T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANA BİLİM DALI

FARKLI KÜLTÜR METOTLARININ *CHLORELLA* SP. KÜLTÜRÜNDE BÜYÜME VE BİYOKİMYASAL YAPIYA ETKİLERİ

GÖKHUN ÇAĞATAY ERBİL

DOKTORA TEZİ

PROF. DR. MAHMUT ELP

HAZİRAN - 2023
KASTAMONU

TEZ ONAYI

Gökhun Çağatay ERBİL tarafından hazırlanan "**Farklı Kültür Metotlarının *Chlorella* sp. Kültüründe Büyüme Ve Biyokimyasal Yapıya Etkileri**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı **16.06.2023** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Prof. Dr. Mahmut ELP Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR Ankara Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Hünkar Avni DUYAR Sinop Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Ertuğrul TERZİ Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Ü. İbrahim KÜÇÜKBASMACI Kastamonu Üniversitesi	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü V. Doç. Dr. Osman ÇİÇEK .....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Gökhun Çağatay ERBİL

İmza

ÖZET

DOKTORA TEZİ

FARKLI KÜLTÜR METOTLARININ *CHLORELLA* SP. KÜLTÜRÜNDE BÜYÜME VE BİYOKİMYASAL YAPIYA ETKİLERİ

GÖKHUN ÇAĞATAY ERBİL

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN:PROF. DR. MAHMUT ELP
EŞ DANIŞMAN:PROF. DR. YAŞAR DURMAZ

Mikroalg kültürü üzerine yapılan çalışmalar, fototrofik kültür metodunda sınırlayıcı faktörleri ortadan kaldırarak elde edilebilecek maksimum kuru madde miktarını arttırmak amacıyla heterotrofik ve miksotrofik kültür metodlarına doğru kaymaktadır. Heterotrofik kültür, fotosentezden bağımsız olarak canlının organik karbon kaynaklarından yararlanarak çoğalması ile gerçekleşirken, miksotrofik kültürde ise hem CO_2 hem de organik karbon kaynağı aynı anda kullanılmaktadır.

Şeker alkolleri arasında yer alan myo-inositol, $C_6H_{12}O_6$ formülüne sahip bir siklohekzandır. Bu çalışmada, *Chlorella* sp. kültüründe karbon kaynağı olarak kullanılabilirliği ve biyokimyasal yapısına olan etkileri araştırılmıştır.

Çalışmalar cam balonlarda ve tübüler fotobiyoreaktörde yürütülmüştür. Cam balonlarda yapılan denemelerin sonuçlarından elde edilen verilere göre en yüksek hücre sayıları 52±0,71 x 10^6 hücre/ml ve 49,28±0,75 x 10^6 hücre/ml ile sırasıyla 1000 mg/l ve 2000 mg/l myo-inositol içeren gruplarında elde edilmiştir. En yüksek kuru ağırlık miktarı 1000 mg/l myo-inositol içeren grupta 1,62±0,02 g/l, en düşük kuru ağırlık miktarı ise kontrol grubunda 0,11±0,01 g/l olarak belirlenmiştir.

En yüksek klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları da 1000 ve 2000 mg/l myo-inositol içeren gruplarda belirlenmiştir. Deneme sonunda yapılan analizlerde en yüksek hücre başına düşen klorofil *a* miktarları 2000 mg/l myo-inositol içeren grupta 0,092±0,005 pg/hücre olarak belirlenmiştir. Yine deneme sonunda yapılan analizlerde aynı grup en yüksek hücre başına düşen toplam karotenoid miktarını içermiş olup bu değer 0,031±0,001 olarak hesaplanmıştır. En düşük klorofil *a* ve toplam karotenoid birikimi ise 2000 mg/l gliserol içeren grupta sırasıyla 0,051±0,002 pg/hücre, 0,018±0,001 pg/hücre olarak tespit edilmiştir.

En yüksek lipid içeriğine sahip deneme grupları 1000 ve 2000 mg/l myo-inositol içeren grupları olup, sırasıyla %10,01±0,36 ve %15,19±0,75 oranında lipid içerdikleri tespit edilmiştir. En düşük lipid içeriği ise 100 mg/l myo-inositol kullanılan grupta %4,04±0,21 olarak belirlenmiştir. Doymuş yağ asitleri en yüksek oranda (%44,74±2,2) 100 mg/l myo-inositol içeren grupta belirlenirken, en yüksek tekli doymamış yağ asitleri 2000 mg/l myo-inositol içeren grupta %18,63±0,09 olarak tespit edilmiştir. Çoklu doymamış yağ asitleri ise en yüksek oranda 500 mg/l myo-inositol içeren grupta %62,15±0,23 olarak belirlenmiştir.

Fotobiyoreaktör kültürü denemesi yaklaşık 5 hafta sürmüştür. İlk hafta CO_2, takip eden 2 hafta hem CO_2 hem myo-inositol, son 2 hafta ise sadece myo-inositol karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. CO_2 kullanılan ilk hafta için ortalama kuru ağırlık 3,22±0,08 g/l olarak elde

edilmiştir. Sadece myo-inositol kullanılan dönemde ise kuru ağırlık ortalaması 4,05±0,15 g/l olarak belirlenmiştir.
Hem klorofil *a* hem de toplam karotenoid miktarlarında myo-inositol kullanımı ile birlikte düşüş tespit edilmiştir. Hücre başına düşen klorofil *a* miktarı myo-inositol kullanılan dönemde CO_2 kullanılan döneme göre yaklaşık %22 oranında düşüş göstermiştir. Ayrıca, toplam hücre başına düşen toplam karotenoid miktarı için de myo-inositol kullanılan dönemde yaklaşık %29 oranında düşüş belirlenmiştir.
Lipid oranı sadece myo-inositol kullanımında %17,47±1,02'den %19,57±0,39'a yükselmiştir. Çoklu doymamış yağ asitleri oranında düşüş, tekli doymamış ve doymuş yağ asitleri oranlarında ise artış tespit edilmiştir. Doymuş yağ asitleri oranı karbon kaynağı olarak CO_2 ile CO_2 ve myo-inositolün birlikte kullanıldığı dönemlerde ortalama %32,77 olarak gerçekleşirken, sadece myo-inositol kullanılan dönemde ortalama %33,1 olarak tespit edilmiştir. Ortalama tekli doymamış yağ asitleri oranları, sadece CO_2 kullanılan dönemde %1,79, CO_2 ve myo-inositol kullanılan dönemde %1,89 ve son olarak %4,84 olarak hesaplanmıştır. Çoklu doymamış yağ asitleri ise CO_2 ile CO_2 ve myo-inositol kullanılan dönemlerde ortalama %65-66 oranında tespit edilmiş iken sadece myo-inositol kullanılan dönemde yaklaşık %60'a kadar düşüş göstermiştir.
Myo-inositol, her ne kadar CO_2'e göre daha maliyetli bir karbon kaynağı olsa da, hem birim biyokütle için harcanan karbon kaynağı miktarının daha düşük olması, hem de ışık kaynağına olan bağımlılığı azaltması sebebiyle daha düşük enerji masrafı nedeniyle rekabetçi bir karbon kaynağı olacağı tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: mikroalg, *Chlorella* sp., miksotrofik kültür, karbon kaynağı, myo-inositol, fotobiyoreaktör.

Haziran 2023, 95 Sayfa

ABSTRACT

PH.D THESIS

THE EFFECTS OF DIFFERENT CULTURE METHODS ON THE GROWTH AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF *CHLORELLA* SP.

GÖKHUN ÇAĞATAY ERBİL

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF AQUACULTURE

SUPERVISOR:PROF. DR. MAHMUT ELP
CO-SUPERVISOR:PROF. DR. YAŞAR DURMAZ

Studies on microalgae culture are gradually shifting towards heterotrophic and mixotrophic cultures in order to eliminate the limiting factors in phototrophic culture and to increase the maximum amount of dry matter that can be obtained. While heterotrophic culture occurs by the reproduction of microalgae on organic carbon sources independently of photosynthesis, in mixotrophic culture both CO_2 and organic carbon source are used simultaneously.

Myo-inositol, which is among the sugar alcohols, is a cyclohexane with the formula $C_6H_{12}O_6$. In this study, possible use of myo-inositol as a carbon source in *Chlorella* sp. culture and its effects on the biochemical structure were investigated.

Experiments were carried out in flasks and tubular photobioreactor. According to the data obtained from the results of the experiments performed in 1 l flasks, the highest cell counts were found as 52±0.71 x 10^6 cells/ml and 49.28±0.75 x 10^6 cells/ml, with 1000 mg/l and 2000 mg/l myo-inositol groups, respectively. The highest dry weight amount was determined as 1.62±0.02 g/l in the group containing 1000 mg/l myo-inositol, and the lowest dry weight amount was determined as 0.11±0.01 g/l in the control group.

The highest amounts of chlorophyll *a* and total carotenoids were also determined in the groups containing 1000 and 2000 mg/l myo-inositol. At the end of the experiment, the highest amount of chlorophyll *a* per cell was determined as 0.092±0.005 pg/cell in the group containing 2000 mg/l myo-inositol. The same group included the highest amount of total carotenoids per cell, and this value was calculated as 0.031±0.001 in the analyzes were conducted at the end of the experiment. The lowest chlorophyll *a* and total carotenoid accumulation were determined as 0.051±0.002 pg/cell and 0.018±0.001 pg/cell, respectively, in the group containing 2000 mg/l glycerol.

The experimental groups with the highest lipid content were the groups containing 1000 and 2000 mg/l myo-inositol, and were contain 10.01±0.36% and 15.19±0.75% lipid, respectively. The lowest lipid content was determined as 4.04±0.21% in the group using 100 mg/l myo-inositol. Saturated fatty acids were determined at the highest rate (44.74±2.2%) in the group containing 100 mg/l myo-inositol, while the highest monounsaturated fatty acids were determined in the group containing 2000 mg/l myo-inositol by 18.63±0.09%. Lastly, polyunsaturated fatty acids were determined as 62.15±0.23% in the group containing 500 mg/l myo-inositol at the highest rate.

The photobioreactor culture trial took approximately 5 weeks. CO_2 was used in the first week, both CO_2 and myo-inositol in the following 2 weeks, and only myo-inositol was used as carbon source in the last 2 weeks. The average dry weight for the first week using CO_2 was 3.22±0.08

g/l. The average dry weight was determined as 4.05±0.15 g/l in the period when only myo-inositol was used.
Both chlorophyll *a* and total carotenoid amounts were decreased with the use of myo-inositol. The amount of chlorophyll *a* per cell decreased by approximately 22% in the period when myo-inositol was used compared to the period when CO_2 was used. In addition approximately 29% decrease was determined for the total amount of total carotenoids per cell during the period of using myo-inositol as carbon source.
The lipid ratio increased from 17.47±1.02% to 19.57±0.39% when myo-inositol was used as only carbon source. A decrease in the ratio of polyunsaturated fatty acids, an increase in the ratio of monounsaturated and saturated fatty acids were determined during the same period. While the ratio of saturated fatty acids was 32.77% on average in the periods when CO_2 and CO_2 and myo-inositol were used together, it was determined as 33.1% in the period when only myo-inositol was used. The mean ratios of monounsaturated fatty acids were calculated as 1.79% in the period of using only CO_2, 1.89% in the period of using CO_2 and finally in the myo-inositol period as 4.84%. Polyunsaturated fatty acids, on the other hand, were detected at an average rate of 65-66% during the periods when CO_2 and CO_2 and myo-inositol were used, but decreased to low as approximately 60% in the period when only myo-inositol was used.
Even tough, myo-inositol is a more costly carbon source than CO_2, it will be a competitive carbon source due to both the lower amount of carbon source consumed per unit biomass and lower energy cost because of reducing the dependency on the light source is considered.

KEYWORDS: microalgae, *Chlorella* sp., mixotrophic culture, carbon source, myo-inositol, photobioreactor.

June 2023, 95 Page

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması öncesinde mikroalg kültürü üzerine herhangi bir altyapı olmaması tezin hem kapsamını hem de tamamlanma sürecini etkilemiştir. Ancak, bu sürecin başlangıcından itibaren mikroalg kültürü/üretimi üzerine yapılmış olan bu tez çalışmasını hem maddi hem de manevi olarak destekleyen/teşvik eden tez danışmanım **Prof. Dr. Mahmut ELP**'e şükranlarımı sunarım. Ayrıca, lisans ve yüksek lisans dönemlerimde danışmanlığımı yapmış olan ve doktora dönemi boyunca da bilgisini ve desteğini esirgemeyen 2. danışmanım **Prof. Dr. Yaşar DURMAZ**'a da teşekkürü borç bilirim.

Gökhun Çağatay ERBİL

Kastamonu, 2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ... **ii**
TAAHHÜTNAME ... **iii**
ÖZET ... **iv**
ABSTRACT ... **vi**
TEŞEKKÜR ... **viii**
İÇİNDEKİLER ... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ... **x**
TABLOLAR DİZİNİ ... **xii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ... **xiii**
1. GİRİŞ ... **1**
1.1 Mikroalglerin Kullanım Alanları ... 3
1.2 Mikroalglerin Üretimi ... 4
1.3 *Chlorella* sp. ... 8
1.4 Myo-inositol ... 13
2. YÖNTEM ... **15**
2.1 Fotobiyoreaktör ... 16
2.2 Büyüme ... 20
2.3 Pigment Analizi ... 22
2.4 Toplam Lipid ... 23
2.5 Yağ Asitleri Analizi ... 24
2.6 İstatistiksel Analiz ... 25
3. BULGULAR VE TARTIŞMA ... **26**
3.1 Balon Denemeleri ... 26
3.1.1 Büyüme ... 26
3.1.2 Pigment ... 39
3.1.3 Toplam Lipid ... 50
3.1.4 Yağ Asitleri ... 53
3.2 Fotobiyoreaktör ... 59
3.2.1 Büyüme ... 59
3.2.2 Pigment ... 65
3.2.3 Toplam Lipid ... 69
3.2.4 Yağ Asitleri ... 70
4. SONUÇ VE ÖNERİLER ... **75**
KAYNAKLAR ... **78**
ÖZGEÇMİŞ ... **94**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Mikroalglerin kullandığı karbon kaynağına göre kültür yöntemleri..... 8
Şekil 1.2 *Chlorella* sp.'nin mikroskop altındaki görünümü..... 9
Şekil 1.3 İnositol kimyasal yapısı 14
Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan tübüler fotobiyoreaktör 17
Şekil 2.2 Çalışmada kullanılan tübüler Fotobiyoreaktörün bölümleri 18
Şekil 2.3 Tübüler fotobiyoreaktörde üretilen *Chlorella* sp.'nin hasat işlemi..... 19
Şekil 2.4 Süzme işleminden sonra dondurulmuş mikroalg örneği..... 19
Şekil 2.5 Hücre sayımı için kullanılan Neubauer hemositometre..... 20
Şekil 2.6 Kültür ortamından süzme işlemi yapılan mikroalg örnekleri 21
Şekil 2.7 Santrifüjde yapılan çöktürme işlemi 22
Şekil 2.8 Spektrofotometrede okutulan pigment örneği 23
Şekil 2.9 Lipid analizi için oluşturulan kalibrasyon eğrisi..... 24
Şekil 2.10 SPV metoduna göre yapılan toplam lipid analizinde hazırlanan örnekler 24
Şekil 2.11 Doğrudan transesterifikasyon metoduna göre hazırlanmış kültür örneklerinde FAME içeren süpernatant 25
Şekil 3.1 1 litrelik balonlarda yapılan denemelerin farklı gruplarına ait görünümü.. 26
Şekil 3.2 Kontrol grubu hücre sayıları ve spesifik büyüme değerleri..... 27
Şekil 3.3 Kontrol grubunun hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği 27
Şekil 3.4 D1 grubu hücre sayıları ve spesifik büyüme değerleri 28
Şekil 3.5 D1 grubunun hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği..... 28
Şekil 3.6 D2 grubu hücre sayıları ve spesifik büyüme değerleri 29
Şekil 3.7 D2 grubunun hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği..... 29
Şekil 3.8 D3 grubu hücre sayıları ve spesifik büyüme değerleri 30
Şekil 3.9 D3 grubunun hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği..... 30
Şekil 3.10 D4 grubu hücre sayıları ve spesifik büyüme değerleri 31
Şekil 3.11 D4 grubunun hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği..... 31
Şekil 3.12 D5 grubu hücre sayıları ve spesifik büyüme değerleri 32
Şekil 3.13 D5 grubunun hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği..... 32
Şekil 3.14 D6 grubunun hücre sayıları ve spesifik büyüme değerleri 33
Şekil 3.15 D6 grubunun hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği..... 33
Şekil 3.16 Cam balonlardan yapılan denemelerden elde edilen kültür yoğunlukları 35
Şekil 3.17 Kontrol grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları 40
Şekil 3.18 D1 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları..... 41
Şekil 3.19 D2 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları..... 42
Şekil 3.20 D3 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları..... 43
Şekil 3.21 D4 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları..... 44
Şekil 3.22 D5 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları..... 45
Şekil 3.23 D6 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları..... 45
Şekil 3.24 Balonlarda yapılan denemelerde elde edilen toplam lipid oranları 51
Şekil 3.25 Tüm deneme gruplarına ait yağ asidi grubu kompozisyonları..... 54
Şekil 3.26 *Chlorella* sp. kültüründe myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı tübüler fotobiyoreaktör 59
Şekil 3.27 *Chlorella* sp.'nin fotobiyoreaktör kültüründe hücre sayıları ve spesifik büyüme oranları..... 60

Şekil 3.28 *Chlorella* sp.'nin fotobiyoreaktör kültüründe hücre sayıları ve hasat miktarları 61
Şekil 3.29 Fotobiyoreaktör kültüründe kuru ağırlık ve hücre başına düşen kuru ağırlık miktarları 62
Şekil 3.30 Fotobiyoreaktör kültüründe klorofil *a* miktarları 65
Şekil 3.31 Fotobiyoreaktör kültüründe toplam karotenoid miktarları 66
Şekil 3.32 Fotobiyoreaktörde yapılan denemede 5 haftalık toplam lipid oranı değişimi 69
Şekil 3.33 Fotobiyoreaktör denemesinde yağ asitlerinin gruplara göre zaman içerisindeki oranları 71

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1 F/2, Zarrouk ve BG-11 besin ortamlarının içerikleri 2
Tablo 1.2 *Chlorella*'nın miksotrofik üretimi üzerine yapılmış bazı çalışmalar 10
Tablo 2.1 BG-11 besin ortamı 15
Tablo 2.2 BG-11 iz element solüsyonu 15
Tablo 2.3 *Chlorella sp.* ile yapılan bütün deneme gruplarının planı 16
Tablo 3.1 Gruplara göre kuru ağırlık, hücre başına düşen kuru ağırlık ve ortalama hücre boyutu değerleri 34
Tablo 3.2 Deneme gruplarının klorofil *a* ve karotenoid miktarları 47
Tablo 3.3 Kontrol ve deneme gruplarının yağ asitleri kompozisyonları 55
Tablo 3.4 Fotobiyoreaktör kültüründe farklı karbon kaynağı kullanılan dönemlerde elde edilen yağ asitleri kompozisyonu 72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

SB	**:** Spesifik büyüme
₺	**:** Türk lirası
°C	**:** Santigrat derece
%	**:** Yüzde
α	**:** Alfa

Kısaltmalar

m	**:** Metre
g	**:** Gram
l	**:** Litre
O_2	**:** Oksijen
CO_2	**:** Karbon dioksit
PBR	**:** Photobioreactor-Fotobiyoreaktör
nm	**:** nanometre
µm	**:** mikronmetre
WHO	**:** World Health Organization-Dünya Sağlık Örgütü
$NaNO_3$	**:** Sodyum nitrat
pH	**:** Hidrojen konsantrasyonunun eksi (-) logaritması
N	**:** Azot
P	**:** Fosfor
KNO_3	**:** Potasyum nitrat
KH_2PO_4	**:** Potasyum di-hidrojen fosfat
NaCl	**:** Sodyum klorür
$NaHCO_3$	**:** Sodyum bikarbonat
EDTA-Na_2	**:** Etilen diamin tetra asetik asit di-sodyum
$FeCl_3$	**:** Demir klorür
$MgSO_4$	**:** Magnezyum sülfat
$CaCl_2$	**:** Kalsiyum klorür
H_3BO_3	**:** Borik asit
$MnCl_2$	**:** Mangan klorür
H_2O	**:** Su
$ZnSO_4$	**:** Çinko sülfat
Na_2MoO_4	**:** Sodyum molibdat
$CuSO_4$	**:** Bakır sülfat
$Co(NO_3)_2$	**:** Kobalt nitrat
W	**:** Watt
µmol	**:** Mikron mol
s	**:** Saniye
rpm	**:** Dakikada devir sayısı
ml	**:** Mililitre
dk	**:** Dakika
µg	**:** Mikrogram
SPV	**:** Sülfo-fosfo-vanilin
h	**:** Hacim

FAME	**:** Fatty acid methyl esters-yağ asidi metil esterleri
pg	**:** Pikogram
HCl	**:** Hidroklorik asit
TL	**:** Türk Lirası
ABD	**:** Amerika Birleşik Devletleri

1. GİRİŞ

Mikroalgler, denizlerde ve tatlı sularda yaşayan, fotosentetik tek hücreli canlılardır. Ökaryot veya prokaryot hücre yapısında olabilen organizmalardır (Correa vd., 2017; Satyanarayana vd., 2011; Schwartz ve Dayhoff, 1978). Dünya üzerinde on binlerce tanımlanmış ve tahminen yüzbinlerce türü olduğu belirtilen bu canlılar, sucul alanlarda birincil üretimin kaynağı konumunda bulunmaktadır (Correa vd., 2017; Ebenezer vd., 2012; Gimpel vd., 2015). Farklı şekil ve boyutlarının yanı sıra, sahip oldukları çeşitli pigment grupları ve bu pigment gruplarının bulunma oranlarına bağlı olarak farklı renk ve tonlara sahip olabilirler (Begum vd., 2016; Drews-Jr vd., 2013; Mulders vd., 2014).

Mikroalgler, fotosentez temelinde karasal bitkilerle ortak özellikler göstermektedirler. Karasal bitkilere özgü metabolitler olarak bilinen flavonoidlerin mikroalglerde de bulunması aradaki akrabalık ilişkisine verilebilecek örneklerden yalnızca biridir (Goiris vd., 2014). Mikroalgler, herhangi bir yüzeye tutunmaksızın, su kolonu içerisinde dağılım göstermektedirler. Ayrıca bazı türlerin, sahip oldukları flagellalar sayesinde aktif olarak hareketi de mevcuttur. Bu nedenle, temelde benzer faaliyetlere sahip olsalar da, metabolik anlamda farklılaşmalar bulunmaktadır (Metting, 1996).

Mikroalgler, bulundukları ortamda birtakım besleyici elementlere ihtiyaç duymaktadır. Bu besleyici elementler genel olarak makro ve mikro nütrientler (besleyici element) olarak ikiye ayrılabilir. Azot, fosfor ve sülfür gibi makro nütrientler yüksek konsantrasyonlarda kullanılırken fotosentez enzimleri, amino asit sentezi ve fosfolipitlerin üretimi gibi yaşamsal faaliyetlerde yer almakta, eksikliğinde ise büyüme ve metabolizmayı doğrudan etkilemektedir (Ghafari vd., 2018). Demir ve mangan gibi mikro nütrientler ile kobalt, molibden gibi iz elementlere ise daha düşük konsantrasyonlarda ihtiyaç duyulur ve elektron taşınımı, su oksidasyonu, nitrat alımı ve redüksiyonu gibi elzem metabolik faaliyetlerde görev almaktadırlar (Liu vd., 2018; Mandal vd., 2019; Wan vd., 2014).

Mikroalglerin kültüründe kullanılan ve ihtiyaç duyulan molekülleri içeren birçok "besin ortamı-medium" günümüze kadar geliştirilmiştir. F/2, Zarrouk, BG-11, vb. olarak isimlendirilen (Tablo 1.1) besin ortamları türe veya belli bir mikroalg grubuna

özgü de olabilir. Bu besin ortamları, temel olarak doğal ortamlarda bulunan besleyici elementlerin, yapılan bilimsel çalışmalar neticesinde optimize edilmesine dayanmaktadır.

Tablo 1.1 F/2, Zarrouk ve BG-11 besin ortamlarının içerikleri

	F/2 (Guillard, 1975)	**BG-11 (UTEX, 2009)**	**Zarrouk (Zarrouk, 1966)**
$NaNO_3$ (g/l)	75	150	2,5
NaH_2PO_4 (g/l)	5	-	-
K_2HPO_4 (g/l)	-	4	0,5
K_2SO_4 (g/l)	-	-	1
NaCl (g/l)	-	-	1
$MgSO_4$ (g/l)	-	7,5	0,2
$C_6H_8FeNO_7$ (g/l)	-	0,6	-
$FeSO_4$ (g/l)	-	-	0,01
$CaCl_2$ (g/l)	-	3,6	0,04
$C_6H_8O_7$ (g/l)	-	0,6	-
Na_2CO_3 (g/l)	-	2	-
	İz Elementler		
Na_2EDTA (g/l)	4,36	0,1	0,08
$FeCl_2$ (g/l)	3,15	-	-
		İz Elementler	
$CuSO_4$ (g/l)	0,0098	0,079	0,079
$ZnSO_4$ (g/l)	0,022	0,22	0,222
$CoCl_2$ (g/l)	0,01	-	-
$MnCl_2$ (g/l)	0,18	1,81	1,81
Na_2MoO_4 (g/l)	0,0063	0,39	0,0177
H_3BO_3 (g/l)	-	2,86	2,86
$Co(NO_3)_2$ (mg/l)	-	49,4	-
Tiamin (g/l)	0,2	-	-
Biotin (g/l)	0,1	-	-
Kobalamin (g/l)	1	-	-

Mikroalglerin kültüründe çok sayıda parametre kültürün büyüme hızı ile türün fiziksel ve biyokimyasal özellikleri üzerinde etkilidir. Kültür sıcaklığı, ışık yoğunluğu ve kompozisyonu, besin ortamı, kültür ortamı pH'ı ve tuzluluk gibi değişkenler mikroalgin hem çoğalma hızını hem de biyokimyasal içeriğini değiştirebilmektedir. Bu nedenle tür bazında optimum koşulların belirlenmesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Daliry vd., 2017; Durmaz, 2007; Furuhashi vd., 2019). Her türün, hatta suşların dahi optimum değerlerinin farklı olabilmesinden dolayı bu alandaki çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Bunun dışında, özellikle biyokimyasal yapıyı kontrol etmek amacıyla ve arzulanan metabolitlerin verimini artırmak amacıyla bir takım optimum olmayan kültür şartları (stres koşulları) da oluşturulmaktadır (Chokshi vd., 2015; Goiris vd., 2015; Sinetova vd., 2021). Bu stres koşulları ile pigment, yağ asitleri gibi içeriklerin mümkün olan en yüksek miktarda canlı tarafından sentezlenip eldesi amaçlanmaktadır.

1.1 Mikroalglerin Kullanım Alanları

Mikroalgler, su ürünleri başta olmak üzere, birçok farklı endüstriyel alanda doğrudan veya dolaylı olarak yararlanılan bir kaynak olarak bilinmektedir. Su ürünlerinde, kuluçkahanelerde "yeşil su tekniği" uygulamalarında doğrudan (Neori, 2011; Rocha vd., 2008), rotifer gibi zooplankton besleme amacıyla ise dolaylı olarak yavru balık yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır (Abd Rahman vd., 2018; Dhert vd., 2001; Ferreira vd., 2009; Muller-Feuga, 2000). Bunun dışında yumuşakçaların (istiridye, midye, vb.) ve kabukluların (karides, su piresi, vb.) yetiştiriciliğinde de yine mikroalglerden yararlanılmaktadır (Brown, 2002; Hemaiswarya vd., 2011; Sirakov vd., 2015). Mikroalglerin genel olarak %30-40 arası protein ve %10-20 arası lipid içeriğine sahip olduğu belirtilse de (Brown vd., 1997), özellikle lipid miktarının yetiştirilme koşulları ile türe bağlı olarak %8-10'lardan %50'lere kadar artabildiği ortaya konulmuştur (Huerlimann vd., 2010; Widjaja vd., 2009). İçerdikleri yüksek oranlardaki PUFA (çoklu doymamış yağ asitleri), dengeli esansiyel amino asit profili, vitaminler, mineraller ve pigmentler sebebiyle su ürünleri yetiştiriciliğinde besleme amaçlı kullanımı ile önemli bir hammadde olmasını sağlamaktadır (Ansari vd., 2021). *Dunaliella* ve *Haematococcus* gibi karotenoid içerikleri bakımından zengin olan türlerin süs balıkları, somonlar ve karideslerin yetiştiriciliğinde, deri ve etin renklendirilmesi ve kalitesinin iyileştirilmesi amacıyla yem içeriklerinde kullanımı önem arz etmektedir (Sirakov vd., 2015).

Su ürünleri dışında, tablet ve toz formlarında besin takviyesi, farklı işlenmiş gıda ürünlerinde renklendirici kaynağı, fonksiyonel gıda üretimi amacıyla gıda katkı maddesi olarak da bu canlılardan yararlanılmaktadır (Durmaz vd., 2020; Genç Polat vd., 2020; Matos, 2017; Palabıyık vd., 2018). Balık yemlerinde içeriğin

zenginleştirilmesi amacıyla eklenen mikroalgler, yine aynı amaçla hayvan yemi rasyonlarına da eklenmektedir (Yaakob vd., 2014).

Tarım sektöründe ise gübre hammaddesi olarak kullanılmasıyla geleneksel gübre kaynaklarının aksine organik karbon girişinin sağlandığı, toprağın mikrobiyal popülasyonunun etkilendiği, fitohormon kaynağı olarak da bitki büyümesi üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir (Alvarez vd., 2021; Fenton ve Huallachain, 2012).

Farmasötiklerin üretiminde hammadde olarak kullanımının yanı sıra, transjenik mikroalglerin rekombinant protein gibi ürünlerin üretilebildiği bir platform olarak da fayda sağladığı bildirilmiştir (Singh vd., 2011; Vijayakumar ve Menakha, 2015; Yan vd., 2016).

Mikroalgler, kozmetik alanındaki uygulamalarda şampuan, yüz ve vücut kremleri, nemlendirici ve güneş ışınlarından korunma amaçlarıyla üretilen ürünlerde hammadde olarak değerlendirilmektedir. Bunun yanında son zamanlarda makyaj malzemeleri için renk verici madde ve yaşlanma karşıtı (anti-aging) ürünlerin üretiminde kullanılan biyoaktif içeriklerin kaynağı olarak da değerlendirilmektedir (Mourelle vd., 2017; Spolaore vd., 2006).

Uzun zamandır araştırma konusu olan bir başka alan ise biyoenerjidir. Mikroalglerin yüksek oranda lipit içeren türleri, sürdürülebilir biyodizel araştırmalarının odak noktasında bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda mikroalg kökenli biyodizelin hem performans hem de emisyon açısından daha verimli sonuçlar verdiği ortaya konulmuştur (Chisti, 2007; Deshmukh vd., 2019). Ayrıca, H_2 üretimi için üretilen fotokimyasal panellerin verimlilikleri yüksek olmasına rağmen, mikroalglerin aynı anda yüksek değere sahip biyomoleküller de üretebiliyor olması bu alanda daha avantajlı görülmesine neden olmaktadır (Larkum vd., 2012).

1.2 Mikroalglerin Üretimi

Mikroalg kültürü, laboratuvar ortamından ticari ölçekli üretime kadar çeşitli boyut ve ortamlarda gerçekleştirilmektedir. Saf suşların korunması ve saflaştırma çalışmalarında petri ve tüplerden faydalanılırken, stok kültür oluşturma ve bilimsel

veri elde etme amaçlarıyla 100 ml'den 20000 ml'ye kadar değişen hacimlere sahip, genellikle cam malzemeden üretilen balon ve şişelerden yararlanılmaktadır. Üretim metotları genel olarak açık ve kapalı kültür sistemleri olarak ikiye ayrılabilir. Açık kültür sistemleri göl, tank ve havuzlar gibi çevreyle doğrudan etkileşimde olan sistemleri içerirken, kapalı kültür sistemleri ise farklı şekil ve boyutlarda olabilen fotobiyoreaktörler (PBR) ve fermenterleri içermektedir.

Açık kültür sistemleri düşük kurulum maliyetine sahip ve doğrudan çevreyle etkileşimde olan sistemlerdir. Bu sebeple çevresel şartlardan etkilenme olasılığı yüksektir. Bu sistemlerde kontrolün çok düşük oluşu ve izole bir ortam oluşturulamaması nedeniyle kontaminasyon riski yüksektir. Bunun yanında kültür verimliliği düşük olup, birim alandan elde edilecek olan kuru madde miktarı da kapalı sistemlere göre oldukça azdır. Bu tür sistemler daha çok ekstrem koşullarda üreme kabiliyetine sahip türlerin (*Spirulina, Dunaliella*) üretimi için kullanılmaktadır.

Kapalı kültür sistemleri, farklı yapı ve boyutlardaki fotobiyoreaktörleri (torbalar, kolon PBR, panel PBR, tübüler PBR) ve fermenterleri içermektedir. Bu sistemlerin genel olarak kurulum ve işletim maliyeti yüksektir. Kapalı kültür sistemlerinden yüksek miktarda kuru madde eldesi mümkündür. Fotobiyoreaktörlerin açık sistemlere göre en büyük avantajı ise tam kontrollü kültüre izin vermesidir. Böylelikle, çevresel şartların etkisi minimumda tutularak yıl boyu üretim yapılabilir, kontaminasyon riski düşürülerek uzun süreli kültür devamlılığına olanak sağlar. Ticari anlamda bakıldığı takdirde fotobiyoreaktörlerin aşağıdaki özelliklere sahip olması beklenir (Olaizola, 2003);

-Yüksek alansal prodüktivite ($g.m^{-2}.gün^{-1}$),

-Yüksek hacimsel prodüktivite ($g.l^{-1}.gün^{-1}$),

-Maksimum fotobiyoreaktör hacmi ($l.PBR^{-1}$),

-Minimum üretim ve işletim maliyeti (₺.PBR^{-1}),

-Kültür parametrelerinin kontrolünün kolay olması (sıcaklık, pH, O_2, karışım),

-Sürdürülebilirlik.

Torbalarda yapılan kültürler, panel ve tübüler sistemlere göre daha düşük kurulum maliyetine sahip olmasına rağmen, kültürün verimliliği de daha düşük olarak gerçekleşmektedir. Torbalar, kapalı kültürler olması sebebiyle açık sistemlere göre çok daha fazla türün kültürünün yapılabilmesine izin vermektedir ve açık sistemlerden daha yoğun kültürler elde etmek mümkündür. Bunun yanında, sürekli kültür bu sistemler için uygun değildir. Sıcaklık problemlerinin yaşanmaması için kapalı alanlarda kullanılması tavsiye edilmektedir. Ancak çok yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılamaması ve üretim maliyetinin de yüksek olması sebebiyle yoğun üretimlerde verimlilik açısından uygun görülmemektedir (Borowitzka, 1999).

Kolon fotobiyoreaktörler özellikle tübüler sistemlere göre daha düşük maliyetle kurulumu, kompakt bir yapıda olması ve gaz-likit kütle transferinin daha iyi olması sebebiyle oksijen inhibisyonundan etkilenmemesi gibi avantajları sebebiyle tercih edilmektedir (Miron vd., 2002). Ancak, ölçeklendirme problemleri nedeniyle bu sistemlerin yüksek hacimlerde kullanımı mümkün görünmemektedir.

Panel fotobiyoreaktörler, doğal (güneş) veya yapay ışık (floresan lamba, led projektör) kaynağından enerji toplanabilmesine izin veren şeffaf bir panel ve rezervuar tankından oluşmaktadır. Bu sistemler yüksek ışıklanma yüzeyine sahip olup kültür yoğunluğu açısından açık ve torba sistemlere göre daha fazla ürün alınmasına olanak sağlamaktadır. Ancak, büyük ölçekli sistemlerin üretiminde çok fazla destek materyaline ihtiyaç duyulurken sıcaklık kontrolü de önemli bir problem oluşturmaktadır.

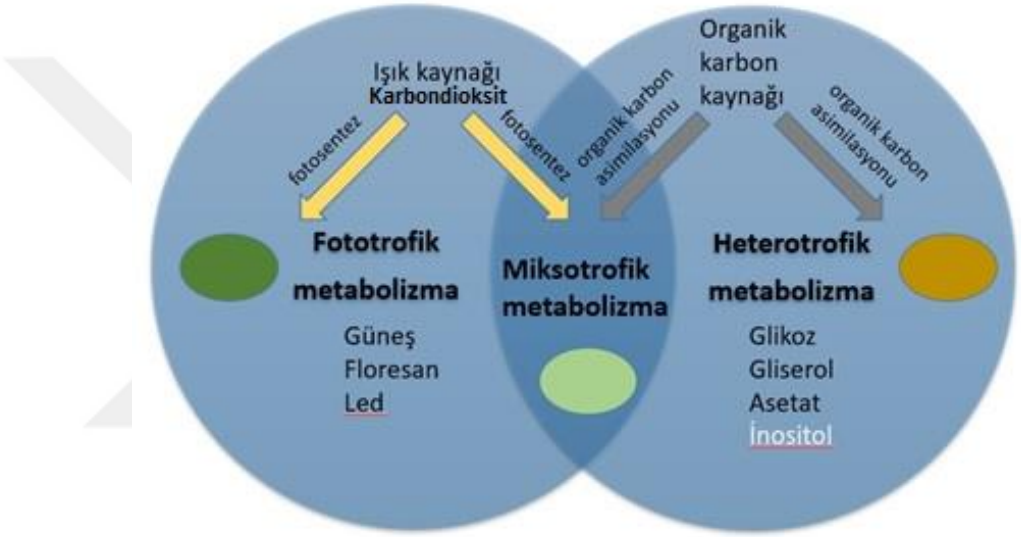
Tübüler fotobiyoreaktörler, farklı çaplara sahip ve farklı materyallerden üretilmiş boruların birbiri ardına eklenmesiyle oluşturulmuş olup, yine panel fotobiyoreaktörlerde olduğu gibi enerji toplayan bir ışıklanma alanı ile rezervuar tankından meydana gelmektedir. Yüksek ışıklanma yüzeyi, büyük ölçekli sistemlerin kurulumuna izin vermesi ve diğer sistemlere kıyasla kültür yoğunluğunun daha yüksek olması gibi avantajlara sahiptir. Ancak, tüplerde çözünmüş O_2 varlığı ve tüplerin iç yüzeyinde yapışma gibi birtakım dezavantajları da beraberinde getirmektedir. Yine de,

kültür parametrelerinin kontrolü ve hem iç hem de dış mekanda üretim için uygun olması sebebiyle yıl boyu yüksek miktarlarda sürekli kültürlerin yapılabilmesine izin vermesi sayesinde diğer sistemlere göre bir adım öne çıkmaktadır.

Mikroalglerin kültürü genel olarak tüm bitkilerde olduğu gibi ışık, su, CO_2 ve besleyici elementlerin dahil olduğu fotosenteze dayanmaktadır. Fototrofik kültür, tüm mikroalg türleri için mümkün iken birtakım sınırlamalar söz konusu olmaktadır. Işık kaynağı ve spektrumu algal büyüme üzerinde belirleyici olurken aynı zamanda mikroalgal biyokütlenin yapısını da etki değiştirebilmektedir (Kim vd., 2014; Mohsenpour vd., 2012; Teo vd., 2014). Öyle ki, *Chlorella* sp. ile yapılmış olan çalışmada, farklı ışık kaynaklarının (floresan, sarı led, beyaz led ve mavi-kırmızı led) hem hücre sayısını hem de pigment içeriğini etkilediği ortaya konulmuştur (Pirinç ve Durmaz, 2017). Sentetik atık suların *Chlorella vulgaris* ile arıtılması üzerine yapılmış olan bir başka çalışmada ise, farklı LED lambalar (kırmızı, beyaz, sarı, mor, mavi, yeşil) ve ışık yoğunluklarının kültür üzerine etkileri araştırılmıştır. Buna göre, hem yüksek karbon hem de yüksek azot girdisinin olduğu ortamlarda 1200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ışık yoğunluğunda kırmızı led lambanın en yüksek miktarda *Chlorella vulgaris* kuru ağırlığına ulaşılmasına olanak verdiği belirtilmiştir. Ayrıca tüm ışık kaynakları arasında aynı ışık yoğunluğu altında en düşük enerji tüketiminin de kırmızı led lambada olduğu da belirtilmiştir (Yan vd., 2013). Bunun dışında, ışığın kültür sistemi içinde ulaşabileceği nokta da sınırlıdır. Sistemin ışık yolu uzunluğunun yanı sıra kültür yoğunluğunun artışına bağlı olarak artan karşılıklı gölgeleme olayı da sistemin içerisinde bulunan hücrelerin ışığı daha fazla kullanamamasına sebep olmaktadır (McGinn vd., 2011).

Mikroalg kültürü üzerine yapılan çalışmalar, fototrofik kültürde sınırlayıcı faktörleri ortadan kaldırmak ve elde edilebilecek maksimum kuru madde miktarını arttırmak amacıyla giderek heterotrofik ve miksotrofik kültürlere doğru kaymaktadır. Heterotrofik kültür, fotosentezden bağımsız olarak canlının organik karbon kaynaklarından yararlanarak çoğalması ile gerçekleşirken, miksotrofik kültürde ise hem CO_2 hem de organik karbon kaynağı birlikte kullanılmaktadır (Şekil 1.1). Heterotrofik kültür tamamen organik karbon kaynağının kullanımıyla fototrofik kültüre göre çok daha yoğun kültürlerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca, özellikle endüstriyel üretimde kullanılan fermenterlerin teorik olarak birer mikroalg

üretim sistemi olarak değerlendirilmesine izin vermektedir. Ancak, bu kültürler birtakım dezavantajları beraberinde getirmektedir. Çok az sayıdaki mikroalg türünün bu üretime uygun olması, organik karbon kaynağının getirdiği maliyet, mikroalg ile diğer canlıların besin kaynağı için mücadelesi ve kontaminasyon, yüksek organik karbon miktarının yarattığı inhibisyon ve ışığa bağlı sentezlenen bazı metabolitlerin eksikliği bu dezavantajları oluşturmaktadır (Perez-Garcia vd., 2011). Miksotrofik kültürde ışığın sınırlayıcı etkisinden uzaklaşılırken, aynı anda ışığa bağlı olarak sentezlenen biyomoleküllerin de devamlılığı sağlanmaktadır.



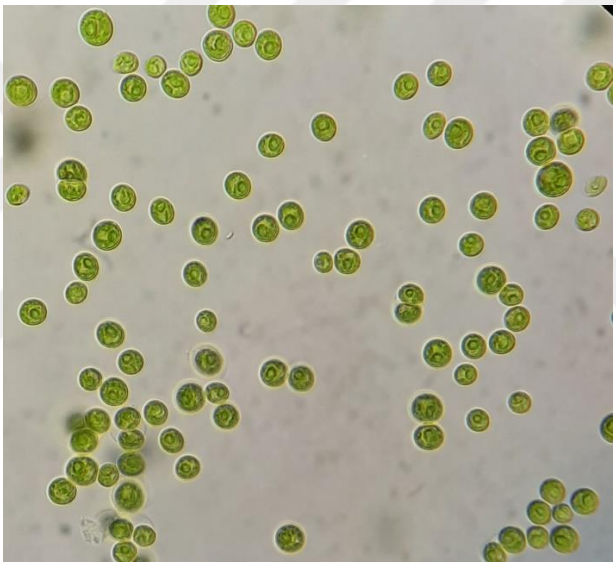
Şekil 1.1 Mikroalglerin kullandığı karbon kaynağına göre kültür yöntemleri

Organik karbon kaynağı üzerinden üreyebilen mikroalg türlerinin sayısı oldukça kısıtlıdır. Ayrıca, her karbon kaynağı her tür için uygun olmayabilir. Bu nedenle heterotrofik ve miksotrofik kültürleri yapılacak türler ve türlerin kullanacağı organik karbon kaynağının seçimi önemlidir.

1.3 *Chlorella* sp.

Beijerinck (1890) tarafından ilk defa Delft (Hollanda) Gölü'nden elde edilerek tanımlanan *Chlorella vulgaris*, hem model organizma olarak hem de yoğun üretime uygun bir mikroalg olarak kayda geçmiştir (Krienitz vd., 2015). Chlorophyta şubesinin Chlorellaceae familyasının üyesi olan bu mikroalg yaklaşık 2-10 µm boyutlarında ve yuvarlak şekillidir (Ho vd., 2013) (Şekil 1.2). Latince "küçük yeşil" anlamına gelen

Chlorella, olgun hücrelerde 17-21 nm'ye ulaşan bir hücre duvarına sahiptir. Tek bir kloroplasta sahip olan *Chlorella*'da klorofil miktarı kuru ağırlığın % 1-2'sine erişebilmektedir. Sahip olduğu amino asit profili Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından insan sağlığı için önerilen profili fazlasıyla karşılamaktadır (Safi vd., 2014). Klorofil dışında β-karoten, astaksantin, kantaksantin ve lutein gibi karotenoidleri de yapısında bulundurmaktadır (Gouveia vd., 1996). *Chlorella* hücrelerinde lipid oranının %50'nin üzerine çıkabildiği belirtilmekle birlikte (Liu vd., 2008) bu oran kültür şartlarına ve suşa göre değişebilmektedir. Miksotrofik üretimde %30 protein, %34 karbonhidrat ve %32 oranında lipid içeriğine sahip olduğu ortaya konulmuştur (Liang vd., 2009).



Şekil 1.2 *Chlorella* sp.'nin mikroskop altındaki görünümü

Chlorella günümüze kadar üzerine en fazla bilimsel çalışma yürütülen mikroalg türlerinden biridir. Endüstriyel anlamda da en yüksek miktarda yer alan *Chlorella*, miksotrofik ve heterotrofik olarak kültürü yapılabilen bir tür olmasından dolayı bu alanda da oldukça göz önünde bulunan bir mikroalg türüdür. Çalışmaların büyük çoğunluğu glikozun karbon kaynağı olduğu miksotrofik ve heterotrofik üretime yönelik olsa da, atıklar ve atık sular ile farklı besin ortamları üzerine de önemli çalışmalar yapılmıştır (Tablo 1.2)

Tablo 1.2 *Chlorella*'nın miksotrofik üretimi üzerine yapılmış bazı çalışmalar

Tür	**Karbon Kaynağı**	**Besin ortamı**	**Sıcaklık**	**Işık**	**Kaynak**
Chlorella protothecoides	40 $g.l^{-1}$ glikoz	Modifiye bazal, 10 $g.l^{-1}$ $NaNO_3$	28 °C	53 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Shi ve Chen, 1999
Chlorella zofingiensis	10-40 $g.l^{-1}$ glikoz	Modifiye Bristol 0-1,1 $g.l^{-1}$	30 °C	90 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Ip vd., 2004
Chlorella pyrenoidosa	0,1-1 $g.l^{-1}$ glikoz	Rodriguez-Lopez	30 °C	400-2000 lux	Martinez vd., 1997
Chlorella vulgaris	75-190 $g.m^{-3}$ HCO_3 + 75-100 $g.m^{-3}$ glikoz	BG-11	-	73 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Manhaeghe vd., 2020
Chlorella vulgaris	Mısır öğütme atıkları (%1); vinas (%2); peynir altı suyu (10 $g.l^{-1}$ laktoz)	BBM	27 °C	72 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	de Melo vd., 2018
Chlorella sorokiniana	Glikoz 1 $g.l^{-1}$	AAP, kadmiyum	24 °C	130 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Marchello vd., 2018
Chlorella vulgaris	Glikoz (40 $mg.l^{-1}$ sabit)	BG-11, farklı N, P	25 °C	45-50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Huang vd., 2021
Chlorella vulgaris	Monosodyum glutamat atık suyu	BG-11, MSGW (monosodyum glutamat atık suyu)	25 °C	30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Ji vd., 2014
Chlorella sp.	Glikoz 30 $g.l^{-1}$	MBG-11, demir EDTA	25 °C	2500 lux	Kona vd., 2017
Chlorella pyrenoidosa	Sodyum asetat trihidrat 5-10 $g.m^{-3}$; gliserol %0,5-1	Fogg's	25 °C	40,5 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Rai vd., 2013
Chlorella vulgaris	Mısır öğütme atıkları %0,5-1,5	BBM	27 °C	52 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	e Silva vd., 2018
Chlorella vulgaris	Glikoz 5-25 $g.l^{-1}$	SEM, KNO_3, $NaHCO_3$, KH_2PO_4, NaCl, EDTA-Na_2, $FeCl_3$, $MgSO_4$ $CaCl_2$, A5	25 °C	2500 lux	Kong vd., 2012
Chlorella sp.	Fruktoz; sodyum asetat; şeker kamışı; peynir altı suyu	BG-11	25 °C	70 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Mondal vd., 2016

Tablo 1.2'nin devamı

Chlorella sorokiniana	Glasiyal asetik asit; glikoz	TAP medium	30 °C	3500-10500 lux	Nair ve Chakraborty, 2020
Chlorella sp.	Gıda atık (ekmek)	BG-11	21 °C	120 µmol.m^{-2}.s^{-1}	Wang vd., 2020
Chlorella vulgaris	$NaHCO_3$	Atık su; ışık, $NaHCO_3$; aydınlatma döngüsü	-	2000-10000 lux	Ebrahimian vd., 2014
Chlorella minutissima	DOABE (yağı alınmış algal biyokütle ekstraktı)	DOABE (yağı alınmış algal biyokütle ekstraktı)	27 °C	1500-2000 lux	Katiyar vd., 2018
Chlorella vulgaris	Balık işleme tesisi atık suyu (272,7 µmol toplam organik karbon içeriği)	Atık su	28 °C	100 µmol.m^{-2}.s^{-1}	Trivedi vd., 2019
Chlorella protothecoides	Etanol (%0,4); gliserol (%1); sodyum asetat (%0,8)	BG-11; pepton	24 °C	100 µmol.m^{-2}.s^{-1}	Sforza vd., 2012
Chlorella pyrenoidosa	-	Domuz çiftliği atık su	25-27 °C	63 µmol.m^{-2}.s^{-1}	Wang vd., 2012
Chlorella sp.	Glikoz 10 g.l^{-1}	BG-11	30 °C	3000 lux	Cheirsilp ve Torpee, 2012
Chlorella vulgaris	Hidrolize olmayan peynir altı suyu, glikoz, laktoz, galaktoz	-	30 °C	70 µmol.m^{-2}.s^{-1}	Abreu vd., 2012
Chlorella sp.	-	Atık su	25 °C	60 µmol.m^{-2}.s^{-1}	Hu vd., 2012
Chlorella sorokiniana	2,5 g.l^{-1} $NaHCO_3$ & 2,5 g.l^{-1} glikoz	PM	25 °C	60 µmol.m^{-2}.s^{-1}	Kim vd., 2013
Chlorella kessleri	Glikoz (0-300 mmol/l), gliserol (0-600 mmol/l) & etanol (0-100 mmol/l)	Kuhl besin ortamı	26 °C	150 µmol.m^{-2}.s^{-1}	Wang vd., 2013
Chlorella sorokiniana	Glikoz & CO_2	BG-11	28 °C	150 µmol.m^{-2}.s^{-1}	Kumar vd., 2014
Chlorella vulgaris	Glikoz 5 g.l^{-1}	BG-11; pH	26 °C	160-180 µmol.m^{-2}.s^{-1}	Park vd., 2014
Chlorella sp.	Glikoz 3 g.l^{-1}	N8 medium	27-31 °C	285 µmol.m^{-2}.s^{-1}	Praveenkumar vd., 2014

Tablo 1.2'nin devamı

Chlorella sp.	Fruktoz, glikoz, gliserol, sukroz, ksiloz	Modifiye Walne	30 °C	4300 lux	Lin ve Wu, 2015
Chlorella sorokiniana	0,5-2 $g.l^{-1}$ glikoz	BBM	-	-	Juntila vd., 2015
Chlorella sp.	CO_2+glikoz	Modifiye N8	28-31 °C	170 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Kim vd., 2016
Chlorella sp.	Peynir altı suyu; beyaz şarap tortusu; gliserol	BG-11	25 °C	250 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Salati vd., 2017
Chlorella sp.	Anaerobik asidifikasyon eflüent	BG-11	25 °C	50-150 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Huo vd., 2018
Chlorella sorokiniana	Asetat; 2 aşamalı üretim	BG-11	25 °C	100 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Chen ve Liu, 2018
Chlorella pyrenoidosa	Sodyum asetat 2-10 $g.l^{-1}$	BG-11-amonyum	30 °C	45 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Liu vd., 2018
Chlorella kessleri	Glikoz 2 $g.l^{-1}$	BG-11	25 °C	30-180 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Deng vd., 2019
Chlorella vulgaris	CO_2	Atık su		100 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Jain vd., 2019
Chlorella sorokiniana	Sodyum asetat 6 $g.l^{-1}$	BG-11	15-35 °C	150 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Chen vd., 2019
Chlorella sp. 13 adet suş	Glikoz	Atık su simülasyonu	25 °C	120 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Gao vd., 2019
Chlorella sorokiniana	Sodyum asetat 6 $g.l^{-1}$	BG-11; Bazal medium; BBM; Bristol; Atık su (karides kültürü)	26 °C	150 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Chen vd., 2019
Chlorella sorokiniana	Sodyum asetat 0-7 $g.l^{-1}$	BG-11	33 °C	150 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Xie vd., 2019
Chlorella protothecoides	Glikoz; Asetik asit 5 $g.L^{-1}$	Tris fosfat amonyum	25-26 °C	0-400 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Sim vd., 2019
Chlorella pyrenoidosa	Glikoz 10 $g.l^{-1}$	Atık su	30 °C	1000-2000 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Wang vd., 2020
Chlorella luteoviridis; Chlorella protothecoides ; Chlorella sacchrarophila ; Chlorella pyrenoidosa	Glikoz asetik asit toplam 1 $g.l^{-1}$	BG-11, BBM, TAP	30 °C	72 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	Xie vd., 2020
Chlorella vulgaris	HCO_3+glikoz /asetat; CO_3+glikoz/asetat	BG-11	15-30 °C	8000 lux	Zhang vd., 2020

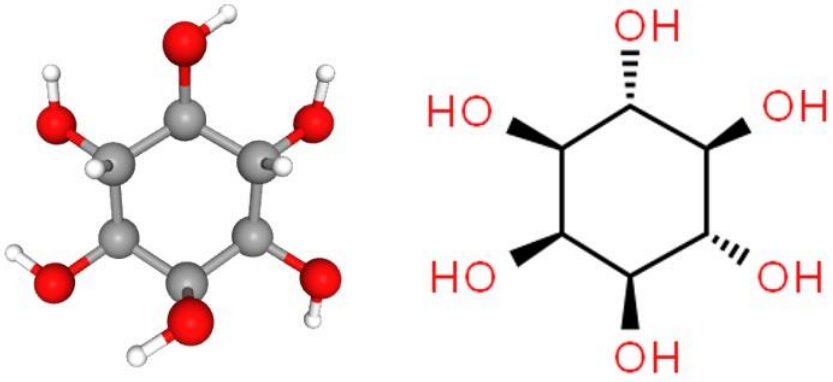
Tablo 1.2'nin devamı

Chlorella sorokiniana	Sodyum asetat	BG-11	33 °C	350	Xie vd., 2020
Chlorella pyrenoidosa	Glikoz 10 $g.l^{-1}$	Atık su	30 °C	673	Wang vd., 2021
Chlorella vulgaris	Glikoz 4 $g.l^{-1}$	Modifiye OCM	26 °C	-	Heredia-Arroyo vd., 2011
Chlorella sorokiniana	Glikoz	Kuhl	25 °C	100	Li vd., 2014
***Chlorella* sp.**	**Gliserol & myo-inositol**	**BG-11**	**21 °C**	**45-130 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$**	**Bu çalışma**

1.4 Myo-inositol

Myo-inositol, bazı kaynaklarda vitamin B8 olarak geçen, hayvan ve bitkilerin yapısında bulunan bir glikoz izomeridir (Cui vd., 2022; Pazourek, 2014). Şeker alkolleri arasında yer alan myo-inositol, $C_6H_{12}O_6$ formülüne sahip bir siklohekzandır (Şekil 1.3). TDK'ye göre vitamin "Besinlerde bulunan, vücutta genellikle yapılmayan, yağda veya suda çözünebilme özelliği olan, eksikliği veya fazlalığı çeşitli hastalıklara yol açan maddelere verilen genel ad" olarak tanımlanmıştır. İnsan dahil tüm memelilerde D-glikozdan myo-inositol sentezi kabiliyeti olduğu bilinmektedir (Vazquez-Levin ve Veron, 2020). Bu tanım üzerinden, birçok kaynakta myo-inositolün vitamin yerine şeker olarak tanımlandığı görülmektedir (Bizzarri ve Carlomagno, 2014; Ghosh vd., 2022; Pazourek, 2014; Seppala vd., 2022).

D-glikozdan myo-inositol sentezinde 3 enzimatik basamak bulunmaktadır. Bu mekanizma algler, mantarlar, bitkiler ve hayvanlarda hücre metabolizmasında yer almaktadır (Loewus ve Murthy, 2000). Bitkilerde oksin metabolizması, tuz toleransı, ışık ve stres koşullarına tepki gibi birbirinden farklı faaliyetlerde myo-inositolün fonksiyonel olarak rol aldığı düşünülmektedir (Alok vd., 2022; Basak ve Majumder, 2021; Li vd., 2021).



Şekil 1.3 İnositol kimyasal yapısı (URL-1, 2023; URL-2, 2023)

Bu tez çalışmasında myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Cam balonlarda yapılmış olan denemelerde kontrol, farklı karbon kaynağı (gliserol) ve myo-inositolün değişen konsantrasyonları mukayese edilmiştir. Fotobiyoreaktör denemesinde ise myo-inositolün endüstriyel kullanımı test edilmiş olup CO_2 kullanımı ile ulaşılan en yüksek kültür yoğunluğu için gerekli olan myo-inositol miktarı belirlenmiştir. Ayrıca, myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanımının fotobiyoreaktör kültüründe *Chlorella* sp.'nin biyokimyasal kompozisyonu üzerindeki etkileri de ortaya konulmuştur.

2. YÖNTEM

Kültür çalışmalarında Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmada kullanılan *Chlorella* sp. suşu Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinden temin edilmiştir. Kültür denemelerinde BG-11 (Tablo 2.1 ve 2.2) besin ortamı kullanılmıştır.

Tablo 2.1 BG-11 besin ortamı

Stok 1	**500 ml için**
$NaNO_3$	75,0 g
Stok 2	**500 ml için**
K_2HPO_4	2,0 g
$MgSO_4.7H_2O$	3,75 g
$CaCl_2.2H_2O$	1,80 g
$C_6H_8O_7$	0,30 g
$(NH_4)_5[Fe(C_6H_4O_7)_2]$	0,30 g
$EDTANa_2$	0,05 g
Na_2CO_3	1,00 g

Tablo 2.2 BG-11 iz element solüsyonu

İz element stok	**1 l için**
H_3BO_3	2,86 g
$MnCl_2.4H_2O$	1,81 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,22 g
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,39 g
$CuSO_4.5H_2O$	0,08 g
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,05 g

Not: Stok 1 ve 2; 10 mL/L, iz element solüsyonu 1 ml/l olacak şekilde ayarlanmaktadır.

Denemelerde kullanılan tüm balonlar, besin ortamları ve pipet uçları otoklav (Nüve OT 40 L) kullanılarak 121 °C'de 1 atm basın altında 15 dk bekletilerek sterilize edilmiştir. Bunun yanında örnek almak amacıyla kullanılan eppendorf tüpleri de etil alkolle dezenfekte edilerek kullanıma hazır halde bekletilmiştir. Deneme süresince ihtiyaç duyulacak olan malzemelerin her an kullanılabilir olması sağlanmıştır.

Hazırlıkların tamamlanmasının ardından Kontrol grubuyla birlikte 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. deneme gruplarının ekimleri yapılarak süreç başlatılmıştır (Tablo 2.3). Tüm denemeler 3'er tekerrür olacak şekilde tamamlanmıştır. Günlük olarak alınan örneklerde kültürdeki büyüme takip edilmiştir. Bunun yanında kültür süresince 2 defa olacak şekilde pigment analizi gerçekleştirilmiştir. Denemelerin sonunda kültürler santrifüjde çöktürülerek supernatantın atılmasıyla yaş alg kütleleri elde edilmiştir. Bu şekilde elde edilen yaş alg dondurulup saklanarak toplam lipid ve yağ asitleri analizlerinde kullanılması amaçlanmıştır.

Tablo 2.3 *Chlorella* sp. ile yapılan bütün deneme gruplarının planı

Grup	Besin ortamı	Myo-inositol	Gliserol	Havalandırma
Kontrol	BG-11	-	-	-
D1	BG-11	-	2000 mg/l	-
D2	BG-11	500 mg/l	2000 mg/l	-
D3	BG-11	100 mg/l	-	-
D4	BG-11	500 mg/l	-	-
D5	BG-11	1000 mg/l	-	-
D6	BG-11	2000 mg/l	-	-

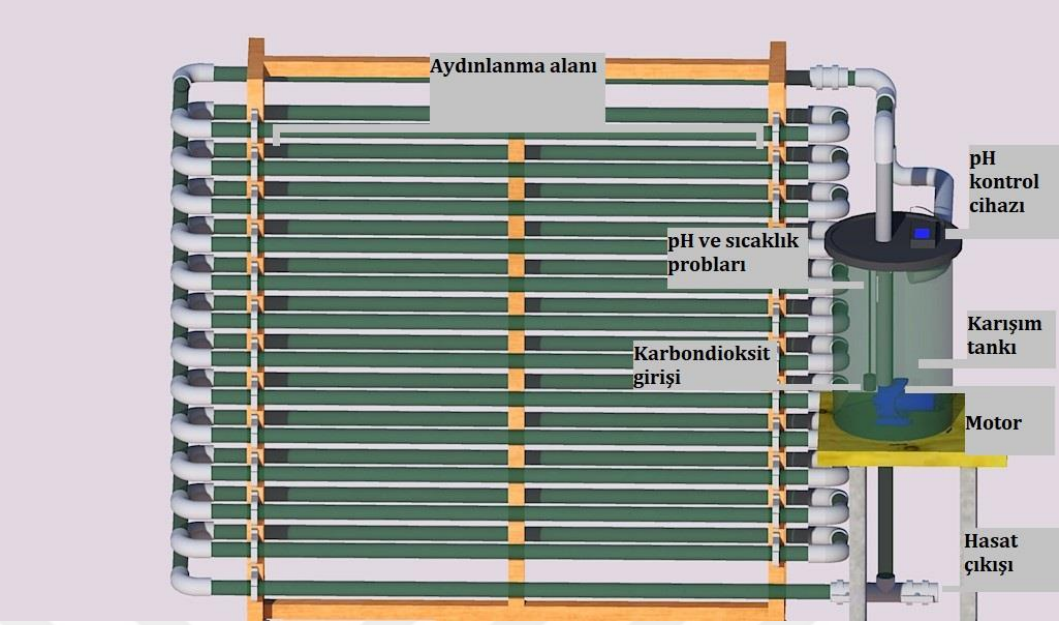
2.1 Fotobiyoreaktör

Çalışmada kullanılan tübüler fotobiyoreaktör toplam 140 litre hacim ile çalışmaktadır. Bu hacmin 107 litresi ışık alan pleksiglas tübüler düzenekten meydana gelirken, 33 litrelik kısım rezervuar (karışım) tankından meydana gelmektedir. Tübüler fotobiyoreaktör içerisinde bulunan sıvı kütle (su, besin ortamı, mikroalg) sirkülasyonu

tankın içerisine yerleştirilmiş pompa ile tüplere gönderilip en sonunda tekrar tankın içerisine boşalmak suretiyle sağlanmaktadır (Şekil 2.1 ve 2.2).



Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan tübüler fotobiyoreaktör



Şekil 2.2 Çalışmada kullanılan tübüler Fotobiyoreaktörün bölümleri

Ayrıca, içerisindeki selenoid valf ile otomatik olarak CO_2 ilavesine olanak sağlayan pH kontrol cihazı (JBL ProFlora CO_2/pH control) yardımıyla kültür ortamı pH'ı istenilen seviyede tutulmaktadır. Fotobiyoreaktörün aydınlatılması tüplerin arasında bulunan 4 adet floresan lamba (2 x Philips TL-D Super 36W/830 ve 2 x Philips TL-D Super 36W/840) yardımıyla yapılmaktadır. Bunun yanında fotobiyoreaktördeki hücre yoğunluğunun yükselmesi ile birlikte fotobiyoreaktörün karşısına yerleştirilen 4 adet 100 watt'lık led ışık düzeneği ilave ışık kaynağı olarak kullanılmıştır. Aydınlatılan bölümün üzerine gelen ortalama ışık şiddeti Apogee MQ-620 marka-model kuantum metre ile 130 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Sistemin sıcaklığı da yine pH kontrol cihazına bağlı bulunan sıcaklık sensörüyle takip edilmiştir.

Tübüler fotobiyoreaktör maksimum kültür yoğunluğuna ulaşana kadar CO_2 desteğiyle çalıştırılmış olup, arkasından karbon kaynağı olarak myo-inositol kullanımına adapte edilmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple, öncelikle CO_2 desteği kesilmeden düşük miktarlarda myo-inositol ilavesi yapılarak (10 g/140 l, 20 g/140 l ve 30 g/140 l) sistem pH'ı üzerinden kullanılan karbon kaynağının durumu gözlenmiş olup bu sonuca uygun olarak kullanılacak miktar belirlenmiştir. Bunun sonucunda CO_2 girişi tamamen durdurulmuş olup dışarıdan yapılan aydınlatma desteği de tamamen kapatılmıştır. Süreç boyunca belirli aralıklarla hasatlar da yapılmıştır (Şekil 2.3). Hasat edilen mikroalgin süzme işlemi Zenit GA 140 seperatör ile gerçekleştirilmiştir. Bu

hasatlardan elde edilen yaş algler, yağ asitleri ve toplam lipid miktarı analizlerinde kullanılmak üzere dondurularak saklanmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.3 Tübüler fotobiyoreaktörde üretilen *Chlorella* sp.'nin hasat işlemi



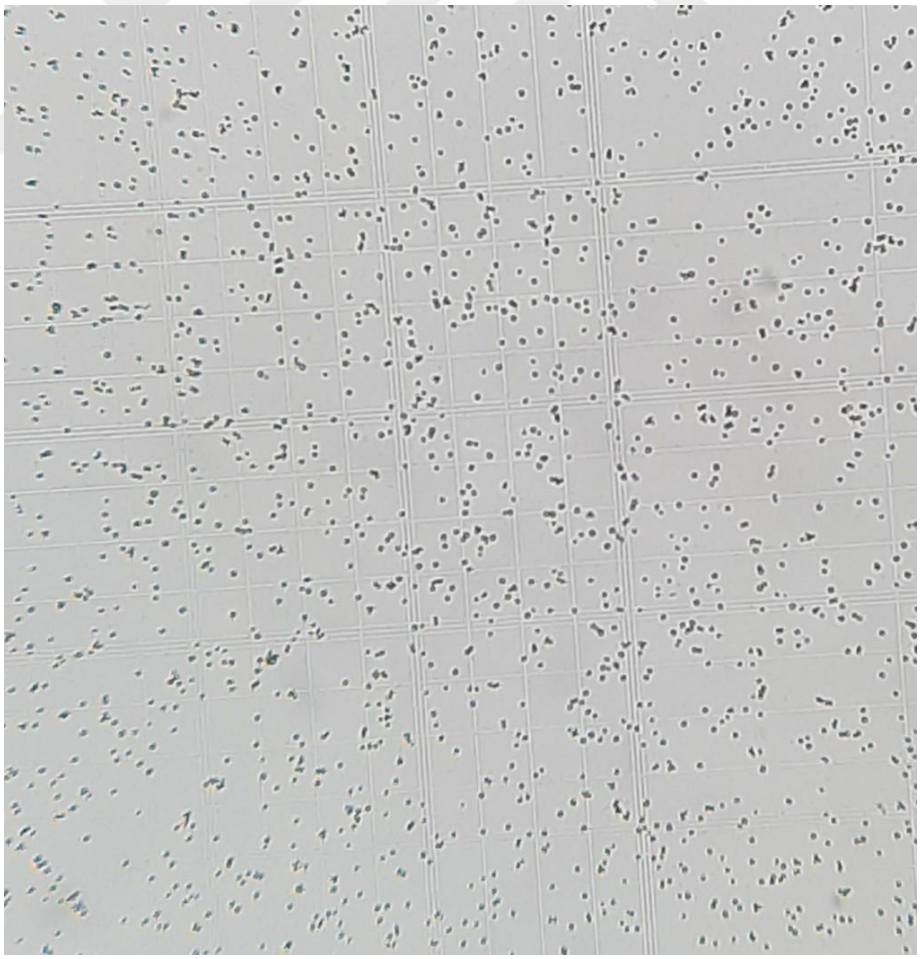
Şekil 2.4 Süzme işleminden sonra dondurulmuş mikroalg örneği

2.2 Büyüme

Kültür denemeleri süresince günlük olarak hücre sayımları Neubauer hemositometrede (isolab) gerçekleştirilerek (şekil 2.5), Hach DR 6000 spektrometrede tarama yöntemiyle absorbans değerleri yine günlük olarak takip edilmiştir. 680 nm'de okunan absorbans değerleri kültürün optik yoğunluğunu (OD) belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Kültürlerde spesifik büyüme (SB) aşağıdaki formül ile (2.1) hesaplanarak ifade edilmiştir;

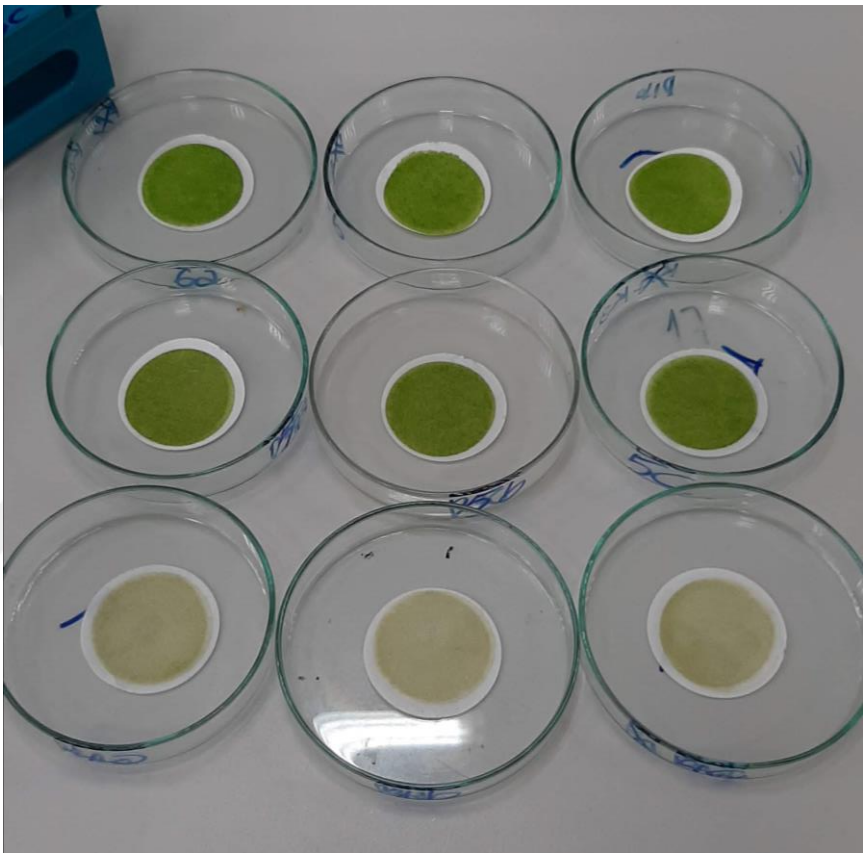
$$SB=\frac{\ln X_2-\ln X_1}{t_2-t_1} \quad (2.1)$$

*Formüldeki X_2 ve X_1 sırasıyla t_2 ve t_1 zamanlarındaki kültür konsantrasyonlarını belirtmektedir.



Şekil 2.5 Hücre sayımı için kullanılan Neubauer hemositometre (isolab)

Bunun yanında kültürlerin sonunda ve fotobiyoreaktör denemesi sırasında hasat günlerinde kuru ağırlık tayini de gerçekleştirilmiştir. Kuru ağırlık tayini için, 0,45 µm göz açıklığına sahip 47 mm çapındaki Whatman filtre kağıtları 2 saat boyunca 105 °C'de kurutularak darası alınmıştır. Ardından 5 ml mikroalg örnekleri filtre kağıtlarından süzülmüştür. Son olarak yine 105 °C'de (Şekil 2.6) örneklerin ağırlıkları sabit kalana kadar kurutulmuştur (Zou ve Richmond, 1999).



Şekil 2.6 Kültür ortamından süzme işlemi yapılan mikroalg örnekleri (Üst sıra: D6 grubu, orta sıra: D5 grubu, alt sıra: D3 grubu)

Kültürlerin son gününde ışık mikroskobunda çekilmiş olan fotoğraflar üzerinden dijital olarak hücre boyutu ölçümü yapılmıştır. Bunun için, her kültürün Neubauer sayım lamı üzerinden çekilmiş fotoğrafları üzerinde tek bir bölge belirlenerek her bir grup için rastgele 10 hücrenin boyutu ImageJ (National Institute of Health, ABD) yazılımı ile boyut tespiti yapılmıştır. Bu değerler ortalama hücre boyutu olarak verilmiştir.

2.3 Pigment Analizi

Toplam karotenoid ve klorofil *a* miktarlarının ortaya konulabilmesi amacıyla yapılmış olan pigment analizi Su Ürünleri Araştırma Laboratuvarında spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Her kültürden 5 ml örnekler alınıp 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjde (Şekil 2.7) çöktürülerek üstte kalan süpernatant atılmıştır. Ardından 5 ml metil alkol ve cam tozu ilave edilerek önce 30 saniye boyunca vorteks ardından ise 10 saniye boyunca mekanik karıştırıcı ile muamele edilerek homojenize edilmiştir. Ultrasonik banyoda 10 dakika tutulduktan sonra tekrar 30 saniye boyunca vorteks ile muamele edilmiştir. Tüm bu işlemlerin ardından 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjde çöktürme işlemi gerçekleştirildikten sonra süpernatant alınarak spektrofotometrede klorofil *a* için 666 nm'de, toplam karotenoid için ise 470 nm'de okunan değerlerin hesaplaması aşağıda verilen formüller ile (2.2 ve 2.3) yapılmıştır (Şekil 2.8).

Klorofil *a* (µg/ml) = 13,9 A_{666} (Macias-Sanchez vd., 2005) (2.2)

A_{666} 666 nm okunan absorbans (soğurma) değeri

Toplam karotenoid (µg/ml) = 4,5 A_{470} (Zou ve Richmond, 2000) (2.3)

A_{470} 470 nm okunan absorbans (soğurma) değeri



Şekil 2.7 Santrifüjde yapılan çöktürme işlemi

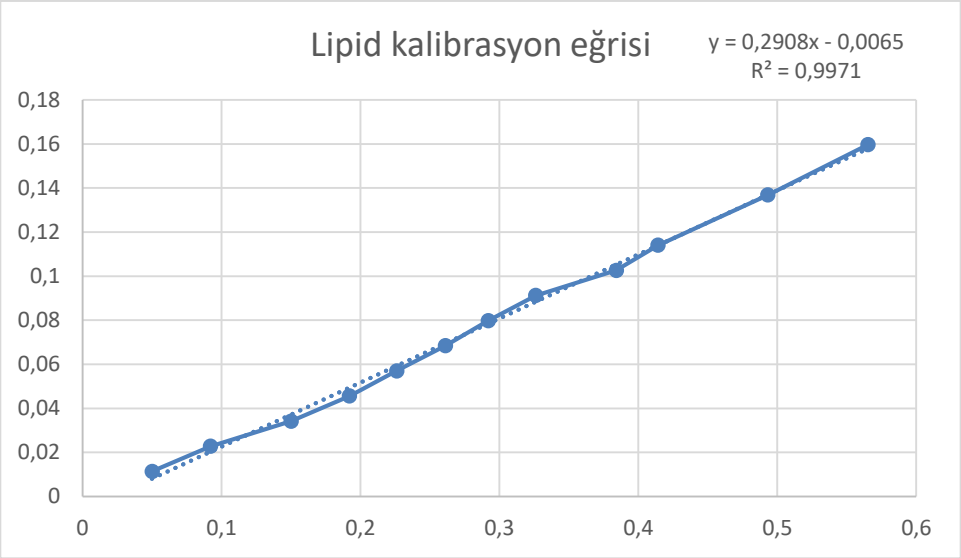


Şekil 2.8 Spektrofotometrede okutulan pigment örneği

2.4 Toplam Lipid

Toplam lipid miktarları spektrofotometrik olarak belirlenmiş olup kuru ağırlığa oranı hesaplanmıştır. SPV (sülfo-fosfo-vanilin) metodu (Mishra vd., 2014) kullanılarak yapılan analizde fosfo-vanilin reaktifi 0,6 g vanilin 10 ml etil alkolde çözdürüldükten sonra sırasıyla 90 ml distile su ve 400 ml fosforik asit ile karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Daha önce tartılan örnekler cam tüplerde önce 0,1 mL distile su ardından da 2 ml sülfürik asit ilave edilerek 100 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Bu işlemden sonra 5 dakika boyunca buz üzerinde soğutulan örnekler 5 mL fosfo-vanilin ilave edildikten sonra 37 °C ve 200 rpm'de 15 dakika boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir (Şekil 2.10). Absorbans değerleri 530 nm'de okutulmuş olup, daha önce elde edilen kalibrasyon eğrisinin (Şekil 2.9) aşağıda verilen denklemine (2.4) göre hesaplanmıştır.

$$y = 0{,}2908x - 0{,}0065 \quad (2.4)$$



Şekil 2.9 Lipid analizi için oluşturulan kalibrasyon eğrisi

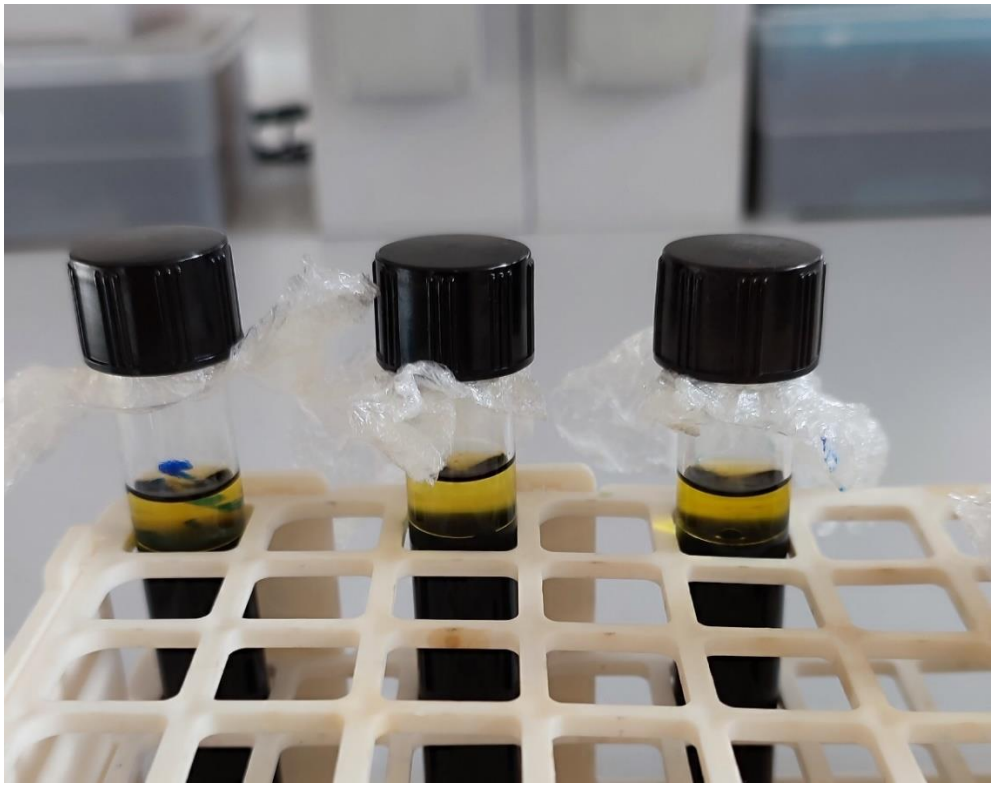


Şekil 2.10 SPV (sülfo-fosfo-vanilin) metoduna göre yapılan toplam lipid analizi için hazırlanan örnekler

2.5 Yağ Asitleri Analizi

Yağ asitleri analizi için örneklerin hazırlanması Rodriguez-Ruiz vd., (1998) tarafından önerilen prosedürün optimize edilmiş haline (Chu vd., 2015) göre yapılmıştır. Buna göre, ağırlığı bilinen kurutulmuş örnekler cam tüplere alındıktan sonra 80 ml/g oranında asetil klorür-metil alkol (1/9; h/h) çözeltisi ilave edilmiştir. Bu karışım 80 °C'de 45 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde oda sıcaklığına getirilmiş olup, bu işlemin ardından tüplere 1 ml %0,58 NaCl çözeltisi ilave edilmiştir. Son olarak,

tüplere 2 mL hekzan eklendikten sonra 30 saniye vorteks ile muamele sonunda FAME (fatty acid methyl esters-yağ asidi metil esterleri) içeren süpernatant analiz için ayrılmıştır (Şekil 2.11). Örneklerin hazırlanma süreci Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda tamamlanmıştır. Hazırlanan örneklerin kromatografik analizi ise Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (Shimadzu GCMS-QP 2010 ULTRA) yaptırılmıştır. RTX-2300 kapiler kolon (60m; 0,25 mm; 0,2 μm) kullanılmış ve taşıyıcı gaz olarak helyum seçilmiştir. Enjeksiyon sıcaklığı 250 °C olup enjeksiyon hacmi 1µl'dir. Fırın başlangıç sıcaklığı 100 °C (240 °C'ye kadar 4°C/dk artış ile) , son sıcaklık ise 240 °C (15 dk)'dir.



Şekil 2.11 Doğrudan transesterifikasyon metoduna göre hazırlanmış kültür örneklerinde FAME içeren süpernatant

2.6 İstatistiksel Analiz

Yapılan denemeler için varyansların normalite ve homojenitesi Smirnov-Kolmogorov testi ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, farklılıkların kaynakları ise Tukey testi ile ortaya konulmuştur. İstatistiki analizler için SPSS (Sürüm 23.0) paket programı kullanılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Elde edilen bulgular 2 ana başlıkta değerlendirilmiştir. İlk olarak 1 l'lik balonlarda yapılan denemeler (Şekil 3.1), ardından ise endüstriyel üretimin laboratuvar ortamında simülasyonunu sağlayan fotobiyoreaktör denemesinin bulguları verilmiştir.



Şekil 3.1 1 litrelik balonlarda yapılan denemelerin farklı gruplarına ait görünümü

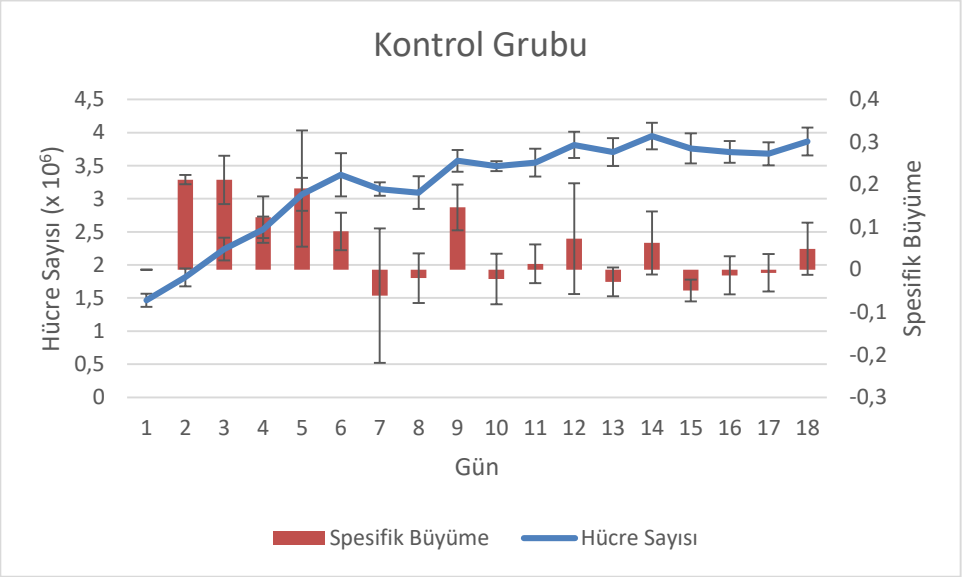
3.1 Balon Denemeleri

3.1.1 Büyüme

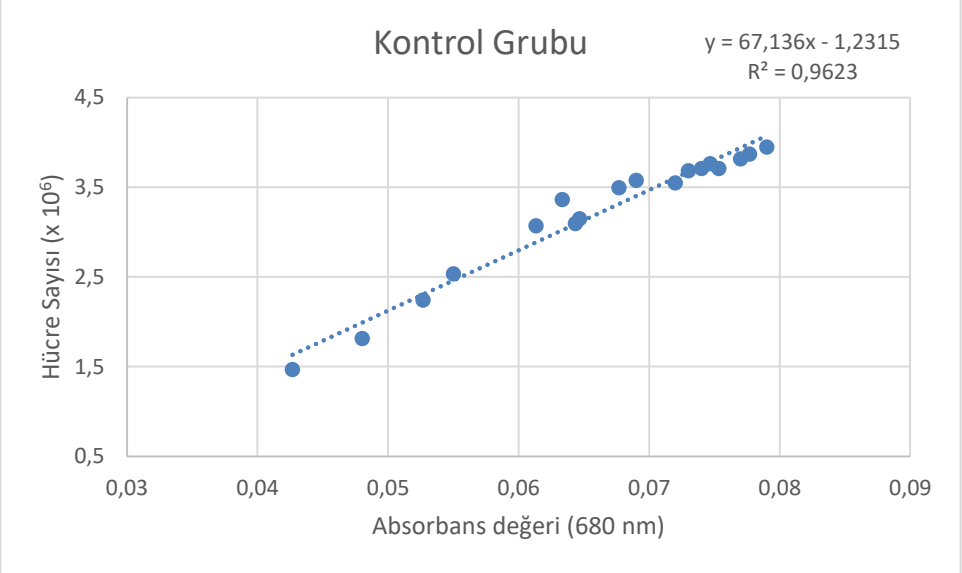
Kültür süresince yapılan hücre sayımları sonucunda maksimum hücre yoğunlukları tespit edilmiştir. Kültürlerin yoğunluğu hücre sayımının yanı sıra spektrofotometrik olarak absorbans değerleri ölçülerek de belirlenmiştir. Buna göre 680 nm'de kontrol grubu ve tüm deneme gruplarının R^2 değerleri 0,95'den yüksek bulunmuştur. En yüksek R^2 değerleri sırasıyla 0,9888; 0,9869 ve 0,9860 olarak D1, D4 ve D3 grubunda hesaplanmıştır.

Kontrol grubunun en yüksek hücre sayısı 3,95±0,2 x 10^6 hücre/ml olarak tespit edilmiş olup ortalama hücre sayısı 3,21±0,19 x 10^6 hücre/ml olarak hesaplanmıştır. Bu grupta

en yüksek spesifik büyüme oran 2. gün 0,21±0,01 iken ortalama spesifik büyüme oranı ise 0,06±0,06 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.2). Optik olarak ölçümü yapılan yoğunluğun R^2 değeri 0,96 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3).



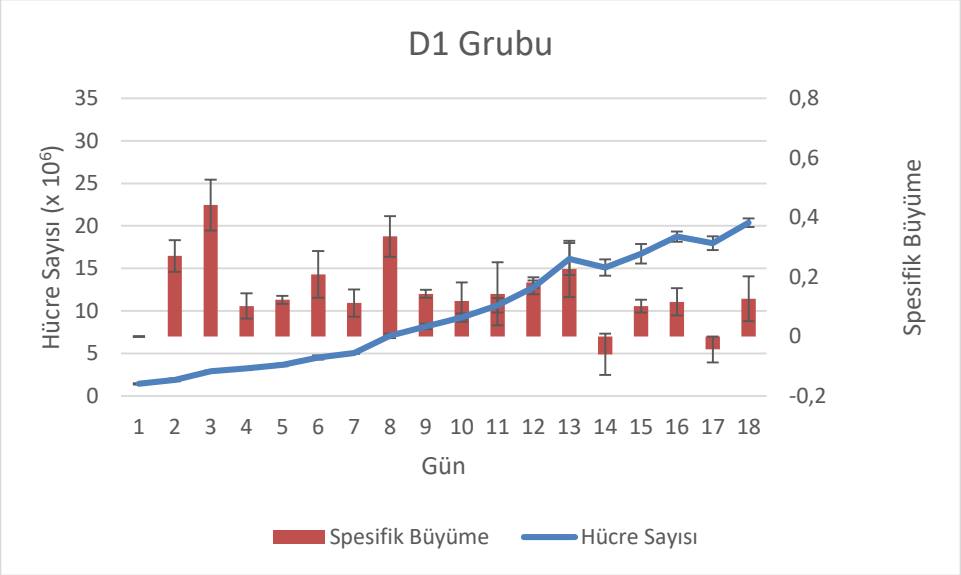
Şekil 3.2 Kontrol grubu hücre sayıları (hücre/ml) ve spesifik büyüme değerleri



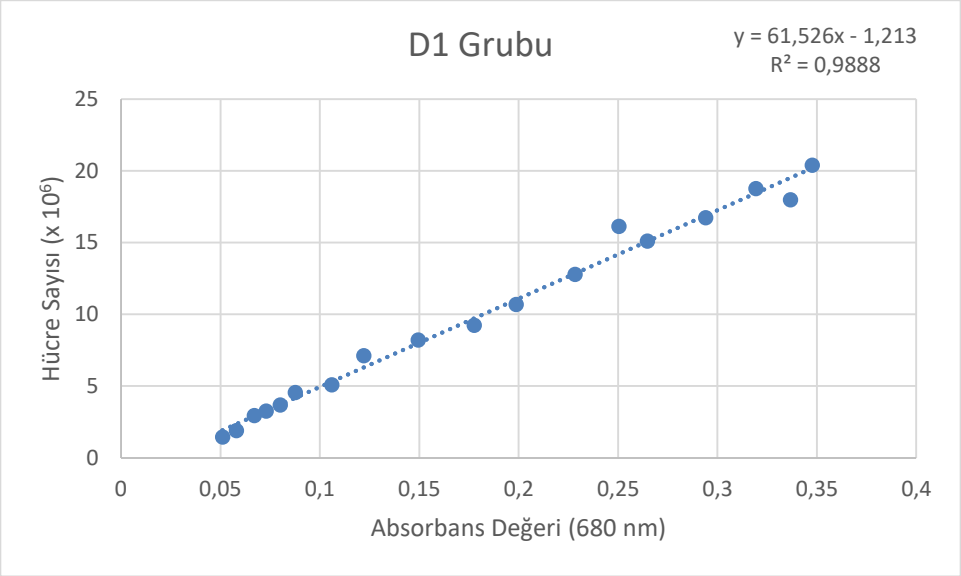
Şekil 3.3 Kontrol grubunun hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği

D1 grubu 2000 mg/l gliserolün karbon kaynağı olarak ilave edildiği gruptur. Bu grup, en yüksek hücre sayısına 18. gün ulaşmış olup bu değer 20,38±0,5 x 10^6 hücre/ml olarak belirlenmiştir. Toplam 18 günlük deneme sürecinin ortalama hücre sayısı 9,76±0,53 x 10^6 hücre/ml olarak gerçekleşmiştir. Kültür denemesinin 2. gününde en yüksek spesifik büyüme oranı 0,44±0,09 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ortalama

spesifik büyüme oranı da 0,16±0,06 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.4). Optik yoğunluğun R^2 değeri ise 0,99 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5).



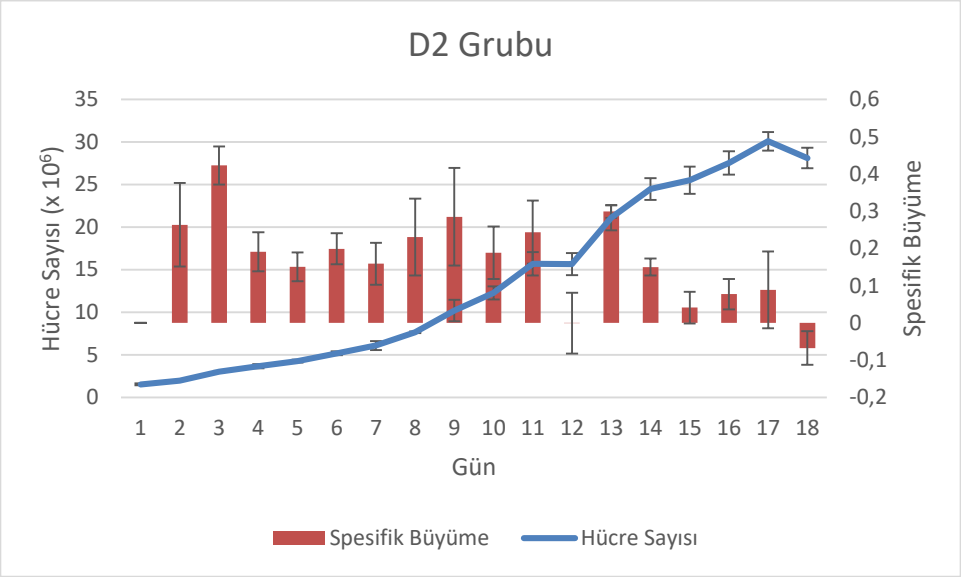
Şekil 3.4 D1 grubu (2000 mg/l gliserol) hücre sayıları (hücre/ml) ve spesifik büyüme değerleri



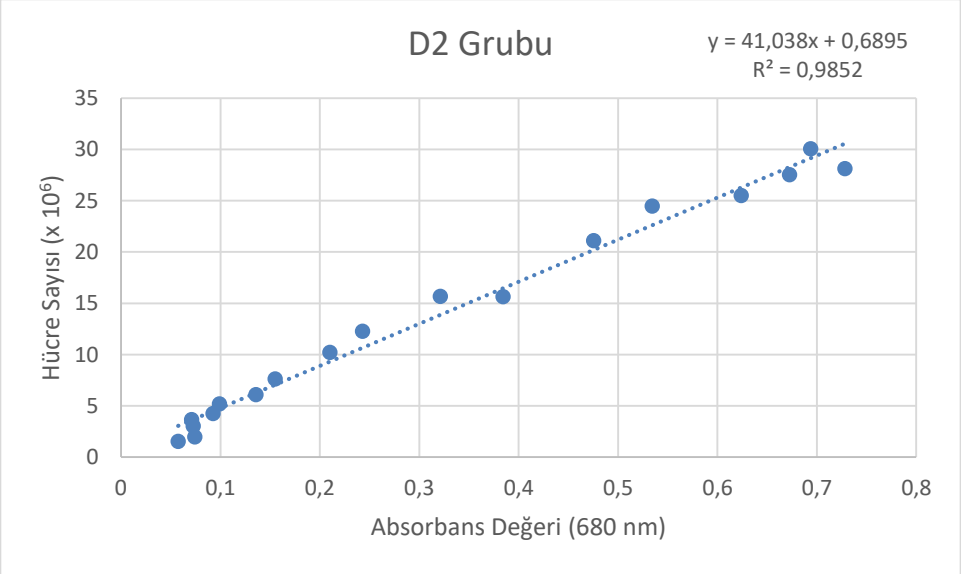
Şekil 3.5 D1 grubunun (2000 mg/l gliserol) hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği

D2 grubu 2000 mg/l gliserolün yanı sıra, 500 mg/l oranında myo-inositol ilavesi yapılmış olan gruptur. Bu grubun en yüksek hücre sayısı 17. günde 30,08±1,08 x 10^6 hücre/ml olarak tespit edilmiş olup, 18 günlük denemenin ortalama hücre sayısı 13,55±0,79 x 10^6 hücre/ml olarak hesaplanmaktadır. Spesifik büyüme oranlarında ise

en yüksek değer 2. gün 0,42±0,05 olarak belirlenmiş olup ortalama spesifik büyüme oranı ise 0,17±0,06 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.6). Optik yoğunluğun R^2 değeri ise 0,99 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7).



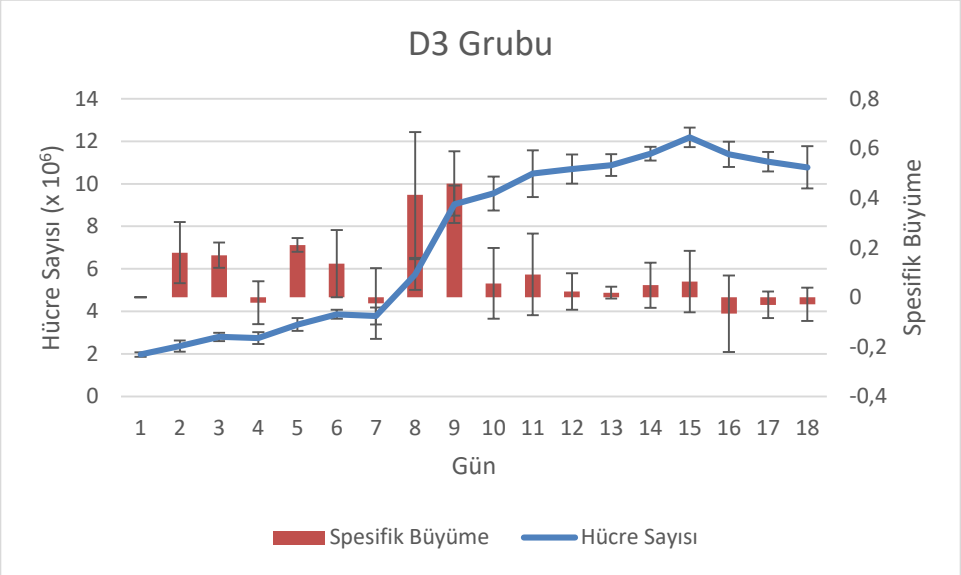
Şekil 3.6 D2 (2000 mg/l gliserol ve 500 mg/l myo-inositol) grubu hücre sayıları (hücre/ml) ve spesifik büyüme değerleri



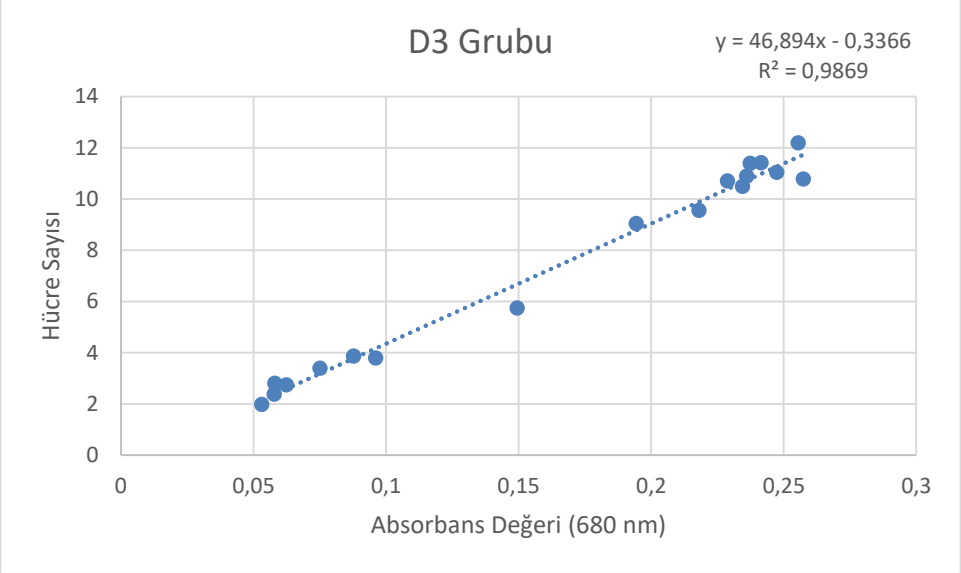
Şekil 3.7 D2 grubunun (2000 mg/l gliserol ve 500 mg/l myo-inositol) hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği

100 mg/l oranında myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı D3 grubunun en yüksek hücre sayısı 12,19±0,46 x 10^6 hücre/ml olarak 16. günde tespit edilmiştir. Ortalama hücre sayısı ise 7,45±0,51 x 10^6 hücre/ml olarak hesaplanmaktadır. Spesifik

büyüme oranlarına bakıldığında, en yüksek değerin 9. günde tespit edildiği görülmekte olup bu değer 0,46±0,13 olarak hesaplanmaktadır. Ortalama spesifik büyüme oranı ise 0,10±0,11 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8). Optik yoğunluğun R^2 değeri ise 0,99 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.9)



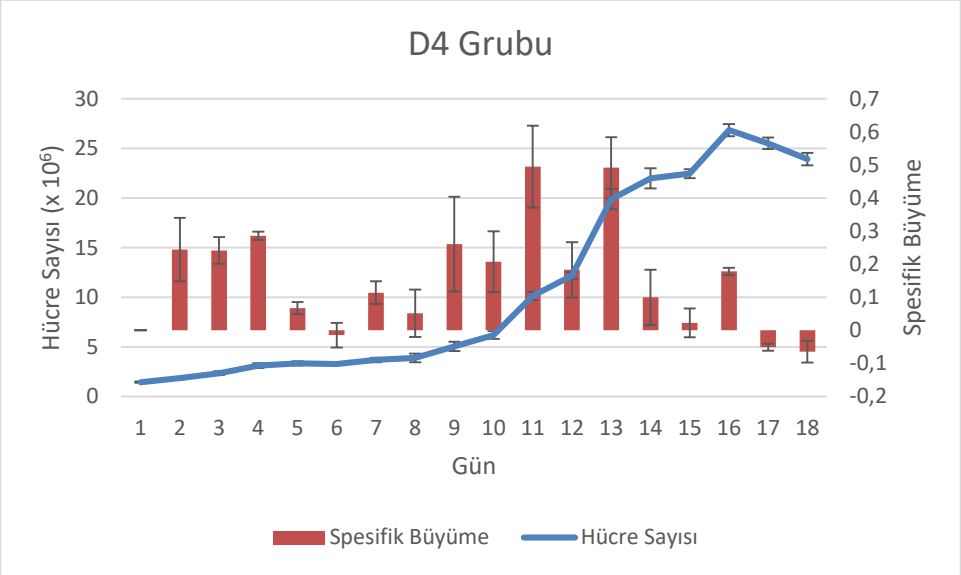
Şekil 3.8 D3 (100 mg/l myo-inositol) grubu hücre sayıları (hücre/ml) ve spesifik büyüme değerleri



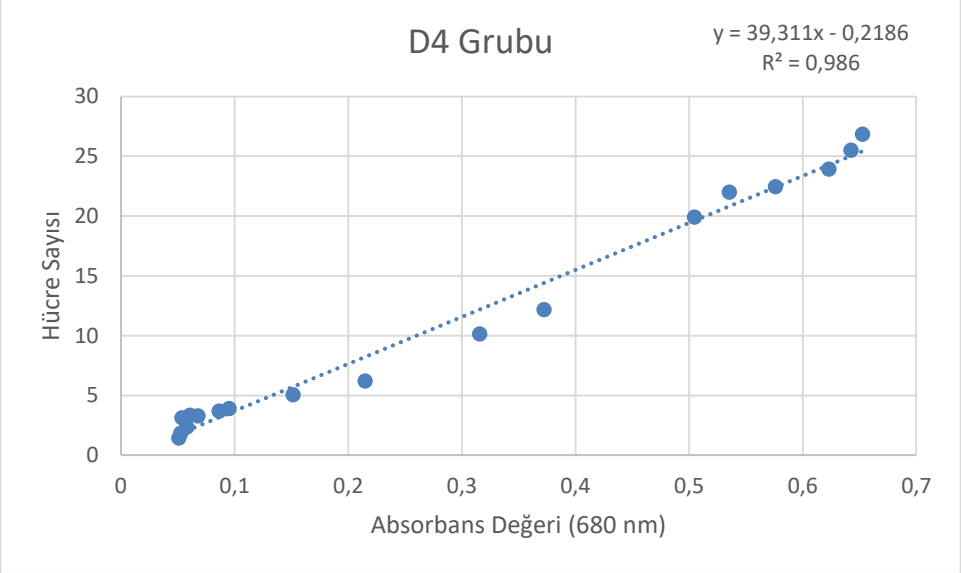
Şekil 3.9 D3 grubunun (100 mg/l myo-inositol) hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği

D4 grubunda karbon kaynağı olarak sadece 500 mg/l oranında myo-inositol kullanılmıştır. Bu grubun en yüksek hücre sayısı 16. günde 26,83±0,62 hücre/ml

olarak gerçekleşmiştir. Ortalama hücre sayısı ise 10,95±0,42 x 10^6 hücre/ml olarak hesaplanmıştır. 11. günde 0,49±0,12 ile en yüksek spesifik büyüme değeri elde edilen D4 grubunun ortalama spesifik büyüme oranı ise 0,16±0,06 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.10). Optik yoğunluğun R^2 değeri ise 0,99 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.11).



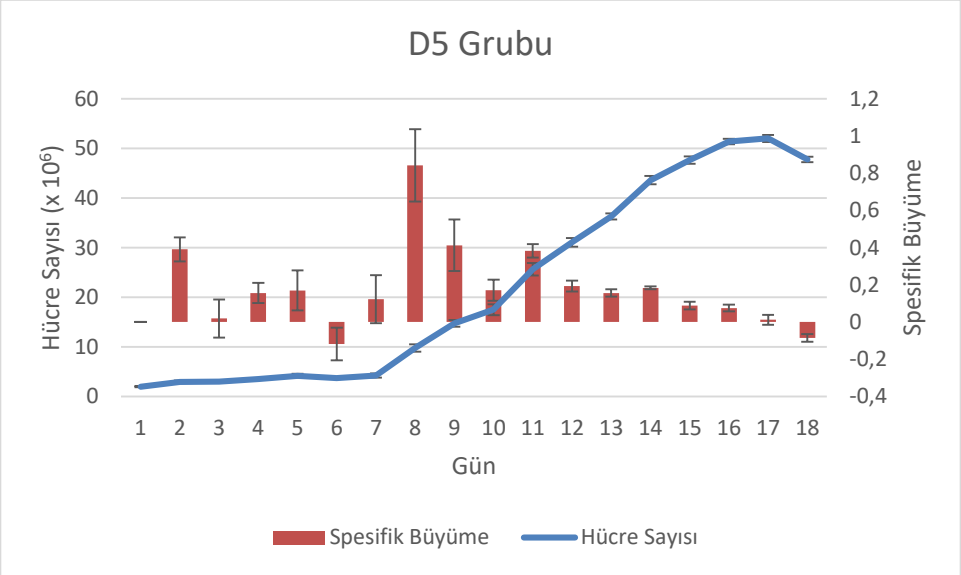
Şekil 3.10 D4 (500 mg/l myo-inositol) grubu hücre sayıları (hücre/ml) ve spesifik büyüme değerleri



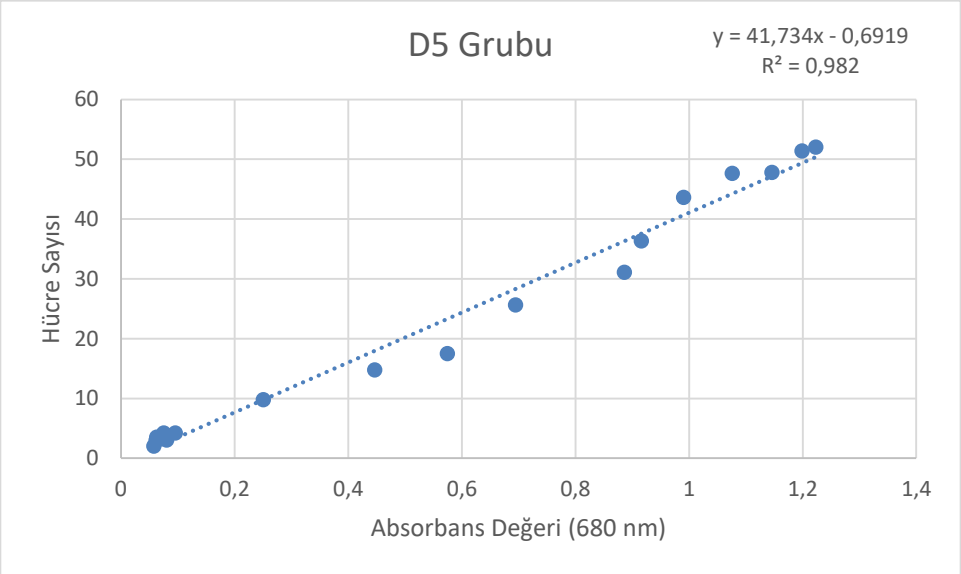
Şekil 3.11 D4 grubunun (500 mg/l myo-inositol) hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği

D5 grubu 1000 mg/l oranında myo-inositol eklenen grup olarak kültürün 17. gününde en yüksek hücre sayısı olan 52±0,71 x 10^6 hücre/ml'ye ulaşmıştır. 22,27±0,56 x 10^6

hücre/ml ortalama hücre sayısına sahip olan D5 grubunun en yüksek spesifik büyüme oranı 7. günde 0,84±0,19 olarak tespit edilmiştir. Ortalama spesifik büyüme oranı ise 0,18±0,07 olarak hesaplanmaktadır (Şekil 3.12). Optik yoğunluğun R^2 değeri ise 0,98 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.13).



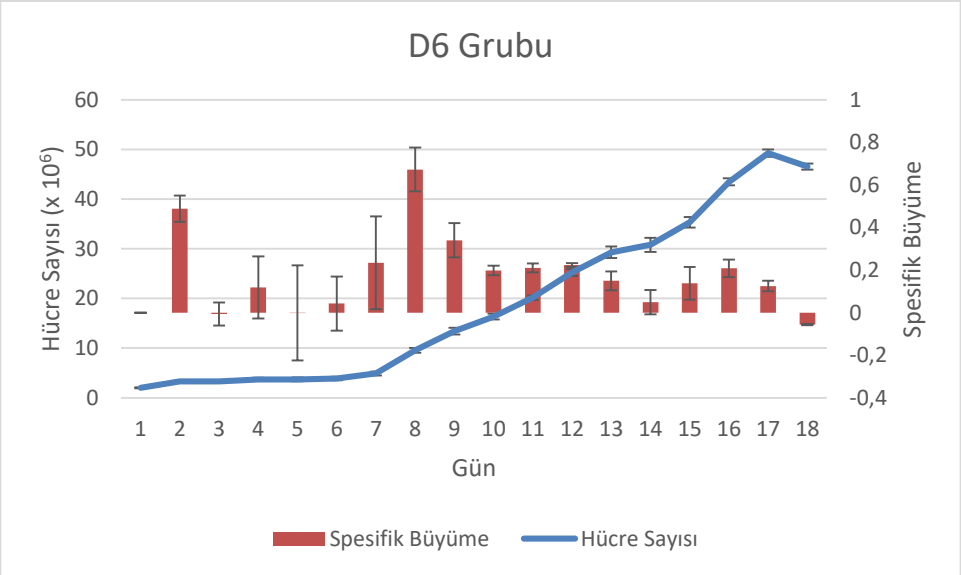
Şekil 3.12 D5 (1000 mg/l myo-inositol) grubu hücre sayıları (hücre/ml) ve spesifik büyüme değerleri



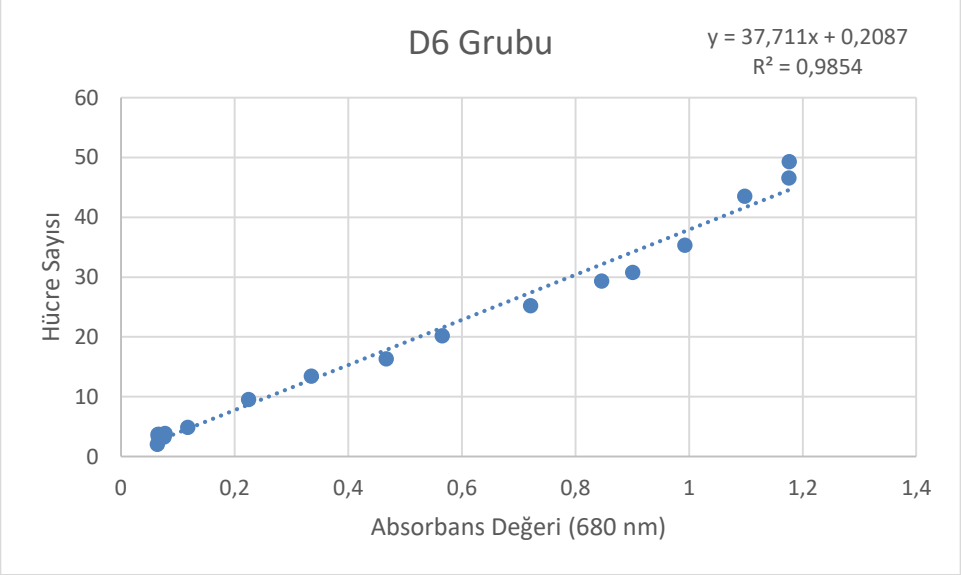
Şekil 3.13 D5 grubunun (1000 mg/l myo-inositol) hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği

D6 grubu 2000 mg/l oranıyla myo-inositol ile en yüksek myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı gruptur. Bu grubun en yüksek hücre sayısı 49,28±0,75 x

10^6 hücre/ml ile 17. günde tespit edilmiş olup, ortalama hücre sayısı ise 19,13±0,58 x 10^6 hücre/ml olarak hesaplanmaktadır. Spesifik büyüme oranlarının ortalaması 0,19±0,08 olarak hesaplanırken, en yüksek spesifik büyüme oranı 8. günde 0,67±0,1 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.14). Optik yoğunluğun R^2 değeri ise 0,99 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.15).



Şekil 3.14 D6 grubunun (2000 mg/l myo-inositol) hücre sayıları (hücre/ml) ve spesifik büyüme değerleri



Şekil 3.15 D6 grubunun (2000 mg/l myo-inositol) hücre sayısı ve absorbans değerinin dağılım grafiği

Elde edilen veriler analiz edildiğinde, balonlarda yapılan deneme grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığı ve olası farklılığın hangi gruplar arasında olduğu da belirlenmiştir. Buna göre, en yüksek hücre sayıları göz önüne alındığında tüm deneme grupları arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiş olup en yüksek hücre sayısı D5 grubunda, en düşük hücre sayısı ise kontrol grubunda elde edilmiştir ($p<0,05$).

Kültürlerin kuru ağırlık ölçümleri 18. günde yapılmıştır. Buna göre en yüksek değer D5 grubundan 1,62±0,02 g/l olarak elde edilmiştir. En düşük değer ise kontrol grubunda 0,11±0,01 g/l olarak hesaplanmıştır ($p<0,05$). Ayrıca, kuru ağırlık analizinin yapıldığı günün hücre sayıları dikkate alınarak yapılan hesaplama sonucunda hücre başına düşen kuru ağırlık miktarları da belirlenmiştir. Buna göre, en yüksek hücre başına düşen kuru ağırlık miktarı 36,08±0,3 pg/hücre ile D1 grubunda, en düşük hücre başına düşen kuru ağırlık miktarı ise kontrol grubunda 29,42±0,5 pg/hücre olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Gruplara göre kuru ağırlık, hücre başına düşen kuru ağırlık ve ortalama hücre boyutu değerleri

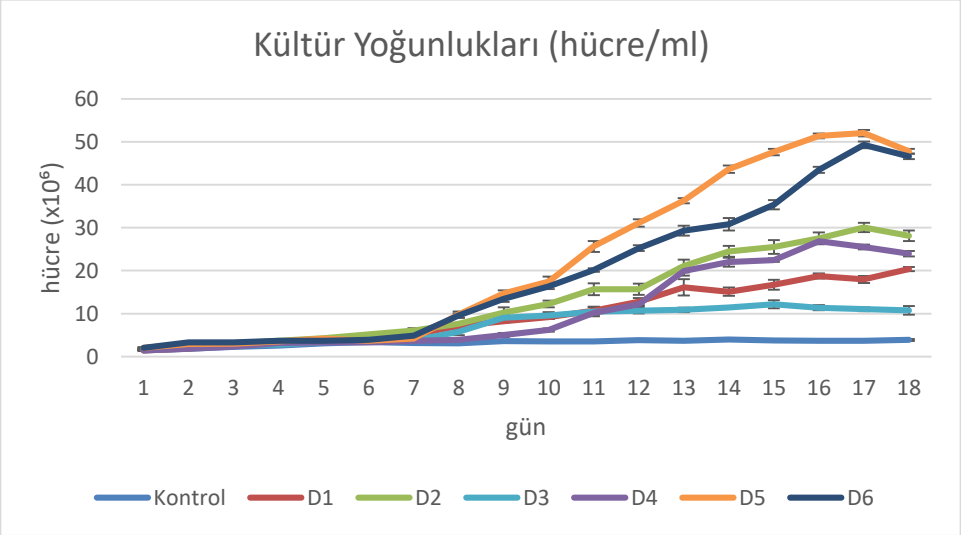
Grup	Kuru ağırlık (g/l)	Hücre başına düşen kuru ağırlık (pg/hücre)	Hücre boyutu (çap, µm)
Kontrol	0,11±0,01^{a}	29,42±0,5^{a}	3,784±1,091^{ab}
D1	0,74±0,02^{b}	36,08±0,3^{b}	4,917±0,858^{b}
D2	0,97±0,05^{c}	34,44±0,25^{c}	4,566±0,78^{ab}
D3	0,35±0,04^{d}	32,49±0,29^{d}	4,045±1,107^{ab}
D4	0,81±0,02^{b}	33,69±0,39^{c}	4,133±0,855^{ab}
D5	1,62±0,02^{e}	33,89±0,19^{c}	3,498±0,759^{a}
D6	1,58±0,03^{e}	33,92±0,51^{c}	3,552±0,656^{a}

Not: Üstel harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı belirtir. Kontrol (karbon kaynağı yok), D1 (2000 mg/l gliserol), D2 (2000 mg/l gliserol ve 500 mg/l myo-inositol), D3 (100 mg/l myo-inositol), D4 (500 mg/l myo-inositol), D5 (1000 mg/l myo-inositol), D6 (2000 mg/l myo-inositol).

Toplam kuru ağırlık değerleri göz önüne alındığında D5 ve D6 grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamakla birlikte bu 2 grubun diğer gruplardan anlamlı ölçüde daha yüksek kuru ağırlık değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubunun ise yine istatistiksel olarak en düşük kuru ağırlığa sahip grup olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bunun dışında, hücre başına düşen kuru ağırlık için de istatistiksel analiz yapılmış olup hücre başına düşen kuru ağırlık en yüksek D1 grubunda, en düşük kontrol grubunda belirlenmiştir ($p<0,05$).

Ortalama hücre boyutları dijital ölçüm yöntemiyle belirlenmiştir. Buna göre en büyük hücre çapı D1 grubunda 4,917±0,858 µm olarak hesaplanmaktadır. En küçük hücre boyutları ise D5 ve D6 gruplarında 3,498±0,759 ve 3,552±0,656 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak yalnızca D1 grubu ve D5-D6 grupları arasında farkın önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Cam balonlarda yapılan denemelerin sonuçlarından elde edilen verilere göre en yüksek hücre sayıları 52±0,71 x 10^6 hücre/ml ve 49,28±0,75 x 10^6 hücre/ml ile sırasıyla 1000 mg/l ve 2000 mg/l myo-inositol içeren D5 ve D6 gruplarında elde edilmiştir. En düşük hücre sayıları ise sırasıyla 3,95±0,2 x 10^6 hücre/ml ve 12,19±0,46 x 10^6 hücre/ml olarak herhangi bir karbon kaynağı kullanılmayan kontrol grubu ile 100 mg/l myo-inositol ilavesi yapılan D3 grubundan elde edilmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16 Cam balonlardan yapılan denemelerden elde edilen kültür yoğunlukları (Kontrol (karbon kaynağı yok), D1 (2000 mg/l gliserol), D2 (2000 mg/l gliserol ve 500 mg/l myo-inositol), D3 (100 mg/l myo-inositol), D4 (500 mg/l myo-inositol), D5 (1000 mg/l myo-inositol), D6 (2000 mg/l myo-inositol)

Elde edilen veriler doğrultusunda, en yüksek hücre sayıları göz önüne alındığında 1000 mg/l ve 2000 mg/l myo-inositol kullanılan grupların kontrol grubuna göre 10 kattan fazla yoğunluğa ulaştığı ve farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca bu 2 grubun 2000 mg/l gliserol kullanılan D1 grubuna ($20,38\pm0,5 \times 10^6$ hücre/ml) göre de 2 kattan fazla yoğunluğa ulaştığı ve farkın önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

Chlorella vulgaris'in bakterilerle simbiyotik kültürü üzerine yapılmış olan bir çalışmada fototrofik kültürde 5-10 x 10^6 hücre/ml yoğunluğa ulaşıldığı belirtilirken, simbiyotik kültürde ise en yüksek 25-30 x 10^6 hücre/ml seviyesine ulaşıldığı görülmektedir. Aynı çalışmada fotoheterotrofik kültür denemesinde ise 0,5 g/l glikoz kullanılan denemelerde sadece mikroalg üretimi yapılan kültürlerde 15-20 x 10^6 hücre/ml'ye ulaşıldığı ortaya konulmuştur. Ayrıca, simbiyotik kültürde hücre sayısında düşüş tespit edildiği belirtilmiştir. Mikroalgler ile bakteriler arasında simbiyotik bir ilişki olduğu bilinmekle birlikte çalışmada bu ilişkinin kültür koşullarında mücadeleye dönebileceği gösterilmiştir (Guo ve Tong, 2014). Bu tez çalışmasında ise kontrol grubunun fototrofik kültür şartlarında $3,95\pm0,2 \times 10^6$ hücre/ml'ye ulaştığı belirlenmiştir. Ayrıca 0,5 g/l myo-inositol ilavesi yapılan grubun $26,83\pm0,62 \times 10^6$ hücre/ml ile en yüksek hücre yoğunluğuna ulaştığı ortaya konulmuştur. Yukarıda belirtilen çalışmada 0,5 g/l konsantrasyonda glikozun karbon kaynağı olarak kullanılmasıyla 2-4 kat yoğunluk artışı görülürken, bu tez çalışmasında aynı konsantrasyonda myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanılması ile kültür yoğunluğunda yaklaşık 6,8 kat artış tespit edilmiştir. Hücre sayısı olarak karşılaştırılma yapıldığı takdirde yine myo-inositol ile daha yüksek hücre sayısına erişilebildiği görülmektedir. Çalışmalar arasında kültür şartları ile tür/suş farklılıkları sonuçları etkileyebilecek olsa da, hem hücre sayısı yönünden hem de oransal artış açısından myo-inositol daha efektif bir karbon kaynağı olduğu düşünülmektedir.

Başka bir çalışmada ise Watanabe kültür ortamı farklı *Chlorella* türlerinin kültüründe araştırılmıştır. En yüksek hücre sayısına ulaşan tür *Chlorella vulgaris* olurken hücre yoğunluğunun 6 x 10^6 hücre/ml'yi biraz geçtiği belirlenmiştir (Illman vd., 2000). Bu çalışmada BG-11 ortamı ile üretilmiş olan kontrol grubunun en yüksek hücre yoğunluğu $3,95\pm0,2 \times 10^6$ hücre/ml olarak tespit edilmiştir. Besin ortamlarındaki değişikliklerin mikroalglerin kültür yoğunluklarını ve biyokimyasal kompozisyonunu

etkilediği bilinmektedir (Yeh ve Chang, 2012). Bu çalışmada hem fototrofik hem de miksotrofik kültürde BG-11 besin ortamı kullanılmış olup, myo-inositol ve gliserolün karbon kaynağı olarak kullanılmasının etkileri ortaya konulmuştur. 1 g/l myo-inositol kullanılan D5 grubunun 52±0,71 x 10^6 hücre/ml'ye ulaştığı tespit edilmiş olup, kontrol grubundan 13 kat, 2 g/l gliserol kullanılan ve 20,38±0,5 x 10^6 hücre/ml yoğunluğa ulaşan D1 grubundan 2,5 kat daha yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılmasını sağladığı belirlenmiştir.

Sentetik atık su oluşturularak yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda sentetik atık su ve BG-11 *Chlorella vulgaris* (tatlı su) kültüründe kullanılarak elde edilen sonuçlar ortaya konulmuştur. 0,26 g/l früktoz ve 0,26 g/l sodyum asetat içeren sentetik atık su ile yapılan kültürlerde en yüksek hücre sayısı 17,94±1,07 × 10^6 hücre/ml olarak belirtilmiştir. BG-11 kullanılan kontrol grubunda ise en yüksek hücre sayısının 5,68±0,36 x 10^6 hücre/ml olarak gerçekleştiği bildirilmiştir (Miao vd., 2016). Bu çalışmada 0,5 g/l myo-inositol kullanılan deneme grubunda en yüksek hücre sayısı 26,83±0,62 x 10^6 hücre/ml olarak belirlenmiştir. Farklı besin ortamları kullanılmış olsa dahi her 2 çalışmanın kontrol gruplarının hücre sayıları benzerlik göstermektedir. Buna göre, karbon kaynağı olarak benzer konsantrasyondaki myo-inositolün sodyum asetat ve früktoz karışımına göre daha yüksek hücre sayısına ulaşılmasını sağladığı söylenebilir. Ayrıca, kontrol grubuna göre artış oranları kıyaslandığında bahsedilen çalışmada 3,16 kat hücre artışı, bu tez çalışmasında ise yaklaşık 6,8 kat hücre sayısı artışı sağlandığı da göz önüne alındığı takdirde hücre yoğunluğu açısından myo-inositolün sodyum asetat ve früktoz karışımına göre daha efektif bir karbon kaynağı olduğu görülmektedir.

Kuru ağırlık açısından bakıldığında en yüksek konsantrasyonda myo-inositol kullanılan grupların (D5-D6) kontrol grubuna göre yaklaşık 15 kat daha fazla kuru madde eldesi sağladığı ortaya çıkmıştır. Yine bu gruplar (D5 ve D6), gliserolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı gruba göre (D1) 2 kattan fazla kuru madde üretimi sağlamıştır. Özellikle, myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı D5 grubunun 1000 mg/l, gliserol kullanılan D2 grubunun ise 2000 mg/l konsantrasyonda karbon kaynağı içerdiği göz önüne alınırsa, kültür yoğunluğu açısından myo-inositolün gliserole göre çok daha etkin bir karbon kaynağı olduğu ortaya çıkmaktadır.

Cheirsilp ve Torpee, (2012) tarafından yapılan çalışmada tatlı su *Chlorella* sp. türünün 2 g/l glikozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı miksotrofik kültürün hem fototrofik hem de heterotrofik kültüre göre daha yüksek biyokütle (g/l kuru ağırlık) elde edilmesini sağladığı ortaya konulmuştur. Bu çalışmada da benzer bir durum hem gliserol hem de myo-inositol için tespit edilmiş olup, her 2 karbon kaynağının da fototrofik kültüre göre daha yüksek biyokütle eldesi sağlamıştır.

Chlorella vulgaris'in (tatlı su) farklı karbon kaynakları (asetat, gliserol, glikoz) altındaki miksotrofik, heterotrofik ve fototrofik kültürünün etkileri araştırılmıştır. En yüksek biyokütle 1,7 g/l ile %1 g/hacim glikoz kullanılan miksotrofik kültürden elde edilmiştir. Gliserol ile yapılan denemelerde ise en yüksek biyokütle en düşük konsantrasyon olan %1 g/hacim konsantrasyonda 0,72 g/l olarak elde edilmiştir (Liang vd., 2009). Bu çalışmada ise 2 g/l konsatrasyonda gliserolün kullanıldığı denemede 0,74±0,02 g/l kuru ağırlık elde edilmiş olup Liang vd., (2009) tarafından verilen bulgular ile benzer bir sonuç elde edilmiştir. 1 g/l myo-inositol kullanılan D5 grubunda 1,62±0,02 g/l biyokütleye ulaşıldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre yarı konsantrasyondaki myo-inositolün gliserole göre yaklaşık 2,2 kat daha fazla biyokütle elde edilmesine olanak sağladığı görülmüştür. Ayrıca, belirtilen çalışmada glikoz ile elde edilen en yüksek biyokütleye yakın bir sonuç myo-inositol ile elde edilmiş olmasına karşın, kullanılan konsantrasyonun çok daha düşük olması önemlidir. Kullanılan suşların ve kültür koşullarının farklı olması da göz önünde bulundurulması gereken bir husustur.

Farklı atıkların *Chlorella vulgaris*' (tatlı su) için karbon kaynağı olarak kullanıldığı kültür çalışmasında, BBM (Bold Basal Medium)'in kullanıldığı kontrol grubu fototrofik kültür ile maksimum 0,91 g/l yoğunluğa ulaşırken, %1 konsantrasyonda kullanılan öğütülmüş mısır atıklarıyla yapılan miksotrofik kültürde en yüksek 2,1 g/l biyokütleye ulaşıldığı bildirilmiştir. Buna göre, atıkların miksotrofik kültürde kullanımı amacıyla yapılan çalışmada fototrofik kültüre kıyasla yaklaşık 2,3 kat daha yüksek biyokütle eldesi sağlanmıştır (de Melo vd., 2018). Bu çalışmada en yüksek biyokütle 1,62±0,02 g/l kuru ağırlık elde edilen 1 g/l myo-inositol kullanılan deneme grubunda belirlenmiştir. Bu miktar, belirtilen çalışmadaki maksimum kuru ağırlık

miktarından düşük olmasına karşın kontrol grubuna göre çok daha yüksek oranda (yaklaşık 15 kat) kuru madde artışı sağladığı belirlenmiştir.

Chlorella vulgaris'in kültüründe karbon kaynağı olarak 0,5-15 g/l arası farklı konsantrasyonlarda atık sudan gelen ham gliserol kullanılmış olan bir başka çalışmada ise en yüksek biyokütle (2,2 g/l) 1 g/l ham gliserol kullanıldığında elde edilmiştir. Çalışmada gliserol içermeyen kontrol grubunun da 1,9 g/l kuru ağırlığa ulaştığı belirtilmiştir (Ren vd., 2017). Buna göre ham gliserolün yaklaşık %16 kadar biyokütle artışı sağladığı söylenebilir. Bu tez çalışmasında ise 2 g/l konsantrasyonunda gliserol kullanımı %670, 1g/l myo-inositol kullanımı ise %1472 kadar biyokütlede artışa sebep olmuştur.

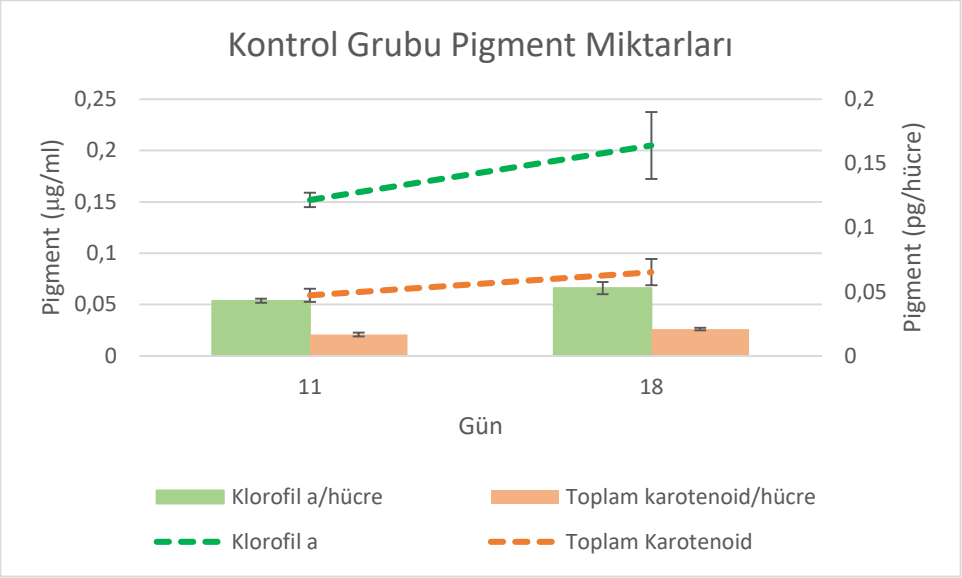
Yukarıda verilen bilgiler ışığında, *Chlorella* sp. kültüründe büyüme parametreleri açısından değerlendirildiğinde myo-inositolün verimli bir karbon kaynağı olduğu anlaşılmaktadır. Özellikle gliserole göre yarı konsantrasyonda kullanımında dahi 2 kattan daha fazla biyokütle elde edilmesi dikkate değerdir. Hem hücre sayısı hem de kuru ağırlık eldesi açısından myo-inositol kontrol grubunun yanı sıra gliserole de üstünlük sağlamıştır. Ayrıca, verilen literatür bilgileri de göz önüne alındığında, hücre yoğunluğu ve kuru madde eldesi açısından myo-inositolün farklı karbon kaynaklarına daha verimli bir karbon kaynağı olduğu düşünülmektedir.

3.1.2 Pigment

Kontrol ve deneme gruplarının kültür çalışması boyunca, 11. ve 18. günlerde olmak üzere 2 defa pigment değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucunda aşağıdaki grafiklerde ortaya konulduğu üzere klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarlarındaki değişim belirlenmiştir. Birim hacimdeki pigment miktarlarının yanı sıra, hücre başına düşen pigment miktarları da, ölçülen pigment miktarının belirtilen günlerdeki hücre sayısına bölünmesi ile hesaplanmıştır.

Kontrol grubu göz önüne alındığında klorofil *a* miktarı 11. gün 0,152±0,007 µg/ml olarak tespit edilirken, 18. gün bu miktar 0,205±0,033 µg/ml olarak belirlenmiştir. Toplam karotenoid miktarı ise 11. gün ölçümde 0,060±0,006 µg/ml, 18. gün ise 0,082±0,013 µg/ml ölçülmüştür (Şekil 3.17). Belirtilen ölçümlerin yapıldığı

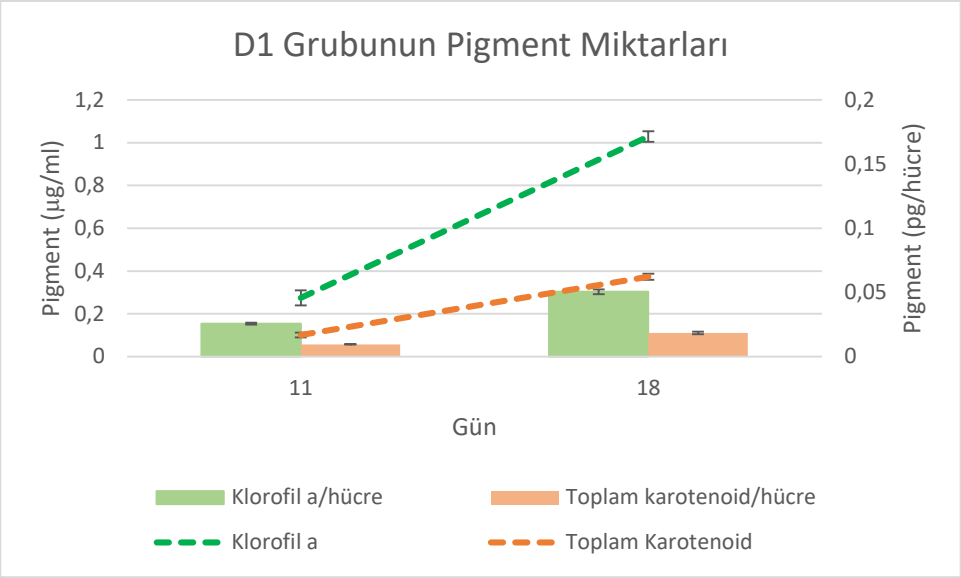
günlerdeki hücre sayıları göz önüne alınarak hücre başına düşen pigment değerleri de hesaplanmıştır. Buna göre, kontrol grubunun hücre başına düşen klorofil *a* miktarı ilk ölçümde 0,043±0,002 pg/hücre, ikinci ölçümde ise 0,053±0,005 pg/hücre olarak belirlenmiştir. Hücre başına düşen toplam karotenoid değerleri 11. ve 18. günler için sırasıyla 0,017±0,001 pg/hücre ve 0,021±0,001 pg/hücre olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Kontrol grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları

D1 grubunda tespit edilen klorofil *a* miktarları 11. günde 0,274±0,035 µg/ml iken, 18. günde ölçümde bu miktar 1,029±0,025 µg/ml olarak bulunmuştur. Toplam karotenoid miktarları ise ilk ölçümde 0,101±0,011 µg/ml, ikinci ölçümde ise 0,374±0,014 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.18).

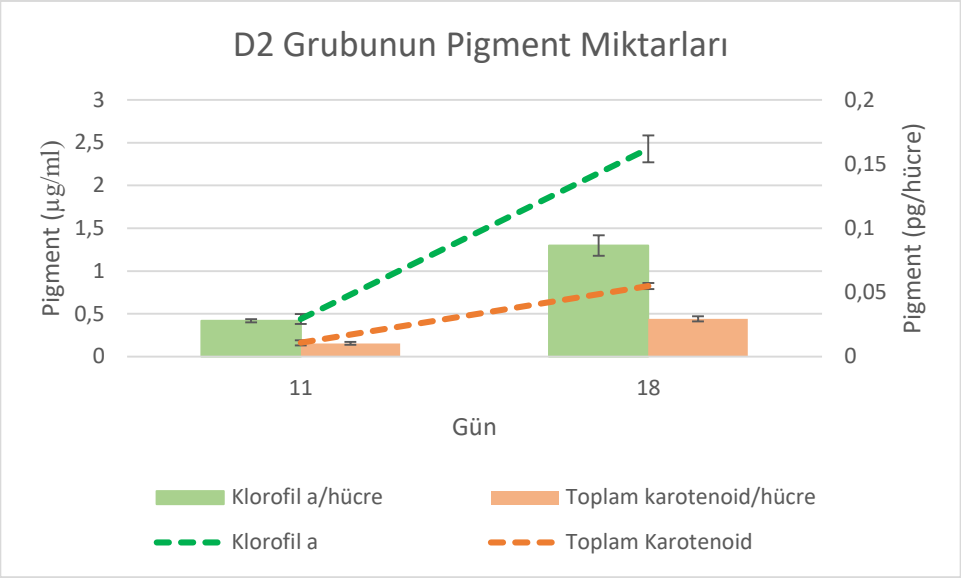
Hücre başına düşen pigment miktarları hesaplandığında D1 grubunun hücre başına düşen klorofil *a* miktarı 11. günde 0,026±0,001 pg/hücre, 18. günde 0,051±0,002 pg/hücre olarak hesaplanmıştır. Hücre başına düşen toplam karotenoid miktarları ise 11. ve 18. günlerde için sırasıyla 0,010±0,000 pg/hücre ve 0,018±0,001 pg/hücre olarak belirlenmiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18 D1 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları

D2 grubu göz önüne alındığında klorofil *a* miktarı ilk ölçümde 0,439±0,057 µg/ml olarak tespit edilirken, ikinci ölçümde bu miktar 2,428±0,157 µg/ml olarak belirlenmiştir. Toplam karotenoid miktarı ise ilk ölçümde 0,162±0,030 µg/ml, ikinci ölçümde ise 0,825±0,036 µg/ml olarak ölçülmüştür (Şekil 3.19).

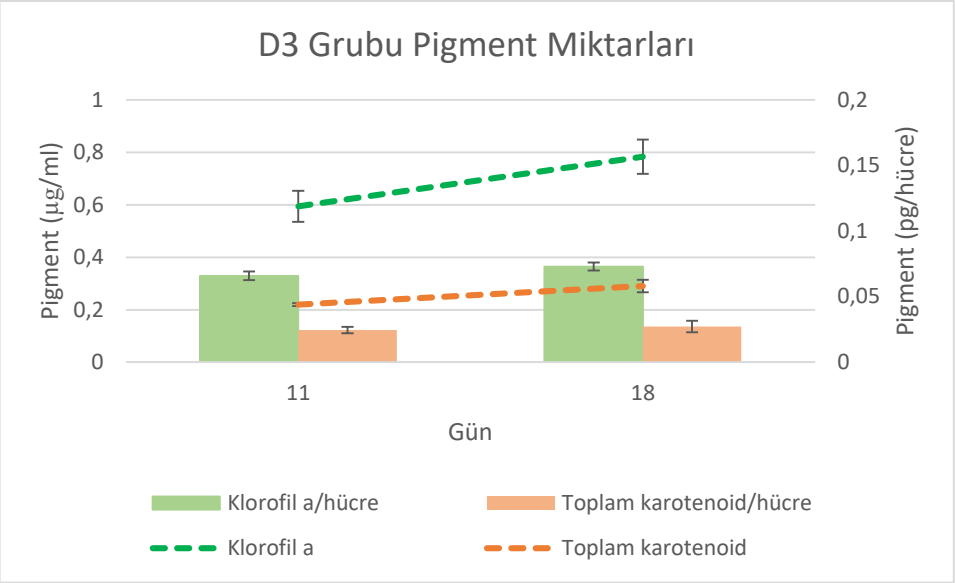
Klorofil *a* pigmentinin hücre başına düşen miktarları ilk ölçümde 0,028±0,001 pg/hücre, ikinci ölçümde ise 0,087±0,008 pg/hücre olarak hesaplanmıştır. Hücre başına düşen toplam karotenoid miktarları ise ilk ölçümde 0,010±0,001 pg/hücre, ikinci ölçümde 0,029±0,002 pg/hücre olarak belirlenmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 D2 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları

D3 grubunda tespit edilen klorofil *a* miktarları 1. ölçümde 0,594±0,059 µg/ml iken, 2. ölçümde bu miktar 0,783±0,065 µg/ml olarak bulunmuştur. Toplam karotenoid miktarları ise ilk ölçümde 0,22±0,006 µg/ml, ikinci ölçümde ise 0,29±0,024 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.20).

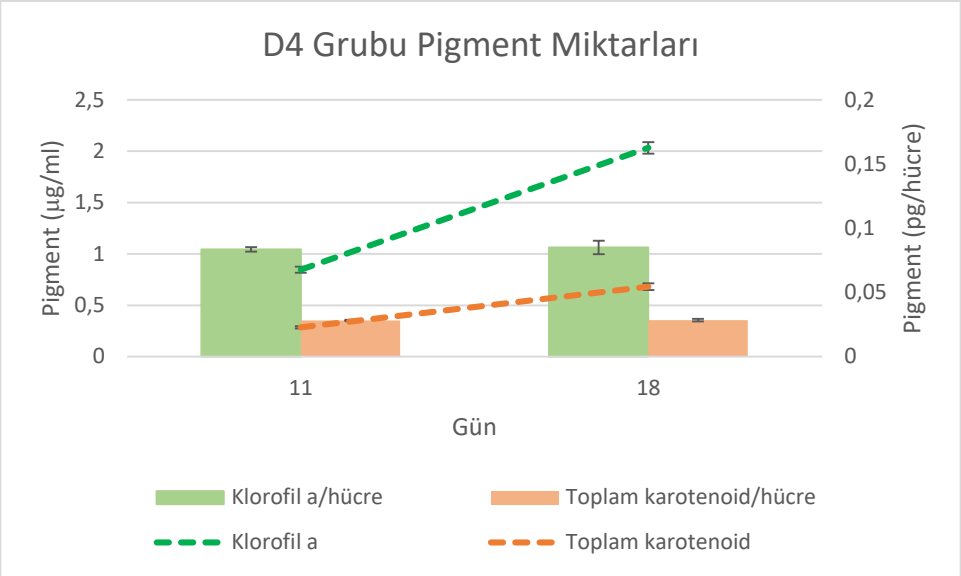
Bu grupta hücre başına düşen klorofil *a* miktarları 1. ve 2. ölçüm için sırasıyla 0,066±0,003 pg/hücre ve 0,073±0,003 pg/hücre olarak belirlenmiştir. Hücre başına düşen toplam karotenoid miktarı ilk ölçüm için 0,025±0,002 pg/hücre, ikinci ölçüm için ise 0,027±0,004 pg/hücre olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.20).



Şekil 3.20 D3 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları

D4 grubunun klorofil *a* ölçümleri sonucunda bu pigmentin miktarının 0,846±0,031 µg/ml'den 2,03±0,058 µg/ml'ye yükseldiği ortaya çıkmıştır. Toplam karotenoid miktarı ise ilk ölçümde 0,285±0,009 µg/ml, ikinci ölçümde 0,68±0,014 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 3.21).

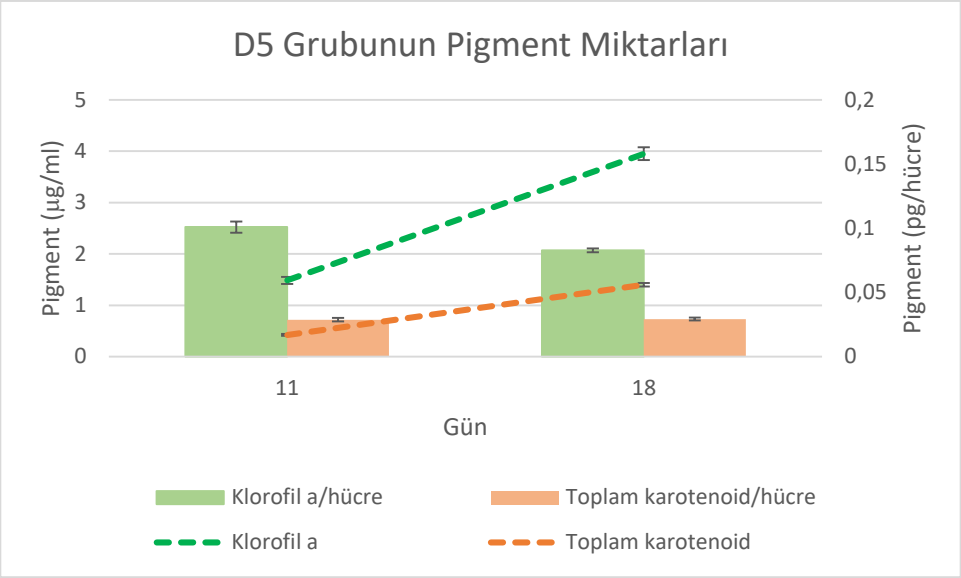
Hücre başına düşen klorofil *a* hesaplamaları sonucunda D4 grubu için ilk ölçümde bu miktar 0,084±0,002 pg/hücre, ikinci ölçümde ise 0,085±0,005 pg/hücre olarak belirlenmiştir. Hücre başına düşen toplam karotenoid miktarı ilk ölçümde 0,028±0,001 pg/hücre, ikinci ölçümde ise 0,028±0,002 pg/hücre olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.21 D4 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları

D5 grubunun pigment analizi sonucunda klorofil *a* miktarının ilk ölçümde 1,48±0,07 µg/ml, ikinci ölçümde ise 3,95±0,12 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Toplam karotenoid miktarları 1. ve 2. ölçümlerde sırasıyla 0,42±0,02 µg/ml ve 1,40±0,04 µg/ml olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 3.22).

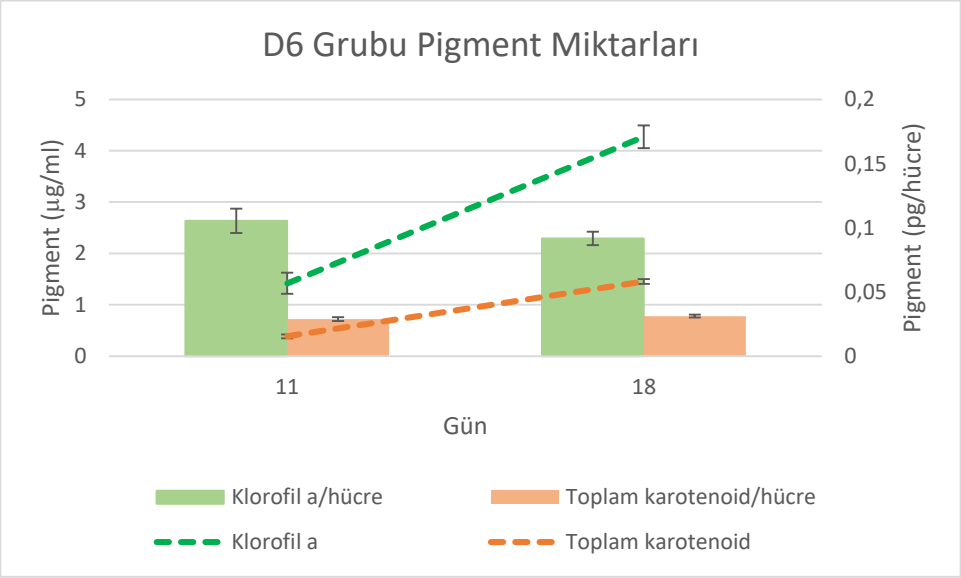
Bu grup için hücre başına düşen klorofil *a* miktarı 1. ve 2. ölçüm için sırasıyla 0,101±0,004 pg/hücre ve 0,083±0,002 pg/hücre olarak hesaplanmıştır. Toplam karotenoid miktarlarının hücre başına düşen miktarları hesaplandığında ise ilk ölçüm için 0,029±0,014 pg/hücre, ikinci ölçüm için 0,029±0,001 pg/hücre sonuçları elde edilmiştir (Şekil 3.22).



Şekil 3.22 D5 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları

D6 grubu için yapılan pigment analizleri sonucunda klorofil *a* miktarları 1,42±0,2 µg/ml ve 4,27±0,22 µg/ml olarak ortaya konulmuştur. Toplam karotenoid miktarları ise 0,39±0,03 µg/ml ve 1,45±0,05 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 3.23).

Bu grubun hücre başına düşen klorofil *a* miktarları ilk ve ikinci ölçüm için sırasıyla 0,106±0,010 pg/hücre ve 0,092±0,005 pg/hücre olarak hesaplanmıştır. Hücre başına düşen toplam karotenoid miktarları ise 1. ölçüm için 0,029±0,002 pg/hücre, 2. ölçüm için 0,031±0,001 pg/hücre olarak belirlenmiştir (Şekil 3.23).



Şekil 3.23 D6 grubunun klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları

Toplam klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 11. gün yapılan analizde istatistiksel olarak en yüksek toplam klorofil *a* miktarı D5 ve D6 gruplarında elde edilmiştir ve bu iki grubun diğer gruplardan önemli ölçüde farklı olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bu 2 grup arasında ise anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). İlk ölçümdeki istatistiksel olarak anlamlı en düşük klorofil *a* miktarları ise kontrol ve D1 gruplarından elde edilmiş olup bu 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). Son ölçümde ise istatistiksel olarak en düşük klorofil *a* elde edilen grup kontrol grubu, istatistiksel olarak en yüksek klorofil *a* içeren gruplar ise D5 ve D6 grupları olmuştur. Bu 2 grup arasında ise anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Hücre başına düşen klorofil *a* miktarları söz konusu olduğunda ilk ölçümde D1 ve D2 grupları istatistiksel olarak farklı en düşük değerlere sahip gruplar olmuştur ($p<0,05$). Bu 2 grup arasında ise anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). D5 ve D6 grupları ise istatistiksel olarak diğer gruplardan daha yüksek hücre başına düşen klorofil *a* miktarlarına sahip olup, 2 grup arasında fark bulunmamaktadır. Son ölçümdeki hücre başına düşen klorofil *a* miktarları göz önüne alındığında istatistiksel olarak en düşük değerlere sahip gruplar kontrol ve D1 grupları olurken, en yüksek gruplar olan D2, D4, D5 ve D6 grupları arasında istatistiksel olarak farklılık mevcut değildir ($p>0,05$) (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Deneme gruplarının klorofil *a* ve karotenoid miktarları

	Kontrol	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Toplam klorofil *a* (µg/mL)	0,152±0,007^{a}	0,274±0,035^{ab}	0,439±0,057^{bc}	0,594±0,059^{c}	0,846±0,031^{d}	1,48±0,07^{e}	1,42±0,2^{e}
	0,205±0,033^{a}	1,029±0,025^{b}	2,428±0,157^{c}	0,783±0,065^{b}	2,03±0,058^{d}	3,95±0,12^{e}	4,27±0,22^{e}
Toplam karotenoid (µg/mL)	0,060±0,006^{a}	0,101±0,011^{a}	0,162±0,030^{b}	0,22±0,006^{b}	0,285±0,009^{c}	0,42±0,02^{d}	0,39±0,03^{d}
	0,082±0,013^{a}	0,374±0,014^{b}	0,825±0,036^{c}	0,29±0,024^{b}	0,68±0,014^{d}	1,40±0,04^{e}	1,45±0,05^{e}
Hücre başına klorofil *a* (pg/hücre)	0,043±0,002^{a}	0,026±0,001^{b}	0,028±0,001^{b}	0,066±0,003^{c}	0,084±0,002^{d}	0,101±0,004^{e}	0,106±0,010^{e}
	0,053±0,048^{a}	0,051±0,002^{a}	0,087±0,008^{b}	0,073±0,003^{c}	0,085±0,005^{bc}	0,083±0,002^{bc}	0,092±0,005^{b}
Hücre başına karotenoid (pg/hücre)	0,017±0,001^{a}	0,010±0,000^{b}	0,010±0,001^{b}	0,025±0,002^{c}	0,028±0,001^{cd}	0,029±0,014^{d}	0,029±0,002^{d}
	0,021±0,001^{a}	0,018±0,001^{a}	0,029±0,002^{b}	0,027±0,004^{b}	0,028±0,002^{b}	0,029±0,001^{b}	0,031±0,001^{b}

Not: Üstel harfler gruplar arasındaki istatistiksel ilişkiyi belirtir.

Toplam karotenoid miktarı açısından ilk ölçümde istatistiksel olarak en düşük değerlere sahip olan gruplar kontrol ve D1 grupları olup, en yüksek değere sahip olan gruplar ise D5 ve D6 grupları olarak belirlenmiştir. Son ölçümde ise kontrol grubu toplam karotenoid miktarı açısından istatistiksel olarak en düşük miktara sahip grup olmuştur ($p<0,05$). D5 ve D6 grupları ise istatistiksel olarak en yüksek toplam karotenoid miktarı içeren gruplar olarak belirlenmiştir ($p<0,05$).

Hücre başına düşen karotenoid miktarları hesaplandığında ilk ölçümde D1 ve D2 grupları istatistiksel olarak en düşük miktarları içeren gruplar olurken, D4, D5 ve D6 grupları istatistiksel açıdan farklı olacak şekilde en yüksek miktarları içeren gruplar olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). Son ölçüm sonuçlarına göre ise kontrol ve D1 grupları istatistiksel olarak en düşük hücre başına düşen karotenoid miktarlarına sahiptir ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında ise hücre başına düşen karotenoid miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

1 l hacimli balonlarda yapılan çalışmaların sonuçları doğrultusunda, en yüksek klorofil *a* miktarlarının 1000 ve 2000 mg/l myo-inositolün kullanıldığı deneme gruplarından elde edildiği belirlenmiştir. Ancak bahsedilen grupların kültüründe daha yüksek miktarda biyokütle üretimininin sağlanmış olması bu sonuca doğrudan etki etmektedir. Bu nedenle hücre başına düşen klorofil *a* miktarlarını incelemek daha doğru bir bakış açısı sunabilir. Buna göre, ilk ölçümler sonucunda yapılan hesaplamalar doğrultusunda en yüksek hücre başına düşen klorofil *a* miktarları D5 ve D6 grubunda iken, ikinci

ölçümler sonucunda D2, D4, D5 ve D6 grupları arasında bir farklılık bulunamamıştır. Bu 4 grubun ortak noktası ise, her grubun kültür başlangıcında 500 mg/l ve üzerinde myo-inositol bulunmasıdır. D2 grubu 2000 mg/l gliserol ve 500 mg/l myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı grup iken D4, D5 ve D6 grupları sırasıyla 500 mg/l, 1000 mg/l ve 2000 mg/l myo-inositol konsatrasyonlarının karbon kaynağı olarak kullanıldığı gruplardır. Dahası, hem gliserol hem de myo-inositol içeren D2 grubu ilk ölçümlerde hücre başına düşen klorofil *a* miktarı açısından sadece gliserol içeren D1 grubuna benzer bir sonuç verirken, ikinci ölçümlerde ise myo-inositol içeren gruplar ile benzer sonuçlara sahiptir. Buna benzer bir sonuç hücre başına düşen karotenoid miktarında hesaplanmıştır. Bu parametre incelendiğinde de, D2 grubu ilk ölçümlerde hücre başına düşen karotenoid miktarı açısından D1 grubuyla benzer sonuç verirken, ikinci ölçümlerde ise myo-inositol içeren gruplarla uyumlu bir sonuç ortaya koymaktadır. Buna göre, hücre başına düşen pigment miktarları ve değişimleri göz önünde bulundurularak D2 grubunun öncelikle gliserol tüketiminde bulunduğu, ardından myo-inositolün tüketiminin başladığı varsayımında bulunulabilir. *Chlorella sorokiniana* kültürü ile yapılan çalışmada glikoz ve sodyum asetat ayrı ayrı ve birlikte kullanılmıştır. Çalışma neticesinde sadece glikoz kullanılan denemede 48 saat içerisinde glikoz miktarının 5 g/l'den 3,3 g/l'ye düştüğü belirlenmiştir. Sadece asetat kullanılan denemede ise 36 saat içerisinde asetat tamamen tüketilirken, glikoz ve asetatın birlikte kullanıldığı denemede, asetat 36 saat içerisinde tükenirken glikoz ilk 36 saat içerisinde 5 g/l'den 4,3 g/l'ye düşmüş, sonraki 36 saatte ise 4,3 g/l'den 1g/l'ye gerilemiştir. Bu sonuç, asetatın erken üstel artış fazında *C. sorokiniana* tarafından öncelikle tercih edilmesi ile açıklanmaktadır (Huang vd., 2017).

Miksotrofik ve heterotrofik kültürlerde mikroalglerin daha düşük miktarda klorofil *a* üretimi yaptığı bildirilmiştir (Cheirsilp ve Torpee, 2012; Kong vd., 2011). Bu nedenle miksotrofik kültür denemelerinde hücresel klorofil *a* birikiminin daha düşük olması beklenmektedir. Sadece gliserol kullanılan D1 ve gliserol ile myo-inositol kullanılan D2 gruplarında ilk ölçümlerde klorofil *a* miktarları kontrol grubuna göre daha düşük miktarda tespit edilmiştir. Diğer gruplarda ise daha yüksek miktarlarda hücre başına klorofil *a* miktarları belirlenmiştir. Ayrıca, kontrol ve D1 grupları arasında ikinci ölçümlerde hücre başına klorofil *a* miktarları açısından farklılık oluşmaz iken hücresel klorofil *a* birikimi açısından en düşük 2 deneme grupları olarak öne çıkmaktadır. Diğer

tüm deneme gruplarının ise daha yüksek hücre başına düşen klorofil *a* değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, kontrol grubunun herhangi bir karbon kaynağıyla desteklenmemiş olmasıyla açıklanabilir.

Toplam karotenoid miktarları cam balonlarda yapılan deneme süresince 2 kez (11. gün ve 18. gün) spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. En yüksek karotenoid miktarları D5 ve D6 gruplarında tespit edilmiştir. D5 ve D6 gruplarının kuru madde miktarlarının da diğer gruplara göre daha yüksek olması sebep olarak görülmektedir. Bu nedenle hücresel karotenoid birikimi hesaplanmış olup farklılıklar ortaya konulmuştur. İlk ölçümler göz önüne alındığında en düşük hücre başına düşen karotenoid miktarları gliserol içeren gruplarda (D1 ve D2) tespit edilmiştir. Sadece myo-inositol kullanılan gruplarda ise hem kontrol grubuna göre hem de gliserol kullanılan gruplara göre hücre başına düşen karotenoid miktarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak, her iki karbon kaynağını da içeren (gliserol ve myo-inositol) D2 grubu ilk ölçümde gliserol içeren D1 grubu ile benzer miktarda hücresel karotenoid birikimine sahip iken, ikinci ölçümde (18. gün) myo-inositol içeren gruplarla benzer miktarda karotenoid biriktirmiştir. Hücresel klorofil *a* birikiminde olduğu gibi hücresel karotenoid birikiminin de karbon kaynaklarının tüketimindeki öncelikle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

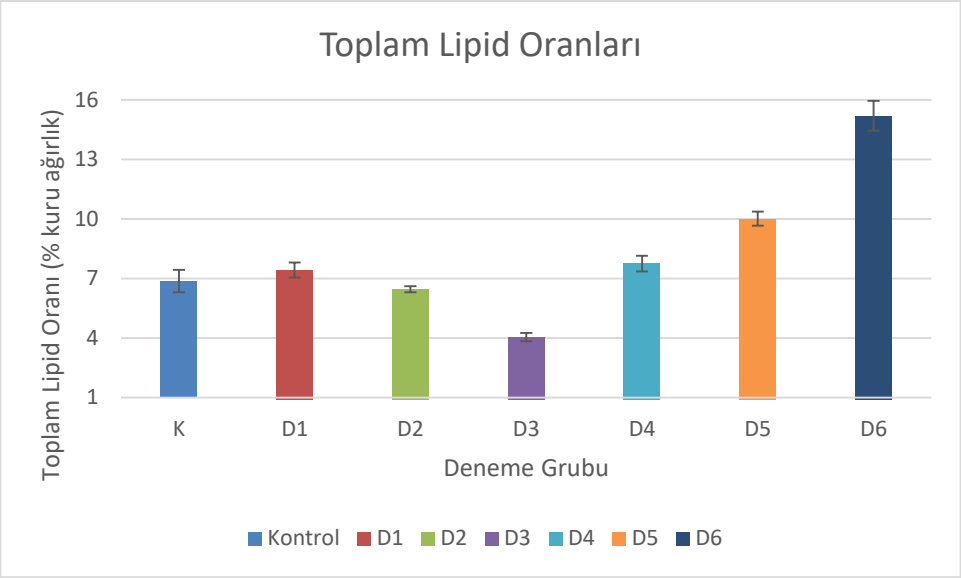
Kontrol, D1, D2 ve D3 gruplarında ikinci ölçümlerdeki hücre başına düşen karotenoid miktarları ilk ölçümlere göre artış göstermiştir. D4 ve D5 grupları için hücresel karotenoid birikimi miktarları değişmez iken, D6 grubunda ise artış yaşanmıştır. Ancak, ikinci ölçümler sonucunda istatistiksel olarak myo-inositol içeren gruplar arasında bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). Mikroalglerin karotenoid birikimlerinin farklı stres koşulları altında tetiklenebildiği bilinmektedir (Paliwal vd., 2017; Shi vd., 2020). Buna örnek olarak farklı konsantrasyonlarda NaCl ilave edilen *Chlorella protothecoides* kültürlerinde karotenoidlerin kuru ağırlığa oranının ve profilinin değişmesi verilebilir (Campenni vd., 2013). Bu çalışmada ise karbon kaynaklarındaki farklılığın hücresel karotenoid birikimini etkilediği ortaya konulmuştur. Miksotrofik ve heterotrofik kültürlerde pigment miktarında ve kompozisyonunda değişiklikler olduğu bilinmektedir. Örneğin, *Chlorella sorokiniana* ve *Chlorella zofingiensis* ile yapılan çalışmada, klorofil *a* ve klorofil *b* miktarlarında

düşüş, toplam karoten miktarında ise artış olduğu bildirilmiştir (Azaman vd., 2017). Bu tez çalışmasında ise, ikinci ölçümler sonucunda D1 grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken ($p>0,05$), myo-inositol kullanılan gruplarda ise hücresel karotenoid birikimi artış göstermiş olup verilen çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Çalışmada elde edilen veriler incelendiğinde karotenoid birikiminin kontrol grubunda diğer deneme gruplarında olduğu ölçüde değişmediği görülmektedir. Bunun sebebinin herhangi bir karbon kaynağı ile desteklenmemesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, gliserol kullanılan grup ile hem gliserol hem de myo-inositol kullanılan gruplarda ilk ölçüm neticesinde düşük konsantrasyonda pigment birikimi tespit edilmiştir. Bu durumun organizmanın öncelikli olarak gliserolü tüketme tercihiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kültür çalışması sonunda yapılan pigment analizinde elde edilen verilere göre, hücresel klorofil *a* ve karotenoid birikimi açısından 500 mg/l ve üzeri myo-inositol içeren tüm gruplar için istatistiksel olarak farklılık belirlenememiştir ($p>0,05$). Bu sonuç, belirtilen gruplardaki pigment birikiminin sadece fotosentetik aktivite sebebiyle olduğu fikriyle açıklanmaktadır. Öyle ki, stres koşullarının karotenoid sentezini tetiklediği bilinmektedir (Couso vd., 2012; Shi vd., 2020; Zuluaga vd., 2017).

3.1.3 Toplam Lipid

Toplam lipid miktarı spektrofotometrede SPV metoduna göre belirlenmiştir. Kuru ağırlığa oranı şeklinde değerlendirilmiştir. Denemelerden elde edilen sonuçlara göre en düşük toplam lipid oranı 100 mg/l myo-inositol kullanılan D3 grubunda elde edilmiş olup bu oran %4,04±0,21 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubunda %6,87±0,56 oranında, D1 grubunda %7,43±0,38 oranında, D2 grubunda %6,46±0,15 oranında, D4 grubunda ise %7,75±0,4 oranında toplam lipid içeriği olduğu ortaya konulmuştur. En yüksek lipid içeriğine sahip deneme grupları ise 1000 ve 2000 mg/l myo-inositol içeren D5 ve D6 grupları olup sırasıyla %10,01±0,36 ve %15,19±0,75 oranında lipid içerdikleri tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.24).



Şekil 3.24 Balonlarda yapılan denemelerde elde edilen toplam lipid oranları (% lipid/kuru ağırlık) (Kontrol (karbon kaynağı yok), D1 (2000 mg/l gliserol), D2 (2000 mg/l gliserol ve 500 mg/l myo-inositol), D3 (100 mg/l myo-inositol), D4 (500 mg/l myo-inositol), D5 (1000 mg/l myo-inositol), D6 (2000 mg/l myo-inositol))

Cam balonlarda yapılan denemelerden elde edilen sonuçlara göre en düşük toplam lipid oranı 100 mg/l myo-inositol kullanılan D3 grubunda elde edilmiş olup bu oran %4,04±0,21 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda %6,87±0,56 oranında, D1 grubunda %7,43±0,38 oranında, D2 grubunda %6,46±0,15 oranında, D4 grubunda ise %7,75±0,4 oranında toplam lipid içeriği olduğu ortaya konulmuştur. En yüksek lipid içeriğine sahip deneme grupları ise 1000 ve 2000 mg/l myo-inositol içeren D5 ve D6 grupları olup sırasıyla %10,01±0,36 ve %15,19±0,75 oranında lipid içerdikleri tespit edilmiştir.

Chlorella sp.'nin miksotrofik kültüründe myo-inositol karbon kaynağının konsantrasyonu arttıkça lipid oranı artmıştır. Çalışma süresince 100 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l ve 2000 mg/l konsantrasyonlarında myo-inositol karbon kaynağı ile denemeler yapılmıştır. En yüksek lipid oranı 2000 mg/l konsantrasyonda elde edilmiş olup %15,97±0,75 olarak belirlenmiştir. En düşük lipid oranı ise 100 mg/l myo-inositol kullanılan deneme grubunda ortaya çıkmış olup tüm deneme grupları arasındaki en düşük değer (%4,04±0,21) elde edilmiştir. Ayrıca, 2000 mg/l gliserol (%7,43±0,38) ve 500 mg/l myo-inositol (%7,75±0,4) kullanılan grupların lipid oranı farklılık göstermemiştir. Bahsi geçen 2 grup arasındaki benzerlik kuru ağırlık miktarı, klorofil *a* birikimi, karotenoid birikimi ve son olarak lipid oranında da devam etmiştir.

Ancak 2000 mg/l konsantrasyonunda myo-inositol içeren grubun aynı konsantrasyonda gliserol içeren gruba göre 2 kattan fazla lipid oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Hem daha yüksek kuru madde hem de daha yüksek oranda lipid içeriği göz önüne alınırsa, myo-inositolün lipid üretimi açısından gliserolden daha etkin bir karbon kaynağı olduğu görülmektedir.

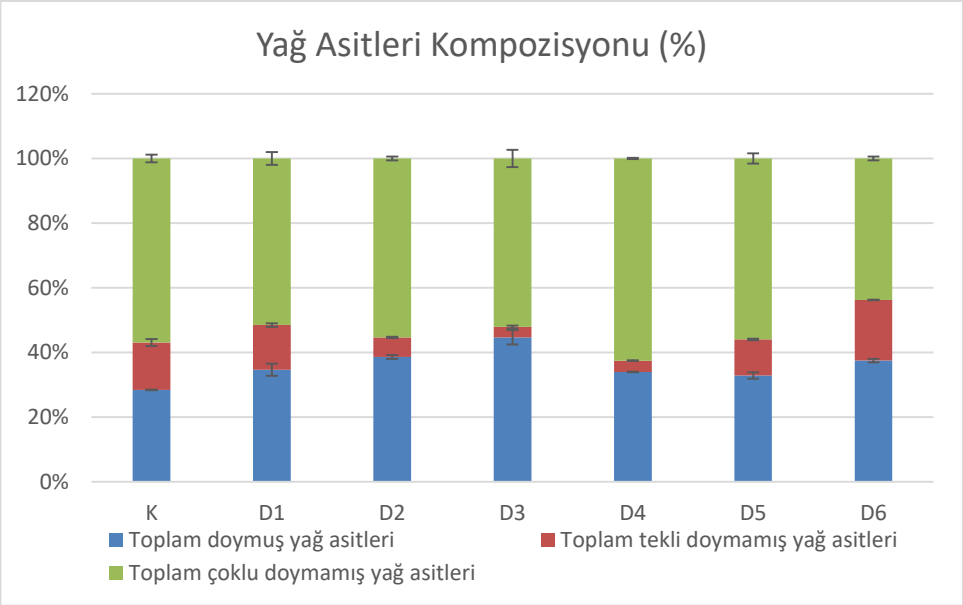
Nannochloropsis oculata, Dunaliella salina ve *Chlorella sorokiniana* türlerinin miksotrofik kültürü ile yapılmış olan çalışmada glikoz konsantrasyonunun lipid oranı üzerine etkileri ortaya konulmuştur. Glikoz konsantrasyonu 5 g/l'den 15 g/l'ye çıkarıldığında *C. sorokiniana*'nın lipid oranında %45 oranında artış tespit edildiği ancak 20 g/l glikoz konsantrasyonunda ise lipid oranının düşmeye başladığı bildirilmiştir. Diğer türlerde ise çok düşük oranlarda sürekli artış olduğu belirtilmiştir (Wan vd., 2011). Başka bir çalışmada ise izole edilen *C. sorokiniana* miksotrofik kültüründe 0 g/l, 0,5 g/l, 1 g/l, 1,5 g/l ve 2 g/l konsantrasyonlarında glikoz kullanılmış olup en yüksek lipid oranı kontrol (0 g/l) ve 0,5 g/l konsantrasyonlarındaki denemelerde elde edilmiştir (Juntila vd., 2015). *Chlorella* sp.'nin gıda atık hidrolizatı kullanılarak yapılan miksotrofik kültüründe ise 10 g/l başlangıç glikoz konsantrasyonuna sahip denemenin sonıucunda lipid oranı %40,19 olarak belirlenmiştir. 20 g/l ve 30 g/l başlangıç glikoz konsantrasyonuna sahip denemelerde ise yaklaşık %20-25 oranında lipid tespit edilmiştir (Wang vd., 2020). *Chlorella vulgaris*'in miksotrofik kültüründe gliserolün farklı konsantrasyonları ile glikoz ilave edilmesinin lipid birikimine etkileri araştırılmıştır. Buna göre, 1 g/l, 2 g/l, 5 g/l ve 10 g/l konsantrasyonlarında kullanılan gliserole 2 g/l glikoz ilave edilmesiyle lipid oranında anlamlı bir farklılık elde edilemediği belirtilmiştir. Kontrol grubunda (fotootrofik kültür) %7,48 oranında lipid birikimi tespit edilirken, en yüksek lipid oranı (%10,64) 10 g/l gliserol ve 2 g/l glikoz kullanılan kültürde elde edilmiştir. Ayrıca 5 g/l'ye kadar gliserol kullanımının lipid oranı açısından herhangi bir etki yaratmadığı da bildirilmiştir (Kong vd., 2013). Bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiş olup kontrol grubu ile 2 g/l gliserol kullanılan grup arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. *C. vulgaris* kültüründe gliserol kullanılan başka bir çalışmada ise 2 g/l konsantrasyonda %13 lipid oranı elde edilirken 5 g/l konsantrasyonda bu oran %23,91 olarak bildirilmiştir (Rincon vd., 2017). Bu tez çalışmasında azot kaynağı olarak $NaNO_3$ kullanılırken bahsedilen çalışmada ise üre bu amaç için kullanılmıştır. 2

çalışma arasındaki farklılığın suş ve azot kaynağının değişkenliği sebebiyle olduğu düşünülebilir.

Yukarıda verilmiş olan literatür bilgileri ve bu tez çalışmasında balonlarda yapılan denemelerin sonuçlarından yola çıkarak karbon kaynağının lipid birikimi üzerine doğrudan etkisi olduğu söylenebilir. Ayrıca, karbon kaynağının kültürde kullanılan konsantrasyonunun da pozitif ya da negatif olarak lipid birikimini etkilediği görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan myo-inositol konsantrasyonları göz önüne alındığında 2000 mg/l olan en yüksek konsantrasyona kadar lipid oranında artış tespit edilmiştir. Bunun yanında, kullanılan diğer karbon kaynağı olan gliserole göre 500 mg/l ve üstü myo-inositol kullanımının lipid üretimi açısından daha verimli olduğu belirlenmiştir.

3.1.4 Yağ Asitleri

Kontrol grubu ve deneme gruplarının yağ asitleri kompozisyonu kültür çalışmasının ardından doğrudan transesterifikasyon metodu ile belirlenmiştir (Tablo 3.3). Yağ asitleri kompozisyonu sonuçlarına göre kontrol grubu %28,45±0,1 toplam doymamış yağ asidi, %14,64±1,13 toplam tekli doymamış yağ asidi ve son olarak %56,88±1,19 oranında toplam çoklu doymamış yağ asitlerini içermektedir. Karbon kaynağı olarak yalnızca gliserol kullanılan D1 grubunda ise bu oranlar %33,34±1,78 toplam doymuş, %13,29±0,54 toplam tekli doymamış ve %49,51±1,87 oranında toplam çoklu doymamış yağ asitleri olarak belirlenmiştir. Ayrıca, büyüme parametreleri açısından (hücre sayısı, kuru madde miktarı) en yüksek değerlere ulaşmış grup olan 1000 mg/l myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı D5 grubunun %32,74±0,97 toplam doymuş yağ asitleri, %11,1±0,22 toplam tekli doymamış yağ asitleri ve %55,69±1,54 oranında çoklu doymamış yağ asitlerini içerdiği belirlenmiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3.25 Tüm deneme gruplarına ait yağ asidi grubu kompozisyonları (Kontrol (karbon kaynağı yok), D1 (2000 mg/l gliserol), D2 (2000 mg/l gliserol ve 500 mg/l myo-inositol), D3 (100 mg/l myo-inositol), D4 (500 mg/l myo-inositol), D5 (1000 mg/l myo-inositol), D6 (2000 mg/l myo-inositol))

Elde edilen analiz sonuçlarına göre toplam doymuş yağ asitleri oranları %28,45±0,1 ile %44,74±2,2 arasında değişmektedir. En yüksek toplam doymuş yağ asidi oranı %44,74±2,2 ile D3 grubunda belirlenmiş olup, en düşük oran ise %28,45±0,1 ile kontrol grubundan elde edilmiştir ($p<0,05$). Bunun yanında, inositol kullanılan gruplarda yoplam doymuş yağ asidi miktarının daha yüksek olduğu da belirlenmiştir. Yapılan yağ asitleri kompozisyonu analizlerine göre tüm gruplar için baskın doymuş yağ asidi palmitik asit (C16:0) olup (Tablo 3.3), en yüksek oran %38,81±1,66 ile D3 grubunda elde edilmiştir. Palmitik asit için en düşük oran ise %26,83±0,99 ile kontrol grubunda tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Toplam tekli doymamış yağ asitlerinde ise en düşük oran %3,21±0,44 ile D3 grubunda, en yüksek oran ise %18,63±0,09 ile D6 grubunda belirlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, kullanılan myo-inositol konsantrasyonu arttıkça toplam tekli yağ asidi oranının da arttığı tespit edilmiştir. Bu yağ asitleri grubunda tüm gruplar için oleik asit (C18:1) baskın yağ asidi olarak belirlenmiştir (Tablo 3.3). En düşük oleik asit oranları D3 ve D4 gruplarında sırasıyla %2,31±0,38 ve %2,13±0,12 olarak belirlenmiştir. En yüksek oleik asit oranına sahip deneme grubu ise D6 olup, bu oran %14,22±0,24 olarak ortaya çıkmıştır ($p<0,05$).

Tablo 3.3 Kontrol ve deneme gruplarının yağ asitleri kompozisyonları

	Kontrol	D1 (2000 mg gliserol)	D2 (500 mg myo-inositol ve 2000 mg gliserol)	D3 (100 mg myo-inositol)	D4 (500 mg myo-inositol)	D5 (1000 mg myo-inositol)	D6 (2000 mg myo-inositol)
Dodekanoik asit (C12:0) (%)	0,07±0,001^{a}	0,17±0,031^{a}	0,26±0,037^{ab}	2,33±1,98^{b}	0,08±0,014^{a}	0,11±0,013^{a}	0,31±0,028^{ab}
Tetradekanoik asit (C14:0) (%)	0,61±0,05^{a}	0,67±0,066^{ab}	0,66±0,043^{ab}	1,47±0,76^{b}	0,53±0,006^{a}	0,61±0,029^{a}	0,80±0,013^{ab}
Hekzadekanoik asit (C16:0) (%)	26,83±0,99^{a}	31,31±1,56^{b}	34,84±0,72^{c}	38,81±1,66^{d}	32,58±0,09^{bc}	30,73±1,15^{b}	31,73±0,49^{b}
9-hekzadesenoik asit (C16:1) (%)	3,57±0,27^{a}	2,85±0,2^{b}	1,08±0,13^{c}	0,90±0,07^{c}	1,08±0,16^{c}	3,02±0,19^{b}	4,21±0,11^{d}
Oktadekanoik asit (C18:0) (%)	0,73±0,178^{ab}	0,77±0,12^{b}	1,71±0,16^{c}	0,98±0,18^{b}	0,28±0,1^{a}	0,85±0,14^{b}	3,77±0,23^{d}
9-oktadesenoik asit (C18:1) (%)	11,07±1,10^{a}	10,44±0,53^{a}	4,98±0,13^{b}	2,31±0,38^{c}	2,13±0,12^{c}	8,03±0,34^{d}	14,22±0,24^{e}
9,12-oktadekadienoik asit (C18:2) (%)	43,56±1,06^{a}	37,61±1,56^{bc}	38,55±0,42^{c}	35,82±1,95^{bc}	47,33±0,42^{d}	42,88±1,33^{a}	34,89±0,46^{b}
9,12,15-oktadekatrienoik asit (C18:3) (%)	13,32±0,36^{a}	11,90±0,44^{b}	16,70±0,16^{c}	16,26±0,78^{c}	14,75±0,57^{d}	12,70±0,22^{ab}	8,62±0,12^{e}
Diğer (%)	0,24±0,01^{a}	4,29±0,33^{b}	1,23±0,06^{ab}	1,23±0,52^{ab}	1,24±0,36^{ab}	1,06±0,03^{ab}	1,43±0,19^{ab}
Toplam (%)	100	100	100	100	100	100	100
Doymuş yağ asitleri (%)	28,45±0,97^{a}	33,42±1,73^{b}	38,57±0,62^{c}	44,73±2,20^{d}	33,95±0,33^{be}	33,02±1,44^{b}	37,44±0,55^{ce}
Tekli Doymamış Yağ Asitleri (%)	14,63±1,13^{a}	17,14±3,20^{ab}	6,06±0,22^{c}	3,20±0,44^{c}	3,55±0,05^{c}	11,28±0,20^{a}	18,87±0,11^{b}
Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (%)	56,93±1,27^{a}	49,5±1,87^{b}	55,40±0,56^{ac}	52,07±2,64^{bc}	62,53±0,40^{d}	55,70±1,55^{ac}	43,65±0,61^{e}

Not: Üstel harfler gruplar arasındaki istatistiksel ilişkiyi göstermektedir.

Çoklu doymamış yağ asitlerinin için en düşük oran %43,64±0,61 ile D6 grubunda tespit edilmiştir ($p<0,05$). En yüksek oran ise D4 grubunda %62,15±0,23 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). Linoleik asit (C18:2) tüm deneme grupları için baskın çoklu doymamış yağ asidi olarak belirlenmiş olup, en yüksek oran %47,33±0,42 olarak D4 grubunda tespit edilmiştir ($p<0,05$). En düşük linoleik asit oranına sahip grup ise D6 grubu (%34,89±0,46) olmuştur. Tüm gruplarda tespit edilmiş olan diğer çoklu doymamış yağ asidi α-linolenik (C18:3) asit için ise en yüksek oran %16,70±0,16 ile D2 ve %16,26±0,78 ile D3 gruplarında ortaya çıkmıştır ($p<0,05$). Myo-inositol kullanılan gruplar içinde bu yağ asidinin oranı kullanılan myo-inositol konsantrasyonu ile ters orantılı olacak şekilde değişiklik göstermiş olup D6 grubunda %8,62±0,12 olarak tespit edilmiş olup bu oran tüm deneme grupları arasındaki en düşük α-linolenik asit oranı olarak ortaya çıkmıştır ($p<0,05$).

Yağ asitleri kompozisyonu doğrudan transesterifikasyon yöntemiyle belirlenmiş olup gruplar arasındaki farklılık ortaya konulmuştur. Buna göre, doymuş yağ asitleri açısından en düşük oran kontrol grubundan, en yüksek oran ise D3 grubundan elde edilmiştir. Tekli doymamış yağ asitleri açısından en yüksek oran D6 grubundan, en düşük oran ise D3 grubundan elde edilmiştir. D4 grubu çoklu doymamış yağ asitlerinin oranı açısından ilk sırada yer alırken, D6 grubu toplam yağ asitleri içerisindeki çoklu doymamış yağ asitleri açısından son sırada yer almaktadır. Elde edilen sonuçlar sadece karbon kaynağının farklı oluşu değil, kullanılan karbon kaynağının konsantrasyonunun da yağ asitleri profili üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Özellikle 500 mg/l, 1000 mg/l ve 2000 mg/l myo-inositol kullanılan gruplar göz önüne alındığında, tekli doymamış yağ asitleri konsantrasyonla doğru orantılı, çoklu doymamış yağ asitleri ise ters orantılı olacak şekilde değişim göstermiştir. Ayrıca, myo-inositolün düşük ve yüksek konsantrasyonları (100 mg/l-2000 mg/l) toplam doymuş yağ asitleri oranında artışa, çoklu doymamış yağ asitlerinde ise düşüşe sebep olmuştur. Deneme grupları arasında lipid üretimi açısından elde edilen biyokütle miktarları göz önüne alınarak bir değerlendirme yapıldığı takdirde, en uygun gruplar D5 ve D6 gruplarıdır. Kuru ağırlık miktarları arasında istatistiksel açıdan fark bulunmayan bu iki grup arasından D5 grubu çoklu doymamış yağ asitleri yönünden, D6 grubu ise tekli doymamış ve doymuş yağ asitleri yönünden daha zengindir. Farklı karbon kaynaklarının *Chlorella kessleri* kültüründe kullanıldığı çalışmaya göre

gliserol kullanımı hem kontrol grubuna göre hem metanol ve glikoz kullanımına göre daha yüksek doymuş yağ asitleri oranına sebep olmuştur. Ayrıca, kontrol grubunun yaklaşık %71, metanol grubunun %65, glikoz grubunun %50 ve son olarak gliserol grubunun %42 oranında çoklu doymamış yağ asitlerine sahip olduğu belirtilmiştir (Wang vd., 2013). Zeytinyağı atık suyu ile yapılan *Chlorella pyrenoidosa* kültüründe atık suyun kullanım oranı arttıkça doymuş yağ asitleri oranında artış, çoklu doymamış yağ asitleri oranında ise düşüş olduğu belirlenmiştir (Sanchez vd., 2001). *Chlorella prototheco*i*des* kültüründe ışık yoğunluğunun yağ asitleri üzerine etkileri araştıran çalışmada 35, 130 ve 420 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ yoğunluklarında denemeler yapılmış olup ışık şiddeti arttıkça oleik asit oranının arttığı, linoleik ve α-linolenik asit oranlarının düştüğü bildirilmiştir (Krzeminska vd., 2015). Başka bir çalışmada BG-11 ortamı, aynı ortamda glikozun karbon kaynağı olarak kullanılması ile glikoz ve sukroz içeren portakal kabuğu ekstraktından elde edilen besin ortamında *Chlorella vulgaris* kültürü yapılmıştır. Ortaya konulan verilere göre en yüksek çoklu doymamış yağ asitleri oranı portakal kabuğu ekstraktının kullanılmasıyla elde edilmiştir (Park vd., 2014).

Tüm gruplarda palmitik asit doymuş yağ asitleri açısından baskın olup toplam yağ asitlerine oranı %26,83±0,99 ile 38,81±1,66 arasında değişiklik göstermektedir. 3 farklı *Chlorella* suşu ile yapılmış olan fototrofik kültür çalışmasında palmitik asit oranının %22,1-26,1 arasında değiştiği belirtilmiştir (Ördög vd., 2016). Başka bir çalışmada ise *Chlorella vulgaris* kültüründe tuzluluk stresinin etkisi incelenmiş olup palmitik asit oranı %25,3-37 arasında değişiklik göstermiştir (Pandit vd., 2017). *Chlorella pyrenoidosa*'nın ototrofik kültürde %14,3 oranında, miksotrofik kültürde ise %36 oranında palmitik asit içerdiği bildirilmiştir (Rai vd., 2013). *Chlorella* sp. ile yapılan bir atık su çalışmasında ise, bu yağ asidinin oranının %20,5-22,8 arasında değiştiği belirtilmektedir (Gao vd., 2019). Bu tez çalışmasında ise fototrofik kültür olan kontrol grubunda yaklaşık %27 oranında bulunan palmitik asit, miksotrofik kültürün denemelerinde kontrol grubuna göre daha yüksek oranda (%31-39) tespit edilmiştir. Kültür koşullarının yağ asitleri kompozisyonunu etkilediği hem literatürde bulunan çalışmalarda, hem de bu tez çalışmasında ortaya konulmuştur.

Tekli doymamış yağ asitlerinden oleik asit, %2,13±0,12 ile %14,22±0,24 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir. En düşük oleik asit oranları 100 mg/l ve 500 mg/l

konsantrasyonlarında myo-inositol içeren gruplarda tespit edilmiştir. En yüksek oleik asit oranı da 2000 mg/l konsantrasyonunda myo-inositol içeren grupta tespit edilmiştir. *Chlorella zofingiensis* ile yapılmış olan çalışmada azot stresinin oleik asit oranını yükselttiği ortaya konulmuştur (Zhu vd., 2015). Karbon kaynağı olarak sadece myo-inositol içeren gruplar kıyaslandığı takdirde, myo-inositol konsantrasyonu 500 mg/l üzerine çıktığında oleik asit oranı da giderek artma eğilimindedir. Bu sonucun, 1000 mg/l ve 2000 mg/l konsantrasyonlarından itibaren kültürlerde karbon kaynağının bulunduğu, ancak azot miktarının sınırlayıcı element olduğu durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

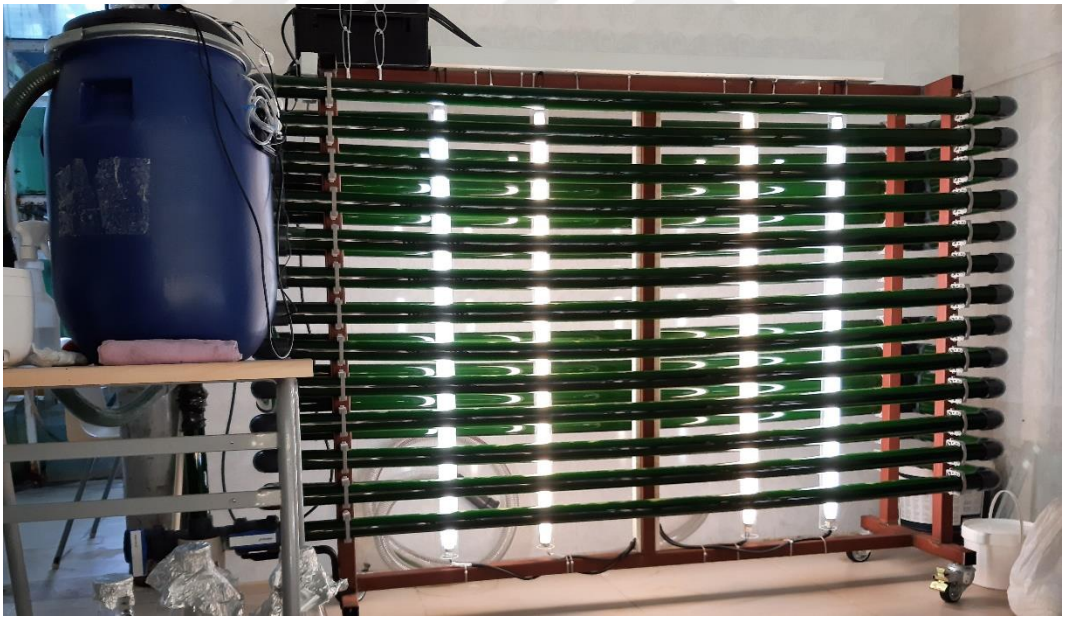
Çoklu doymamış yağ asitleri içerisinde linoleik asit tüm gruplar için baskın yağ asidi olmakla birlikte en yüksek oran D4 (500 mg/l myo-inositol) grubunda elde edilmiştir. D5 ve D6 gruplarında ise myo-inositol konsantrasyonuyla ters orantılı olacak şekilde linoleik asit düşüş eğilimi göstermiştir. Bunun yanında, α-linolenik asit oranları da benzer bir eğilim göstermektedir. Azot eksikliğinden kaynaklanan stresin linoleik ve α-linolenik asit oranlarında düşüşe neden olduğu literatürde bildirilmiştir (Zhu vd., 2015). Azot elementinin sınırlayıcı faktör olduğu hipotezi linoleik ve α-linolenik asit oranlarıyla da uyum göstermektedir. *Chlorella kessleri* ile yapılan çalışmada kültür ortamına etanol, gliserol ve glikoz ilave edilmiştir. Etanol kullanılan denemede linoleik ve α-linolenik asit oranları önemli ölçüde değişmez iken gliserol kullanımında her iki yağ asidinin oranlarında, glikoz kullanımında ise linoleik asit oranında düşüş olduğu belirlenmiştir (Wang vd., 2013). Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlarda da gliserol kullanımında hem linoleik asit hem de α-linolenik asit oranlarında düşüş belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *Chlorella* kültüründe gliserolün karbon kaynağı olarak kullanılmasının linoleik ve α-linolenik asit oranlarında düşüşe sebep olduğu düşünülebilir.

Yukarıda belirtilen geçmiş çalışmalar ve bu tez çalışmasından elde edilen veriler ışığında kültür ortamı ve kültür ortamında bulunan içeriklerin konsantrasyonlarının yağ asitleri kompozisyonu üzerinde doğrudan etkisi olduğu görülmektedir. Bu çalışmada hem gliserolün hem de myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanılmasıyla yağ asitleri profili üzerinde etkileleri belirlenmiştir. Ayrıca, myo-

inositolün farklı konsantrasyonlarda kullanımı ile yağ asitleri profilinde farklılaşmaya sebep olduğu ortaya konulmuştur.

3.2 Fotobiyoreaktör

Tübüler fotobiyoreaktör ile yapılan denemede öncelikle kültür ekiminin yapılmasını takiben fototrofik kültür ile maksimum yoğunluğa erişilmiştir. Ardından kültürün karbon kaynağının CO_2'den myo-inositole dönüşümü her iki kaynağın da kullanıldığı geçiş dönemiyle birlikte tamamlanmıştır. Fototrofik kültür süresince tübüler sistemin ortasında bulunan 4 adet floresan lambaya ek olarak 4 adet led lambalarla sistemin ışık ihtiyacı desteklenmiştir. Miksotrofik kültüre geçiş döneminde bu ışıklandırmalar kapatılmış olup, yalnızca sistemin ortasında bulunan floresan lambalardan yararlanılmıştır (Şekil 3.26).

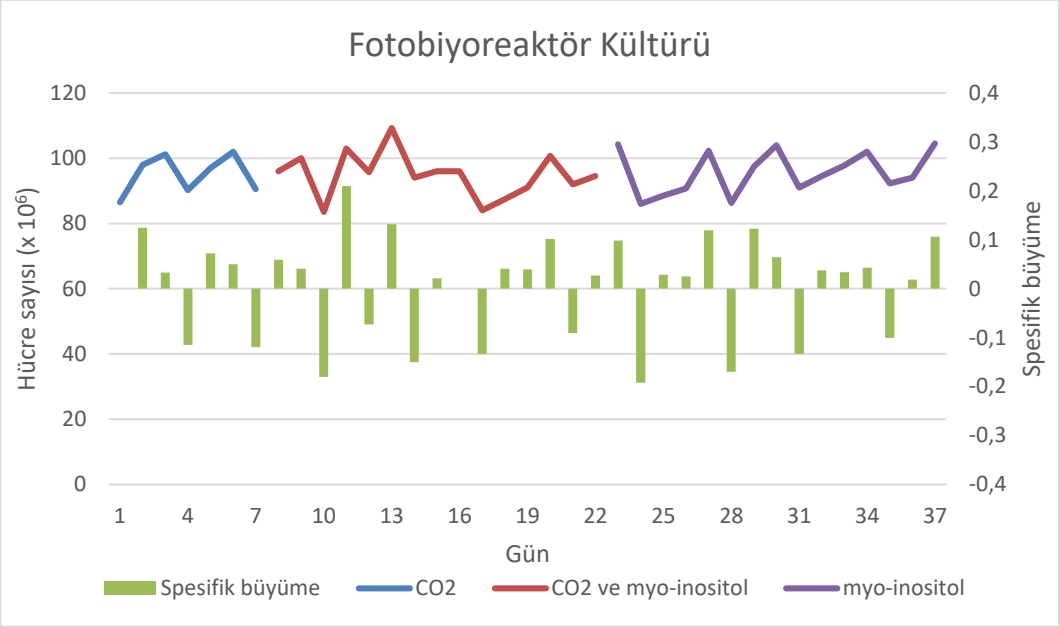


Şekil 3.26 *Chlorella* sp. kültüründe myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı tübüler fotobiyoreaktör

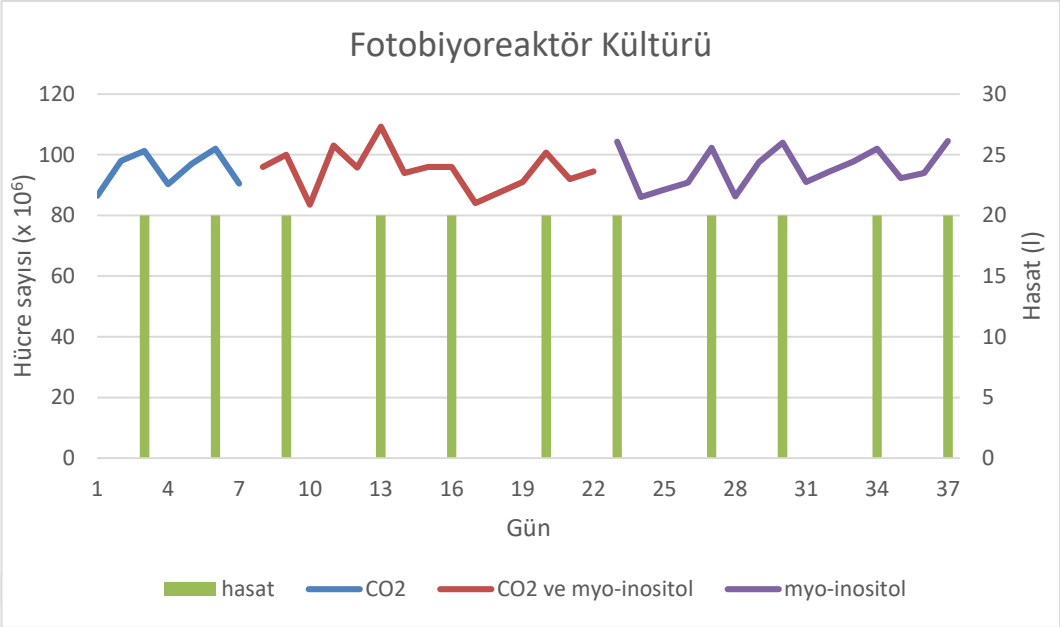
3.2.1 Büyüme

Tübüler fotobiyoreaktör sisteminde CO_2 girişi yapılan 7 günün ortalama hücre sayısı 95,07 x 10^6 hücre/mL seviyesinde gerçekleşmiştir. Karbon kaynağı olarak sadece CO_2 girişinin olduğu ilk 7 günlük dönemde en yüksek hücre sayısı 6. gününde 102 x 10^6 hücre/mL olarak tespit edilmiştir.

Tübüler fotobiyoreaktör sisteminde CO_2 girişi yapılan 7 günün devamında, CO_2 ve myo-inositolün birlikte kullanıldığı 8.-22. gün dönemde 94,88 x 10^6 hücre/ml ortalama hücre yoğunluğu hesaplanmıştır. Bu dönemde elde edilen en yüksek hücre sayısı 109 x 10^6 hücre/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmanın devamında 15. günün ardından sisteme CO_2 girişinin durdurulması ve dış aydınlatmanın da kapatılmasıyla sistemde karbon kaynağı olarak myo-inositol kullanılan döneme geçilmiş olup, ortalama 95,70 x 10^6 hücre/ml yoğunluk elde edilmiştir. Sadece myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı miksotrofik kültür döneminde en yüksek hücre sayısı 30. gün 104,5 x 10^6 hücre/ml olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.27 ve 3.28).

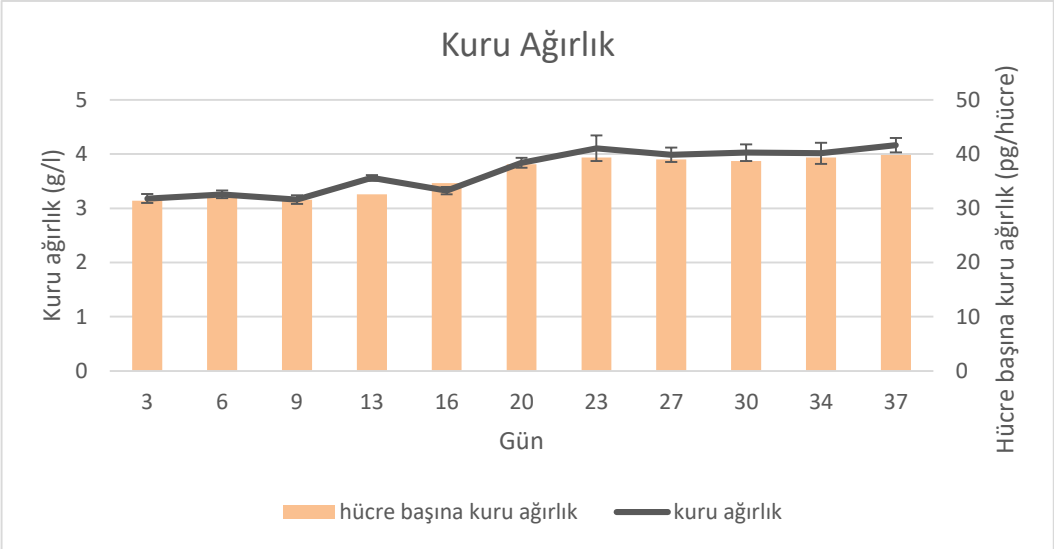


Şekil 3.27 *Chlorella* sp.'nin fotobiyoreaktör kültüründe hücre sayıları ve spesifik büyüme oranları



Şekil 3.28 *Chlorella* sp.'nin fotobiyoreaktör kültüründe hücre sayıları ve hasat miktarları

Belirtilen üretim dönemlerinden sadece CO_2 girişinin olduğu 7 günlük dönemde ortalama kuru ağırlık 3,22±0,08 g/l olarak tespit edilmiştir. Bu dönem içerisinde hücre başına düşen kuru ağırlık ortalaması 31,67 pg/hücre olarak hesaplanmıştır. Geçiş periyodu olarak değerlendirilen hem CO_2 hem de myo-inositol girişinin yapıldığı dönemde ise 3,60±0,11 g/l ortalama kuru ağırlığa ulaşılmıştır. Bu dönem için hesaplanan hücre başına düşen ortalama kuru ağırlık ise 35,27 pg/hücre olarak gerçekleşmiştir. Son olarak, sadece myo-inositol kullanılan dönemde ise kuru ağırlık ortalaması 4,05±0,15 g/l olarak belirlenmiştir. Myo-inositol ile miksotrofik kültür denemesi yapılan dönemde hücre başına düşen ortalama kuru ağırlık ise 39,22 pg/hücre olarak belirlenmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.29 Fotobiyoreaktör kültüründe kuru ağırlık (g/l) ve hücre başına düşen kuru ağırlık (pg/hücre) miktarları

Bu çalışmada toplam 140 l hacme sahip tübüler fotobiyoreaktörde yapılan kültür denemesinde 2 hafta süresince karbon kaynağı olarak myo-inositol kullanılıp sistemin devamlılığı sağlanmıştır. Bu süre içerisinde haftada 2 defa olmak üzere toplam 4 hasat yapılmış olup toplam 80 l kültür hasat edilmiştir. Bu süre zarfında sisteme toplam 280 g myo-inositol ilave edilmiştir. Hasat edilen kültürün ortalama kuru ağırlığı 4,05 g/l olarak belirlenmiştir. Toplam hasat kuru ağırlığı ise 324 g olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre hasat edilen 1 gram *Chlorella* sp. için harcanan myo-inositol miktarı 0,86 gram bulunmuştur. Son yapılan hasattan sonra PBR içerisinde kalan kültürün kuru ağırlığı da göz önüne alınırsa (499,60 g) 1 gram *Chlorella* sp. için harcanan myo-inositol miktarı 0,34 g hesaplanmıştır.

Farklı tasarımlara sahip kolon fotobiyoreaktörler üzerinde yapılmış olan çalışmalara göre *Chlorella vulgaris* en yüksek 0,78 g/l biyokütle yoğunluğuna ulaşmıştır (Wong vd., 2016). Düzlemsel dalga kılavuzu panel fotobiyoreaktöründe *Chlorella vulgaris* üretimi çalışılmış olup maksimum biyokütle 3,66 g/l kuru ağırlık ile elde edilmiştir (Liao vd., 2017). Farklı ışık yolu uzunluğuna sahip panel fotobiyoreaktörlerde yapılan *Chlorella* sp. kültürü çalışmasında maksimum kuru ağırlık 2,12 g/l ile 10 cm ışık yolu uzunluğuna sahip sistemden elde edilmiştir (Feng vd., 2020). Farklı bir panel fotobiyoreaktör tasarımı olan ince film panel fotobiyoreaktörde yapılan *Chlorella* sp. kültüründe ise ulaşılan en yüksek biyokütle 2,01 g/l kuru ağırlık olarak bildirilmiştir (Yan vd., 2020). Dış ortamda, panel fotobiyoreaktörde yapılan *Chlorella* sp.

kültürünün mevsimsel olarak değişimi araştırılmış, en yüksek kültür yoğunluğu 2,73 g/l kuru ağırlık ile sonbaharda elde edilmiştir. En düşük yoğunluk ise kış döneminde 1,63 g/l olarak belirlenmiştir (Feng vd., 2022). Sarmal tübüler fotobiyoreaktörde ise *Chlorella vulgaris* kültürünün 60 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ ışıklandırma ile 30 gün içerisinde yaklaşık 2,5 g/l yoğunluğa ulaştığı bildirilmiştir (Frumento vd., 2013). Kentsel atık suların *Chlorella vulgaris* kültüründe kullanılması üzerine yapılan çalışmada ulaşılan en yüksek biyokütle 0,99 g/l olarak verilmiştir (Leong vd., 2022). Verilen çalışmalar ile mukayese yapıldığı takdirde bu çalışmada kültür yoğunluğunun daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca dış ortamda yapılan kültürler ile kıyaslandığında mevsimsel/çevresel koşullardan bağımsız olması sebebiyle süreklilik açısından da üstünlük sağlamaktadır.

Qiu vd., (2017)' e göre 1 gram *Chlorella* sp. için harcanacak en düşük CO_2 miktarı 2,01 gram olarak belirlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda myo-inositolün biyokütle üretimi açısından CO_2'e göre daha verimli bir karbon kaynağı olduğu düşünülebilir. *Chlorella sorokiniana*'nın heterotrofik ve miksotrofik kültüründe başlangıç glikoz miktarı ve biyokütle eldesi verilmiştir. Buna göre, harcanan glikoza göre elde edilen biyokütle oranı 0,32 ile 0,82 arasında değişmektedir. En yüksek verim ise (0,82) 4 g/l başlangıç glikoz miktarına sahip olan miksotrofik kültürde elde edildiği bildirilmiştir (Li vd., 2014). Başka bir çalışmada, Hindistan'da doğal ortamdan izole edilmiş olan *Chlorella* sp.'nin asetat, früktoz ve melas ile miksotrofik kültürü yapılmıştır. Verilen sonuçlara göre en yüksek kültür yoğunluğu melas ile 1,55 g/l olarak elde edilmiştir. Ayrıca biyokütle/harcanan karbon kaynağı hesaplandığında 0,25-0,31 arasında değiştiği görülmüş ve en yüksek oranın melas ile (0,31) elde edildiği kaydedilmiştir (Mondal vd., 2017). Sorgum küspesi kullanılarak yapılan *Chlorella vulgaris* kültürü çalışmasında 1,5 litre hacme sahip tank PBR'de 25 °C'de 250 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ışık ile 7 gün sürecek şekilde yürütülmüştür. 15 g/l glikoz ve 1,25 g/l ksiloz içeren sorgum küspesi hidrolizatı ile yapılan üretimde 2,8 g/l kuru ağırlığa ulaşıldığı bildirilmiştir. Sonuç olarak biyokütlenin kullanılan karbon kaynağına oranının 0,17'de kaldığı ortaya çıkmıştır (Arora ve Philippidis, 2021). *Chlorella pyrenoidosa*'nın 3,5 l hacminde silindirik PBR kültüründe laboratuvar ortamında hazırlanmış olan sentetik atık su ve karbon kaynağı olarak da gliserol kullanılmıştır. 3 g/l konsantrasyonunda gliserol kullanılırken ulaşılan maksimum kuru ağırlığın 1,35 g/l olduğu belirtilmiştir.

Biyokütlenin kullanılan karbon kaynağına oranı ise 0,45 olarak gerçekleşmiştir (Rana ve Prajapati, 2021). 15 l hacme sahip optik panel PBR'de *Chlorella vulgaris* kültürü üzerine yapılan bir çalışmada 2, 10, 15 g/l gliserol başlangıç konsantrasyonları araştırılmıştır. Buna göre en yüksek biyokütle eldesi 1,91 g/l kuru ağırlığa ulaşan 5 g/l gliserol konsantrasyonunda elde edilmiştir. Sonuç olarak yaklaşık 0,38 oranında biyokütle/kullanılan karbon kaynağı değeri elde edilmiştir (Choi ve Yu, 2015).

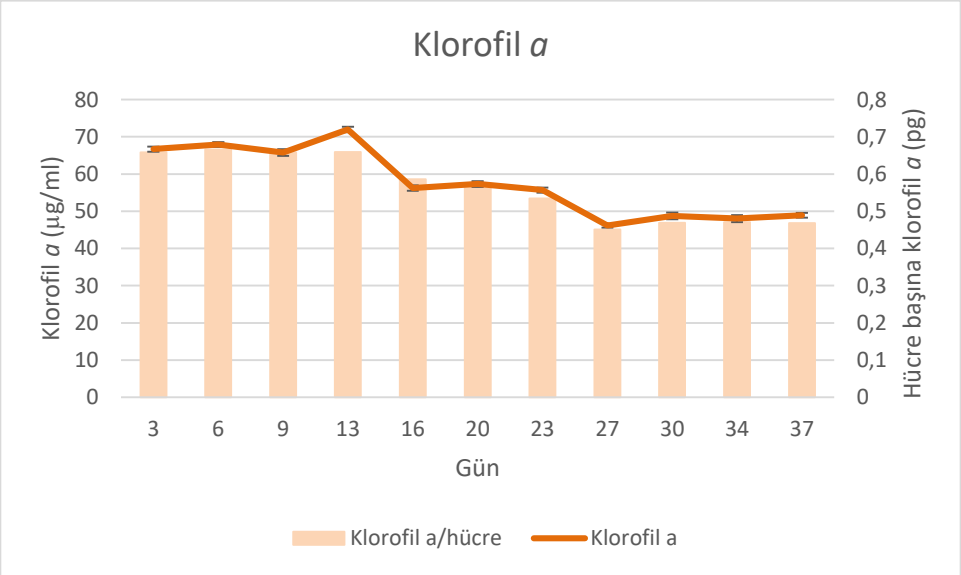
Başka bir çalışmada farklı karbon kaynakları (glikoz, früktoz, sukroz, gliserol ve sodyum asetat) içerdikleri karbon konsantrasyonları 4 g/l olacak şekilde (10-13,67 g/l organik karbon kaynağı) *Chlorella vulgaris* kültüründe kullanılmıştır (Yeh vd., 2012). Elde edilen sonuçlara göre en yüksek biyokütle üretimi glikoz kullanılan kültürde sağlanırken 3,49 g/l olarak belirtilmiştir. Çalışmada glikozun 10 g/l konsantrasyonda kullanıldığı göz önüne alınırsa biyokütlenin kullanılan karbon kaynağı miktarına oranının yalnızca 0,35 düzeyinde olduğu görülmektedir. Ayrıca kullanılan diğer karbon kaynaklarının veriminin düşük olması da bu karbon kaynaklarının pH'ı 9-11 düzeyine kadar yükseltmesiyle açıklanmıştır. Bunun yanında pH düzeyinin HCl ile 8,5'e düşürülmesiyle yapılan diğer denemelerde sodyum asetat kullanılan kültürde kuru ağırlığın 3,6 g/l seviyesine kadar yükseldiği bildirilmiştir. Farklı pH değerleri ile (7,5-9,5) yapılan denemelerde ise sodyum asetatın en yüksek verimle kullanıldığı pH değerinin 8,5 olduğu ortaya konulmuştur. Bu pH seviyesinde biyokütlenin kullanılan karbon kaynağına oranının 0,29 olduğu belirtilmiştir (Yeh vd., 2012). Bu tez çalışmasının PBR kültürü aşamasında ise, yalnızca myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı miksotrofik kültür döneminde, sistemin pH değerine müdahalede bulunulmaz iken 7,5-9,0 arasında dalgalanmalar gözlemlenmiştir. Bu durum, sistem içerisinde CO_2 ve organik karbon kaynağının (myo-inositol) dönüşümlü olarak kullanımıyla açıklanabilir. *Chlorella sorokiniana* ile yapılan ototrofik, heterotrofik ve miksotrofik üretim çalışmasında da bu durum benzer şekilde açıklanmaktadır (Kim vd., 2013).

Bu çalışmadaki veriler incelendiğinde sadece hasat edilen *Chlorella* sp. miktarına göre elde edilen biyokütlenin kullanılan karbon kaynağı miktarına oranı 1,16 olarak hesaplanmaktadır. PBR içerisinde bulunan hasat edilmemiş biyokütle de dahil edilirse bu oran 3,30'a kadar çıkmaktadır. Her 2 koşulda da elde edilen biyokütlenin harcanan

karbon kaynağına oranı açısında myo-inositolün diğer karbon kaynaklarına göre daha verimli olduğu görülmektedir. Ancak, çalışmalar arasındaki tür, suş ve kültür koşullarının farklılık göstermesi göz ardı edilmemelidir.

3.2.2 Pigment

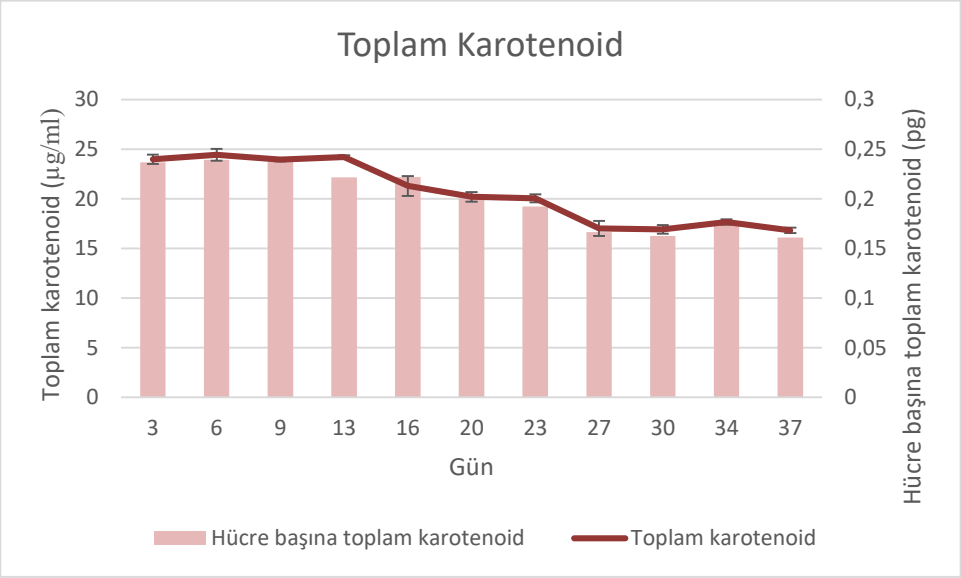
Fotobiyoreaktör kültüründe her hasat döneminde kuru ağırlık miktarlarının yanı sıra pigment miktarları da belirlenmiştir. Bu doğrultuda, en yüksek klorofil *a* miktarı 13. günde 71,96±0,75 µg/ml olarak bulunmuştur. En düşük klorofil *a* miktarı ise 27. Günde 46,13±0,55 µg/ml olarak elde edilmiştir. Fotobiyoreaktör kültürü süresince ortalama klorofil *a* miktarları CO_2 verilen fotoototrofik dönem (1.-7. Gün) için 67,31±0,67 µg/ml, hem CO_2 hem de myo-inositol girişi yapılmış olan geçiş periyodu (8.-22. gün) için 61,39±0,76 µg/ml, son olarak sadece myo-inositol girişi yapılmış olan miksotrofik dönem (23.-37. Gün) için ise 47,95±0,76 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Kültür başlangıcında sadece CO_2 girişi yapılan fotoototrofik dönemde hücre başına düşen klorofil *a* miktarı ortalama 0,66 pg/hücre olarak gerçekleşmiştir. CO_2 ve myo-inositolün birlikte kullanıldığı geçiş döneminde ise hücre başına düşen ortalama klorofil *a* miktarı 0,60 pg/hücre, son olarak sadece myo-inositol girişi yapılan miksotrofik dönemde 0,47 pg/hücre olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.30).



Şekil 3.30 Fotobiyoreaktör kültüründe klorofil *a* miktarları

Toplam karotenoid miktarları arasındaki en yüksek değer 24,42±0,50 µg/ml olarak 6. günde, en düşük miktar ise 16,81±0,27 µg/ml olarak 37. günde elde edilmiştir. Sadece CO_2 girişi yapılmış olan fotoototrofik dönemde ortalama toplam karotenoid miktarı 24,2±0,52 µg/ml olarak bulunmuştur. Geçiş dönemi olan hem CO_2 hem de myo-inositol girişi yapılan periyotta ise bu değer 21,93±0,45 µg/ml olarak gerçekleşmiştir. Son olarak, yalnızca myo-inositol girişi yapılan miksotrofik dönemde ortalama toplam karotenoid miktarı 17,1±0,43 µg/ml tespit edilmiştir.

Fotoototrofik dönemde hücre başına düşen ortalama toplam karotenoid miktarı 0,24 pg/hücre olarak hesaplanmıştır. Geçiş dönemi olan her iki karbon kaynağının birlikte kullanıldığı periyotta ise ortalama hücre başına düşen toplam karotenoid miktarı 0,22 pg/hücre, son olarak miksotrofik dönemde ise bu miktar 0,17 pg/hücre seviyesinde gerçekleşmiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3.31 Fotobiyoreaktör kültüründe toplam karotenoid miktarları

Tübüler PBR'de yapmış olduğumuz kültür çalışmasında CO_2 kullanılan periyotta hücre başına düşen ortalama klorofil *a* miktarı 0,66 pg/hücre, sadece myo-inositol girişi yapılan miksotrofik dönemde ise ortalama 0,47 pg/hücre olarak hesaplanmıştır. Hücre başına düşen klorofil *a* miktarında yaklaşık %30 düşüş görülmüştür. Daha önce *Chlorella zofingiensis* kültüründe glikoz kullanımıyla klorofil *a* miktarı arasında ters orantı olduğu bildirilmiştir. 5 g/l glikoz kullanımı sonucunda glikoz kullanılmayan kültüre göre yaklaşık %30 oranında klorofil *a* miktarının düşüş gösterdiği belirtilmiştir

(Ip vd., 2004). Bildirilen oranlar bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. *Spirulina platensis* ile yapılan çalışmada ise, 2. günden itibaren miksotrofik kültürdeki klorofil *a* miktarının ototrofik kültüre göre %53 oranında düştüğü bildirilmiştir (Li vd., 2018). Bir başka çalışmada ise hem ototrofik hem de miksotrofik kültürde amonyum klorür (NH_4Cl)'ün *S. platensis* kültüründe etkileri araştırılmıştır. Çalışmada ortaya konulan veriler klorofil *a* miktarında diğer çalışmalar ile benzer şekilde 2. günden itibaren %53 düşüş göstermektedir (Li vd., 2019). Yukarıda verilen literatür bilgisi ve tübüler PBR verileri göz önüne alındığında miksotrofik kültürde hücresel klorofil *a* birikiminde azalma eğilimi olduğu söylenebilmektedir. Ancak, *Tetradesmus obliquus* kültüründe kitin hidrolizatı kullanılarak yapılan miksotrofik kültürde olduğu gibi klorofil *a* birikiminde artış olduğu da bildirilmiştir. Bahsi geçen çalışmada, 0,1 g/l konsantrasyonda kitin hidrolizatı kullanıldığında klorofil *a* birikiminde %60 oranında artış, 0,3 g/l konsantrasyonda %7 düşüş son olarak 0,5 g/l konsantrasyonda %49 oranında düşüş bildirilmiştir (Gomaa ve Ali, 2021). Bu sonuç tür, karbonun kaynağının ve konsantrasyonun pigment birikiminde doğrudan etkili olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında da balonlarda yapılan denemelerde myo-inositol kullanımı ile birlikte hücresel klorofil *a* birikiminin arttığı belirlenmiştir. Ancak, tübüler PBR'de yapılan denemelerde ise aksi doğrultuda bir sonuç elde edilmiştir. Ortaya çıkan sonuç, 2 farklı şekilde açıklanabilir. Öncelikle, balon denemelerinde kontrol grubunun herhangi bir karbon kaynağı desteğinin olmaması kontrol grubunda elde edilen klorofil *a* konsantrasyonunun myo-inositol kullanılan deneme gruplarına göre daha düşük olmasına sebep olarak gösterilebilir. Ayrıca, PBR'de yapılan denemede miksotrofik kültüre geçiş ile birlikte klorofil *a* konsantrasyonunda belirlenen düşüş, PBR'nin karşısına konumlandırılmış led ışıklandırmanın kapatılmasıyla ilişkili olabilir.

Bu tez çalışmasında yapılmış olan PBR kültüründe elde edilen sonuçlara göre klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarlarında düşüş görülmektedir. Biyokütlede düşüş olmamasına rağmen gerçekleşen pigment miktarlarındaki azalma, verilerden de görülebileceği gibi hücre başına pigment miktarlarında meydana gelmiştir. Azaman vd., (2017) tarafından yapılan çalışmada, *Chlorella sorokiniana* ve *Chlorella zofingiensis* türlerinde fototrofik ve miksotrofik çalışmaları yapmış olup, her iki tür için de miksotrofik kültürde klorofil *a* miktarının yaklaşık 6 kat azaldığı bildirmiştir.

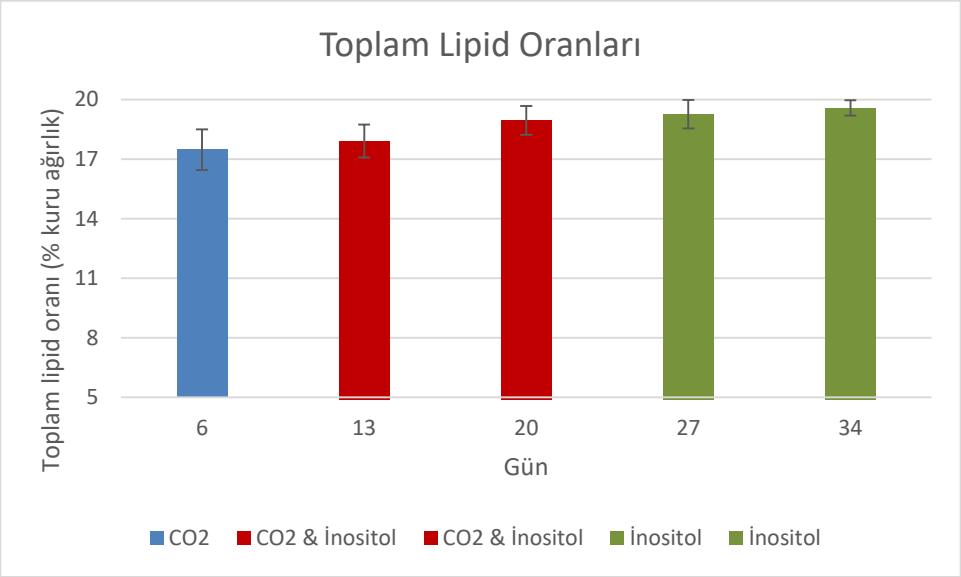
Ancak, karoten miktarlarında ise aksine artış olduğu belirtilmiştir. Sebep olarak miksotrofik kültürde ışık şiddetinin 10 kat arttırılmasından kaynaklandığı şeklinde açıklanmıştır (Azaman vd., 2017). *Chlorella sorokiniana*'nın miksotrofik ve fototrofik kültürlerinde, pigment miktarlarında oluşan değişimin ortaya konulduğu miksotrofik kültürde klorofil *a* miktarı yaklaşık %43 oranında düşmüş olup, toplam karotenoid miktarında bu düşüş yaklaşık %39 oranında gerçekleşmiştir (Van Wagenen vd., 2015). Bu çalışmadan klorofil *a* miktarı yaklaşık %30 oranında düşüş göstermiştir. Toplam karotenoid miktarı da yaklaşık %30-35 oranında düşüş göstermiş olup, bu sonuçlar yukarıda belirtilen önceki çalışmalarla genel olarak uyum göstermektedir. Özellikle aksesuar pigmentler olarak adlandırılan karotenoidler arasındaki farklı sonuçların çalışmalar arasındaki ışık şiddetindeki farklılıktan meydana geldiği düşünülmektedir. Azaman vd., (2017) tarafından yapılan çalışmada miksotrofik aşamada ışık şiddeti arttırılırken, Van Wagenen vd., (2015) tarafından yapılan çalışmada ise değiştirilmemiştir. Yapılan bu çalışmada ise ışık şiddeti düşürülmüş olup, elde edilen sonuçlar özellikle Van Wagenen vd., (2015) ile yüksek benzerlik taşımaktadır.

Fotoototrofik dönemde hücre başına düşen ortalama toplam karotenoid miktarı 0,24 pg/hücre olarak hesaplanırken miksotrofik dönemde bu değer 0,17 pg/hücre seviyesine gerilemiştir. Klorofil *a* birikiminde olduğu gibi karotenoid birikiminde de yaklaşık %30 oranında gerileme belirlenmiştir. Karotenoid birikiminde belirlenen düşüşün klorofil *a* birikimiyle benzer oranda olması, bu düşüşün ışık kaynaklı olması düşüncesini desteklemektedir. *Chlorella zofingiensis* ile yapılmış olan miksotrofik kültürde (sabit ışık, 90 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) glikoz kullanımının kontrol grubuna göre klorofil miktarında düşüş, karotenoidlerin miktarında ise artış olduğu belirtilmiştir (Ip vd., 2004). Hem *Chlorella zofingiensis* hem de *Chlorella sorokiniana* fotoototrofik ve miksotrofik kültürlerinin farklarının araştırıldığı çalışmada ototrofik kültür 10 $\mu mol.m^{-1}.s^{-1}$, miksotrofik kültür ise 100 $\mu mol.m^{-1}.s^{-1}$ ışık ile gerçekleştirilmiştir. Ortaya çıkan sonuca göre her 2 tür için klorofil *a* konsantrasyonu %80'in üzerinde azalırken karotenoid konsantrasyonları %30'dan daha fazla artış göstermiştir (Azaman vd., 2017). Mikroalglerde karotenoidler genel olarak birincil ve ikincil karotenoidler olarak sınıflandırılmaktadır. Birincil karotenoidler, klorofiller ile birlikte fotosentetik aktiviteler için gerekli iken, ikincil karotenoidler besin eksikliği ve yüksek ışık gibi stres koşullarına tepki olarak sentezlenmektedir (Henriquez vd., 2016). PBR

kültüründe hem klorofil *a* hem de karotenoidlerin benzer oranlarda düşüş göstermesi, miksotrofik kültür sebebiyle fotosentetik aktivitenin azalması ile açıklanabilir. Ayrıca, bu teoriye göre ikincil karotenoidlerin de değişmediği varsayılmaktadır. Strese bağlı olarak hücre içi birikimi sağlanan bu pigmentlerin konsantrasyonunun değişmemesi, hem fotoototrofik hem de miksotrofik kültürde ışık, besin gibi stres koşullarında değişkenlik olmadığı düşüncesini desteklemektedir.

3.2.3 Toplam Lipid

Fotobiyoreaktörde yapılan denemede de balon denemelerinde olduğu gibi SPV metoduna göre toplam lipid analizi yapılmıştır. Farklı karbon kaynaklarının hücrelerdeki lipid birikimine etkisini ortaya koymak amaçlanmış olup sadece CO_2, hem CO_2 hem de myo-inositol ve son olarak sadece myo-inositol kullanılan 5 haftadaki değişim aşağıdaki grafikte görülmektedir (Şekil 3.32).



Şekil 3.32 Fotobiyoreaktörde yapılan denemede 5 haftalık toplam lipid oranı değişimi (% lipid/kuru ağırlık)

Analiz sonuçlarına göre karbon kaynağı olarak tamamen CO_2 kullanılan dönemde %17,47±1,02 lipid oranı elde edilirken sisteme CO_2 ile birlikte inositol girişi yapılan 2. ve 3. haftada bu oran sırasıyla %17,90±0,83 ve %18,95±0,73'e yükselmiştir. Sadece myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı 4. ve 5. haftalarda ise toplam lipid oranının sırasıyla %19,26±0,72'ye ve %19,57±0,39'a yükseldiği belirlenmiştir.

Tübüler fotobiyoreaktörde yapılan kültür çalışmasında öncelikle CO_2 kullanılmış olup sırayla her 2 karbon kaynağı ve sadece myo-inositol ile kültür devam ettirilmiştir. CO_2'in karbon kaynağı olarak kullanıldığı dönemde %17,47±1,02 olan lipid oranı her 2 karbon kaynağının birlikte kullanıldığı dönemde %8, sadece myo-inositol kullanılan dönemde %12 oranında artış göstermiştir. Kültür yoğunluğu açısından herhangi bir kayıp olmamakla birlikte myo-inositol kullanılan dönemdeki lipid oranının artışı myo-inositol'ün bu amaç doğrultusunda yapılacak kültürde daha verimli bir karbon kaynağı olduğunu göstermektedir.

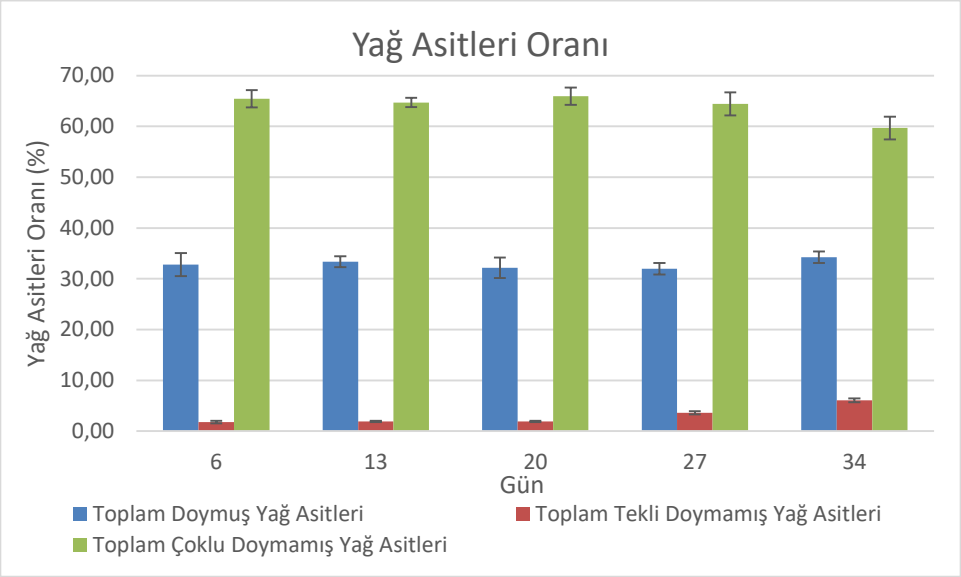
Chlorella'nın 4 farklı suşu ile dış ortamda yapılmış çalışmada azot eksikliği uygulanmış olup lipid oranının %19,7-26 arasında değiştiği belirtilmiştir (Guccione vd., 2014). Başka bir çalışmada ise *C. protothecoides*'in fotootototrofik, fotootototrofik (azot eksikliği) ve miksotrofik (%1 gliserol) kültürleri araştırılmıştır. Fotootototrofik kültürde %11,5 lipid oranı elde edilirlen %1 gliserol kullanılan miksotrofik kültürde bu oran %21,3'e yükselmiştir. Ancak, azot eksiliğinin stres faktörü olarak kullanıldığı fotootototrofik kültürde %35,8 lipid oranı bildirilmiştir (Sforza vd., 2012). *Chlorella vulgaris* ile yapılmış olan çalışmada ışık şiddetinin arttırılmasıyla lipid oranında artış ortaya konulmuştur (Sasi vd., 2011). Tübüler PBR'de yapılan çalışmada azot eksikliğinin lipid oranını arttırdığı bildirilmiştir (Yeh ve Chang, 2011). Bu bilgiler doğrultusunda azot eksikliği ve ışık şiddetinin arttırtılmasının lipid oranını tetikleyen en önemli faktörler olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasının tübüler PBR'de yapılmış olan kültür denemesinde ise azot eksikliğine bağlı stres koşulu uygulanmamış olup, ışık şiddeti ise fotootototrofik kültüre göre düşürülmüştür. Buna rağmen myo-inositol kullanımında lipid oranında artış tespit edilmiştir.

3.2.4 Yağ Asitleri

Fotobiyoreaktör denemesinde yağ asitleri farklı karbon kaynakları kullanılan dönemleri içeren 5 farklı hafta için yapılmış olup toplam lipid içeriğinin belirlendiği hasatlar kullanılmıştır.

Toplam doymuş yağ asitleri oranı sadece CO_2 verilen dönemde %32,77±2,28 iken, hem CO_2 hem de myo-inositol verilen dönemde %33,39±1,07 ve %32,15±2,00 olarak

tespit edilmiştir. Yalnızca myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı dönemde ise toplam doymuş yağ asitleri oranı önce 31,95±1,13 olarak gerçekleşmiş iken son ölçümde 34,25±1,15'e yükselmiştir (3.33).



Şekil 3.33 Fotobiyoreaktör denemesinde yağ asitlerinin gruplara göre zaman içerisindeki oranları

Toplam tekli doymamış yağ asitlerinin oranı deneme boyunca artış göstermiştir. Buna göre, karbon kaynağı olarak sadece CO_2 kullanılan dönemde toplam tekli doymamış yağ asitlerinin oranı %1,79±0,24 seviyesinde iken hem CO_2 hem de myo-inositol verilen dönemde %1,89±0,13 ve %1,89±0,15'e yükselmiştir. Sadece myo-inositol kullanılan dönemde ise önce %3,61±0,3 daha sonra ise %6,07±0,38'e kadar artış göstermiştir.

Denemeler sonucunda yapılan analizlere göre çoklu doymamış yağ asitleri en yüksek oranda bulunan yağ asitleri grubu olarak öne çıkmaktadır. CO_2 kullanılan dönemde %65,44±1,69 oranında toplam çoklu doymamış yağ asitleri bulunurken bu oran her 2 karbon kaynağının kullanıldığı dönemde sırasıyla 64,72±0,94 ve 65,95±1,69 olarak gerçekleşmiştir. Sadece myo-inositol kullanılan dönemde ise ilk ölçümde %64,44±2,28 oranında toplam çoklu doymamış yağ asitleri bulunurken 2. ölçümde bu oranın %59,69±2,26'ya düştüğü belirlenmiştir (Tablo 3.32).

Fotobiyoreaktör kültüründe CO_2 kullanılan dönemde %1,53 oranında bulunan oleik asit oranı hem CO_2 hem de myo-inositol kullanılan dönemde %1,68 ve %1,64

oranlarında tespit edilmiştir. Sadece myo-inositol kullanılan dönemde ise sırasıyla %3,43 ve %5,93 oranlarında bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4 Fotobiyoreaktör kültüründe farklı karbon kaynağı kullanılan dönemlerde elde edilen yağ asitleri kompozisyonu

	CO_2 (6. gün)	**CO_2 ve myo-inositol (13. gün)**	**CO_2 ve myo-inositol (20. gün)**	**Myo-inositol (27. gün)**	**Myo-inositol (34. gün)**
Dodekanoik asit (12:0) (%)	0,22±0,12^{a}	0,15±0,01^{a}	0,25±0,1^{a}	0,19±0,05^{a}	0,15±0,02^{a}
Tetradekanoik asit (C14:0) (%)	1,79±0,05^{a}	1,63±0,06^{b}	1,52±0,05^{b}	1,33±0,06^{c}	1,32±0,06^{c}
Hekzadekanoik asit (C16:0) (%)	28,70±1,14^{a}	29,57±0,43^{a}	28,35±1,21^{a}	28,58±0,72^{a}	30,46±0,81^{a}
9-Hekzadesenoik asit (16:1) (%)	0,22±0,09^{a}	0,16±0,01^{a}	0,25±0,08^{a}	0,18±0,04^{a}	0,14±0,01^{a}
Oktadekanoik asit (18:0) (%)	1,11±0,46^{a}	1,08±0,31^{a}	0,90±0,1^{a}	0,90±0,06^{a}	1,50±0,09^{a}
9-Oktadesenoik asit (18:1) (%)	1,53±0,08^{a}	1,68±0,03^{a}	1,64±0,06^{a}	3,43±0,27^{b}	5,93±0,36^{c}
9,12-Oktadekadienoik asit (18:2) (%)	51,85±0,92^{a}	49,86±0,16^{ab}	51,64±1,12^{a}	50,14±1,41^{ab}	47,75±1,69^{b}
9,12,15-Oktadekatrienoik asit (18:3) (%)	13,48±0,67^{ab}	14,72±0,76^{b}	14,18±0,45^{b}	14,13±0,82^{b}	11,82±0,55^{a}
Diğer (%)	1,10±0,69^{a}	1,14±0,36^{a}	1,28±0,66^{a}	1,13±0,28^{a}	0,93±0,19^{a}
Toplam (%)	100	100	100	100	100
Doymuş Yağ Asitleri (%)	32,77±2,28^{ab}	33,39±1,07^{ab}	32,15±2,00^{b}	31,95±1,13^{b}	34,25±1,15^{a}
Tekli Doymamış Yağ Asitleri (%)	1,79±0,24^{a}	1,89±0,13^{a}	1,89±0,15^{a}	3,61±0,3^{b}	6,07±0,38^{c}
Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (%)	65,44±1,69^{a}	64,72±0,94^{a}	65,95±1,69^{a}	64,44±2,28^{a}	59,69±2,26^{b}

Not: üstel harfler gruplar arasındaki istatistiksel ilişkiyi belirtir.

Linoleik asit oranı CO_2 kullanılan dönemde %51,85 oranında tespit edilmiştir. Bu yağ asidi oranının her 2 karbon kaynağının kullanıldığı dönemde %49,86 ve %51,64 olduğu belirlenmiştir. Sadece myo-inositol kullanılan periyotta %50,14 ile %47,75 oranlarında linoleik asit tespit edilmiştir.

α-linolenik asit oranları yalnızca CO_2 kullanılan dönemde %13,48 oranında, her 2 karbon kaynağının kullanıldığı dönemde %14,72 ve %14,18 oranlarında, son olarak

myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanıldığı dönemde ise %14,13 ve %11,82 oranlarında olduğu belirlenmiştir.

Tübüler PBR çalışmasında 5 farklı zamanda yağ asitleri analizi gerçekleştirilmiştir. CO_2 kullanılan fotoototrofik dönemde doymuş yağ asitleri arasında %28,7±1,14 ile palmitik asit (C16:0), tekli doymamış yağ asitleri içerisinde %1,53±0,08 ile oleik asit (C18:1) ve çoklu doymamış yağ asitleri içerisinde %51,85±0,92 ile linoleik asit (C:18:2) en yüksek orana sahiptir. Baskın yağ asitleri tüm kültür çalışması boyunca değişmez iken toplam yağ asitleri içerisindeki oranları değişim göstermiştir. Myo-inositol kullanılan miksotrofik dönemde palmitik asit oranının %30,46±0,81'e yükseldiği belirlenmiştir. Ayrıca oleik asit oranı da %5,93±0,36'ya yükselirken linoleik oranının ise %47,75±1,69'a düştüğü görülmüştür.

Literatürde verilen bilgiler, *Chlorella* kültüründe ışık şiddetinin artması ile çoklu doymamış yağ asitlerinin oranlarında azalma olduğu bilgisini desteklemektedir (Seyfabadi vd., 2011; Krzeminska vd., 2015). Ancak tam tersini destekleyen çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, farklı renklerdeki ışıkların düşük ve yüksek ışık şiddetinin etkilerininin araştırıldığı *Chlorella vulgaris* kültürü çalışmasında, çoklu doymamış yağ asitlerinin ışığın renginden bağımsız olarak ışık şiddetinin artışıyla yükseldiği bildirilmiştir (Chavez-Fuentes vd., 2018). Farklı bir çalışmada ise azot ve fosfor eksikliğinin tekli doymuş yağ asitleri oranını arttırdığı, çoklu doymamış yağ asitleri oranını ise azalttığı belirtilmektedir (Li vd., 2019). Bu tez çalışmasının PBR kültüründe myo-inositol kullanılan döneminde ise ışık şiddeti daha düşük olmasına rağmen doymuş yağ asitleri ve tekli doymamış yağ asitleri oranı artış göstermiş olup çoklu doymamış yağ asitleri oranı ise düşmüştür. Karbon kaynağının yağ asitleri profili üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Farklı şekerler ile yapılmış olan heterotrofik kültür çalışmasında laktoz ile yapılan denemede, *Chlorella zofingiensis*'in çoklu doymamış yağ asitleri oranı %51,59 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada glikoz kullanımında ise çoklu doymamış yağ asitleri oranının %36,24'e düştüğü görülmektedir. Ayrıca laktoz kullanımında %16,01 olan tekli doymamış yağ asitleri oranının glikoz kullanımında %37,64'e yükseldiği ortaya konulmuştur (Liu vd., 2010). *Chlorella pyrenoidosa* kültüründe standart Fogg's besin ortamı ile yapılan kültürde, doymamış yağ asitleri oranının %57,92 iken asetat ve gliserol kullanımında %25-30

arasında değiştiği bildirilmiştir (Rai vd., 2013). Fotoototrofik, heterotrofik ve miksotrofik *Chlorella sorokiniana* kültürlerinin yağ asitleri profili ortaya konulduğu çalışmada farklı başlangıç glikoz konsantrasyonları hem heterotrofik hem de miksotrofik kültür için uygulanmıştır (Li vd., 2014). Buna göre fotoototrofik kültürde çoklu doymamış yağ asitleri oranı %52 iken heterotrofik kültürde %57,67-40,64 arasında, miksotrofik kültürde ise %51,35-46,23 arasında değişim göstermiştir. Heterotrofik ve miksotrofik kültürlerde glikozun başlangıç kosnantrasyonu arttıkça çoklu doymamış yağ asitleri oranının da genel bir düşüş içerisinde olduğu ortaya konulmuştur. Tekli doymamış yağ asitlerinin ise glikoz oranı artışıyla birlikte artış gösterdiği de aynı çalışmada görülmektedir (Li vd., 2014). Bu tez çalışmasının PBR kültüründe de benzer bir sonuç elde edilmiştir. Fotoototrofik dönemde çoklu doymamış yağ asitleri oranı %65,44±1,69 iken miksotrofik dönemde %59,69±2,26'ya kadar düşmüştür. Ayrıca tekli doymamış yağ asitleri oranının fotoototrofik dönemde %1,79±0,24 olarak belirlenirken, miksotrofik dönemde %6,07±0,38'e yükseldiği tespit edilmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma süresince ilk olarak 1 l hacmindeki balonlarda 6 farklı konsantrasyon ve 3 tekerrürlü, ardından ise 140 l hacme sahip tübüler fotobiyoreaktörde myo-inositolün *Chlorella* sp. tarafından karbon kaynağı olarak kullanımı araştırılmıştır.

Balonlar ile yapılan denemeler neticesinde myo-inositol kullanımı ile biyokütlede yüksek oranda artış elde edilmiştir. Gliserolün karbon kaynağı ile kullanımı da kontrol grubuna göre daha yüksek miktarda biyokütle eldesi sağlamış olmasına karşın, yarı konsantrasyondaki myo-inositol kullanımı 2 kattan fazla biyokütle elde edilmesine sebep olmuştur. Ayrıca, daha önce yapılmış çalışmalarda kullanılmış olan karbon kaynaklarına göre de bu açıdan üstün olduğu fikri oluşmuştur. Ancak daha güvenilir bir mukayese için aynı koşullar altında aynı suşlar ile çalışmalar yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Miksotrofik ve heterotrofik kültürlerde en yüksek oranda kayıp pigment birikiminde ortaya çıkmaktadır. Balon denemelerinde kontrol grubu herhangi bir karbon kaynağından yoksun olması sebebiyle fotoototrofik kültür-miksotrofik kültür karşılaştırması yapılması uygun görülmemektedir. Bunun yanında myo-inositol kullanımının gliserol kullanımınıyla mukayesesinde toplam pigment ve hücre başına düşen pigment parametrelerinde üstünlük sağladığı ortaya çıkmıştır.

Toplam lipid oranı açısından da myo-inositolün gliserole göre avantajlı olduğu ortaya çıkmış olup kullanılan myo-inositol konsantrasyonu ile lipid birikiminin arttığı tespit edilmiştir. Lipid birikimi açısından daha yüksek konsantrasyonların denenmesi ile lipid artışının maksimum olduğu konsantrasyonun tespit edilmesi gerekliliği göz önünde bulundurulmalıdır. Yağ asitleri kompozisyonu genel olarak miksotrofik kültür çalışmalarına benzer nitelikte gelişmiştir. Myo-inositol kullanımı ile artan doymuş yağ asitleri ve azalan çoklu doymamış yağ asitleri genel olarak literatüre uygunluk göstermektedir. Ancak, myo-inositol konsantrasyonunun değişimi ile yağ asitleri profilinin de değiştiği belirlenmiş olup, hedeflenen üretime uygun konsantrasyonun seçilmesi tavsiye edilmektedir.

PBR denemesinde elde edilen veriler ile fotoototrofik üretimde ulaşılan maksimum yoğunlukta myo-inositolün kültürün devamlılığına ve biyokimyasal kompozisyonuna etkisi incelenmiştir. Buna göre kullanılan myo-inositol oranı ve elde edilen biyokütle ile literatürde verilen optimum CO_2/biyokütle dönüşüm oranı karşılaştırılmıştır. Myo-inositolün daha maliyetli bir karbon kaynağı olmasına karşın, kullanılan karbon kaynağının biyokütleye dönüşümü açısından daha verimli bir karbon kaynağı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, ışığa olan bağımlılığın azaltılması sebebiyle myo-inositol kullanımının daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Yerli tedarikçi fiyatları göz önünde bulundurulacak olursa, myo-inositol (aromel-gıda kalite) 1371,55 TL/kg (73 ABD doları/kg), CO_2 gazı ise 59 TL/kg (3,2 ABD doları/kg) (TÜRKSAN) fiyatlarına sahiptir. Bunun dışında, dünya geneli incelendiğinde yabancı üreticilerden AM NUTRATECH (Yeni Delhi, Hindistan) firmasından 305 rupi/kg (69,8 TL), HAIHANG INDUSTRY (Çin) firmasından ise 3-5 ABD doları (55,90-93,17 TL) fiyat aralığında inositol tedariği mümkündür. CO_2 ise Wuhan Air Gas Electronic Materials Enterprise (Çin) şirketinde 1 ABD doları (18,63 TL) fiyatla satılmaktadır. Yerli tedarikçilerde inositol karbon dioksitten 23 kat daha yüksek bedelle satılırken yurt dışı tedarikçiler göz önüne alındığında bu oran yaklaşık 3-5 kat arasında değişmektedir. Yerli tedarikçi fiyatı göz önüne alındığında 1 gram *Chlorella* sp. için harcanacak inositol maliyeti 0,47 TL olarak hesaplanmıştır. Yabancı tedarikçi fiyatları söz konusu olduğunda ise bu maliyet 0,02-0,03 TL arasında değişmektedir. CO_2 açısından bakıldığında ise yerli tedarikçi fiyatıyla 1 gram *Chlorella* sp. için oluşan karbon kaynağı maliyeti 0,12 TL olarak hesaplanmıştır. Yabancı tedarikçileri söz konusu olduğunda ise bu maliyet 0,04 TL olarak hesaplanmıştır. Yerli tedarik açısından bakıldığında inositol ile yapılan kültürün karbon maliyeti CO_2'e göre yaklaşık 3,9 kat daha fazladır. Yabancı tedarikçi fiyatlarına göre inositol ile yapılacak olan üretimin karbon kaynağı maliyeti CO_2'e göre yarı yarıya daha ucuzdur. Ancak, lojistik ve gümrük vergisi gibi ekstra maliyetler de göz önünde bulundurulmalıdır. CO_2 kullanılan dönemde yararlanılan aydınlatma elemanlarının myo-inositol kullanılan döneme göre 4 kat daha fazla enerji harcadığı da hesaplanmıştır. Enerji maliyetinin yanı sıra, aydınlatma elemanlarının yatırım maliyetleri de dikkate alınmalıdır. Sonuç olarak inositolün karbon biyokütle dönüşümü açısından verimi CO_2'e göre daha yüksektir, ancak daha yüksek maliyetle tedarik edilebilmektedir. Yine de, ileride yapılacak olan optimizasyon çalışmaları sayesinde verimin daha da arttırılabilme

potansiyeli ve erişilebilecek ucuz tedarik olanağı, inositolün CO_2 ile rekabet edebilecek bir karbon kaynağı olarak değerlendirmesi fikrini desteklemektedir.

Myo-inositolün karbon kaynağı olarak kullanımında pigment konsantrasyonunda düşüş tespit edilmiştir. Ancak, bu sonucun ışık şiddetinde yapılacak olan değişiklikler ile aşılabileceği düşünülmektedir. Myo-inositol kullanımı sonucunda lipid oranında ise artış belirlenmiştir. Ayrıca, yağ asitleri kompozisyonunda doymuş yağ asitleri ve tekli doymamış yağ asitleri oranlarında artış belirlenirken, çoklu doymamış yağ asitleri oranında ise düşüş tespit edilmiştir. Bu sebeple amaçlanan biyokompozisyona göre büyük ölçekli kültürlerde optimizasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abd Rahman, A. R., Cob, Z. C., Jamari, Z., Mohamed, A. M., Toda, T., & Ross, O. H. (2018). The effects of microalgae as live food for Brachionus plicatilis (rotifer) in intensive culture system. *Tropical life sciences research*, *29*(1), 127.

Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J., & Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource technology*, *118*, 61-66.

Alok, A., Singh, S., Kumar, P., & Bhati, K. K. (2022). Potential of engineering the myo-inositol oxidation pathway to increase stress resilience in plants. Molecular Biology Reports, 1-11.

Alvarez, A. L., Weyers, S. L., Goemann, H. M., Peyton, B. M., & Gardner, R. D. (2021). Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Research*, *54*, 102200.

Ansari, F. A., Guldhe, A., Gupta, S. K., Rawat, I., & Bux, F. (2021). Improving the feasibility of aquaculture feed by using microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(32), 43234-43257.

Arora, N., & Philippidis, G. P. (2021). Insights into the physiology of Chlorella vulgaris cultivated in sweet sorghum bagasse hydrolysate for sustainable algal biomass and lipid production. *Scientific reports*, *11*(1), 1-14.

Azaman, S. N. A., Nagao, N., Yusoff, F. M., Tan, S. W., & Yeap, S. K. (2017). A comparison of the morphological and biochemical characteristics of Chlorella sorokiniana and Chlorella zofingiensis cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *PeerJ*, *5*, e3473.

Begum, H., Yusoff, F. M., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016). Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical reviews in food science and nutrition*, *56*(13), 2209-2222.

Beijerinck, M.W., 1890, Kulturversuche mit Zoochloren, Lichenengonidien und anderen niederen Algen, Bot. Ztg. 48, 725–785.

Bizzarri, M., & Carlomagno, G. (2014). Inositol: history of an effective therapy for polycystic ovary syndrome. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 18(13), 1896-1903.

Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. In *Progress in industrial microbiology* (Vol. 35, pp. 313-321). Elsevier.

Brown, M. R. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuicola*.

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, *151*(1-4), 315-331.

Campenni, L., Nobre, B. P., Santos, C. A., Oliveira, A. C., Aires-Barros, M. R., Palavra, A. M. F., & Gouveia, L. (2013). Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga Chlorella protothecoides under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. Applied microbiology and biotechnology, 97(3), 1383-1393.

Chavez-Fuentes, P., Ruiz-Marin, A., & Canedo-López, Y. (2018). Biodiesel synthesis from Chlorella vulgaris under effect of nitrogen limitation, intensity and quality light: estimation on the based fatty acids profiles. Molecular biology reports, 45(5), 1145-1154.

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

Chen, C. Y., & Liu, C. C. (2018). Optimization of lutein production with a two-stage mixotrophic cultivation system with Chlorella sorokiniana MB-1. *Bioresource technology*, *262*, 74-79.

Chen, J. H., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, C. H., Ng, I. S., & Chang, J. S. (2019). Enhancing lutein production with mixotrophic cultivation of Chlorella sorokiniana MB-1-M12 using different bioprocess operation strategies. *Bioresource technology*, *278*, 17-25.

Chen, J. H., Kato, Y., Matsuda, M., Chen, C. Y., Nagarajan, D., Hasunuma, T., ... & Chang, J. S. (2019). A novel process for the mixotrophic production of lutein with Chlorella sorokiniana MB-1-M12 using aquaculture wastewater. *Bioresource technology*, *290*, 121786.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, *25*(3), 294-306.

Choi, H. J., & Yu, S. W. (2015). Influence of crude glycerol on the biomass and lipid content of microalgae. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *29*(3), 506-513.

Chokshi, K., Pancha, I., Trivedi, K., George, B., Maurya, R., Ghosh, A., & Mishra, S. (2015). Biofuel potential of the newly isolated microalgae Acutodesmus dimorphus under temperature induced oxidative stress conditions. Bioresource Technology, 180, 162-171.

Chu, P. N., Chu, F. F., Zhang, Y., Wu, C., & Zeng, R. J. (2015). A robust direct-transesterification method for microalgae. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 37(23), 2583-2590.

Correa, I., Drews, P., Botelho, S., de Souza, M. S., & Tavano, V. M. (2017, December). Deep learning for microalgae classification. In *2017 16th IEEE*

International Conference on Machine Learning and Applications (ICMLA) (pp. 20-25). IEEE.

Couso, I., Vila, M., Vigara, J., Cordero, B. F., Vargas, M. Á., Rodríguez, H., & León, R. (2012). Synthesis of carotenoids and regulation of the carotenoid biosynthesis pathway in response to high light stress in the unicellular microalga Chlamydomonas reinhardtii. *European Journal of Phycology*, *47*(3), 223-232.

Cui, W., Ma, A., Farhadi, A., Saqib, H. S. A., Liu, S., Chen, H., & Ma, H. (2022). How myo-inositol improves the physiological functions of aquatic animals: A review. Aquaculture, 738118.

Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi, R. J., Nouri, H., & Golzary, A. (2017). Investigation of optimal condition for Chlorella vulgaris microalgae growth.

de Melo, R. G., de Andrade, A. F., Bezerra, R. P., Correia, D. S., de Souza, V. C., Brasileiro-Vidal, A. C., ... & Porto, A. L. F. (2018). Chlorella vulgaris mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. *Chemosphere*, *204*, 344-350.

Deng, X., Chen, B., Xue, C., Li, D., Hu, X., & Gao, K. (2019). Biomass production and biochemical profiles of a freshwater microalga Chlorella kessleri in mixotrophic culture: Effects of light intensity and photoperiodicity. *Bioresource technology*, *273*, 358-367.

Deshmukh, S., Kumar, R., & Bala, K. (2019). Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. *Fuel processing technology*, *191*, 232-247.

Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., & Sorgeloos, P. (2001). Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, *200*(1-2), 129-146.

Drews-Jr, P., Colares, R. G., Machado, P., de Faria, M., Detoni, A., & Tavano, V. (2013). Microalgae classification using semi-supervised and active learning based on Gaussian mixture models. *Journal of the Brazilian Computer Society*, *19*(4), 411-422.

Durmaz, Y. (2007). Vitamin E (α-tocopherol) production by the marine microalgae Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. Aquaculture, 272(1-4), 717-722.

Durmaz, Y., Kilicli, M., Toker, O. S., Konar, N., Palabiyik, I., & Tamtürk, F. (2020). Using spray-dried microalgae in ice cream formulation as a natural colorant: Effect on physicochemical and functional properties. *Algal Research*, *47*, 101811.

e Silva, P. E. D. C., de Barros, R. C., Albuquerque, W. W. C., Brandão, R. M. P., Bezerra, R. P., & Porto, A. L. F. (2018). In vitro thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from Chlorella vulgaris. *Journal of Chromatography B*, *1092*, 524-529.

Ebenezer, V., Medlin, L. K., & Ki, J. S. (2012). Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. *Marine Biotechnology*, *14*(2), 129-142.

Ebrahimian, A., Kariminia, H. R., & Vosoughi, M. (2014). Lipid production in mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris in a mixture of primary and secondary municipal wastewater. *Renewable Energy*, *71*, 502-508.

Feng, P., Qin, L., Xu, Z., Alam, M. A., Wang, Z., & Zhu, S. (2022). Seasonal variation in the growth, lipid accumulation, and fatty acid composition of Chlorella sp. GN1 cultured in flat plate photobioreactors outdoors. Biomass Conversion and Biorefinery, 1-15.

Feng, P., Xu, Z., Qin, L., Alam, M. A., Wang, Z., & Zhu, S. (2020). Effects of different nitrogen sources and light paths of flat plate photobioreactors on the growth and lipid accumulation of Chlorella sp. GN1 outdoors. Bioresource technology, 301, 122762.

Fenton, O., Huallachain, D. O., (2012). Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): a review. *Algal Research*, *1*(1), 49-56.

Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fábregas, J., & Otero, A. (2009). Enriching rotifers with "premium" microalgae. Nannochloropsis gaditana. *Marine Biotechnology*, *11*(5), 585-595.

Frumento, D., Casazza, A. A., Al Arni, S., & Converti, A. (2013). Cultivation of Chlorella vulgaris in tubular photobioreactors: a lipid source for biodiesel production. Biochemical engineering journal, 81, 120-125.

Furuhashi, Y., Honda, R., Noguchi, M., Hara-Yamamura, H., Kobayashi, S., Higashimine, K., & Hasegawa, H. (2019). Optimum conditions of pH, temperature and preculture for biosorption of europium by microalgae Acutodesmus acuminatus. Biochemical Engineering Journal, 143, 58-64.

Gao, F., Yang, H. L., Li, C., Peng, Y. Y., Lu, M. M., Jin, W. H., ... & Guo, Y. M. (2019). Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae Chlorella sp. Bioresource technology, 282, 118-124.

Genç Polat, D., Durmaz, Y., Konar, N. *et al.* Using encapsulated *Nannochloropsis oculata* in white chocolate as coloring agent. *J Appl Phycol* 32, 3077–3088 (2020).

Ghafari, M., Rashidi, B., & Haznedaroglu, B. Z. (2018). Effects of macro and micronutrients on neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Biofuels*, *9*(2), 147-156.

Ghosh, M., Nandi, S., Layek, S., Nandi, P. K., Bera, N., & Sarkar, N. (2022). Formation of lipid tubules induced by a sugar-like molecule myo-inositol. Chemical Communications, 58(3), 459-462.

Gimpel, J. A., Henríquez, V., & Mayfield, S. P. (2015). In metabolic engineering of eukaryotic microalgae: potential and challenges come with great diversity. *Frontiers in microbiology*, *6*, 1376.

Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., E Baart, G. J., & De Cooman, L. (2014). Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal of phycology*, *50*(3), 483-492.

Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., & Muylaert, K. (2015). Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. Algal Research, 7, 51-57.

Gomaa, M., & Ali, M. M. (2021). Enhancement of microalgal biomass, lipid production and biodiesel characteristics by mixotrophic cultivation using enzymatically hydrolyzed chitin waste. *Biomass and Bioenergy*, *154*, 106251.

Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., & Empis, J. (1996). Evolution of pigment composition in Chlorella vulgaris. *Bioresource Technology*, *57*(2), 157-163.

Guccione, A., Biondi, N., Sampietro, G., Rodolfi, L., Bassi, N., & Tredici, M. R. (2014). Chlorella for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. *Biotechnology for biofuels*, *7*(1), 1-12.

Guillard, R. R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Culture of marine invertebrate animals (pp. 29-60). Springer, Boston, MA.

Guo, Z., & Tong, Y. W. (2014). The interactions between Chlorella vulgaris and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions. *Journal of Applied Phycology*, *26*(3), 1483-1492.

Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V., & Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(8), 1737-1746.

Henriquez, V., Escobar, C., Galarza, J., & Gimpel, J. (2016). Carotenoids in microalgae. *Carotenoids in Nature*, 219-237.

Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Ruan, R., & Hu, B. (2011). Mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and bioenergy*, *35*(5), 2245-2253.

Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga Chlorella vulgaris FSP-E. *Bioresource technology*, *135*, 157-165.

Hu, B., Min, M., Zhou, W., Du, Z., Mohr, M., Chen, P., ... & Ruan, R. (2012). Enhanced mixotrophic growth of microalga Chlorella sp. on pretreated swine

manure for simultaneous biofuel feedstock production and nutrient removal. *Bioresource technology*, *126*, 71-79.

Huang, A., Sun, L., Wu, S., Liu, C., Zhao, P., Xie, X., & Wang, G. (2017). Utilization of glucose and acetate by Chlorella and the effect of multiple factors on cell composition. *Journal of Applied Phycology*, *29*(1), 23-33.

Huang, Y., Lou, C., Luo, L., & Wang, X. C. (2021). Insight into nitrogen and phosphorus coupling effects on mixotrophic Chlorella vulgaris growth under stably controlled nutrient conditions. *Science of the Total Environment*, *752*, 141747.

Huerlimann, R., De Nys, R., & Heimann, K. (2010). Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and bioengineering*, *107*(2), 245-257.

Huo, S., Kong, M., Zhu, F., Zou, B., Wang, F., Xu, L., ... & Huang, D. (2018). Mixotrophic Chlorella sp. UJ-3 cultivation in the typical anaerobic fermentation effluents. *Bioresource technology*, *249*, 219-225.

Illman, A. M., Scragg, A. H., & Shales, S. W. (2000). Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and microbial technology*, *27*(8), 631-635.

Ip, P. F., Wong, K. H., & Chen, F. (2004). Enhanced production of astaxanthin by the green microalga Chlorella zofingiensis in mixotrophic culture. *Process Biochemistry*, *39*(11), 1761-1766.

Jain, D., Ghonse, S. S., Trivedi, T., Fernandes, G. L., Menezes, L. D., Damare, S. R., ... & Gupta, V. (2019). CO2 fixation and production of biodiesel by Chlorella vulgaris NIOCCV under mixotrophic cultivation. *Bioresource technology*, *273*, 672-676.

Ji, Y., Hu, W., Li, X., Ma, G., Song, M., & Pei, H. (2014). Mixotrophic growth and biochemical analysis of Chlorella vulgaris cultivated with diluted monosodium glutamate wastewater. *Bioresource technology*, *152*, 471-476.

Juntila, D. J., Bautista, M. A., & Monotilla, W. (2015). Biomass and lipid production of a local isolate Chlorella sorokiniana under mixotrophic growth conditions. *Bioresource technology*, *191*, 395-398.

Katiyar, R., Bharti, R. K., Gurjar, B. R., Kumar, A., Biswas, S., & Pruthi, V. (2018). Utilization of de-oiled algal biomass for enhancing vehicular quality biodiesel production from Chlorella sp. in mixotrophic cultivation systems. *Renewable Energy*, *122*, 80-88.

Kim, B., Praveenkumar, R., Lee, J., Nam, B., Kim, D. M., Lee, K., ... & Oh, Y. K. (2016). Magnesium aminoclay enhances lipid production of mixotrophic Chlorella sp. KR-1 while reducing bacterial populations. *Bioresource technology*, *219*, 608-613.

Kim, D. G., Lee, C., Park, S. M., & Choi, Y. E. (2014). Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using Chlorella vulgaris. *Bioresource technology*, *159*, 240-248.

Kim, S., Park, J. E., Cho, Y. B., & Hwang, S. J. (2013). Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of Chlorella sorokiniana in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource technology*, *144*, 8-13.

Kona, R., Hemalatha, M., Srivastav, K. V., & Mohan, S. V. (2017). Regulatory effect of Fe-EDTA on mixotrophic cultivation of Chlorella sp. towards biomass growth and metabolite production. *Bioresource technology*, *244*, 1227-1234.

Kong, W. B., Hua, S. F., Cao, H., Mu, Y. W., Yang, H., Song, H., & Xia, C. G. (2012). Optimization of mixotrophic medium components for biomass production and biochemical composition biosynthesis by Chlorella vulgaris using response surface methodology. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *43*(3), 360-367.

Kong, W., Song, H., Cao, Y., Yang, H., Hua, S., & Xia, C. (2011). The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of Chlorella vulgaris under mixotrophic cultivation. African Journal of Biotechnology, 10(55), 11620-11630.

Krienitz, L., Huss, V. A., & Bock, C. (2015). Chlorella: 125 years of the green survivalist. *Trends in plant science*, *20*(2), 67-69.

Krzeminska, I., Piasecka, A., Nosalewicz, A., Simionato, D., & Wawrzykowski, J. (2015). Alterations of the lipid content and fatty acid profile of Chlorella protothecoides under different light intensities. Bioresource Technology, 196, 72-77.

Kumar, V., Muthuraj, M., Palabhanvi, B., Ghoshal, A. K., & Das, D. (2014). High cell density lipid rich cultivation of a novel microalgal isolate Chlorella sorokiniana FC6 IITG in a single-stage fed-batch mode under mixotrophic condition. *Bioresource technology*, *170*, 115-124.

Larkum, A. W., Ross, I. L., Kruse, O., & Hankamer, B. (2012). Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends in biotechnology*, *30*(4), 198-205.

Leong, W. H., Saman, N. A. M., Kiatkittipong, W., Assabumrungrat, S., Najdanovic-Visak, V., Wang, J., ... & Lim, J. W. (2022). Photoperiod-induced mixotrophic metabolism in Chlorella vulgaris for high biomass and lipid to biodiesel productions using municipal wastewater medium. Fuel, 313, 123052.

Li, C. H., Tien, H. J., Wen, M. F., & Yen, H. E. (2021). Myo-inositol transport and metabolism participate in salt tolerance of halophyte ice plant seedlings. Physiologia Plantarum, 172(3), 1619-1629.

Li, D., Yuan, Y., Cheng, D., & Zhao, Q. (2019). Effect of light quality on growth rate, carbohydrate accumulation, fatty acid profile and lutein biosynthesis of Chlorella sp. AE10. Bioresource technology, 291, 121783.

Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2014). Mixotrophic cultivation of a Chlorella sorokiniana strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, *66*, 204-213.

Li, X., Li, W., Zhai, J., & Wei, H. (2018). Effect of nitrogen limitation on biochemical composition and photosynthetic performance for fed-batch mixotrophic cultivation of microalga Spirulina platensis. *Bioresource technology*, *263*, 555-561.

Li, X., Li, W., Zhai, J., Wei, H., & Wang, Q. (2019). Effect of ammonium nitrogen on microalgal growth, biochemical composition and photosynthetic performance in mixotrophic cultivation. *Bioresource Technology*, *273*, 368-376.

Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of Chlorella vulgaris under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Biotechnology

Liao, Q., Sun, Y., Huang, Y., Xia, A., Fu, Q., & Zhu, X. (2017). Simultaneous enhancement of Chlorella vulgaris growth and lipid accumulation through the synergy effect between light and nitrate in a planar waveguide flat-plate photobioreactor. Bioresource technology, 243, 528-538.

Lin, T. S., & Wu, J. Y. (2015). Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource technology*, *184*, 100-107.

Liu, J., Huang, J., Fan, K. W., Jiang, Y., Zhong, Y., Sun, Z., & Chen, F. (2010). Production potential of Chlorella zofingienesis as a feedstock for biodiesel. Bioresource technology, 101(22), 8658-8663.

Liu, J., Tan, K., He, L., Qiu, Y., Tan, W., Guo, Y., ... & Sun, W. (2018). Effect of limitation of iron and manganese on microalgae growth in fresh water. *Microbiology*, *164*(12), 1514-1521.

Liu, L., Zhao, Y., Jiang, X., Wang, X., & Liang, W. (2018). Lipid accumulation of Chlorella pyrenoidosa under mixotrophic cultivation using acetate and ammonium. *Bioresource technology*, *262*, 342-346.

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

Loewus, F. A., & Murthy, P. P. (2000). myo-Inositol metabolism in plants. Plant science, 150(1), 1-19.

Macias-Sánchez, M. D., Mantell, C., Rodrıguez, M., de La Ossa, E. M., Lubián, L. M., & Montero, O. (2005). Supercritical fluid extraction of carotenoids and

chlorophyll a from Nannochloropsis gaditana. *Journal of Food Engineering*, *66*(2), 245-251.

Mandal, M. K., Saikia, P., Chanu, N. K., & Chaurasia, N. (2019). Modulation of lipid content and lipid profile by supplementation of iron, zinc, and molybdenum in indigenous microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(20), 20815-20828.

Manhaeghe, D., Blomme, T., Van Hulle, S. W. H., & Rousseau, D. P. L. (2020). Experimental assessment and mathematical modelling of the growth of Chlorella vulgaris under photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Water Research*, *184*, 116152.

Marchello, A. E., Oliveira, N. L., Lombardi, A. T., & Polpo, A. (2018). An investigation onto Cd toxicity to freshwater microalga Chlorella sorokiniana in mixotrophy and photoautotrophy: A Bayesian approach. *Chemosphere*, *211*, 794-803.

Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology advances*, *31*(8), 1532-1542.

Martinez, M. E., Camacho, F., Jiménez, J. M., & Espínola, J. B. (1997). Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of Chlorella pyrenoidosa mixotrophic growth. *Process Biochemistry*, *32*(2), 93-98.

Matos, Â. P. (2017). The impact of microalgae in food science and technology. Journal of the American Oil Chemists' Society, 94(11), 1333-1350.

McGinn, P. J., Dickinson, K. E., Bhatti, S., Frigon, J. C., Guiot, S. R., & O'Leary, S. J. (2011). Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations. *Photosynthesis research*, *109*(1), 231-247.

Metting, F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of industrial microbiology*, *17*(5), 477-489.

Miao, M. S., Yao, X. D., Shu, L., Yan, Y. J., Wang, Z., Li, N., ... & Kong, Q. (2016). Mixotrophic growth and biochemical analysis of Chlorella vulgaris cultivated with synthetic domestic wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *113*, 120-125.

Miron, A. S., Garcıa, M. C. C., Camacho, F. G., Grima, E. M., & Chisti, Y. (2002). Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and microbial technology*, *31*(7), 1015-1023.

Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource technology*, *155*, 330-333.

Mohsenpour, S. F., Richards, B., & Willoughby, N. (2012). Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresource technology*, *125*, 75-81.

Mondal, M., Ghosh, A., Sharma, A. S., Tiwari, O. N., Gayen, K., Mandal, M. K., & Halder, G. N. (2016). Mixotrophic cultivation of Chlorella sp. BTA 9031 and Chlamydomonas sp. BTA 9032 isolated from coal field using various carbon sources for biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, *124*, 297-304.

Mondal, M., Ghosh, A., Tiwari, O. N., Gayen, K., Das, P., Mandal, M. K., & Halder, G. (2017). Influence of carbon sources and light intensity on biomass and lipid production of Chlorella sorokiniana BTA 9031 isolated from coalfield under various nutritional modes. *Energy Conversion and Management*, *145*, 247-254.

Mourelle, M. L., Gómez, C. P., & Legido, J. L. (2017). The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. *Cosmetics*, *4*(4), 46.

Mulders, K. J., Lamers, P. P., Martens, D. E., & Wijffels, R. H. (2014). Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *Journal of phycology*, *50*(2), 229-242.

Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of applied phycology*, *12*(3), 527-534.

Nair, A., & Chakraborty, S. (2020). Synergistic effects between autotrophy and heterotrophy in optimization of mixotrophic cultivation of Chlorella sorokiniana in bubble-column photobioreactors. *Algal Research*, *46*, 101799.

Neori, A. (2011). "Green water" microalgae: the leading sector in world aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, *23*(1), 143-149.

Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular engineering*, *20*(4-6), 459-466.

Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., Aremu, A. O., Okem, A., Lovász, C., ... & van Staden, J. (2016). Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three Chlorella strains. Algal Research, 16, 141-149.

Palabiyik, I., Durmaz, Y., Öner, B., Toker, O. S., Coksari, G., Konar, N., & Tamtürk, F. (2018). Using spray-dried microalgae as a natural coloring agent in chewing gum: effects on color, sensory, and textural properties. Journal of applied phycology, 30(2), 1031-1039.

Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource technology*, *244*, 1216-1226.

Pandit, P. R., Fulekar, M. H., & Karuna, M. S. L. (2017). Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in Acutodesmus obliquus and Chlorella vulgaris. Environmental Science and Pollution Research, 24(15), 13437-13451.

Park, W. K., Moon, M., Kwak, M. S., Jeon, S., Choi, G. G., Yang, J. W., & Lee, B. (2014). Use of orange peel extract for mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris: increased production of biomass and FAMEs. *Bioresource technology*, *171*, 343-349.

Patel, A. K., Joun, J. M., Hong, M. E., & Sim, S. J. (2019). Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae. *Bioresource technology*, *282*, 245-253.

Pazourek, J. (2014). Fast separation and determination of free myo-inositol by hydrophilic liquid chromatography. Carbohydrate research, 391, 55-60.

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, *45*(1), 11-36.

Pirinç, P., & Durmaz, Y. (2017). Effect of LED Light Color on Growth Rates and Pigments Compositions of Tetraselmis chuii and Chlorella sp. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, *2*(1), 15-18.

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

Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., & Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO2 addition of microalgae Chlorella sorokiniana. *Algal research*, *28*, 192-199.

Rai, M. P., Nigam, S., & Sharma, R. (2013). Response of growth and fatty acid compositions of Chlorella pyrenoidosa under mixotrophic cultivation with acetate and glycerol for bioenergy application. *biomass and bioenergy*, *58*, 251-257.

Rana, M. S., & Prajapati, S. K. (2021). Stimulating effects of glycerol on the growth, phycoremediation and biofuel potential of Chlorella pyrenoidosa cultivated in wastewater. *Environmental Technology & Innovation*, *24*, 102082.

Ren, H., Tuo, J., Addy, M. M., Zhang, R., Lu, Q., Anderson, E., ... & Ruan, R. (2017). Cultivation of Chlorella vulgaris in a pilot-scale photobioreactor using real centrate wastewater with waste glycerol for improving microalgae biomass production and wastewater nutrients removal. *Bioresource technology*, *245*, 1130-1138.

Rincon, S. M., Romero, H. M., Aframehr, W. M., & Beyenal, H. (2017). Biomass production in Chlorella vulgaris biofilm cultivated under mixotrophic growth conditions. *Algal research*, *26*, 153-160.

Rocha, R. J., Ribeiro, L., Costa, R., & Dinis, M. T. (2008). Does the presence of microalgae influence fish larvae prey capture?. *Aquaculture research*, *39*(4), 362-369.

Rodriguez-Ruiz, J., Belarbi, E. H., Sanchez, J. L. G., & Alonso, D. L. (1998). Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. Biotechnology techniques, 12(9), 689-691.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *35*, 265-278.

Salati, S., D'Imporzano, G., Menin, B., Veronesi, D., Scaglia, B., Abbruscato, P., ... & Adani, F. (2017). Mixotrophic cultivation of Chlorella for local protein production using agro-food by-products. *Bioresource technology*, *230*, 82-89.

Sanchez, S., Martínez, M., Espejo, M. T., Pacheco, R., Espinola, F., & Hodaifa, G. (2001). Mixotrophic culture of Chlorella pyrenoidosa with olive-mill wastewater as the nutrient medium. Journal of applied phycology, 13(5), 443-449.

Sasi, D., Mitra, P., Vigueras, A., & Hill, G. A. (2011). Growth kinetics and lipid production using Chlorella vulgaris in a circulating loop photobioreactor. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 86(6), 875-880.

Satyanarayana, K. G., Mariano, A. B., & Vargas, J. V. C. (2011). A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of energy research*, *35*(4), 291-311.

Schwartz, R. M., & Dayhoff, M. O. (1978). Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science*, *199*(4327), 395-403.

Seppala, A., Turunen, K., & Yazdani, M. R. (2022). Thermal conductivity of sugar alcohols. Solar Energy Materials and Solar Cells, 243, 111796.

Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., & Amini Khoeyi, Z. (2011). Protein, fatty acid, and pigment content of Chlorella vulgaris under different light regimes. Journal of Applied Phycology, 23(4), 721-726.

Sforza, E., Cipriani, R., Morosinotto, T., Bertucco, A., & Giacometti, G. M. (2012). Excess CO2 supply inhibits mixotrophic growth of Chlorella protothecoides and Nannochloropsis salina. *Bioresource technology*, *104*, 523-529.

Shi, T. Q., Wang, L. R., Zhang, Z. X., Sun, X. M., & Huang, H. (2020). Stresses as first-line tools for enhancing lipid and carotenoid production in microalgae. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *8*, 610.

Shi, X. M., & Chen, F. (1999). Production and rapid extraction of lutein and the other lipid-soluble pigments from Chlorella protothecoides grown under heterotrophic and mixotrophic conditions. *Food/Nahrung*, *43*(2), 109-113.

Sim, S. J., Joun, J., Hong, M. E., & Patel, A. K. (2019). Split mixotrophy: A novel cultivation strategy to enhance the mixotrophic biomass and lipid yields of Chlorella protothecoides. *Bioresource technology*, *291*, 121820.

Sinetova, M. A., Sidorov, R. A., Medvedeva, A. A., Starikov, A. Y., Markelova, A. G., Allakhverdiev, S. I., & Los, D. A. (2021). Effect of salt stress on physiological parameters of microalgae Vischeria punctata strain IPPAS H-242, a superproducer of eicosapentaenoic acid. Journal of Biotechnology, 331, 63-73.

Singh, R. K., Tiwari, S. P., Rai, A. K., & Mohapatra, T. M. (2011). Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *The Journal of antibiotics*, *64*(6), 401-412.

Sirakov, I., Velichkova, K., Stoyanova, S., & Staykov, Y. (2015). The importance of microalgae for aquaculture industry. Review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, *2*(4), 81-84.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, *101*(2), 87-96.

Teo, C. L., Atta, M., Bukhari, A., Taisir, M., Yusuf, A. M., & Idris, A. (2014). Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource technology*, *162*, 38-44.

Trivedi, T., Jain, D., Mulla, N. S., Mamatha, S. S., Damare, S. R., Sreepada, R. A., ... & Gupta, V. (2019). Improvement in biomass, lipid production and biodiesel properties of a euryhaline Chlorella vulgaris NIOCCV on mixotrophic cultivation in wastewater from a fish processing plant. *Renewable energy*, *139*, 326-335.

URL-1. Royal Society of Chemistry. İnositol, http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10239179.html Erişim tarihi; 16/01/2023

URL-2. National Library of Medicine. Inositol, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Inositol Erişim tarihi; 16/01/2023

UTEX (2009). BG-11 medium recipe. Url:https://utex.org/products/bg-11-medium?variant=30991786868826. Erişim tarihi:15.12.2022

Van Wagenen, J., De Francisci, D., & Angelidaki, I. (2015). Comparison of mixotrophic to cyclic autotrophic/heterotrophic growth strategies to optimize productivity of Chlorella sorokiniana. *Journal of Applied Phycology*, *27*(5), 1775-1782.

Vazquez-Levin, M. H., & Veron, G. L. (2020). Myo-inositol in health and disease: its impact on semen parameters and male fertility. Andrology, 8(2), 277-298.

Vijayakumar, S., & Menakha, M. (2015). Pharmaceutical applications of cyanobacteria—A review. *Journal of Acute Medicine*, *5*(1), 15-23.

Wan, M., Jin, X., Xia, J., Rosenberg, J. N., Yu, G., Nie, Z., ... & Betenbaugh, M. J. (2014). The effect of iron on growth, lipid accumulation, and gene expression profile of the freshwater microalga Chlorella sorokiniana. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*(22), 9473-9481.

Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Betenbaugh, M. J., ... & Qiu, G. (2011). The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in Chlorella sorokiniana. *Applied microbiology and biotechnology*, *91*(3), 835-844.

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

Wang, Q., Yu, Z., & Wei, D. (2020). High-yield production of biomass, protein and pigments by mixotrophic Chlorella pyrenoidosa through the bioconversion of high ammonium in wastewater. *Bioresource technology*, *313*, 123499.

Wang, Q., Yu, Z., Wei, D., Chen, W., & Xie, J. (2021). Mixotrophic Chlorella pyrenoidosa as cell factory for ultrahigh-efficient removal of ammonium from catalyzer wastewater with valuable algal biomass coproduction through short-time acclimation. *Bioresource Technology*, *333*, 125151.

Wang, X., Zhang, M. M., Sun, Z., Liu, S. F., Qin, Z. H., Mou, J. H., ... & Lin, C. S. K. (2020). Sustainable lipid and lutein production from Chlorella mixotrophic fermentation by food waste hydrolysate. *Journal of Hazardous Materials*, *400*, 123258.

Wang, Y., Chen, T., & Qin, S. (2013). Differential fatty acid profiles of Chlorella kessleri grown with organic materials. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 88(4), 651-657.

Wang, Y., Rischer, H., Eriksen, N. T., & Wiebe, M. G. (2013). Mixotrophic continuous flow cultivation of Chlorella protothecoides for lipids. *Bioresource Technology*, *144*, 608-614.

Widjaja, A., Chien, C. C., & Ju, Y. H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *40*(1), 13-20.

Wong, Y. K., Ho, K. C., Tsang, Y. F., Wang, L., & Yung, K. K. L. (2016). Cultivation of Chlorella vulgaris in column photobioreactor for biomass production and lipid accumulation. Water Environment Research, 88(1), 40-46.

Xie, Y., Li, J., Ho, S. H., Ma, R., Shi, X., Liu, L., & Chen, J. (2020). Pilot-scale cultivation of Chlorella sorokiniana FZU60 with a mixotrophy/photoautotrophy two-stage strategy for efficient lutein production. *Bioresource technology*, *314*, 123767.

Xie, Y., Li, J., Ma, R., Ho, S. H., Shi, X., Liu, L., & Chen, J. (2019). Bioprocess operation strategies with mixotrophy/photoinduction to enhance lutein production of microalga Chlorella sorokiniana FZU60. *Bioresource technology*, *290*, 121798.

Xie, Z., Lin, W., Liu, J., & Luo, J. (2020). Mixotrophic cultivation of Chlorella for biomass production by using pH-stat culture medium: Glucose-Acetate-Phosphorus (GAP). *Bioresource Technology*, *313*, 123506.

Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., & Takriff, M. S. (2014). An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, *21*(1), 1-10.

Yan, C., Wang, Z., Wu, X., Wen, S., Yu, J., & Cong, W. (2020). Outdoor cultivation of Chlorella sp. in an improved thin-film flat-plate photobioreactor in desertification areas. Journal of bioscience and bioengineering, 129(5), 619-623.

Yan, C., Zhao, Y., Zheng, Z., & Luo, X. (2013). Effects of various LED light wavelengths and light intensity supply strategies on synthetic high-strength wastewater purification by Chlorella vulgaris. *Biodegradation*, *24*(5), 721-732.

Yan, N., Fan, C., Chen, Y., & Hu, Z. (2016). The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *International journal of molecular sciences*, *17*(6), 962.

Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2011). Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga Chlorella vulgaris ESP-31: implications for biofuels. Biotechnology Journal, 6(11), 1358-1366.

Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga Chlorella vulgaris ESP-31. *Bioresource technology*, *105*, 120-127.

Yeh, K. L., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2012). pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous Chlorella vulgaris ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. *Biochemical engineering journal*, *64*, 1-7.

Zarrouk, C. (1966). Contribution a l'etude d'une Cyanophycee. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthese de Spirulina mixima. Thesis. University of Paris, France.

Zhang, Z., Gao, P., Guo, L., Wang, Y., She, Z., Gao, M., ... & Wang, G. (2020). Elucidating temperature on mixotrophic cultivation of a Chlorella vulgaris strain: different carbon source application and enzyme activity revelation. *Bioresource Technology*, *314*, 123721.

Zhu, S., Wang, Y., Shang, C., Wang, Z., Xu, J., & Yuan, Z. (2015). Characterization of lipid and fatty acids composition of Chlorella zofingiensis in response to nitrogen starvation. Journal of bioscience and bioengineering, 120(2), 205-209.

Zou, N., & Richmond, A. (1999). Effect of light-path length in outdoor fiat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in Nannochloropsis sp. In *Progress in Industrial Microbiology* (Vol. 35, pp. 351-356). Elsevier.

Zou, N., & Richmond, A. (2000). Light-path length and population density in photoacclimation of Nannochloropsis sp.(Eustigmatophyceae). *Journal of Applied Phycology*, *12*(3), 349-354.

Zuluaga, M., Gueguen, V., Pavon-Djavid, G., & Letourneur, D. (2017). Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. *BioImpacts: BI*, *7*(1), 1.