

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***CHLORELLA ELLIPSOIDEA* ve *DUNALIELLA*
BARDAWIL (Chlorophyta) MİKROALG TÜRLERİNİN
FARKLI BESİN ORTAMLARINDAKİ
BİYOKİMYASAL KOMPOZİSYONUNUN
BELİRLENMESİ**

Tuğba SÖNMEZİŞİK

Tez Danışmanı: Prof. Dr Semra CİRİK

Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 504.04.01

Sunuş Tarihi: 07.05.2010

Bornova-İZMİR

2010

Tuğba Sönmezışık tarafından Yüksek lisans tezi olarak sunulan “Chlorella ellipsoidea ve Dunaliella bardawil (Chlorophyta) Mikroalg Türlerinin Farklı Besin Ortamlarındaki Biyokimyasal Kompozisyonun belirlenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29/12/2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:
Raportör Üye	:
Üye	:

ÖZET***CHLORELLA ELLIPSOİDEA* ve *DUNALIELLA BARDAWİL*
(Chlorophyta) MİKROALG TÜRLERİNİN FARKLI BESİN
ORTAMLARINDAKİ BİYOKİMYASAL KOMPOZİSYONUNUN
BELİRLENMESİ**

SÖNMEZİŞİK, Tuğba

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr Semra CİRİK

Ağustos 2010, 73 sayfa

Bu çalışmada *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil*'in (Chlorophyceae) farklı ortam koşullarında yetiştiricilikleri yapılmıştır. Elde edilen biyomas ile lipit, protein, karbonhidrat, toplam su miktarı, nem miktarı, kül miktarı araştırılmıştır. *Chlorella ellipsoidea* için, 25°C'de F/2 ve Proteose ortamları uygulanmıştır. En yüksek lipit, protein ve karbonhidrat miktarlarının Proteose ortamında olduğu saptanmıştır. 10. güne ait lipit, protein, karbonhidrat, toplam su, nem, kül miktarı sırası ile % 20.4 ± 0.99, % 56.6 ±1.04, % 16.4 ±1.71, %1.89 ±0.185, %14.25 ±1.561.89, % 4.71 ±0.201. *Dunaliella bardawil* kültürü için, 21°C 'de 2XErdshreiber ve Modifiye Edilmiş Johson ortamları uygulanmıştır. En yüksek lipit, protein ve karbonhidrat miktarlarının 2XErdshreiber ortamında olduğu belirlenmiştir. 12. güne ait lipit, protein, karbonhidrat, toplam su, nem, kül miktarı değerleri sırası ile % 9.1 ±0.17, % 39.7 ±2.28, % 22.8 ±2.51, % 1.44 ±0.28, % 18.28 ±1.26, % 26.96 ±1.35 bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Mikroalgler, lipit, protein, karbonhidrat *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil*.

ABSTRACT**DETERMINING THE BIOCHEMICAL COMPOSITION of
CHLORELLA ELLIPSOIDEA and *DUNALIELLA BARDAWIL*
(Chlorophyta) MICROALGAE IN DIFFERENT TYPES FOOD
ENVIRONMENT**

SÖNMEZİŞİK, Tuğba

Master's Thesis, Department of Fisheries Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Semra CİRİK

December 2010, 73 Pages

In this study, aquaculture of *Chlorella ellipsoidea* and *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) were performed in different environmental conditions. Protein, carbohydrate, total water content, moisture content, ash content and the obtained biomass with lipid were investigated. F/2 at 25°C and Proteose environments were applied for *Chlorella ellipsoidea*. It is determined that the highest level of lipid, protein and carbohydrate are at F/2 environment. The value of lipid belonged to 10th day, protein, carbohydrate, total water, moisture, amount of ash are % 20.4 ± 0.99, % 56.6 ± 1.04, % 16.4 ± 1.71, % 1.89 ± 0.185, % 14.25 ± 1.561.89, % 4.71 ± 0.201 respectively. 2XErdschreiber at 21°C and Modified Johnson environments were applied for *Dunaliella bardawil*. It is determined that the highest level of lipid, protein and carbohydrate are at 2XErdschreiber environment. The value of lipid belonged to 12th day, protein, carbohydrate, total water, moisture, amount of ash are % 20.4 ± 0.99, % 56.6 ± 1.04, % 16.4 ± 1.71, % 1.89 ± 0.185, % 14.25 ± 1.561.89, % 4.71 ± 0.201 respectively.

Key words: Microalgae, lipid, protein, carbohydrate and *Chlorella ellipsoidea*, *Dunaliella bardawil*

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans öğrenimim boyunca bana ilgisini ve desteğini hiç esirgemeyen, büyük bir sabır ve titizlikle bilgi ve tecrübelerini aktararak gelişmemi sağlayan, değerli danışmam hocam, Prof. Dr. Semra CİRİK'e, tez çalışmam esnasında ilgisini ve yardımlarını gördüğüm, laboratuvar deneyim ve birikimlerinden yararlandığım Yrd. Doç. Dr. Şafak SEYHANEYILDIZ CAN'a, tez çalışmam sırasında desteklerini ve yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. Dr. Gamze TURAN'a, Araş. Gör. Dr. Hatice TEKOĞUL'a, çalışmaya ait verilerin düzenlenmesi ve istatistiksel analizlerinin değerlendirilmesinde yardımları esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. İlknur AK'a, tez çalışmamın her aşamasında desteğini gördüğüm Araş. Gör. Ulviye KARACALAR'a, tezimin düzenlenmesinde yardımlarını gördüğüm bilgisayar öğretmeni Onur YILMAZ ve uluslararası ilişkiler uzmanı Ece GÜNEYLİGİL'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, öğrenim hayatım boyunca bana hep destek olan, sabırla yardımlarını esirgemeyen Su Ürünleri Mühendisi Gökhan SUBAKAN'a, tez çalışmam esnasında benimle birlikte olup cesaret veren, bana inanıp maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, asla beni yalnız bırakmayan hayatımdaki en değerli varlığım ailem'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x17
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1 Mikroalg Üretimi	7
2.1.1 Alglerin İzolasyonu	7
2.1.2 Mikroalgal Biyomas Üretimi	8
2.1.3 Mikroalg yetiştiriciliğinde Kültür Koşulları	8
2.1.3.1. Fiziksel Koşullar	8
2.1.3.2. Aydınlatma	8
2.1.3.3. Sıcaklık	9
2.1.3.4. pH	9

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.3.5. Tuzluluk.....	9
2.1.3.6. Havalandırma.....	9
2.1.3.7. Oksijen seviyesi.....	10
3. MATERYAL VE METOD	11
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. <i>Chlorella ellipsoidea</i>	11
3.1.2. <i>Dunaliella bardawil</i>	12
3.2. Metod.....	14
3.2.1. <i>Chlorella ellipsoidea</i> Kültürü.....	15
3.2.1.1. <i>C .ellipsoidea</i> Katı Agar Ortamından Sıvı Besin Ortamına Ekimi.....	15
3.2.1.2. <i>Chlorella ellipsoidea</i> İçin Uygulanan Deneme Ortamları.....	16
3.2.1.3. F/2 Ortamı ile Deneme Yapılan <i>Chlorella ellipsoidea</i>	18
3.2.1.4. Proteose Ortamı ile Deneme Yapılan <i>Chlorella ellipsoidea</i>	18
3.2.2. <i>Dunaliella bardawil</i> Kültürü	19
3.2.2.1. <i>Dunaliella bardawil</i> Katı Agar Ortamından Sıvı Besin Ortamına Ekimi	19
3.2.2.2. <i>Dunaliella bardawil</i> İçin Uygulanan Deneme Ortamları	19

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.2.3. 2X Erdshreiber Ortamı ile Deneme Yapılan <i>Dunaliella bardawil</i>	22
3.2.2.4. Modifiye Edilmiş Johnson Ortamı İle Deneme Yapılan <i>Dunaliella bardawil</i>	22
3.2.3. Alglerin Hasat İşlemi.....	23
3.2.4. Alglerin Kurutulması ve Ağırlıklarının Ölçülmesi.....	24
3.3. Deneme Süresince Günlük Yapılan Analizler.....	24
3.3.1. Kuru Madde Analizi	24
3.3.2. Optik Yoğunluk	25
3.3.3. Hücre Sayımı	25
3.3.4. pH ve Oksijen Ölçümü	26
3.4. Deneme Sonunda Yapılan Analizler	26
3.4.1. Alglerden Lipidin Ekstraksiyonu.....	26
3.4.2. <i>Chlorella ellipsoidea</i> ve <i>Dunaliella bardawil</i> Örneklerinin Protein ve Karbonhidrat Analizleri İçin Hazırlanması	27
3.4.3. Protein Analizi	27
3.4.3.1. Solüsyonların Hazırlanması	28
3.4.3.2. Protein Analizin Yapılışı	29

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.4.4. Karbonhidrat Analizi	29
3.4.4.1. Solüsyonların Hazırlanması.....	30
3.4.4.2. Karbonhidrat Analizin Yapılışı	31
3.4.5. Toplam Su Miktarı Analizi.....	31
3.4.6. Nem Analizi.....	32
3.4.7. İnorganik Madde Miktarı Analizi (Kül).....	32
4. BULGULAR	34
4.1. <i>Chlorella ellipsoidea</i>	34
4.1.1. Optik Yoğunluk (OD).....	34
4.1.2. Kuru Ağırlık	35
4.1.3. Hücre Sayısı.....	36
4.1.4. pH Değerleri	36
4.1.5. Oksijen Değerleri.....	36
4.1.6. <i>Chlorella ellipsoidea</i> kültürünün Biyokimyasal Kompozisyonu	37
4.2. <i>Dunaliella bardawil</i>	38
4.2.1. Optik Yoğunluk (OD).....	39

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2.2. Kuru Ağırlık	39
4.2.3. Hücre Sayısı.....	39
4.2.4. pH Değerleri	40
4.2.5. Oksijen Değerleri.....	41
4.2.6. <i>Dunaliella bardawil</i> kültürünün Biyokimyasal Kompozisyonu	42
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	43
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. <i>Chlorella ellipsoidea</i> Gerneck, Deneme Grupları (Orijinal)	11
3.2. <i>Dunaliella bardawil</i> Teodoresco, Deneme Grupları (Orijinal).....	13
3.3. Kültür Dolabı	15
3.4. Otoklav	17
3.5. <i>Chlorella ellipsoidea</i> Proteose ve F/2 Ortamı Uygulanan Deneme (Orijinal)	18
3.6. Vorteks	19
3.7. <i>Dunaliella bardawil</i> 2XErdschreiber ve Modifiye Edilmiş Johnson Ortamı Uygulanan Grupları (Orijinal).....	23
3.8. Alglerin kurutulması (Orijinal)	24
3.9. Kuru madde Analizinde kullanılan Filtre kağıtları (Orijinal)	25
3.10. Spektrometre	26
3.11. Neubauer sayma kamarası.....	26
3.12. <i>Chlorella ellipsoidea</i> Lipit (Orijinal).....	27
3.13. <i>Dunaliella bardawil</i> Lipit (Orijinal)	27
3.14. Protein Analizinin yapıışı (Orijinal)	29

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.15. Karbonhidrat Analizi (Orijinal)	32
3.16. Karbonhidrat Analizin Yapılışı (Orijinal)	32
3.17. Porselen kroze, Alg (Orijinal)	33
3.18. Kül fırını (Orijinal).....	33
3.19. Porselen kroze, Kül (Orijinal)	33
4.1. <i>Chlorella ellipsoidea</i>	34
4.2. <i>Dunaliella bardawil</i>	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. <i>Chlorella ellipsoidea</i> için kullanılan Proteose ve F/2 ortamı.....	16
3.2. <i>Dunaliella bardawil</i> için kullanılan 2XErdschreiber ortamı.....	20
3.3. <i>Dunaliella bardawil</i> için kullanılan Modifiye edilmiş Johnson ortamı	21
3.4. <i>C.ellipsoidea</i> Proteose ve F/2 ortamı Protein Standart Solüsyonu.....	28
3.5. <i>D. bardawil</i> 2XErdschreiber ve Modifiye edilmiş Johnson ortamı Protein Standart Solüsyonu	28
3.6. <i>C.ellipsoidea</i> Proteose ve F/2 ortamı Glikoz Standart Konsantrasyonu	30
3.7. <i>D.bardawil</i> 2XErdschreiber ve Modifiye edilmiş Johnson ortamı Glikoz Standart Konsantrasyonu	30
4.1. <i>C.ellipsoidea</i> Proteose ve F/2 ortamı Optik yoğunluk (O.D).....	35
4.2. <i>C.ellipsoidea</i> Proteose ve F/2 ortamı Kuru ağırlık.....	35
4.3. <i>C.ellipsoidea</i> Proteose ve F/2 ortamı Hücre sayısı	36
4.4. <i>C.ellipsoidea</i> Proteose ve F/2 ortamı pH değerleri	37
4.5. <i>C.ellipsoidea</i> Proteose ve F/2 ortamı Oksijen değerleri.....	37
4.6. <i>C.ellipsoidea</i> 'nın Protein, Karbonhidrat ve Lipit Değerleri (n=3).....	38
4.7. <i>D.bardawil</i> 2XErdschreiber ve Modifiye edilmiş Johnson ortamı Optik yoğunluk (O.D)	39

ÇİZELGELER DİZİNİ (DEVAM)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.8. <i>D.bardawil</i> 2XErdschreiber ve Modifiye edilmiş Johnson ortamı Kuru Ağırlık.....	40
4.9. <i>D.bardawil</i> 2XErdschreiber ve Modifiye edilmiş Johnson ortamı Hücre sayısı.....	40
4.10. <i>D.bardawil</i> 2XErdschreiber ve Modifiye edilmiş Johnson ortamı pH değerleri	41
4.11. <i>D.bardawil</i> 2XErdschreiber ve Modifiye edilmiş Johnson ortamı Oksijen değerleri.....	41
4.12. <i>D.bardawil</i> Protein, Karbonhidrat ve Lipit değerleri (n=3).....	42

GİRİŞ

Algler uzun yıllardan beri hücre içinde biriktirdikleri protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitamin, mineral, pigmentleriyle; daha pek çok önemli metabolitleri nedeniyle endüstri ve sağlık alanlarında değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Mikroalgler ile yapılan yoğun araştırmalar, özellikle siyanobakterilerde 1980'lerde başlamıştır, son yıllarda da mikroalgler kapsamlı araştırmaların odağı haline gelmişlerdir (Neenan et al., 1986). Bunun nedeni, denemeler için gerekli olan algal biyokütlenin, laboratuvar ölçeğinde kolaylıkla kültüre edilebilmesidir. Az miktardaki materyal ile çok miktarda ekstrakt ve bileşik denenebilmektedir.

Mikroalgler kara bitkileri gibi güneş ışığı ve karbondioksiti kullanarak yağ üretebilmeleri, saatler içerisinde bölünerek çoğalmaları ve yıl boyunca üretilibilmeleri sebebiyle kara bitkilerinden daha fazla ürün verimliliğine sahip organizmalardır. Algal kütleden yağ eldesi konusunda dünyanın pek çok ülkesinde çalışmalar gizlilik içerisinde sürdürülmektedir. Yağ içeriği yüksek tür arayışının yanında mevcut türler içerisinde yağ içeriğini yükseltme olanakları konusu araştırılmaktadır (Neenan et al., 1986). Mikroalgal hücrelerin üretiminde hasat işlemi, kültürünün nispeten maliyetli olması gibi sorunlar ile birlikte kara bitkilerine göre avantajlarının daha fazla olması ve hepsinden önemlisi suyu en verimli kullanan sistemler olmaları, araştırmacıların konuya olan ilgisini artırmaktadır. Büyük hacimlerde mikroalgal üretim, verimsiz arazilerde gerçekleştirilebilmektedir. Enerji kaynağı depo ürünleri, membran komponentleri gibi fonksiyonel olan lipitler ve yağ asitleri tüm bitki hücrelerinin bileşenleridir.

Alglerin atıksu arıtımı, gübre, insan gıdası, hayvan yemi, kozmetik sanayinde kullanılmasının yanında son yıllarda enerji kaynağı olarak yenilenebilir, biodiesel yakıt kaynağı olarak değerlendirme olanakları araştırılmaktadır (Neenan et al., 1986). Bu amaçla yağ içeriği ve büyüme hızı yüksek mikroalg türlerinin belirlenmesi çalışmaları ile birlikte, hücre içinde mevcut yağ içeriğinin artırılmasını uyaran stres koşullarının belirlenmesi araştırmaları da sürdürülmektedir.

Bu çalışmada yeşil alger sınıfından olan *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil* farklı besin ortamlarında yetiştirilmiş ve algerin lipit, karbonhidrat ve protein içeriklerine etkisi araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Takagi et al., (2005) yılında yaptıkları bir çalışma da *Dunaliella* hücrelerinde triasilgliserid ve lipitlerin birikmesinde tuz stresinin etkisini araştırmışlardır. 1.5 M' den daha yüksek NaCl konsantrasyonunun belirgin şekilde hücre büyümesini engellediğini NaCl konsantrasyonunu 0.5 M' den 1.0 M' a arttırıldığında daha yüksek hücre içi lipit'e sahip olduğu saptanmıştır (% 60).

Xu et al., (2006) yılında yaptıkları çalışmada *Chlorella protothecoides*'in heterotrofik (Het.) ve ototrofik (Ot.) yetiştirme şartlarında bio-dizel olarak kullanım olanaklarını karşılaştırmışlardır. *C. protothecoides*'in ototrofik olarak kültüre alındığında hücre içerisindeki protein oranının heterotrofik (Het.) beslemeye göre 5 kat arttığı (54.64 (Ot.) / 10.28 (Het.)), ancak yağ (lipit) oranının 4 kat (14.57 (Ot.) / 55.20 (Het.)) ve karbonhidrat oranının 1.5 kat (10.62 (Ot.) / 15.43 (Het.)) olduğu kaydedilmiştir.

Petkov and Garcia, (2007) farklı *Chlorella* türlerindeki yağ oranını incelemişler ve daha önce yapılan benzer çalışmalarla karşılaştırmışlardır. Çalışma da, farklı *Chlorella* türlerini fototrofik, heterotrofik ve dışarı koşullarında üretmişler, türler üzerinde azot eksilmesi uygulayarak yağ içeriklerini incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre 20 karbonlu ve 4 ya da 5 çift bağlı yağ asidinin tür farklılığından kaynaklanmadığı düşünülmüştür. Tatlı su alglerinden *C. pyrenoidosa*'nın fototrofik olarak azot ilave edilmeden yapılan yetiştiriciliğinde, yağ asidi miktarının arttığı saptanmıştır.

Yapılan bir çalışmada *Chaetoceros calcitrans* (diatom) su ürünleri yetiştiriciliğinde, canlı yem kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışma laboratuvar koşulları altında, farklı sıcaklık (20-25 ve 30°C), tuzluluk (‰ 25-30) koşullarında ve CO₂ ilaveli vererek havalandırma uygulanarak yapılmış ve *C. calcitrans*'da büyüme, biyomas, karbonhidrat, lipit ve protein miktarına etkilerine araştırılmıştır. Büyüme ve biyomas değerleri karbondioksit ilavesinden etkilendiğini, tuzluluk ve sıcaklık değişimlerinden daha az etkilendiğini saptamışlardır. Lipit ve karbonhidrat içeriği, düşük sıcaklıklarda (20 ve 25 °C) yüksek değerlerde saptanmış, iken protein içeriği etkilenmemiştir. Karbondioksit

eklemesi protein değerini artırırken, karbonhidrat değerini düşürmüş, lipit oranını değiştirmemiştir. Yüksek tuzlulukta karbonhidrat artış göstermiş, protein ve lipit oranlarında düşüş olmuştur(Raghavan et al., 2008).

Liang et al., (2009) yılında yaptıkları bir çalışmada *Chlorella vulgaris*'de farklı büyüme koşulunda biomas ve lipit üretimini araştırmışlardır. Kùltürler ototrofik ve heterotrofik olarak büyüme alınmışlar, ototrofik büyüme ile daha yüksek lipit içeriği (% 38) sağlanmış, heterotrofik büyümede ise glukoz, asetat ve gliserol kullanımı ile çok daha az lipit üretimi olduğu saptanmıştır. Optimal hücre yoğunluğu (2 g l⁻¹) ve lipit üretimine (54 mg-1 gün-1) % 1 glikoz kullanımında ulaşılmıştır. Azot konsantrasyonuna bağlı olarak mikroalglerin biyokimyasal kompozisyonlarındaki değişikler çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Xu et al., 2001; Li et al., 2008).

Mikroalgal lipit üretimini tetikleyen faktörleri bulmak yapılan araştırmalar çevresel stresin birçok mikroalg türünde lipit birikimine etki ettiğini göstermiştir. Çalışmaların çoğunda besin ortamındaki azotun azalması ile lipit miktarının arttığı da bildirilmiştir (Evans et al., Ratledge, 1984). Bothom and Radledge (1979) besin ortamındaki azot kaynağına bağlı olarak lipit miktarının değiştiğini, azotun azalması ile birlikte glukozun lipit'e dönüştüğünü bildirmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda da mikroalglerin lipit birikimi için, azotun sınırlandırılması gerektiği tespit edilmiştir (Turcotte and Kosaric, 1988; Evans and Ratledge, 1984; Widjaja et al., 2009).

Çevresel koşullar ile birlikte kùltür ortamında kullanılan besleyici elementler ve konsantrasyonları mikroalgal büyüme ve biyokimyasal yapı üzerinde değişikliklere neden olabilmektedir (Brown et al., 1993). Azot kaynağı ve farklı konsantrasyonları'nın mikroalglerin büyüme ve biyokimyasal yapılarında etkili olduğu bilinmektedir. (Gökpınar, 1991; Xu et al., 2001). Alglerde lipit sentezi yüksek bitkilerdeki yağ sentezi ile benzerdir (Chisti., 1980; Nagle and Lemke., 1990; Sawayama et al., 1995). Mikroalgler tarafından oluşturulan yağlar, sebze yağlarına benzer yağ asidi bileşimine sahiptirler. Alglerin birçok türü tarafından sentezlenebilen önemli yağ asitleri de bulunmaktadır (Knothe et al., 1997).

Besin içeriği ve çevresel faktörler, total yağ içeriği kadar yağ asitlerinin birbirlerine göre oranlarını da etkileyebilmektedir. Azot sınırlaması ile büyüyen birçok mikroalg türünde lipit içeriğinin arttığı gözlenmiştir. 1940'ların sonlarında azot açlığının lipit deposu üzerinde etkili olduğu saptanmış ve kuru ağırlıkta % 70-85 lipit düzeyi rapor edilmiştir. *Dunaliella* sp. veya *Tetraselmis suecica* gibi bazı alg türleri ise düşük lipit içermekte ve genellikle lipitten çok karbonhidratları üretmektedirler. Azotun dışında diğer bazı besin eksiklikleri de lipit içeriğinde düşüğe sebep olabilmektedir. Örneğin diatomlarda lipit miktarı silikon açlığı sırasında artabilir. Farklı azot rejimlerinin bazı alg türleri (*Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris*, *Anacystis nidulans*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria rubescens*, *Spirulina platensis*) nin lipit içeriği ve büyümesi üzerine etkileri çalışılmıştır (Piorreck and Pohl 1984).

Chlorophyceae sınıfına ait yeşil flagellatlardan *Dunaliella salina*'nın; kuru ağırlıktan yapılan analizinde besin kompozisyonu bakımından % 57 protein, % 32 karbonhidrat, % 9 yağ, % 8 minarele sahip olduğunu bildirmişlerdir (Fabregas and Herrero, 1985). Bir diğer çalışmada *Dunaliella salina*'nın yağ asitleri kompozisyonu incelenmiş ve % 23.3 doymuş yağ asidi, % 24.0 tek doymamış asidi, % 6.8 C:16, % 10.9 18:2w6, % 30.3 oranında 18:3w3 yağ asidine sahip olduğu bildirilmiştir. Mikroalg kültürlerinde biyomasın biyokimyasal kompozisyonu ve yağ asitleri değerleri çevresel faktörler, besin ortamı ve aydınlatma ile değişmektedir (Ben-Amotz et al., 1985).

Tatlı su mikrolaglerinden *Chlorella vulgaris*'in ürettiği lipit miktarına, CO₂ konsantrasyonunun, azotun, hasat zamanının ve ekstraksiyon yöntemlerindeki farklılıkların etkisi incelenmiştir. Çalışmada 60 °C'nin altında yapılan kurutma en iyi sonucu vermiştir. 60 °C'nin üzerinde yapılan kurutma işlemi ise triasilgliserid içeriğini düşürmüştür. Yeterince ezilip toz haline getirilen kuru alg örneklerine uygulanan ultra sonikasyon, lipit içeriğine ve ekstraksiyon zamanına etki etmemiştir. Mikroalgal hücrelerin toplam lipit içeriğinin yükselmesi besin ortamındaki azot miktarı ile ilgili olduğu gözlenmiştir. Besin ortamındaki azot normalden aza doğru indiği zaman serbest yağ asitlerince zengin lipitten, triasilgliserid içeren lipite doğru bir değişim olmuştur. Yüksek lipit içeriği azotun az olduğu ve dolayısıyla biyomas artışının yavaş ilerlediği dönemlerde

gözlenmiştir. Yüksek oranda ortama verilen CO₂'in de lipit üretimini artırmada önemli rol oynadığı gözlenmiştir. CO₂ konsantrasyonunun normal, azotun az olduğu ortamlarda yüksek lipit içeriği görülmüştür. Yüksek CO₂ konsantrasyonu ve normal besin ortamı ile yapılan üretimde logaritmik büyüme fazının sonunda azotun azalması sonucu lipit üretimi artmıştır (Widjaja et al., 2009). Denizel *Chlorella* sp.'de yüksek oranda hücre içi lipit içeriği ve besin ortamındaki azotun azalması sonucu lipit üretiminin arttığı Illman et al., (2000) tarafından da bildirilmiştir.

Ürenin azot kaynağı olarak kullanıldığı *Chlorella* sp. kültür çalışmasında besin ortamındaki ürenin azalması sonucu hücre sayıları sabit kalırken, biyomas konsantrasyonlarında azda olsa bir yükselme olduğu saptanmıştır. Mikroalglerin lipit içeriği kompozisyonuna tuzluluğun etki ettiği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. NaCl konsantrasyonu 0.4 M'dan 4 M'a yükseldiği zaman çoklu doymamış yağ asitleri azalırken tekli doymamış yağ asitleri artmıştır (Qing et al., 1997). Yapılan başka bir çalışmada NaCl konsantrasyonunun artması ile birlikte doymuş yağ asitleri yüzdesi düşmüş, doymamış yağ asitleri artmıştır (Fujii et al., 2001).

Dunaliella salina'nın lipit ve triasilgliserit birikimine tuz konsantrasyonunun etkisini denemek için yapılan çalışmada 1.5 M, 1 M ve 0.5 M NaCl içeren besin ortamları kullanılmıştır. *Dunaliella* kültüründe besin ortamı olarak litrede 29.2 g NaCl, 1.0 g KNO₃, 1.5 g MgCl₂.H₂O, 0.5 g MgSO₄.7H₂O, 0.2 g KCl, 0.2 g CaCl₂, 0.045 g K₂HPO₄, 2.45 g tris, 1.89 mg EDTA.2Na, 0.087 mg ZnSO₄.7H₂O, 0.61 mg H₃BO₃, 0.015 mg CoCl₂.6H₂O, 0.06 mg CuSO₄.5H₂O, 0.23 mg MnCl₂, 0.38 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 3.64 mg Fe(III).EDTA bulunan NORO ortamı kullanılmış ve pH 8'e ayarlanmıştır. 20 ml deney tüplerinde bulunan kültürler 100 ml'lik erlenlere inoküle edildikten sonra 680 nm'de optik yoğunluğu 0.05 olarak ölçülmüştür. Kültür sıcaklığı 28 °C' ye, ışık yoğunluğu ise 65 µmol s-1m-2 ayarlanmıştır. Denemenin sonunda 1.0 M NaCl bulunan kültürden hasat edilen hücrelerde hücre içi lipit % 67 ve triasilgliserol miktarı % 56 olarak bulunmuştur. 0.5 M NaCl içeren kültürde ise hücre içi lipit miktarı % 60 ve triasilgliserol miktarı % 40 olarak saptanmıştır. Ayrıca NaCl konsantrasyonu

1.0 M' dan 2.0 M' a yükseltildiğinde hücre konsantrasyonunun düştüğü gözlenmiştir (Takagi et al., 2005).

Dunaliella salina 0.05-5 M tuzluluğa, 1-9 pH'a, 10-30°C sıcaklığa tolerans gösterebilirler (Gimmler and Weis, 1992; Santin-Montanya, 2007). Işık toleransı ile ilgili yapılan çalışmada ise 10-1000 $\mu\text{E.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğuna tolerans gösterdikleri tespit edilmiştir (Aizawa and Miyachi, 1992; Santin-Montanya, 2007). Yapılan diğer bir çalışmada azot ve ışık yoğunluğunun *Dunaliella salina*'nın lipit üretimine etkisi çalışılmıştır. Çalışma için iki farklı ışık şiddeti ve iki farklı azot miktarı kullanılmıştır. İki erlen 24 saat 800 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlatmaya diğer iki erlen ise yine 24 saat 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlatmaya uygulanmıştır. Yüksek ışıktaki denemeye 20 mM NO_3^- lık ve 2 mM NO_3^- 'luk azot konsantrasyonu ile başlanmıştır. Aynı şekilde düşük ışıktaki denemede de içinde 20 mM NO_3^- lık ve 2 mM NO_3^- lık besin ortamı kullanılmıştır. Ortam sıcaklığı 28 °C' ye, pH 8.1' e ve tuzluluk 1.0 M' a ayarlanmıştır. 13 gün süren denemelerde biyomas gelişimi hem yüksek hem de düşük ışıktaki 2 mM NO_3^- bulunan kültürlerde yavaş olmuştur. 20 mM NO_3^- içeren kültürlerde ise yüksek ışıktaki gelişim düşük ışığa göre daha yüksek bulunmuştur. Lipit üretimi incelendiğinde ise maksimum üretimin düşük azot konsantrasyonunun da ve yüksek ışıktaki gerçekleştiği gözlenmiştir (Share et al., 2009).

2.1. Mikroalg Üretimi

2.1.1. Alglerin İzolasyonu

Üretimi yapılacak olan alg türlerinin saf olması kültürün devamlılığı açısından önemlidir. Saf üretim için türün izolasyonu gerekir. İzolasyon için ilk işlem, laboratuvar ya da doğadan alınan karışık örnekler içeren süspansiyonun, izole edilecek türün boyutuna göre filtrelenmesidir. Filtrasyon işlemi ile istenmeyen, daha büyük boyuttaki türlerin ayrılması ve uzaklaştırılması sağlanır. Daha sonra seri dilüsyonlar yapılarak ve son dilüsyondan alınan örnekler mikroskopta incelenerek ekim yapılır. Birkaç gün üremesi için beklenen alglerde karışık tür var ise, %15 agar içeren besin ortamı hazırlanır ve agar'a ekim yapılır. Burada iki hafta kadar tutulan alglerden örnek alınıp mikroskopta incelenir.

İstenen alg türü katı agar ortamından öze yardımı ile alınarak sıvı besin ortamına ekilir (Anderson, 2005). Her alg türü, en ideal gelişimini kendine özgü spesifik koşulların sağlandığı kültür ortamlarında gösterir. Bu nedenle yoğun kültüre alınacak algin optimum koşulları ve üreyebileceği besin ortamı hazırlanır.

2.1.2. Mikroalgal Biyomas Üretimi

Mikroalgal biyoması üretmek karasal bitkilere oranla genellikle daha pahalı bir işlemdir. Fotosentetik gelişme için ışığa, karbondioksite, suya ve inorganik tuzlara ihtiyaç duyulur. Gelişme ortamı algal hücrelerin bünyesinde bulunan azot ve fosfor gibi inorganik elementler içermelidir. Mikroalgal biyomasın minimum besin ihtiyacı $CO_0.48H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01}$ moleküler formülü kullanılarak hesaplanmaktadır (Grobbelaar, 2004).

2.1.3. Mikroalg Yetiştiriciliğinde Kültür Koşulları

2.1.3.1. Fiziksel Koşullar

Alg üretimindeki önemli faktörler; besin maddelerinin miktarı ve kalitesi, aydınlatma sıcaklık, pH, tuzluluk, havalandırma ve oksijen seviyesidir.

2.1.3.2. Aydınlatma

Bitkilerde olduğu gibi, alglerde de fotosentez yaparak inorganik maddelerden organik madde üretmektedirler. Bu reaksiyonlar için enerji kaynağı ışıktır. Işık; yoğunluğuna, şiddetine, spektrum kalitesine ve aydınlatma süresine göre değişiklik göstermektedir. Işık yoğunluğu, kültürün derinliğine ve alg konsantrasyonuna bağlı olarak ayarlanması gereken bir değişkendir.

Kullanılacak ışık kaynağı doğal olarak bulunabileceği gibi, florasan lambalar gibi yapay olabilir. Aşırı ışık yoğunluğunda fotorespirasyona (ışık etkisiyle yapılan hızlandırılmış solunum çeşidi) yol açacağından kaçınılması gereklidir. Aşırı aydınlatmadan kaçınılacağı gibi, ışık kaynağının ortamı ısıtmasından da kaçınılmalıdır. Bu sebeple, ışık kaynağı olarak florasan tüplerin kullanılması uygundur. Florasan tüpleri, fotosentezin en fazla yapıldığı hem

kırmızı hemde mavi spektrumlarla desteklenmekte, hem de ortamı ısıtmamaktadır. Aydınlatma süresi genellikle en az 18 saat olmalıdır. Işık şiddetini ölçmek için kuantum sensörlü kuantummetre kullanılmaktadır (Sukatar A, 2002).

2.1.3.3. Sıcaklık

Fitoplankton kültürleri için optimum sıcaklık genellikle 20-24 °C arasındadır. Fakat bu kültürlerdeki besin ortamına, türe ve kültüre alınan suş'a göre değişmektedir. Kültüre alına alglerin çoğu 16-27°C arasındaki sıcaklığa tolere edebilmektedir. 16°C 'den düşük sıcaklıklar büyümeyi yavaşlatırken, 35°C 'den yüksek sıcaklıklar genellikle öldürücü etki göstermektedir (Sukatar A, 2002).

2.1.3.4. pH

Birçok alg türü için ideal pH sınırları 7 ile 9 arasında kalmakta, optimum olarak 8.2-8.7 arasında değişmektedir. Kültürdeki ölümler aşırı olduğunda, serbest kalan hücre içerdiklerinden dolayı pH aşırı düşmektedir. Bu sebeple, yoğun kültürlerdeki kültüre karbondioksit ilavesiyle pH değeri arttırılmalıdır (Sukatar A, 2002).

2.1.3.5. Tuzluluk

Denizsel fitoplankton tuzluluk değişimlerine son derece toleranslıdır. Çoğu tür, doğal ortamdaki tuzluluk derecesinden daha düşük tuzluluklarda daha iyi büyümektedir. Çoğu tür için 20-24 g/L arasındaki tuzluluk aralığını tercih etmektedir (Sukatar A, 2002).

2.1.3.6. Havalandırma

Karıştırma, alg büyüme evresini arttırdığı, biyomasın çökmesini engellediği, alglerin besin maddelerinden eşit olarak yararlanmasını sağladığı, yoğun kültürlerde bütün bireylerin ışığı etkin olarak kullanmasını sağladığı, ortamda sıcaklık katmanlaşmasını engellediği ve tank ile hava arasındaki gaz alışverişini tetiklediği için gerekli bir süreçtir.

Özellikle gaz alış verişi, fotosentez için gerekli karbon kaynağının sağlanması açısından önemlidir. Bununla birlikte, aşırı yoğun kültüre araçlarla verilecek hava, yeterli karbon içermeyeceğinden, havayla birlikte karbondioksitinde verilmesi tavsiye edilmektedir. Karbondioksit fotosentez için kaynağı olmasının yanı sıra, $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ dengesi nedeniyle suyun pH değişimlerini engelleyecek tampon etkisi göstermesi de önemli bir avantajdır. Kültür sisteminin büyüklüğüne bağlı olarak, erlenlerdeki ve tüplerdeki kültürler elle günde bir kez, tank kültürleri havalandırmayla ve havuzlar jet pompaları ve değirmen sistemleri ile karıştırılmalıdır. Ancak, her kültüre alına tür, bu karıştırmayı tolere etmemektedir (Sukatar A, 2002).

2.1.3.7. Oksijen seviyesi

Sudaki çözülmüş oksijen miktarı her saat başı ölçülmelidir. Bunun için biyolojik oksijen monitörü kullanılabilir. Kültürdeki oksijen miktarı, oksijen doygunluğunun % 150'sini geçmemelidir, aksi takdirde kültürdeki algler zarar görmektedir. Bu oranı azaltmak için, aydınlatmanın azaltılması gerekebilir (Sukatar A, 2002).

3. MATERYAL VE METHOD

3.1. Materyal

3.1.1. *Chlorella ellipsoidea* Gerneck, (1907)

1890-1893 yıllarında ilk saf Alg kültürü, Hollandalı bilim adamı M.W. Beijerinck tarafından *Chlorella* mikroalginin izolasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Denemelerde materyal olarak seçilen *Chlorella ellipsoidea*'nın laboratuvarındaki kültürü (Bkz. Şekil 3.1).’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *Chlorella ellipsoidea*, Gerneck deneme grupları (Orijinal)

Algin sistematığı ve biyolojisi

Bölüm: *Chlorophyta*

Sınıf: *Chlorophyceae*

Takım: *Chlorococcales*

Aile: *Oocystaceae*

Cins: *Chlorella*

Tür: *Chlorella ellipsoidea*

Yeşil alglerden olan *Chlorella* (Chlorophyceae) tek hücreli mikroorganizmalardandır. Bu cinsteki türler küre veya elips şeklinde olup büyüklükleri 2-4 µm'dir. *Chlorella* deniz, tatlı su, toprak gibi çok geniş yayılım alanları vardır. Hatta *Hydra viridis* gibi tatlı su omurgasızlarının hücrelerinde endosimbiont olarak yaşarlar. Kloroplastları perietaldır ve bazılarında tek prenoit bulunur. Aseksüel üreme dört otosporla olur. Seksüel üremesi ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. *Chlorella sorokiniana*, *C. vulgaris*, *C. kesleri* gibi bazı türlerinin hücre duvarları glukozaminden oluşurken *C. saccharophila*, *C. luteoviridis* gibi türlerin hücre duvarları ise glukoz ve mannondan meydana gelmiştir (Takeda, 1991; Graham and Wilcox 2000). *Chlorella* türleri içinde en yaygın olarak üretilen, günde 40 kat çoğalma özelliğine sahip olan *Chlorella pyrenoidosa*'dır. Bu türün ayrıca mikroalgal biyoteknolojide önemli bir yere sahip olmasının nedenlerinden biri de ilk defa yoğun kültürlerde ve ticari üretim amacıyla kullanılmış olmasıdır (Cirik 2005). *Chlorella* üretim tesisi Dünya'da ilk defa Tayvan'da 1964 yılında kurulmuştur. Daha sonraki yıllarda *Chlorella* ticari ölçekte üretilmeye başlanmış ve Tayvan'da 10 sene içinde bu çiftliklerin sayısı 30'a yükselmiştir. *Chlorella* türleri kolay üretilbildiği ve hızlı geliştiği için normal gelişme şartları altında kuru ağırlığının %14-30'u lipit, %50-70 oranında protein, %3-18 arasında karbonhidrat içermektedir (Illman et al., 2000; Spolaore et al., 2006). Ayrıca hücre yenilenme hızını artırır, kan şekerini dengeler, karaciğeri korur, mide rahatsızlıkları ve bazı deri hastalıklarının tedavisinde etkili olur, bağırsakların hızlı ve düzenli çalışmasını sağlar, çocukların gelişiminde de olumlu etkileri vardır (Cirik 2005).

3.1.2. *Dunaliella bardawil* Teodoresco, (1905)

Dunaliella bardawil ilk defa Vitasen Gölü'nden Teodoresco (1905) tarafından izole edilmiştir. Denemelerde materyal olarak kullanılan *Dunaliella bardawil*'in laboratuardaki kültürü (Bkz. Şekil 3.2)'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. *Dunaliella bardawil* Teodoresco, deneme grupları (Orijinal)

Algin sistematığı ve biyolojisi

Bölüm: *Chlorophyta*

Sınıf: *Chlorophyceae*

Takım: *Volvocales*

Aile: *Dunaliellaceae*

Cins: *Dunaliella*

Tür: *Dunaliella bardawil*

Dunaliella 1–10 µm genişliğinde iki flagellaya sahip, hücreler 5-20 µm uzunluğunda ovoid yapılı olup yeşil algerin *Volvocales* ordosunun bir cinsidir. Hücrelerde eşit uzunlukta iki uzun kamçı ve hücre hacminin yaklaşık yarısını kaplayan küp şekilli kloroplast mevcuttur. *Dunaliella* türlerinde sert hücre duvarları bulunmamasına karşın (Gibbs and Duffus, 1976 ; Santin-Montanya, 2007). 25-200 nm uzunluğundaki fibrillerden oluşan selülozik glukoprotein tarafından hücre sarılmıştır (Gibbs and Duffus, 1976; Oliveira et al., 1980; Santin-Montanya, 2007). Bu durum hücre şeklinin değişmesinde ve osmotik değişimlere uymada bir avantaj sağlamaktadır. Böylece bu türün genelde yaşamını

sürdüğü tuzlalarda, hücre dışı osmotik basınca karşı hücre içindeki gliserol konsantrasyonunu arttırarak osmoregülasyon sağlanmaktadır. *Dunaliella tertiolecta* hücreleri büyük miktarda lipit içerirler ve yüksek tuzluluğa toleransları olduğundan dış havuzlarda büyük miktarlarda üretilme kapasiteleri vardır (Takagi and et al., 2005). *Dunaliella* türleri tuzlu lagünlerde β -karoten üretimi için ticari olarak büyük çapta üretilmektedir. (Ben-Amotz, 1999; Garcia-Gonzalez and et al., 2000; Santin-Montanya, 2007).

Dunaliella'nın kuru ağırlığının yaklaşık % 40'ı gliseroldür ve 16 g gliserol m⁻² gün⁻¹ gibi yüksek bir ürün alınabilir. Üretiminde ışık yoğunluğu ve süresinin artması yanında nütrient eksikliği veya yüksek tuz konsantrasyonu gibi çeşitli stres şartları büyümeyi sınırlamakta, β -karotenin artmasına neden olmaktadır. Böylece algin rengi yeşilden koyu turuncuya döner. β -karoten serbest radikallerin süpürülmesinde, hücreyi zararlı ışınlarla karşı korumada, bağışıklığın düzenlenmesinde ve özellikle potansiyel bir antioksidant olarak kanserin önlenmesinde önemli role sahip bir pigmenttir. Gıda sektöründe β -karoten besinlerin renklendirilmesinde ve meyve sularının renklerinin korunmasında kullanılmaktadır. Ayrıca, salmon, alabalık, kabuklu deniz ürünlerinin ve kümes hayvanlarının etlerinin renklendirilmesi amacıyla yemlere de karıştırılmaktadır (Cirik 2005).

3.2. Metod

Bu çalışmada kullanılan *Chlorella ellipsoidea* (B20 UTEX), *Dunaliella bardawil* (LB2538 UTEX) mikroalg türleri kullanılmış olup, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Urla Yerleşkesinde bulunan alg kültür odasındaki stok kültür dolabından temin edilmiştir. Mikroalglerin besin içerikleri Özdamar (1997)'ye göre Student -T testi uygulanarak karşılaştırılmış ve $p \leq 0.05$ değerleri istatistiksel yönden farklı olarak kabul edilmiştir.

3.2.1. *Chlorella ellipsoidea* Kültürü

3.2.1.1. *Chlorella ellipsoidea* Katı Agar Ortamından Sıvı Besin Ortamına Ekimi

Kültür koleksiyonunda *Chlorella ellipsoidea* katı agar ortamında bulunmaktadır (Bkz. Şekil 3.3). Bu nedenle farklı besin ortamlarındaki denemelerine başlamadan önce *Chlorella ellipsoidea*'nın katı agar ortamından sıvı besin ortamına ekimi yapılmıştır. 8 mL sıvı besin ortamı bulunan 10 ml'lik deney tüplerine ekilen algler üremeleri için iki hafta boyunca kültüre alınmıştır. İki haftalık üretim periyodu boyunca algler günde bir defa karıştırılan dibe çökmesi engellenmiştir. Üretim periyodunun sonunda algler çöktürülmüş ve üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. İz miktarda besin ortamı içeren algler, biyomas artışlarının ve elde edilen biyomas ile lipid, karbonhidrat, protein, toplam su miktarı, nem miktarı, kül miktarı gibi biyokimyasal analizlerin yapılacağı özel deneme ortamlarına ekilmiştir.



Şekil 3.3. Kültür dolabı

3.2.1.2. *Chlorella ellipsoidea* İçin Uygulanan Deneme Ortamları

Yapılan denemede F/2 ortamı ve Proteose ortamı (Bkz. Çizelge 3.1) hazırlanmış ve 25 °C denemeler yapılmıştır. Besin ortamları öncelikle 6 adet 1 L'lik erlenmayere aktarılmış, erlenlerin ağzı pamukla tıkanmış ve pamukların üstü alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Daha sonra içinde 800 mL'lik besin ortamı bulunan erlenler sterilizasyon için 121 °C ve 1 atmosfer buhar basıncında 15 dakika steril edilmiştir. (Bkz. Şekil 3.4) Otoklavdan ıkarılan besin ortamları inokülasyondan önce, ekim yapılacak algler ile sıcaklığının eşitlenmesi için 24 saat laboratuarda bekletilmıştir.

Çizelge 3.1. *Chlorella ellipsoidea* için kullanılan F/2 ve Proteose ortamı

F/2 solüsyonu Ortamı	
Bileşik	Miktar (g)
NaNO₃	7 g
Na₂HPO₄·7H₂O	5 g
FeCl₃·6H₂O	3,15 g
Na₂EDTA	4,35 g
Iz element solüsyonu	10 ml
Vitamin solüsyonu	0,1 ml
Tatlı su	1000ml
F/2 iz element solusyonu	
MnSO₄·H₂O	18 g
CoCl₂·6H₂O	1 g
CuSO₄·5H₂O	1 g
ZnSO₄·7H₂O	2,2 g
NaMoO₄·2H₂O	0,6 g
Saf su	1000 ml
F/2 Vitamin solüsyonu	

Thiamin	2 g
B₁₂	0,1 g
Biotin	0,1 g
Saf su	1000 ml

Proteose Medium		
Stok Solüsyon	g/400 ml dH₂O	ml
NaNO₃	10	10
CaCl₂.2H₂O	1	10
MgSO₄.7H₂O	3	10
K₂HPO₄	3	10
KH₂PO₄	7	10
NaCl	1	10
Proteose Peptone	1 g/	



Şekil 3.4. Otoklav

3.2.1.3. F/2 Ortamı ile Deneme yapılan *Chlorella ellipsoidea*

Sıcaklık eşitlemesi tamamlanan, her biri 800 mL besin ortamı içeren 3 adet erlene, daha önce katı agar ortamından sıvı besin ortamına alınan algler inoküle edilmiş, deneme grupları (1.1, 1.2, 1.3) ve ekimi tamamlanan erlenler 25 °C'ye ayarlanan laboratuara yerleştirilmiştir. 10 gün boyunca kültürü yapılan alglerin günlük olarak optik yoğunlukları ve kuru ağırlıkları, hücre sayısı ölçülerek büyüme izlenmiştir. Ayrıca günlük olarak pH ve oksijen değerleri de ölçülmüştür. Kültür kaplarının havalandırılması için 2 ml'lik steril pipet kullanarak havalandırma sağlanmıştır. Sürekli florasan lambalarla aydınlatma yapılmış olup ışık şiddeti 1600 lux olarak ölçülmüştür (Bkz. Şekil 3.5).



Şekil 3.5. *Chlorella ellipsoidea* Proteose ve F/2 ortamı uygulanan deneme grupları (Orijinal)

3.2.1.4. Proteose Ortamı ile Deneme Yapılan *Chlorella ellipsoidea*

Birinci denemede olduğu gibi 800 ml'lik besin ortamı içeren 3 adet erlenlere ekim yapılmıştır. Deneme grupları (2.1, 2.2, 2.3) ve ekimi tamamlanan erlenler 25°C'ye ayarlanan laboratuara yerleştirilmiştir (Şekil 3.5). Günlük olarak günlük olarak pH ve oksijen değerleri ölçülmüştür. Kültür kaplarının havalandırılması için 2 ml'lik steril pipet kullanarak havalandırma sağlanmıştır. Sürekli florasan lambalarla aydınlatma yapılmış olup ışık şiddeti 1600 lux olarak ölçülmüştür (Bkz. Şekil 3.5).

3.2.2. *Dunaliella bardawil* Kültürü

3.2.2.1. *Dunaliella bardawil* Katı Agar Ortamından Sıvı Besin Ortamına Ekimi

Agar ortamında bulunan *Dunaliella bardawil* denemelere başlamadan önce sıvı besin ortamına ekilmiştir. 8 mL sıvı besin ortamı bulunan 10 ml' lik deney tüplerine ekilen algler üremeleri için iki hafta boyunca kültüre alınmıştır. İki haftalık üretim periyodu boyunca günde bir defa karıştırılan (Heidolph, reax top model, vorteks) (Bkz. Şekil 3.6) alglerin dibe çökmesi engellenmiştir. Üretim periyodunun ardından algler çöktürülmüş ve böylelikle daha önce kültüre alındıkları besin ortamlarından izole edilmiştir. İz miktarda besin ortamı içeren algler, biyomas artışlarının ve elde edilen biyomas ile lipid, karbonhidrat, protein, toplam su miktarı, nem miktarı, kül miktarı gibi biyokimyasal analizlerin yapılacağı özel deneme ortamlarına ekilmiştir.



Şekil 3.6. Vorteks

3.2.2.2. *Dunaliella bardawil* İçin Uygulanan Deneme Ortamları

Yapılan denemede 2XErdschreiber ortamı (Bkz. Çizelge 3.2) ve Modifiye Edilmiş Johnson ortamı (Bkz. Çizelge 3.3) hazırlanmış ve 21°C denemeler yapılmıştır. Besin ortamları öncelikle 6 adet 1 L'lik erlenmayere aktarılmış, erlenlerin ağzı pamukla tıkanmış ve pamukların üstü alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Daha sonra içinde 800 mL'lik besin ortamı bulunan erlenler sterilizasyon için 121 °C ve 1 atmosfer buhar basıncında 15 dakika otoklavda

tutulmuştur. Otoklavdan çıkarılan besin ortamları, ekim yapılacak algler ile sıcaklığının eşitlenmesi için 24 saat laboratuarda bekletilmiştir.

Çizelge 3.2. *Dunaliella bardawil* için kullanılan 2X Erdschreiber Ortamı

2XErdschreiber Ortamı		
Stok Solüsyon	g/L dH₂O	ml/3L
NaNO₃	59.5	10
Na₂HPO₄	0.83	10
P-IV metal Solüsyonu	36ml/3L	
Toprak Ektraktı	150/3L	
Vitmin B₁₂	3ml/3L	

P-IV metal Solüsyonu	
Bileşik	Miktar (g)
Na₂EDTA	7.5
FeCl₃.6H₂O	0.97
MnCl₂.4H₂O	0.41
ZnCl₂	0.05
CoCl₂.6H₂O	0.02
Na₂Mo₄.2H₂O	0.04
Tatlı su	1000 ml

Toprak ekstraktının hazırlanması

Bir kg ince bir şekilde elenmiş gübresiz bahçe toprağı 2 litre çeşme suyu ile birlikte bir saat kaynatılmış ve kaynatılan karışım toprağın içindeki minerallerin iyice çözünüp suya salınması için 121 °C, 1 atmosfer buhar basıncında, 60 dakika otoklavda tutulmuştur. Soğumaya bırakılan süspansiyon filtre kağıdı ile süzdürülmüştür. Süzdürme işleminden sonra geriye kalan çok ince çamur da santrifüjle çöktürülerek temizlenmiştir. (Cirik ve Gökpinar, 1999)

Çizelge 3.3. *Dunaliella bardawil* için kullanılan Modifiye Edilmiş Johnson Ortamı

MİKTAR	KİMYASAL MADDE	STOK ÇÖZELTİ
10 ml	NaNO ₃	150 g/L d H ₂ O
10 ml	KH ₂ PO ₄	150 g/L d H ₂ O
10 ml	KCl	20 g/L d H ₂ O
10 ml	CaCl ₂	150 g/L d H ₂ O
10 ml	NaHCO ₃	4,3 g/L d H ₂ O
10 ml	MgCl ₂	150 g/L d H ₂ O
1 ml	MJ demir solüsyonu	
1 ml	MJ iz metal solüsyonu	
MİKTAR	KİMYASAL MADDE	STOK ÇÖZELTİ
10 ml	NaNO ₃	150 g/L d H ₂ O
10 ml	KH ₂ PO ₄	150 g/L d H ₂ O
10 ml	KCl	20 g/L d H ₂ O
10 ml	CaCl ₂	150 g/L d H ₂ O
10 ml	NaHCO ₃	4,3 g/L d H ₂ O
10 ml	MgCl ₂	150 g/L d H ₂ O
1 ml	MJ demir solüsyonu	
1 ml	MJ iz metal solüsyonu	

MİKTAR	KİMYASAL MADDE
2,860g/l	H ₃ BO ₃
1,819 g/l	MnCl ₂ .4H ₂ O
0,222g/l	ZnSO ₄ .7H ₂ O
0,390 g/l	NaMoO ₄ .2H ₂ O
0,079 g/l	CuSO ₄ .5H ₂ O
49,400 mg/l	Co(NO ₃) ₃ .6H ₂ O
950 ml saf su	
Modifiye Edilmiş Johnson Ortamında kullanılan A5 İz Metal Solüsyonu	

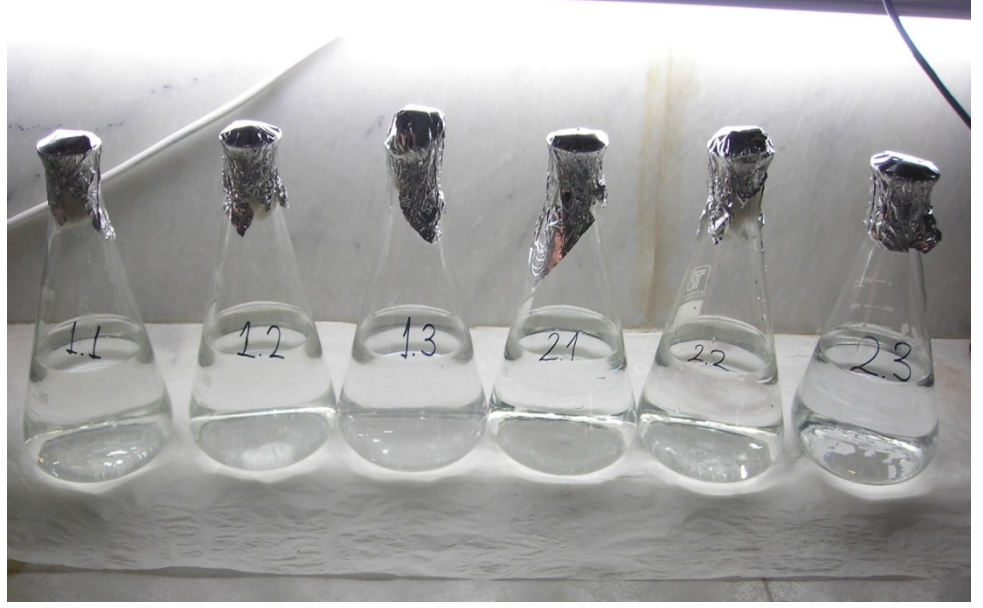
3.2.2.3. 2XErdschreiber ortamı ile Deneme yapılan *Dunaliella bardawil*

Sıcaklık eşitlemesi tamamlanan, her biri 800 mL besin ortamı içeren 3 adet erlene (Bkz. Şekil 3.7), deneme grupları (1.1, 1.2, 1.3) daha önce katı agar ortamından sıvı besin ortamına alınan algler inoküle edilmiş ve ekimi tamamlanan erlenler 21 °C'ye ayarlanan laboratuara yerleştirilmiştir. 12 gün boyunca kültürü yapılan alglerin günlük olarak optik yoğunlukları ve kuru ağırlıkları, hücre sayısı ölçülerek algal gelişim kaydedilmiştir. Ayrıca günlük olarak pH ve oksijen değerleri de ölçülmüştür. Kültür kaplarının havalandırılması için 2 ml'lik steril pipet kullanarak havalandırma sağlanmıştır. Sürekli florasana lambalarla aydınlatma yapılmış olup ışık şiddeti 1600 lux olarak ölçülmüştür.

3.2.2.4. Modifiye Edilmiş Johnson ortamı ile Deneme yapılan *Dunaliella bardawil*

Birinci denemede olduğu gibi 800 ml'lik besin ortamı içeren erlenlere (Bkz. Şekil 3.7) ekim yapılmış deneme grupları (2.1, 2.2, 2.3) ve ekimi tamamlanan

erlenler 21°C'ye ayarlanan laboratuara yerleştirilmiştir. 12 gün boyunca kültürü yapılan alglerin günlük olarak optik yoğunlukları ve kuru ağırlıkları, hücre sayısı ölçülerek algal gelişim kaydedilmiştir. Ayrıca günlük olarak pH ve oksijen değerleri de ölçülmüştür. Kültür kaplarının havalandırılması için 2 ml'lik steril pipet kullanarak havalandırma sağlanmıştır. Sürekli florasan lambalarla aydınlatma yapılmış olup ışık şiddeti 1600 lux olarak ölçülmüştür.



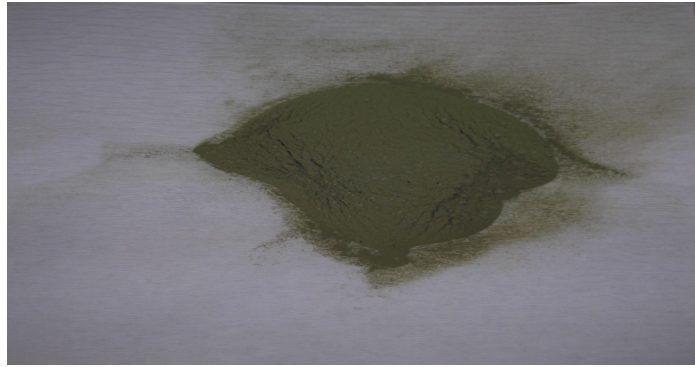
Şekil 3.7. *Dunaliella bardawil* 2XErdschreiber ve Modifiye Edilmiş Johnson ortamı uygulanan deneme grupları (Orijinal)

3.2.3. Alglerin Hasat İşlemi

Algal lipid üretiminin logaritmik büyüme evresi sonrasında gelen durgunluk evresinde olduğunu göstermiştir (Casadevall et al., 1985; McGinnis et al., 1997). Kültürlerde logaritmik evrenin bitimi ve duraklama evresinin izlenmesi, optik yoğunluk değerlerine göre yapılmıştır. *Chlorella ellipsoidea* ortalama 10-15 günde, *Dunaliella bardawil* ise 12-18 günde durgunluk fazına ulaşmıştır. Alglerin lipid, karbonhidrat, protein analizleri için, durgunluk fazına ulaşan algler üretim periyodunun sonunda TD 3 model santrifüj kullanılarak 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek hasat edilmiştir.

3.2.4. Alglerin Kurutulması ve Ağırlıklarının Ölçülmesi

Lipit analizleri için santrifüjlenen algler (*Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil*), önceden darası alınan petri kaplarına konulmuş ve 100 °C'ye ayarlanan Ecocell etüvde 12 saat boyunca kurutulmuştur (Lee et al., 1998). Kurutma işleminden sonra tekrar ağırlıkları ölçülmüş ve petri kabının darası çıkarılarak alglerin kuru ağırlıkları bulunmuştur. (Bkz. Şekil 3.8)



Şekil 3.8. Alglerin kurutulması (Orijinal)

3.3. Deneme Süresince Günlük Yapılan Analizler

3.3.1. Kuru Madde Analizi

Kuru madde miktarlarının saptanması için, günlük olarak her erlenden 0.5'şer mL mikroalg kültürü alınmıştır. Daha önce 105 °C'de 1 saat etüvde tutulmuş, desikatörde soğutulmuş ve darası alınmış 0.45 µ göz açıklığındaki Sartorius stedim MGA filtre kağıtlarından, süzme düzeneği ve bir su trombu kullanılarak oluşturulan vakum yardımıyla *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil* hücreleri ortamdan ayrılarak yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaştırılmış hücreler, distile su ile yıkanmıştır. 0.001 g duyarlı hassas terazide ağırlıkları alınmış petri kapları içerisinde belirli miktarlarda tartılarak, önceden 105 °C' ye ayarlanan etüvde 2 saat (Bkz. Şekil 3.9) tutulmuştur. Bu süre sonunda petri kapları bir desikatöre konularak, oda sıcaklığına kadar soğumaları sağlanmış ve daha sonra 0.001 g duyarlı terazide tartımları yapılmıştır. Örnekler yaş iken yapılan tartım sonucu elde edilen rakamdan, kurutulduktan sonraki tartım değeri

çıkarılarak kuru madde miktarı hesaplanmış ve % değerler elde edilmiştir (Vonshak., 1997).



Şekil 3.9. Kuru madde analizinde kullanılan filtre kağıtları (Orijinal)

3.3.2. Optik Yoğunluk

Chlorella ellipsoidea ve *Dunaliella bardawil* kültürlerinde denemeler boyunca, Optik yoğunluğu ölçmek için günlük olarak kültürler homojen olarak karıştırıldıktan sonra bir pipet yardımıyla 3 ml örnek alınmıştır (Bkz. Şekil 3.10). Tüplere alınan örnekler kuartz küvetlere konularak görünür spektrofotometre’de (Boeco, S-20) 680 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. (Liu et al., 2007)

3.3.3. Hücre Sayımı

Chlorella ellipsoidea kültürü için kullanılan Proteose ve F/2 ortamlarında laboratuvar ortamındaki denemeler 10 gün sürmüştür. *Dunaliella bardawil* kültürü için kullanılan 2XErdschreiber ve Modifiye edilmiş Johnson ortamlarında,

laboratuvar koşullarında yürütülen çalışma 12 gün devam etmiştir. Bu süre boyunca denemelerde günlük olarak hücre sayımı Neubauer sayma kamarası ile yapılmıştır (Bkz. Şekil 3.11).



Şekil 3.10. Spektrofotometre(Orijinal) Şekil 3.11. Neubauer sayma kamarası (Orijinal)

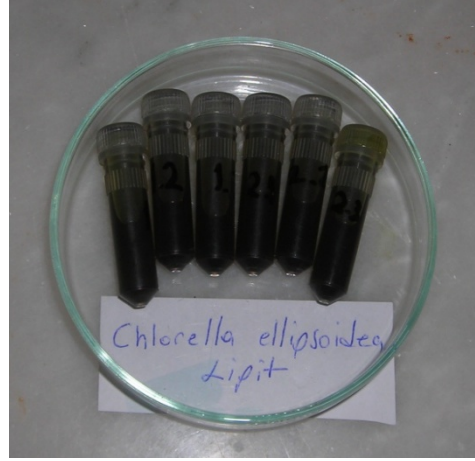
3.3.4. pH ve Oksijen Ölçümü

Chlorella ellipsoidea kültürü için kullanılan Proteose ve F/2 ortamlarında laboratuvar ortamındaki denemeler 10 gün sürmüştür. *Dunaliella bardawil* kültürü için kullanılan 2XErdschreiber ve Modifiye edilmiş Johnson ortamlarında, laboratuvar koşullarında yürütülen çalışma 12 gün devam etmiştir. Bu süre boyunca denemelerde günlük olarak pH (wtw, pH 3110) ve Oksijen (wtw Oxi,315 i) ölçümleri yapılmıştır.

3.4. Deneme Sonunda Yapılan Analizler

3.4.1 Alglerden Lipidin Ekstraksiyonu

Lipit ekstraksiyonu için kurutulan *Chlorella ellipsoidea* (Bkz. Şekil 3.12) ve *Dunaliella bardawil* (Bkz. Şekil 3.13), Bead-beater tüplerine konulmuştur. Bead-beater'da 4800 rpm'de 3 dakika çalıştırılarak alglerin parçalanması sağlanmıştır (Lee and et al., 1998). Buradan santrifüj tüplerine alınan alglerin üzerine yağ çözücü olarak hexan ilave edilmiş ve 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen karışım süzülerek alg posasından ayrılmıştır. Hexan ve lipit karışımının içinden, hexan 60 °C'ye ayarlanan etüvde uçurulmuş ve geriye kalan algal lipitler gravimetrik olarak ölçülmüştür.

Şekil 3.12. *C. ellipsoidea* Lipit (Orijinal)Şekil 3.13. *D. bardawil* Lipit (Orijinal)

3.4.2. *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil* örneklerinin Protein ve Karbonhidrat Analizleri için Hazırlanması

3'er adet yaklaşık 0,5 ml olacak şekilde alg hücrelerini santrifüj ile toplanır, üstteki sıvı kısmı uzaklaştırılır, alg hücrelerini içeren tüpler buz üzerine yerleştirildikten sonra üzerine soğutulmuş 10 ml Asit Solüsyonu (HClO_4) ilave edilir. Tüpler vorteks'de karıştırılır ve 15 dk 4 °C 'de buzdolabında bekletilir, santrifüj'den geçirildikten sonra üstte kalan sıvı kısmı uzaklaştırılır, aynı işlem 10 ml Asit solüsyonu ile bir kez daha tekrarlanır, asit ekstraksiyonu sonucu elde edilen peletin üzerine 10 ml kloroform-metanol solüsyonu (2:1, v/v) ilave edilir. Vorteksle karıştırdıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletilir, santrifüjlenir, üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırılır, yukarıdaki işlem 5 ml kloroform-metanol solüsyonu ile tekrarlandıktan sonra sıvı kısım uzaklaştırılır, 24 saat boyunca +4 °C' de buzdolabında kloroform-metanol'ün uzaklaştırılması için bekletilir. Pelet üzerine 1 ml tampon çözelti ilave ettikten sonra 10 dk kaynar su banyosunda bekletilir. Hazırlanan örnek protein ve karbonhidrat analizleri için kullanılır (modifiye edilmiştir), (AOAC 1975).

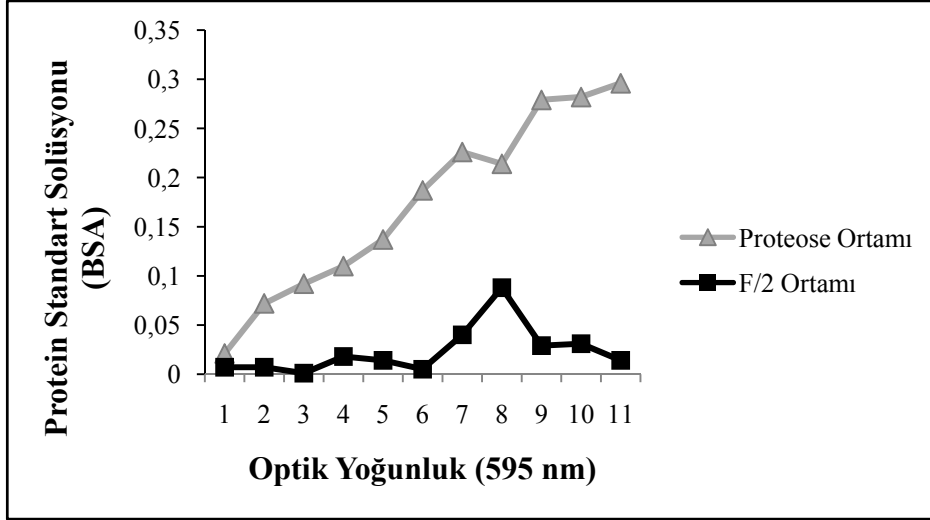
3.4.3. Protein Analizi

Toplam protein Bradford Dye-Binding Metot (Nielsen, 2010 a) göre yapılmıştır. Protein analizine başlamadan önce analiz için gerekli olan solüsyonlar hazırlanmıştır.

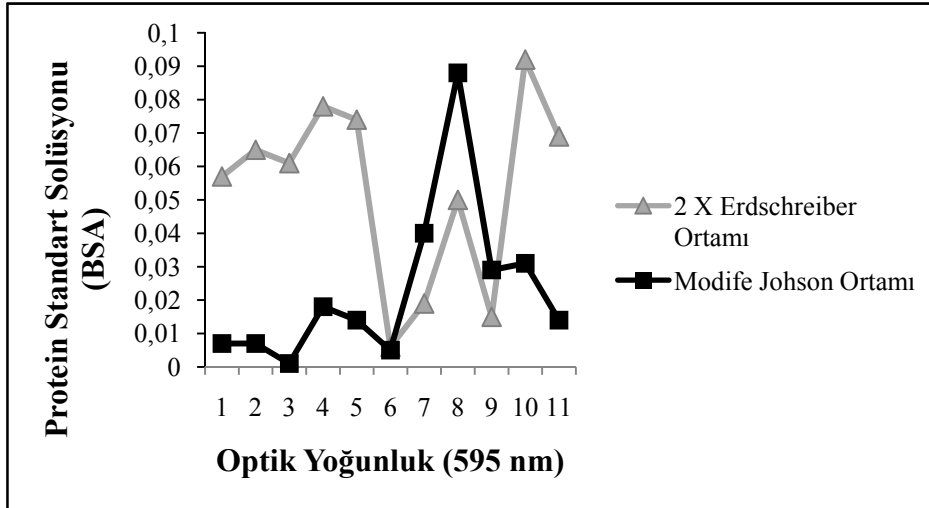
3.4.3.1. Solüsyonların Hazırlanması

Coomassive Brilliant Blue G-250 yi % 95 lik etanolde çözülür ve %85 lik Fosforik Asit ilave edilerek asitliği arttırılır. 1-100 mikrogram/ml olarak hazırlanan protein içeren örneklere ve Standart BSA (Bovine Serum Albumin) Solüsyonu üzerine Bradford Ajanı ilave edilir. Absorbanlar 595 nm de “ kör örnek ” karşısında okunur. *Chlorella ellipsoidea* (Bkz. Çizelge 3.4) ve *Dunaliella bardawil* (Bkz. Çizelge 3.5) örneklerinin protein konsantrasyonları BSA standart grafiğinden hesaplanır.

Çizelge 3.4. *Chlorella ellipsoidea* Proteose ortamı ve F/2 ortamı Protein Standart Solüsyonu



Çizelge 3.5. *Dunaliella bardawil* 2X Erdschreiber ortamı ve Modifiye edilmiş Johson ortamı Protein Standart Solüsyonu

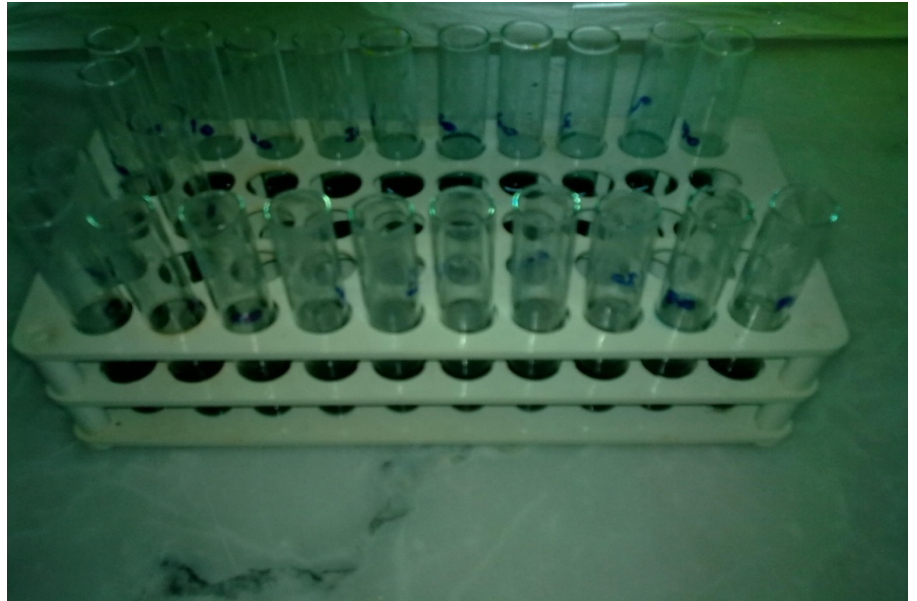


3.4.3.2. Protein Analizin Yapılışı

4°C de buzdolabında muhafaza edilen Protein Standart solüsyonunda 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alınarak test tüplerine yerleştirilir (Bkz. Şekil 3.14), tüm tüplerin hacimlerini Tampon Çözeltisi ile 0.1 mL'ye ayarlanır, *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil* protein örneğinden 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µL alarak ayrı test tüplerine yerleştirilerek içinde bilinmeyen proteinin çözünmüş olarak bulunduğu Tampon Çözeltisi ile hacimlerini 0,1 mL ye ayarlanır, 0,1 mL lik Tampon Çözeltisi blank veya "kör örnek" olarak ayrı bir tüpte hazırlanır, tüm tüplerin üzerine 5 ml protein ajanı eklendikten sonra vorteksle karıştırılır. Absorbansı 595 nm de "kör örnek" karşısında okunarak Protein Standart ağırlığıyla buna bağlı absorbans değerleri için standart grafiği oluşturduktan sonra bilinmeyen örneğin protein miktarı grafikten hesaplanır (Zor, T., and Selinger, Z . 1991), (modifiye edilmiştir).

3.4.4. Karbonhidrat Analizi

Toplam karbonhidrat analizi Fenol-Sülfürik Asit Metodu (Nielsen, 2010 b) göre yapılmıştır. Karbonhidrat analizine başlamadan önce analiz için gerekli olan solüsyonlar hazırlanmıştır.

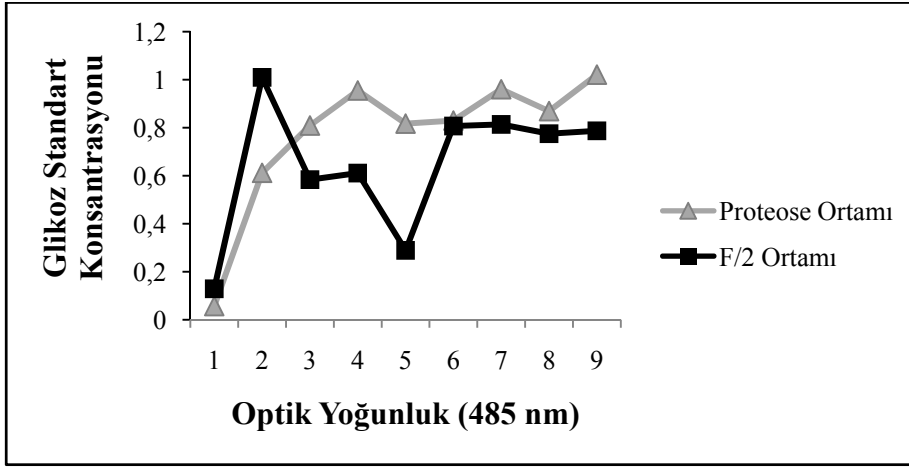


Şekil 3.14. Protein Analizinin Yapılışı (Orijinal)

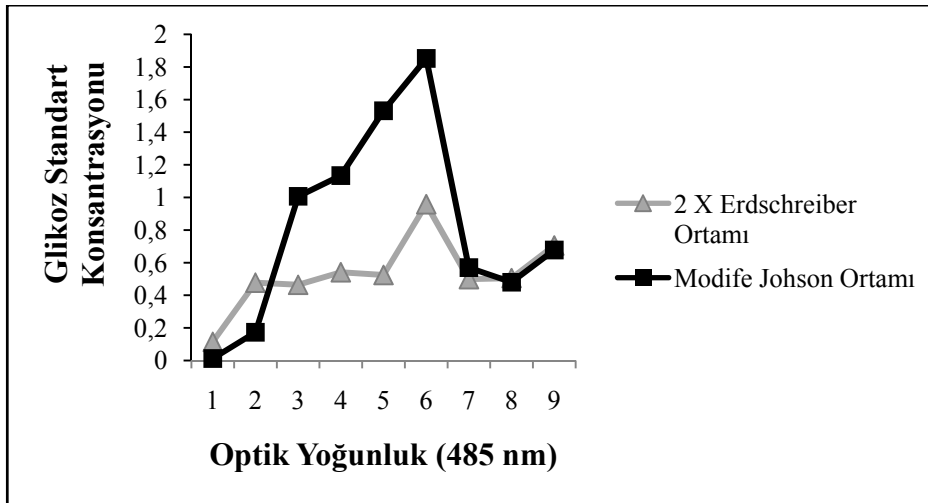
3.4.4.1. Solüsyonların Hazırlanması

Glikoz saf suda çözülerek Standart Çözelti hazırlanır. 1-140 mikrogram/ml olarak örnekler hazırlanır. Absorbanslar 485 nm de “kör örnek“ karşısında okunur. *Chlorella ellipsoidea* (Bkz. Çizelge 3.6) ve *Dunaliella bardawil* (Bkz. Çizelge 3.7) örneklerinin karbonhidrat konsantrasyonları Glikoz standart grafiğinden hesaplanır.

Çizelge 3.6. *Chlorella ellipsoidea* Proteose ortamı ve F/2 ortamı Glikoz Standart Konsantrasyonu.



Çizelge 3.7. *Dunaliella bardawil* 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye edilmiş Johson ortamı Glikoz Standart Konsantrasyonu



3.4.4.2. Karbonhidrat Analizin Yapılışı

Karbonhidrat Standart Solüsyonundan 0, 20, 30, 40, 70, 90, 120, 130 ve 140 µL arasında örnek alınarak test tüplerine yerleştirilir, (Bkz. Şekil 3.15) tüm tüplerin hacimleri Tampon çözelti ile 2 ml ye tamamlanır, *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil* örneğinden 0, 20, 40, 60, 100, 140 ve 160 µL alınarak ayrı test tüplerine yerleştirildikten sonra içinde bilinmeyen karbonhidratın çözünmüş olarak bulunduğu Tampon çözelti ile hacimleri 2 ml ye tamamlanır, 2 ml lik Tampon çözeltisi "kör örnek" olarak hazırlanır, tüm tüplerin üzerine 50 µL Fenol Solüsyonu ilave edildikten sonra her bir tüp için 2 dk vorteksle karıştırılır, 5 ml H₂SO₄ her bir tüpe eklenir. Absorbansı 485 nm "kör örnek" karşısında okunarak Karbonhidrat Standart Ağırlığıyla buna bağlı absorbans değerleri için Standart Grafiği oluşturduktan sonra bilinmeyen örneğin karbonhidrat miktarı grafiksel olarak hesaplanır (Bkz. Şekil 3.16). (Dubois , M., Gilles , K.A., Hamilton , J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956), (modifiye edilmiştir).

3.4.5. Toplam Su Miktarı Analizi

Toplam su miktarı tayini AOAC (1975) e göre yapılmış olup, sonuçlar (%) olarak verilecektir. Cam petri kapları 105°C lik etüvde 2-3 saat bekletilir, etüvden çıkarılan petri kapları 1-2 saat desikatörde soğutulduktan sonra tartılarak ilk ağırlık değerleri alınır, 5 g taze örnek (*Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil*) cam tüperin içinde santrifüjlenerek hasat edildikten sonra, toplanan algler ağırlığı bilinen petri kabının içine tartılır, 5 gr taze örnek, 65-70 °C de 8-10 saat süreyle etüvde bekletilir. Desikatörde soğutulduktan sonra petri ler tartılıp son ağırlık değerleri bulunur. Örnekteki su miktarı % olarak sunulmuştur.



Şekil 3.15. Karbonhidrat analizi (Orijinal)



Şekil 3.16. Karbonhidrat analizinin yapılışı

3.4.6. Nem Analizi

Nem tayini AOAC (1975)'e göre yapılmış olup, sonuçlar (%) olarak verilecektir. Cam petri kapları 105°C lik etüvde 2-3 saat bekletilir, etüvden çıkarılan petri kapları 1-2 saat desikatörde soğutulduktan sonra tartılarak ilk ağırlık değerleri alınır, 2-4 g (70°C) kurutulmuş ve öğütülmüş alg örneği, (*Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil*) ağırlığı bilinen petri kabında tartılır, petri kapları 105°C'de 8 saat süreyle etüvde kurutulur. Desikatöre alınan petri kapları soğutulur ve tartılır, sabit tartıma gelinceye kadar işlem tekrarlanmıştır. Örneklerin nem miktarları % olarak sunulmuştur.

3.4.7. İnorganik Madde Miktarı Analizi (Kül)

İnorganik madde tayini AOAC (1975)'e göre yapılmış olup, yüzde (%) olarak verilmiştir. 1-4 gr kuru (70°C) alg örneği, (*Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil*). Sabit tartıma getirilmiş porselen kroze içine tartılmıştır (Şekil 3.17) , 600°C de kül fırınının içinde 8 saat sürede kül haline getirilmiştir (Şekil 3.18) , Kül fırınından alınan porselen krezeler desikatöre alınmış olup,

soğutulduktan sonra tartılmıştır (Bkz. Şekil 3.19), Örneklerin inorganik madde miktarları (kül) % olarak sunulmuştur.



Şekil 3.17. Porselen kroze, Alg (Orijinal)



Şekil 3.18. Kül fırını (Orijinal)

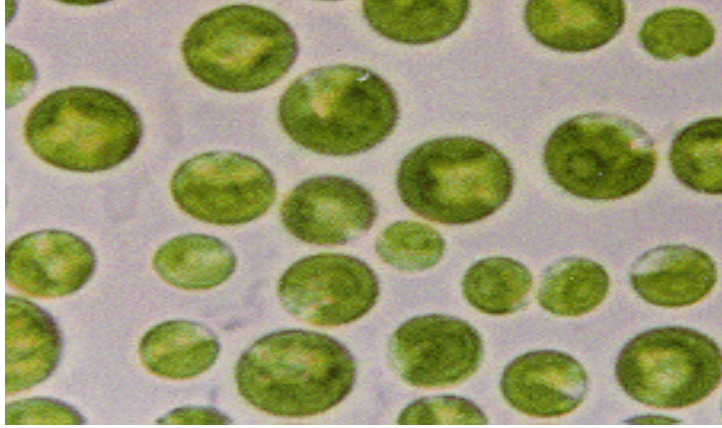


Şekil 3.19. Porselen kroze, kül (Orijinal)

4. BULGULAR

4.1. *Chlorella ellipsoidea*

Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Urla Yerleşkesinde bulunan Alg kültür Laboratuvarında *Chlorella ellipsoidea* (Bkz. Şekil 4.1) için Proteose ortamı ve F/2 ortamı kullanılmış çalışmada günlük olarak optik yoğunluk, kuru ağırlık, hücre sayısı ölçülmüştür. Sıcaklık 25°C de sabit tutulmuştur sürekli aydınlatma uygulanmıştır. Protein, karbonhidrat, lipit, nem, kül analizleri belirlenmiştir. Mikroalglerin besin içerikleri Özdamar (1997)'ye göre Student -T testi uygulanarak karşılaştırılmış ve $p \leq 0.05$ değerleri istatistiksel yönden farklı olarak kabul edilmiştir.

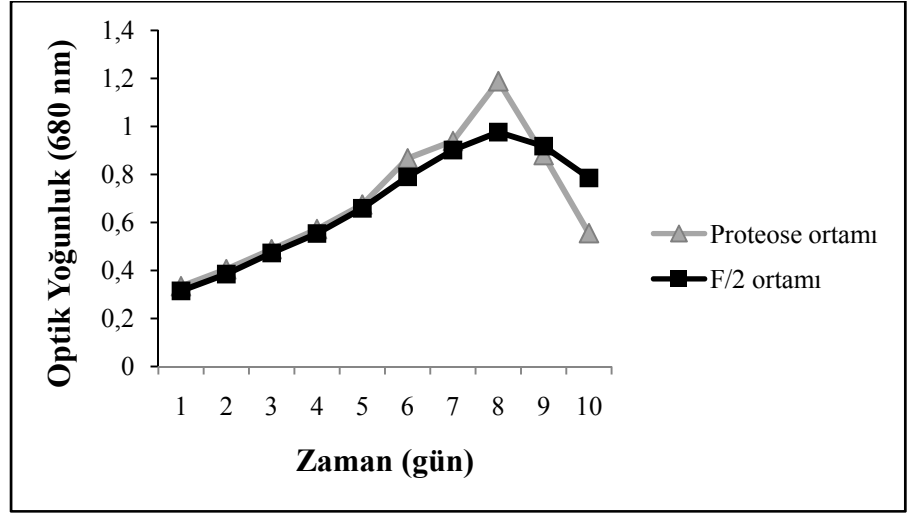


Şekil 4.1. *Chlorella ellipsoidea*

4.1.1. Optik Yoğunluk (OD)

Chlorella ellipsoidea kültürünün Proteose ortamı ve F/2 ortamı, günlük olarak ölçümleri (10 gün) yapılmıştır (Bkz. Çizelge 4.1). Elde edilen sonuçlar grafikte görüldüğü gibi Proteose ortamında en yüksek optik yoğunluğa ulaşılmıştır.

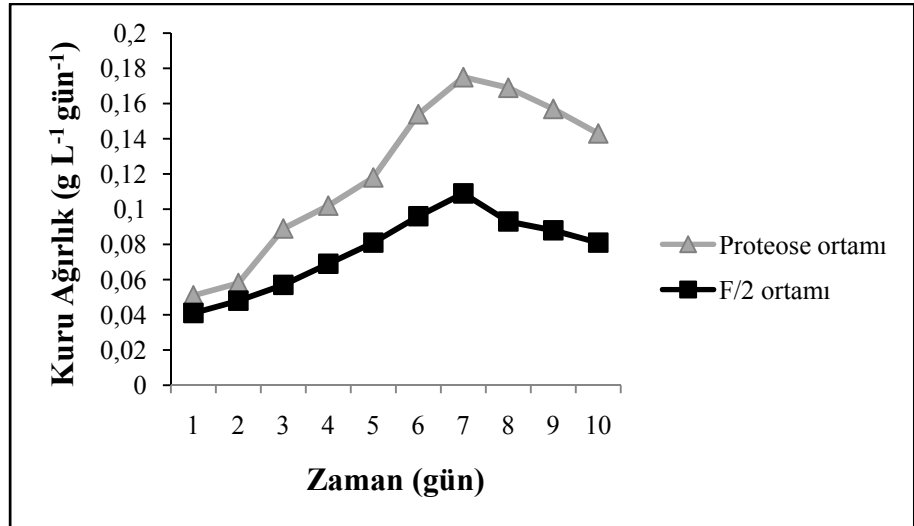
Çizelge 4.1. *Chlorella ellipsoidea* Proteose ortamı ve F/2 ortamı Optik Yoğunluk (OD)



4.1.2. Kuru Ağırlık

Chlorella ellipsoidea kültürünün Proteose ortamı ve F/2 ortamı, günlük olarak ölçümleri (10 gün) yapılmıştır. (Bkz. Çizelge 4.2) elde edilen sonuçlar grafikte görüldüğü gibi Proteose ortamında en yüksek kuru ağırlık miktarına ulaşılmıştır.

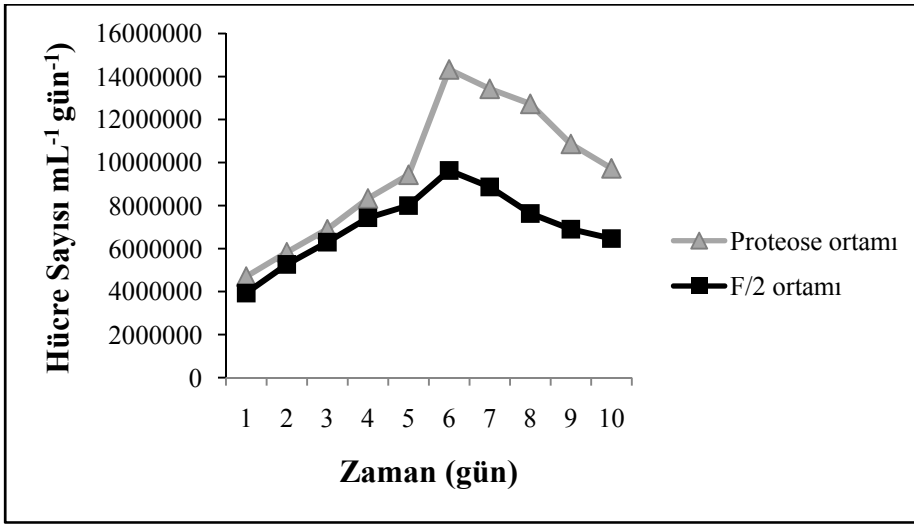
Çizelge 4.2. *Chlorella ellipsoidea* Proteose ortamı ve F/2 ortamı Kuru Ağırlık



4.1.3. Hücre Sayısı

Chlorella ellipsoidea kültürünün Proteose ortamı ve F/2 ortamı, günlük olarak ölçümleri (10 gün) yapılmıştır. (Bkz. Çizelge 4.3) elde edilen sonuçlar grafikte görüldüğü gibi Proteose ortamında en yüksek hücre sayısına ulaşılmıştır.

Çizelge 4.3. *Chlorella ellipsoidea* Proteose ortamı ve F/2 ortamı Hücre Sayısı

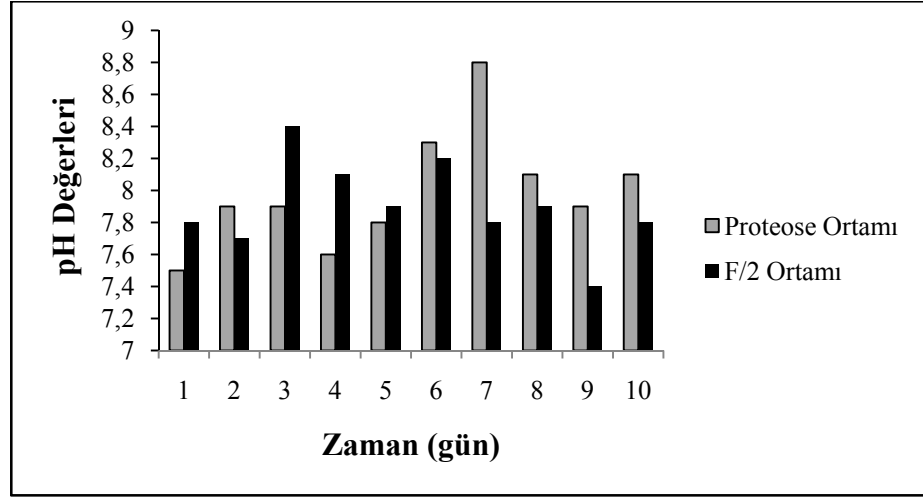
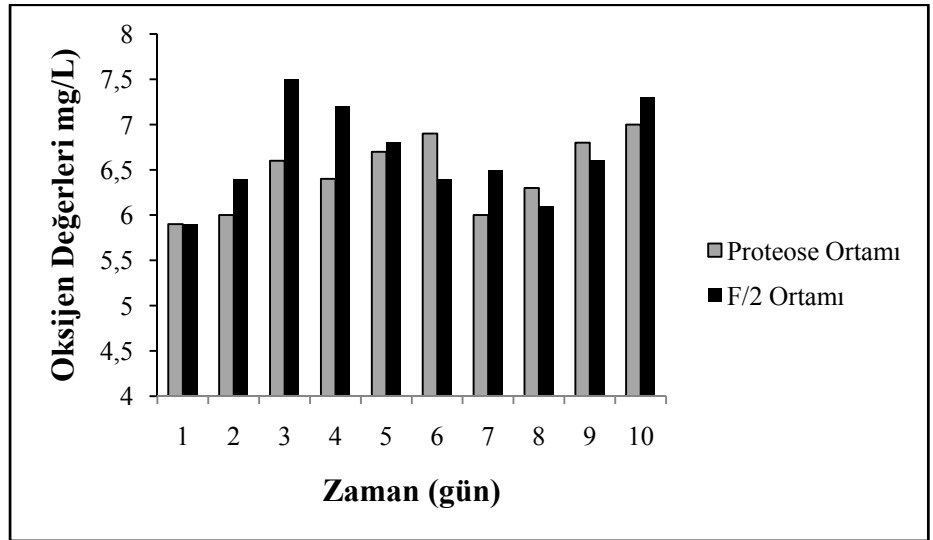


4.1.4. pH Değerleri

Chlorella ellipsoidea kültürünün Proteose ortamı ve F/2 ortamı, günlük olarak ölçümleri (10 gün) yapılmıştır. (Bkz. Çizelge 4.4) elde edilen sonuçlar grafikte görüldüğü gibi pH değerleri 7.3-8.7 arasında değişiklik göstermiştir.

4.1.5. Oksijen Değerleri

Chlorella ellipsoidea kültürünün Proteose ortamı ve F/2 ortamı, günlük olarak ölçümleri (10 gün) yapılmıştır. (Bkz. Çizelge 4.5) elde edilen sonuçlar grafikte görüldüğü gibi oksijen değerleri 5.9-7.4 arasında değişiklik göstermiştir.

Çizelge 4.4. *Chlorella ellipsoidea* Proteose ve F/2 ortamı pH Değerleri**Çizelge 4.5.** *Chlorella ellipsoidea* Proteose ve F/2 ortamı Oksijen Değerleri

4.1.6. *Chlorella ellipsoidea* kültürünün Biyokimyasal Kompozisyonu

Yapılan analizlerde lipit içeriği Proteose Ortamı % 20.4 ± 0.99 ve F/2 ortamı % 16.5 ± 2.16 olarak bulunmuştur. Lipit içeriğinde istatistiksel olarak önemli farklar olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$). Protein içeriği Proteose Ortamı grubunda % 56.6 ± 1.04 , F/2 ortamı grubunda ise % 47.1 ± 2.02 olarak belirlenmiş ve gruplara arasında istatistiksel yönden önemli derecede farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Karbonhidrat, toplam su, inorganik madde ve nem miktarları Proteose Ortamı ile ortamı için sırasıyla % 16.4 ± 1.71 , 1.89 ± 0.185 , 4.71 ± 0.201

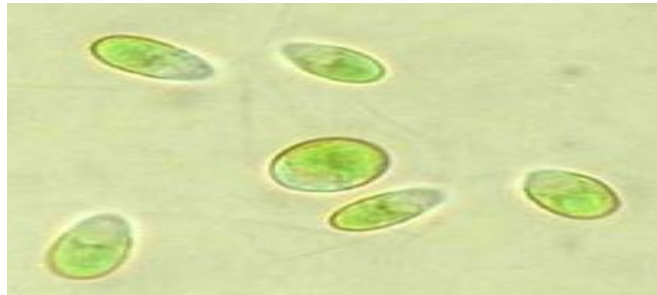
F/2 ortamı için % 15.9 ± 1.11 , 2.41 ± 0.368 , 18.9 ± 0.85 olarak belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.6). Değerlerin istatistiksel yönden önemli derecede farklılıkların olmadığı yapılan istatistik analizlerinin sonucunda belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.6. *Chlorella ellipsoidea*'nın Protein, Karbonhidrat, Lipit Değerleri (n=3). Aynı satırda Proteose Ortamı F/2 Ortamları arasında farklı küçük üssel işaretlerle ifade edilen değerler arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0.05$).

	Proteose ortamı	F/2 ortamı
Lipit(%)	20.4 ± 0.99^a	16.5 ± 2.16^a
Protein(%)	56.6 ± 1.04^a	47.1 ± 2.02^b
Karbonhidrat(%)	16.4 ± 1.71^a	15.9 ± 1.11^a
Toplam Su Miktarı(%)	1.89 ± 0.185^a	2.41 ± 0.368^a
İnorganik Madde Miktarı(%)	4.71 ± 0.201^a	18.9 ± 0.85^a
Nem Miktarı(%)	14.25 ± 1.56^b	27.93 ± 2.42^a

4.2. *Dunaliella bardawil*

Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Urla Yerleşkesinde bulunan Alg kültür Laboratuvarında *Dunaliella bardawil* (Bkz. Şekil 4.2.) 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye Edilmiş Johnson kullanılmış çalışmada günlük olarak optik yoğunluk, kuru ağırlık, hücre sayısı ölçülmüştür. Sıcaklık 21°C de sabit tutulmuştur sürekli aydınlatma uygulanmıştır. Protein, karbonhidrat, lipit, nem, kül analizleri belirlenmiştir.

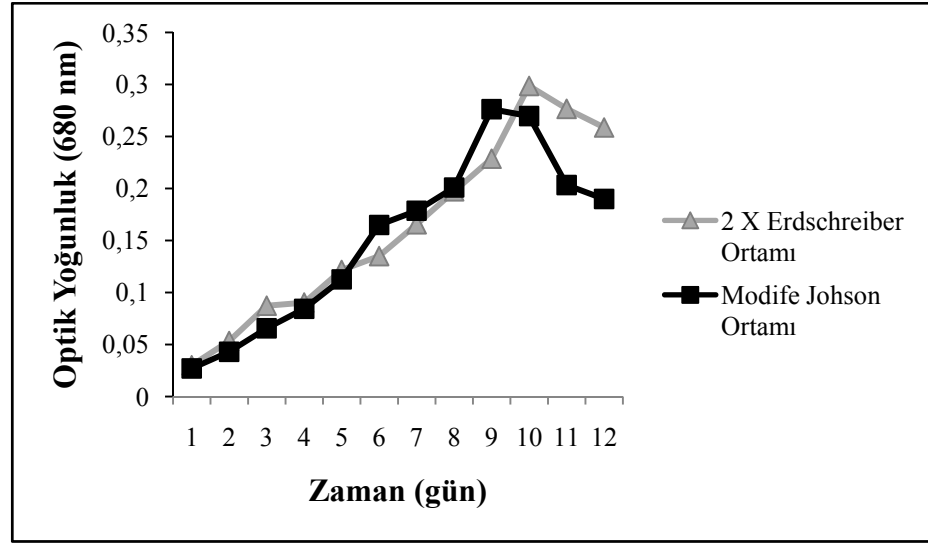


Şekil 4.2. *Dunaliella bardawil*

4.2.1. Optik Yoğunluk (OD)

Dunaliella bardawil kültürünün 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye Edilmiş Johnson, günlük olarak ölçümleri (12 gün) yapılmıştır. (Bkz. Çizelge 4.7) elde edilen sonuçlar grafikte görüldüğü gibi 2XErdschreiber ortamında en yüksek optik yoğunluğa ulaşılmıştır.

Çizelge 4.7. *Dunaliella bardawil* 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye Edilmiş Johnson Optik Yoğunluk (OD)



4.2.2. Kuru Ağırlık

Dunaliella bardawil kültürünün 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye Edilmiş Johnson ortamı, günlük olarak ölçümleri (12 gün) yapılmıştır. (Bkz. Çizelge 4.8) elde edilen sonuçlar grafikte görüldüğü gibi 2XErdschreiber ortamında en yüksek kuru ağırlık miktarına ulaşılmıştır.

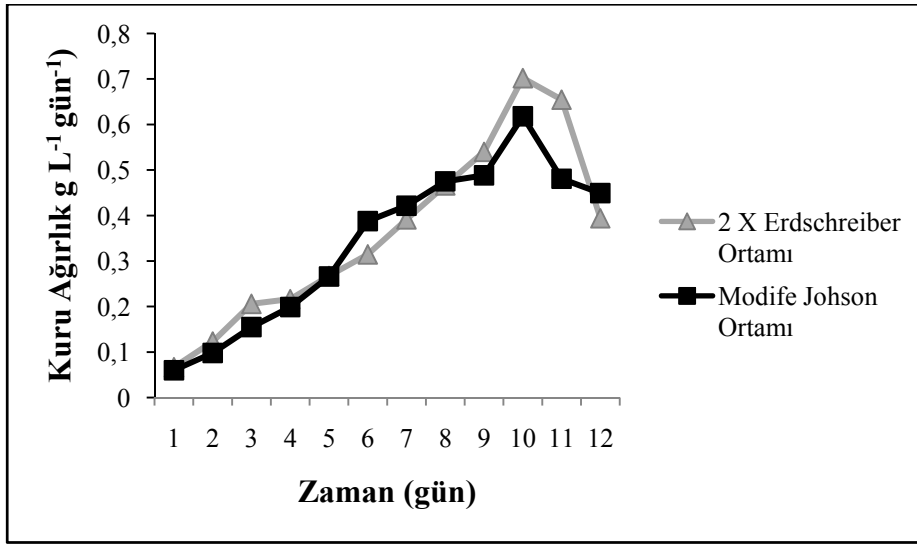
4.2.3. Hücre Sayısı

Dunaliella bardawil kültürünün 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye Edilmiş Johnson, günlük olarak ölçümleri (12 gün) yapılmıştır. (Bkz. Çizelge 4.9) elde edilen sonuçlar grafikte görüldüğü gibi Modifiye Edilmiş Johnson ortamında en yüksek hücre sayısına ulaşılmıştır.

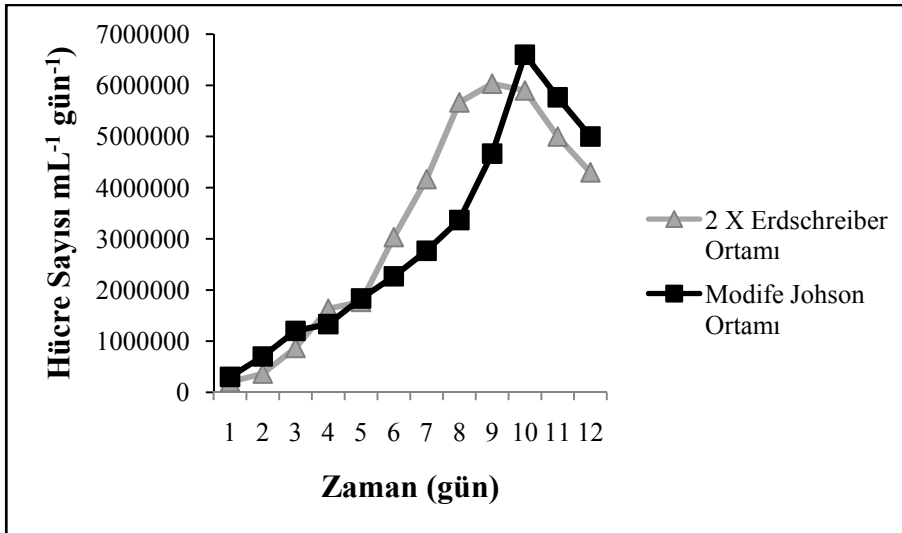
4.2.4. pH Değerleri

Dunaliella bardawil kültürünün 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye Edilmiş Johnson ortamı, günlük olarak ölçümleri (12 gün) yapılmıştır (Bkz. Çizelge 4.10). Elde edilen sonuçlar grafikte görüldüğü gibi pH değerleri 7.8-8.1 arasında değişiklik göstermiştir.

Çizelge 4.8. *Dunaliella bardawil* 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye Edilmiş Johnson Kuru Ağırlık



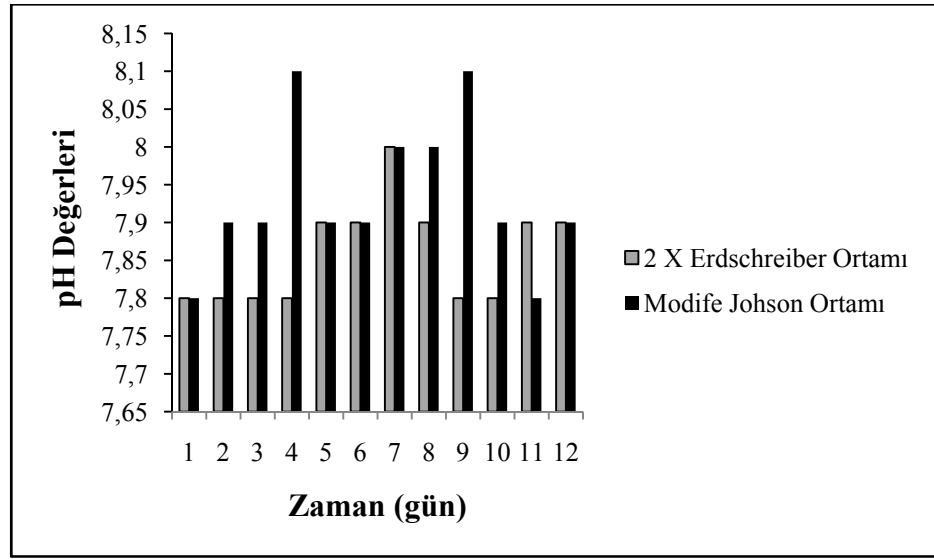
Çizelge 4.9. *Dunaliella bardawil* 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye Edilmiş Johnson Hücre Sayısı



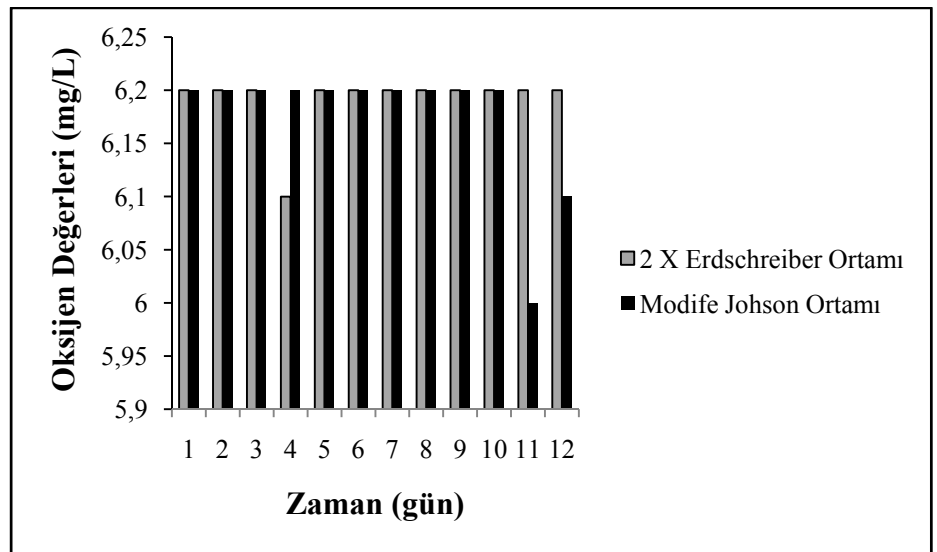
4.2.5. Oksijen Değerleri

Dunaliella bardawil kültürünün 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye Edilmiş Johnson, günlük olarak ölçümleri (12 gün) yapılmıştır (Bkz. Çizelge 4.11). Elde edilen sonuçlar grafikte görüldüğü gibi oksijen değerleri 6.0-6.2 arasında değişiklik göstermiştir.

Çizelge 4.10. *Dunaliella bardawil* 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye Edilmiş Johnson pH Değerleri



Çizelge 4.11. *Dunaliella bardawil* 2XErdschreiber ortamı ve Modifiye Edilmiş Johnson Oksijen Değerleri



4.2.6. *Dunaliella bardawil* kültürünün Biyokimyasal Kompozisyonu

Yapılan analizlerde lipit içeriği 2XErdschreiber Ortamında % 9.1 \pm 0.17 ve Modifiye Edilmiş Johnson Ortamında % 7.9 \pm 0.45 olarak bulunmuştur. Lipit içeriğinde istatistiksel olarak önemli farklar olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Protein içeriği 2XErdschreiber grubunda % 39.7 \pm 2.28, Modifiye Edilmiş Johnson grubunda ise % 30.2 \pm 2.67 olarak belirlenmiş ve gruplara arasında istatistiksel yönden önemli derecede farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Karbonhidrat, toplam su, inorganik madde ve nem miktarları 2XErdschreiber ile ortamı için sırasıyla % 22.8 \pm 2.51, 1.44 \pm 0.28, 26.96 \pm 1.35 ve 18.28 \pm 1.26, Modifiye Edilmiş Johnson ortamı için % 10.3 \pm 2.34, 0.56 \pm 0.08 ve 51.44 \pm 1.85 ve 34.9 \pm 2.15 olarak belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.12). Değerlerin istatistiksel yönden önemli derecede farklılıkların olduğu yapılan istatistik analizlerinin sonucunda belirlenmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 4.12. *Dunaliella bardawil*'in Protein, Karbonhidrat, Lipit Değerleri (n=3). Aynı satırda 2XErdschreiber ve Modifiye Edilmiş Johnson Ortamları arasında farklı küçük üssel işaretlerle ifade edilen değerler arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.05$).

	2XErdschreiber Ortamı	Modifiye Edilmiş Johnson Ortamı
Lipit(%)	9.1 \pm 0.17 ^a	7.9 \pm 0.45 ^a
Protein(%)	39.7 \pm 2.28 ^a	30.2 \pm 2.67 ^b
Karbonhidrat(%)	22.8 \pm 2.51 ^a	10.3 \pm 2.34 ^b
Toplam Su Miktarı(%)	1.44 \pm 0.28 ^a	0.56 \pm 0.08 ^b
İnorganik Madde Miktarı(%)	26.96 \pm 1.35 ^b	51.44 \pm 1.85 ^a
Nem Miktarı(%)	18.28 \pm 1.26 ^b	34.9 \pm 2.15 ^a

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada yeşil algler grubundan olan *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil*'in farklı ortamlarda yetiştiriciliği yapılmıştır. Elde edilen biyomas ile lipit, protein, karbonhidrat, toplam su, nem ve kül miktarlarını belirlemek amacıyla araştırmalar yürütülmüştür. Tez kapsamında *Chlorella ellipsoidea*'nın proteose ortamında ve F/2 ortamlarında laboratuvar koşullarında 25°C sıcaklıkta, 1600 lux ışık yoğunluğunda 10 gün boyunca yetiştiriciliği yapılmıştır. Günlük olarak optik yoğunluk, kuru ağırlık, hücre sayısı, pH ve oksijen ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre proteose ortamında yapılan denemelerde optik yoğunluk, kuru ağırlık, hücre sayısı F/2 ortamına göre yüksek bulunmuştur. PH ve oksijen değerleri iki ortam arasında benzerlik göstermiştir.

Takagi ve arkadaşları (2005), *Dunaliella bardawil*'in 1.5 M tuzlulukta lipit miktarının arttığını bildirmişlerdir. Denemeler bu nedenle 2 M tuzlulukta çalışılmıştır. Sukatar, (2002). Mikroalglerin 16-27°C arasındaki sıcaklığı tolere etmeleri nedeniyle *Chlorella ellipsoidea* için 25°C ve *Dunaliella bardawil* için 21°C sıcaklık uygulanmıştır. Fabregas ve Herrero, (1985), *Dunaliella salina*'nın protein oranını % 57, karbonhidrat oranını % 31 ve lipit oranını % 9 olarak belirlemişlerdir. Çalışmada lipit oranı benzerlik göstermiş, karbonhidrat ve protein oranı düşük bulunmuştur. Bothom ve Radledge (1979) besin ortamındaki azot kaynağına bağlı olarak lipit miktarının değiştiğini, azotun azalması ile birlikte glikozun lipit'e dönüştüğünü bildirmişlerdir. Çalışmada en yüksek lipit içeriğinin *Chlorella ellipsoidea* için proteose ortamında % 20.4 ± 0.99 , *Dunaliella bardawil* için 2XErdschreiber ortamında % 9.1 ± 0.17 olarak bulunmuştur. Proteose ve 2XErdschreiber ortamında azot ve fosfat içeriği diğer ortamlara göre yüksek bulunmuştur. Evans and Ratledge, (1984). Mikroalgal lipit üretimini tetikleyen faktörleri bulmak için yapılan araştırmalar, çevresel stresin birçok mikroalg türünde lipit birikimine etki ettiğini göstermiştir. Çalışmada en yüksek lipit içeriğinin *Chlorella ellipsoidea* için proteose ortamında % 20.4 ± 0.99 , *Dunaliella bardawil* için 2XErdschreiber ortamında % 9.1 ± 0.17 olarak bulunmuştur. Proteose ve 2XErdschreiber ortamında azot ve fosfat içeriği diğer ortamlara göre yüksek bulunması, Evans and Ratledge (1984), yaptıkları çalışmaya göre farklılıklar göstermiştir ($p > 0.05$).

Yetiştiriciliği yapılan *Chlorella ellipsoidea* kültüründen elde edilen biyomas miktarı ile biyokimyasal analizler yapılmıştır. Lipit analizinde kurutulmuş *Chlorella ellipsoidea* mikroalgine yağ çözücü olarak hexan ilave edilip işlemler sonrasında gravimetrik olarak ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda yapılan denemelerde proteose ortamında lipit oranının % 20.4 ± 0.99 , F/2 ortamında lipit oranının % 16.5 ± 2.16 olarak bulunmuştur. Ancak gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli derecede farklılığın olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$) Protein analizleri Bradford Dye-Binding metoduna göre yapılmıştır (Nielsen 2010 a). Solüsyonun hazırlanması ve işlemlerin uygulanmasından sonra, spektrofotometre’de 595 nm’de örneklerin okunmasıyla elde edilen sonuçlarına göre protein oranı, proteose ortamında % 56.6 ± 1.04 , F/2 ortamında % 47.1 ± 2.02 ’dir. En yüksek protein içeriği proteose ortamında tespit edilmiş olup istatistiksel yönden farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.05$).

Fenol-Sülfürik asit metoduna göre karbonhidrat analizleri yapılmıştır (Nielsen 2010 b). Solüsyonun hazırlanması ve işlemlerin uygulanmasından sonra, spektrofotometre’de 485 nm’de örneklerin okunmasıyla elde edilen sonuçlarına göre karbonhidrat oranı, proteose ortamında % 16.4 ± 1.71 , F/2 ortamında % 15.9 ± 1.11 ’dur. En yüksek karbonhidrat oranı proteose ortamında olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). *Chlorella ellipsoidea* kültürünün toplam su miktarı, nem miktarı, inorganik madde miktarı (kül) AOAC (1975)’e göre yapılmıştır. Proteose ortamında yapılan denemede toplam su miktarı, nem miktarı, kül miktarı sırasıyla % 1.89 ± 0.185 , % 14.25 ± 1.56 , % 4.71 ± 0.201 . F/2 ortamında % 2.41 ± 0.368 , % 27.93 ± 2.42 , % 18.9 ± 0.85 olarak bulunmuştur. Toplam su miktarı ve kül miktarları arasında istatistiksel yönden önemli farklılıklar bulunmamasına karşın nem miktarında farklılıklar tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

Yapılan çalışmada, *Dunaliella bardawil* 2X Erdschreiber ortamı ve modifiye edilmiş Johnson ortamı denemelerde, laboratuvar koşullarında 21°C sıcaklıkta, 1600 lux ışık yoğunluğunda 12 gün boyunca yetiştiriciliği yapılmıştır. Günlük olarak optik yoğunluk, kuru ağırlık, hücre sayısı, pH ve oksijen ölçümleri yapılmıştır. Ölçümlerde elde edilen sonuçlara göre Erdschreiber ortamı yapılan denemelerde optik yoğunluk, kuru ağırlık, hücre sayısı modifiye edilmiş Johnson ortamına göre yüksek bulunmuştur. Oksijen değerleri benzer bulunmakla beraber

pH değerlerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Yetiştiriciliği yapılan *Dunaliella bardawil* kültüründen elde edilen biyomas miktarı ile biyokimyasal analizler yapılmıştır. Çalışmada 2XErdschreiber ortamında lipit oranının % 9.1 ±0.17, modifiye edilmiş Johnson ortamında lipit oranının % 7.9 ±0.45 olarak bulunmuştur. En yüksek lipit içeriğinin 2XErdschreiber ortamında olduğu saptanmıştır (p>0.05). Denemelerde protein oranının, 2XErdschreiber ortamında % 39.7±2.28, modifiye edilmiş Johnson ortamında % 30.2 ±2.67 'dir. Bu sonuçlara göre 2XErdschreiber ortamında en yüksek protein oranı tespit edilmiş, gruplar arasında istatistiksel açıdan farklılıklar belirlenmiştir (p>0.05). Elde edilen sonuçlarına göre karbonhidrat oranı, 2XErdschreiber ortamında % 22.8 ±2.51, modifiye edilmiş Johnson ortamında % 10.3 ±2.34'dür. En yüksek karbonhidrat içeriğinin 2XErdschreiber ortamında olduğu tespit edilmiş olup, istatistiksel yönden farklılık gösterdiği saptanmıştır (p<0.05).

Dunaliella bardawil kültürünün toplam su miktarı, nem miktarı, inorganik madde miktarı (kül) AOAC (1975)'e göre yapılmıştır. 2XErdschreiber ortamında yapılan denemede toplam su miktarı, nem miktarı ve kül miktarı % 1.44 ±0.28, % 18.28 ±1.26, % 26.96 ±1.35 olarak, modifiye edilmiş Johnson ortamında % 0.56 ±0.08 , % 34.9 ±2.15, % 51.44 ±1.85 bulunmuştur. Modifiye edilmiş Johnson ortamında en yüksek kül ve nem miktarı saptanırken, 2XErdschreiber ortamında en yüksek toplam su miktarı bulunmuştur. İstatistiksel yönden farklılık gösterdiği belirlenmiştir (p<0.05).

Algal biyoteknoloji de ticari öneme sahip alg türlerinden *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil* farklı ortamlarda yetiştiriciliği yapılarak Elde edilen biyomas ile lipit analizi, protein analizi, karbonhidrat analizi, toplam su miktarı, nem miktarı, kül miktarı değerleri sonuçlarda verilmiştir. Bu sonuçlara göre elde edilen lipit oranın *Chlorella ellipsoidea* ve *Dunaliella bardawil* için düşük olduğu tespit edilmiştir. Lipit içeriğinin artırılması için farklı yöntemler denenmesi gerekmektedir.

Akuakültür ve biyomas için kullanılan iki türün farklı ortamlarda farklı besin içeriğine sahip olduğu çalışma sonunda saptanmıştır. Algerin kullanım alanları çeşitlilik gösterip bunlardan insan gıdası ve hayvan yem katkı maddesi

olarak kullanımlarında ise protein ve karbonhidrat sonuçlarının yeterli düzeylerde bulunduğu tespit edilmiştir. Alglerin üretim amacına uygun koşullarda kültüre alınması gerektiği bu çalışma sonunda belirlenmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- AOAC**, (1975), Official Methods of Analysis. 20 th Edition, Horwitz ,W, Analytical Chemists, POBOX 540, Benjamin Franklin Station, Washington, DC 20044.
- Anderson, R.A.**, 2005. Traditional Microalgae Isolation Techniques. Elsevier Academic Pres. 83-96.
- Aizawa, K., Miyachi, S.**, 1992. Photosynthesis: Biochemical and Physiological adaptation. In: Avron, M., Ben-Amotz, A. (Eds.), *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*, 1. CRC Press, pp. 45–62.
- Ben-Amotz, A. in: Z. Cohen (Ed.)**, 1999. Chemicals from Microalgae, Taylor & Francis Ltd.
- Ben-Amotz, A., Tornabene, T.G. ve Thomas, W.H.**, 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.*, 21: 72-81.
- Botham, P. A. and C. Ratledge.**, 1979. A Biochemical Explanation for Lipid Accumulation in *Candida 107* and Other Oleaginous Microorganisms. *J. Gen. Microbiol.*, 114, 361.
- Brown., M.R.**, 1993. The amino acid VE sugar composition of sixteen species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 145: 79-99.
- Casadevall, E, Dif, D, Largeau, C, Gudin, C, Chaumont, D and Desant, O.**, 1985. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: Hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition. *Biotechnology and Bioengineering Vol. 27*, pp. 286–295
- Cirik S., Gökpınar Ş., 1999.** Plankton Bilgisi ve Kültürü. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:47 Ders Kitabı Dizini No: 19. Sayfa:109.
- Cirik S., Gökpınar Ş., (2005).** Plankton Bilgisi ve Kültürü Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:47 Ders Kitabı Dizini No: 19. Sayfa:109.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Chistiý A., 1980.** An unusual hydrocarbon. *J Ramsay Soc* 27–28: 24–6.
- Dubois , M., Gilles , K.A., Hamilton , J.K., Rebers, P.A., and Smith, F., 1956.** Colorimetrik method for determination of sugars and related substances *Analytic Chemistry* 28, 350-356.
- Evans, C. T. and C. Ratledge., 1984.** Effect of Nitrogen Source on Lipid Accumulation in Oleaginous Yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 130, 1693.
- Fabregas, J., Herrero, C., Abalde, J. ve Cabezas, B., 1985.** Growth, chlorophyll-a and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 50: 1-11.
- Fujii, S., Uenaka, M., Nakayama, S., Yamamoto, R., and Mantani, S., 2001.** Effect of sodium chloride on the fatty acids composition in *Boekelovia hooglandii* (Ochromonadales, Chrysophyceae). *Phycology Res.*, 49, 73-77.
- Grobbelaar, J.U., 2004.** Algal nutrition. in: Richmond A, editor. *HVEbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell; p. 97–115.
- Gökpınar, Ş., 1991,** Effect of change of temperature on inorganic nitrogen assimilation of five important sea flagellat in aquaculture. *Dokuz Eylül Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü*, sayfa,88 (in Turkish).
- Garcia-Gonzalez, M., Manzano, J.C., Moreno, J., and Guerrero, M.G., 2000.** Biotecnología del cultivo de *Dunaliella salina* en el litoral andaluz. *Pesca y Acuicultura. Consejería de Agricultura y Pesca. Spain* 16/00, 163.
- Graham E.L., Wilcox L.W., 2000.** Algae. Chapter 19. *Green algae III*. 452-459. (University of Wisconsin).
- Gibbs, N., Duffus, C.M., 1976.** Natural protoplast *Dunaliella* as a source of protein. *Applied Environmental Microbiology* 31, 602–604.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Gimmler, H., Weis, U.**, 1992. *Dunaliella acidophila* – Life at pH 1.0. In: Avron, M., Ben-Amotz, A. (Eds.), *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, pp. 99–133.
- Illman, A.M., Scragg, A.H., Shales, S.W.**, 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Tech.* 27, 631–635.
- Knothe, G., Dunn, R.O., Bagby, M.O.**, 1997. Biodiesel: the use of vegetable oils and their derivatives as alternative diesel fuels. *ACS Symp Ser*;666:172–208.
- Lee, S.L., Yoon, B.D., Oh, H.M.**, 1998. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnology Techniques*, Vol. 12, pp. 553–556.
- Liu Z.Y., Wang G.C., Zhou B.C.**, 2007. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 99 (2008) 4717–4722.
- Li, Q., Du, W., Liu, D.**, 2007. Perspectives of microbial oils for biodisel production. *Appl Microbial Biotechnol* 80:749-756.
- 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*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 629–636.
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y.**, 2009. Biomass and lipid productivities of *Chorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* 31:1043-1049.
- McGinnis, K.M, Dempster, T.A and Sommerfeld, M.R.**, 1997. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Journal of Applied Phycology* Vol. 9, pp. 19–24.
- Nagle, N., Lemke, P.**, 1990. Production of methyl-ester fuel from microalgae. *Appl Biochem Biotechnol* 24–5:355–61.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Neenan, B., Feinberg, D., Hill, A., Mcintosh, R., Terry, K.,** 1986. Fuels from microalgae: Technology status, potential, and research requirements. Publ. No. SERi/SP-231-2550, Solar Energy Research institute,.
- Nielsen, S.,** (2010 a). Bradford Dye-Binding Method, Chapter 9: Protein Analysis, In: Food Analysis, Springer Publication, P: 141.
- Nielsen, S.,** (2010 b). Total Carbohydrate: Phenol-Sulfuric Acid Method, Chapter 10: Carbohydrate Analysis, In: Food Analysis, Springer Publication, P: 152.
- Oliveira, L., Bisalputra, T., Antia, N.J.,** 1980. Ultrastructural observation of the surface coat of *Dunaliella tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzyme treatments. *New Phytology* 85, 385–390.
- Özdamar, K.** 1997. Paket Programlar ile *İstatistiksel* Veri Analizi I. Anadolu Üniversitesi Yayınları. Eskişehir.
- Qing, X., Xu J. and Berdall, J.,** 1997. Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalgae from an Antarctic hypersaline lake. *Phytochemistry*, 45, 655-658 (1997).
- Petkov, G., ve Garcia, G.,** 2007. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella* *Biochemical Systematics VE Ecology*. 35: 281 – 285.
- Piorreck, M., Pohl, P.,** 1984. Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acid in green and bluegreen algae during one growth phase. *Phytochemistry* 23: 217-223.
- Raghavan, G., Haridevil, C.K., Gopinathan, C.P.,** 2008. Growth V and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. *Aquaculture Research*, vol.39;1053-1058p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Santin-Montanya, I., Sandin-Espana, P., Garcí'a Baudin J.M., Coll-Morales, J., 2007.**
Optimal growth of *Dunaliella primolecta* in axenic conditions to assay herbicides.
Chemosphere 66: 1315–1322
- Sukatar A., (2002).** Alg Kültür Yöntemleri. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi
No: 184. Sayfa: 46-64, 103-105.
- Share, C., Huesemann, W Huesemann, M., 2009.** Lipid Production By *Dunaliella salina* In
Batch Culture: Effects Of Nitrogen Limitation and Light Intensity.
<http://www.scied.science.doe.gov>.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E., 2006.** Isambert A. Commercial applications of
microalgae. J Biosci Bioeng ;101:87–96.
- Sawayama, S., Inoue, S., Dote, Y., Yokoyama, S-Y., 1995.** CO₂ fixation and oil production
through microalga. Energy Convers Manag;36: 729–31.
- Turcotte, G. and N. Kosaric, 1988.** “Biosynthesis of Lipids by *Rhodospiridium toruloides*
ATCC 10788,” J. Biotechnol., 8, 221 .
- Takeda, H., 1991.** Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella*
(Chlorophyceae). Journal of Phycology 27:224-232.
- Takagi, M., Karseno, and Yoshida, T., 2005.** Effect of Salt Concentration on Intracellular
Accumulation of Lipids and Triacylglyceride in Marine Microalgae *Dunaliella* Cells.
Journal of Bioscience and Bioengineering. The Society for Biotechnology, Japan.
3:223-226.
- Vonshak, A. (Ed.) 1997.** *Spirulina platensis* (Arthrospira) Physiology, cell-biology and
biotechnology. Taylor & Francis, London).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- 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. 13-20.
- Xu, N., Zhang, X., Fan, X., Han, L., Zeng, C.**, 2001. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion sp.* (Eustigmatophyta). J. Appl. Phycol. 13, 463–469.
- Xu, H., Miao, X. ve Wu., Q.**, 2006. High quality biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. Journal of Biotechnology. 126: 499–507
- Zor, T., and Selinger, Z.**, (1991). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies, Analytic Biochemistry , 236, 302-303.