenmiştir. Stok kültürlerden inokülasyonun yapıldığı gün klorofil b miktarının 0.030 mg/ml olduğu ve aşılamaı takip eden ilk gün kontrol grubunda 0.140 mg/ml, 0.3 g/L azot amonyum nitrat ihtiva eden kültürlerde 0.110 mg/ml, 0.9 g/L'de 0.070 mg/ml ve 1.5 g/L konsantrasyonlu kültürlerde ise 0.044 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Klorofil b miktarındaki artış bütün kültürlerde altıncı güne kadar devam etmiş ve altıncı günde maksimum değere ulaşmıştır (Şekil 3.24). Çalışmanın altıncı gününde kontrol grubunda 0.305 mg/ml olan klorofil b miktarı 0.3 g/L amonyum nitrat ihtiva eden kültürlerde 0.285 mg/ml, 0.9 g/L'de 0.195 mg/ml, 1.5 g/L'de ise 0.155 mg/ml olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 3.24. Farklı azot konsantrasyonlarının *C.vulgaris*'in klorofil b miktarına etkisi



3.5 Farklı Fosfat Konsantrasyonlarının *C.vulgaris*'in Gelişim, Protein, Gliserol ve Pigment (astaksantin ve klorofil a, b) Miktarına Etkisi

3.5.1 Farklı Fosfat Konsantrasyonlarının *Chlorella vulgaris*'in Hücre Gelişimine Etkisi

Alglerin bulunduğu ortamın içeriği büyüme kinetiğini doğrudan etkileyebilmektedir. Özellikle fosfatın (PO_4) alglerin gelişimi üzerindeki etkisinin son derece önemlidir. Fosfatın *C. vulgaris*'in gelişimi üzerindeki etkileri farklı PO_4 konsantrasyonları ile hazırlanan kültürlerde incelenmiştir.

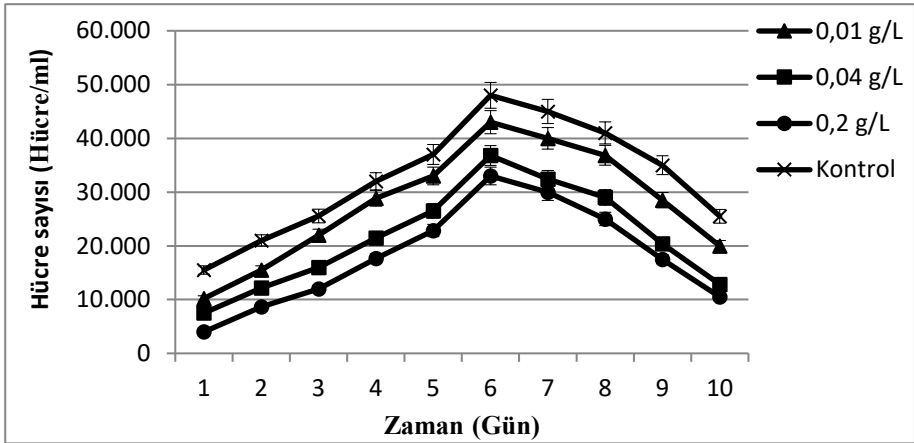
Bu amaçla, stok *C. vulgaris* kültürlerinden 0.01, 0.04 ve 0.2 g/L PO_4 bulunan sıvı kültürlerle inokülasyon yapılmış ve on gün süresince hücre sayısında meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir.

Stok kültürlerden inokülasyonun yapıldığı gün hücre sayısının 3200 hücre/ml olduğu, inokülasyonu takip eden birinci ve ikinci günde hücre sayısının arttığı, ikinci günde kontrol grubunda 21000 hücre/ml olan hücre sayısının 0.01 g/L PO_4 içeren kültürlerde 15500 hücre/ml, 0.04 g/L'de 12200 hücre/ml ve 0.2 g/L PO_4 'da ise 8650 hücre/ml'ye ulaştığı tespit edilmiştir. İnokülasyonu takip eden altıncı güne kadar hücre sayısı artmış ve altıncı günde maksimum sayıya ulaştığı görülmüştür.

Altıncı günde kontrol grubunda 48.000 hücre/ml'ye ulaşan hücre sayısı 0.01 g/L PO_4 içeren kültürlerde 43.000 hücre /ml, 0.04

g/L’de 36800 hücre/ml ve 0.2 g/L PO₄’da ise 33.000 hücre/ml olarak tespit edilmiştir. Altıncı günden sonra bütün kültürlerde hücre sayıları azalmıştır. (Şekil 3.25). Çalışmanın son gününde kontrol grubunda hücre sayısının 25500 hücre/ml, 0.01 g/L konsantrasyonlu kültürlerde 20000 hücre/ml, 0.04 g/L’de 12800 hücre/ml ve 0.2 g/L’de ise 10500 hücre/ml olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 3.25 Farklı fosfat konsantrasyonlarının *C.vulgaris*’in hücre sayısına etkisi



3.5.2 Farklı Fosfat Konsantrasyonlarının *Chlorella vulgaris*’in Protein Miktarına Etkisi

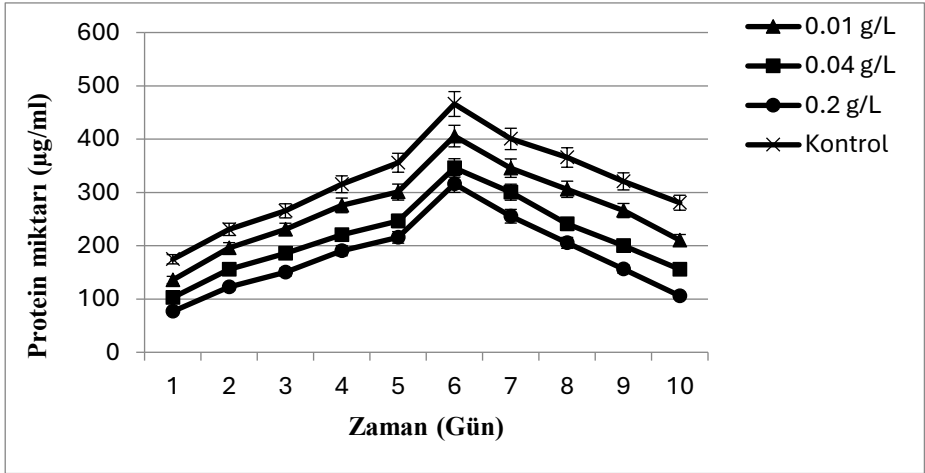
Chlorella vulgaris’in protein miktarı üzerinde PO₄’ın etkilerini incelemek amacı ile farklı PO₄ konsantrasyonu ile hazırlanan kültür ortamlarına stok kültürlerden ekim yapılarak on gün süresince protein miktarındaki değişiklikler tespit edilmiştir.

Stok kültürlerde inokülasyonun yapıldığı gün protein miktarının 65.50 µg/ml olduğu, takip eden birinci günde kontrol grubunda protein miktarının 174.54 µg/ml, 0.01 g/L PO₄ içeren kültürlerde 135.69 µg/ml, 0.04 g/L’da 102.65 µg/ml ve 0.2 g/L konsantrasyonda ise 76.65 µg/ml olduğu tespit edilmiştir.

İkinci ve üçüncü günde de artmaya devam eden protein miktarının dördüncü günde kontrol kültürlerinde 315.25 µg/ml, 0.01 g/L PO₄ içeren kültürlerde 275.65 µg/ml, 0.04 g/L’de 220.65 µg/ml ve 0.2 g/L’de ise 190.65 µg/ml olduğu tespit edilmiştir.

Bütün kültürlerde maksimum protein miktarına altıncı günde ulaşılmış ve kontrol grubunda protein miktarının 465.85 µg/ml, 0.01 g/L PO₄ içeren kültürlerde 405.65 µg/ml, 0.04 g/L’de 345.95 µg/ml ve 0.2 g/L’de ise 315.85 µg/ml olduğu grlmştir. İnokülasyonu takip eden altıncı günden sonra protein miktarının azaldığı ve çalışmanın son gününde kontrol grubunda protein miktarının 280.65 µg/ml, 0.01 g/L’de 210.52 µg/ml, 0.04 g/L’de 155.86 µg/ml ve 0.2 g/L PO₄ içeren kültürlerde ise 105.95 µg/ml’ye azaldığı tespit edilmiştir (şekil 3.26.).

Şekil 3.26. Farklı fosfat konsantrasyonlarının *C.vulgaris*' in protein miktarına etkisi



3.5.3 Farklı Fosfat Konsantrasyonlarının *Chlorella vulgaris*' in Gliserol Miktarına Etkisi

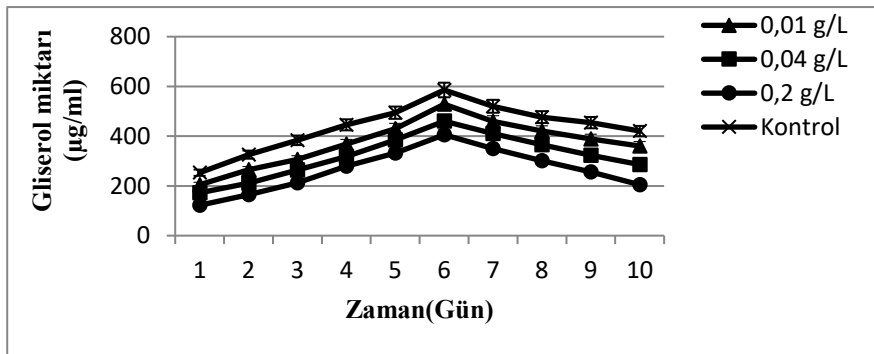
Alglerde fotosentezin bir yan ürünü olan gliserol üzerinde PO_4 miktarının etkilerini incelemek üzere farklı fosfat miktarları ile hazırlanan kültürlerde on gün süresince gliserol miktarları tespit edilmiştir. *Chlorella vulgaris*'in stok kültürlerinden inokülasyonun yapıldığı gün gliserol miktarı 105.50 µg/ml olduğu tespit edilmiştir.

İnokülasyonu takip eden birinci gün kontrol grubunda 252.98 µg/ml olan gliserol miktarının 0.01 g/L PO_4 ihtiva eden kültürlerde 204.51 µg/ml, 0.04 g/L'de 172.19 µg/ml ve 0.2 µg/ml'de ise 122.15 µg/ml olduğu tespit edilmiştir.

İkinci gün kontrol grubunda 325.65 olan gliserol miktarının 0.01 g/L PO₄ miktarına sahip kültürlerde 264.53 µg/ml, 0.04 g/L'de 211.35 µg/ml ve 0.2 µg/ml'de ise 165.32 µg/ml olduğu görülmüştür.

Üçüncü ve dördüncü günlerde bütün kültürlerde artmaya devam eden gliserol miktarı kontrol grubunda dördüncü günde 445.51 µg/ml, 0.01 g/L PO₄ içeren kültürlerde 368.57 µg/ml, 0.04 g/L'de 318.10 µg/ml ve 0.2 g/L konsantrasyonda ise 279.31 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Altıncı güne gelindiğinde gliserol miktarlarının tüm kültürlerde maksimum olduğu ve en yüksek değerin kontrol grubunda (585,65 µg/ml) olduğu görülmüş, 0.01 g/L'de 528.50 µg/ml olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.27). Altıncı günden sonra gliserol miktarı azalmış ve inokülasyonun son günü gliserol miktarları kontrol grubunda 420.18 µg/ml, 0.01 g/L'de 360.20 µg/ml, 0.04 g/L'de 285.65 µg/ml ve 0.2 g/L'de ise 205.13 µg/ml değerlerine düştüğü tespit edilmiştir.

Şekil 3.27. Farklı fosfat konsantrasyonlarının *C.vulgaris*' in gliserol miktarına etkisi



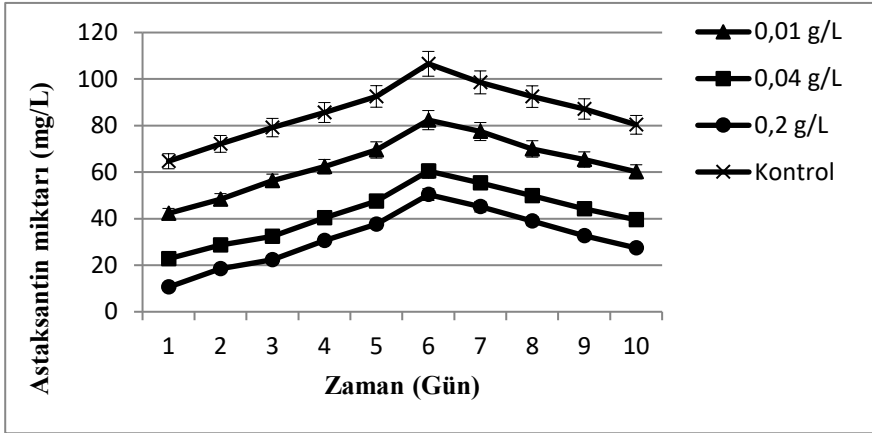
3.5.4 Farklı Fosfat Konsantrasyonlarının *Chlorella vulgaris*'in Astaksantin Miktarına Etkisi

Farklı fosfat konsantrasyonlu kültürlerde inokülasyon günü astaksantin miktarı 9.50 mg/L olarak hesaplanmış ve inokülasyonu takip eden birinci günde fosfat konsantrasyonu 0.2 g/L olan kültürlerde astaksantin miktarı 10.6 mg/L, 0.04 g/L konsantrasyonda 22.8 mg/L, 0.01g/L konsantrasyonda 42.3 g/L ve kontrol grubunda ise 64.68 mg/L astaksantin miktarı analizler sonucunda tespit edilmiştir.

Kontrol grubunda ikinci günde astaksantin miktarı 72.15 mg/L'ye ulaşırken bu grubu 0.01 g/L konsantrasyonlu (48.35 mg/L) kültürler takip etmiştir. 0.04 ve 0.2 g/L konsantrasyonlu kültürlerde ise astaksantin miktarlarının 28.65 mg/L ve 18.45 mg/L'ye artış gösterdiği belirlenmiştir. Üçüncü ve dördüncü günlerde de astaksantin miktarı artmaya devam etmiş altıncı günde maksimum değere ulaştığı tespit edilmiştir.

Altıncı günde kontrol grubunda astaksantin miktarı 106.56 mg/L, 0.01 g/L'de 82.35 mg/L, 0.04 g/L'de 60.45 mg/L, 0.2 g/L'de ise 50.35 mg/L olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.28). Altıncı günden sonra bütün kültürlerde astaksantin miktarı azalmış ve inokülasyonun son gününde kontrol grubunda astaksantin miktarı 80.35 mg/L'ye düşerken, 0.01 g/L konsantrasyonda 60.15 mg/L, 0.04 g/L'de 39.54 mg/L ve 0.2 g/L fosfat konsantrasyonlu kültürlerde ise 27.45 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Şekil 3.28. Farklı fosfat konsantrasyonlarının *C.vulgaris*'in astaksantin miktarına etkisi



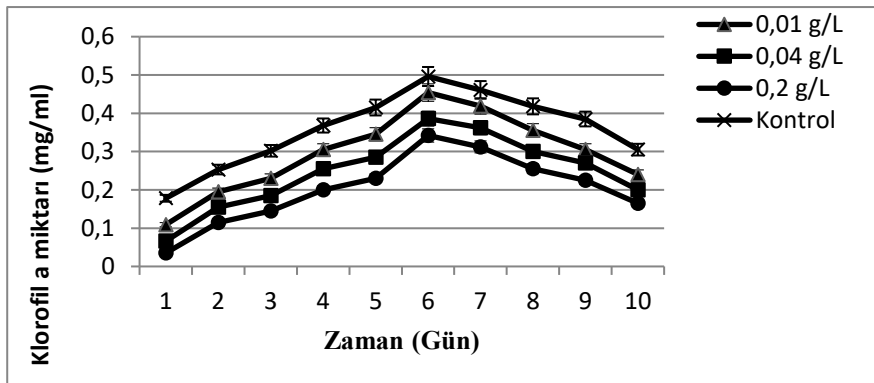
3.5.5 Farklı Fosfat Konsantrasyonlarının *Chlorella vulgaris*'in Klorofil a Miktarına Etkisi

Farklı fosfat konsantrasyonlarına sahip kültür ortamlarında gelişme tabi tutulan *Chlorella vulgaris* örneklerinin pigment miktarındaki değişimler on gün boyunca izlenmiştir. Stok *C. vulgaris* kültürlerinden farklı fosfat konsantrasyonlarına sahip kültür ortamlarına *C. vulgaris* inokülasyon yapıldığı gün bütün kültürlerde klorofil a miktarının 0.020 mg/ml olduğu belirlenmiştir. İnokülasyonu takip eden birinci gün klorofil a miktarının kontrol grubunda 0.178 mg/ml olduğu, 0.01 g/L PO₄ konsantrasyonda 0.109 mg/ml, 0.04 g/L PO₄'da 0.066 mg/ml ve 0.2 g/L PO₄'da ise 0.035 mg/ml'ye ulaştığı tespit edilmiştir.

İnokülasyonu takip eden ikinci günde kontrol grubunda klorofil a miktarı 0.253 mg/ml olurken 0.01 g/ml PO₄ miktarına sahip kültürlerde 0.195 mg/ml, 0.04 g/L'de 0.155 mg/ml ve 0.2 mg/ml PO₄'de ise 0.115 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

İnokülasyonu takip eden üçüncü ve dördüncü günde bütün kültürlerde artmaya devam eden klorofil a miktarı beşinci günde kontrol kültürlerinde 0.415 mg/ml'ye ulaşırken 0.01 g/L PO₄ miktarına sahip kültürlerde 0.345 mg/ml, 0.04 g/L'de 0.285 mg/ml ve 0.2 g/L PO₄'de ise 0.230 mg/ml olmuştur. Altıncı günde bütün kültürlerde maksimum miktarına ulaşan klorofil a kontrol kültürlerinde 0.496 mg/ml, 0.01 g/L'de 0.454 mg/ml, 0.04 g/L'de 0.386 mg/ml ve 0.2 mg/ml PO₄'de ise 0.342 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Altıncı günden sonra çalışmanın son gününe kadar farklı fosfat konsantrasyonlarına sahip bütün kültürlerde klorofil a miktarının azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.29).

Şekil 3.29. Farklı fosfat konsantrasyonlarının *C.vulgaris*' in klorofil a miktarına etkisi



3.5.6 Farklı Fosfat Konsantrasyonlarının *Chlorella vulgaris*'in klorofil b Miktarına Etkisi

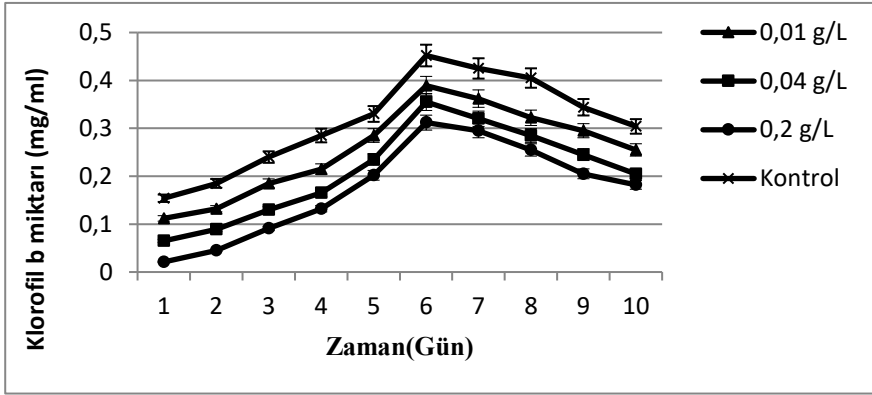
Chlorella vulgaris kültürlerinde klorofil b miktarı üzerinde fosfat miktarının etkisi hazırlanan kültürlerde on gün süresince her gün alınan örneklerde incelenmiştir. Stok *C. vulgaris* kültürlerinden inokülasyonun yapıldığı gün klorofil b miktarının 0.020 mg/ml olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın ilk gününde kontrol grubunda klorofil b miktarının 0.154 mg/ml, 0.01 g/L PO₄'a sahip kültürlerde klorofil b miktarının 0.112 mg/ml, 0.04 g/L'de 0.065 mg/ml ve 0.2 g/L PO₄'da ise 0.021 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. İnokülasyonu takip eden ikinci günde kontrol grubunda 0.185 mg/ml olan klorofil b miktarı 0.01 g/L PO₄'a sahip kültürlerde klorofil b miktarının 0.132 mg/ml, 0.04 g/L'de 0.089 mg/ml ve 0.2 g/L PO₄'da ise 0.045 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Üçüncü, dördüncü ve beşinci günde de klorofil b miktarındaki artışını devam etmiş ve altıncı günde maksimum miktara ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 3.30).

Altıncı günde klorofil b miktarı kontrol grubunda 0.452 mg/ml iken 0.01 g/L PO₄'a sahip kültürlerde 0.389 mg/ml, 0.04 g/L'de 0.355 mg/ml ve 0.2 g/L konsantrasyonlarda ise 0.312 mg/ml tespit edilmiştir. Altıncı günden sonra fosfat miktarı farklı olan bütün kültürlerde klorofil b miktarının azaldığı tespit edilmiştir.

Şekil 3.30 Farklı fosfat konsantrasyonlarının *C.vulgaris*'in klorofil b miktarına etkisi



4. Tartışma ve Sonuç

Algler, bulundukları ekosistemlerdeki primer üreticiler olmalarının yanında yapılarında bulundurdıkları değerli metabolitler ile en dikkat çekici organizmalar arasında yer almaktadırlar. Bu değerli metabolitlerin başında lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve pigmentler gelmektedir. Mikroalglerin sahip olduğu bu metabolitlerin her birinin spesifik içeriği türlere özgüdür ve kullanılan kültür koşullarına göre değişebilmektedir. Mikroalgler, vitamin, mineral, farmasötik bileşenler ve antioksidan kaynağı olan pigment formları bakımından zengin bir kaynak olarak dikkate alınırlar (Converti, 2009). Bu pigment formlarından olan astaksantinler, üstün antioksidan aktiviteye sahip ketokarotenoidlerdir (Miki, 1991), bazı kanser hücrelerinin proliferasyonuna potansiyel engelleyici olarak etki ederler (Tanaka, 1995) ve insanlarda T hücresi aktivitesinin artırılması ile ilgili bir

ilişkisi olduğu ifade edilen değerli alg metabolitlerindendir (Jynouchi, 1995).

Son zamanlarda algler üzerinde yapılan araştırmalar, heterotrofik koşullarda büyüme ve lipit üretimi, atıkların hidrolizatı (Wen vd., 2013), biyodizel türevi ham gliserol (Chen ve Walker, 2011) ve mikсотrofik büyüme altında fazla CO₂ ve gliserol kullanımı (Sforza vd., 2012) gibi farklı karbon kaynaklarının kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır. Bunun yanı sıra mikroalgler sahip olduğu değerli metabolitlerle biyodizel eldesi sayesinde sadece enerji ihtiyacına cevap vermekle kalmayıp, mineraller ve omega 3 yağ asitleri (Mata vd., 2010) gibi ürünlerin kaynağı oldukları için genellikle gıda takviyesi olarak da tüketilmektedirler (Fradique vd., 2010). Son yirmi yılda mikroalgler ve makroalglerden elde edilen bu moleküllerin antibiyotik, antiviral, antikanser, antifungal, antibakteriyel, antiinflamatuvar etkilerinin yanı sıra hipokolestrolemik, enzim inhibisyonu ve diğer bazı farmakolojik etkileri ortaya çıkmıştır.

Bu doğal ürünler sadece ilaç hammaddesi olarak değil, sentetik moleküllerin yapımında da yapısal birer model olarak görev almaktadırlar (Quinn vd., 1993, El-Sheekh vd., 2006). Mikroalglerin büyüme ve biyokimyasal kompozisyonunu iyileştirmek için çeşitli stratejiler kullanılmıştır. Bu stratejilerin başında organizmayı belirli stres faktörlerine tabi tutmak gelmektedir. Çevresel bazı koşullarda değişiklik yapmak suretiyle

oluşturulan stres faktörleri organizmayı doğrudan etkileyebilmektedir. Bu stres faktörlerinden biri olan ışığın hem fotosentez hızını hem de mikroalg hücre büyümesini ve metabolik aktiviteleri etkileyebilen en önemli çevresel faktörlerden biri olduğu vurgulanmaktadır (Wahidin vd, 2013).

Gonçalves ve arkadaşları (2014)'te *Chlorella vulgaris* ve *Pseudokirchneriella subcapitata* ile yaptıkları çalışmada ışık ışınımındaki artışın spesifik büyüme hızı ve biyokütle verimliliğini arttırdığını bildirmişlerdir. Wang vd., (2007) yaptıkları çalışmada ışığın dalga boyundaki değişimin kültürlerin gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla fototrofik kültür koşulunda *Spirulina platensis*'in kırmızı, yeşil, mavi, sarı ve beyaz ışık ile aydınlatılan kültür ortamlarındaki gelişim oranı araştırılmış ve çalışma sonucunda en iyi hücre gelişiminin kırmızı dalgaboyu ile aydınlatılan kültürlerde gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Mohsenpour ve Willoughby (2013), *Chlorella vulgaris*'in fotobiyoreaktörlerde kültüre alındığı çalışmada ise diğer çalışmalara benzer sonuçların elde edildiğini ve kırmızı dalga boyuyuna sahip ışık ile aydınlatılan kültürlerde en iyi hücresel gelişim elde edilirken klorofil a ve b miktarının ise yeşil ışık ile aydınlatılan kültürlerde maksimum olduğunu belirlemişlerdir. Katsuda (2004), ışığın mikroalglerde sadece hücresel gelişimi değil aynı zamanda biyokimyasal yapıyı da etkilediğini ifade ederek mavi led ışık ile aydınlatılan kültürlerde astaksantin miktarının maksimuma ulaştığı belirtmiştir.

Çalışmamızda, farklı dalga boyuna sahip ışık ile aydınlatılan kültürlerle inoküle edilen *Chlorella vulgaris* örneklerinde kırmızı ışık ile aydınlatılan kültür ortamında hücre sayısının maksimum değere ulaştığını tespit ettik. Protein ve gliserol miktarının da hücre sayısındaki artışta olduğu gibi kırmızı ışık ile aydınlatılan kültürlerde oldukça yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Wang vd., 2007, yaptıkları çalışmada kırmızı dalga boyu ile aydınlatılan kültürlerdeki hücre sayısının çalışmamızda elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterdiği görüldü. Çalışmamızın sonuçları, yapılan çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermiş ve kırmızı ışık ile aydınlatılan mikroalglerin hücre gelişimi, protein ve gliserol miktarının artışı üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu fikrini desteklemiştir.

Mohsenpour ve Willoughby, (2013) yaptıkları çalışmada, klorofil a ve b miktarının yeşil ışık ile aydınlatılan kültürlerde maksimum olduğunu astaksantin miktarının ise Katsuda, (2004)'nın yaptığı çalışmada mavi ışıkla aydınlatılan kültürlerde en yüksek değere ulaştığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda pigment ve astaksantin analizleri neticesinde elde ettiğimiz verilerin Mohsenpour ve Willoughby, (2013) ve Katsuda, (2004)'nın çalışmalarına uyumluluk gösterdiği ortaya konulmuştur.

Çeşitli araştırmalar, farklı ortam koşullarının (örn. karbon, azot, fosfor ve demir kaynağının konsantrasyonu) ve çevresel parametrelerin (örn. sıcaklık, ışık kalitesi ve pH miktarı),

mikroalglerin biyokütle ve lipit verimliliğini önemli derecede etkilediğini göstermiştir (Ben-Amortz ve Shaish, 1992; Asulabh vd., 2012; Mata vd., 2010). Gong vd., (2014), ortam pH'sının mikroalglerin gelişimi ve biyokimyasal yapısı üzerindeki etkisini incelemek üzere gerçekleştirdikleri çalışmada pH 7, 8, 9 ve 10 aralığında kültür ortamları hazırlamış ve 20 günlük inokülasyon süresi sonunda pH 10'da hazırlanan besiyerinde kültüre alınan örneklerde hücre sayısının maksimum olduğunu tespit etmişlerdir.

Khalil vd., (2010) yaptıkları çalışmada, pH 4-10 aralığında sıvı kültürlerde inoküle edilen *Chlorella elipsoidea* ve *Dunaliella bardawil*'in hücresel gelişim ve biyokimyasal içeriklerindeki değişim belirlenmiş ve neticede *Chlorella ellipsoidea*'nın pH artışına paralel olarak kuru ağırlık miktarının arttığını, protein miktarının pH 4'te ve klorofil a,b miktarlarının ise pH 4, 6 ve 7 aralığında maksimum miktara ulaştığını tespit etmişlerdir. Sakarika vd., (2016), *Chlorella vulgaris*'in gelişimi için optimum pH'ın belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada, pH artıkça gelişim oranının arttığını belirlenmiş ve bazik ortamda hücre sayısının çok daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır.

Rafiqul vd., (2005), *Spirulina plantesis* ve *Spirulina fusiformis*'in gelişimi için optimum pH değerini belirlemek üzere yaptıkları çalışmada kültür ortamının pH'sının hücre gelişimi için önemli olduğu ve pH 10'un gelişim için elverişli olduğuna vurgu yapmışlardır. Çalışmamızda *Chlorella vulgaris*'in gelişimi için

optimum pH değerinin 10 olduğu belirlenmiş, çalışmamızın sonuçları mevcut çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermiş ve çalışmadan elde ettiğimiz veriler mikrolglerin gelişimi için bazik ortam pH'sının uygun olduğunu göstermiştir. Gond vd., (2014), Khalil vd., (2010) ve Skarika vd., (2016) yaptıkları çalışmalarda bazik pH'larda (pH 8 ve 10) hücre sayısının diğer Ph lara göre yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmamızda hücre sayısının maksimum değerlere ulaştığı inkübasyonun altıncı gününde bazik kültür ortamında (pH 8 ve 10) yüksek olan hücre sayısı pH 10'da 97400 hücre/ml olarak hesaplanmıştır. Protein analizinden elde ettiğimiz sonuçlar, Khalil vd., (2010) yaptıkları çalışma ile paralellik göstermiş ve protein miktarının asidik pH'larda (pH 4 ve 6) zellikle pH 4'te maksimuma ulaştığı tespit edildi.

Farklı pH'ya sahip sıvı kültürlerde gelişime tabi tuttuğumuz *C. vulgaris*'in gliserol miktarının bazik ortamda yüksek olduğu ve pH 10'da (inokülasyonun altıncı günü pH 10'da gliserol miktarı; 920.47 $\mu\text{g/ml}$) en yüksek değere ulaştığını tespit ettik. Ayrıca pH miktarındaki değişimin astaksantin üretimini teşvik ettiği ve asidik pH'larda on günlük inokülasyon sürecinde özellikle pH 6'da astaksantin miktarının maksimum düzeye ulaştığı tespit edilmiştir. Klorofil a ve b analizleri neticesinde elde ettiğimiz sonuçlar Khalil vd., 2010 yılında yaptıkları çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermiş ve pigment miktarının pH 4, 6 ve 7'de maksimum olduğu görülmüştür. Azot yoksunluğu, biyodizel üretimi amacıyla

mikroalglerin biyokütle değerini arttırmaya yönelik en yaygın kabul gören stratejilerden biridir (Hu vd., 2008).

Birçok çalışma, azot sınırlaması veya yoksunluğunun hücre bölünmesini inhibe ettiğini ve mikroalglerin biyokütle verimliliğini azalttığını göstermiştir (Dean vd., 2010; Breuer vd., 2012; Adams vd., 2013). Azot sınırlaması veya eksikliği, mikroalglerdeki karbon dağılımını etkilemektedir (Li vd., 2014). Mikroalgler tarafından fotosentez yoluyla sabitlenen karbon kaynağı çoğunlukla lipitleri, proteinleri ve karbonhidratları sentezlemek için kullanılmaktadır. Bu nedenle bu ana bileşiklerin oranındaki değişiklikler mikroalglerdeki karbon dağılımındaki değişime göre farklılık gösterebilmektedir. Kültür ortamının azot kaynağında yapılan değişiklikler, alg türlerinin hücresel biyomolekül bileşiminde değişimlere sebep olabilmektedir.

Gonzalez-Garccinuno vd., (2014) *Scenedesmus abundans* ve *Chlorella ellipsoidea* ile gerçekleştirdikleri çalışmada kültür ortamında farklı azot kaynakları olarak; NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanmış, hücresel yoğunluk ve lipid miktarındaki değişimleri incelenmiştir. Araştırma sonucunda NH_4NO_3 ile hazırlanan kültür ortamlarında hücre sayısı ve lipid miktarının diğer azot kaynağı ile hazırlanan kültür ortamlarına kıyasla çok daha yüksek olduğunu tespit etmiştir.

Petkov ve Garcia (2007), Azot yoksunluğu ile oluşturdıkları stres koşulunda gerçekleştirdikleri çalışmada, azot

stresinin *Chlorella* türlerinde lipit oranını nasıl etkilediği belirlenmeye çalışmış ve neticede azot eksikliğinin lipid ve yağ asidi miktarında artışa sebep olduğu ifade etmişlerdir.

Sarada vd., (2002) yaptıkları çalışmada ise farklı azot kaynakları ile hazırlanan kültürlerde *Haematococcus pluvialis*'de biomas, astaksantin, klorofil miktarlarındaki değişimler araştırılmış ve klorofil miktarının en yüksek olduğu azot kaynağının NaNO_3 olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda farklı azot kaynakları kullanarak hazırladığımız sıvı besiyerlerine inoküle edilen *Chlorella vulgaris* kültürleriyle gerçekleştirdiğimiz çalışmada, maksimum hücre sayısı NH_4NO_3 ile hazırlanan sıvı kültürlerde elde edilmiştir. İnokülasyon gününden itibaren altıncı günde maksimum olan hücre sayısı NH_4NO_3 ile hazırlanan kültürlerde 96000 hücre/ml'ye ulaşmıştır, çalışmamızın sonuçları Gonzalez-Garccinuno ve arkadaşlarının (2014) çalışmalarının sonuçları ile paralellik göstermiş ve azot kaynağı olarak NH_4NO_3 'ın kullanıldığı sıvı kültürlerde gelişimin daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda protein ve gliserol analizlerin sonucunda hücre sayısındaki sonuçlara benzer şekilde azot kaynağı olarak NH_4NO_3 'ın kullanıldığı kültürlerde maksimum protein ve gliserol miktarları elde edilirken astaksantin analizlerinde en yüksek astaksantin miktarına NaNO_3 ile hazırlanan kültürlerde ulaşılmıştır. Pigment analizleri sonucunda, klorofil a ve b miktarlarının NaNO_3 ile hazırlanan *Chlorella vulgaris*

kültürlerinde maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiş ve çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuçlar Sarada vd. (2002)'nin yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermiştir.

Proteinlerin, klorofillerin, genetik materyalin (DNA ve RNA), adenozintrifosfatın ve mikroalg büyümesinin sürdürülmesinde gerekli olan diğer nitrojen içerikli makromoleküllerin vazgeçilmez bir bileşeni olan azotun besiyerindeki konsantrasyonu, mikroalglerin hücresel gelişimi ve biyokimyasal miktarları üzerine oldukça etkilidir (Li vd., 2012; Simionato vd.; 2013). Wu ve Miao'nun (2014), yaptıkları çalışmada, 14 gün süresince 0, 0.3, 0.6, 0.9 ve 1.5 g/L azot konsantrasyonuna sahip sıvı kültürlerde gelişime tabi tutulan *Chlorella pyrenoidosa*'nın kuru ağırlık, lipit, protein ve karbonhidrat gibi metabolitlerinin miktarındaki değişimler araştırmışlardır.

Çalışmada, 1.5 g/L konsantrasyonlu kültürlerde, kuru ağırlık ve protein miktarının maksimum düzeyde olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Converti vd., (2009), sıvı kültürlerde azot konsantrasyonunun, hücresel gelişim ve lipit verimliliğine olan etkisini inceledikleri çalışmalarında, *Chlorella vulgaris*'in sıvı kültür ortamlarının sıcaklık ve azot konsantrasyonunda değişiklikler yapılmışlar ve araştırma sonunda en iyi gelişimin 1.5 g/L azot konsantrasyonlu kültürlerde olduğunu belirlemişlerdir. Li vd. (2008), yaptıkları çalışmada lipit miktarının kültür ortamındaki azot miktarının artışı ile ters orantılı olarak azaldığına işaret etmişler ve

azot konsantrasyonunun protein miktarı üzerindeki etkilerini ortaya koymuşlardır. Ip vd., (2005), *Chlorella zofingiensis* ile yaptıkları çalışmada düşük azot konsantrasyonlarının, alg kültürlerinde astaksantin üretimini etkilediği belirtmişlerdir. Çalışmamızda, 0.3, 0.9, 1.5 g/L azot konsantrasyonuna sahip kültürlerinde gelişime bırakılan *Chorella vulgaris*'in hücre sayısının ve protein miktarının 1.5 g/L konsantrasyonlu örneklerde maksimum olduğu tespit edilmiştir. Altıncı günde tüm kültürlerde maksimuma ulaşan protein miktarları için kontrol grubunda bu değer 354.59 µg/ml olarak belirlenirken 1.5 g/L konsantrasyonlu kültürlerde ise 314.77 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda hücre sayısı ve protein miktarının Wu ve Miao (2014) ve Converti vd. (2009)'nin çalışmalarıyla benzerlik göstermiş ve 1.5 g/L azot konsantrasyonunda maksimum protein ve gliserol miktarına ulaştığı tespit edilmiştir. Yine çalışmamızda maksimum gliserol miktarının düşük azot konsantrasyonuna sahip kültürlerde olduğu tespit edilmiştir. Astaksantin miktarlarının ise Ip vd., (2005), yaptıkları çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde çalışmamızda da düşük azot konsantrasyonuna sahip sıvı besi ortamlarında yüksek değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Klorofil miktarı da, astaksantin de olduğu gibi 0.3 g/L düşük azot konsantrasyonlarında maksimum olarak belirlenmiştir.

Fosfat, fotosentez sürecinde ve kültür ortamında organizmanın metabolik büyümesinin kontrolünde temel bileşen

olarak kabul edilmektedir (Hu vd., 2012; Wang vd., 2012; Roopnarain vd., 2014). Biyodizel üretim imkanlarını artırma açısından, farklı fosfat konsantrasyonları ile azot eksikliği koşulları altında kültüre edilen *Chlorella vulgaris* örneklerinin biyodizel üretimi için umut verici bir aday olduğu kabul edilmektedir (Griffiths ve Harrison, 2012). Reitan vd., 1994'te yaptıkları çalışmada fosfat sınırlamasının mikroalglerde lipit üretkenliğini önemli ölçüde teşvik ettiğini ortaya koymuşlardır. Feng vd. (2012), *Chlorella zofingiensis*'in kuru ağırlık ve lipit birikimi üzerinde fosfat konsantrasyonlarının etkisinin araştırdıkları çalışmada KH_2PO_4 'ün 0.01, 0.04, 0.2, 0.5 g/L konsantrasyonlarının etkilerini incelemiş ve sonuçta kuru ağırlık miktarının 0.01 g/L konsantrasyonda maksimum seviyede olduğunu tespit edilmişlerdir. Çalışmamızda, KH_2PO_4 'ün 0.3, 0.9, 1.5 g/L konsantrasyonlarında hazırlanan sıvı kültürlerle inoküle edilen *Chlorella vulgaris* örneklerinin hücre sayısı, protein, gliserol ve pigment analizleri yapılmış ve Feng vd., (2012), yaptıkları çalışmanın sonuçlarıyla benzer şekilde en düşük fosfat konsantrasyonunda maksimum hücre sayısına ulaşılmıştır.

Çalışmamızda bu maksimum değer inokülasyonun altıncı gününde 0.01 g/L konsantrasyonda 43000 hücre/ml olarak hesaplanmıştır. Çalışmamız süresince kontrol grubundaki hücre sayısı, tüm fosfat konsantrasyonlarına sahip besi yerlerinden daha yüksek miktarlara ulaşmıştır. Protein ve gliserol miktarı ise yine en düşük fosfat konsantrasyonunda (0.01 g/L) maksimum olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, daha önce yapılan

Çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermiş ve başta hücre sayısı ölçümleri olmak üzere protein, astaksantin, gliserol ve pigment (klorofil a ve b) analizlerinin tümünde 0.01 g/L PO₄ konsantrasyonasahip sıvı besiyerlerinde inokülasyon süresince maksimum değerlere ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışmada, yeşil algler içerisinde önemli bir yer tutan *C. vulgaris*'in hücre sayısı, protein, pigment ve gliserol miktarı üzerinde ışık dalga boyu, pH, azot kaynağı ve konsantrasyonu ile fosfat konsantrasyonunun etkileri incelenmiştir. Bu alışma ile geleceğimizi tehdit eden protein eksikliği, enerji problemi ve sağlık sorunlarının giderilmesine yönelik çalışmalara ışık tutacak sonuçlar elde edilmiştir. *C.vulgaris*'in protein miktarındaki artışın; kırmızı dalga boyuna sahip olan ışıkta, pH 4'de, azot haysnağı olarak amonyum nitratla hazırlanan ve 1.5 g/L konsantrasyondaki besiyerinde gerçekleştiği tespit edildi. Maksimum gliserol miktarının ise kırmızı dalga boyuna sahip olan ışıkta, pH 10'da, azot haysnağı olarak amonyum nitratla hazırlanan ve 0.3 g/L konsantrasyona sahip besiyerinde olduğu belirlendi. Astaksantin miktarının mavi dalga boyuna sahip ışıkta, pH 6'da, azot kaynağı olarak sodyum nitratla hazırlanan ve 0.3 g/L konsantrasyona sahip besiyerinde artış gösterdiği tespit edildi. Klorofil a ve klorofil b miktarının ise yeşil dalga boyuna sahip olan ışıkta, pH 7'de, azot haysnağı olarak sodyum nitratla hazırlanan ve 0.3 g/L konsantrasyona sahip besiyerinde gerçekleştiği belirlendi.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu sonuçlar, yapılacak olan mikroalg kültür çalışmalarına ve mikroalglerin ihtiva ettikleri ekonomik değere sahip olan metabolitlerin eldesine ve miktarlarının artırılmasına yönelik çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Kaynaklar

Adams C., Godfrey V., Wahlen B., Seefeldt L., Bugbee B., 2013. Understanding precision ni-trogen stress to optimize the growth and lipid content trade off in oleaginous green microalgae, Bioresour. Technol. 131:188–194.

Altuğ, T., 2001, Gıda katkı maddeleri, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 286.

Apha, 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Treatment, 12th Ed. American Public Health Association, New York.

Arora, N., Patel, A., Pruthi, A.P., Pruthi, V., 2016. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. Bioresource Technology; 213: 79-87.

Asulabh, K.S., Supriya, G., and Ramachandra, T.V., 2012. Effect of Salinity Concentrations on Growth Rate and Lipid Concentration in *Microcystis* Sp., *Chlorococcum* Sp. and *Chaetoceros* Sp., LAKE: National Conference on Conservation and Management of Wetland Ecosystems, School of Environmental Sciences Mahatma Gandhi University, Kottayam, Kerala.

Baydar, S., 1990. Tohumuz bitkiler sistematiği. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi, 261.

Becker E.W. 1994. Microalgae biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press.

Belotti, G., Bravi, M., Caprariis, B.De., Filippis, P.De., Scarsella, M., 2013. Effect of nitrogen and phosphorus starvations on *Chlorella vulgaris* lipids productivity and quality under different trophic regimens for biodiesel production. *AJPS* 4, 44–51.

Ben-Amotz, A., and Shaish, A., 1992. Carotene biosynthesis. In: Avron, M., Ben-Amotz, A. (Eds.), *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, FL, 206–216pp.

Bertling, K., Hurse, T.J., Kappler, U., and Rakic, A.D., 2006. Lasers an effective artificial source of radiation for the cultivation of anoxygenic photosynthetic bacteria, *Biotechnol Bioeng* 94:337–345pp.

Beyerinck [Beijerinck], M.W. 1890. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung* 47: 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.

Bono, M.S., Ahner, Kirby, B.A., 2013. Detection of algal lipid accumulation due to nitrogen limitation via dielectric spectroscopy of *Chlamydomonas reinhardtii* suspensions in a coaxial transmission line sample cell. *Bioresour. Technol.* 143, 623–631.

Borowitzka A. Michael and Borowitzka J. Lesley. 1988. Micro-Algal Biotechnology. Cambridge University Press. pp. 27 - 58.

Boussiba S., 2000. Carotenogenesis in green alga *Haematococcus pluvialis* : Cellular physiology and stress response, *Physiologia Plantarum*, 108:111-117.

Boussiba, S. and Vonshak, A., 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* 32, 1077– 1082.

Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains, *Bioresour. Technol.* 124:217–226.

Brindley C., Fernandez F.G.A., Fernandez-Sevilla J.M., 2011. Analysis of light regime in continuous light distributions in photobioreactors, *Bioresour. Technol.* 102:3138–3148.

Carvalho, A.P., Silva, S.O., Baptista, J.M., and Malcata, F.X., 2011. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects, *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1275–1288 DOI 10.1007/s00253- 010-3047-8pp.

Chakraborty, S., Mohanty, D., Ghosh, S., Das, D., 2016. Improvement of lipid content of *Chlorella minutissima* MCC5 for biodiesel production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 1-7.

Cheirsilp, B., Torpee, S., 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation, *Bioresour. Technol.* 110:510–516.

Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J., Chang, J.S., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review, *Bioresour. Technol.* 102 :71–81.

Chen, Y., Li, D., and Lu, W., 2003. Screening and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of *Haematococcus pluvialis*, *Biotechnology Letters*, 25: 527-529.

Chen, Y.H., Walker, T.H., 2011. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnol. Lett.* 33, 1973–1983.

Chia, A.M., Bako, S.P., Alonge, S.O., Adamu, A.K., 2011. Green algal interactions with physicochemical parameters of some manmade ponds in Zaria northern Nigeria. *Braz. J. Bot.* 34, 285–295.

Chia, A.M., Lombardi, A.T., Melão, M.G.G., Parrish, C.C., 2013. Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Eur. J. Phycol.* 48, 1–11.

Chu WL, See TC, Phang SM. 2009. Use of immobilised *Chlorella vulgaris* for the removal of colour from textile dyes. *J. Appl Phycol.* 21(6): 641-648. doi: 10.1007/s10811-008-9396-3

Chu, F.F., Chu, P.N., Cai, P.J., Li, W.W., Lam, P.K.S., Zeng, R.J., 2013. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. *Bioresource Technology*; 134:341-346.

Cirik, S., ve Gökpinar, Ş., 2006. Plankton Bilgisi ve Kültürü, Ege Üniversitesi Yayınları, Su Ürünleri Fakültesi Yayın No:47, Ders Kitabı Dizini No:17. Ders Kitabı, 4. Baskı. Bornova- İzmir.

Cirik, S., ve Gökpinar, Ş., 1993. Plankton bilgisi ve kültürü, Ege Üniversitesi Yayınları, 47, İzmir, 274.

Cohen, Z.V., 2000. Chemicals from microalgae, Taylor & Francis publishers, 419 p.

Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Borghi, M.D., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nanochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel Production. *Chemical Engineering and Processing*; 48:1146-1151.

Das, P., Lei, W., Aziz, S.S., Obbard, J.P., 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light, *Bioresour. Technol.* 102:3883– 3887.

Davies, B.H., 1976. Analysis of carotenoid pigments. In: Chemistry and Biochemistry of plant pigments. Godwin, T.W. (ed.) Academic Press, New York. Vol 2, 38-165.

Dean A.P., Sigee D.C., Estrada B., Pittman J.K., 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid de-termination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae, Bioresour. Technol. 101: 4499–4507.

Dodds, W.K., Smith, V.H., Lohman, K., 2002. Nitrogen and phosphorus relationships to benthic algal biomass in temperate streams. Can. J. Fish Aquat. Sci. 59, 865–874.

El-Sheekh, M.M., Osman, M.E.H., Dyab, M.A. and Amer, M.S., 2006. Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. Environmental Toxicology and Pharmacology 21. 42-50.

Fabregas, J., Dominguez, A., and Otero A., 2001, Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, Journal of Biotechnology 89: 65-71.

Feng, P., Dang, Z., Fan, L., Hu, Z., 2012. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. Journal of Bioscience and Bioengineering; Vol. 114, No 4, 405-410.

Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Raymundo, A., 2010. Incorporation of *Chlorella*

vulgaris and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: preparation and evaluation. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1656–1664.

Gantar M., Svircev Z., 2008. Microalgae and Cyanobacteria : Food for thought. *Journal of Phycology* 44 (2): 260-268.

Giannelli, L., Yamada, H., Katsuda T., Yamaji, H., 2015. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; vol.119 No, 345-350.

Gonçalves, A.L., Simoes, M., Pires, J.C.M., 2014. The effect of light supply on microalgal growth, CO₂ uptake and nutrient removal from wastewater. *Energy Convers. Manage.* 85, 530–536.

Gong, Q., Feng Y., Kang, L., Luo, M., Yang, J., 2014. Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. *Energy Procedia*; 61:2012-2015.

González-Garcinuno, A., Anonio T., Sánchez-Álvarez, J.M., Martín del Valle, E.M., Galán, M.A., 2014. Effect of nitrogen sources on growth and lipid accumulation in *Scenedesmus abundans* and *Chlorella ellipsoidea*. *Bioresource Technology*; 173:334-341.

Gouveria, C., Trigo, R.M., DaCamara, C.C., Libonati, R., Pereira, J.M.C., 2008. The North Atlantic Oscillation and European vegetation dynamics. *Int. J. Climatol* 28:1835-1847.

Griffiths, M., Hille, R. van, Harrison, S.L., 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal

species grown under nitrogen replete and limited conditions, J. Appl. Phycol. 24 (2012) 989–1001.36.37.38.39.

Grung, M., Borowitzka, M., and Jensen, S., 1992. Algal carotenoids, 1. Sekondary carotenoids, 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S-3'S)-astaxanthin esters, J. Appl. Phycol., 4: 165-171.

Guerin, M, Huntley, M.E, Olaizola, M., 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends Biotechnol 2003;21:210–6.

Gushina, I.A., Harwood, J.L., 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. Prog. Lipid Res. 45, 160–186.

Hagen, C., Grünewald, K., and Rothe, E., 2001. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*, Journal of Applied Phycology, 13:79-87.

Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. Biotechnol. Adv. 30: 709–732.

Ho, S.S., Huang, S.W., Chen, C.Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J.S., 2013. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E, Bioresour. Technol. 135:157–165.

Hossain, A.S., Salleh, A., Boyce, A.N., 2008. Chowdhury P., Naquiuddin M., Biodiesel fuel production from algae as renewable energy, *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, 4 (3), 250-254.

Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *Plant J.* 54 621–639, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2008.03492>.

Hu, B., Min, M., Zhou, W., Du, Z., Mohr, M., Chen, P., Zhu, J., Cheng, Y., Liu, Y., Ruan, R., 2012. Enhanced mixotrophic growth of microalga *Chlorella* sp. on pretreated swine manure for simultaneous biofuel feedstock production and nutrient removal. *Bioresource Technology* 126, 71–79.

Ilman, A.M., Scragg, A.H., Shales, S.W., 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 631–635.

Ip, P.F., Chen F., 2005. Peroxynitrite and nitril chloride enhance astaxanthin production by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Process Biochem*; 40:3595-3599.

Ip, P.F., Kaho, W., Chen, F., 2004. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture. *Process Biochem*; 39:1761-1766.

İnanç, A., 1994. *Scenedesmus* sp.' nin tatlı sulardan izolasyonu ve laboratuvar şartlarında üremesinin araştırılması, G.Ü. Yüksek lisans tezi.

Jackson, S.A., Eaton-Rye, J.J., Bryant, D.A., Posewitz, M.C., Davies, F.K., 2015. Dynamics of photosynthesis in a glycogen-deficient *glgC* mutant of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (18), 6210–6222.

Juneja, A., Ceballos, R.M., Murthy, G.S., 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies* 6, 4607–4638.

Jyonouchi H, Sun S, Tomita Y, Gross MD., 1995. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including Thelper cell clones and suboptimal doses of antigen. *J Nutr* 1995;125:2483– 92.

Kamalanathan, M., Pierangelini, M., Shearman, L.A., Gleadow, R., Beardall, J., 2015. Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.*

Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K. and Katoh, S., 2014. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs, *Enzym and Microbial Technology*; 35:81-86.

Keeling, P.J., 2013. The number, speed and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:583-607.

Khalil, Z.I., Asker, M.M.S., El-Sayed, S., Kobbia, I.A., 2010. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World J. Microbiol Biotechnol*; 26:1225-1231.

Kommareddy, A., and Anderson, G., 2004. Study of light requirements of a photobioreactor, North Central ASAE/CSAE Conference Presentation MB04-111, Winnipeg, USA.

Li, J., Han, D., Wang, D., Ning, K., Jia, J., Wei, L., et al., 2014. Choreography of transcriptomes and lipidomes of *Nannochloropsis* reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae, *Plant Cell* 26:1645–1665.

Li, Y., Fei, X., Deng, X., 2012. Novel molecular insights into nitrogen starvation induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*. *Biomass Bioenergy* 42, 199–211.

Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2011. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions, *Bioresour Technol.* 102:123–129.

Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, Q.C., 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 81:629-636.

Li, Y., Lian, S., Tong, D., Song, R., Yang, W., Fan, Y., Qing, R., Hu, C., 2000. One-step production of biodiesel from *Nannochloropsis* sp. on solid base Mg–Zr catalyst, *Appl. Energy*, 88 (10), 3313-3317, 2011.

Liang, G., Mo, Y., Tang, J., Zhou, Q., 2011. Improve lipid production by pH shifted strategy in batch culture of *Chlorella protothecoides*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5 (28), 5030–5038.

Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett*; 31:1043-1049.

Liu, J., Huang, J., Jiang, Y., Chen, F., 2012. Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*; 107:393-398.

Liu, Z.Y., Wang, G.C., Zhou, B.C., 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 99 (11), 4717–4722.

Lorenz RT, Cysewski GR., 2000. Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol* 2000;18:160–7.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 193, 265-75

Ly, J.M, Cheng, L.H., Xu, X.H., Zhang, L., Chen, H.L., 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions, Bioresour. Technol. 101: 6797–6804.

Margalith, P., 1999. Production of ketocarotenoids by microalgae, Applied Microbiol Biotechnol, 51: 431-438.

Marriott, M.F.H. and Blankenship, R.E., 2011. Evolution of photosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. 62:515-548.

Mata T. M., Martins A.A, Caetano N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14: 217-232.

Mathews, van Holde and Ahern, 2000. Biochemistry, Third Edition. Wesley Longman.

Miki, W., 1991, Biological functions and activities of animal carotenoids, Pure Appl. Chem.. 63: 141-146.

Mischler, J.A., Taylor, P.G., Townsend, A.R., 2014. Nitrogen limitation of pond ecosystems on the plains of eastern colorado. PLoS One 9 (5), e95757. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095757>.

Mohammadi, F.S., Arabian D., Khalilzadeh, R., 2016. Investigation of effective parameters on biomass and lipid productivity of *Chlorella vulgaris*. *Periodicum Biologorum*; Vol.118, No 2, 123-129.

Mohsenpour, S.F. and Willoughby, N., 2013. Luminescent photobioreactor design for improved algal growth and photosynthetic pigment production through spectral conversion of light. *Bioresour. Technol*; 142:147-153.

Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.G., Lee, K., 2012. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*; 123:279-283.

Naguib, Y., 2000, Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids, *J. Agric. Chem.*, 48: 1150-1154.

Newton, J. 2002. Fluorometric chlorophyll a and total phaeopigment, from TM (trace metal free rosette) casts, (chlTM) added 06-10-94 parameter names changed for DMO Alpha9 release, 06-24-2002.

Orosa, M., Franqueira D., Cid, A., Abalde, J., 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*; 96:3737-378.

Ördög, V., Stirk, W.A., Bálint, P., Aremu, A.O., Okem, A., Lovász, C., Molnár, Z., Staden, J.V., 2016. Effect of temperature and

nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains. *Algal Research*; 16:141-149.

Petkov, G. and Garcia G., 2007. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*. *Biochemical Systematics and Ecology*; 35:281-285.

Pragya, N., Pandey, K.K., Sahoo, P.K., 2013. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 24, 159-171.

Praveenkumar, R., Kim, B., Choi, E., Lee, K., Park, J.-Y., Lee, J.-S., Lee, Y.-C., Oh, Y.-K., 2014. Improved biomass and lipid production in a mixotrophic culture of *Chlorella* sp. KR-1 with addition of coal-fired flue-gas. *Bioresour. Technol.* 171, 500–505.

Prescott, G.W., 1968. *The algae*. Boston: Michigan State University p. 37-67.

Qin, S., Liu, G.-X., Hu, Z.-Y., 2008. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Process Biochem*; 43:795-802.

Quinn, J., Li, H.H., Singer, J., Morimoto, B., Mets, L., Kindle, K. and Merchant, S., 1993. The plastocyanin-deficient phenotype of *Chlamydomonas reinhardtii* Ac-208 results from a frame-shift mutation in the nuclear gene encoding preapoplastocyanin. *J. Biol. Chem.* 268, 7832-7841

Rafiqul, I.M., Jalal, K.C.A, Alam M.Z., 2005. Enviromental factors for optimasition of Spirulina biomass in laboratory culture. Biotechnology; 19-22.

Rai M.P., Gautom T., Sharma N., 2015. Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application, J. Biol. Sci. 15:260e267.

Rai, S.V., Rajashekhar, M., 2014. Effect of pH, salinity and temperature on the growth of six species of marine phytoplankton, J. Algal Biomass Util. 5:55e59

Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Olsen, Y., 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine Microalgae 1. J. Phycol. 30 (6), 972–979

Renstrom, B., Borch, G., and Jensen, S., 1981. Fatty acid composition of some esterified carotenols, Comp. Biochem. Physiol. B., Comp. Biochem. 69: 625-627.

Reynolds, C.S., 2006. Ecology of phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge.

Richmond, A., 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personel view, Journal of Applied Phycology, 12: 441-451.

Ritchie, R.J., 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents, Photosynth Res, 89:27-4 DOI 10./007/s 11120-006-9065-9.

Roopnarain, A., Gray, V.M., Sym, S.D., 2014. Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 156, 408–411.

Ruiz-Marin A, Mendoza-Espinosa L, Stephenson T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Techno.* 101(1): 58-64. doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.076.

Sakarika, M., Kornaros, M., 2016. Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresource Technology*; 219:694-701.

Santhosh, S., Dhandapani, R., Hemalatha, NA., 2016. A Review on potential biotechnological applications of microalgae. *J App Pharm Sci.* 6(08): 179-184. doi: 10.7324/JAPS.2016.60829

Sarada, R., Tripathi, U., Ravishankar, G.A., 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochem*; 37:623.

Scotter, M. J., Castle, L., Roberts, D., 2005. Method development and HPLC analysis of retail foods and beverages for copper chlorophyll (E141 [i]) and chlorophyllin (E141 [ii]) food colouring materials. *Food Additives and Contaminants* 22(12): 1163- 1175.

Sforza, E., Cipriani, R., Morosinotto, T., Bertuccio, A., Giacometti, G.M., 2012. Excess CO₂ supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Bioresource Technol.* 104, 523–529.

Shihira, I., 1965. *Chlorella* physiology and taxonomy of forty-one isolates. Maryland: University of Maryland, College Park 97 p.

Siaut, M., Heijde, M., Mangogna, M., Montsant, A., Coesel, S., Allen, A., Manfredoria, A., Falciatore, A., Bowler, C., 2007. Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornutum*. *Gene*.doi:10.1016/j.gene.2007.05.022 Golden, CO, 149 pp.

Simionato, D., Block, M.A., La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G., 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. *Eukaryot. Cell* 12, 665–676.

Singh, P., Guldhe, A., Kumari, S., Rawat, I., Bux, F., 2015. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 94, 22–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.019>.

Sjors, V.I., Alessvero, F., 2010. Algae base biofuels, Applications and co-products. Environment and natural resources management working paper.Environment Climate Change. Bioenergy Monitoring and Assessment. <http://www.fao.org/3/a-i1704e.pdf>

Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R., 1963. Apractical handbook of seawater analysis, Fishery Research Board, Canada. 310p.

Sturgeon, R.J, Deamler, R.L. and Harbison, H.A., 1979. Improved Method. Spectrophotometric Determination of Glycerol and Its Comparison with an Enzymatic Journal of Pharmaceutical Sciences. 68: 1064 - 1066.

Sukatar, A., 2002. Alg kültür yöntemleri, Ege Üniversitesi Yayınları, 184, İzmir, 168.

Sun, N., Wang, Y., Li, Y.T., Huang, J.C., Chen, F., 2008. Sugar based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). Process Biochem;43: 1288-1292.

Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, Hara A., 1995. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. Cancer Res; 55:4059–64.

Tang H., Chen M., Simon Ng K.Y. , Salley S.O., 2012. Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 109:2468–2474.

Thompson, A.S., Rhodes, J. C. and Pettman, I., 1988. Natural Environmental Research Council Culture Collection of algae and protozoa: catalogue of strains. *Freshwater Biology Association, Ambleside*, p. 164.

Tunail, N. 2009. *Mikrobiyoloji*. Pelin ofset, 448 s., Ankara.

URL.1 <https://tr.wikipedia.org/wiki/pH>

URL.2 <https://tr.freeimages.com/premium/glycerol-glycerine-molecule-chemical-structure> 1876327

URL.3
<http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx>

URL.4
www.algaebase.org/search/species/detail/species_id=27676

Varshney, P., Mikulic, P., Vonshak, A., Beardall, J., Wangikar, P.P., 2014. Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. *Bioresour. Technol.* 11, 184.

Vonshak, A., and Torzillo, G., 2003, International workshop and training course on photobioreactors, *Ebiltem Yayınları*, İzmir, 66.

Wahidin, S., Idris, A., Shaleh, S., 2013. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technol.* 129, 7–11.

Wahidin, S., Idris, A., Shaleh, S., 2013. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technol.* 129, 7–11.

Wang B., Lan C.Q., 2011. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent, *Bioresour. Technol.* 102:5639–5644.

Wang, C.Y., Fu, C.C. and Liu, Y.C., 2007. Effects of using light emitting diodes on the cultivation of *Spirulina* plantesis. *Journal of Biochemical Engineering*; 37:21-25.

Wang, H., Xiong, H., Hui, Z., Zeng, X., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggyery wastewater to produce lipids. *Bioresource Technology* 104, 215–220.

Weisse T., Stadler P., 2006. Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution, *Limnol. Oceanogr.* 51:1708e1715.

Wen, Q., Chen, Z., Li, P., Duan, R., Ren, N., 2013. Lipid production for biofuels from hydrolyzate of waste activated sludge

by heterotrophic *Chlorella protothecoides*. *Bioresource Technol.* 143, 695–698.

Widjaja, A., Chao-Chang, C., Yi-Hsu, J., 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 40, 13–20.26.

Wijffels R.H., Barbosa M.J., 2010. An outlook on microalgal biofuels, *Science* 329 (2010) 796–799.

Wu, H. and Miao X., 2014. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. *Bioresource Technology*; 170:421-427.

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 5494–5500.

Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., Kawano, S., 2004. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J. Plant Res.* 117, 257–264.

Yeesang, C., Cheirsilp, B., 2011. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology* 102 (3), 3034– 3040.

Yin-Hu, W., Yin, Y., Xin, L., Hong-Ying, H., Zhen-Feng, S.,
2012. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-
starvation cultivation condition. *Bioresour. Technol.* 112, 193–198.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.037>.

CHLORELLA VULGARIS'İN GLİSEROL, PİGMENT VE PROTEİN İÇERİĞİ ÜZERİNDE BAZI STRES FAKTÖRLERİNİN ETKİLERİ

