



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOBİLİM ve NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

NANOBİLİM ve NANOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ BİLİM DALI

Chlorella sp. ESP-6 MİKROALGİNDE TRİAÇİLGLİSEROL
ÜRETİMİ İÇİN EN UYGUN STRES DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

EMİNE SELÇUK

Tez Danışmanı:

Doç.Dr. Turgay ÇAKMAK

ARALIK-2017

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Yüksek Lisans öğrencisi olan Emine SELÇUK'un hazırladığı ve jüri önünde savunduğu "Chlorella sp. ESP-6 Mikroalginde Triaçilgliserol Üretimi İçin En Uygun Stres Düzeyinin Belirlenmesi" başlıklı tez başarılı kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

Tez Danışmanı:

[Doç.Dr. Turgay ÇAKMAK]

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

İMZA

.....

Üyeler:

[Doç Dr. Özgür AKTAŞ]

.....

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

[Prof. Dr. Barbaros Nalbantoğlu]

.....

Kurumu: Yıldız Teknik Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi:

ETİK İLKELERE UYGUNLUK BEYANI

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü bünyesinde hazırladığım bu Yüksek Lisans tezinin bizzat tarafımdan ve kendi sözcüklerimle yazılmış orijinal bir çalışma olduğunu ve bu tezd

- 1- Çeşitli yazarların çalışmalarından faydalandığımda bu çalışmaların ilgili bölümlerini doğru ve net biçimde göstererek yazarlara açık biçimde atıfta bulunduğumu;
- 2- Yazdığım metinlerin tamamı ya da sadece bir kısmı, daha önce herhangi bir yerde yayımlanmışsa bunu da açıkça ifade ederek gösterdiğimi;
- 3- Alıntılanan başkalarına ait tüm verileri (tablo, grafik, şekil vb. de dahil olmak üzere) atıflarla belirttiğimi;
- 4- Başka yazarların kendi kelimeleriyle alıntıladığım metinlerini kaynak göstererek atıfta bulunduğum gibi, yine başka yazarlara ait olup fakat kendi sözcüklerimle ifade ettiğim hususları da istisnasız olarak kaynak göstererek belirttiğimi,

beyan ve bu etik ilkeleri ihlal etmiş olmam halinde bütün sonuçlarına katlanacağımı kabul ederim.

Emine Selçuk

[İmza]

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ONAY	ii
ETİK İLKELERE UYGUNLUK BEYANI	iii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyodizel Üretiminde Mikroalglerin Hammadde Kaynağı Olarak Kullanılması.....	2
1.2 Mikroalglerde Lipid Üretimi.....	4
1.3 Lipid Üretiminin Uyarılması.....	6
1.4 Mikroalglerde Stresi Tetikleyen Faktörler ve Hemostatik Denge.....	10
1.5 Reaktif Oksijen Türleri.....	11
1.6 Antioksidant Maddeler.....	12
2. MATERYAL VE METOT.....	14
2.1 <i>Chorella sp. ESP-6</i> Mikroalginin İzolasyonu ve Tanımlanması.....	14
2.1.1 Örnekleme Alanının Tanımı.....	14
2.1.2 Örnekleme.....	16
2.2 Mikroalglerin Kültüre Alınması ve Büyütülmesi.....	18
2.2.1 Deney Düzenekinin Hazırlanması.....	20
2.3 Nötral Lipidleri Taini İçin Mikroalglerin Nil Kırmızısı ile Boyaması.....	21
2.4 Hidrojen Peroksit Tayini İçin Mikroalglerin Hazırlanması.....	22
2.5 Mikroalglerin Klorofil ve Karetenoid İçeriklerinin Analizi İçin Mikroalglerin Hazırlanması.....	23
2.6 FT-IR Analizi İçin Mikroalglerin Hazırlanması.....	23
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	25
3.1 <i>Chlorella sp. ESP-6</i> Mikroalginin Tanımlanmasına İlişkin Bulgular ve Sonuçlar.....	25
3.2 <i>Chlorella sp. ESP-6</i> 'nın Büyüme Analizine İlişkin Bulgular ve Sonuçlar.....	26
3.3 Mikroalglerin İçerdikleri H ₂ O ₂ Miktarlarının Tayinine İlişkin Bulgular ve Sonuçlar.....	29
3.4 Klorofil ve Karetenoid İçeriklerinde Meydana Gelen Değişime İlişkin Bulgular ve Sonuçlar.....	30
3.4.1 2. Saatten Alınan Örnekler.....	33
3.4.2 8. Saatten Alınan Örnekler.....	34

3.4.3	24. Saatten Alınan Örnekler.....	35
3.4.4	48. Saatten Alınan Örnekler.....	36
3.4.5	72. Saatten Alınan Örnekler.....	37
3.4.6	144. Saatten Alınan Örnekler.....	37
3.5	FT-IR Analizine İlişkin Bulgular ve Sonuçlar.....	41
3.6	H ₂ O ₂ Stresine Cevapta Mikroalglerin Ürettikleri Stoplazmik Lipid Cisimciklerinin Floresan Görüntülenmesi ile Elde edilen Bulgular ve Sonuçlar.....	44
3.6.1	2. Saatten Alınan Örnekler.....	45
3.6.2	8. Saatten Alınan Örnekler.....	45
3.6.3	24. Saatten Alınan Örnekler.....	46
3.6.4	48. Saatten Alınan Örnekler.....	46
3.6.5	72. Saatten Alınan Örnekler.....	47
4.	SONUÇ.....	49
	KAYNAKÇA.....	51
	Özgeçmiş.....	54

KISALTMALAR

H₂O₂ : Hidrojen Peroksit

FT-IR : Kızılötesi absorpsiyon spektroskopisi

UV Spektrometri: Ultraviyole spektrofotometre

TAG: Triaçilgliserol

FA: Yağ asidi

PUFA: Çok zincirli doymamış yağ asidi

MGDG: Monogalaktosildiaçilgliserol

KI: Potasyum İyodür

K₂HPO₄ : Dipotasyum hidrojen fosfat

TCA : Trikarboksilik Asit

BBM: Bold's Basal Medium

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. Alglerden elde edilen lipidlerle biyodizel üretim şeması[7] Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Şekil 2. Alg tabanlı biyodizel üretim şeması[7]	3
Şekil 3. Mikroalglerden lipit üretim şeması[12].....	5
Şekil 4. Hücre metabolizmasında oluşan doymuş ve doymamış yağ asidi[15].....	6
Şekil 5. Stres koşulları altında mikroalglerde lipid üretiminin indüklenmesi[9]	7
Şekil 6. Oluşan çevresel stres faktörlerine bağlı olarak ROS faktörlerinin hücre içerisinde lipid üretimini uyarması[18].....	8
Şekil 7. Spirulina plantensis’de hidrojen peroksitin hücre büyümesine etkisi[20].....	9
Şekil 8. Hücre içindeki hemeostatik denge[22]	10
Şekil 9. Hücre içerisinde serbest radikallerin oluştuğu çeşitli lokalizasyonlar	11
Şekil 10. Antioksidanlar tarafından serbest radikallerin nötralize edilmesi[20].....	12
Şekil 11. Nemrut Kalderası ve göllerinin yer bulduru haritası.....	16
Şekil 12. İzolasyon için uyguladığımız deneysel akış şeması.....	17
Şekil 13. Işık mikroskobu altında Chlorella sp. ESP-6(x40/50µm).....	19
Şekil 14. Sıvı ortama ekim yapıldıktan sonra kültürlerimizin 23 °C sıcaklık ve 150 µ mol foton m ⁻² s ⁻¹ ’luk ışık altında ve çalkalayıcıda (120 rpm) yetiştirilmesi.....	20
Şekil 15. Deney düzeneğinin kurulması.....	20
Şekil 16.a Şekilde erlen mayerdeki en baştan sağa doğru C1,C2,C3 olan üçer tekrarlı kontrol grubu ve sağda 1a,1b,1c olarak adlandırdığımız 1µM lık H ₂ O ₂ konsantrasyonuna sahip üçer tekrarlı grup bulunmaktadır.	
16.b. Şekilde erlen mayerdeki en baştan sağa doğru 5a,5b,5c olan üçer tekrarlı 5µM’lık H ₂ O ₂ konsantrasyonuna sahip hücre grubu ve sağda 20a,20b,20c olarak adlandırdığımız 20µM lık H ₂ O ₂ konsantrasyonuna sahip üçer tekrarlı grup bulunmaktadır.....	21
Şekil 17. Artan yoğunluklarda H ₂ O ₂ uygulanan mikroalglerin büyümelerinde meydana gelen değişim.....	27
Şekil 18. Farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ stresine maruz bırakılan hücrelerin dışardan alınan görüntülerinde meydana gelen değişimin	28
Şekil 19. Farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ stresine maruz bırakılan hücrelerin ışık mikroskobu altındaki görüntülerinde meydana gelen değişim. (x40/10µm).....	28
Şekil 20. Mikroalglerin H ₂ O ₂ içeriklerinde zamana bağlı olarak meydana gelen değişim.....	29
Şekil 21. Yukarıdaki tabloda farklı konsantrasyonlarda ve farklı saatlerde H ₂ O ₂ stresine maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen <i>klorofil-a</i> miktarındaki değişim gösterilmiştir.....	30
Şekil 22. Yukarıdaki tabloda farklı konsantrasyonlarda ve farklı saatlerde H ₂ O ₂ stresine maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen <i>klorofil-b</i> miktarındaki değişim gösterilmiştir.....	31
Şekil 23. Mikroalglerin toplam klorofil içeriklerinde meydana gelen değişim.....	32

Şekil 24. Deney grubunun 2. saatteki dışardan çekilen görüntüsü.....	Sayfa 33
Şekil 25. Deney grubunun 2. saatteki mikroskop görüntüsü (x40).....	33
Şekil 26. Deney grubunun 8. saatteki dışardan çekilen görüntüsü.....	34
Şekil 27. Deney grubunun 8. saatteki mikroskop görüntüsü (x40).....	34
Şekil 28. Deney grubunun 24. saatteki dışardan çekilen görüntüsü.....	35
Şekil 29. Deney grubunun 24. saatteki mikroskop görüntüsü (x40).....	35
Şekil 30. Deney grubunun 48. saatteki dışardan çekilen görüntüsü.....	36
Şekil 31. Deney grubunun 48. saatteki mikroskop görüntüsü (x40).....	36
Şekil 32. Deney grubunun 72. saatteki dışardan çekilen görüntüsü.....	37
Şekil 33. Deney grubunun 72. saatteki mikroskop görüntüsü (x40).....	37
Şekil 34. Deney grubunun 144. saatteki dışardan çekilen görüntüsü.....	37
Şekil 35. Deney grubunun 144. saatteki mikroskop görüntüsü (x40).....	38
Şekil 36. Yukarıdaki tabloda farklı konsantrasyonlarda ve farklı saatlerde H ₂ O ₂ stresine maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen <i>karetenoid</i> miktarındaki değişim gösterilmiştir.....	40
Şekil 37. 1744cm ⁻¹ /1652cm ⁻¹ oranına göre “TAG” miktarının FTIR ile hesaplanmasına ilişkin sonuçlar.....	41
Şekil 38. 1150cm ⁻¹ /1652cm ⁻¹ oranına göre “polisakkarit” miktarının FTIR ile hesaplanmasına ilişkin sonuçlar.....	42
Şekil 39. 1045cm ⁻¹ /1652cm ⁻¹ oranına göre “oligosakkarit” miktarının FTIR ile hesaplanmasına ilişkin sonuçlar.....	43
Şekil 40. 2. saatten alınan örneklerin floresan görüntüsü.....	45
Şekil 41. 8. saatten alınan örneklerin floresan görüntüsü.....	45
Şekil 42. 24. saatten alınan örneklerin floresan görüntüsü.....	46
Şekil 43. 48. saatten alınan örneklerin floresan görüntüsü.....	46
Şekil 44. 72. saatten alınan örneklerin floresan görüntüsü.....	47
Şekil 45. Yukarıdaki tabloda farklı konsantrasyonlarda ve farklı saatlerde H ₂ O ₂ stresine maruz bırakılan hücrelerin floresan mikroskobu altındaki görüntülerinde meydana gelen değişimin gösterilmiştir. (x40/10µm).....	47

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo I. Bitkilerde enzimatik olmayan ve enzimatik antioksidanların lokalizasyonları ve rolleri [20].....	13
Tablo II: Çalışma Planı.....	14
Tablo III. Çalışmada kullanılmış primerler ve sekansları.....	18
Tablo IV. <i>Chlorella sp.</i> ESP-6 türünün büyütüldüğü BBM ortamının içeriğine ilişkin tablo [21].....	18
Tablo V. <i>Chlorella sp</i> ESP-6 türüne ait sekans analiz sonucu.....	25
Tablo VI. <i>Chlorella sp.</i> ESP-6 nolu örneğin DNA dizi analizi sonrasında elde edilen sekansının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri.....	26

ÖZET

Kısa yaşam döngüleri, kolay manipüle edilebilmeleri ve tarıma uygun olmayan alanlarda kolayca üretilibilmeleri gibi özellikleriyle mikroalgler, sürdürülebilir yolla katma değeri yüksek ürün eldesi için biyoteknoloji endüstrisinde önemli bir kullanım potansiyeline sahiptir. Genel olarak biyotik ya da abiyotik stres faktörüne cevapta mikroalglerde ergastik maddeler ya da sekonder metabolitlerin üretimi değişiklik gösterir. *Chlorella* cinsi mikroalgler katma değeri yüksek ürün eldesi çalışmalarında sıklıkla kullanılan türlerdir.

Bu çalışmada, Bitlis il sınırları içerisinde bulunan volkanik bir göl olan Nemrut Gölünden izole edilen *Chlorella* sp. ESP-6 mikroalginde oksitativ strese bağlı olarak lipid miktarında ve formasyonundaki değişiklikler incelenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan *Chlorella* sp. ESP-6 mikroalgi için önerilen genel üretim ortamlarından olan BBM çözültisi bu çalışmada *Chlorella* sp. ESP-6 türü için kullanılmış, kontrol grubunun yanı sıra 1, 5, 20µM yoğunluklarda H₂O₂ içeren büyütme ortamlarında 72 saat boyunca triaçilgliserol ve nötral lipid üretimindeki değişiklikler kaydedilerek ilgili parametreler değerlendirilmiştir.

H₂O₂ uygulaması ilk günden itibaren büyümede önemli düzeyde baskılanmaya sebep olmuştur. Uygulamanın ilk 5 gününde büyümedeki baskılanma artmış, takip eden günlerde 1µM ve 5µM H₂O₂ uygulanan gruplarda büyüme yeniden gelişmiş ve baskılanma kalkmıştır. Diğer taraftan H₂O₂ yoğunluğu 20uM olarak uygulanan grupta yeniden büyüme gerçekleşmemiştir. Klorofil a, b ve toplam klorofil miktarı H₂O₂ uygulanan gruplarda konsantrasyon ile doğru orantılı olarak ilk 24 saatte artmış, daha sonra da azalmıştır. 72 saat sonra klorofil a ve toplam klorofil içeriğindeki azalma görülmüştür. Mikroalglerin içerdikleri toplam karotenoid miktarları klorofil içeriklerindeki değişim ile paralellik göstermiştir. FT-IR analizi ile belirlenen TAG içeriklerindeki değişim 24 saatin sonunda özellikle 5uM H₂O₂ uygulamasında yaklaşık %220 artış ile en yüksek düzeyde artış göstermiştir. Benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla 5uM H₂O₂ uygulamasına cevapta ilk 24 saatte

mikroalglerin içerdikleri toplam oligosakkarit miktarı da yaklaşık olarak %56 oranında, toplam polisakkarit miktarı ise %51 oranında artmıştır. Farklı yoğunluklarda H₂O₂ uygulanan mikroalglerin nil kırmızısı ile boyanarak çekilen floresans görüntülerinden de 5uM H₂O₂ uygulamasının ilk 24 saat içerisinde nötral lipid üretimini önemli oranda tetiklediği belirlenmiştir. Sonuçlar, kısa süreli H₂O₂ uygulamasının mikroalglerden biyodizel hammaddesi olan triaçilgliserol üretiminde kullanılabilir bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Chlorella , H₂O₂, nötral lipid, lipid kesecikleri, oksidatif stres



ABSTRACT

Microalgae have a considerable potential in the biotechnology industry for the sustainable production of value-added products as they have a short life cycle, they can be easily manipulated, and cultivated in the non-arable landscape. In general, production of ergastic and secondary metabolites in microalgae differentiate in response to a biotic and abiotic stress factor. *Chlorella* strains are mostly preferred for the production of value-added metabolites.

In this study, oxidative stress depended changes in lipid production and formation in *Chlorella* sp. ESP-6 which was isolated from Lake Nemrut, a volcanic lake located in Bitlis province, was analyzed. The growth solution for growing *Chlorella* ESP-6 was BBM which is an internationally accepted growth medium for green microalgae. For experimentation, microalgae were cultivated in controlled or growth medium with 1, 5, and 20 μ M H₂O₂ during 72 hours for evaluation of changes in triacylglycerol, neutral lipid, and related parameters.

Hydrogen peroxide application caused a significant decrease in growth starting from the first day. Intriguingly, there was a continuous suppression of growth during five days of H₂O₂ addition; however, the growth was induced again after this time point in 1 μ M and 5 μ M H₂O₂ added microalgae group after this time point while suppression of growth was continuous in the 20 μ M H₂O₂ group during 12 days of growth. The H₂O₂ contents of microalgae showed a time- and concentration-dependent changes in the growth medium. The Chlorophyll a, b and total chlorophyll contents exponentially increased during 24 hours and then gradually decreased, lasting with statistically significant decreases at the end of 72 hours of incubation period. The total carotenoid content of microalgae showed similar trends as seen in total chlorophyll content. Increase in TAG content reached its maximum with 220% at the end of 24 hours of incubation in 5 μ M H₂O₂ supplemented medium. Likewise, total oligosaccharide and polysaccharide contents increased over 56% and 51% in response to 5 μ M H₂O₂ addition during 24 hours of

incubation. Fluorescence staining and imaging of cytoplasmic lipid bodies support the increase of TAG as a response to an increase in the stress level. The results refer that short-term H₂O₂ application might be a considerable approach to induce TAG production in microalgae.

Keywords: Chlorella , H₂O₂, lipid, nötral lipid, lipid body, oxidative stress



1.GİRİŞ

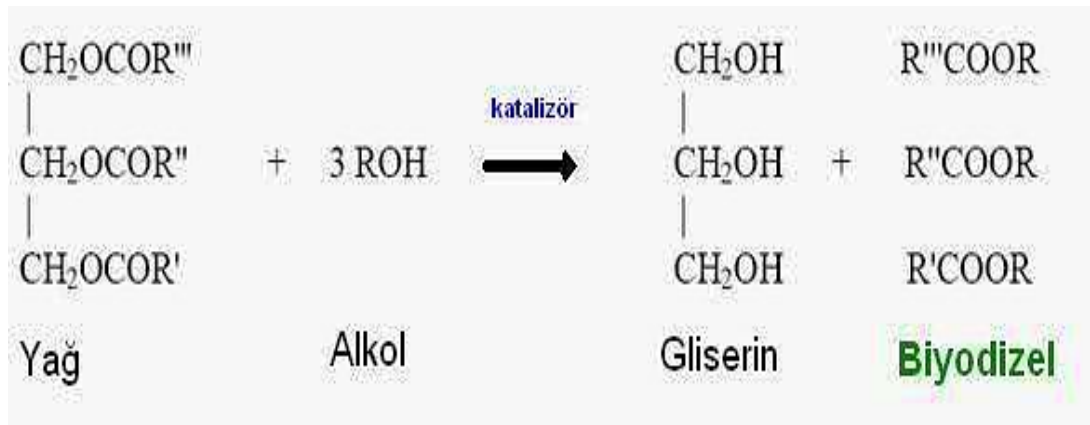
Mikroalgler sürdürülebilir, temiz ve çevre dostu enerji kaynağıdır. Ancak kültürlerdeki mikroalg üretim etkinliğinin ve alglerdeki kullanılabilir lipid miktarının dış uygulamalarla geliştirilmesi gerekmektedir. Mikroalglerde metabolik olarak üretilen lipid miktarının artırılması özellikle enerji sektörüne büyük katkı sağlayacaktır. Bunun için çeşitli çalışmalar sürdürülmektedir. Örneğin Meng Chen ve arkadaşlarının 2011' de yayınladığı makalede çeşitli besin maddelerinin (Co, Fe, Mn, NO_3^-) ortama eklenmesinin alg büyümesini ve lipid üretimini desteklediği[1], yine benzer şekilde Jian-Ming Lv ve arkadaşlarının 2010' da yaptığı bir çalışmada alglerin kültür şartlarının değiştirilmesi ile lipid üretimin optimize edildiği bildirilmiştir[2]. Çakmak ve arkadaşlarının 2014 de yaptığı bir çalışmada da farklı element manipulasyonlarının *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginde nötral lipid üretimini uyardığı; N, S, P, Mg, Ca, açlığı ile Fe, N elementlerinin normalden 5 kat fazla bulunduğu durumlarda mikroalglerdeki triaçilgliserol içeriğinin önemli oranda uyarıldığını bildirmişlerdir[3] Takip eden çalışmalarında Çakmak ve arkadaşları makro ve microelement açlığı ile normalden 5 kat daha fazla bulunduğu durumlarda nötral lipid üretimindeki artışı tetikleyen stress mekanizması üzerine çalışmalar yapmışlar, *C.reinhardtii* mikroalginde nötral lipid üretimini artıran element manipulasyonlarının doğrudan oksidatif stress ve büyümedeki basklanma ile ilintili olabileceğini vurgulamışlardır[4]. Literatürde bildirilen biyotik ya da abiyotik stress faktörleri uygulanarak biyodizel hammaddesi üretiminin artırılmasındaki ana sebeplerden biri de stress uygulamaları sonrasında uygulamanın kendisinden kaynaklanan sebebin dışında bir de uygulamanın yarattığı oksidatif stresin düzeyi olabilir.

Mikroalgelere hidrojen peroksit uygulanmasıyla birlikte hücrede oluşan antioksidant cevaba karşılık olarak hücrede lipid birikiminin meydana geldiği gözlemlenmiştir[5].

Hidrojen peroksitin uygulanma konsantrasyonu ve uygulanma süresine bağlı olarak mikroalglerde meydana gelen bu değişimleri anlamak gelecekte alglerde enerji üretimi için önemli adımlara öncülük edebilir. Yani günümüzde kısıtlı, maliyeti yüksek ve sürdürülebilir olmayan enerji kaynaklarının yerini alglerdeki nötral lipidler alabilir. Bu da biyoyakıt sektörüne katkı sağlayarak enerji kaynaklarından biri olan etkin biyodizel üretimi için önemli adım olabilir.

1.1 Biyodizel Üretiminde Mikroalg Lipidlerin Ham Madde Kaynağı Olarak Kullanılması

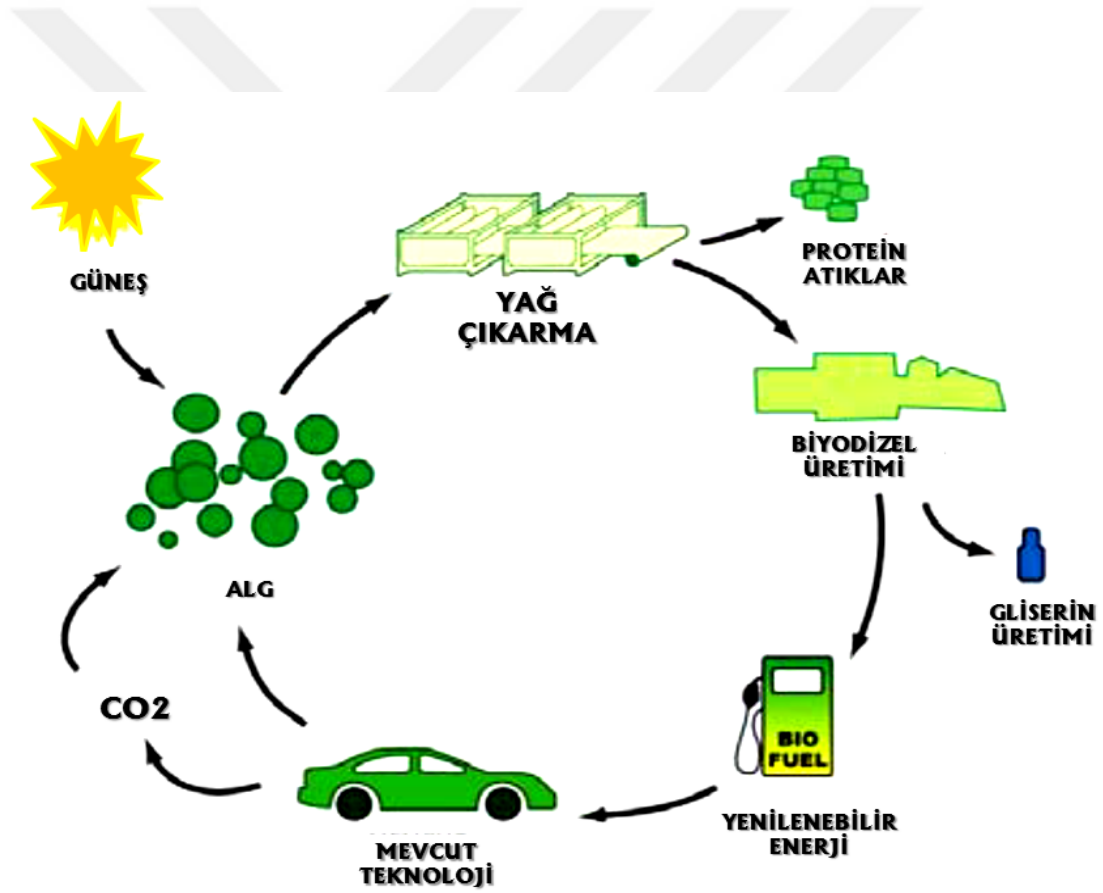
Bazı mikroalgler bünyesinde yaklaşık %80 den fazla miktarda bulunan oleik asit (C18:1) ve palmitoleik asit (C16:1) gibi yağ asitleri sayesinde yüksek enerji içerirler[6]. Bu sebeple mikroalgleri yakıtı çevirmek oldukça elverişlidir. Mikroalgleri biodizele çevirmede kullanılan yöntemlere gazifikasyon, piroliz ve transesterifikasyon yöntemleri örnek verilebilir. Alglerden elde edilen yağ, bir alkolle (etanol, metanol), katalizör (asidik, bazik ve enzim) varlığında yağ asidi metil esterleri ve gliserine dönüşmektedir. Belirli bir alandan elde edilen mikroalg tabanlı yağların, bitkisel ve hayvansal yağlara göre çok yüksek olduğundan dolayı, mikroalg biyodizeli çok daha ekonomik olmaktadır[6].



Şekil 1. Alglerden elde edilen lipidlerle biyodizel üretim şeması [7]

Mikroalglerden biyodizel üretimi için kullanılan yöntemlerden biri olan transesterifikasyon olayı üç basamakta gerçekleşmektedir. Mikroalglerden elde edilen trigliseritler ilk basamakta digliseritlere dönüştürülmekte ve digliseritlerde tekrar yıkıma uğrayarak monogliseritlere dönüştürülmektedir. Daha sonra monogliseritler yağ asidi ve gliserol moleküllerine dönüştürülerek biyodizel üretimi için uygun hale getirilmektedir(Şekil 1.)[8]

Aşağıda Şekil 2.'de alglerden biyodizel üretim basamakları kısa bir şekilde şematik olarak özetlenmiştir.

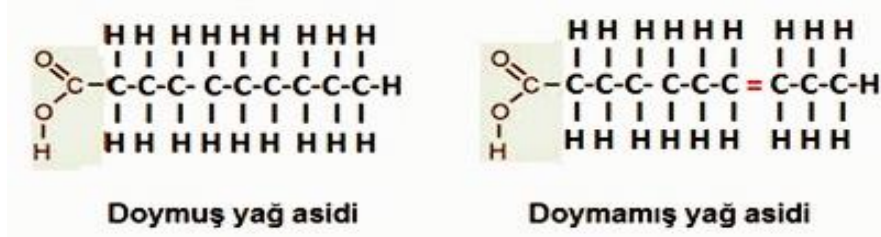


Şekil 2. Alg tabanlı biyodizel üretim şeması[7]

1.2 Mikroalglerde Lipid Üretimi

Prenil grubu türevi olan tokoferol, karetenoid, terpen ve pirol türevi klorofil-II gibi lipid gruplarının yanı sıra nötral lipid, polar lipid, steroller ve hidrokarbonların türevleri mikroalgler tarafından üretilmektedir[9]. Mikroalgler tarafından üretilen lipidler depo lipidleri (non-polar) ve yapı lipidleri (polar) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Depo lipidlerinin büyük bir bölümü doymuş yağ asitlerinden oluşan TAG formu ve biyodizel üretimi için transesterifikasyon yapılabilen doymamış yağ asitleri şeklinde düzenlenmektedir. Yapısal lipidler ise tipik olarak aquatik hayvanlar ve insanlar için besin kaynağı olarak kullanılan çoklu doymuş yağ asitlerinden büyük miktarda içermektedir. Polar lipidler (fosfolipidler) ve steroller hücrelerde ve organellerde seçici geçirgenlikte görev alan yapılara katılmada önemli yapısal komponentleri oluşturmaktadır. Bu lipidler çeşitli metabolik süreçlere katılmakta ve direkt olarak membran füsyonunu sağlaması gibi spesifik hücresel membran fonksiyonlarını sürdürmektedir. Bunun yanında yapısal fonksiyonlarda görev alan bazı polar lipidlere baktığımızda bunlar hücresel haberleşme yollarında (e.g., inositol lipids, sphingolipids, oxidative products) ve hücre etrafında meydana gelen çevresel değişimlere yanıt oluşturmada önemli işlevler üstlenmektedir[9]. Non-polar lipidlerden olan TAG'lar hücrede metabolik enerji sağlamak için kolayca katabolize olabilen depo ürünlerini oluşturmaktadır[10]. Genel olarak TAG'lar ışık altında çokça sentezlenmekte ve sitosolik lipid keseciklerinde depolanmaktadır. Karanlıkta ise bu depolanan lipidler tekrar kullanılabilir forma dönüştürülebilmektedir[11]. Aşağıda Şekil 3' te ise mikroalglerden lipid üretim şeması gösterilmektedir.

Çevresel şartlarının ani değişmesine tepki olarak algelerde bazı metabolik olaylar yavaşlarken, çok zincirli doymamış yağ asitlerinden oluşan triaçilgliserollerin (PUFA-rich TAG) üretiminin arttığı bazı çalışmalarla gösterilmiştir[13].

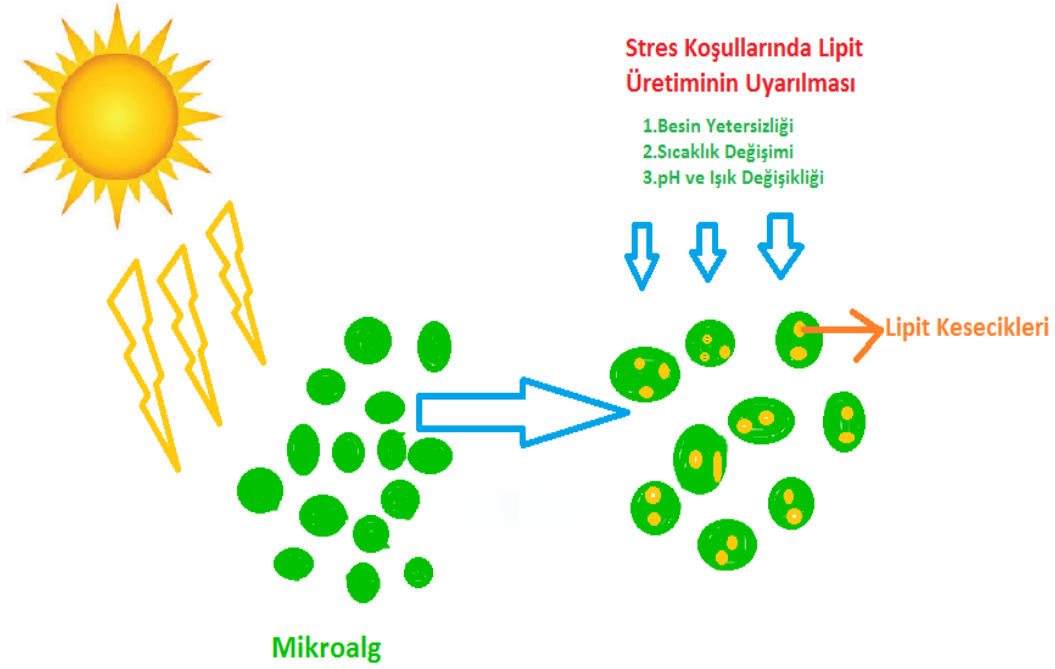


Şekil 4. Hücre metabolizmasında oluşan doymuş ve doymamış yağ asidi [15]

1.3 Lipid Üretiminin Uyarılması

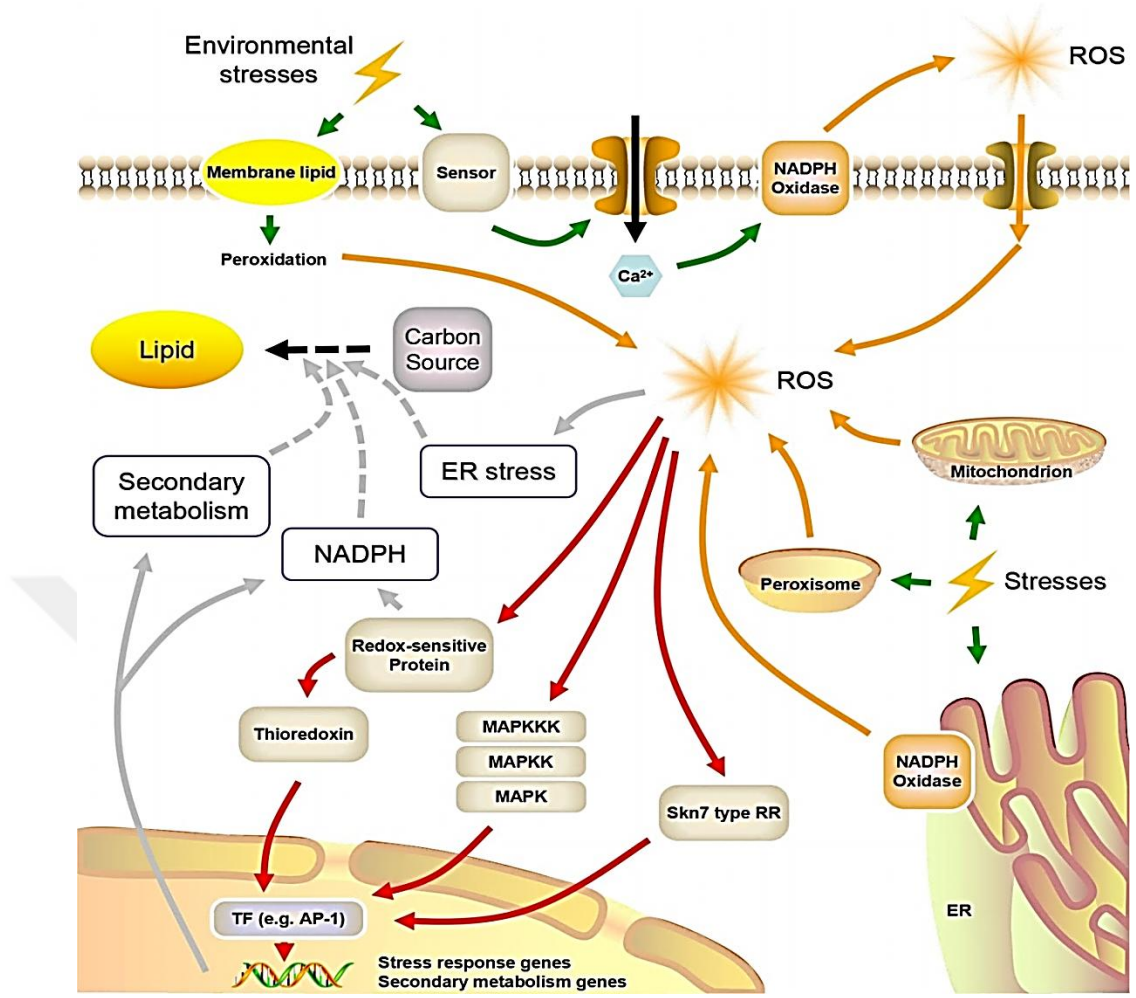
Olağandışı ve sürekli değişebilen çevre koşullarına karşı mikroalglerin canlı kalabilme yeteneği, bu şartlara yanıt olarak oluşturulan devasa çeşitlilikteki varlığı ile alakalıdır[16]. Bu yanı sıra bu alglerin bazıları çevresel koşulların değişmesine yanıt olarak lipid metabolizmasını etkili bir şekilde değiştirebilmektedir[17]. Son zamanlarda mikroalgal metabolizması hakkında bir reviw yayınlandı. Deneysel ortamda sürdürülen devasa büyüklükteki algal kültürün optimal koşullar altında, gliserolden oluşan membran lipidlerini de içeren hücresel lipid miktarının oldukça az üretildiği gözlemlenmiştir[9].

Özellikle mikroalg biyokütlesi ve TAG'lar fotosentetik olaylar sırasında hücre metabolizmasında birbiriyle yarış halindedir. Yani buradaki amacımız mikroalgal biyokütle üretmekten ziyade mikroalgal yağ biyokütlesinin artırmaya yönelik uyarılmalar yapmamız olmalıdır. Yapılan birçok çalışmada istenmeyen çevre şartları ve çevre koşulları birçok algde lipid üretim yollarının yeniden modifikasyonunu sağlayarak nötral lipid üretiminin hücresel kuru ağırlığa oranla arttığını göstermiştir [9]. Aşağıdaki şekilde bunun için yapılan bir çalışmadan yapılan alıntılamaadır.



Şekil 5. Stres koşulları altında mikroalglerde üretiminin uyarılması [9]

Mikroalgler için yapılan birçok deneyde besin açlığına bırakma, ışıklandırma şartlarının değiştirilmesi, pH faktörü, sıcaklık, ağır metaller ve diğer kimyasal faktörlere maruz bırakma gibi çevresel faktörlerle alglerin üretiminde değişiklikler oluşturulduğunu gösterilmiştir[9]. Benzer bir şekilde 2017’ de yayımlanan bir çalışmada da Kun Shi, Zhen Gao ve ark.’ı *Oleagineus*’u besin açlığına ve uygun olmayan çevresel koşullara maruz bıraktıklarında ROS faktörlerinin oluştuğunu ve bu faktörlerin hücre içerisinde lipid üretimini uyardığı görülmüştür[18]. Yine benzer bir yaklaşımla Çakmak ve ark.’nın 2015’te yaptıkları bir çalışmada *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgini on gün boyunca farklı element (-N,-S,-P,-Mg) açlığına bıraktıklarında oluşan oksidatif stres elementlerinin nötral lipid üretimini önemli bir şekilde uyardığı görülmüştür[4].

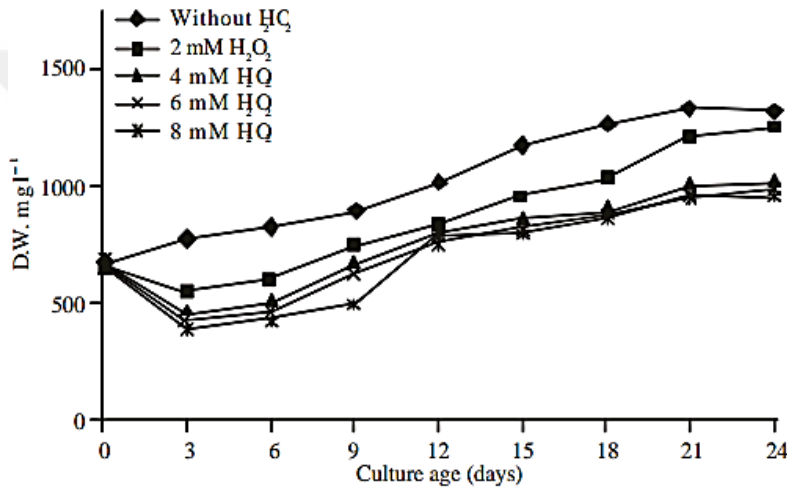


Şekil 6. Oluşan çevresel stres faktörlerine bağlı olarak ROS faktörlerinin hücre içerisinde lipit üretimini uyarması[18]

2014'te yapılan bir başka çalışmada ise Jianhua Fan ve ark., *Chlorella pyrenoidosa* türünü nitrojen, fosfor ve demir açlığına bıraktıklarında bu alglerde çok yüksek miktarda lipit üretiminin desteklendiği görülmüştür[19]. Bu çalışmalarda görüldüğü gibi abiyotik ve biyotik olarak çevre faktörlerinin değişmesi hücre içerisinde lipit yollarının aktive olmasını sağlamaktadır (Şekil 6.)

Bizim çalışmamızda belirli zaman aralıklarında ve belirli konsantrasyonlarda kimyasal bir stres faktörü olan hidrojen peroksit uygulaması yaparak mikroalglerde oluşan üretim mekanizmasının nasıl yanıt oluşturduğunu anlamak olmuştur.

Yapılan bazı çalışmalar göstermiştir ki H_2O_2 stres faktörüne maruz kalan hücrelerde antioksidan cevap oluşacağı için hücresel enzimlerin miktarında ve hücre büyüme oranında değişimler meydana gelmiştir[20]. Hanaa H. Abd El-Baky ve ark.'nin 2007 de *Spirulina plantensis* üzerinde yaptığı bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda mikroalg kültürüne uygulanan hidrojen peroksit stres faktörü hücrelerde antioksidan cevabı oluşturmuştur. Stres altına giren hücrelerin büyüme hızlarında düşüş meydana gelmiş ve hücre içerisinde cevap olarak antioksidan moleküller üretilmiştir[20].



Şekil 7. *Spirulina plantensis*'de hidrojen peroksitin hücre büyümesine etkisi[20]

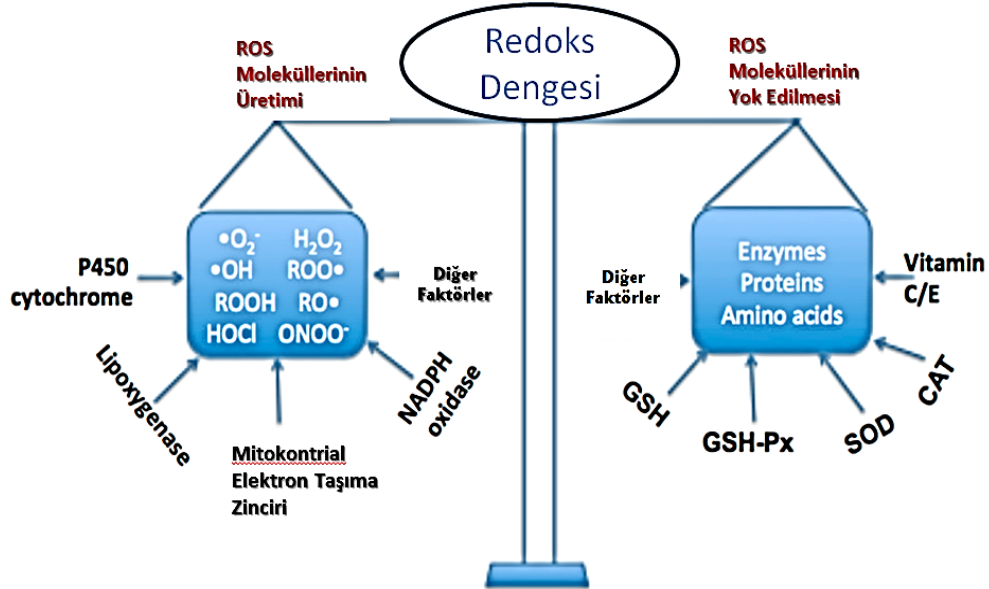
Hanaa H. Abd El-Baky ve ark. 'nin yaptığı çalışmada elde ettikleri bir diğer veri ise hidrojen peroksit antioksidan cevaba karşılıklı üretilen moleküllerden biri olan karetonid ve türevi olan moleküllerin miktarlarında önemli derecede artış görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda uyguladığı H_2O_2 oksidatif stres oluşturduğu için enzimatik antioksidan ve enzimatik olmayan antioksidan moleküllerde önemli derecede artış kaydedilmiştir[20].

Hanaa H. Abd El-Baky ve ark.'nin elde ettikleri bu veriler hidrojen peroksit hücre içi metabolik sistemde oksidatif strese cevapta antioksidan moleküllerin hücre içinde sentezlenme mekanizmasını indüklemektedir. Stres altına giren hücrelerin büyüme

hızlarında düşüş görülürken bu cevaba karşı oluşan antioksidant cevabla hücrede metabolik yolları yeniden düzenlenmiştir[20]

1.4 Mikroalglerde Stresi Tetikleyen Faktörler ve Hemostatik Denge

Mikroalgler yaşamları süresince birçok stres faktörü ile karşılaşmaktadırlar. Stres faktörleri Levitt'e göre biyotik ve fizikokimyasal (abiyotik) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır[21]. Biyotik faktörler; mikroorganizmaların (fungus, bakteri ve virüs) enfeksiyonu ve zararlı hayvanların saldırıları sonucu oluşan stres faktörleridir. Abiyotik faktörler ise su, sıcaklık, radyasyon, kimyasallar, manyetik ve elektriksel alanlar gibi çevre faktörleridir[21].



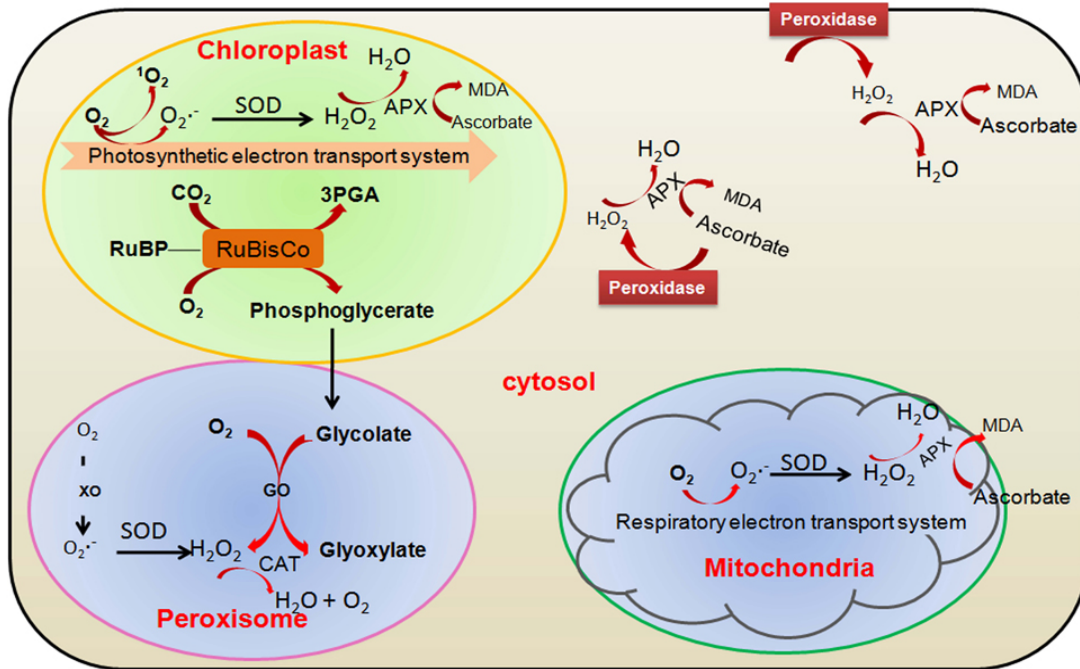
Şekil 8. Hücre içindeki hemeostatik denge[22]

Abiyotik bir stres kaynağı olan hidrojen peroksit mikroalglerde fotosentez, fotorespirasyon ve diğer metabolik faaliyetler sonucu da oluşabilen doğal bir moleküldür[22]. Mikroalgler kendi metabolik işlevlerini sürdürürken yan ürün olarak H_2O_2 oluşturmaktadır. Hücre içinde sürekli olarak oksidatif maddeler oluşurken bu maddelerin vereceği zararı en aza indirmek için hücre içerisinde sorumlu antioksidan

maddelerde üretilir.Yani hücre içersinde sürekli olarak homostatik dengenin sağlanması hücrelerin canlılığı için zorunlu bir olaydır(Şekil 8.)

1.5 Reaktif Oksijen Türleri

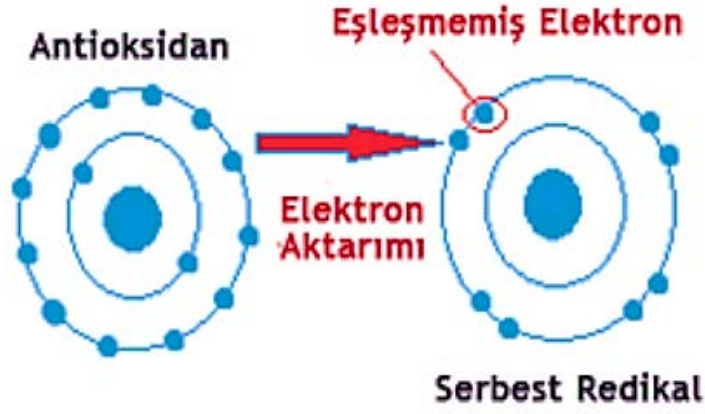
Molekül yapısında eşlenmemiş elektron taşıyan çok aktif saldırgan moleküllerdir. Kararsız formda bulunurlar ve kararlı hale gelebilmek için elektron fazlalığı bulunan moleküllere atak yaparlar yani onları elektronlarını alarak kendilerini kararlı forma dönüştürürler. Özellikle yapılarında çift bağ bulunan moleküllere saldırarak kararlı hale gelen bu moleküller çeşitli formlarda olabilmektedir. Örneğin hücre içinde temelde dört farklı grup halinde bulunan oksidatif madde olarak adlandırılan serbest radikaller; singlet oksijen (1O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH\cdot$) olarak gruplandırılabilir[23]. Hücre içerisinde özellikle kloroplast, peroksisom ve mitokondri gibi lokasyonlarda serbest radikaller oluşmaktadır(Şekil 9.)



Şekil 9.Hücre içerisinde serbest radikallerin oluştuğu çeşitli lokalizasyonlar[23]

1.6 Antioksidant Maddeler

Hücre içinde oluşan serbest radikallere yani oksidant maddelere elektron vererek onların kararlı hale geçmesini sağlayan moleküllerdir(Şekil 10.)



Şekil 10. Antioksidanlar tarafından serbest radikallerin nötralize edilmesi [20].

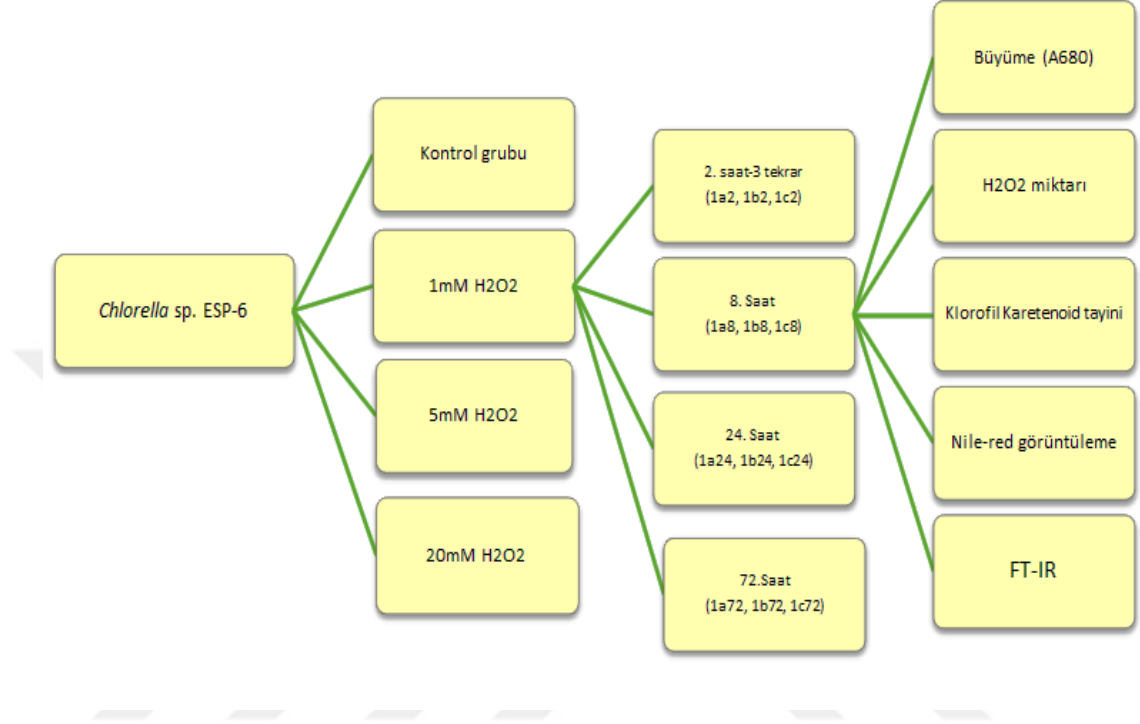
Antioksidanlar, enzimatik olmayan antioksidanlar ve enzimatik antioksidanlar olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Enzimatik olmayanlar, askorbik asit (AA), tokoferoller (vitamin E), karotenoidler, glutatyon ve fenolik bileşiklerdir. Enzimatik antioksidanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) olarak bilinmektedir. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar hücredeki lokalizasyonlarına ve rollerine göre farklılık göstermektedirler[24].

Aşağıdaki tablo I.'de enzimatik antioksidan ve enzimatik olmayan antioksidanların hücredeki yeri ve hücre içindeki lokalizasyonu sıralanmıştır [25].

Tablo I: Bitkilerde enzimatik olmayan ve enzimatik antioksidanların lokalizasyonları ve rolleri[25]

Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	Rolü	HücreSEL Lokasyonu
Askorbik Asit	Direk olarak $O_2^{\bullet -}$, OH^{\bullet} ve H_2O_2 'yu temizler.	Kloroplast, apoplast, vakuol, sitozol
Tokoferoller	Lipit peroksidasyonunu kırar. Lipit peroksitlerini $O_2^{\bullet -}$ ve OH^{\bullet} 'i temizler.	Bitkilerin tüm kısımlarında bulunur. Kloroplast membranlarında tokoferol yoğun olarak bulunur.
Karotenoidler	Peroksi radikalleri ile $O_2^{\bullet -}$ ve OH^{\bullet} 'i temizler.	Sitozol, vakuol
Glutasyon	Redoks döngüsünün bir substratı olarak, OH^{\bullet} ile 1O_2 'nin direk temizlenmesinde yararlıdır.	Sitozol, endoplazmik retikulum, vakuol, mitokondri
Fenolik Bileşikler	Antioksidan özelliklerini iyi birer hidrojen veya elektron vericisi olmaları, zincir kırıcı özellikleri ve geçiş metalleri ile şelat oluşturmaları ile gösterirler.	Sitozol, vakuol
Süperoksit Dismutaz (SOD)	$O_2^{\bullet -}$ 'i H_2O_2 'ye dönüştürür.	Kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizom
Askorbat Peroksidaz (APX)	H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir.	Kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizom
Katalaz (CAT)	H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir.	Peroksizom
Glutasyon Peroksidaz (GPX)	H_2O_2 'yi ve lipit peroksitlerini etkisizleştirir.	Kloroplast, sitozol, mitokondri, endoplazmik retikulum

2. MATERYAL VE METOT



Tablo II. Çalışma Planı

2.1 *Chlorella sp. ESP-6* Mikroalginin İzolasyonu ve Tanımlanması

2.1.1 Örnekleme Alanının Tanımı

Bir volkanın üst kısmı büyük bir gaz patlaması sonucunda havaya uçar ya da bacanın içine çökerse geride kalan büyük çukura “kaldera” ya da “patlama kazanı” denir. Van gölünün batısında, yakın zamana kadar volkanik faaliyetini sürdürmüş olan (en son 1441 yılında püskürmüştür) Nemrut stratovolkanının doruk noktası deniz seviyesinden 2935 metre yüksekliktedir. Bu volkanın tepesinde bulunan ve büyük bir patlama ile meydana gelen, ortalama 680 m derinliğinde ve yaklaşık 40 km²’lik bir yüzölçümüne sahip olan Nemrut Kalderası 42° 15' 25" - 42° 24' 48" kuzey enlemleri

+38° 31' 11" - 38° 36' 12" doğu boylamları arasında bulunur ve ölkemizin volkanizma faaliyetleri açısından en karakteristik ve orjinal yeryüzü şekillerinden birisidir (Şekil 9). Bu kaldera, içerisinde yer alan büyüklü küçüklü 5 göl, çok sayıda lav çıkış merkezi, lav hunisi, sıçratma konisi, sıcak su kaynakları, orjinal fauna ve florası ve kendine has mikroiklim özellikleri ile tam bir tabiat harikasıdır. Nemrut dağındaki orman örtüsü, kalderanın i duvarlarında 2900 m'ye kadar çıkmaktadır ki bu da yer yer 650 m derinliği olan kalderanın kendi mikroiklim özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Nemrut kalderası 2003 yılında "tabiat anıtı" olarak ilan edilmiştir.

Türkiye'nin en büyük krater gölü olan Nemrut Gölü bu kalderanın batı kesiminde, tabanda bulunur. Bir hilal şeklinde ve yaklaşık 15 km² lik bir yüz ölçümüne sahip Nemrut Gölü'nün yüzeyi, deniz seviyesinden 2247 m, Van Gölü'nden ise 600 m yüksekliktedir. Yüzey akımları, cılız pınarlar ve Ilıgöl'ün suları ile beslenen Nemrut gölü tatlı su özelliğindedir ve su derinliği ortalama 100m'dir. Nemrut gölünde bir takım belirgin olmayan sıcak buhar ıkışları ve gaz boşlukları bulunmaktadır. Az miktarda gaz çıkışı kaldera tabanında aktiftir. Gölde sonradan konulan ve hızla üreyen sazan balıkları yaşamaktadır.

Nemrut kalderasının kuzeydogu kısmına ise Nemrut jeotermal kaynaklarıyla beslenen ve yaklaşık 120 hektarlık bir alanı kaplayan Ilıgöl yerleşmiştir. Göl 600 m uzunlukta ve 500 m genişliktedir. Ilıgölün su sıcaklığı kış aylarında ortalama 15-20°C, yaz aylarında ise 45-50°C dolaylarındadır. Ilıgölü besleyen sıcak su kaynakları bikarbonat ve sodyumlu sulardır, bol miktarda karbondioksit (CO₂) de ihtiva etmektedir. Kaynak sularının total mineralizasyonları ise litrede 1 gramın üzerinde ve pH değeri 6,2 dir. Kıyılarında seyrek bitki örtüsü bulunan Nemrut Gölü'nün aksine, sıcak su kaynaklarıyla beslenen Ilıgöl çevresinde bir miktar sazlık görülür. Su yüzeyi kış aylarında çoğunlukla donan Nemrut gölüne kıyasla Ilıgölün suları hiç bir zaman donmaz.



Şekil 11. Nemrut Kalderası ve göllerinin yer bulduru haritası

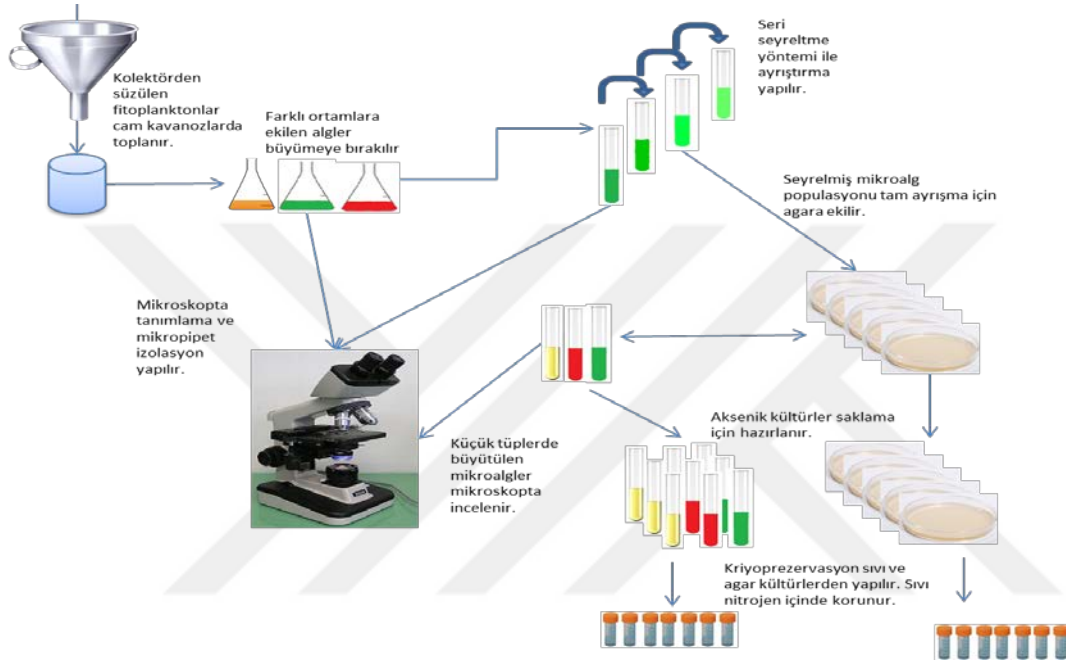
2.1.2. Örnekleme

Fitoplanktonik örnekler, 45 mikrometre por çapına sahip fitoplankton kepçesi yardımıyla dikey, yatay ve kıvrımlama çekim yöntemleriyle toplanmıştır. Laboratuvara taşınan su örneği seyreltme yöntemi ile saflaştırılmıştır.

Seyreltme yöntemleri genellikle besi yeri ortamında iyi büyüeyebilen mikroalglerin izolasyonunda başarılı bir yöntemdir. Fakat aksenik kültürlerin eldesi için bakteri kontaminasyonundan kurtulmaya yeterli değildir. Bunun için antibiyotik uygulaması gibi yöntemler de kullanılmıştır. Seri seyreltmede mikroskobik incelemelerle belirlenecek olan türler için seyreltme yapılmıştır. Genel hatları ile seyreltme yönteminde uygulanan yol şu şekilde özetlenebilir:

- a) İçlerinde steril 8 ml besiyeri çözeltisi bulunan 10 deney tüpünden ilkinde 2 ml zenginleştirilmiş numunedan konulup iyice karıştırılmıştır.
- b) Daha sonra bu tüpten aseptik koşullarda 2 ml alınarak bir sonraki tüpe aktarılmıştır. Bu işlem 10. Tüpe kadar tekrar edilmiştir.
- c) Uygun sıcaklık ve ışıktaki bu tüpler inkübasyona bırakılmış ve 15 gün sonra dilüsyon tüplerinden mikroskobik çalışma yapılmıştır.
- d) Tüplere düşen tek hücreler katı ve sıvı ortamlara alınarak saf kültürler üretilmiştir.

e) İzolasyon yöntemleri çoğu zaman belirli bir metodu izlemez, gözlem ve kantitatif analizler sonucu duyulan ihtiyaca göre en uygun metoda karar verilir ve uygulanır. Bu yüzden net bir metot akış şeması çıkarmak oldukça karmaşıktır. İzolasyon için uyguladığımız deneysel akış şeması basit haliyle Şekil 12’de resmedilmiştir.



Şekil 12. İzolasyon için uyguladığımız deneysel akış şeması

Saflaştırılarak morfolojik gözlemlerle tanımlanan mikroalgin kesin teşhisi sekans analizi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla türlerin genomik DNA'ları izole edilmiş ve 18S rRNA'nı kodlayan gen sekansını ve 5.8S ile 28S rRNA arasındaki bölgeyi kodlayan sekansı amplifiye edebilecek primerler tasarlanmış (Tablo III) ve izole edilen mikroalgin sekans analiz yapılmıştır. BLAST programına sekans sonuçları eklenerek en muhtemel türler belirlenmiş, %99 olasılıkla izole ettiğimiz türün *Chlorella sp. ESP-6* türü olduğu belirlenmiştir.

Tablo III. Çalışmada kullanılmış primerler ve sekansları

Primer Adı	Oryantasyon	Primer sekansı (5'-3')	Hedef	Uygulama
18S rRNA	Forward	TGATCCTTCYGCAGGTTAC	Eukaryota	PCR
	Reverse	ACCTGGTTGATCCTGCCAG		PCR
18S rRNA	Forward	ATTGGAGGGCAAGTCTGGT	Eukaryota	Sekans
	Reverse	ACTAAGAACGGCCATGCAC		Sekans

2.2 Mikroalglerin Kültüre Alınması ve Büyütülmesi

Saflaştırılarak kültüre alınmış olan *Chlorella sp.* ESP-6 türü mikroalgler için önerilen genel bir büyütme çözeltilisi olan BBM ortamında sürdürülmüştür

BBM BESİN ORTAMI

STOCK	STOCK SOLUTION	ml/Litre	
1. KH ₂ PO ₄	8.75 g/500 ml	10 ml	
2. CaCl ₂ .2H ₂ O	1.25 g/500 ml	10 ml	
3. MgSO ₄ .7H ₂ O	3.75 g/500 ml	10 ml	
4. NaNO ₃	12.5 g/500 ml	10 ml	
5. K ₂ HPO ₄	3.75 g/500 ml	10 ml	
6. NaCl	1.25 g/500 ml	10 ml	
7. Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	10 g/L	1 ml	
	KOH	6.2 g/L	
8. FeSO ₄ .7H ₂ O	4.98 g/L	1 ml	
	H ₂ SO ₄ (concentrated)	1 ml/L	
9. Trace Metal Solution	See below	1 ml	
10. H ₃ BO ₃	5.75 g/500 ml	0.7 ml	

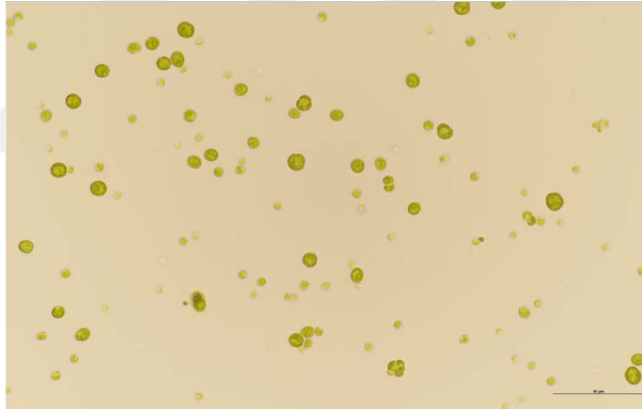
Adjust the pH to 6.8. OPTIONS: For 10% BBM, use 100 ml of 100% BBM/Litre of distilled water. The addition of 5 ml of soil extract is also beneficial to some algae.

Trace Metal Solution:

Substance	g/Litre
1. H ₃ BO ₃	2.86 g
2. MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81 g
3. ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222 g
4. Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.390 g
5. CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079 g
6. Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.0494 g

Tablo IV. *Chlorella sp.* ESP-6 türünün büyütüldüğü BBM ortamının içeriğine ilişkin tablo[26]

BBM ortamı uygun kimyasallarla belirli ölçekte hazırlandıktan sonra pH'ı 6.8 e ayarlanıp otoklavlanılmıştır. Daha sonra büyütme ortamının soğuması beklenmiş ve 100 ml gibi uygun ölçekteki erlen mayer içerisinde 50 ml sıvı BBM konulduktan sonra katı ortamdaki hücrelerin transferi sağlanmıştır. 23 °C sıcaklık ve 150 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık altında çalkalayıcıda (120 rpm) hücrelerin çoğalması beklenildi(Şekil 14.) Hücrelerimiz çoğalırken düzenli aralıklarla hücrelerin büyüme hızı ve saflığı kontrol edilmiştir. Hücrelerin saflığı sıvı ortamdaki lamel üzerine alınan örneğin ışık mikroskobu altında incelenmesi ile tespit edilmiştir(Şekil 13.) Hücre çoğalma hızı ise 680 nm lik uv spektrometresinde ölçüm yapılarak izlenmiştir. Hücrelerimizin saflığı kontrol edildikten sonra ve istediğimiz hücre yoğunluğuna (680nm' de-1) ulaştıktan sonra bu kültür içerisinde daha büyük erlen mayerlere ekim yapılmıştır. Steril lamina ortamında daha büyük kücre kültürlerine aktarım sağlandıktan sonra bu hücrelerin de belirli konsantrasyona ulaşması sağlanmıştır.



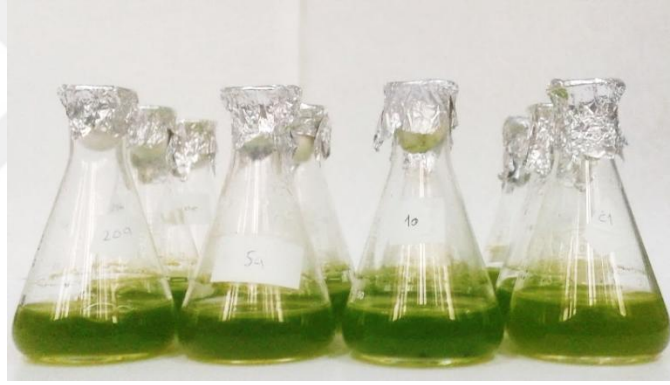
Şekil 13 : Işık mikroskobu altında *Chlorella sp.* ESP-6 (x40/50 μm)

Çoğalmasını beklediğimiz alg kültüründen saf örneklerimizin mikroskop altındaki görüntüsü yukarıdaki şekilde görülmektedir. x40'lık ışık mikroskobu altındaki bu kültürümüzden deneyin devamı sağlanmıştır.



Şekil 14. Sıvı ortama ekim yapıldıktan sonra kültürlerimizin 23 °C sıcaklık ve 150 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ luk ışık altında ve çalkalayıcıda (120 rpm) yetiştirilmesi

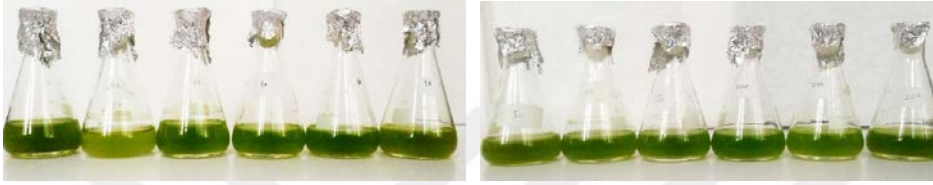
2.2.1 Deney Düzenine Hazırlanması



Şekil 15. Deney düzenine kurulması

Deney düzenine üçerli tekrarlar halinde ve 3 farklı zamanda yeniden yapılmıştır. Farklı zamanlarda yapılan tekrarlar aynı sonuçları vermiştir. Deney düzenine hazırlanırken üç tekrarlı kontrol grubu ve her biri yine üç tekrarlı içerisinde 1, 5, 20 μM 'lık H_2O_2 eklenilen deney grupları bulunmaktadır (Şekil 15.) Aşağıdaki şekilde de görüldüğü üzere hücre grupları hazırlanırken isimlendirme yöntemi kullanılmıştır. Kontrol grubu için C harfi kullanılmış ve üç tekrarlı olarak deney yapıldığı için C1, C2, C3 olarak kontrol grubu hazırlanmıştır. 500 ml'lik erlenlerin içerisinde 350 ml'lik hücre kültürü eklenmiştir.

Bezer şekilde 1 μM 'lık, 5 μM 'lık ve 20 μM 'lık gibi üç farklı konsantrasyonda hidrojen peroksit taşıyan hücrelerin isimlendirilişi ise 1a,1b,1c olarak adlandırılan 1 μM lık H_2O_2 konsantrasyonuna sahip üçer tekrarlı grup, 5a,5b,5c olarak adlandırılan 5 μM lık H_2O_2 konsantrasyonuna sahip üçer tekrarlı grup ve 20a,20b,20c olarak adlandırılan 20 μM lık H_2O_2 konsantrasyonuna sahip üçer tekrarlı gruptan oluşmaktadır. Toplamda 12 tane deney tüpü bulunmaktadır(Şekil 16.)



Şekil 16. a) Şekilde erlen mayerdeki en baştan sağa doğru C1,C2,C3 olan üçer tekrarlı kontrol grubu ve sağda 1a,1b,1c olarak adlandırdığımız 1 μM lık H_2O_2 konsantrasyonuna sahip üçer tekrarlı grup bulunmaktadır.

b) Şekilde erlen mayerdeki en baştan sağa doğru 5a,5b,5c olan üçer tekrarlı 5 μM 'lık H_2O_2 konsantrasyonuna sahip hücre grubu ve sağda 20a,20b,20c olarak adlandırdığımız 20 μM lık H_2O_2 konsantrasyonuna sahip üçer tekrarlı grup bulunmaktadır.

Herbir deney grubu C1,C2,C3;1a,1b,1c;5a,5b,5c;20a,20b,20c olan hücrelerden ışık mikroskonu altında inceleme yapmak için preperat hazırlandı ve fotoğrafları çekildi.

2.3 Nötral Lipidlerin Tayini İçin Mikroalglerin Nil-Kırmızısı ile Boyanması

Nile Red boyoma hücrelerdeki tayini için kullanılmaktadır. Hücrelere uygulanan Nile Red membranlardaki veya hücre içindekilere bağlanarak onların kantitatif ve kalitatif varlığını gösterirler. Biz de bu amaçla Thermo Fisher adlı firmadan temin ettiğimiz Nile Red boyasını kullandık.

Hücrelerimiz protokale uygun olarak Nile Red boyama ile boyandıktan sonra floresans mikroskop altında incelendi ve resimleri çekildi.

Hücreler boyanmadan önce Thermo Fisher' den temin edilen Nile Red boyasından stok solusyon (0.25 mg/mL) hazırlandı. 40 ml asetonun içerisine 0.01 g Nile Red boyası

eklendi. Işık geçirmeyem bir stoğun içerisinde alınarak bu karışımın birbiri içerisinde çözülmesi sağlandı.(Volume 2015, Article ID 695061) Daha sonra belirli saattlerde alınan hücrelerin 0,2 deki absorbansları hesaplanıp besi ortamı ile 1 ml'ye tamamlanıldı. Karanlık ortamda gerçekleştirilen deneyde 1 ml'ye tamamlanan hücrelerin üzerine hazırlanan stok solusyondan 5 µl eklendikten sonra rotatorda 15 dk inkübe olması sağlandı. Daha sonra 1000 rpm'de 2 dk santrifüjleme işlemi yapıldı. Böylece boyanın hücre içerisine girmesi sağlandı. Santrifüj olan hücrelerin üzerindeki süpernatanttan 800µl alınıp uzaklaştırıldı. Dipteki örneğe hücrelerin büyüdüğü büyütme çözeltilisinden 800µl tekrar eklenildi. Böylece hücrelerimizin yıkanmasını sağlayarak mikroskop altında net bir görüntü vermesini sağlandı [27].

Hücreleri mikroskop altında incelemek için hücre preparatı hazırlanıldı. Lam üzerine 20 µl litre kadar Nile red ile boyanmış hücrelerden koyulup lamelle yayılarak kapatıldı. Daha sonra floresan mikroskop altında incelenerek hücrelerin fotoğrafları çekildi.

2.4 Hidrojen Peroksit Tayini İçin Mikroalglerin Hazırlanması

Deney için (- 80 °C)'de saklanan örnekler oda şartlarına alındı ve üzerlerine 2 ml saf su eklenildi. Birkaç dakika alt üst edildikten sonra 3000 rpm de 3 dk santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırıldı. Bu aşamayla hücrelerin yıkanması sağlandı. 0.1 % (w/v) oranında TCA çözeltisi hazırlandı. 100 ml saf suyun içerisine 0.1 gr TCA ekleyerek hazırlanan çözeltiliden 2 ml alınıp bütün örneklerin üzerine eklenildi. Rotatorda 5 dk döndükten sonra her bir örnek 12000 g de 15 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj yapıldıktan sonra örneklerimizin üzerindeki süpernatant kısmından mikropipetle 0.5 ml alıp 2 ml lik küvetlerin içine aktarıldı. Küvetlere aktarılan süpernatantın üzerine pH'ı 7.0 olan 10 mM'lık potasyum fosfat çözeltilisinden 0.5 ml ve 1 M'lık KI çözeltilisinden 1 ml eklenildi. Süpernatantın koyulduğu ve üzerine çözeltilerin eklenildiği küvetin 390 nm de absorbansı ölçüldü. Kör olarak kullanılan küvetlerin içerisine 0.5 ml TCA, 0.5 ml potasyum fosfat çözeltisi ve 1 ml KI çözeltisi eklenildi[28].

2.5 Klorofil ve Karotenoid İçeriklerinin Analizi İçin Mikroalglerin Hazırlanması

Derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edilen örnekler kullanıldı. 15 ml'lik falkon tüplerdeki örneklerin her birinin üzerine 500 mikrolitre su eklendi ve kapağı kapatılarak 3 dakika alt üst edildi.

Böylece hücrelerin yıkanması sağlandı. Daha sonra eklenen suyun dışarı atılması için 3000 rpm de ve 3 dk santrifüj yapıldı. Hücreler tekrar dibine çöktü ve üstte kalan su mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

Elimizde bulunan örneklerin her birine 90 % lık 500 mikrolitre aseton eklendi. Aseton eklendikten sonra hücreler 15 ml lik falkon tüplerden alınıp 2 ml lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Örnekler bu şekilde 15 dakika rotatorda alt-üst edildi.

Rotatorda iyice karıştırılan örnekler 5 dakika 15000 rpm de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra herbir örneğin süpernatant kısmından 240 mikrolitre alınıp 96'lık well platelere aktarıldı.

Cihaza yerleştirilen 96'lık well platelerin 750, 664, 647, 470 ve 630 nm de absorbanları ölçüldü. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilen denkleme uygun bir şekilde hesaplandı [29].

$$\begin{aligned} \text{Klorofil a} &= (11.85 * (E664 - E750) - 1.54 * (E647 - E750) - 0.08 (E630 - E750)) * \text{seyreltme} \\ \text{Klorofil b} &= (-5.43 * (E664 - E750) + 21.03 * (E647 - E750) - 2.66 (E630 - E750)) * \text{seyreltme} \\ \text{Klorofil c} &= (-1.67 * (E664 - E750) - 7.60 * (E647 - E750) + 24.52 (E630 - E750)) * \text{seyreltme} \\ \text{Toplam Karotenoid} &= (1000 E470 - (1.86 * \text{Chla}) - (74.08 * \text{Chlb})) / 206 \end{aligned}$$

2.6 FT-IR Analizi İçin Mikroalglerin Hazırlanması

Deney için (-80 °C)'de muhafaza edilen örnekler alınıp 3 saat boyunca liyofilizatörde kurutuldu. Ardından 2 saat boyunca 40 °C sıcaklık altında etüvde bekletildi.

Kuruyan örneklerin her birinden belli miktarda numuneler alınıp FTIR(Fourier Transform Spektroskopisi) cihazında ölçümleri yapıldı. TAG miktarının tayini için (1652 cm^{-1}) amid / (1744cm^{-1}) triağılglicerol FT-IR oranı kullanıldı.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 *Chlorella sp. ESP-6* Mikroalginin Tanımlanmasına İlişkin Bulgular ve Sonuçlar

Nemrut gölünden saflaştırılarak kültüre alınan *Chlorella sp. ESP-6* türü DNA ekstraksiyonu, PCR ve sekans analizi sonucunda elde edilen dizi (Tablo V.) BLAST analizi ile değerlendirilmiştir.

Tablo V. *Chlorella sp. ESP-6* türüne ait sekans analiz sonucu.

```
TCCCTAGAGTAACTTTTATCCGTTGAGCGACGGCCCTTCCACGCGGAACCGTCGGAT
CACTAAGGCCGGCTTTCGCCCTGCTCGACTTGTAGGTCTTGCAGTCAAGCTCCCTT
CTGCCTTTACTACTACGGCTGATTTCCGTCCAGCCTGAGGGAACCTTTGCACACCT
CCGTTACCTTTTAGGAGGTGACCGCCCCAGTCAAAGTCCACCTGAAACTGTCAAG
CGTCCTGCTTCAAGGAACGCCATTAGAATTCTAGCTCCTCCAGAGTGGTCTCTCACT
GATGGCTCCAGTTTYCCCGAAAAAACTTTCAACGCCTCCACCTAGGCTGCGCAA
GAAGAGCCCGAACCAATTCCAAGCTACAGTCAAGCTTCATAGGGTCTTTCTGTC
```

BLAST analizi sonucu izole edilen türün çok yüksek benzerlik oranı ile *Chlorella sp. ESP-6* türü olduğu anlaşılmıştır (Tablo VI.)

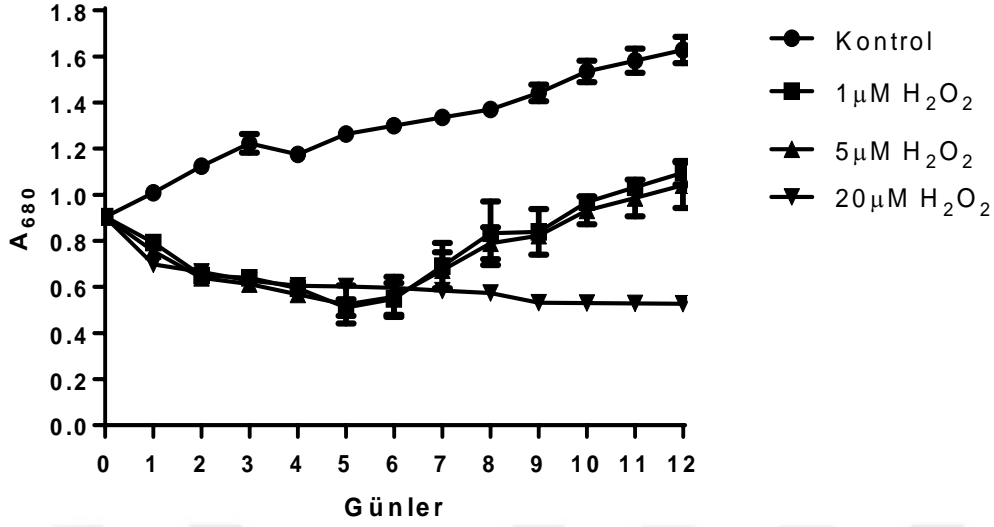
Tablo VI. *Chlorella sp. ESP-6* nolu örneğin DNA dizi analizi sonrasında elde edilen sekansının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Mikroalg Türleri	% Homoloji
<i>Chlorella sp. ESP-6</i>	HM070293.1	Chlorella sp. ESP-6	%99
<i>Chlorella sp. ESP-6</i>	HQ914635.1	<i>Chlorella variabilis</i>	%99
<i>Chlorella sp. ESP-6</i>	AB001684.1	<i>Chlorella vulgaris</i> C-27	%99
<i>Chlorella sp. ESP-6</i>	GU939612.1	Chlorella vulgaris ESP-31	%99
<i>Chlorella sp. ESP-6</i>	HE978273.1	Chlorella sp. FSP-E	%98

3.2 *Chlorella sp. ESP-6* 'ün Büyüme Analizine İlişkin Bulgular ve Sonuçlar

Aşağıdaki şekilde alg kültürümüzün 0., 8., 24., 48., 72. ve 144. saatteki büyüme hızı gösterilmiştir.

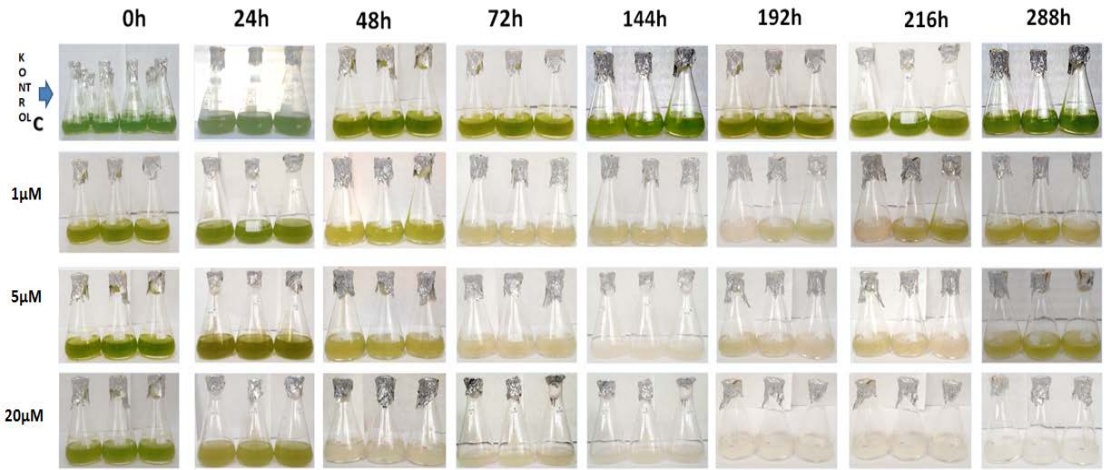
Şekil 17' de kontrol grubundaki hücreler izlenen gün boyunca büyümelerini devam ettirmiş fakat 1, 5, 20 μ M H₂O₂ stresi uyguladığımız hücrelerde daha ilk günden büyümenin baskılandığı görülmüştür. Bu azalma tüm deney gruplarında 6. güne kadar devam etmiştir. 6. günden sonra 1, 5 μ M H₂O₂ stresi uyguladığımız hücreler büyümede meydana gelen baskılanmayı yenmiş ve hücre çoğalmasını devam ettirmişlerdir.



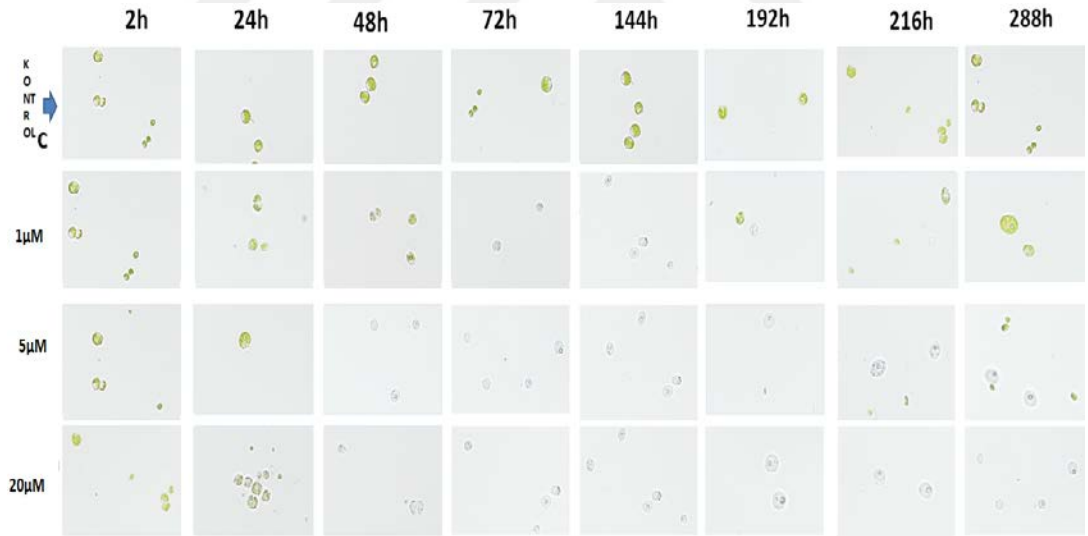
Şekil 17. Artan yoğunluklarda H₂O₂ uygulanan mikroalglerin büyümelerinde meydana gelen değişim

Mikroalglerin büyümesi ortama 1, 5 veya 20μM H₂O₂ ilave edildiğinde ilk gün sırasıyla yaklaşık %21, %25 ve %31 oranında baskılanmıştır(Şekil 17.) Büyümedeki baskılanma zamana bağlı olarak artmış ve 5. günün sonunda büyümedeki baskılanma sırasıyla %59, %60 ve % 62 olarak belirlenmiş, bu süreden sonra 1 ve 5μM H₂O₂ ilave edilmiş olan grupta yeniden büyüme gerçekleşmeye başlamış ve büyümedeki baskılanma azalmış ve hatta büyüme hızlanmıştır. Büyümedeki baskılanma 1 ve 5uM H₂O₂ uygulanan gruplarda 12 günlük inkübasyonun sonunda %32 ve %36 düzeylerinde iken 20uM H₂O₂ uygulanmış olan grupta büyümedeki baskılanma artmış ve %68 ile en yüksek değere ulaşmıştır.

Şekil 18.'de sunulan erlen görüntülerinden ve Şekil 19.'da ışık mikroskobundan alınan verilerden de görüldüğü gibi 1 ve 5uM gibi düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında büyüme ortamında belli bir süre sonra (bu çalışmada 4-6 gün arası) hücreler yeniden çoğalmaya başlayabiliyor. Mikroskop görüntüleri de düşük konsantrasyonda H₂O₂ uygulanan gruplarda ortalama 5 günün sonunda yeni hücrelerin meydana geldiğini doğruluyor (Şekil 19.) Dolayısıyla bu yolla uygulanan stres uygulaması ile strese dayanıklı yeni bireyler elde edilebilir. Bu sonuç bu çalışmanın ana hedefi olmasa da yeni bir bulgu olarak kaydedilmiştir.

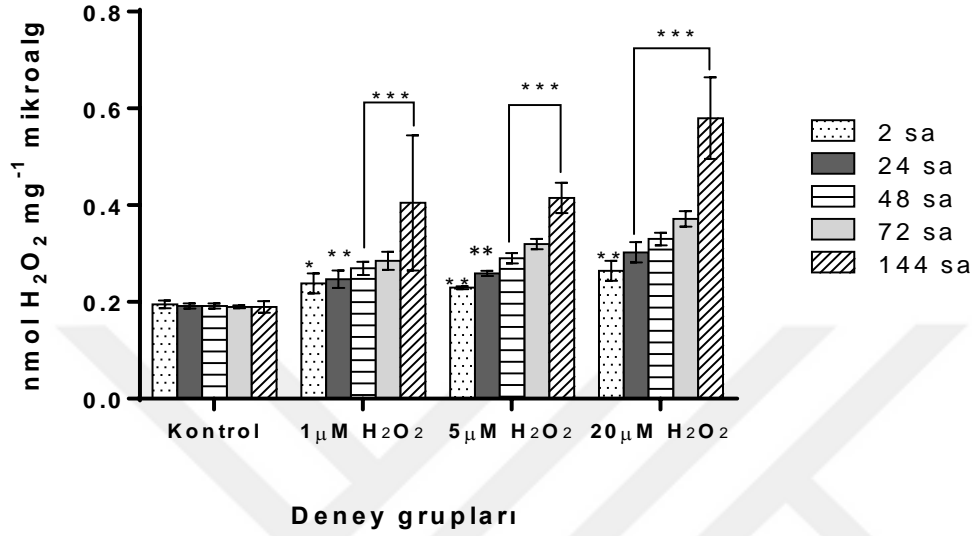


Şekil 18. Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ stresine maruz bırakılan hücrelerin dışardan alınan görüntülerinde meydana gelen değişim



Şekil 19. Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ stresine maruz bırakılan hücrelerin ışık mikroskobu altındaki görüntülerinde meydana gelen değişim (x40/10µm)

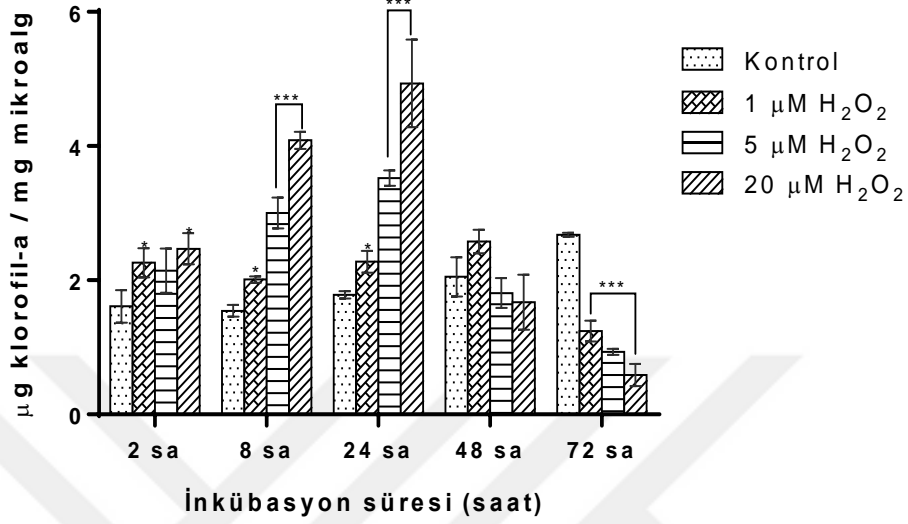
3.3 Mikroalglerin İçerdikleri Hidrojen Peroksit Miktarlarının Tayinine İlişkin Bulgular ve Sonuçlar



Şekil 20. Mikroalglerin H₂O₂ içeriklerinde zamana bağlı olarak meydana gelen değişim

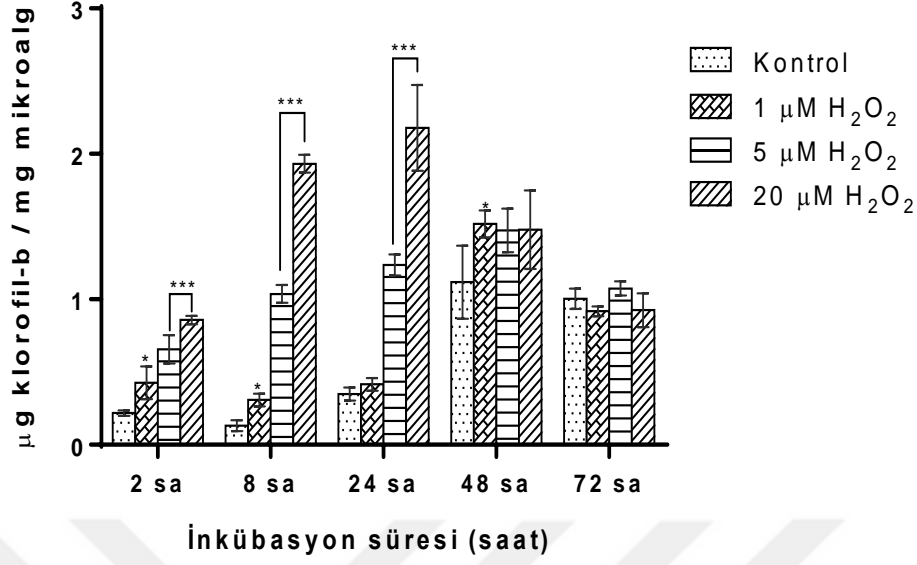
Şekil 20’de görüldüğü gibi mikroalglerin hücresel H₂O₂ konsantrasyonları ortama uygulanan H₂O₂ konsantrasyonları ile orantılı göstermiştir. Ortam H₂O₂ konsantrasyonu arttığında mikroalglerdeki H₂O₂ konsantrasyonu da yüksek değerlerde bulunmuştur. Uygulamanın ilk gününde 1, 5 ve 20 uM H₂O₂ uygulanan türlerde kontrole kıyasla sırasıyla %22, %18 ve %36 düzeylerinde daha yüksek olarak belirlenen hücresel H₂O₂ konsantrasyonları 5 günlük inkübasyon periyodunun sonunda sırasıyla %113, %119 ve %205 oranında daha yüksek değerler olarak belirlenmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerde 2,24,48,72,144. saatlerde hücrelerdeki H₂O₂ miktarı aynı seviyelerde iken 1µM, 5µM, 20µM’lık H₂O₂ stresi uyguladığımız deney hücrelerinde zamana bağlı olarak hücre içindeki H₂O₂ seviyesinde artış görülmüştür. Benzer şekilde El Baky ve ark., 2007’ de ve Büyük İ ve ark.’nın 2012 de yaptığı çalışmalar sonucunda alglere uygulanan H₂O₂ stresi faktörü sonucunda hücrelerdeki H₂O₂ konsantrasyonlarının arttığı gözlenmiştir.

3.4 Mikroalglerin Klorofil ve Karotenoid İçeriklerinde Meydana Gelen Değişimlere İlişkin Bulgular ve Sonuçlar



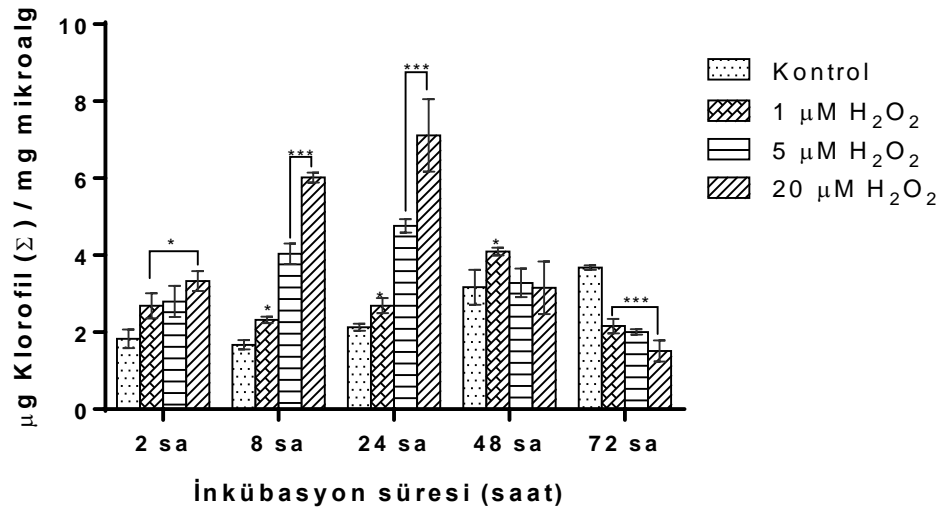
Şekil 21. H₂O₂ stresine maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen *klorofil-a* miktarındaki değişim

Şekil 21’de görüldüğü gibi 1µM, 5µM, 20µM’lık H₂O₂ stresi uyladığımız deney grubu hücrelerinde zamana bağlı olarak klorofil-a miktarında farklı cevaplar oluşmuştur. 1µM, 5µM, 20µM’lık H₂O₂ stresi uyladığımız mikroalglerin Klorofil-a içerikleri ilk 24 saatte artmış, daha sonra önemli oranda azalmıştır. H₂O₂ uygulamasından sonraki ilk iki saat içerisinde 1, 5 ve 20 uM H₂O₂ uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %40, %33 ve %53 oranında artış belirlenmiş bu artışlar 24 saatin sonunda sırasıyla yaklaşık olarak %28, %97 ve %177 oranlarında artışlar olarak belirlense de takip eden günlerde klorofil parçalanması sonucu klorofil-a miktarında önemli oranda azalma gözlemlenmiştir. 72 saatlik inkübasyonun sonunda klorofil a miktarı 1, 5 ve 20uM H₂O₂ uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %53, %65 ve %78 oranında daha düşük olarak kaydedilmiştir.



Şekil 22. H₂O₂ stresine maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen *klorofil-b* miktarındaki değişim

1µM, 5µM, 20µM'lık H₂O₂ stresi uyguladığımız mikroalglerin Klorofil-b içerikleri ilk 24 saatte artmış, daha sonra önemli oranda azalmıştır(Şekil 22.) H₂O₂ uygulamasından sonraki ilk iki saat içerisinde 1, 5 ve 20 uM H₂O₂ uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %95, %200 ve %293 oranında artış belirlenmiş bu artışlar 24 saatin sonunda sırasıyla yaklaşık olarak %19, %254 ve %524 oranlarında artışlar olarak belirlense de takip eden günlerde klorofil parçalanması sonucu Klorofil-b miktarında önemli oranda azalma gözlemlenmiştir. 72 saatlik inkübasyonun sonunda Klorofil b miktarı 1, ve 20uM H₂O₂ uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %8, ve %7 oranında daha düşük olarak kaydedilmiştir.



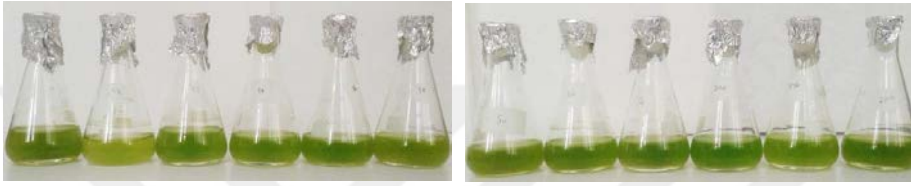
Şekil 23. Mikroalglerin toplam klorofil içeriklerinde meydana gelen değişim

1µM, 5µM, 20µM'lık H₂O₂ stresi uyladığımız mikroalglerin toplam Klorofil içerikleri ilk 24 saatte artmış, daha sonra önemli oranda azalmıştır(Şekil 23.) H₂O₂ uygulamasından sonraki ilk iki saat içerisinde 1, 5 ve 20 uM H₂O₂ uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %49, %52 ve %81 oranında artış belirlenmiş bu artışlar 24 saatin sonunda sırasıyla yaklaşık olarak %26, %123 ve %233 oranlarında artışlar olarak belirlense de takip eden günlerde klorofil parçalanması sonucu toplam klorofil miktarında önemli oranda azalma gözlemlenmiştir. 72 saatlik inkübasyonun sonunda toplam klorofil miktarı 1, 5 ve 20uM H₂O₂ uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %41, %45 ve %58 oranında daha düşük olarak kaydedilmiştir.

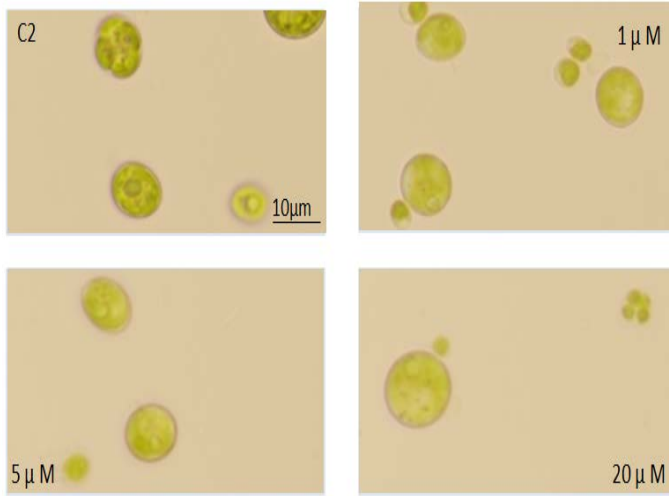
Deney Grubuna H₂O₂ eklendikten sonra ışık mikroskobu ile fotoğrafların çekilmesi sonucu elde ettiğimiz veriler mikroalglerdeki toplam klorofil miktarının zamana göre değişim miktarı ve süresiyle paralellik göstermektedir. Aşağıda bununla ilgili veriler sunulmuştur. Yapılan bu çalışmalar Kalpesh K. Sharma ve ark.'nın 2012' de ve El Baky ve ark., 2007' deki çalışma sonuçlarıyla örtüşmektedir.

Aynı zamanda yapılan birbaşka çalışmada çevresel stres faktörleri hücre içerisinde ROS moleküllerinin oluşmasını tetiklemekte ve bu moleküllerde kloroplastlardaki klorofil moleküllerinin yıkıp, hücre sitoplasmasında lipid damlacıklarının birikmesine yol açtığı mekanizmalar yardımıyla gösterilmiştir[30].

3.4.1 2. Saatten Alınan rnekler

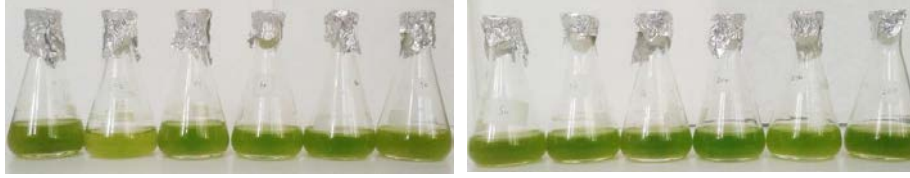


şekil 24. Deney grubunun 2. saatteki dışardan çekilen görüntüsü



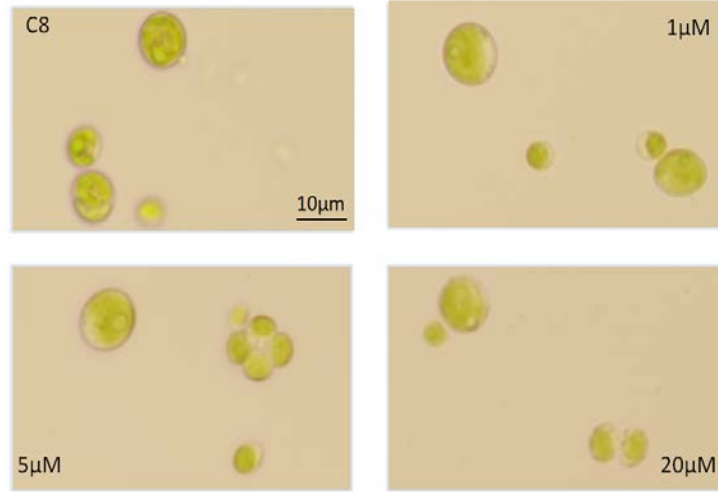
şekil 25. Deney grubunun 2. saatteki mikroskop görüntüsü (x40)

3.4.2 8. Saatten Alınan Örnekler



Şekil 26. Deney grubunun 8. saatteki dışardan çekilen görüntüsü

Yukarıdaki şekilde kurulan deney düzeneğinin sekizinci saatte dışarıdan çekilen resimleri görülmektedir.

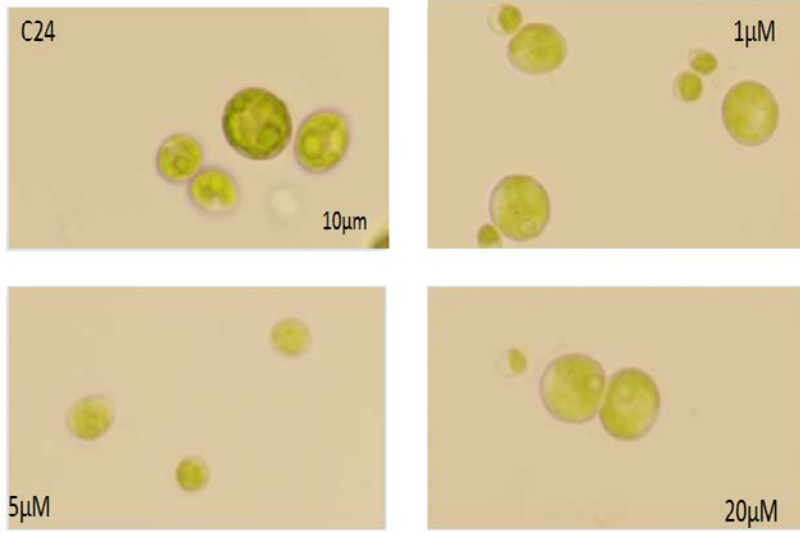


Şekil 27. Deney grubunun 8. saatteki mikroskop görüntüsü (x40)

3.4.3 24. Saatten Alınan Örnekler

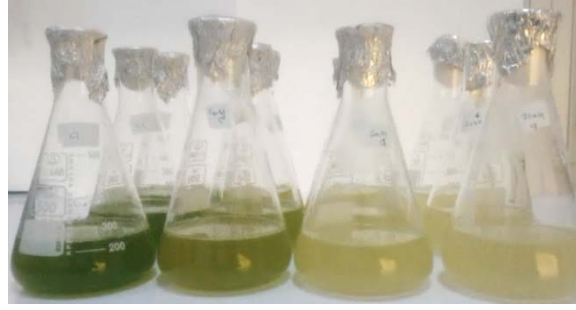


Şekil 28. Deney grubunun 24. saatteki dışardan çekilen görüntüsü

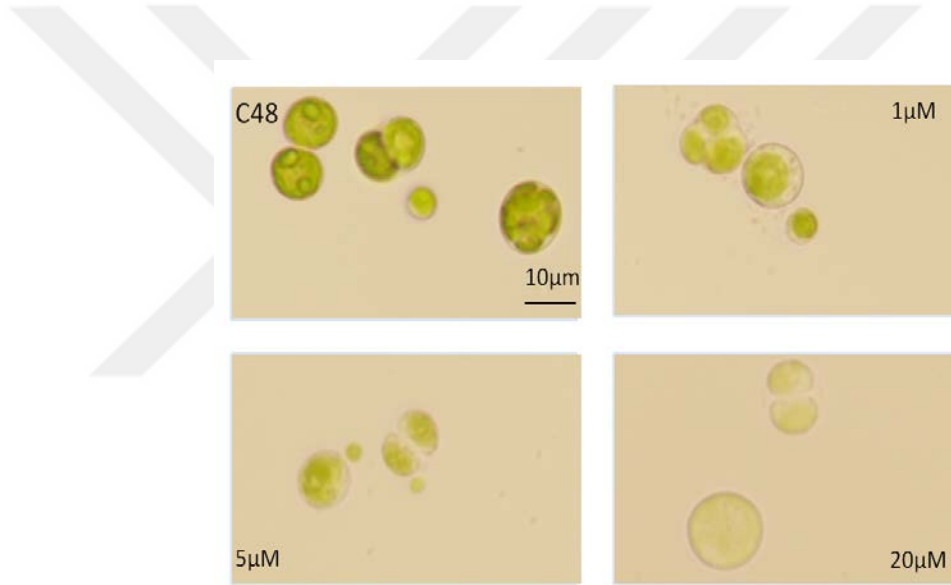


Şekil 29. Deney grubunun 24. saatteki mikroskop görüntüsü (x40)

3.4.4 48. Saatten Alınan Örnekler



Şekil 30. Deney grubunun 48. saatteki dışardan çekilen görüntüsü

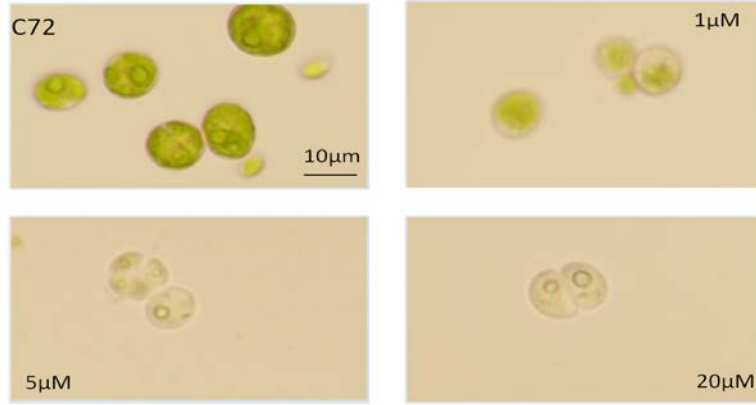


Şekil 31. Deney grubunun 48. saatteki mikroskop görüntüsü (x40)

3.4.5 72. Saatten Alınan Örnekler

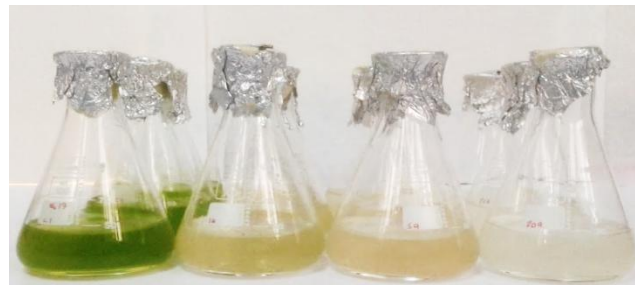


Şekil 32. Deney grubunun 72. saatteki dışardan çekilen görüntüsü

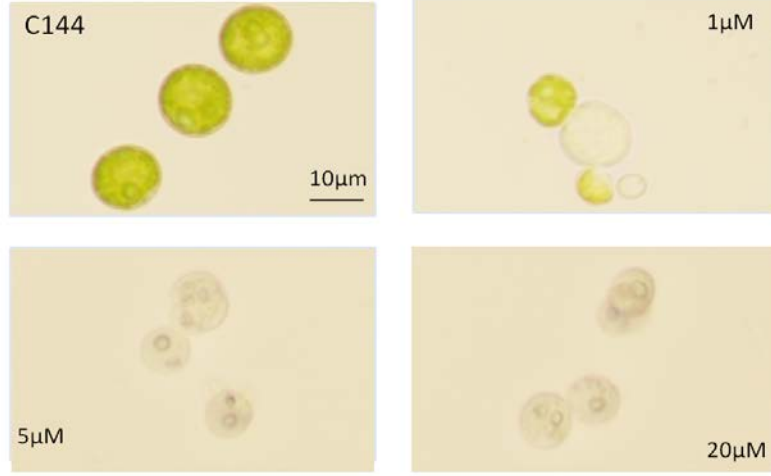


Şekil 33. Deney grubunun 72. saatteki mikroskop görüntüsü (x40)

3.4.6 144. Saatten Alınan Örnekler



Şekil 34. Deney grubunun 144. saatteki dışardan çekilen görüntüsü

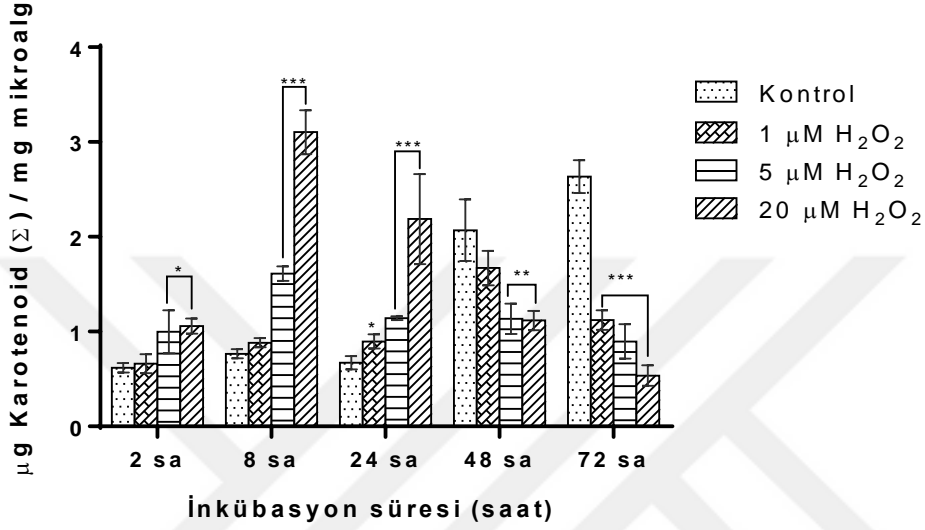


Şekil 35. Deney grubunun 144. saatteki mikroskop görüntüsü (x40)

Şekil 24., Şekil 25.,, Şekil 35.'te de görüldüğü gibi 2, 8, 24, 48, 72 ve 144 saat inkübasyon süresince mikroalglerdeki klorofil miktarındaki değişim morfolojisine yansımıştır. Artan miktarlarda uygulan H_2O_2 miktarına bağlı olarak bu koşullarda inkübasyon süresi 24, 48, 72. Ve 144. saate ulaştığında mikroalgler beyazımsı renge dönmektedir. Bu da digger verilerin ışığında bize göstermektedir ki mikroalgler 24. saatten sonra klorofil moleküllerini yıkıp başka moleküllere dönüştürmektedir. Yapılan bu çalışmalar Kalpesh K. Sharma ve ark.'nın 2012' de ve El Baky ve ark., 2007' deki çalışmayla uyuşmaktadır.

Algler üzerinde yapılan birçok çalışma göstermiştir ki stress faktörlerine maruz kalan hücreler özellikle kloroplasttaki bazı molekülleri yıkıp lipid üretim yollarını aktive etmektedir. Krzysztof Zienkiewicz ve ark. 2016' da yaptıkları bir çalışmada stress faktörlerinin lipid üretimini uyardıkları görülmüştür. Kloroplasttaki dönüşüm mekanizmaları TAG moleküllerinin sitoplazmada birikmesine neden olmuştur[31]. Yaptığımız çalışma görüntülerinin de desteklediği gibi stres faktörlerine maruz kalan alglerde ki klorofil molekülleri yıkıldığından dolayı beyaz renge dönüşmektedir. Bu dönüşüm olaylarında

floresan görüntülerinde desteklediği gibi TAG moleküllerinin üretimesinin rolü göze çarpmaktadır.



Şekil 36. H₂O₂ stresine maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen *karotenoid* miktarındaki değişim

Alglerde fotosentez olayı kloroplastlarda gerçekleşir ve hücre içi enerji döngüsünün devamlılığı için hayati bir öneme sahiptir. Mikroalglerde istenilen ölçüde fotosentez olayının gerçekleşmesi için görevli olan klorofil a miktarı ve karotenoid miktarının hücre içerisinde belirli ve dengeli seviyede olması gerekmektedir.

Şekil 34. de görüldüğü gibi mikroalglerdeki zamana ve H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak toplam klorofil miktarındaki değişime benzer sonuçlar alglerdeki karotenoid miktarındaki değişime paralellik göstermiştir.

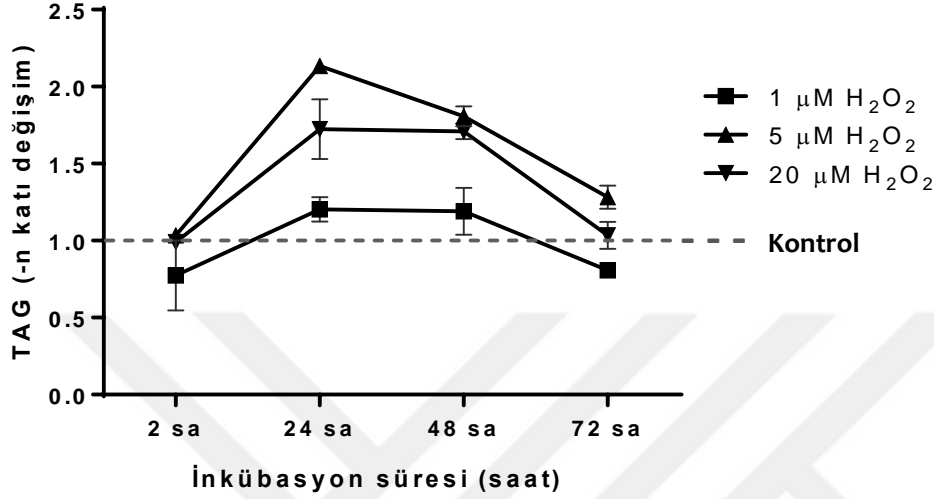
Bizim sonuçlarımız göstermektedir ki H_2O_2 stres faktörüne maruz bırakılan hücrelerde toplan klorofil ve karetenoid miktarı 8. ve 24. Saatte kadar önemli bir artış gösterirken 24. saatten sonra toplam klorofil ve karetenoid miktarında belirli oranda azalma meydana gelmiştir. $1\mu M$, $5\mu M$, $20\mu M$ 'lık H_2O_2 stresi uyguladığımız mikroalglerin karetenoid içerikleri ilk 24 saatte artmış, daha sonra önemli oranda azalmıştır.(Şekil 36.) H_2O_2 uygulamasından sonraki ilk iki saat içerisinde 1, 5 ve 20 μM H_2O_2 uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %6, %46 ve %70 oranında artış belirlenmiş bu artışlar 24 saatin sonunda sırasıyla yaklaşık olarak %33, %69 ve %202 oranlarında artışlar olarak belirlense de takip eden günlerde önemli oranda azalma gözlemlenmiştir. 72 saatlik inkübasyonun sonunda karetenoid miktarı 1, 5 ve 20 μM H_2O_2 uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %57, %68 ve %79 oranında daha düşük olarak kaydedilmiştir.

Salguero A. ve arkadaşlarının 2003' te yaptıkları *Dunaliella bardawil* türü üzerindeki bir çalışmada oksidatif stres altına giren hücrelerin antioksidant cevap olarak karetenoid moleküllerini ürettiğini gözlemlemiştir[32].

Yaptığımız çalışma da bunu doğrular niteliktedir. Stres altına giren mikroalgler ilk 24 saatte karetenoid miktarında özellikle 20 μM konsantrasyona sahip deney grubunda büyük bir artış göstermiştir.

Bir diğer taraftan El Baky ve ark.'nın 2007 de *Spirulina plantensis* üzerine çalışmalarda da benzer sonuçlar görülmüştür. El Baky ve ark.'nın yaptığı çalışma da de *Spirulina plantensis* üzerine 2, 4, 6 ve 8 μM H_2O_2 uygulaması sonucunda hücrelerdeki karetenoid miktarının H_2O_2 konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür.

3.5 FT-IR Analizine İlişkin Bulgular ve Sonuçlar



Şekil 37. $1744\text{cm}^{-1}/1652\text{cm}^{-1}$ oranına göre “TAG” miktarının FTIR ile hesaplanmasına ilişkin sonuçlar

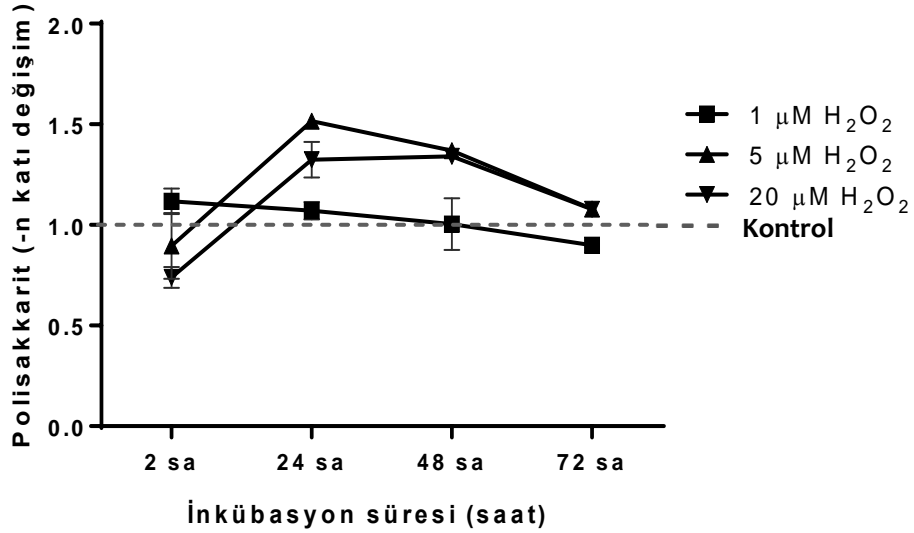
Yapılan birçok çalışmada istenmeyen çevre şartları ve çevre koşulları birçok algde üretim yollarının yeniden modifikasyonunu sağlayarak nötral üretiminin hücrel kuru ağırlığa oranla arttığını göstermiştir[4][9]. Buna benzer bir şekilde yaptığımız çalışma sonucunda mikroalglerdeki TAG miktarının artışı mikroalglerdeki toplam kuru ağırlığın artışıyla ilişkilidir.

Şekil 37.'ye bakıldığında farklı konsantrasyonlarda ve farklı saatlerde H₂O₂ stresine maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen TAG miktarındaki değişim gösterilmiştir. 24. saatte kontrol grubuna göre mikroalglerdeki TAG miktarı ve 5μM'lık H₂O₂ konsantrasyona sahip deney grubunda yaklaşık 2 kat artış göstermiştir. 72. Saatin sonuna ulaştığımızda %70 oranında düşüş görülmüştür. Benzer bir şekilde diğer deney gruplarında da 24. Saate kadar önemli bir artış olurken, ilerleyen saatlerde TAG miktarında düşüş görülmüştür. Burada da görüldüğü gibi en uygun

inkübasyon süresi 24. saatlerin sonu iken; en uygun H₂O₂ konsantrasyon değeri ise 5µM'dir.

Kaan Yılcıoğlu ve arkadaşlarının 2014' te PLoS One'da yayınladıkları bir makalede oksidatif stresin hücrelerde lipid üretim mekanizmalarını aktive ettiğini gözlemlemişlerdir. Hücrelerde oluşan stres faktörlerinin lipid peroksidasyonuna sebep olduğu ve bunun sonucunda lipid birikiminin meydana geldiği görülmüştür[33]. Çakmak ve ark.'nın 2012'de yayınladıkları bir makaledeki çalışmada da sülfür ve nitrojen açlığına bırakılan *Chlamydomonas reinhardtii*'nin özellikle sülfür açlığına bırakılan grupta oluşan oksidatif stres elementlerinin TAG üretimini önemli bir şekilde arttırdığı görülmüştür[34].

Benzer şekilde El Baky ve arkadaşlarının 2007' de yaptığı çalışmada da *Spirulina plantensis* hücrelerine H₂O₂ stres faktörü direkt olarak uygulanıp bunun sonucunda lipid yollarının aktive olması ve hücrelerde lipid üretiminin meydana geldiği görülmüştür[20].

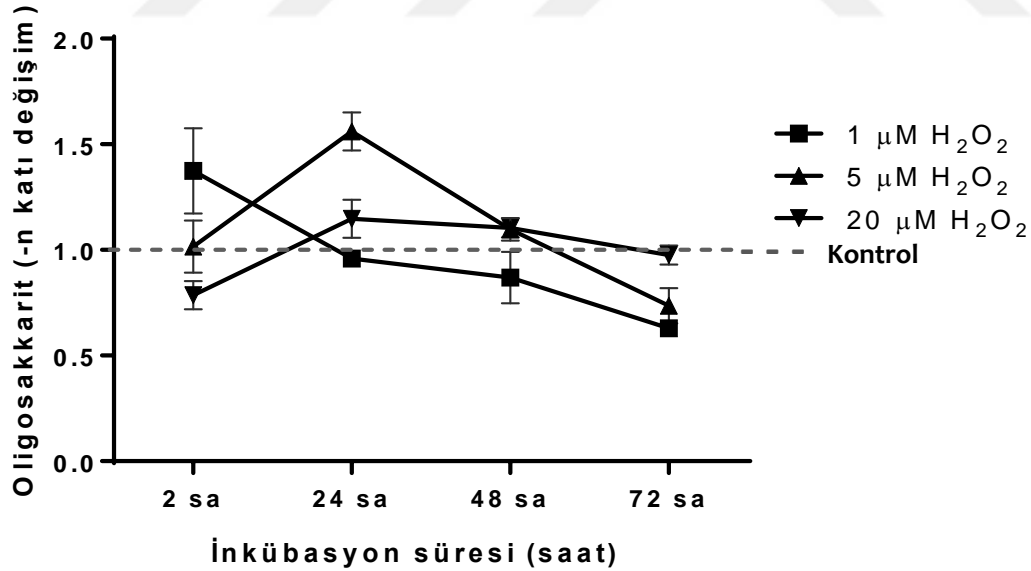


Şekil 38. 1150cm⁻¹/1652cm⁻¹ oranına göre “polisakkarit” miktarının FTIR ile hesaplanmasına ilişkin sonuçlar

Şekil 38. e bakıldığında farklı konsantrasyonlarda ve farklı saatlerde H_2O_2 stresine maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen polisakkarit miktarındaki değişim gösterilmiştir. 2. saatte kontrol grubuna göre mikroalglerdeki polisakkarit miktarı 5 ve $20\mu M$ 'lık H_2O_2 konsantrasyonuna sahip deney gruplarında 24. saatte yaklaşık olarak iki kat artış gösterirken, ilerleyen saatlerde bu değerde % 40 oranında azalma görülmüştür. $1\mu M$ 'lık H_2O_2 konsantrasyonuna sahip deney grubunda ise 2. saatten itibaren hücresel polisakkarit miktarında azalma görülmüştür.

Burada da görüldüğü gibi en uygun inkübasyon süresi 24. saatlerin sonu iken; en uygun H_2O_2 konsantrasyon değeri ise $5\mu M$ 'dir.

Deney grubunda TAG miktarı artışına paralel olarak mikroalglerdeki polisakkarit miktarları da 24. saatte ve $5\mu M$ 'lık H_2O_2 konsantrasyonda en yüksek değerine ulaşmıştır.



Şekil 39. $1045cm^{-1}/1652cm^{-1}$ oranına göre "oligosakkarit" miktarının FT-IR ile hesaplanmasına ilişkin sonuçlar

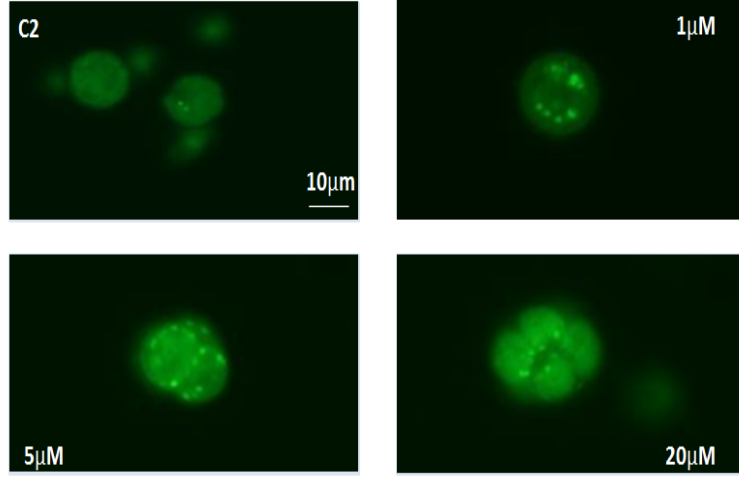
Şekil 39. a bakıldığında farklı konsantrasyonlarda ve farklı saatlerde H_2O_2 stresine maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen oligosakkarit miktarındaki değişim gösterilmiştir. Bu değerler TAG miktarındaki artış ve polisakkarit miktarındaki en fazla artıştaki inkübasyon süresine paralellik göstermiştir. 2. Saate kıyasla mikroalglerdeki oligosakkarit miktarı 24. saatte 5 ve 20 μM 'lık H_2O_2 konsantrasyonunda yaklaşık olarak iki kat artış gösterirken bu değer 24. saatten sonra azalmıştır. Bu azalma miktarı 20 μM 'lık için %30 civarlarında iken, 5 μM 'lık için %50 civarına ulaşmıştır. En uygun inkübasyon süresi 24. saatlerin sonu iken; en uygun H_2O_2 konsantrasyon değeri ise 5 μM olarak değerlendirilmiştir. Stamatia Bellou ve arkadaşlarının 2014' te yayınladıkları bir makalede hücre içerisinde TAG üretim yollarında kloroplast, mitokondri ve endoplasmik retikulum organellerinin işbirliğinde; kloroplast içerisinde bazı moleküller aracılığıyla şeker türevi moleküller oluşmaktadır. Oluşan bu moleküller mitokondride sitrat moleküllerini dönüştürerek PUFAs molekülleri oluşmakta ve bu moleküllerde endoplasmik retikulumda işlenerek TAG moleküllerinin oluşmasını sağlamaktadır[12].

Buradan da anlaşıldığı gibi hücre içerisindeki TAG, polisakkarit ve oligosakkarit molekülleri birbirleriyle ilişkilidir. TAG moleküllerinin tespiti için bu moleküllerin hücre içerisindeki miktarları bize bu konu için bilgi sağlamaktadır(Şekil 3.)

3.6 Hidrojen Peroksit Stresine Cevapta Mikroalglerin Ürettikleri Sitoplazmik Lipid Cisimciklerinin Floresans Görüntülenmesi İle Elde Edilen Bulgular ve Sonuçlar

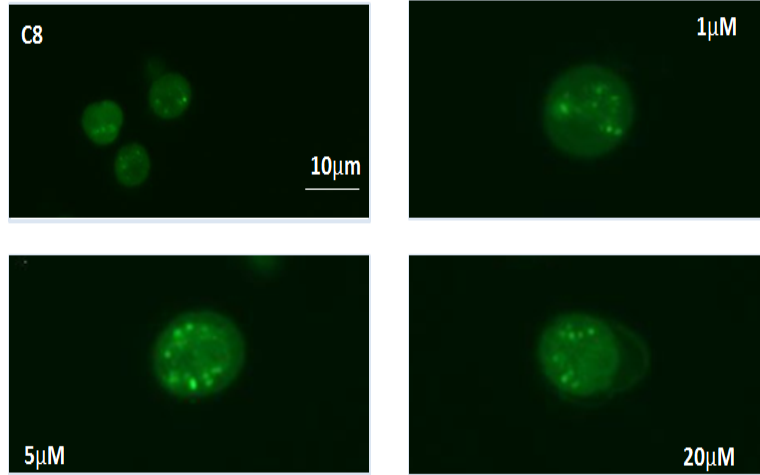
Aşağıda belirli saatlerde alınan örneklerin Nile-Red boyama sonucu çekilen fotoğrafları gösterilmektedir.

3.6.1 2. Saatten Alınan Örnekler



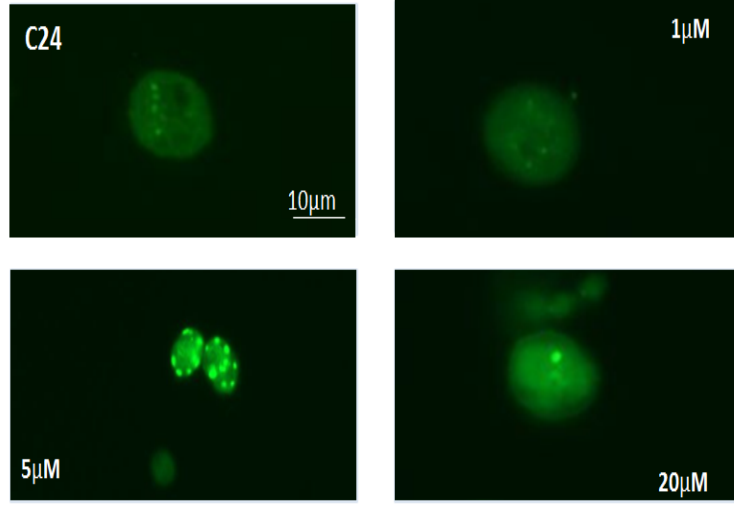
Şekil 40. 2. saatten alınan örneklerin floresan görüntüsü

3.6.2 8. Saatten Alınan Örnekler



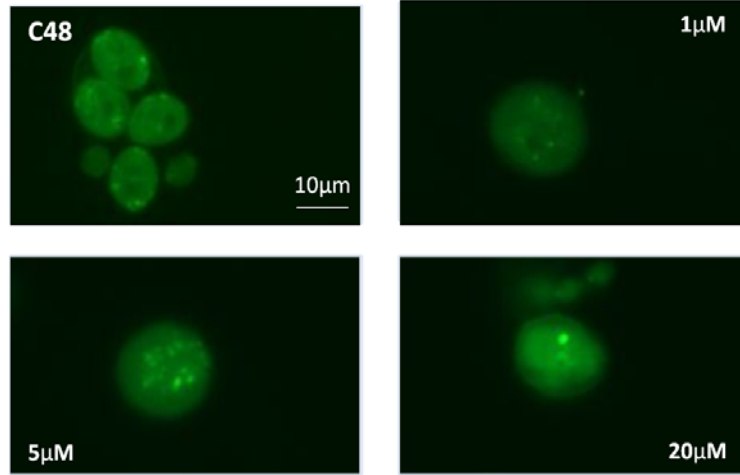
Şekil 41. 8. saatten alınan örneklerin floresan görüntüsü

3.6.3 24. Saatten Alınan Örnekler



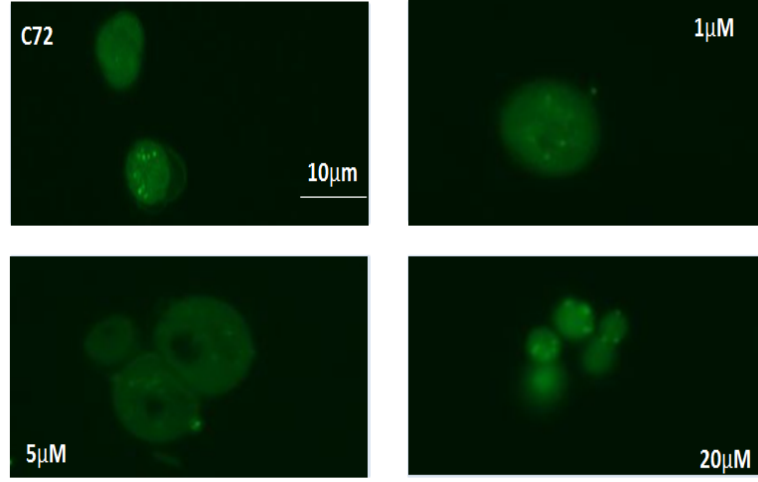
Şekil 42. 24. saatten alınan örneklerin floresan görüntüsü

3.6.4 48. Saatten Alınan Örnekler

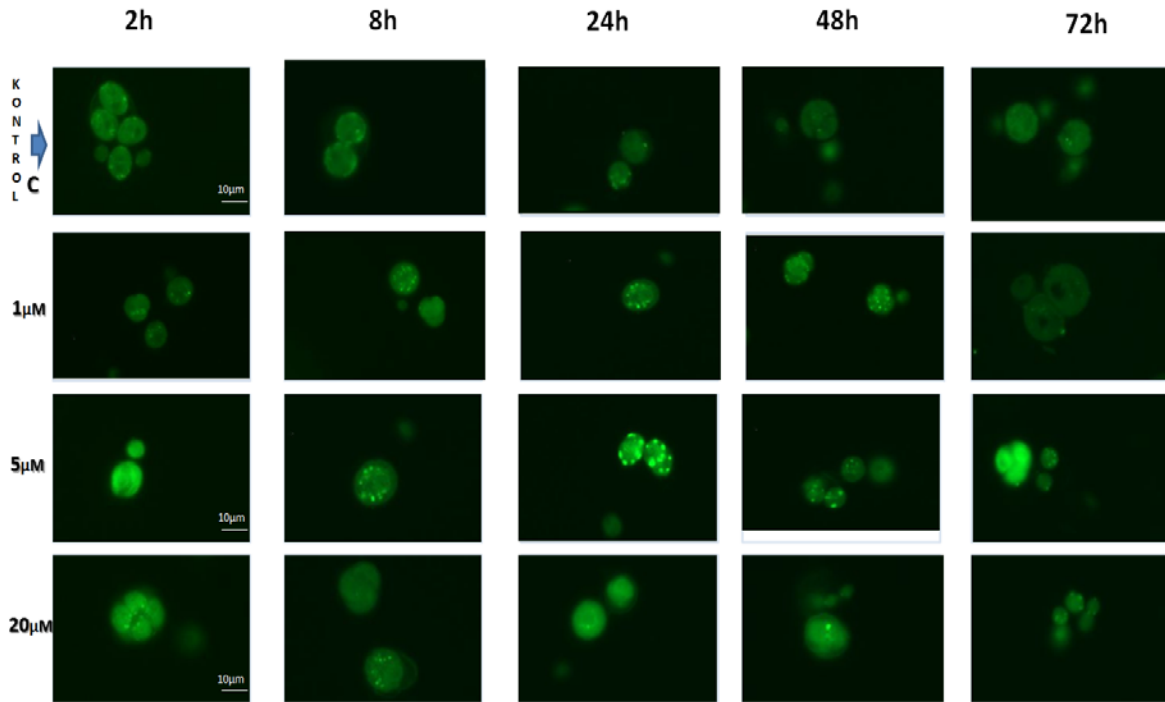


Şekil 43. 48. saatten alınan örneklerin floresan görüntüsü

3.6.5 72. Saatten Alınan Örnekler



Şekil 44. 72. saatten alınan örneklerin floresan görüntüsü



Şekil 45. Farklı konsantrasyonlarda ve farklı saatlerde H₂O₂ stresine maruz bırakılan hücrelerin floresan mikroskobu altındaki görüntülerinde meydana gelen değişim (x40/10µm)

Şekil 40., Şekil 41., , Şekil 45.'teki floresans görüntülerin de desteklediği gibi 1µM, 5µM, 20µM'lık H₂O₂ stresi uyguladığımız hücrelerde lipid damlacıkları oluşmaya başlamıştır. FT-IR analizi sonucu elde edilen TAG içeriğindeki değişim ile floresans görüntüleme ile elde edilen fotoğraflar örtüşmektedir. Özellikle 24. saatte 5µM'lık H₂O₂ stresi uyguladığımız hücrelerde lipid kesecikleri çok net bir şekilde görülmüştür. 20µM'lık H₂O₂ strese maruz kalan hücrelerde ise hücre formasyonu bozulmaya başlamıştır. Çünkü hücre için aşırı toksik olan bu miktar hücre tarafından telafi edilememiş ve hücreler ölmeye başlamıştır. Bu sonuçlar Hanaa H. ve ark.'nın 2007 ve Kalpesh K. Sharma ve ark.'nın 2012 tarihinde yayınlanan makalelerindeki çalışmayla uygunluk göstermiştir.

4. SONUÇ

Mikroalglerden biyodizel hammaddesi ve katma değeri yüksek ürün eldesi için uygulanan stresin şiddeti önemlidir. Bu tez çalışmasında, 1 μ M, 5 μ M ve 20 μ M'lık konsantrasyonda H₂O₂ uyguladığımız hücreler normal koşullar altında büyüme gösteren kontrol hücrelerine göre farklı metabolik olaylar sergilemiştir. H₂O₂ stresine maruz kalan hücrelerin, hücre büyüme mekanizmasında, hücre içindeki biyokimyasal moleküllerinde ve hücre modifikasyonunda değişimler meydana gelmiştir. Bu değişimleri burada toparlanacak olursa; öncelikle 1 μ M, 5 μ M, 20 μ M'lık artan konsantrasyonlarda H₂O₂ stresi uygulanan hücrelerde büyümenin baskılandığını görüldü. Hidrojen peroksit uygulaması ilk günden itibaren büyümede önemli düzeyde baskılanmaya sebep olmuştur. Özellikle uygulamanın ilk 5 gününde büyümedeki baskılanma artmış, takip eden günlerde 1 μ M ve 5 μ M H₂O₂ uygulanan gruplarda büyüme yeniden gelişmiş ve baskılanma kalkmıştır. Çünkü düşük konsantrasyon H₂O₂ değerinde hücreler hayatta kalabilecek kapasite gösterirken yüksek konsantrasyondaki H₂O₂ yoğunluğu hücrelerin membran yapılarında bozulma meydana geldiği için 20 μ M olarak uygulanan grupta yeniden büyüme gerçekleşmemiştir. Mikroalglerin içerdikleri H₂O₂ konsantrasyonları zamana ve uygulanan H₂O₂ yoğunluğuna paralel bir artış sergilemiştir. Klorofil a, b ve toplam klorofil miktarı H₂O₂ uygulanan gruplarda konsantrasyon ile doğru orantılı olarak ilk 24 saatte artmış, daha sonra da azalmıştır. 72 saat sonra klorofil a ve toplam klorofil içeriğindeki azalma istatistiksel olarak çok önemli düzeyde tespit edilmiştir. Mikroalglerin içerdikleri toplam karotenoid miktarları toplam klorofil içeriklerindeki değişim ile paralellik göstermiştir. FT-IR analizi ile belirlenen TAG içeriklerindeki değişim 24 saatin sonunda özellikle 5 μ M H₂O₂ uygulamasında yaklaşık %220 artış ile en yüksek düzeyde artış olarak kaydedilmiştir. Benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla 5 μ M H₂O₂ uygulamasına cevapta ilk 24 saatte mikroalglerin içerdikleri toplam oligosakkarit ve polisakkarit miktarları da en yüksek düzeye ulaşmıştır. Bu sonuçlar hücre içerisindeki şeker ve yağ üretim yollarının birbiriyle ilişkili olduğunu desteklemiştir[12]. Çünkü ilk 24 saatte hem şeker ve yağ miktarı hücre

içerisinde çoğalırken 24 saatten sonra her ikisinde hücre içindeki değeri azalmıştır. Farklı yoğunluklarda H₂O₂ uygulanan mikroalglerin nil kırmızısı ile boyanarak çekilen floresans görüntülerinden de 5µM H₂O₂ uygulamasının ilk 24 saat içerisinde nötral lipid üretimini önemli oranda tetiklediği belirlenmiştir.

Bu çalışma bize hücrede biriken lipid miktarının hangi saatte ve hangi H₂O₂ konsantrasyonunda en etkin olduğunu göstermiştir. Hidrojen peroksitin uygulanma konsantrasyonu ve uygulanma süresine bağlı olarak mikroalglerde meydana gelen bu değişimleri anlamak gelecekte alglerde enerji üretimi için önemli adımlara öncülük edebilir. Yani günümüzde kısıtlı, maliyeti yüksek ve sürdürülebilir olmayan enerji kaynaklarının yerini alglerdeki nötral lipidler alabilir. Bu da biyoyakıt sektörüne katkı sağlayarak enerji kaynaklarından biri olan etkin biyodizel üretimi için önemli adım olabilir. Bu çalışmada Nemrut Gölünden izole edilen bir mikroalg olan *Chlorella sp. ESP-6* türünde 5 µM H₂O₂ uygulamasının 24 saat içerisinde mikroalglerden biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol miktarını iki katın üzerine çıkarmıştır. Bu sayede düşük yoğunlukta H₂O₂ uygulamasının biyoteknolojik açıdan mikroalglerden biyodizel ve katma değeri yüksek ürün eldesinde değerlendirilebilecek bir yaklaşım olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKÇA

- [1] Chen, M. ve Diğlerleri. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*. 102.2, 1649–1655.
- [2] Lv, J-M. ve Diğlerleri. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*. 101.17, 6797-6804.
- [3] Çakmak, Z. ve Diğlerleri. (2014). Induction of triacylglycerol production by microalgae: Comparative analysis of different element regime. *Bioresource Technology*. 155, 379-387.
- [4] Çakmak, Z. ve Diğlerleri. (2015). Antioxidant response of *Chlamydomonas reinhardtii* grown under different element regimes. *Phycological Research*. 63, 202-211.
- [5] Zhnag, J. ve Diğlerleri. (2016). ROS and ROS Mediated Celluler Signaling. *Oxidative Medicine and Celluler Longetity*. 2016,18.
- [6] Gezici, Mustafa, Eliçin, Konuralp ve Gürhan, Recai (2012). Biyoyakıt amaçlı mikroalg üretimi için bazı yetiştirme parametrelerinin belirlenmesi. *Tarım Makinaları Bilim Dergisi*. 8.2, 223-231.
- [7] Chisti, Yusuf. (2007). Biodiesel From Microalgae. *Biotechnology Advance*. 25.3, 294 – 306.
- [8] Amaro, H. M., Guedes, A. C., Malcata, F. X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*. 88.10, 3402–3410.
- [9] Sharma, K. K., Schuhmann, H. ve Schenk P.M. (2012). High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies*. 5.5, 1532-1553.
- [10] Gurr, M.I. (2002). Lipid Biochemistry an introduction. *Oxford- UK*. p.320.
- [11] Guy A Thompson Jr. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *BBA*. 1302.1, 17-45.
- [12] Bellou, S. ve Diğlerleri. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*. 32.8, 1476-1493.
- [13] Bigogno, C. ve Diğlerleri. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incise*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*. 60.5, 497-503.

- [14] Khozin-Goldberg, I. ve Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*. 67, 696-701.
- [15] <https://bikifi.com/biki/canlilarin-temel-bilesenleri-yaglar>
- [16] Sato, N. ve Diğlerleri. (2000). Environmental effect on acidic lipids of thylakoid membrane. *Biochemical Society Transactions*. 28.6, 912-914.
- [17] Guschina, I.A. ve Harwood, J.L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*. 45.2, 160-186.
- [18] Shi, K. ve Diğlerleri. (2017). Reactive Oxygen Species-Mediated Cellular Stress Response and Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms: The State of the Art and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology* 8, 793.
- [19] Fan, J. ve Diğlerleri. (2014). Lipid Accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnol Biofuels*. 7, 17.
- [20] Abd El-Baky, H.H., El Baz, F.K. ve El Baroty, G.S. (2007). Enhancement of antioxidant production in *Spirulina Plantensis* under oxidative stress. *IDOSI Publications*. 2.2, 170-179.
- [21] Levitt, J. (1972). Responses of plants to environmental stresses. *Book Physiological Ecology*, 1, 497.
- [22] Manley, L.S. (2002). Phytochemistry of halomethanes: A product of selection or a metabolic accident?. *Biogeochemistry*. 60.2, 163-180
- [23] Halliwell, B. ve Gutteridge JMC. (1998). Free radicals in biology and medicine. *Clarendon Press*. 53.1, 188-96.
- [24] Smirnoff, N. (2005). Ascorbate, Tocopherol and Carotenoids: Metabolism, Pathway Engineering and Functions. In: Smirnoff N, ed. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. *Oxford Blackwell Publishing*. 53-86.
- [25] Büyük, İ., Soydam-Aydın, S. ve Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 69.2, 97-110.
- [26] Stein, J. (2003). Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. *Cambridge University Press*. 448 pp.

- [27] Halim, R. ve Webley, P.A. (2015). Nile red staining for oil determination in microalgal cell. *International Journal of Chemical Engineering*. 2015, 14.
- [28] Junglee, S. ve Diğlerleri. (2014). Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide. *American Journal of Analytical Chemistry*. 05.11, 730-736.
- [29] Jeffrey, S.W. ve Humphrey, G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higherplants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 167, 191–194.
- [30] Chen, B. ve Diğlerleri. (2017). Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products. *J. Biortech*. 05, 1198-1206.
- [31] Zienkiewicz, K. ve Diğlerleri. (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalga. *Molecular, cellular and physiological insights*. 1861.9, 1269-1281.
- [32] Salguero, A. ve Diğlerleri. (2003). Caretenoid as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Journal Article*. 20.4, 249-253.
- [33] Yılcıoğlu, K. ve Diğlerleri. (2014). Oksidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PLoS One*. 9.3, e91957.
- [34] Çakmak, T. ve Diğlerleri. (2012). Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Bioeng*. 109.8, 1947-1957.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Emine SELÇUK

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 20 Ağustos 1990, Malatya

Elektronik Posta: eselcuk.822@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Yıl
Lisans	Atatürk Üniversitesi , Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2010- 2014
Yüksek Lisans	İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanobilim ve Nanomühendislik Bölümü	2016- 2017

YABANCI DİLLER

İyi düzeyde İngilizce

BİLGİSAYAR BİLGİSİ

Microsoft Office, Word, Excel, Powerpoint, Access

HOBİLER

Yemek yapmak, Dil Öğrenmek, Bilimsel Kitaplar Okumak, Doğada Yürüyüş Yapmak















