



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

EMS (ETİL METANSÜLFONAT) MUTAJENEZ
YÖNTEMİYLE *Chlorella vulgaris*'in BİYOKÜTLESİNİN
ARTTIRILMASI

Yiğit Sabri ÜNLÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

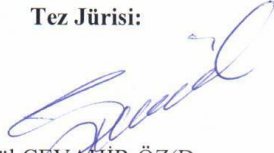
II. DANIŞMAN
Prof.Dr. İ.Halil KAVAKLI

Aralık, 2016

İSTANBUL

Bu çalışma 2.01.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Botanik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

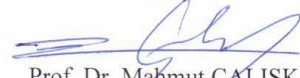
Tez Jürisi:



Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Orhan Küçük
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Gülriz BAYÇU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. İbrahim BARIŞ
Koç Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 39324 numaralı projesi ile desteklenmiştir

ÖNSÖZ

Tezimin her aşamasını yönlendiren, bilgilerini ve yardımlarını eksik etmeyen, akademik alanda yetişmeme ve gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ'e,

Deneylerimi yürüttüğüm Koç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Biyokimya Laboratuvarını açan ve çalışmalarımı yönlendiren, yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI'ya ve Doç. Dr. İbrahim BARIŞ'a, Koç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Biyokimya Laboratuvarından Dr. Mehmet TARDU, Ehsan SARAYLOO, tüm Halil KAVAKLI laboratuvar ekibine,

Ayrıca çalışmalarım esnasında bana Koç Üniversitesi Tüpraş Enerji Merkezi Laboratuvarı'nın imkanlarını sunan Prof. Dr. Can ERKEY'e, Dr. Rıza KIZILEL'e ve Koç Üniversitesi Tüpraş Enerji Merkezi Laboratuvarı'ndan Salim ŞİMŞEK'e teşekkürü borç bilirim.

Tez aşamamda sürekli yanımda olan ve bana her alanda yardım eden Uzm. Yusuf Can GERÇEK, Uzm. Hande Morgil'e ve Araş. Gör. Almila ÇİFTÇİ'ye teşekkür ederim.

Eğitim öğretim aşamalarımnda beni maddi manevi her anlamda destekleyen annem Selma YAVUZ'a, ablam Hande ÜNLÜ'ye ve halam Ümran BULDUK'a,

Uzun süren tez aşamamda bana koşulsuz desteklerini sunan babam Ahmet Hamdi ÜNLÜ'ye ve Nevzat KARAMAN'a,

Tezimin yazım aşamasıda desteklerini esirgemeyen arkadaşım Hande ERMİŞ'e teşekkür ederim.

Aralık 2016

Yiğit Sabri ÜNLÜ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. MİKROALGLER	4
2.1.1. <i>Chlorella vulgaris</i>	5
2.2. MİKROALGLERİN BÜYÜMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	7
2.2.1. Sıcaklık	7
2.2.2. pH.....	7
2.2.3. Karbondioksit.....	8
2.2.4. Işık.....	8
2.2.5. Element	9
2.2.6. Diğer etkenler.....	10
2.3 MİKROALGLERDE MUTASYON TEKNİKLERİ	10
2.4 ALGLERDE LİPİDLER VE LİPİD METABOLİZMASI.....	11
2.5. BİYODİZEL	13
2.5.1.Biyodizel Üretiminde Mikroalglerin Kullanılması.....	15
3. MALZEME VE YÖNTEM	18
3.1. MİKROALG VE KÜLTÜR KOŞULLARI	18
3.2. BÜYÜMENİN VE BİYOKÜTLENİN BELİRLENMESİ.....	18
3.3. AZOT KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ.....	18
3.4. MUTASYON	19
3.5. LİPİD ANALİZİ.....	19

3.5.1. Nil Kırmızısı (Nile Red) Boyama Metodu.....	19
3.5.2. Lipid Kompozisyonunun ve Yağ Asidi Metil Esterlerinin (YAME) Göreceli Miktarlarının Belirlenmesi	20
3.6. RNA TRANSKRİPTOM ANALİZİ (MİSEQ)	21
3.6.1. Total RNA İzolasyonu	21
3.6.2. cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması	21
3.6.3. De Novo Transkriptom Eşleştirmesi ve Anlatımı Farklı Genlerin Analizi ...	22
3.6.4. İşlevsel Annotasyon ve Gen Ontolojisi (GO)	22
3.6.5. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Yolak Annotasyonu .	23
4. BULGULAR	24
4.1. MUTANT SUŞLARIN TARANMASI.....	24
4.1.1. Mutasyonun Lipid Üretimi Üzerine Etkisi	24
4.1.2. Mutasyonun Lipid İçeriği Üzerine Etkisi	28
4.1.3. Mutasyonun Biyokütle Üzerine Etkisi.....	32
4.2. ADAY MUTANT SUŞLARIN TARANMASI	37
4.2.1. Mutasyonun Lipid Üretimi Üzerine Etkisi	37
4.2.2. Mutasyonun Lipid İçeriği Üzerine Etkisi	38
4.2.3. Mutasyonun Biyokütle Üzerine Etkisi.....	39
4.3. MUTASYONUN GENLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ	40
4.4. MUTASYONUN LİPİD KOMPOZİSYONU ÜZERİNE ETKİSİ.....	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>Chlorella vulgaris</i> 'in ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (Zelitch, 1971).	5
Şekil 2.2: Tek hücreli lipid akümülayonu yapan ökaryotik organizmalardaki lipid biyosentezi yolağı (Mühlroth ve diğ., 2013).	13
Şekil 2.3: Transesterifikasyon tepkimesi.	14
Şekil 4.1: Nil kırmızısı standart eğrisi.	24
Şekil 4.2: Mutant suşların (M1-17) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6).	25
Şekil 4.3: Mutant suşların (M18-M34) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6)	25
Şekil 4.4: Mutant suşların (M35-51) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6).	26
Şekil 4.5: Mutant suşların (M52-68) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6).	26
Şekil 4.6: Mutant suşların (M69-85) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6).	27
Şekil 4.7: Mutant suşların (M86-103) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6) ...	27
Şekil 4.8: Mutant suşların (M1-17) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6).	28
Şekil 4.9: Mutant suşların (M18-34) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6).	29
Şekil 4.10: Mutant suşların (M36-51) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6). ...	29
Şekil 4.11: Mutant suşların (M52-68) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6). ...	30
Şekil 4.12: Mutant suşların (M69-85) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6). ...	30
Şekil 4.13: Mutant suşların (M86-103) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6) ..	31
Şekil 4.14: Hücre sayısının belirlenmesi ve zamana bağlı büyüme eğrisi.	32
Şekil 4.15: Nitrat miktarının belirlenmesi ve zamana bağlı nitrat eğimi.	32
Şekil 4.16: Mutant suşların (M1-17) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.	33
Şekil 4.17: Mutant suşların (M18-34) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.	34
Şekil 4.18: Mutant suşların (M35-51) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.	34

Şekil 4.19: Mutant suşların (M52-68) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.	35
Şekil 4.20: Mutant suşların (M69-85) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.	35
Şekil 4.21: Mutant suşların (M86-103) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması ...	36
Şekil 4.22: Mutant suşların lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=12, 2 biyolojik, 6 teknik tekrar).....	37
Şekil 4.23: Mutant suşların lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=12, 2 biyolojik, 6 teknik tekrar).....	38
Şekil 4.24: Mutant suşların biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.	39
Şekil 4.25: EMS (Etil Metansülfonat)'in hücre ölümü üzerine etkisi.	40
Şekil 4.26: M32 suşu ve kontrol grubunun lipid kompozisyonlarının karşılaştırılması (n=2).	45
Şekil 4.27: Mutant M32 ve kontrol grubunun toplam yağ asidi metil esterleri miktarının karşılaştırılması.	46
Şekil 4.28: M32 suşu ve kontrol grubunun lipid miktarlarının karşılaştırılması (n=12, 2 biyolojik, 6 teknik tekrar).	46
Şekil 5.1: Yağ akümüleden mikroorganizmaların azot eksikliğinde yağ akümüasyonu mekanizması. 1. piruvat dekarboksilaz, 2. malat dehidrogenaz, 3. malik enzim, 4. piruvat dehidrogenaz, 5. sitrat sentaz, 6. ATP:sitrat liyaz, 7. sitrat-malat translokaz (Ratledge, 2004).	52
Şekil 5.2: Yağ akümüasyonu yapan organizmalarda varsayımda bulunulan metabolonların işleyiş şeması. OAA, oksaloasetat; AC-CoA, asetil-CoA; Mal-CoA, malonil-CoA; FAS, yağ asidi sentaz; ACL, ATP:sitrat liyaz; ACC, asetil-CoA karboksilaz; CMT, sitrat-malat translokaz; ME, malik enzim; PC, piruvat karboksilaz; MDH, malat dehidrogenaz (Ratledge, 2004).	53
Şekil 5.3: C-3 bitkilerinde fotosentetik karbonun indirgenme şeması ile ışığa bağımlı enzimlerin ve redoks tepkimeleri ile kontrol edilen enzimlerin ilişkisi. NADP-MDH, NADP bağımlı malat dehidrogenaz; PRK, fosforübilokinaz; GAPDH, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz; FBPase, fruktoz-1,6-bifosfat fosfataz; SBPase, sedoheptuloz-1,7-bifosfat fosfataz; G6PDH, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (Ruelland ve Miginiac-Maslow, 1999).	54

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: <i>Chlorella vulgaris</i> 'in sistematikteki yeri (Illman ve diğ., 2000).	6
Tablo 2.2: <i>Chlorella vulgaris</i> 'in normal koşullarda ve azot eksikliğindeki protein, karbonhidrat ve lipid miktarları (Illman ve diğ., 2000).	6
Tablo 2.3: Çeşitli tarımsal ürünler ile mikroalgerin yağ oranı, yağ üretimi, arazi kullanımı ve biyodizel üretimlerinin karşılaştırılması (Mata ve diğ., 2010).	16
Tablo 2.4: Bazı mikroalg türlerinin kuru ağırlıkta yağ içeriklerinin karşılaştırılması (Chisti, 2007).	16
Tablo 4.1: MiSeq RNA dizi analizi sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlatımı farklı genlerin listesi.	41

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
*	: T testi uyarınca istatistiksel olarak anlamlı veri ($p \leq 0,05$)
**	: T testi uyarınca istatistiksel olarak çok anlamlı veri ($p \leq 0,01$)
***	: T testi uyarınca istatistiksel olarak son derece anlamlı veri ($p \leq 0,001$)

Kısaltmalar	Açıklama
ns	: T testi uyarınca istatistiksel olarak anlamsız veri
kg.b.d	: Kilogram başına dizel
Ha	: Hektar
μ l	: Mikrolitre
ug	: Nanogram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
bç	: Baz çifti

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EMS (ETİL METANSÜLFONAT) MUTAJENEZ YÖNTEMİYLE *Chlorella vulgaris*'in BİYOKÜTLESİNİN ARTTIRILMASI

Yiğit Sabri ÜNLÜ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

II. Danışman : Prof. Dr. İ. Halil KAVAKLI

Son zamanda, artan enerji fiyatları, sera gazı emisyonu ve fosil yakıtların kademeli olarak tükenmesi nedeniyle mikroalgal yakıt üretimi büyük ilgi görmektedir. Hızlı biyokütle üretimi, yüksek fotosentez verimi ve büyük miktarda lipid depolama özelliklerine sahip oluşları, mikroalgleri biyodizel için ideal bir kaynak yapmaktadır. Mikroalgler, yağlı tohumlar ve/veya bitkisel yağlara oranla 10-20 kat daha fazla biyodizel üretebilmektedir. 2025 yılına kadar petrole olan küresel talebin %40 artış göstereceği göz önüne alındığında alternatif kaynakların kullanımının yaygınlaşması gerekmektedir. Ancak biyodizel üretimi maliyeti yüksek olduğundan dezavantajlı konumdadır. Bu aşamada biyokütle içeriğini arttırmak ve/veya mevcut biyokütledeki yağ içeriğini arttırmak problemlerin çözümü için gerekli olan stratejilerden ikisidir ve bu sayede biyodizel üretimi için gerekli olan hammadde kaynakları verimli hale gelmiş olacaktır.

Tezin başlıca amacı, bir mikroalg olan *Chlorella vulgaris*'in EMS (Etıl Metansülfonat) mutajenez yöntemi ile biyokütlesinin artırılmasıdır. Elde edilen mutantların Nile Red (Nil Kırmızısı) boyama metoduna göre lipid miktarları saptanmış ve uygun aday seçilmiştir. Lipid içeriği yüksek olan adayın mRNA transkript seviyeleri belirlenmiş ve gaz kromatografi-kütle spektrometre (GC-MS) analiz yöntemiyle lipid kompozisyonları çıkarılmıştır. Tez çalışması kapsamında EMS uygulanan mutant suşlarda lipid üretiminde

%40 lara varan verim artışı gözlemlenmiş olup mevcut lipid kompozisyonunda herhangi bir farklılığa rastlanmamış ancak mevcut kompozisyonundaki yağ asitlerinde artış saptanmıştır. RNA transkriptom (MiSeq) analizi ile elde edilen mRNA transkript seviyelerine göre istatistiksel olarak 51 anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Çalışma kapsamındaki veriler *Chlorella vulgaris*'in mevcut potansiyelinin biyodizel üretimi için gelecek vaad eden bir aday olduğunu ve gelecekte yapılacak çalışmalarda etkin olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Aralık 2016, 79 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Chlorella vulgaris*, Biyodizel, EMS, Mutasyon, Biyokütle

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INCREASING THE BIOMASS of *Chlorella vulgaris* by USING EMS (ETHYL METHANESULFONATE) MUTAGENESIS METHOD

Yigit Sabri UNLU

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Gul CEVAHIR OZ

Co-Supervisor : Prof. Dr. I. Halil KAVAKLI

Recently, microalgae fuel production has attracted a great deal of attention due to the rising energy prices, greenhouse gas emissions and the depletion of fossil fuel stocks. Rapid biomass production, high photosynthesis yield and large quantities of lipid storage of microalgae make it an ideal source for biodiesel production. Microalgae are able to produce 10 to 20 times more biodiesel than oil seeds and/or vegetable oils. Given that the global demand for oil will increase by 40% until 2025, the use of alternative sources must be widespread. However, biodiesel production is disadvantageous because of production cost. Increasing the biomass production and / or increasing the oil content of the existing biomass at this stage is the main strategy for solving the problems and the raw material resources needed for biodiesel production will be efficient.

The main aim of the thesis is to increase biomass by EMS (ethyl methanesulfonate) mutagenesis method in *Chlorella vulgaris*, a microalgae. Lipid quantities of the obtained mutants were determined according to the Nile Red staining method and the candidate mutants were selected. mRNA transcript levels were determined with high lipid content candidate and lipid compositions were extracted and analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis method. According to the results of the thesis study, a yield increase of up to 40% was observed in lipid production and no difference was

detected in the lipid composition, but the increase in the fatty acids in the present composition was found in the mutant strains treated with EMS. A statistically significant difference of 51 mRNA transcript levels was obtained with RNA sequencing (MiSeq) analysis. The data in the study indicate that the potential of *Chlorella vulgaris* is a promising candidate for biodiesel production and can be used effectively in future studies

December 2016, 79 pages.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, Biodiesel, EMS, Mutation, Biomass

1. GİRİŞ

Enerji krizi ve çevre sorunları günümüzde tüm dünyayı ilgilendiren iki önemli konudur ve her ne kadar iki ayrı konu olarak gözükse de aslında birbirleriyle yakından ilişkilidir. Günümüze kadar enerji üretimi adına çevreye verilen zararlar göz ardı edilmiştir. Ancak son yıllarda küresel ısınmanın artmasıyla birlikte çevreye salınan sera gazları dikkate alınmaya başlanmıştır. Diğer yandan petrole olan bağımlılığın giderek artması ve petrol yataklarının azalması araştırmacıları alternatif ve sürdürülebilir kaynaklara yöneltmiştir. Bu anlamda yenilenebilir kaynak olarak biyoyakıtlar ön plana çıkmıştır. Geçmiş yıllarda tarımsal kaynaklı biyokütleden biyoyakıt üretimi ivme kazanmış olsa da, bu ilgi kaynakların azalması ve mevcut tarım uygulamalarından dolayı biyoçeşitliliğin azalması ile bazı sorunları da beraberinde getirmiştir (Fenton ve Ohuallachain, 2012). Biyoyakıt üretim amacı ile mikroalg yetiştiriciliğine ilgi 1950'lerde doğmuştur. 1973 yılında OPEC (Petrol İhraç Eden Ülkeler Birliği)'in petrol fiyatlarını önemli ölçüde yükseltmesi sonucu alternatif kaynaklara yönelim tekrar gündeme gelmiş ve mikroalglerden biyoyakıt üretimine yönelim hız kazanmıştır.

Son zamanlarda artan enerji fiyatları, sera gazı emisyonu ve fosil yakıtların kademeli olarak tükenmesi nedeniyle mikroalgal yakıt üretimi büyük ilgi görmektedir. Mikroalglerin hızlı biyokütle üretimi, yüksek fotosentez verimi ve büyük miktarda lipid depolama özelliklerine sahip oluşları, mikroalgleri biyodizel üretimi için ideal bir kaynak yapmaktadır. Ortalama olarak mikroalgler, yağlı tohumlara ve/veya yağlı bitkilere kıyasla

10-20 kat daha fazla biyodizel üretebilmektedir (Rasoul-Amini ve diğ., 2011). Algal biyodizel operasyonlarının üretim verimliliği, içerdikleri lipid miktarına ve alglerin hücre büyüme oranına bağlıdır. Yapılan araştırmalar, alglerdeki yağ oranının %2'den %75'e kadar değişebileceğini göstermektedir (Mata ve diğ., 2010). *Chlorella* sp. başta C16:0, C18:1 ve C18:3 yağ asitleri olmak üzere, hacimlerinin %20'sini lipid olarak biriktirme potansiyeline sahiptir (Rasoul-Amini ve diğ., 2011). Mikroalglerin potansiyeli elli yılı aşkın bir süredir bilinmesine ve yirmi yılı aşkın bir süredir ciddi bir araştırma konusu olmasına rağmen, yakın zamana kadar ticari gelişiminde çok az ilerleme olmuştur (Tang ve diğ., 2011).

Biyoyakıtlar iki ana yolla üretilir: biyokimyasal (fermentasyon, sindirim vb.) yol ya da kimyasal/termokimyasal (transesterifikasyon, piroliz, gazlaştırma vb.) yol. Her iki durumda da büyük miktarlarda, tercihen gıda kaynaklı olmayan, ucuz ve sürdürülebilir biyokütle ham malzemesine ihtiyaç vardır. Santraller ve diğer endüstriyel işlemlerin baca gazından gelen CO₂'i doğrudan yakalayıp fotosentez yoluyla faydalı ürünlere dönüştürme yeteneğine sahip olmasından dolayı mikroalg üretimi umut verici teknolojilerden biri olmuştur. Bu nedenle, biyoyakıt endüstrisinde hammadde kaynağı olarak mikroalglerin kullanılması son yıllarda çok ilgi görmeye başlamıştır.

Son on yılda alternatif yeni yakıt kaynakları bulmak için yoğun araştırmalar yapılmıştır. Biyokütleden elde edilen yenilenebilir enerji kaynağı olarak biyodizel en iyi adaydır (Ahn ve diğ., 2012; Tran ve diğ., 2012). Biyodizel halen hayvansal yağlar, bitkisel yağlar, ayçiçeği yağı, hurma yağı, kolza tohumu yağı ve atık yağlardan üretilir (Ahn ve diğ., 2012; Tran ve diğ., 2012). Fakat biyodizel üretimine arz edilenden daha fazla talep olduğundan, alternatif biyokütle kaynakları gerekmektedir. Mikroalgler biyodizel üretimi için en değerli alternatif hammadde kaynağıdır. Mikroalglerin petrol üretimi açısından diğer toprak kökenli bitkilere göre çeşitli avantajları vardır. Yüksek büyüme oranlarına sahiptirler, basit tek hücreli yapısı ve yüksek fotosentez verimi yağlı tohumdan daha yüksek yağ verimi sağlar (Lardon ve diğ., 2009). Bununla birlikte sadece tohumu hasat edilen karasal yağ bitkilerinin aksine, her bir alg hücresi lipid içerir. Dolayısıyla biyokütleden elde edilen ürün verimi çok daha yüksektir (Becker, 1994).

Yenilenebilir kaynaklardan biyoyakıt üretimi petrol kaynaklı yakıtlara göre en yaygın, çevresel ve ekonomik sürdürülebilir alternatiflerden biri olarak kabul edilmektedir (Dragone ve diğ., 2010). Ancak, biyoyakıt alma süreci istenen ürünlerin verimi düşük olduğundan zaman alıcı ve pahalı bir iştir. Dolayısıyla alg biyoteknolojisi araştırma amaçları, üreme oranını arttırmak, girdilerin metabolizmasını iyileştirmek ve faydalı türlerde istenen yağların ya da proteinlerin üretimini artırmak için yeni yollar bulmayı amaçlamaktadır (Cuello, 2005; Grima ve diğ., 2003; Hossain ve diğ., 2008). Son zamanlarda, yeni bir *Chlorella* sp. türü arktik deniz buzundan izole edilip ArM0029B olarak adlandırılmıştır. *C. vulgaris* ile karşılaştırıldığında bu mikroalg daha geniş bir sıcaklık aralığında daha hızlı bir büyüme göstermiş ve azot açlığı altında yağ asitleri daha

yüksek seviyelerde birikmiştir (Ahn ve diğ., 2012). Bu sonuçlar biyodizel üretimi için umut verici bir aday olduğuna işaret etmektedir.

Mikroalglerde lipid üretimini arttırmak için çeşitli çalışmalar yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. *Nannochloropsis* sp. türünde EMS kullanılarak elde edilen mutantlarda lipid üretimi %21, ağır iyon ışıması sonucu elde mutantlarda ise %29 artış saptanmıştır (Anandarajah ve diğ., 2012; Ma ve diğ., 2013).

Bu tez çalışmasında ise *Chlorella vulgaris* #211-12 suşu kullanılmış olup EMS ile elde edilen mutant suşta lipid üretiminde benzer artışlar saptanmıştır. GC-MS analizine göre kompozisyonda yeni bir yağ asidi olmamakla birlikte var olan yağ asitlerinin miktarlarında artış gözlemlenmiştir. MiSeq RNA transkriptom analizi sonucuna göre ise 51 istatistiksel anlamlı farklılık mevcut olup buradaki farklılıkların bazılarının lipid metabolizması ile yakından alakalı olduğu tespit edilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1.MİKROALGLER

Mikroalgler, güneş enerjisini kullanabilen fotosentez yapan ve bunun sonucunda protein, karbonhidrat, yağ ve diğer değerli organik bileşikler (karotenoid, astaksantin vb.) üretebilen ökaryotik canlılardır (Cuellar-Bermudez ve diğ., 2014). Fotosentetik organizmalar olarak, zengin biyolojik çeşitliliğe sahip sucul ekosistemlerin üyeleri içerisinde önemli bir grubu temsil etmektedirler. Bunun nedeni, mikroalglerin mikroskobik canlılardan balıklara ve oradan da insana kadar uzanan besin zincirinde, başta klorofil olmak üzere sahip oldukları fotosentetik pigmentler yoluyla birincil üretimi gerçekleştirmeleri ve zincirin ilk halkasını oluşturmalarıdır. Atmosferik oksijenin yaklaşık yarısını üreten mikroalgler, aynı anda sera gazı karbondioksitini kullanarak fototrofik olarak büyümektedir.

Tatlı, tuzlu ve acı sularda yaşayan bu organizmaların boyutları türlere göre değişmekle birlikte bir kaç mikrometreden birkaç yüz mikrometreye kadar çıkabilir. Muazzam biyoçeşitliliğe sahip mikroalglerin 200 bin ile 800 bin arasında türü olduğu tahmin edilmektedir. Ancak bunun 50 bin kadar tanımlanmış ve sadece 100 kadar tür laboratuvar düzeyinde üretilmiştir (Starckx, 2012).

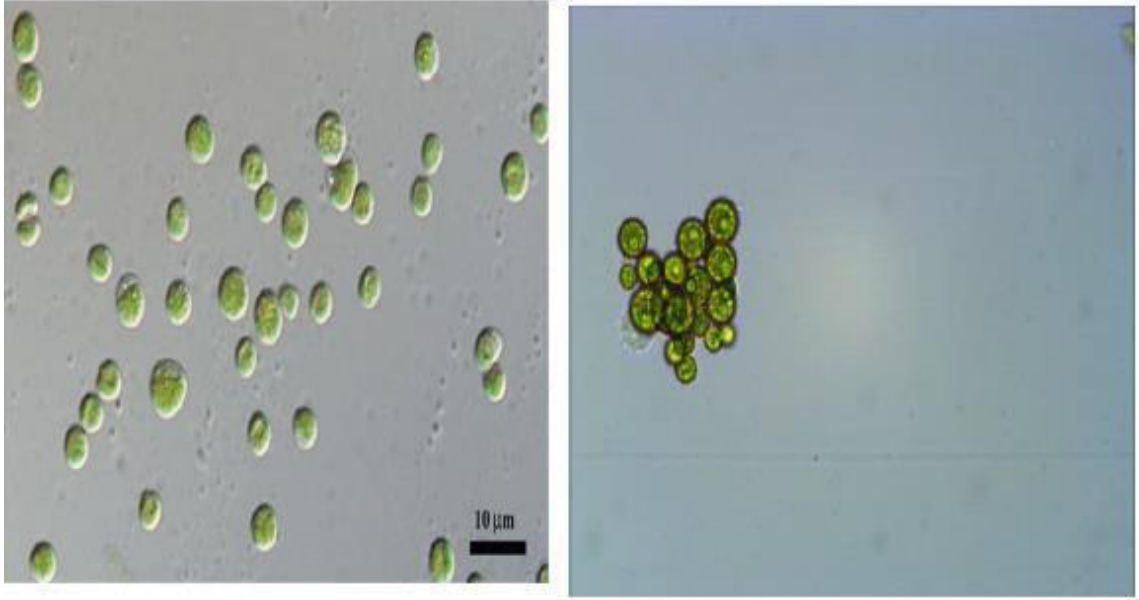
Mikroalgal kültür modern biyoteknoloji uygulamalarından biridir. Yüksek verimde ekim alanına ihtiyaç duymadan büyüyebilir ve gıda üretimi için uygun olmayan arazilerde yetiştirilebilirler (Collet ve diğ., 2011). İlk tek hücreli algal kültür 1890'da *Chlorella vulgaris* ile gerçekleştirilmiş olup 1900'lü yılların başında bitki fizyolojisi çalışmalarında kullanılmıştır. 1950'de algal araştırmalar hız kazanmış olup fazla miktarlarda mikroalg üretilmeye başlanmıştır. Ticari olarak üretimlerine ise 1960'da Japonya'da *Chlorella* cinsi ile başlanmış ve günümüze kadar çok farklı türlerin üretimi gerçekleşmiştir. 1980 yılında sadece Asya'da başta *Chlorella* olmak üzere aylık 1 ton mikroalg üretilmiştir (Pulz ve Gross, 2004).

İçerdiği değerli komponentler dolayısıyla gıda/gıda takviyesi, biyoyakıt (biyogaz, biyodizel, bioetanol), kozmetik, balık endüstrisi gibi çok çeşitli alanlarda

kullanılmaktadır (Spolaore, 2006; Vergara-Fernández, 2008; Batista, 2013, Chen ve diğ., 2013; Li ve diğ., 2014).

2.1.1. *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris Chlorophyta bölümüne ait tek hücreli 2-10µm büyüklüğünde, tatlı-acı sularda yaşayan fotosentetik bir mikroalg türüdür (Şekil 2.1). Biyokimyasal hücre içeriği ve fotosentez verimliliğinden dolayı (teorik olarak % 8), şeker kamışı gibi diğer yüksek verimli bitkiler ile karşılaştırılabilir bir potansiyele sahiptir. Bu durum *Chlorella* sp.'yi alternatif bir gıda ve enerji kaynağı olarak dikkat çeken bir tür yapmaktadır (Zelitch, 1971).



Şekil 2.1: *Chlorella vulgaris*'in ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (Zelitch, 1971).

Chlorella vulgaris'in sistematikteki yeri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1: *Chlorella vulgaris*'in sistematikteki yeri (Illman ve diğ., 2000).

Alem	Plantae
Bölüm	Chlorophyta
Sınıf	Chlorophyceae
Takım	Chlorococcales
Aile	Oocystaceae
Cins	<i>Chlorella</i>
Tür	<i>vulgaris</i>

Chlorella vulgaris stres koşullarında yağ akümülayonu yapan bir mikroalg türüdür.

Tablo 2.2'de azot açlığı stresinde ve normal koşullarda içerdği karbonhidrat, yağ ve protein içerikleri özetlenmiştir (Illman ve diğ., 2000).

Tablo 2.2: *Chlorella vulgaris*'in normal koşullarda ve azot eksikliğindeki protein, karbonhidrat ve lipid miktarları (Illman ve diğ., 2000).

	<i>C.vulgaris</i> (Kontrol)	<i>C. vulgaris</i> (Azot eksikliği)
Protein (%)	29±2.5	7±1.6
Karbonhidrat (%)	51±2	55±3.2
Lipid (%)	18±2.1	40±2.1

Günümüzde *Chlorella*'nın birçok ticari formu mevcuttur. Bunlar arasında tabletler, kapsüller gibi gıda takviyelerinin yanı sıra, içecekler, sakızlar, şekerler ve diğer atıştırmalık yiyecekler bulunmaktadır. Kozmetik sanayiinde ve balıkçılık endüstrisinde

larvaların beslenmesinde de sıklıkla kullanılan *Chlorella* bunların yanı sıra β -1,3 glukan içermektedir ki bu bileşiğin immün sistemi düzenleyici etkisi bulunmaktadır. Ayrıca içerdiği omega 3-6 yağ asitleri besin zincirinde önemli bir yer tutmakta ve insan sağlığı açısından önem teşkil etmektedir. Enerji sektöründe de gelecek vaad eden *Chlorella* 'nın küresel pazarda yıllık 38 milyar dolar hacmi vardır (Spolaore ve diğ., 2006).

Kullanım alanı oldukça geniş olan bu cinsin yetiştirilmesi de önem teşkil etmektedir. Bunun için elde edilmek istenen ürüne göre çeşitli koşullar sağlanmalı ve büyüme/gelişmesini etkileyen faktörler dikkate alınarak optimizasyon çalışmaları sürdürülmelidir.

2.2.MİKROALGLERİN BÜYÜMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

2.2.1. Sıcaklık

Chlorella vulgaris sıcaklık toleransı yüksek bir mikroalg türüdür. Ancak büyüme ve gelişmesi için optimal sıcaklığın 25-30°C olduğu araştırmalar sonucu ortaya konmuştur. 30°C sıcaklığın üzerine çıkıldığında biyokütlenin ve yağ içeriğinin azaldığı, 25°C ise maksimum verim alındığı tespit edilmiştir (Chinnasamy ve diğ., 2009; Converti ve diğ., 2009). Düşük sıcaklıklara inildiğinde ise fotosentez hızının yavaşladığı, klorofil içeriğinin azaldığı saptanmıştır (Maxwell ve diğ., 1994).

2.2.2. pH

Mikroalgler pH değişimlerine duyarlı organizmalardır. Genel olarak pH 8-9 arası alglerin üretimini artırıcı ve istilacı türlerin üremelerini engelleyici etki yapmaktadır. Birçok üretim sisteminde pH seviyesi dışarıdan CO₂ verilerek 8'in altında tutulabilir. CO₂ aynı zamanda mikroalglerin büyümesini teşvik eder ve su içerisinde reaksiyona girerek karbonik asit oluşturur. Bu da ortamın pH'ını düşürür. Ortamın pH'ının düzenlenmesi istenmeyen organizmaları [siliyatlar (predator), diyatom (algal rekabetçi)] engeller. Yüksek pH seviyelerinde siliyatlarda ve diyatomlarda yoğunluğu düşürdüğü gözlemlenmiştir (Bartley ve diğ., 2014).

Bartley ve diğ. (2014) *Nannochloropsis salina* türünde pH 8 ve 9 da maksimum büyüme sağlarken toplam YAME (Yağ Asidi Metil Esterleri) içeriğinin pH 8 de maksimuma ulaştığını ancak lipid kompozisyonunda herhangi bir değişim olmadığını belirtmişlerdir.

Dunelilla salina türünde yapılan bir çalışmaya göre ise geniş pH aralıklarında büyümenin devam ettiği, pH 7-8 arasında maksimum büyüme sağlandığı ve pH 7,1'de maksimum klorofil miktarına ulaşıldığı rapor edilmiştir (Ying ve diğ., 2014).

Chlorella vulgaris ile yapılmış benzer çalışmalarda optimum pH'nın 6-8 arası olduğu ve bu aralıkta maksimum büyümenin ve lipid içeriğinin elde edildiği bildirilmiştir (Rachlin ve Grosso, 1991; Mayo, 1997; Moheimani, 2013).

2.2.3. Karbondioksit

Fosil yakıtların yanması sonucu açığa çıkan karbondioksitin, bu yüzyılda atmosferik karbondioksit miktarının ikiye katlandığı tahmin edilmektedir. Sucul fitoplanktonlar içerdikleri RUBISCO enziminin karbondioksite bağlılığından dolayı atmosferik karbondioksit değişimlerine karşı oldukça duyarlıdırlar (Fu ve diğ., 2007). Bu sebepten karbondioksit mikroalglerin büyümesinde ve gelişmesinde oldukça önemlidir.

Karbondioksitin mikroalgler üzerinde etkileri ile ilgili yapılmış çalışmalar neticesinde karbondioksit oranı arttıkça büyüme ve gelişmeyi teşvik ettiği, lipid içeriğini arttırdığı ve lipid kompozisyonunu değiştirdiği ancak %5 karbondioksit oranının üzerine çıkıldığında olumsuz etki yarattığı bildirilmiştir (Tsuzuki ve diğ., 1990; Yongmanitchai ve Ward, 1991; Yang ve Gao, 2003).

Scenedesmus obliquus'da yapılan bir çalışmada ise %15 karbondioksitin büyümeyi teşvik ettiği ve mikroalg türlerinin karbondioksite olan duyarlılığının türler arasında ne kadar değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir (Kaewkannetra ve diğ., 2012).

2.2.4. Işık

Fotosentez ışığa bağımlı bir süreç olduğundan dolayı mikroalglerin ihtiyacı olan bir enerji kaynağıdır. Yetersiz veya aşırı ışık girdisi mikroalglerin büyümesini durdurabilir veya kısıtlayabilir (Chang ve diğ., 2016).

Yapılan çalışmalar neticesinde ışığın mikroalglerin gelişmesinde önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur. Chang ve diğ. (2016) *Chlorella vulgaris*'in gelişiminin yüksek ve düşük ışık şiddetinde ($180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) azalmakta olduğunu, optimum gelişmenin ise $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde olduğunu bildirmişlerdir.

Thawechai ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada ışık şiddetinin yanı sıra fotoperiyodun da önemli olduğu ortaya konmuş ve 16:8 aydınlatma periyodunda, $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde maksimum büyüme, gelişme ve lipid içeriği elde edildiği gösterilmiştir. Ancak 24:0 aydınlatma periyodunda büyüme ve gelişmenin inhibe olduğu, yüksek ışık girdisinin ve uzun süreli ışık periyodunun mikroalglerin büyümesini kesintiye uğrattığı ve sonucunda hücre ölümünün gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Ayrıca 24:0 fotoperiyod uygulamasında uygun ışık şiddetinin $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ olduğu bildirilmiştir.

Benzer çalışmalarda birbirine yakın sonuçlar elde edilmiş olup ışığın mikroalglerin gelişimi üzerine etkileri rapor edilmiştir (Qiang ve diğ., 1998; Solovchenko ve diğ., 2008; Bonnefond ve diğ., 2016; Gonçaves ve diğ., 2016).

2.2.5. Element

Besiyeri içeriğindeki elementlerin kompozisyonu ve miktarı mikroalglerin büyüme ve gelişmesinin yanı sıra hücre içeriğini de etkilemektedir. Örneğin, azot açlığında veya kısıtlamasında mevcut azot, enzimlerin veya hücre yapısında yer alan esansiyel bileşiklerin sentezinde kullanılmaktadır. Böylece karbondioksit fiksasyonu sonucu oluşan son ürün protein yerine karbonhidrata veya lipide dönüşmektedir (Dragone ve diğ., 2011).

Xin ve diğ. (2010) besiyerindeki azot veya fosfor miktarının azaltıldığında büyüme ve gelişmenin yavaşladığı ancak lipid içeriğinin yaklaşık 2 kat arttığını rapor etmiştir. Tuzluluğun (tatlı su algleri için) artmasının büyümeyi yavaşlatıcı etkiye neden olduğu ancak lipid üretimi ile ilgili değişken sonuçlar elde edildiği vurgulanmıştır. Demir iyonlarının konsantrasyonunun artmasının ise büyüme ve gelişmeyi yavaşlattığı ve 0.037 mM konsantrasyona kadar lipid üretimini teşvik ettiği ancak bu dozun üzerindeki konsantrasyonlarda herhangi bir etki görülmediği bildirilmiştir (Yeesang ve Cheirsilp, 2011).

Benzer şekilde çinko ve bakır elementleri de mikroalglerin gelişiminde önemli rol oynamaktadır ancak bakır için 3 mg/L, çinko için 6,5 mg/L konsantrasyon toksik etki yaratarak hücrelerin ölümüne sebep olmaktadır (Li ve diğ., 2006).

Spirulina platensis ile yapılan bir çalışmada kurşun, bakır ve çinkonun etkisine bakılmış, bu elementlerin yüksek dozlarının büyüme ve gelişmeyi inhibe ettiği rapor edilmiştir (Choudhary ve diğ., 2007).

Ayrıca kobalt, mangan ve molibdenin de iz element olarak mikroalglerin büyüme ve gelişmelerinde rol oynadıkları, eksikliklerinde gelişimi olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (Chen ve diğ., 2011).

2.2.6. Diğer etkenler

Çalkalama hızı, çeşitli trofik yetiştirme şekilleri, hormon veya çeşitli biyolojik aktif bileşiklerin eklenmesi de mikroalglerin gelişimini etkilemektedir.

Chlorella vulgaris'de yapılan bir çalışmaya göre yüksek çalkalama hızlarında biyokütlenin arttığı ancak lipid içeriğinin düştüğü, düşük çalkalama hızında ise biyokütlenin azaldığı ancak lipid içeriğinin arttığı gözlemlenmiştir. Mikroalglerin çalkalanarak yetiştirilmesi ışığın, besinin, gazların (O₂, CO₂), sıcaklığın kültür içerisinde eşit derecede dağılımını sağlamaktadır (Heredia ve diğ., 2011).

Hormon veya biyolojik aktif bileşiklerin kullanımı da büyüme ve gelişmeyi etkilemektedir. Bajguz (2000)'e göre ortama brassinosteroid eklenmesi büyümeyi ve protein miktarını artırıcı yönde etki yapmıştır.

Farklı yetiştirme koşulları uygulanarak yapılan bir çalışmada mikroalglerin heterotrofik koşullarda karanlıkta inkübe edildiğinde ve karbon kaynağı olarak asetat veya glukoz kullanıldığında ototrofik koşullara göre daha fazla biyokütle elde edildiği ancak lipid içeriğinin ototrofik koşullarda maksimum olduğu bildirilmiştir (Liang ve diğ., 2009).

2.3 MİKROALGLERDE MUTASYON TEKNİKLERİ

Günümüzde kullanılan çeşitli genetik modifikasyon teknikleri mikroalgler üzerinde de uygulanmaktadır. Bu tekniklerden bazıları ultraviyole ışınlar, ağır iyon ışımaları, mutajenik kimyasallar (EMS, MMS, DES, NTG, NG, MNNG vb.) ve nokta mutasyonlardır.

Literatürde mikroalglerde mutasyon ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Mikroalglerden biyoyakıt üretimi gelecek vaad eden bir kaynak olup araştırmacılar tarafından son yıllarda ilgi gören çalışma alanıdır. Araştırmacılar lipid üretimini arttırmak için kültür

koşullarında değişikliğin yanı sıra farklı mutasyon teknikleri de uygulamış ve olumlu sonuçlar elde etmişlerdir.

Anandarajah ve diğ. (2012) *Nannochloropsis* cinsinde EMS uygulaması ile elde edilen mutant sušta klorofil, biyokütle ve lipid içeriğinin yaklaşık %20 arttığını, Chaturvedi ve Fujita (2006) ise *Nannochloropsis* cinsinde EMS ile elde edilen mutant sušta benzer sonuçlar rapor etmişlerdir.

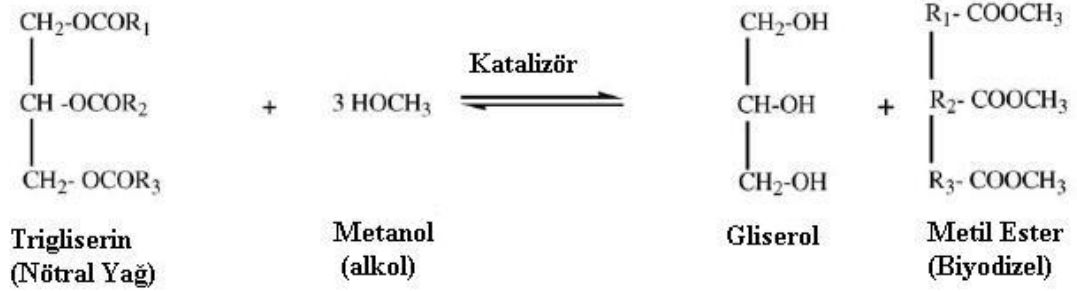
Chlamydomonas cinsinde yapılan UV ve nokta mutasyonlarla nişastasız suşlar elde edilmiş olup lipid akümülyasyonunun arttığı tespit edilmiştir (Li ve diğ., 2010; Work ve diğ., 2010). *Chlorella* cinsinde ise UV ve EMS kullanılarak elde edilen mutantlarda lipid içeriğinin kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir (Manandhar-Shrestha ve Hildebrand, 2013).

2.4 ALGLERDE LİPİDLER VE LİPİD METABOLİZMASI

Ökaryotik algler çöllerden buzullara kadar birçok ekosistemin önemli bir parçası olmakla beraber besin zincirinde birincil üretimin yarısından fazlasında yer almaktadır. Sistematik sınıflandırmaya göre bin kadar alg türü dokuz bölüme ayrılmıştır ve en yüksek sayıyla Chlorophyceae (yeşil algler), Phaeophyceae (kahverengi algler), Pyrrophyceae (dinoflagellatlar), Rhodophyceae (kırmızı algler) ve Chrysophyceae (sarı yeşil algler)'de temsil edilmektedirler (South ve Whittick, 2009). Bu çeşitlilik birçok farklı lipid türevini de beraberinde getirmektedir. *Chrysotila lamellose* 'den izole edilen uzun zincirli (C35-40) alkenonlar ve türevleri, *Egredia menziesii* 'den izole edilen egrediaklorin veya *Botryococcus braunii* 'den izole edilen botrikokkenler bunlara örnek verilebilir. Lipid metabolizması sıcaklık, element eksikliği, kültür koşulları gibi bir takım faktörlerden de etkilenmektedir. Bu faktörlerin değiştirilmesi lipid metabolizmasındaki genlerin anlatımını değiştirmekte ve bunun sonucunda da lipid kompozisyonu ve miktarı da değişmektedir. *Chlamydomonas moewusii* 'de yapılan çalışmaya göre element eksikliğinde C16:1, C16:3, C16:4 ve C18:3 yağ asitlerinde azalma gözlemlenirken aynı oranda C16:0 ve C18:1'de artma görülmüştür. *Chlamydomonas* spp.'de ise fototrofik koşulun, mikсотrofik veya heteretrofik koşula değiştirilmesiyle çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarlarında azalma saptanmıştır (Guschina ve Harwood, 2006).

Şekil 2.2’de görüldüğü üzere lipid metabolizmasında görevli bazı ana enzimler yer almaktadır. Asetil Koenzim A (Asetil-KoA) hem yağ asidi sentezinde hem de Krebs döngüsünde öncü madde olarak yer almaktadır. Asetil Koenzim A karboksilaz (ACCase) enzimi ise Asetil-KoA’yı malonil koenzim A’ya dönüştürmektedir ve buradan çeşitli enzimler yardımıyla 3-ketoaçıl-ACP’ye dönüşerek yağ asidi biyosentezine katılarak lipid sentezini başlatmaktadır (Mühlroth ve diğ., 2013). Bu yolaktaki ana enzimler dışında lipid biyosentezinde dolaylı olarak görev alan çeşitli enzimler de (Piruvat-format liyaz, Lizofosfatidil lipid açıltransferaz, Steroid dehidrogenaz, Lipid açıl hidrolizaz, Malat dehidrogenaz gibi) mevcuttur (Nguyen ve diğ., 2011). Bu enzimlerin birinde ya da birden fazlasında meydana gelebilecek mutasyonların mikroalgal lipid içeriğini doğrudan etkilemesi muhtemeldir.

Biyodizel genellikle transesterifikasyon denilen yöntemle elde edilir. Reaksiyon TAG'ın 3 mol alkol ile tepkimeye girmesi sonucu gliserol ve metil esterleri (biyodizel) oluşumuyla tamamlanır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Transesterifikasyon tepkimesi.

Transesterifikasyon 5 basamaktan oluşur;

- Alkol ile katalizörün karıştırılması,
- Alkol ile katalizörün reaksiyonu,
- Gliserinin uzaklaştırılması,
- Nötralizasyon,
- Yıkama ve kurutma.

Reaksiyonda alkol olarak genellikle ucuz olduğu için metanol, katalizör olarak ise bazlar (bazlar asitlere göre 4000 kat daha hızlı tepkimeye yol açar) tercih edilir. Katalizör olarak enzim de kullanılabilir ancak maliyetleri yüzünden günümüzde elverişli değildir (Khan ve diğ., 2009).

Biyodizel üretimine baktığımızda karşılaşılan en büyük problem maliyet olmuştur. Biyodizel üretim maliyeti litre başına yaklaşık olarak 0,5 dolar, petrol dizeli ise 0,35 dolar civarındadır (Widjaja ve diğ., 2009). Ancak günümüzde petrol varil fiyatındaki ciddi azalma biyodizel üretimini olumsuz yönde etkilemeye devam etmektedir. Bu aşamada hem

süreç teknolojileri hem de hammadde kaynaklarında yenilikler yapılmalı ve biyodizel üretimi kullanıma elverişli hale getirilmelidir.

Son yıllarda biyodizel üretiminde farklı yöntemler geliştirilmiş olup bu teknolojiler daha temiz biyodizel üretime olanak vermektedir. Örneğin Fransa Petrol Enstitüsünün geliştirdiği Esterfip-H süreci Axens firması tarafından ticari platforma taşınmıştır. Bu proje iki metal oksitin, bir spinel karışımı olan heterojen bir katalizörle kapalı sistemde yüksek sıcaklıkta metanol kullanıp biyodizel üretime dayanır. Elde edilen biyodizel sodyum hidroksit gibi homojen katalizör içermediği için yüksek saflıktadır. Bu yüzden yüksek maliyetli yıkama ve nötralizasyon basamaklarına gerek yoktur (Dizge ve diğ., 2005).

Hammadde kaynaklarının iyileştirilmesi açısından da farklı çalışmalar mevcut olup bu tezin başlıca amacı bir mikroalg türü olan *Chlorella vulgaris*'in lipid içeriğini arttırmak ve bu sayede mikroalglerden biyodizel üretimini daha elverişli hale getirmektir.

2.5.1.Biyodizel Üretiminde Mikroalglerin Kullanılması

Mikroalgler günümüzde potansiyel bir biyodizel kaynağı olarak görülmektedir. Bunun sebebi mikroalglerin ve mikroalgal dizelin avantajlarıdır. Tablo 2.3'de çeşitli tarımsal ürünler ile mikroalgerin yağ oranı, yağ üretimi, arazi kullanımı ve biyodizel üretimlerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

Tablo 2.3: Çeşitli tarımsal ürünler ile mikroalgerin yağ oranı, yağ üretimi, arazi kullanımı ve biyodizel üretimlerinin karşılaştırılması (Mata ve diğ., 2010).

	Yağ oranı %	Yağ üretimi L/Ha/Yıl	Arazi kullanımı m ² .yıl/ kg. b.d	Biyodizel üretimi Kg. b.d / ha yıl
Mısır	44	172	66	152
Soya	18	636	18	562
Kanola (kolza)	41	974	12	862
Ayçiçeği	40	1070	11	946
Palmiye	36	5366	2	4747
Mikroalg(düşük)	30	58,700	0,2	51,927
Mikroalg(orta)	50	97,800	0,1	86,515
Mikroalg(yüksek)	70	136,900	0,1	121,104

Tablo 2.4’de ise bazı mikroalglerin yağ içerikleri ve bazı yağlı bitkilerin birim alan (ha) başına litre cinsinden yıllık yağ üretim miktarları ile biyodizel üretim miktarları (kg) verilmiştir (Chisti, 2007; Mata ve diğ., 2010).

Tablo 2.4: Bazı mikroalg türlerinin kuru ağırlıkta yağ içeriklerinin karşılaştırılması (Chisti, 2007).

Mikroalgler	Yağ içeriği (% kuru ağırlık)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30

Tablo 2.4 (Devam): Bazı mikroalg türlerinin kuru ağırlıkta yağ içeriklerinin karşılaştırılması (Chisti, 2007).

<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-33

Yüksek oranda yağ içeriklerine sahip olmakla birlikte biyodizel üretimi için kullanılan diğer tarımsal ürünlerle kıyaslandığında, mikroalgler aşağıda maddeler halinde sıralanan özellikleri açısından büyük oranda avantajlıdır.

1. Mikroalgler yüksek miktar yağ sentez ederler ve yüksek büyüme hızına sahiptirler.
2. Birim alanda yüksek verim sağlarlar.
3. Mikroalgler tatlı-acı-tuzlu sularda, denizlerde, tarıma elverişli olmayan yerlerde kültüre alınabilir ve tarımsal bölgeler için rekabete girmezler.
4. Kurak, yarı kurak, çöl iklimi gibi tarıma uygun olmayan bölgeleri tolere edebilirler.
5. Atık sulardaki azot ve fosforu kullanabilirler, bu da atık suların biyoremediasyonunda fazladan yarar sağlar.
6. Fosil ve diğer kaynaklardan açığa çıkan karbondioksitin emisyonunu sağlarlar.
7. Katma değeri yüksek ana ve yan ürün (protein, pigment, gübre, hayvan yemi gibi) üretirler, herbisite ve pestisite ihtiyaçları yoktur.
8. Algal biyoyakıtlar kükürt içermez.
9. Algal biyoyakıtlar yüksek oranda biyoçözünürdür.
10. Algal biyoyakıtların toksik etkileri yoktur (Demirbaş ve Demirbaş, 2011).

Bu avantajları sayesinde mikroalgler biyodizel üretimi için ideal kaynak olduğu için Avrupa ve Amerika'da birçok ticari firma alglerden biyodizel üretmektedir ancak ülkemizde sadece tarım ürünlerinden (mısır, kanola vb.) elde edilen yağlardan biyodizel üretimi yapılmaktadır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MİKROALG VE KÜLTÜR KOŞULLARI

Bu çalışmada *Chlorella vulgaris* #211-12 suşu kullanılmış olup Goettingen Üniversitesi alg kültürü koleksiyonu (SAG)'ndan temin edilmiştir. Alg kültürleri Bold's Basal besi ortamında [NaNO₃ (0,25 g/L), MgSO₄ (0,075 g/L), NaCl (0,025 g/L), K₂HPO₄ (0,075 g/L), KH₂PO₄ (0,175 g/L), CaCl₂ (0,025 g/L), ZnSO₄ (8,82 mg/L), MnCl₂ (0,44 mg/L), Na₂MoO₄ (1,2 mg/L), CuSO₄ (1,57 mg/L), CoCl₂ (0,49 mg/L), H₃BO₃ (11,42 mg/L), KOH (31 mg/L), EDTA (50 mg/L), FeSO₄ (4,98 mg/L), H₂SO₄ (1 µl/L)], çalkalayıcı üstünde 170 rpm'lik hızla, oda sıcaklığında ve 24 saat devamlı 3600 lux ışık şiddetinde aydınlatılarak, steril koşullarda büyütülmüşlerdir. Besiyeri ortamında kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich'den temin edilmiş olup analitik saflıktadır. Besiyeri distile su kullanılarak hazırlandıktan sonra sterilize edilmiştir.

Besiyeri sterilizasyonu, besiyeri hazırlandıktan sonra 121°C'de 1,5 atm basınç altında 20 dakika boyunca otoklavlanarak gerçekleştirilmiştir. Besiyeri sterilize edildikten sonra hücreler bu ortama ekilerek 14 gün boyunca yetiştirilmiştir. Onuncu günün sonunda hücreler doyumluk evresine girmiş ve azot açlığı başlamıştır. Lipid analizleri de 14. günde gerçekleştirilmiştir.

3.2. BÜYÜMENİN VE BİYOKÜTLENİN BELİRLENMESİ

Hücre büyümesi spektrofotometrik olarak 680 nm dalga boyunda ölçülmüş olup hemositometre ile mikroskop altında hücre sayımı gerçekleştirilerek standart eğrileri oluşturulmuştur ve $y=2 \cdot 10^7 \cdot OD_{680} + 942189$ $r^2=0,9853$ 'e göre belirlenmiştir. Biyokütle ise, 1 mililitre hücrenin 5 dakika boyunca 13000 rpm'de sentifüj edilip çöktürüldükten, 48 saat 65°C'de kurutulduktan sonra tartılmasıyla belirlenmiştir ve standart eğrileri çıkarılarak $y=0,1915 \cdot OD_{680}$ $r^2=0,987$ 'e göre hesaplanmıştır. Buna göre hücrelerin 10. günden itibaren doyumluk evresine ulaştıkları belirlenmiştir.

3.3. AZOT KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

Azot miktarı Collos ve diğ. (1999)'a göre belirlenmiş olup, 0-10 mg/L azot konsantrasyonunda standart çözeltiler hazırlanarak spektrofotometrede 220 nm dalga

boyunda ölçülmüş ve standart eğri oluşturularak formülize edilmiştir. Bir mililitre hücre 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmesinden sonra süpernatantın distile suyla 100 kat seyreltilerek spektrofotometrede 220 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değeri standart eğriye göre oluşturulan denkleme yerleştirilip $y=21,258*OD_{220}+0,0468$ $r^2=0,9998$ şeklinde azot konsantrasyonu hesaplanmıştır. Buna göre hücreler 10. günden itibaren azot açlığına girerek stres koşulları başlamaktadır.

3.4. MUTASYON

Yaklaşık 5×10^7 kadar *Chlorella vulgaris* hücresi 25-500 mM etil metansülfonat (EMS) konsantrasyonlarında 1 saat süre ile inkübe edilerek ölüm eğrileri oluşturulmuştur. Buna göre *Chlorella vulgaris* hücreleri 25 mM etil metansülfonat (EMS) ile steril petri kaplarında çeker ocak altında karanlık ortamda 1 saat boyunca inkübe edilerek mutasyona uğratılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler 3 defa Bold’s Basal besiyeri ile yıkanarak agarlı petrilere ekilmiş ve kolonilerin büyümesi sağlanmıştır (Kao ve diğ., 2012).

Koloniler belirginleştğinde saf kültür olacak şekilde koloniler seçilip içerisinde 2 mililitre steril Bold’s basal besiyeri içeren tüplere aktararak kültüre alınmıştır.

3.5. LİPİD ANALİZİ

Mutasyon sonrası içerisinde 2 mililitre steril Bold’s Basal besiyeri içeren tüplerde kültüre alınan saf koloniler 14 gün boyunca yetiştirilip Nil Kırmızısı (Nile Red) boyama metoduna göre lipid miktarları belirlenmiştir ve lipid içeriği yüksek olan suşlar seçilmiştir (Chen ve diğ., 2009).

3.5.1. Nil Kırmızısı (Nile Red) Boyama Metodu

Nil kırmızısı yağda çözünen, yağlara bağlanarak florasan ışıma yapan boyadır ve sıklıkla hayvan hücreleri, bakteri, mantar, mikroalg gibi mikroorganizmaların yağ miktarlarını belirlemek için kullanılan hızlı ve kullanışlı bir methodur.

Buna göre, 0,5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 2 mililitre dimetil sülfoksit (DMSO)’e 1 gram Nil Kırmızısı (Sigma-Aldrich) eklenerek stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra 49.9 mililitre DMSO-distile su (hacmen 1:1) karışımı içerisine 100 µl stok Nil Kırmızısı çözeltisi eklenmiş, son konsantrasyonu 1 µg/ml olan çalışma solüsyonu hazırlanıp 96-well plate'lere son Nil Kırmızısı konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde 150 µl hücre süspansiyonu-150 µl çalışma solüsyonu karanlık ortamda eklenerek çalkalayıcı üstünde 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası spektrofotometrede

544nm/590nm eksitasyon/emisyon dalga boylarında ölçümleri alınarak önceden hazırlanan standart eğriye göre miktarları belirlenmiştir.

Standart eğri ise 0-50 µg/ml konsantrasyonda Bold's Basal besiyeri içerisinde çözölmüş triolein (Sigma-Aldrich) standardı kullanılarak spektrofotometrede 544nm/590nm eksitasyon/emisyon dalga boylarında ölçümleri alınarak hazırlanmıştır. Bu eğriye göre *Chlorella vulgaris* hücrelerinin yağ miktarları $y=9,889*ABS_{544/590}$ $r^2=0,9715$ şeklinde hesaplanmıştır.

3.5.2. Lipid Kompozisyonunun ve Yağ Asidi Metil Esterlerinin (YAME) Göreceli Miktarlarının Belirlenmesi

Lipid kompozisyonu ve yağ asidi metil esterleri (YAME) analitik yöntem olan gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak belirlenmiştir.

Yağ asidi metil esterleri Lewis ve diğ. (2000), Laurens ve diğ. (2012), Hidalgo ve diğ (2013) ile Park ve diğ. (2015)'e göre modifiye edilerek elde edilmiştir. Buna göre 14 gün boyunca içerisinde 30 mililitre Bold's Basal besiyeri içeren 50 mililitrelik erlenlerde yetiştirilen hücreler toplanıp 13000 rpm'de santrifüjlenerek çöktürölmüş ve 2 mililitre distile su ile tekrar çözölmek 3 dakika boyunca sonikatör yardımıyla hücreler parçalanmıştır. Sonikasyon sonrası 48 saat boyunca 65°C'de kurutulan hücreler doğrudan transesterifikasyon işlemine alınarak metil esterleri elde edilmiştir. Doğrudan transesterifikasyon; kuru alg hücreleri havanda toz haline getirildikten sonra 2 saat boyunca 20 mililitre %2'lik hidroklorik asit içeren metanol ile 2 saat boyunca 100°C de muamele edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. İki saat sonunda 10 mililitre distile su ve 10 mililitre hekzan konularak çalkayıcı üstünde 5 dakika boyunca fazların ayrılıp metil esterlerin metanol fazından ayrılarak hekzan fazına geçmesi sağlanmıştır. Fazlar ayrılınca üstte kalan hekzan fazı alınarak uçurulmuş ve 1 mililitre hekzanda tekrar çözölmek GC-MS'de lipid kompozisyonları ve göreceli miktarları belirlenmiştir (Lewis ve diğ., 2000; Laurens ve diğ., 2012; Hidalgo ve diğ., 2013; Park ve diğ., 2015).

Otoörnekleme sistemli Agilent 7890A markalı GS-MS cihazı kullanılarak yağ asidi analizleri yapılmıştır. 1µl'lik örnek 1/50 split oranında enjekte edilmiştir. Kromatografik ayırma işlemlerinde DB-23 kapiler kolon kullanılmıştır. Analizde dakikada 1 ml akış hızı ile taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 50°C'de 1 dakika tutularak, 25°C aralıklarla 175°C ye çıkarıldıktan sonra 4°C aralıklarla 230°C ye çıkarılmış ve 5

dakika bu sıcaklıkta tutulmuştur. Enjeksiyon port sıcaklığı ise 250°C ye ayarlanmıştır. Ayrılmış bileşenler GC-MS' teki uluslararası standartlar ve teknolojiye uygun olarak kütle-spektral kütüphane bilgisiyle (Wiley) eşleştirilerek tanımlanmıştır. Yağ asidi eksternal standardı C4-C24 FAME mix (Supelco) kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır.

3.6. RNA TRANSKRİPTOM ANALİZİ (MİSEQ)

3.6.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA 14 günlük doygunluk evresine ulaşmış kültürlerden Machida ve diğ. (2008)'e göre modifiye edilerek izole edilmiştir. On mililitre hücre süspansiyonu 5 dakika boyunca 7000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürülüp pellet sıvı azot yardımıyla havanda toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen *C. vulgaris* hücreleri 500 µl ekstraksiyon tamponu (0.1 M Tris-HCl, pH 9.0; 0.1 M NaCl, %1 SDS ve 0.1 M 2-merkaptoetanol) ile oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübasyonu sağlanmıştır. Ardından 500 µl PCI (fenol, kloroform, izoamilalkol; 25:24:1, v/v/v) eklenip 5000 rpm'de 4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant alınmış ve bu işlem üç defa tekrar edilmiştir. Alınan süpernatant hacminin %10'u kadar amonyum asetat ve 2.5 katı kadar %100'lik etanol eklenerek hafifçe karıştırılıp -80°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bir saat sonunda 4°C'de 30 dakika boyunca santrifüj edilip süpernatant atılarak %70'lik etanol eklenmiş ve 10 dakika boyunca 10000 rpm'de santrifüj edilerek yıkanmıştır. Süpernatant atılarak kurutulan pellet DNAaz kullanılarak saflaştırılmıştır. Buna göre 3 µl DNAaz I enzimi, 3 µl DNAaz reaksiyon tampon çözeltisi ve 10 µl distile su (dH₂O) pellete eklenerek 37°C'de 45 dakika boyunca inkübe edilmiştir. 45 dakika sonunda 1 µl 0.5 M EDTA eklenerek 10 dakika daha bekletilerek -80°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra yıkama işlemi önceki basamakta anlatıldığı gibi tekrarlanmış ve pellet 30 µl RNAaz enziminden arındırılmış (RNAase free) distile su kullanılarak çözülmüştür.

3.6.2. cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması

mRNA'lar, oligo (dT) manyetik boncuk kullanarak toplam 1 ug'den saflaştırılmış ve TruSeq mRNA Örnek Hazırlama Seti (Illumina, ABD) kullanılarak parçalanma tamponu kullanılarak parçalara ayrılmıştır. Parçalanmış kısa RNA parçaları, rastgele hekzamer-primerler kullanılarak birincil iplik cDNA sentezi için kullanılmış ve ikincil iplik, DNA polimeraz I ve RNaz H kullanılarak sentezlenmiştir. Çift iplikli cDNA'lar, AMPure XP boncuklar (Beckman Coulter, ABD) ile saflaştırılmış ve çözünme solüsyonu tamponuyla yıkandıktan sonra 3' adenilasyonu sağlanmıştır. Son olarak, dizileme adaptörleri

fragmentlere bağlanmış ve cDNA parçaları, PCR amplifikasyonu ile zenginleştirilmiştir. Kümelenme üretimi ve dizilimi için zenginleştirilmiş cDNA kütüphaneleri kullanılmıştır. Her bir koşul için iki cDNA kütüphanesinin (kontrol grubu ve EMS ile muamele edilmiş grup) iki biyolojik çoğaltmayla eşleştirilmiş uç sıralaması Illumina MiSeq sıralama platformu (Illumina, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.3. De Novo Transkriptom Eşleştirmesi ve Anlatımı Farklı Genlerin Analizi

Tüm dizi verileri 2 x 75 bp uzunluğunda olacak şekilde oluşturulmuştur. Yüksek kaliteli okunan dosyalar fastq dosyalarında kaydedilmiştir. Floresan görüntüler dizilere işlenmiş, baz araması ve kalite değeri hesaplaması Illumina veri işleme hattı (v1.5) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (v0.11.5) kullanılarak ham okumaların ilk kalite değerlendirmesinden sonra Trimmomatic (v0.32) programı ile (1) adaptör kaynaklı istenmeyen eşleşmelerin çıkartılması; (2) düşük kaliteli eşleşmelerin çıkarılması (kalite skoru <Q30) ile kalite kontrolü tamamlanmıştır. Yüksek kaliteli okumaların De novo eşleştirilmesi üç bağımsız yazılım modülünden (Inchworm, Chrysalis ve Butterfly) oluşan Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Grabher ve diğ., 2011). Son olarak, dizilerin uzunluğunun dağıtılmış durumu sayılmış ve RSEM yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Biyolojik tekrarlar arasındaki transkript düzeyinde R^2 'yi elde etmek için Pearson korelasyon analizi yapılmıştır. Kontrol grubu ve EMS ile muamele edilmiş hücreler arasındaki sayıma dayalı diferansiyel ekspresyon analizi için edgeR kullanılmıştır (Robinson ve diğ., 2010). Gen ifadesindeki önemli farklılıkları değerlendirmek için min_rowSum_counts of 10, stringent q-value < 0.01 (FDR)(False Discovery Rate) |Fold change| ≥ 2 parametreleri kullanılmıştır.

3.6.4. İşlevsel Annotasyon ve Gen Ontolojisi (GO)

Trinity'de eşleştirilmiş de novo transkriptlerinin gen ontolojisi ve işlevsel annotasyonu için custom pipeline Annocript (<https://github.com/frankMusacchia/Annocript/tree/master/GUIDE>) kullanılmıştır (Musacchia ve diğ., 2015). Proteinler için Swiss-Prot (SP) ve UniRef90 (v. Şubat 2016) kullanılarak BLASTP protein veritabanında “word_size = 4; e-value = 10^{-5} ; num_descriptions = 5; num_alignments = 5; threshold=18” parametrelerinde karşılıklarına bakılarak her bir sekans için en iyi eşleşme seçilmiştir. Putatif proteinlerin domain yerlerinin belirlenmesi için “e-value = 10^{-5} ; num_descriptions = 20;

num_alignments = 20” parametreleri kullanılarak RPS BLAST programından yararlanılmıştır (Marchler-Bauer ve diğ., 2012).

3.6.5. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Yolak Annotasyonu
Birleştirilmiş transkriptler, KEGG veritabanlarına (<http://www.genome.jp/kegg/>) dayanan BLAST algoritması (Blastx/Blastp 2.2.29+) kullanılarak GENES (<http://www.genome.jp/kegg/genes.html>) ile hizalanmış ve birden fazla genin paylaştığı spesifik biyolojik yollar buna göre tayin edilmiştir.

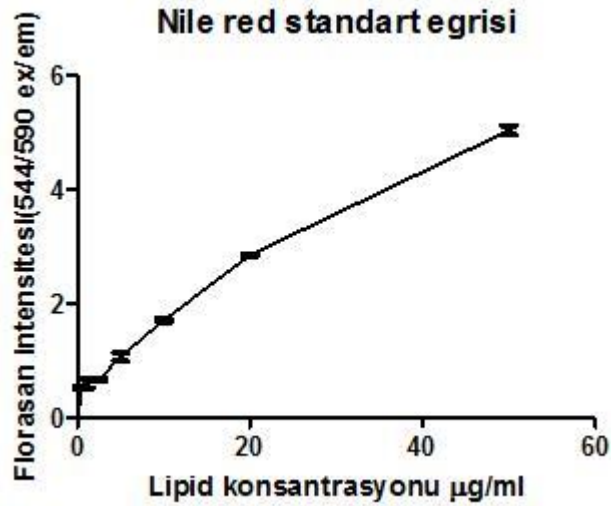
4. BULGULAR

4.1.MUTANT SUŞLARIN TARANMASI

4.1.1. Mutasyonun Lipid Üretimi Üzerine Etkisi

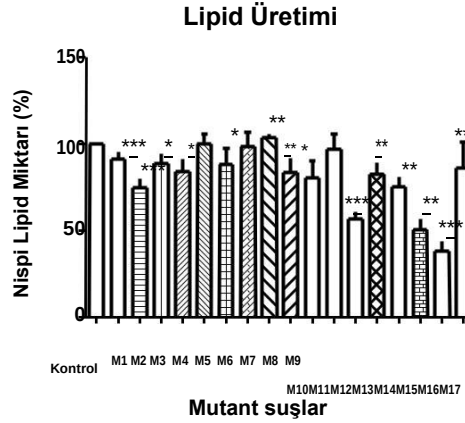
Mutasyon sonrası petrilere büyüyen koloniler 2 mililitre Bold's Basal besiyeri içeren tüplere ekilerek 14 gün boyunca yetiştirilmiştir. Nil Kırmızısı boyama metoduna göre 14. günün sonunda hücrelerin lipid miktarları belirlenmiştir. Deney kapsamında 103 mutant koloni taranmış olup nispi lipid miktarları aşağıdaki grafiklerde parçalar halinde verilmiştir.

Nil Kırmızısı standart eğrisi için triolein kullanılmış olup grafiği oluşturulmuştur ve formülize edilmiştir (bkz. Bölüm 3.5.1)(Şekil 4.1).



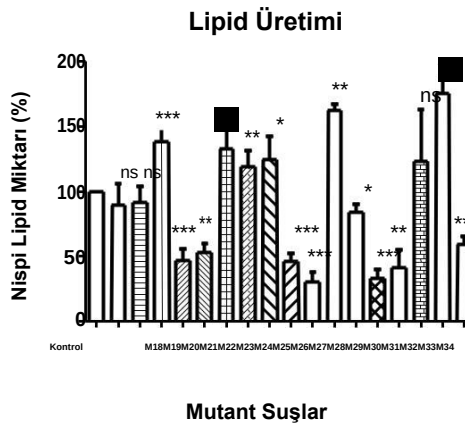
Şekil 4.1: Nil kırmızısı standart eğrisi.

Taranan 17 koloni içerisinde mutant suşların lipid miktarlarında hemen hemen kontrol grubu ile aynı seyretmiş ve dikkate değer herhangi bir artış gözlenmemiştir. En kritik azalış %62 ile mutant M16'da görülmüştür (Şekil 4.2).



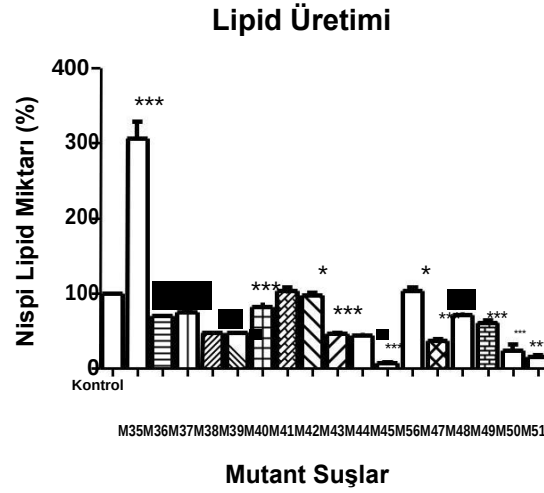
Şekil 4.2: Mutant suşların (M1-17) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6).

Şekil 4.3 de görüldüğü üzere kontrol grubu ile kıyaslandığında mutant suşların (M20, M23, M24, M25, M28, M32 ve M33) lipid miktarlarında sırasıyla %38, %32, %18, %24, %62, %23, %75 artışlar dikkat çekmiş, diğerlerinde azalma meydana gelmiş, M27 kodlu mutantta ise %70 lik azalış tespit edilmiştir.



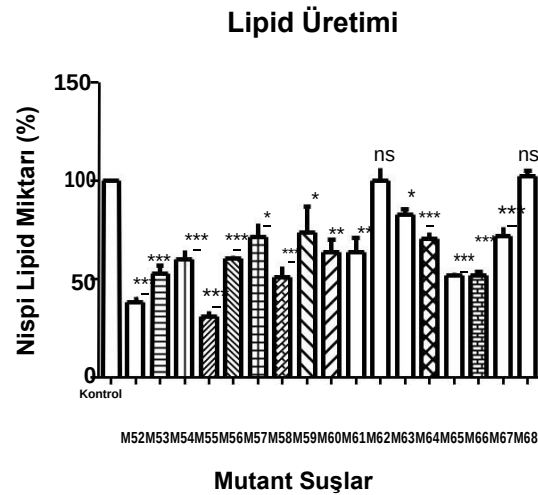
Şekil 4.3: Mutant suşların (M18-M34) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6).

Taranan tüm mutant koloniler içerisinde M35 suşunda lipid miktarında kontrole grubuna göre %206 artış sergilemiş, diğer mutant suşlarda ise azalma meydana gelmekle birlikte en fazla azalış %92 ile mutant M45 suşunda saptanmıştır (Şekil 4.4).



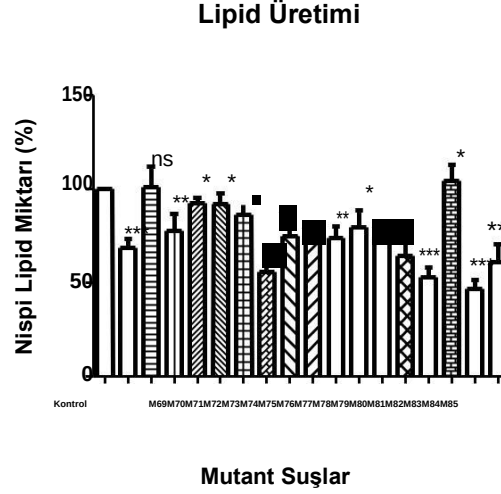
Şekil 4.4: Mutant suşların (M35-51) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6).

Nil Kırmızısı sonuçlarına göre mutant suşlar arasında lipid miktarlarında herhangi bir artış gözlenmemiştir. Bu grupta en fazla azalış %70 ile M55 suşunda görülmüştür (Şekil 4.5).



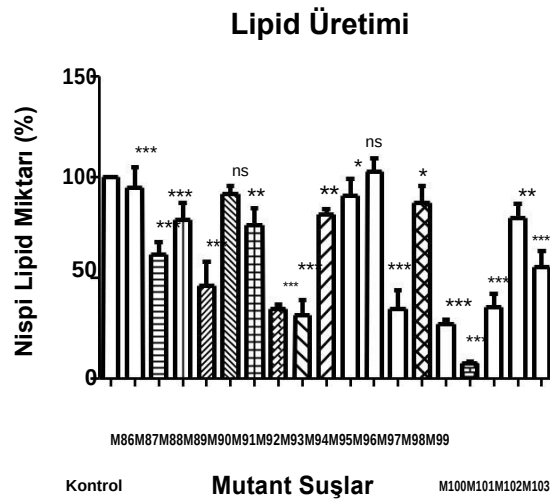
Şekil 4.5: Mutant suşların (M52-68) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6).

Bu seride mutant suşların lipid miktarlarında kontrol grubuna göre herhangi bir artış saptanmamıştır. En fazla düşüş ise %54 ile M84 suşunda görülmüştür (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Mutant suşların (M69-85) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6).

Mutant suşların lipid miktarında kontrol grubuna göre herhangi bir artış meydana gelmemiş, en dikkate değer azalma %92 ile M100 suşunda saptanmıştır (Şekil 4.7).

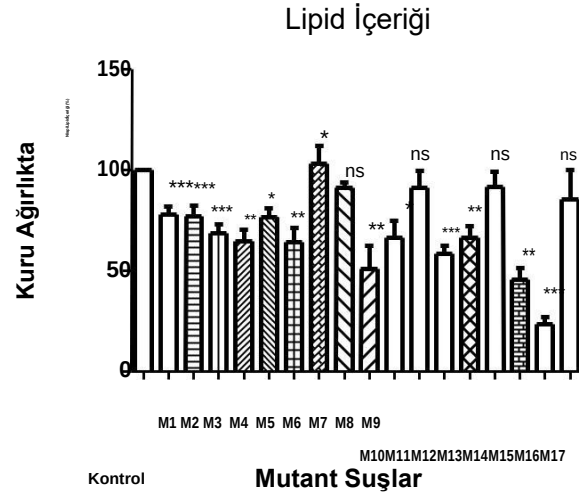


Şekil 4.7: Mutant suşların (M86-103) lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=6).

4.1.2. Mutasyonun Lipid İçeriği Üzerine Etkisi

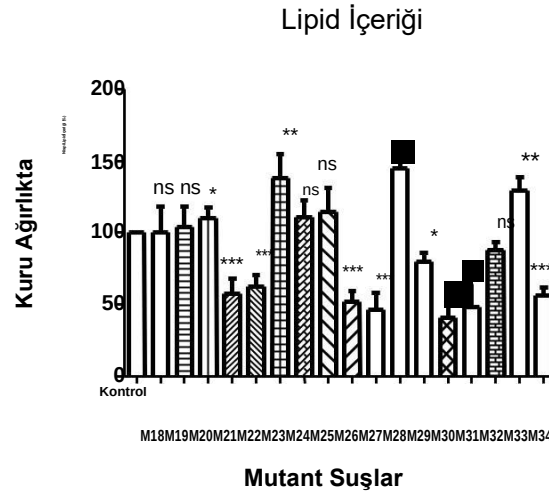
Mutasyon sonrası petrilere büyüyen koloniler içerisinde 2 mililitre Bold's Basal besiyeri içeren tüplere ekilerek 14 gün boyunca yetiştirilmiştir. 14. günün sonunda Nil Kırmızısı boyama metoduna göre hücrelerin lipid içerikleri belirlenmiştir. 103 mutant koloni taranmış olup nispi lipid içerikleri aşağıdaki grafiklerde parçalar halinde verilmiştir.

Taranan 17 koloni içerisinde mutant suşların lipid içeriklerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında herhangi bir artış saptanmamış, M16 suşunda önemli bir azalma görülmüştür (Şekil 4.8).



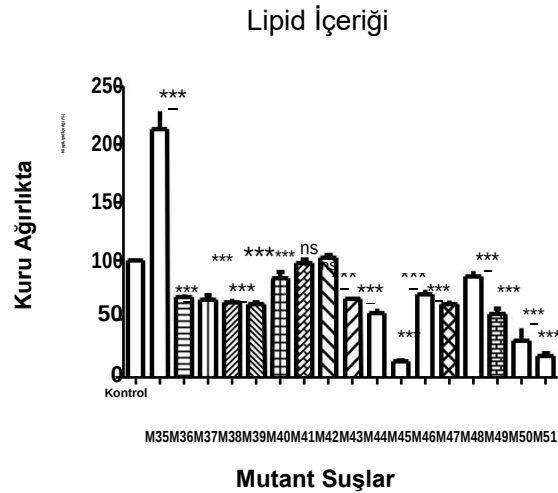
Şekil 4.8: Mutant suşların (M1-17) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6).

Tüm mutant suşların lipid içerikleri kontrol grup ile kıyaslandığında M20, M23, M24, M25, M28 ve M33 suşlarında sırasıyla %10, %38, %11, %14, %44 ve %56 artış ancak diğerlerinde azalma meydana gelmiş, M30 suşunda ise %60 lık maksimum bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



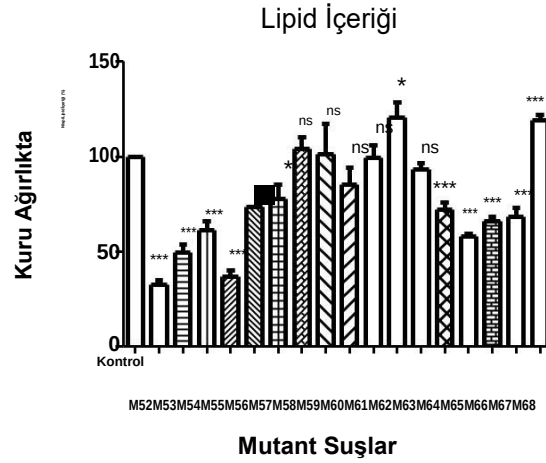
Şekil 4.9: Mutant suşların (M18-34) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6).

Nil KırmızıSı sonuçlarına göre mutant suşların lipid içeriklerinde kontrol grubuna göre maksimum artış %113 ile M35 suşunda saptanmış, M45 suşunda ise %87'lik azalma dikkat çekmiştir (Şekil 4.10).



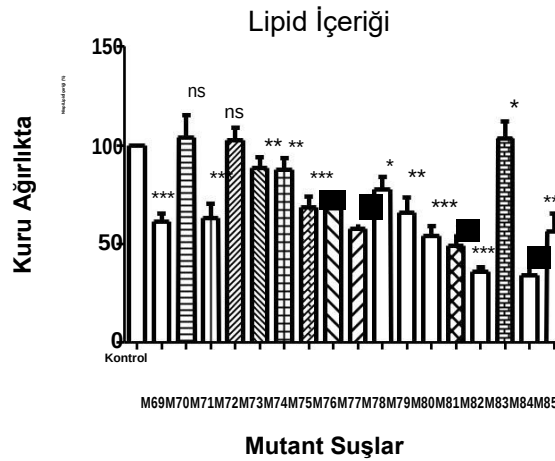
Şekil 4.10: Mutant suşların (M36-51) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6).

Bu seride mutant suşların lipid içeriklerinde en önemli azalma %68 ile M52 suşunda tespit edilirken, M62 ve M68 suşlarında %20 artış görülmüştür (Şekil 4.11).



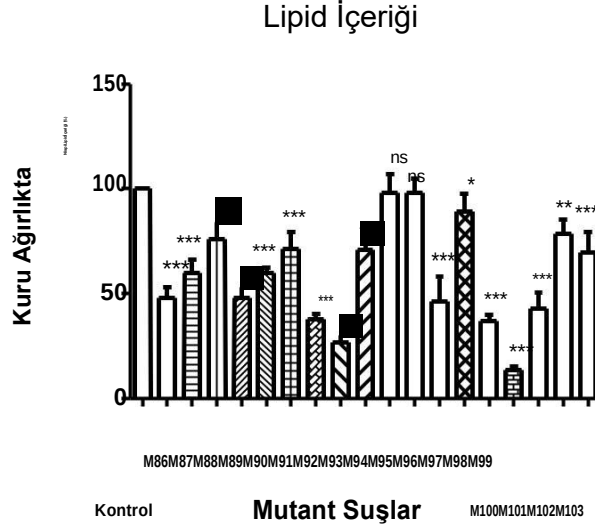
Şekil 4.11: Mutant suşların (M52-68) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6).

Şekil 4.12’de verildiği üzere taranan 17 mutant suşta lipid içerikleri karşılaştırılmış olup herhangi bir artış saptanmamıştır. Bununla birlikte %66’lara varan azalmalar tespit edilmiş, kontrol gruba göre en fazla azalma M82 suşunda görülmüştür.



Şekil 4.12: Mutant suşların (M69-85) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6).

Nil Kırmızısı boyama metoduna göre mutant suşların lipid içerikleri şekil 4.13'te verilmiştir. Sonuçlara göre mutant suşlarda önemli bir artış tespit edilmemiştir. Ancak lipid içeriğinde tüm koloniler arasında en fazla azalma %87 ile M100 suşunda tespit edilmiştir (Şekil 4.13).

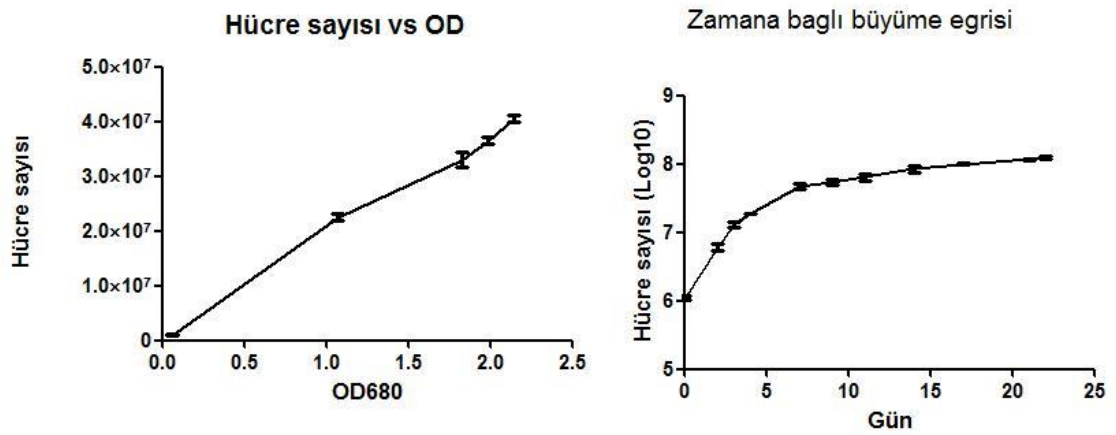


Şekil 4.13: Mutant suşların (M86-103) lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=6).

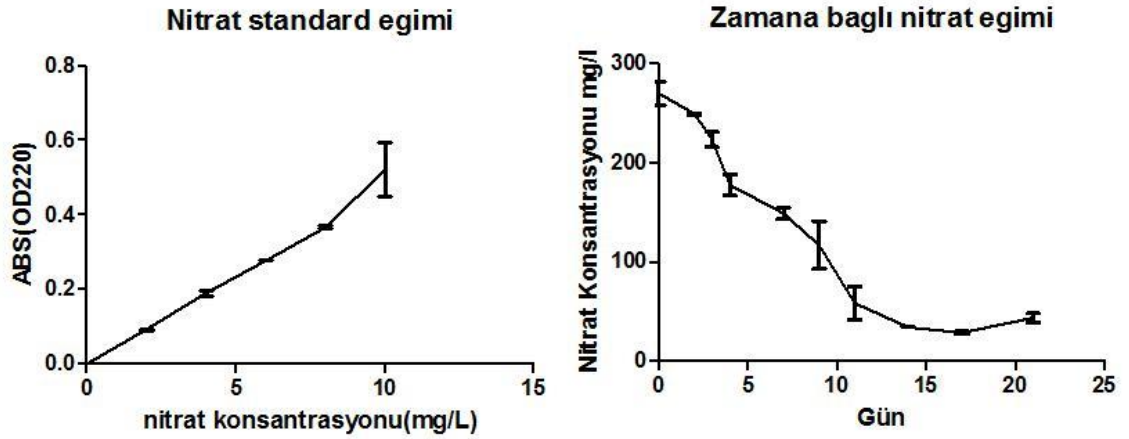
4.1.3. Mutasyonun Biyokütle Üzerine Etkisi

Biyokütle ölçümü hücre yoğunluğu (OD₆₈₀) esasına göre belirlenmiş olup 14. günde alınan ölçümlerin grafikleri parçalar halinde aşağıda verilmiştir.

Biyokütle ve nitrat miktarı üzerine standart eğriler çıkartılmış ve formülize edilerek gerekli ölçümler bu grafiklere göre yapılmıştır (bkz. Bölüm 3.2, 3.3)(Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).

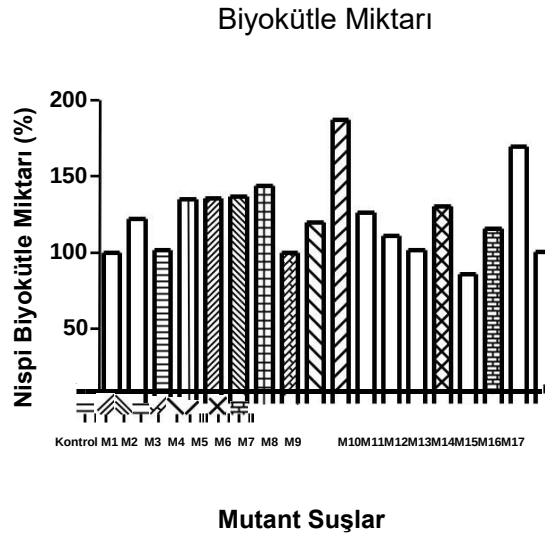


Şekil 4.14: Hücre sayısının belirlenmesi ve zamana bağlı büyüme eğrisi.



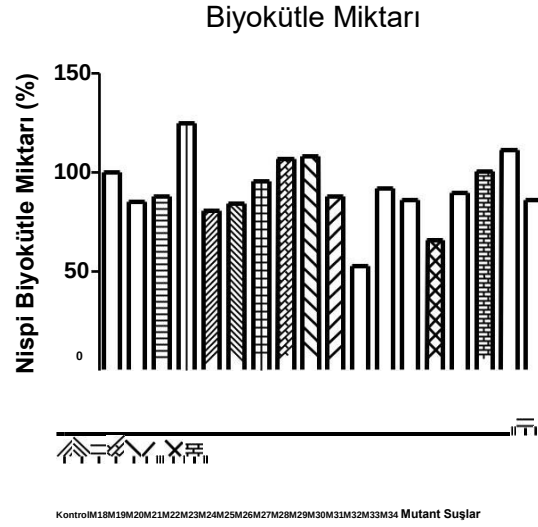
Şekil 4.15: Nitrat miktarının belirlenmesi ve zamana bağlı nitrat eğimi.

Taranan 17 koloni içerisinde mutant suşların biyokütle miktarlarında en kritik azalma %15 ile M14 suşunda gözlemlenirken, M1, M3, M4, M5, M6, M8, M9, M10, M11, M13, M15 ve M16 suşlarında sırasıyla %22, %35, %35, %36, %43, %87, %26, %11, %30, %15 ve %69 artışlar gözlenmiştir (Şekil 4.16). Ancak bu artışlar lipid miktarlarına aynı oranda yansımamakla birlikte kontrol grubuna göre biyokütle miktarı yüksek saptanan suşlarda lipid miktarları düşmüştür (bkz. Şekil 4.2, Şekil 4.3).



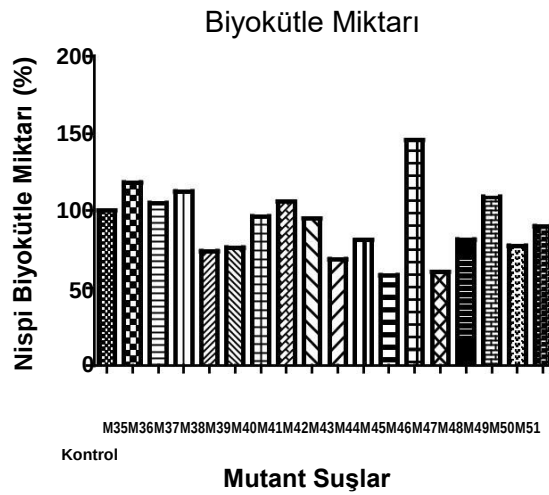
Şekil 4.16: Mutant suşların (M1-17) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.

Taranan 17 koloni içerisinde mutant suşların biyokütle miktarlarında en kritik azalma %25 ile M27 suşunda gözlemlenirken, M20, M24, M25 ve M33 suşlarında sırasıyla %24, %6, %8 ve %11’lik artış saptanmıştır (Şekil 4.17).



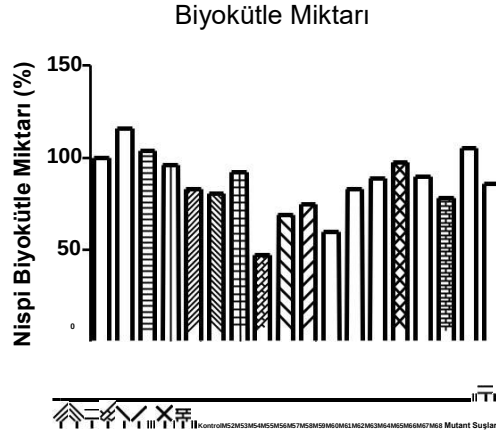
Şekil 4.17: Mutant suşların (M18-34) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.

Taranan 17 koloni içerisinde mutant suşların biyokütle miktarlarında M35, M37, M41, M46 ve M49 suşlarında sırasıyla %18, %12, %5, %45 ve %9 artışlar saptanırken, en dikkate değer azalma %42 ile M45 suşunda gözlenmiştir (Şekil 4.18).



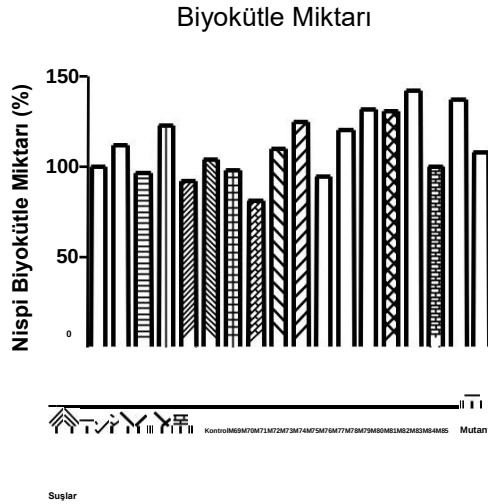
Şekil 4.18: Mutant suşların (M35-51) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.

Taranan 17 koloni içerisinde mutant suşların biyokütle miktarlarında genellikle azalmalar dikkat çekerken, M52 ve M67 suşlarında sırasıyla %15 ve %5 artış tespit edilmiştir (Şekil 4.19).



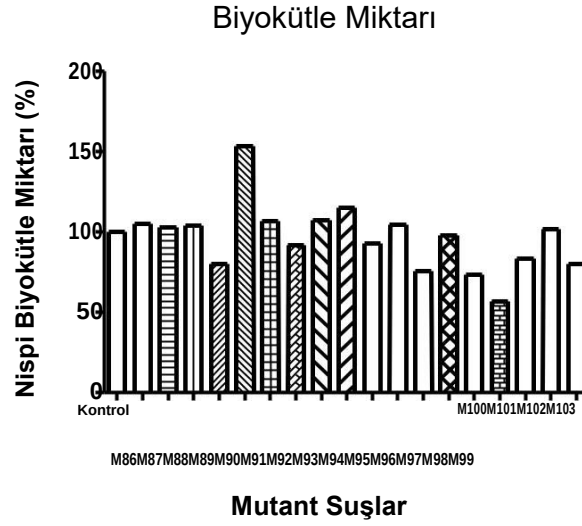
Şekil 4.19: Mutant suşların (M52-68) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.

Taranan 17 koloni içerisinde mutant suşların biyokütle miktarlarındaki ciddi bir azalma %19 ile M75 suşunda gözlemlenirken, M69, M71, M76, M77, M79, M80, M81, M82, M84 ve M85 suşlarında sırasıyla %11, %22, %9, %24, %20, %31, %31, %42, %37 ve %8'lik artış bulunmuştur (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Mutant suşların (M69-85) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.

Taranan 18 koloni içerisinde biyokütle miktarlarındaki en kritik azalma %44 ile M100’de gözlenirken, M90, M91, M93 ve M94 suşlarında sırasıyla %53, %7, %7 ve %14 oranında artışlar tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



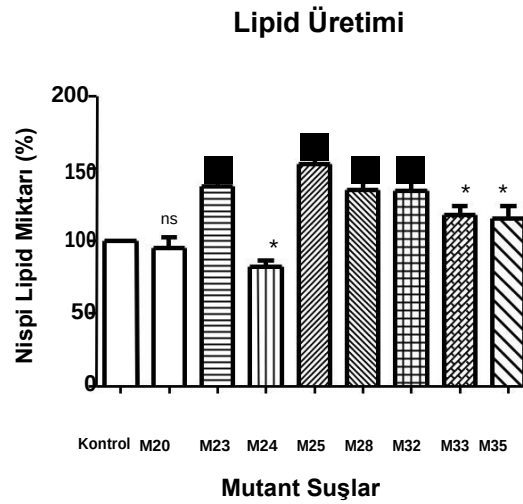
Şekil 4.21: Mutant suşların (M86-103) biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.

4.2.ADAY MUTANT SUŞLARIN TARANMASI

4.2.1. Mutasyonun Lipid Üretimi Üzerine Etkisi

Taranan 103 mutant suş içerisinde Lipid miktarları yüksek olan adaylar seçilerek içerisinde 30 mililitre Bold's Basal besiyeri içeren erlenlerde tekrar kültüre alınarak Nil Kırmızısı boyama metoduna göre tekrar ölçümleri yapılmıştır.

Lipid miktarları fazla olan 8 mutant suş tekrar kültüre alınıp yetiştirildikten sonra analizler tekrar edilmiştir. Buna göre mutant M20 ve M24 suşları hariç benzer sonuçlar elde edilmiş; M23, M25, M28, M32, M33 ve M35 suşlarında sırasıyla %37, %53, %35, %34, %17 ve %15 artış saptanmıştır (Şekil 4.22).

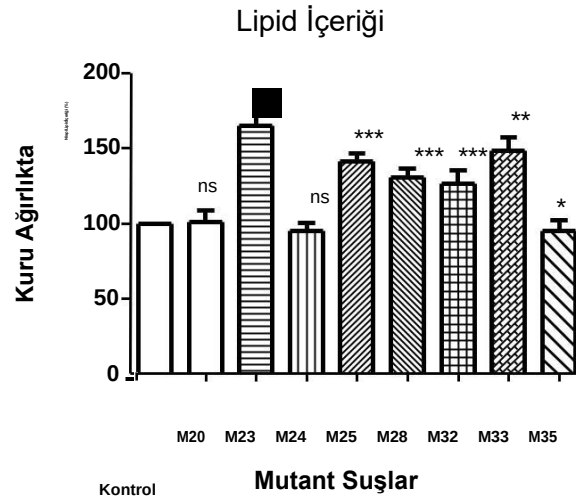


Şekil 4.22: Mutant suşların lipid üretimlerinin karşılaştırılması (n=12, 2 biyolojik, 6 teknik tekrar).

4.2.2. Mutasyonun Lipid İçeriği Üzerine Etkisi

Taranan 103 mutant suş içerisindeki lipid miktarları yüksek olan adaylar seçilerek içerisinde 30 mililitre Bold's Basal besiyeri bulunan erlenlerde tekrar kültüre alınarak Nil Kırmızısı boyama metoduna göre tekrar ölçümleri alınmıştır ve lipid içerikleri belirlenmiştir.

Lipid içeriği fazla olan 8 mutant suş tekrar kültüre alınıp yetiştirildikten sonra analizler tekrar edilmiştir. Buna göre M20, M24 ve M35 hariç diğerlerinde benzer sonuçlar elde edilerek sırasıyla M23, M25, M28, M32, M33 ve M35 suşlarında, %64, %41, %30, %26 ve %48 oranında artışlar saptanmıştır (Şekil 4.23).

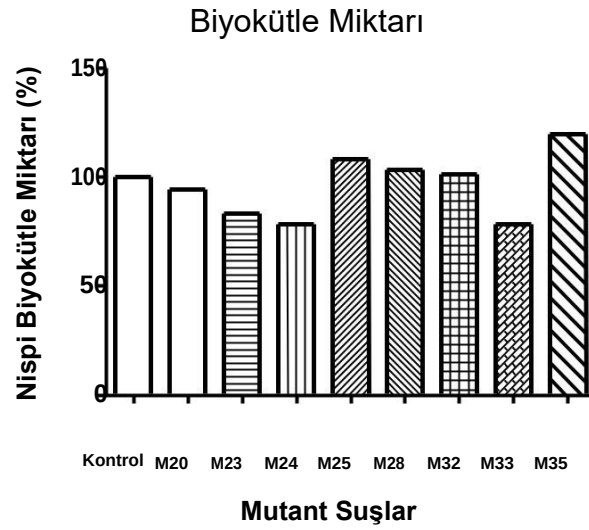


Şekil 4.23: Mutant suşların lipid içeriklerinin karşılaştırılması (n=12, 2 biyolojik, 6 teknik tekrar).

4.2.3. Mutasyonun Biyokütle Üzerine Etkisi

Taranan 103 mutant suş içerisindeki lipid miktarları yüksek olan adaylar seçilerek içerisinde 30 mililitre Bold's Basal besi yeri bulunan erlenlerde tekrar kültüre alınmıştır. 14. gün sonunda biyokütle ölçümü hücre yoğunluğu (OD_{680}) esasına göre belirlenmiş olup yapılan ölçümlerin grafikleri aşağıda verilmiştir.

Lipid miktarları fazla olan 8 mutant suş tekrar kültüre alınıp yetiştirildikten sonra analizler tekrar edilmiştir. Önceki analizlere göre M20, M23 ve M24 hariç diğerlerinde benzer sonuçlar elde edilerek sırasıyla M25, M28, M32 ve M35'te, %8, %3, %1 ve %19'luk artış saptanırken M33'te ise 13'lük bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.24).

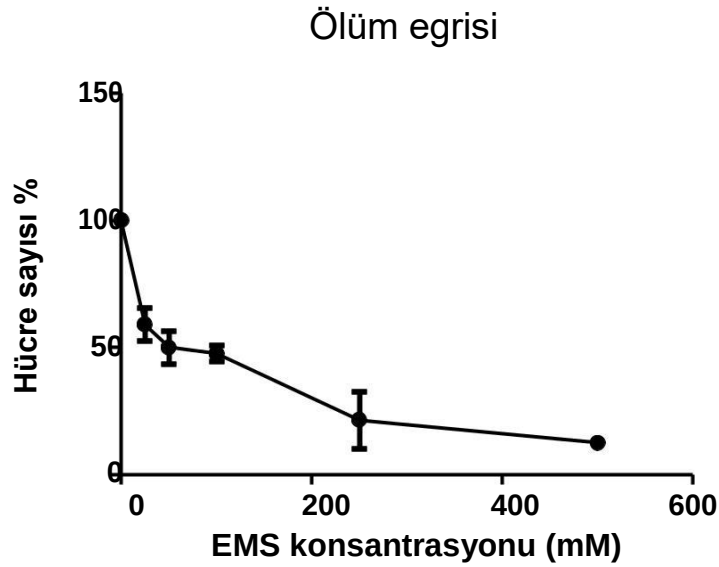


Şekil 4.24: Mutant suşların biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.

4.3.MUTASYONUN GENLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

EMS uygulamasının gen anlatımı üzerindeki etkisini saptayabilmek için yeni nesil dizileme tekniği olan MiSeq RNA dizileme cihazı kullanılarak gen düzeyinde analizler yapılmıştır. MiSeq RNA dizi analizi sonuçlarına göre M32 suşunda istatistiksel olarak anlamlı 51 adet genin ekspresyonunda farklılık tespit edilmiştir (Tablo 5). Bu genlerden biri palmitoil-mono galaktozil diaçilgliserol (FAD5) doğrudan lipid metabolizması, bir diğeri de Malat Dehidrogenaz dolaylı olarak lipid metabolizması ile ilgilidir. Tespit edilen diğer transkriptlerden 24 tanesinin fonksiyonu bilinmemekle birlikte diğerleri DNA tamir mekanizmaları, sıcaklık stresi, hücre çeper proteinleri, nitrat taşınımı gibi çeşitli hücresel faaliyetlerle ilişkilidir.

Şekil 4.25'te görüldüğü üzere 25-500 milimolar EMS konsantrasyonunun hücre sayısı üzerine etkisi verilmiştir. Buna göre 25-100 milimolar EMS konsantrasyonunun optimum konsantrasyonlar olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.25: EMS (Etil Metansülfonat)'in hücre ölümü üzerine etkisi.

Tablo 4.1: MiSeq RNA dizi analizi sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlatımı farklı genlerin listesi.

Trinity Kütüphane No	Protein Fonksiyonu	logFC	logCPM	P Değeri	FDR
TRINITY_DN6031_c7_g3	Kromodomain -DNA-bağlayıcı protein 2	9,06	5,81	9,44811E-05	0,006510903
TRINITY_DN3305_c0_g1	-	8,31	5,10	3,62149E-05	0,003217661
TRINITY_DN3637_c0_g1	Transmembran protein 53-B	3,18	3,14	0,000159259	0,009374352
TRINITY_DN3877_c0_g1	Termitaz	2,51	4,85	1,48827E-05	0,001642565
TRINITY_DN5473_c0_g1	Yüksek afiniteli nitrat taşıyıcı aktivatör protein 2.1	2,41	9,96	5,78662E-11	4,08738E-07
TRINITY_DN9796_c0_g1	Kromodomain Helikaz hrp3	2,26	6,83	5,13432E-07	0,000185981
TRINITY_DN3750_c0_g1	-	2,15	3,71	8,89782E-05	0,00625371
TRINITY_DN6265_c0_g1	Eksprese olmuş Protein	2,05	7,04	9,91428E-08	6,36632E-05
TRINITY_DN7081_c0_g1	Nitrat Redüktaz	1,80	10,11	1,04833E-10	4,93659E-07
TRINITY_DN6118_c12_g 1	Dinein 78 kDa orta uzunlukta flagellar dış uzantı	1,79	7,13	1,86547E-07	9,69321E-05
TRINITY_DN2791_c0_g1	Üre taşıyıcı protein	1,77	10,88	2,17941E-10	7,69714E-07
TRINITY_DN9962_c0_g1	Histon-lizin N-metil transferaz setd3	1,55	5,26	1,61413E-05	0,001740671
TRINITY_DN5724_c0_g1	İşlevi bilinmeyen karakterize edilmemiş protein	1,52	4,58	9,12648E-05	0,00638266
TRINITY_DN5889_c27_g 1	İşlevi bilinmeyen karakterize edilmemiş protein	1,44	7,03	0,000000272	0,000116458

Tablo 4.1 (Devam): MiSeq RNA dizi analizi sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlatımı farklı genlerin listesi.

Trinity Kütüphane No	Protein Function	logF C	logCP M	P Değeri	FDR
TRINITY_DN5730_c0_g2	İşlevi bilinmeyen transcription elongation factor SPT5 homolog 1	1,42	7,31	1,93313E-07	9,69321E-05
TRINITY_DN6063_c1_g1	Varsayımsal protein	1,40	5,52	1,27888E-05	0,00148088
TRINITY_DN4553_c0_g1	İşlevi bilinmeyen karakterize edilmemiş protein	1,40	4,55	8,05691E-05	0,005881351
TRINITY_DN5915_c2_g1	İşlevi bilinmeyen karakterize edilmemiş protein	1,39	5,55	1,07137E-05	0,001339406
TRINITY_DN5119_c1_g1	GIY-YIG odaklı endonükleaz	1,37	5,83	0,000027103	0,00262249
TRINITY_DN5727_c0_g1	Palmitoilmonogalaktozildiaçilgliserol delta-7 desaturaz kloroplastik	1,37	6,69	1,31357E-06	0,000343643
TRINITY_DN4246_c0_g1	İşlevi bilinmeyen karakterize edilmemiş protein	1,30	8,04	7,36613E-08	6,12343E-05
TRINITY_DN6855_c0_g1	Serin/treonin-protein kinaz EDR1	1,30	7,93	9,70985E-06	0,00124701
TRINITY_DN6083_c0_g1	-	1,28	5,71	1,05223E-05	0,001339176
TRINITY_DN1663_c0_g1	Hidroksimetilprimidin fosfat sentaz	1,28	7,63	2,13629E-07	9,73528E-05
TRINITY_DN3637_c0_g2	Transmembran protein 53-B	1,25	5,32	3,91596E-05	0,003393914
TRINITY_DN4810_c0_g1	İşlevi bilinmeyen karakterize edilmemiş protein, ART2	1,24	11,96	1,27853E-11	1,80618E-07
TRINITY_DN6074_c8_g5	Glutaminil-peptid siklotransferaz	1,17	6,45	6,87232E-06	0,000980659

Tablo 4.1 (Devam): MiSeq RNA dizi analizi sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlatımı farklı genlerin listesi.

Trinity Kütüphane No	Protein Fonksiyonu	logFC	logCPM	P Değeri	FDR
TRINITY_DN863_c0_g1	Aktin bağımlı protein 6	1,16	8,20	0,000000085	6,33817E-05
TRINITY_DN9181_c0_g1	-	1,13	6,85	1,74336E-06	0,000403746
TRINITY_DN11007_c0_g1	Malat dehidrogenaz NADP 1 kloroplastik	1,09	6,08	3,32426E-05	0,003049473
TRINITY_DN7043_c0_g1	Nitrat redüktaz NADH 2	1,08	5,90	0,000110245	0,007177099
TRINITY_DN11006_c0_g1	-	1,07	5,66	7,63947E-05	0,005740574
TRINITY_DN9052_c0_g1	-	1,04	10,12	5,28564E-06	0,000858278
TRINITY_DN6016_c7_g1	Öncü rRNA-işleyen protein PNO1	1,01	7,95	1,23479E-06	0,000337194
TRINITY_DN4974_c1_g1	Klorofil a-b bağlayıcı protein LHCII tip I kloroplastik	-1,02	7,08	0,000002472	0,000506113
TRINITY_DN3135_c2_g1	-	-2,18	6,35	1,80787E-06	0,000411933
TRINITY_DN4868_c0_g1	İşlevi bilinmeyen karakterize edilmemiş protein	-2,89	6,19	0,000171645	0,009937846
TRINITY_DN2344_c0_g1	İşlevi bilinmeyen karakterize edilmemiş protein	-3,46	4,56	3,81943E-06	0,000674463
TRINITY_DN6093_c6_g3	-	-3,70	5,78	5,9172E-07	0,000194401
TRINITY_DN6042_c0_g3	İşlevi bilinmeyen karakterize edilmemiş protein	-6,61	3,09	0,000122341	0,007807849

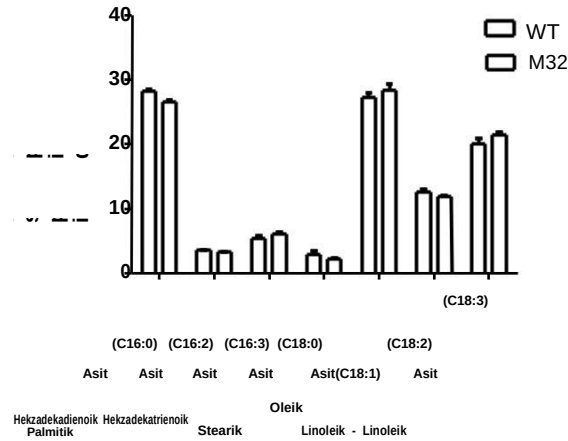
Tablo 4.1 (Devam): MiSeq RNA dizi analizi sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlatımı farklı genlerin listesi.

Trinity Kütüphane No	Protein Fonksiyonu	logFC	logCPM	P Değeri	FDR
TRINITY_DN6099_c5_g2	İşlevi bilinmeyen karakterize edilmemiş protein	-7,41	3,99	7,55388E-05	0,005706611
TRINITY_DN7858_c0_g1	Pentatrikopeptid tekrarlı protein mitokondriyal	-9,57	9,11	2,05844E-07	9,69321E-05
TRINITY_DN7858_c0_g1	Pentatrikopeptid tekrarlı protein mitokondriyal	-9,57	9,11	2,05844E-07	9,69321E-05
TRINITY_DN4642_c0_g1	Proteaz 2	-2,04	3,76	8,79644E-05	0,006213363

4.4.MUTASYONUN LİPİD KOMPOZİSYONU ÜZERİNE ETKİSİ

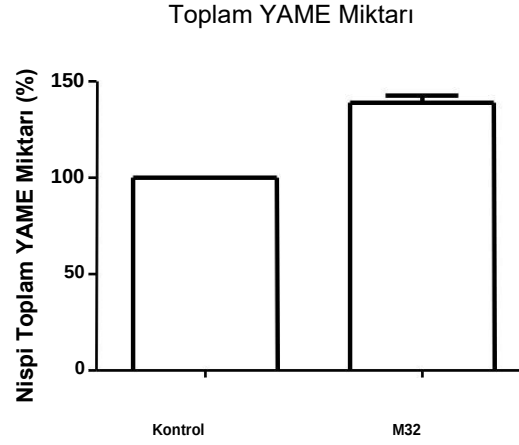
MiSeq RNA dizi analizi sonuçlarına göre M32 suşunda istatistiksel olarak anlamlı 51 adet genin ekspresyonunda farklılık tespit edilmiştir. Bu farklılıkların lipid kompozisyonuna olan etkisini incelemek için gaz kromografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) analizi yapılmıştır ve sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.

Şekil 4.26'de görüldüğü üzere 7 adet ana pik saptanmış olup lipid kompozisyonunda palmitik asit miktarında M32 suşunda kontrol grubuna göre %2 azalmaya karşın hekzadekanoik asit miktarında %1 artış görülmüştür. Aynı zamanda stearik asit miktarında M32 suşunda %0,6 azalma, oleik asit miktarında %0,8 artış saptanmıştır.



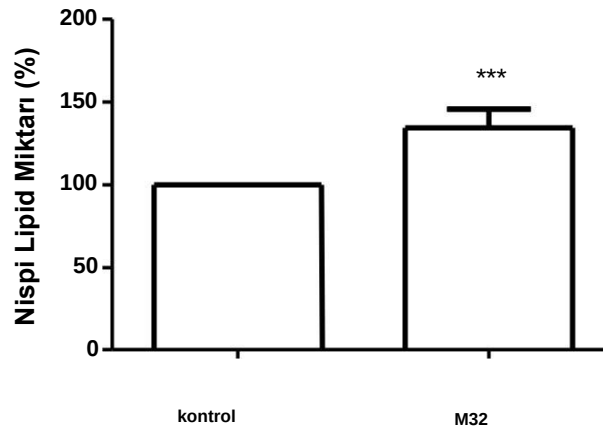
Şekil 4.26: M32 suşu ve kontrol grubunun lipid kompozisyonlarının karşılaştırılması (n=2).

Şekil 4.27’da görüldüğü üzere M32 suşunun kontrol grubuna göre toplam yağ asidi metil esterleri (YAME) miktarında %39 artış saptanmıştır.



Şekil 4.27: Mutant M32 ve kontrol grubunun toplam yağ asidi metil esterleri miktarının karşılaştırılması.

Nil Kırmızısı boyama metoduna göre kontrol grubu ile kıyaslandığında M32 suşunun toplam lipid miktarında %40 artış mevcuttur (şekil 4.28).



Şekil 4.28: M32 suşu ve kontrol grubunun lipid miktarlarının karşılaştırılması (n=12, 2 biyolojik, 6 teknik tekrar).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikroalgler ve potansiyelleri 30 yıldan uzun bir süredir araştırılmakta ve kullanılmaktadır. Mikroalgler bulundukları ortam koşullarına göre çok çeşitli kimyasal maddeleri üretebilmektedir. Mikroalg kökenli bu maddelerden özellikle gıda, enerji ve kozmetik gibi en temel alanlarda faydalanılmaktadır. Bunların yanı sıra ekosisteme yaptıkları katkılar da onları vazgeçilmez yapmaktadır. Balık larvaları büyüyüp gelişimlerini tamamlarken mikroalgler ile beslenmektedir ve balıkların ihtiva ettiği omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin de büyük çoğunluğu mikroalglerden kaynaklanmaktadır. Fotosentez kapasiteleri sayesinde atmosferdeki oksijenin büyük çoğunluğu mikroalgler sayesinde. Ayrıca metal akümüasyonu kapasiteleri sayesinde inorganik kirliliğin giderilmesine de katkı sağlamaktadır.

Gelişmekte olan dünyada enerji-yakıt ihtiyacı önemli bir yer teşkil etmektedir. Yakıt tüketimi taşımacılık, ulaşım, savunma sanayi gibi alanların vazgeçilmezi olmakla birlikte talep edilen yakıt ihtiyacı artarken mevcut kaynaklar tükenmektedir. Bunun için yeni kaynak arayışlarına başlanmış ve yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyoyakıtlar umut vaad edici olmuştur. Mikroalglerden elde edilen biyodizel de bu yenilenebilir kaynaklardan birisidir. *Chlorella*'dan elde edilen biyodizel uluslararası standartları sağlamakla birlikte tarımsal ürünlerden elde edilen biyodizele göre daha üstündür. Tarımsal ürünlerden elde edilen biyodizel ile kıyaslandığında *Chlorella* dizelinin kalorifik değeri 41 MJ/kg iken, kanola dizelinin kalorifik değeri 39,8 MJ/kg, soya dizeli 37,4 MJ/kg'dır. Yoğunlukları kıyaslandığında ise *Chlorella* biyodizeli 0,864 kg/L, kanola biyodizeli 0,885 kg/L, soya biyodizeli 0,873 kg/L'dir (Xiong, 2008). Dolayısı ile biyodizel üretimi için mikroalglerin kullanımının avantajlı olmasının yanı sıra

Chlorella'nın yüksek kalorifik değere sahip olması mikroalgal biyodizel üretimi için *Chlorella*'nın uygunluğunu arttırmaktadır.

Bu tez çalışmasında mikroalg türü olarak *Chlorella vulgaris* (SAG #211-12) kullanılmış olup bütün deneyler kültürlerin azot açlığı esnasında gerçekleştirilmiştir. Element eksikliği mikroalglerde stres faktörü olmakla birlikte yağ akümüasyonu yapan türlerde yağ üretimini teşvik etmektedir. Bunların yanı sıra yetiştirilme koşulları da (heterotrofik, ototrofik, miksotrofik) lipid üretimini ve içeriğini etkilemektedir.

Yetiştirilme koşullarına bağlı olarak *Chlorella vulgaris*'de yapılan çalışmaya göre ototrofik olarak yetiştirilen kültürlerde azot eksikliğinde maksimum lipid içeriği gözlemlenmiştir. Buna karşı en düşük biyokütle üretiminin de aynı koşullarda elde edildiği bildirilmiştir. Bunun sebebi azot eksikliğinde hücre büyümesinin yavaşlamasıdır. Heterotrofik veya mikсотrofik koşullarda çeşitli karbon kaynakları kullanılmış (asetat, glukoz ve gliserol) olup %2 gliserol konsantrasyonunda ototrofik koşullardan sonra ise lipid içeriği maksimum düzeyde saptanmıştır. Gliserol alınımı birçok mikroalg türü için tanımlanmıştır. Siyanobakter türü olan *Spiriluna platensis*'te lipidler ve pigmentler gliserolden türevlenerek üretilmektedir. *Schizochytrium limacinum*'da dokosahekzanoik asit (DHA) ve diğer lipidler de gliserollü ortamda üretimlerinin gerçekleştiği ancak *Chlorella* türleri için gliserolden bu şekilde bir faydalanma rapor edilmemiştir (Liang, 2009).

Element eksikliği stres faktörü olarak benzer çalışmalarda özellikle azot eksikliği sıkça kullanılmıştır. Bilindiği üzere azot protein, enzim, ATP, nükleik asit gibi canlılığın devamlılığı için gerekli olan yapıların temel taşıdır. Azot eksikliğinin mikroalglerde lipid akümülyasyonuna etkisi üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde lipid miktarında bir tatlı su algı olan *Scenedesmus* sp.'de %30, *Neochloris oleobundans*'da %25, *C. vulgaris*'de lipid miktarı iki katına kadar yükseldiği belirlenmiştir (Li ve diğ., 2008; Converti ve diğ., 2009; Xin ve diğ., 2010).

Azot ve karbon metabolizması birbirleriyle ilişkilidir. Kültür ortamındaki azotun hücre içerisine alınıp işlenmesi için enerji gereklidir. Ortamda azot bulunması (NO_3^-) halinde hücre içine alınımı ve akabinde indirgenmesi için gerekli olan enerji karbon kaynaklarının yıkımından sağlanmaktadır. Ortamda azot bulunduğu sürece karbon kaynakları enerji için yıkılmaya devam etmektedir ve karbonhidrat veya lipid akümülyasyonu gerçekleşmemektedir. Ancak ortamdaki azot tükendiğinde veya azotun indirgenmesi için gerekli olan enerji ihtiyacının karşılanmasından sonra hücreler nişasta veya lipid üretmeye başlamaktadır (Huppe, 1994).

Azot kaynağı olarak nitrat (NO_3) kullanıldığında azotun indirgenmesi sitosolde nitrat redüktaz (NR) enzimi tarafından gerçekleşmektedir. Nitrat redüktaz (NR) yüksek bitkilerde (EC 1.6.6.1, EC 1.6.6.2), alglerde (EC 1.6.6.1, EC 1.6.6.2) ve mantarlarda (EC 1.6.6.2, EC 1.6.6.3) bulunmaktadır. NR karbon ve azot metabolizmasının birleştiği odak

noktadır (Campbell, 1999). Nitratın indirgenmesi sırasında redoks dengesi önemli yer teşkil etmektedir. Hücre içerisindeki redoks eşitliği kloroplastik ve mitokondriyal indirgeyicilerin yer değiştirmesi ile düzenlenmektedir. Kloroplastta, mitokondride ve peroksizomlarda bulunan malat dehidrogenaz (MDH) tarafından düzenlenen malat-oksaloasetat mekiği sayesinde NADH/NADPH'ın kloroplasttan, mitokondriden ve peroksizomdan sitosole geçişi sağlanır. Nitrat sitosolde $\text{NO}_3 + \text{NADH} \rightarrow \text{NO}_2 + \text{NAD}^+ + \text{OH}$ ($\Delta G = -34.2 \text{ kcal/mol}$, $\Delta E = 0.74 \text{ V}$) şeklinde indirgenir (Huppe, 1994).

Kültür ortamındaki azot eksikliği kadar azot kaynağı da önemlidir. Yağ akümülayonu yapan bir mikroalg türü olan *Neochloris oleobundans*'da farklı azot kaynakları (sodyum nitrat, üre ve amonyum bikarbonat) kullanılarak yapılan bir çalışmada en yüksek lipid içeriğinin ve üretiminin sodyum nitrat kullanılarak elde edildiği bildirilmiştir. Azot kaynağı olarak amonyum bikarbonat kullanımı kültür ortamındaki karbon dengesini (çözünmüş CO_2 , bikarbonat ve karbonat dahil) değiştirdiğinden lipid üretimini ve içeriğini olumsuz yönde etkilemektedir. Kültür ortamındaki azotun tükenmesinden sonra klorofil miktarında da düşüşler bildirilmiştir. Klorofil azot açısından zengin bir yapıdır. Bu durum hücrenin canlılığını devam ettirebilmesi için gerekli olan azotun klorofilin parçalanması ile gerçekleştiği hipotezini desteklemektedir. Bu azot ise daha sonra protein, nükleik asit gibi esansiyel yapıların üretilmesi için kullanılmaktadır. Klorofil miktarının kritik seviyelere düşmesi hücre büyümesine ve lipid akümülayonuna ket vurmaktadır (Li ve diğ., 2008).

Ticari olarak mikroalglerden biyodizel üretimi iki ana stratejiye dayanmaktadır; ya biyokütle üretimini arttırmak ya da mevcut biyokütledeki lipid miktarını arttırmak. Kültür koşullarındaki değişimlerin lipid üretimine etkisi sıkça araştırılmıştır. Algal hücrelerin mutasyona uğratılarak lipid veriminin arttırılması ise tercih edilen bir diğer yaklaşımdır. Nokta mutasyon lipid üretimi fazla mutantların elde edilmesi için klasik bir metoddur ancak alglarda lipid metabolizmasının ilgili gen bölgeleri tam anlamıyla çıkarılmış değildir. Bunun yerine birçok çalışma, uygulaması daha basit ve az sayıda ekipman gerektiren fiziksel veya kimyasal mutajenlerle yapılmaktadır (Chisti, 2007; Doan ve Obbard, 2012; Anthony ve diğ., 2015; Hlavová ve diğ., 2015). Bu çalışmada azot açlığıyla birlikte etil metansülfonat (EMS) kullanılarak rastgele mutasyon ile lipid üretiminin arttırılması hedeflenmiş ve gen düzeyinde anlatımı farklı genler tespit edilerek bu

genlerin fonksiyonları belirlenmiştir. Buna göre lipid metabolizmasıyla bağlantılı malat dehidrogenaz, nitrat redüktaz ve palmitoil-monogalatozildiaçilgliserol delta-7 desaturaz enzimlerinin anlatımlarında farklılıklar tespit edilmiştir.

Azot alglerin büyümesi ve gelişimi için önemli bir elementtir. Azot açlığında lipid içeriğinin arttığı bir çok çalışmada rapor edilmiştir (Li ve diğ., 2008; Converti ve diğ., 2009; Xin ve diğ., 2010). Azot açlığında lipid akümülayonun arttığı ve nitrat asimilasyonu ile ilgili genlerin uyarıldığı araştırmacılar tarafından bildirilmiş ve Miller ve diğ. (2010) nitrat metabolizmasıyla ilgili nitrat redüktazın da dahil olduğu birkaç enzimde 2 kattan fazla artış olduğunu tespit etmiştir (Ballester ve diğ., 2004; Miller ve diğ., 2010; Gonzalez-; Wase ve diğ., 2014). Ayrıca Ikaran ve diğ. (2015) *Chlorella vulgaris*'te azot açlığında nitrat redüktaz enziminin ifadesinde artış gözlemlemiştir. Çalışmamızda nitrat redüktaz enziminin anlatımında M32 suşunda kontrol grubuna göre 4.14 kat artış saptanmıştır ve bu sonuç diğer araştırmacıların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Bu tez çalışmasında 2.13 katlık artışla saptadığımız anlatımı farklı olan bir diğer enzim ise malat dehidrogenazdır. *Chlamydomonas reinhardtii* 'de yapılan proteomik çalışmasına göre malat dehidrogenaz enziminin lipid metabolizması ile bağlantılı olduğu ortaya koyulmuştur (Nguyen ve diğ., 2011).

Bütün canlılar az da olsa hücre membranı ve diğer yapısal/işlevsel yapılar için lipid sentezlemektedir ancak bu toplam hücre ağırlığının %20'sini geçmemektedir. Yağ akümülayonu mayalarda, mantarlarda ve bazı alg türlerinde görülmektedir. Bu organizmalar yağlı türler olarak adlandırılmaktadır. Lipid metabolizması ilk bakışta aynı gözükse de yağ akümüle eden ve yağ akümüle etmeyen türlerde büyük farklılık mevcuttur. Yağ akümülayonu yapan türlerde azot eksikliğinde karbon asimilasyonu devam etmekte ve triaçil gliserol (TAG)'ın üretilmesiyle doğrudan bağlantılıdır. Yağsız türlerde ise karbon asimilasyonu devam etmekte ancak glikojen, glukan, mannan gibi çeşitli polisakkaritlere dönüşmektedir. Yağ akümüle eden türlerde yağ asidi biyosentezinin dışına çıkılması düşünülmelidir ve bu yol yağ akümülayonu yapan çoğu türde ortaktır. Yağ akümülayonun sebebi çift yönlü olarak ortaya çıkmaktadır. 1. Yağ asidi sentaz için gerekli prekürsör olan asetil-CoA'nın sürekli olarak üretim yeteneği, 2. Yağ asidi biyosentezinde kullanılan temel redüktant NADPH'ı yeterli miktarda üretme

yeteneği. Yağlı türlerde asetil-CoA oluşumu ATP:sitrat liyaz (ACL) varlığında oluşur ki yağ akümüle etmeyen türlerin çoğunda ATP:sitrat liyaz aktivitesi görülmemektedir (Ratledge, 2004).

Azot eksikliğinde aşağıda sırasıyla ifade edildiği şekilde ardışık bir takım reaksiyonlar meydana gelmektedir ve bu reaksiyonlar sonucunda lipid akümülasyonu gerçekleşmektedir.

AMP deaminaz aktivitesinde artış

AMP deaminazın artışı neticesinde mitokondri de dahil olmak üzere hücresel AMP düzeyinin azalması

Mitokondrideki AMP'nin azalışı AMP'ye bağımlı isositrat dehidrogenaz emziminin çalışmasını durdurması

Bunun sonucunda metabolize edilemeyen isositratın akonitazlar yardımıyla sitrata dönüşümü

Böylece sitratın mitokondride akümülasyonu

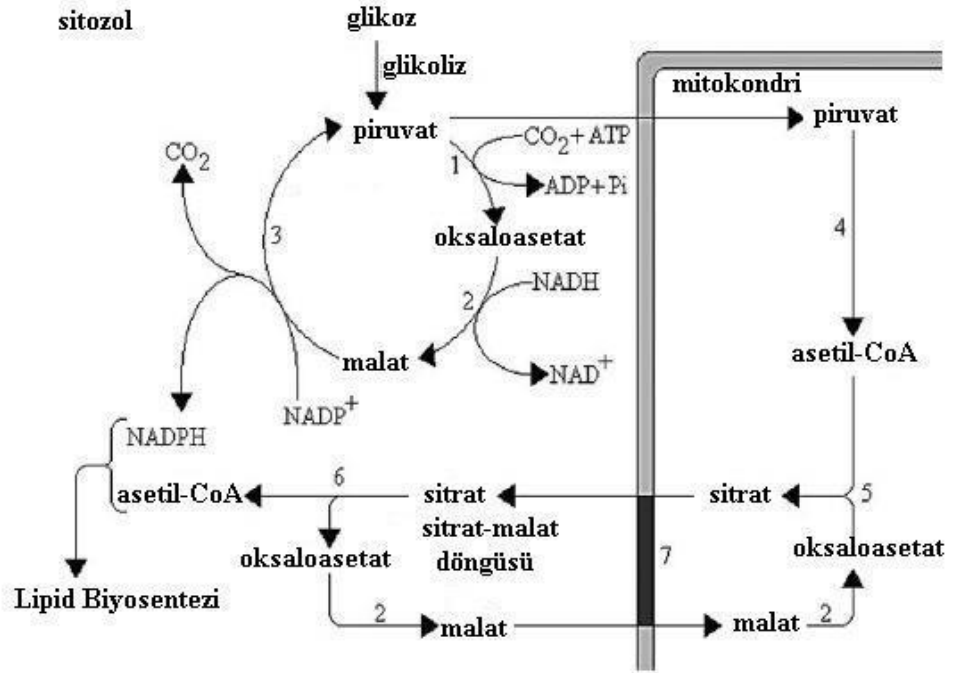
Sitratın malat karşılığı sitosole geçişi (sitrat çıkış sistemi)

Sitosolde ACL vasıtası ile asetil-CoA ve oksaloasetata dönüşümü

Asetil-CoA'nın yağ asidi sentezinde kullanılması

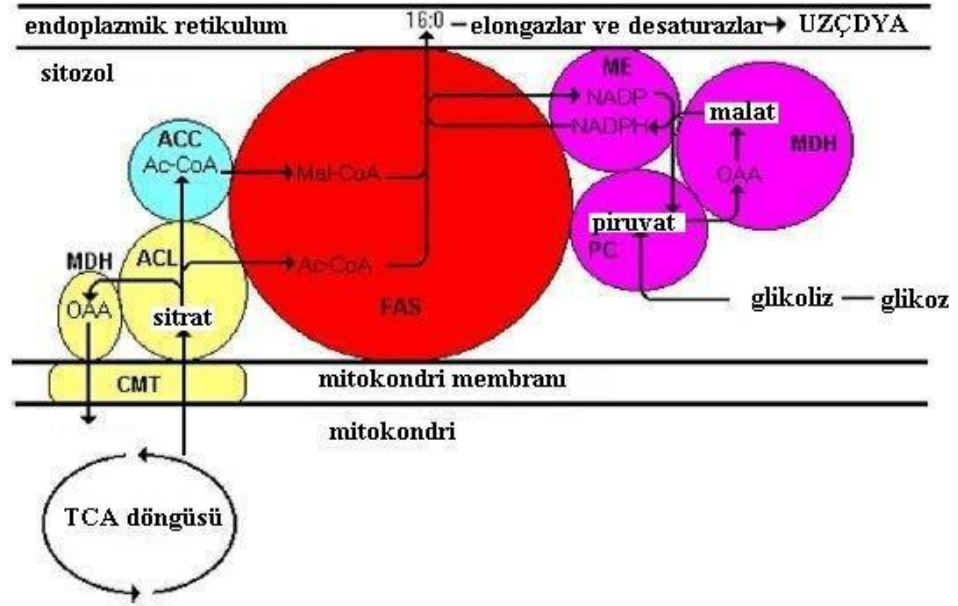
Oksaloasetatın malat dehidrogenaz enzimi ile malata dönüşümü ve sitrat çıkış sistemine tekrar kazandırılması.

Bu sayede yağ biriktirme eğilimi olan türlerde lipid akümülayonu gerçekleşmektedir ve yağ akümüle eden türlerde lipid akümülayonu Şekil 5.1’de şematize edilmiştir (Ratledge, 2004).



Şekil 5.1: Yağ akümüle eden mikroorganizmaların azot eksikliğinde yağ akümülayonu mekanizması. 1. piruvat dekarboksilaz, 2. malat dehidrogenaz, 3. malik enzim, 4. piruvat dehidrogenaz, 5. sitrat sentaz, 6. ATP:sitrat liyaz, 7. sitrat-malat translokaz (Ratledge, 2004).

Şekil 5.2’de ise yağ akümülayonu yapan türlerde metabolonların işleyiş şeması verilmiştir.

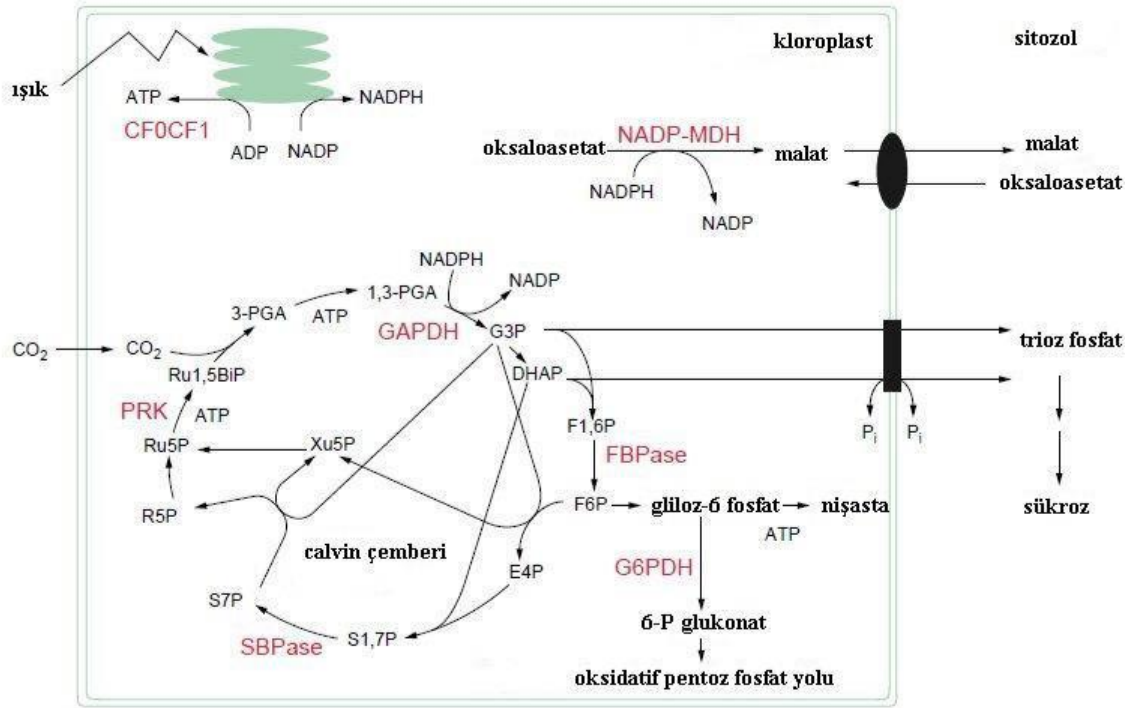


Şekil 5.2: Yağ akümülayonu yapan organizmalarda varsayımda bulunulan metabolonların işleyiş şeması. OAA, oksaloasetat; AC-CoA, asetil-CoA; Mal-CoA, malonil-CoA; FAS, yağ asidi sentaz; ACL, ATP:sitrat liyaz; ACC, asetil-CoA karboksilaz; CMT, sitrat-malat translokaz; ME, malik enzim; PC, piruvat karboksilaz; MDH, malat dehidrogenaz (Ratledge, 2004).

Benzer varsayım Wynn ve diğ. (2001) tarafından da yağ akümülayonu yapan mikromantar türü olan *Mucor circinelloides* ve *Mortierella alpina* için ortaya atılmıştır ve azot eksikliğinde solunum hızının da arttığını rapor etmişlerdir.

Bir tuzlu su algi olan *Phaeodactylum tricornutum*’da yapılan çalışmaya göre ise azot eksikliğinin lipid akümülayonuna olan etkisine bakılmış ve gen anlatımlarının profili çıkarılmıştır. Çalışmada azot eksikliğinde solunum hızının arttığını ve glikoliz sürecinde rol alan enzimlerin ifadesinde artış saptanmıştır. Lipid akümülayonun başlangıcında aralarında malat dehidrogenaz enziminin de bulunduğu karbon metabolizmasıyla ilişkili genlerin ifadesinde artış bildirmişlerdir. Gen ifadelerine göre karbon metabolizması hem C-3 hem de C-4 yolağını göstermektedir (Valenzuela ve diğ., 2012).

Ruelland ve Miginiac-Maslow (1999), kloroplast enzimlerinin birçoğunun karbon metabolizmasıyla ilişkilendiğini, malat dehidrogenaz enziminin C-4 bitkilerinin karbon asimilasyonunda ana enzim olduğunu ve C-3 bitkilerinde ise metabolik indirgeyicilerin sitozole taşınmasında rol oynadığını bildirmiştir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3: C-3 bitkilerinde fotosentetik karbonun indirgenme şeması ile ışığa bağımlı enzimlerin ve redoks tepkimeleri ile kontrol edilen enzimlerin ilişkisi. NADP-MDH, NADP bağımlı malat dehidrogenaz; PRK, fosforubilokinaz; GAPDH, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz; FBPase, fruktoz-1,6-bifosfat fosfataz; SBPase, sedoheptuloz-1,7-bifosfat fosfataz; G6PDH, glüköz-6-fosfat dehidrogenaz (Ruelland ve Miginiac-Maslow, 1999).

Yapılan literatür çalışmasında azot eksikliğinin lipid akümülyasyonunu teşvik ettiği ve moleküler düzeydeki çalışmalar ışığında malat dehidrogenazın lipid akümülyasyonunda rol aldığı belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda azot eksikliğinin yanı sıra mutasyon uygulaması sonucu malat dehidrogenaz aktivitesinde 2.13 kat artış görülmüş olup mutant suştaki lipid artışının bu enzimden kaynaklı olduğu savunulmaktadır.

Deney sonuçlarımıza göre palmitoil-mono galaktozil diaçilgliserol delta-7 desaturaz (FAD5)'in anlatımında 2.58 kat artış saptanmıştır. FAD5, hegzadekatrienoik asit (C16:3) oluşumunu teşvik etmektedir (Heilmann ve diğ., 2004a). Hekzadekatrienoik asit, palmitik asitin (C16:0) desaturasyonu ile sentezlenmektedir.

Arabidopsis thaliana'da yapılmış çalışmalarda FAD5 geninin hekzadekatrioneik asit oluşumundan sorumlu olduğu ve FAD5 mutanlığı *Arabidopsis thaliana*'da hekzadekatrioneik asit oluşumunun gözlemlenmediği ya da kontrol grubuna göre daha düşük miktarda üretildiği bildirilmiştir (Heilmann ve diğ., 2004a). Aynı araştırmacı, bir başka çalışmada ADS1 ve ADS2 geninin FAD5 geni gibi davranarak hekzadekatrioneik asit oluşumunu teşvik ettiğini rapor etmiştir (Heilmann ve diğ., 2004b). Bu tez çalışmasında, mutant suşta palmitik asit içeriğinin azalmasına karşın hekzadekatrioneik asit içeriğinde artış saptanmış olup aynı zamanda FAD5 geninin de anlatımında artış gözlemlenmiştir. Palmitik asit içeriğindeki bu azalışa karşın hekzadekatrioneik asit içeriğindeki artışın FAD5 aktivitesindeki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre tez amacına başarıyla ulaşılmıştır. Lipid içeriği ve üretimi yüksek mutant suşlar elde edilmiş olup mikroalglerden biyodizel üretimi için hammadde kaynakları iyileştirilmiş ve mikroalgal biyodizel üretimi verimli hale getirilmiştir. Yapılan derin literatür taraması ışığında bulgularımızın diğer araştırmacıların verileriyle tutarlılık gösterdiği sonucuna varılmıştır ancak bulgularımızın desteklenmesi ve çalışmanın bütünüyle tamamlanabilmesi için karbonhidrat, protein, klorofil miktar tayini ve MiSeq sonuçlarının Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

(kantitatif PZR) validasyonu gibi bazı analizlere ihtiyaç duyulmaktadır ve yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Ahn J, Hwangbo K, Lee S, Choi H, Park Y, Liu J, Jeong W., 2012, A new Arctic *Chlorella* species for biodiesel production, *Bioresource Technology*, 3: 125-340.
- Anandarajah K., Mahendrapurumal, G., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2012, Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels, *Applied Energy*, 96, 371-377.
- Anthony, J., Rangamaran, V. R., Gopal, D., Shivasankarasubbiah, K. T., Thilagam, M. L. J., Dhassiah, M. P., Thirunavukkarasu, S., 2015, Ultraviolet and 5' Fluorodeoxyuridine induced random mutagenesis in *Chlorella vulgaris* and its impact on fatty acid profile: a new insight on lipid-metabolizing genes and structural characterization of related proteins, *Marine Biotechnology*, 17(1), 66-80.
- Bajguz, A., 2000, Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(3), 209-215.
- Bartley, M. L., Boeing, W. J., Dungan, B. N., Holguin, F. O., Schaub, T., 2014, pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms, *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1431-1437.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarrra, N. M., Franco, J. M., Raymundo, A., 2013, Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products, *Algal Research*, 2(2), 164-173.
- Becker, E. W., 1994, Microalgae: biotechnology and microbiology (Vol. 10), *Cambridge University Press*.
- Beisson, Y., 2011, Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: with focus on proteins involved in lipid metabolism, *Proteomics*, 11(21), 4266-4273.
- Bonnefond, H., Moelants, N., Talec, A., Bernard, O., Sciandra, A., 2016, Concomitant effects of light and temperature diel variations on the growth rate and lipid production of *Dunaliella salina*, *Algal Research*, 14, 72-78.
- Campbell, W. H., 1999, Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology, *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 277-303.

- Chang, H. X., Huang, Y., Fu, Q., Liao, Q., Zhu, X., 2016, Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon, *Bioresource Technology*, 206, 231-238.
- Chaturvedi, R., Fujita, Y., 2006, Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of *Nannochloropsis oculata* ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level, *Phycological Research*, 54(3), 208-219.
- Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X., Wang, J., 2012, Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion, *Bioresource Technology*, 111, 208-214.
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T. C., Ng, K. S., Salley, S. O., 2011, Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*, *Bioresource Technology*, 102(2), 1649-1655.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2009, A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae, *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 41-47.
- Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., Das, K. C., 2009, Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature, *International Journal of Molecular Sciences*, 10(2), 518-532.
- Chisti, Y., 2007, Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
- Choudhary, M., Jetley, U. K., Khan, M. A., Zutshi, S., Fatma, T., 2007, Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(2), 204-209.
- Collet, P., Hélias, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R. A., Steyer, J. P., 2011, Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production, *Bioresource Technology*, 102(1), 207-214.
- Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A., Harrison, P. J., 1999, An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures, *Journal of Applied Phycology*, 11(2), 179-184.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., Del Borghi, M., 2009, Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151.

- Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A., Parra-Saldivar, R., 2015, Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins, *Microbial Biotechnology*, 8(2), 190-209.
- David, F., Sandra, P., Vickers, A. K., 2005, Column selection for the analysis of fatty acid methyl esters, *Food Analysis Application. Palo Alto, CA: Agilent Technologies*.
- Demirbas, A., Demirbas, M. F., 2011, Importance of algae oil as a source of biodiesel, *Energy Conversion and Management*, 52(1), 163-170.
- Dizge, N., Canlı, O., Karpuzcu, M., Biyodizel Kullanımının Çevre için Önemi. http://www.emo.org.tr/ekler/5aa4bd09c07d8b2_ek.pdf
- Doan, T. T. Y., Obbard, J. P., 2012, Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting, *Algal Research*, 1(1), 17-21.
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Abreu, A. P., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., 2011, Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae, *Applied Energy*, 88(10), 3331-3335.
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., 2010, Third generation biofuels from microalgae., *Current Research, Technology And Education Topics in Applied Microbiology And Microbial Biotechnology*, 2, 1355-1366.
- Fenton, O. 2012, Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): a review, *Algal Research*, 1(1), 49-56.
- Fu, F. X., Warner, M. E., Zhang, Y., Feng, Y., Hutchins, D. A., 2007, Effects of increased temperature and CO₂ on photosynthesis, growth, and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (cyanobacteria), 1. *Journal of Phycology*, 43(3), 485-496.
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C., Simões, M., 2016, The effects of light and temperature on microalgal growth and nutrient removal: an experimental and mathematical approach, *RSC Advances*, 6(27), 22896-22907.
- Gonzalez-Ballester, D., Camargo, A., Fernández, E., 2004, Ammonium transporter genes in *Chlamydomonas*: the nitrate-specific regulatory gene Nit2 is involved in Amt1; 1 expression, *Plant Molecular Biology*, 56(6), 863-878.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Chen, Z., 2011, Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome, *Nature Biotechnology*, 29(7), 644-652.

- Grima, E. M., Belarbi, E. H., Fernández, F. A., Medina, A. R., Chisti, Y., 2003, Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, *Biotechnology Advances*, 20(7), 491-515.
- Guschina, I. A., Harwood, J. L., 2006, Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae, *Progress in Lipid Research*, 45(2), 160-186.
- Heilmann, I., Mekhedov, S., King, B., Shanklin, J., 2004, Identification of the *Arabidopsis* palmitoyl-monogalactosyldiacylglycerol Δ^7 -desaturase gene FAD5, and effects of plastidial retargeting of *Arabidopsis* desaturases on the *fad5* mutant phenotype, *Plant Physiology*, 136(4), 4237-4245.
- Heilmann, I., Pidkowich, M. S., Girke, T., Shanklin, J., 2004, Switching desaturase enzyme specificity by alternate subcellular targeting, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(28), 10266-10271.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Ruan, R., Hu, B., 2011, Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 2245-2253.
- Hidalgo, P., Toro, C., Navia, R., 2013, Advances in direct transesterification of microalgal biomass for biodiesel production, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(2), 179-199.
- Hlavova, M., Turoczy, Z., Bisova, K., 2015, Improving microalgae for biotechnology—From genetics to synthetic biology, *Biotechnology Advances*, 33(6), 1194-1203.
- Hossain S, Salleh A., 2008, Biodiesel fuel production from algae as renewable energy, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4: 250-254
- Huppe, H. C., Turpin, D. H., 1994, Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells, *Annual Review of Plant Biology*, 45(1), 577-607.
- Ikaran, Z., Suárez-Alvarez, S., Urreta, I., Castañón, S., 2015 The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3, *Algal Research*, 10, 134-144.
- Illman, A. M., Scragg, A. H., Shales, S. W., 2000, Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme and Microbial Technology*, 27(8), 631-635.
- Kaewkannetra, P., Enmak, P., Chiu, T., 2012, The effect of CO₂ and salinity on the cultivation of *Scenedesmus obliquus* for biodiesel production, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(3), 591-597.
- Kao, C. Y., Chiu, S. Y., Huang, T. T., Dai, L., Hsu, L. K., Lin, C. S., 2012, Ability of a mutant strain of the microalga *Chlorella* sp. to capture carbon dioxide for biogas upgrading, *Applied Energy*, 93, 176-183.

- Khan, S. A., Hussain, M. Z., Prasad, S., Banerjee, U. C., 2009, Prospects of biodiesel production from microalgae in India, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(9), 2361-2372.
- Lardon L, Hei lias A, Sialve B, Steyer J.P, Bernard O., 2009, Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae, *Environmental Science and Technology* 43: 6475-6481.
- Laurens, L. M., Quinn, M., Van Wycken, S., Templeton, D. W., Wolfrum, E. J., 2012, Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(1), 167-178.
- Lewis, T., Nichols, P. D., & McMeekin, T. A., 2000, Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs *Journal of Microbiological Methods*, 43(2), 107-116.
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., 2009, Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions, *Biotechnology Letters*, 31(7), 1043-1049.
- Li, K., Liu, S., Liu, X., 2014, An overview of algae bioethanol production, *International Journal of Energy Research*, 38(8), 965-977.
- Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z., Liu, Z., 2006, Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae), *Chemosphere*, 62(4), 565-572.
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Dauvillee, D., Sommerfeld, M., Ball, S., Hu, Q., 2010, Chlamydomonas starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol, *Metabolic Engineering*, 12(4), 387-391.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C. Q., 2008, Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 629-636.
- Ma, Y., Wang, Z., Zhu, M., Yu, C., Cao, Y., Zhang, D., Zhou, G., 2013, Increased lipid productivity and TAG content in *Nannochloropsis* by heavy-ion irradiation mutagenesis, *Bioresource Technology*, 136, 360-367.
- Machida, T., Murase, H., Kato, E., Honjoh, K. I., Matsumoto, K., Miyamoto, T., Iio, M., 2008, Isolation of cDNAs for hardening-induced genes from *Chlorella vulgaris* by suppression subtractive hybridization, *Plant Science*, 175(3), 238-246.
- Manandhar-Shrestha, K., Hildebrand, M., 2013, Development of flow cytometric procedures for the efficient isolation of improved lipid accumulation mutants in a *Chlorella* sp. Microalga, *Journal of Applied Phycology*, 25(6), 1643-1651.

- Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, L. Y., Geer, R. C., Lu, F., 2012, CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure, *Nucleic acids research*, gks1243.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., 2010, Microalgae for biodiesel production and other applications: a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232.
- Maxwell, D. P., Falk, S., Trick, C. G., Huner, N. P., 1994, Growth at low temperature mimics high-light acclimation in *Chlorella vulgaris*, *Plant Physiology*, 105(2), 535-543.
- Mayo, A. W., 1997, Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria, *Water Environment Research*, 69(1), 64-72.
- Miller, R., Wu, G., Deshpande, R. R., Vieler, A., Gärtner, K., Li, X., Bullard, B., 2010, Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism, *Plant Physiology*, 154(4), 1737-1752.
- Moheimani, N. R., 2013, Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors, *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 387-398.
- Musacchia, F., Basu, S., Petrosino, G., Salvemini, M., Sanges, R., 2015, Annocript: a flexible pipeline for the annotation of transcriptomes able to identify putative long noncoding RNAs, *Bioinformatics*, 31(13), 2199-2201.
- Mühlroth, A., Li, K., Røkke, G., Winge, P., Olsen, Y., Hohmann-Marriott, M. F., Bones, A. M., 2013, Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista, *Marine Drugs*, 11(11), 4662-4697.
- Nguyen, H. M., Baudet, M., Cuine, S., Adriano, J. M., Barthe, D., Billon, E., Li-Beisson, Y., 2011, Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: with focus on proteins involved in lipid metabolism, *Proteomics*, 11(21), 4266-4273.
- Park, J. Y., Park, M. S., Lee, Y. C., Yang, J. W., 2015, Advances in direct transesterification of algal oils from wet biomass, *Bioresource Technology*, 184, 267-275.
- Ponnuswamy, I., Madhavan, S., Shabudeen, S., 2013, Isolation and characterization of green microalgae for carbon sequestration, waste water treatment and bio-fuel production, *Int. J. Bio-Sci. Bio-Technol*, 5, 17-26.
- Pulz, O., Gross, W., 2004, Valuable products from biotechnology of microalgae, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648.

- Qiang, H., Zarmi, Y., Richmond, A., 1998, Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria), *European Journal of Phycology*, 33(2), 165-171.
- Rachlin, J. W., Grosso, A., 1991, The effects of pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and its interactions with cadmium toxicity, *Archives of environmental contamination and toxicology*, 20(4), 505-508.
- Rasoul-Amini, S., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher, M. A., Hoseini-Alhashemi, S., Ghasemi, Y., 2011, *Chlorella* sp.: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor, *Applied Energy*, 88(10), 3354-3356.
- Ratledge, C., 2004, Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production, *Biochimie*, 86(11), 807-815.
- Ruelland, E., Miginiac-Maslow, M., 1999, Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition?, *Trends in Plant Science*, 4(4), 136-141.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K., 2010, edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M. N., 2008, Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 20(3), 245-251.
- South, G. R., Whittick, A., 2009, *An Introduction to Phycology*. John Wiley & Sons.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A., 2006, Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Starckx, S., 2012, A place in the sun-Algae is the crop of the future, *Geel Flanders Today*.
- Tang, H., Abunasser, N., Garcia, M. E. D., Chen, M., Ng, K. S., Salley, S. O. 2011, Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel, *Applied Energy*, 88(10), 3324-3330.
- Thawechai, T., Cheirsilp, B., Louhasakul, Y., Boonsawang, P., Prasertsan, P., 2016, Mitigation of carbon dioxide by oleaginous microalgae for lipids and pigments production: Effect of light illumination and carbon dioxide feeding strategies. *Bioresource Technology*, 219, 139-149.

- Tran, D., Yeh, K., Chen, C., Chang J., 2012, Enzymatic Transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized Burkholderia lipase, *Bioresource Technology* 108: 119-127.
- Tsuzuki, M., Ohnuma, E., Sato, N., Takaku, T., Kawaguchi, A., 1990, Effects of CO₂ concentration during growth on fatty acid composition in microalgae, *Plant Physiology*, 93(3), 851-856.
- Valenzuela, J., Mazurie, A., Carlson, R. P., Gerlach, R., Cooksey, K. E., Peyton, B. M., Fields, M. W., 2012, Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*, *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 1.
- Vergara-Fernández, A., Vargas, G., Alarcón, N., Velasco, A., 2008, Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system, *Biomass and Bioenergy*, 32(4), 338-344.
- Wase, N., Black, P. N., Stanley, B. A., DiRusso, C. C., 2014, Integrated quantitative analysis of nitrogen stress response in *Chlamydomonas reinhardtii* using metabolite and protein profiling, *Journal of Proteome Research*, 13(3), 1373-1396.
- Widjaja, A., Chien, C. C., Ju, Y. H., 2009, Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(1), 13-20.
- Work, V. H., Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Meuser, J. E., Elliott, L. G., Vinyard, D. J., Posewitz, M. C., 2010, Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* sta7-10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains, *Eukaryotic cell*, 9(8), 1251-1261.
- Wynn, J. P., Hamid, A. A., Li, Y., Ratledge, C., 2001, Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*, *Microbiology*, 147(10), 2857-2864.
- 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., *Bioresource Technology*, 101(14), 5494-5500.
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J., Wu, Q., 2008, High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(1), 29-36.
- Yang, Y. ve Gao, K., 2003, Effects of CO₂ concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta), *Journal of Applied Phycology*, 15(5), 379-389.

- Yeesang, C. ve 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.
- Ying, K., Gilmour, J., Zimmerman, W. B., 2014, Effects of CO₂ and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*, *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 2014.
- Yongmanitchai, W ve Ward, O. P., 1991, Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 419-425.
- Zelitch, I., 1971, Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity, *Academic Press*. p. 275.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Yiğit Sabri ÜNLÜ
Doğum Yeri	Beyoğlu
Doğum Tarihi	05.06.1989
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0536 457 9801
E-Posta Adresi	yigitsabriunlu@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	05.09.2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Botanik Programı
Mezuniyet Tarihi	02.01.2017

Makale ve Bildiriler
Increasing the Lipid Productivity of <i>Chlorella vulgaris</i> by Using EMS Mutagenesis Method, International Conference on Biofuels and Microalgae, 30-31 Temmuz 2015, Koç Üniversitesi (Poster).
EMS Mutajenez Yöntemiyle <i>Chlorella vulgaris</i> 'in Biyokütlesinin Arttırılması, 2. Alg Teknolojisi Sempozyumu, 24-27 Mayıs 2016, İzmir (Sözlü sunum).