

Nemrut Krater Gölü'nden (Bitlis/Türkiye) İzole Edilen *Chlorella* sp. Mikroalgında H₂O₂ Uygulaması ile Triaçilgliserol Üretimini Artırılması

Emine SELÇUKⁱⁿ, Turgay ÇAKMAK^{in*}

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul.

*Sorumlu Yazar: turgay.cakmak@medeniyet.edu.tr

Araştırma Makalesi

Geliş 05 Ocak 2019; Kabul 22 Nisan 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: Selçuk, E., & Çakmak, T. (2019). Nemrut Krater Gölü'nden (Bitlis/Türkiye) izole edilen *Chlorella* sp. mikroalgında H₂O₂ uygulaması ile triaçilgliserol üretimini artırılması. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 280-288. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.508780>

Özet

Bu çalışmada Nemrut Volkanik Gölü'nden izole edilen bir *Chlorella* sp. mikroalgında oksidatif stresin düzeyine bağlı olarak triaçilgliserol miktarında ve formasyonundaki değişiklikler incelenmiştir. Bu amaçla mikroalgelerde oksidatif stresi uyarmak için büyüme ortamlarına 1µM, 5µM, ve 20µM yoğunluklarda hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulanmıştır. Hidrojen peroksit uygulaması ilk günden itibaren büyümede önemli düzeyde baskılanmaya sebep olmuştur. Uygulamanın ilk 5 gününde büyümedeki baskılanma artmış, takip eden günlerde 1µM ve 5µM H₂O₂ uygulanan gruplarda büyüme yeniden gelişmiş ve baskılanma kalkmıştır. Mikroalgelerin H₂O₂ içerikleri, uygulanan H₂O₂ yoğunluğu ile orantılı şekilde artmıştır. Mikroalgelerin klorofil ve karotenoid içerikleri H₂O₂ uygulanan gruplarda konsantrasyon ile doğru orantılı olarak ilk 24 saatte artmış, daha sonra da lineer olarak azalmıştır. Mikroalgelerin triaçilgliserol içerikleri özellikle 5µM H₂O₂ uygulamasına cevapta ilk 24 saatte yaklaşık olarak 2,1 kat artış ile en yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Floresans görüntüleme ile elde edilen sitoplazmik lipid cisimi üretimindeki artış da bu veriyi desteklemiştir. Böylece, bu çalışma ile elde edilen sonuçlar kısa süreli ve düşük yoğunlukta H₂O₂ uygulamasının mikroalglerden biyodizel hammaddesi olan triaçilgliserol üretiminde kullanılabilecek bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Chlorella*, H₂O₂, nötral lipid, oksidatif stres, triaçilgliserol.

Enhancement of Triacylglycerol Production via H₂O₂ Application in *Chlorella* sp. Isolated from Nemrut Crater Lake (Bitlis/Turkey)

Abstract

In this study, oxidative stress depended changes in lipid production and formation in *Chlorella* sp. was analyzed. The strain was isolated from Lake Nemrut which is a volcanic lake located in Bitlis province. In order to induce oxidative stress in microalgae 1µM, 5µM, and 20µM hydrogen peroxide (H₂O₂) were added into the growth media. Hydrogen peroxide application caused a significant decrease in growth starting from the first day of incubation. Following decrease of the growth for first five-days, microalgae started to grow up as a response to 1µM and 5µM H₂O₂ application. The H₂O₂ contents of microalgae increased in proportion to the applied H₂O₂ concentration. Total chlorophyll and carotenoid contents showed a gradual increase during first 24 hours of H₂O₂ application, and then a linear decrease was followed afterwards. A maximum of 2.1 fold increase in triacylclglyerole content of microalgae was recorded after 24 hours of 5µM H₂O₂ application. Fluorescence imaging of cytoplasmic lipid bodies support this datum. Thus, results of this study showed that short-term and low-density H₂O₂ application might be used as a potential approach to induce microalgal triacylglycerol production as a biodiesel feedstock.

Keywords: *Chlorella*, H₂O₂, neutral lipid, oxidative stress, triacylglycerol.

GİRİŞ

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

Mikroalglerin biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol üretim etkinliğinin artırılması üzerine şimdiye kadar yapılan çalışmalar çoğunlukla abiyotik stress faktörlerinin uygulanması ile büyümede baskılanmanın yanında nötral lipid üretiminde artışın sağlandığı çalışmalardır (Sharma vd., 2012). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda başlıca düşük sıcaklık (Elmoraghy vd., 2012), makroelement açlığı (Elibol Cakmak vd., 2014), mikroelement fazlalığı (Chen vd., 2011), tuzluluk (Mohan ve Devi, 2014), yüksek (He vd., 2015) ya da düşük ışık şiddeti (George vd., 2014), pH (Elibol Çakmak, 2018) ile azot kaynağındaki değişimin (Elibol Çakmak, 2019) çok sayıda mikroalg türünün nötral lipid üretiminin artırılması üzerine olumlu etkilerinin oluşu bildirilmiştir. Diğer taraftan abiyotik stress uygulamasının sebep olduğu büyümedeki baskılanma ile nötral lipid üretiminin mikroalglerde oluşan oksidatif stresin düzeyi ile doğrudan ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir (Solovchenko, 2012; Elibol Cakmak vd., 2015).

Literatürde bildirilen 10 farklı türle temsil edilen *Chlorella* (Chlorophyta) cinsi mikroalgler heterotrof, miksotrof ya da fotoototrof olarak yetiştirilebilmektedir ve biyodizel hammaddesi olarak kullanılan nötral lipid üretiminde biyoteknolojik olarak üretilebilme potansiyeli taşırlar (Petkov ve Garcia, 2007). *Chlorella* cinsi mikroalglerdeki lipid içeriğinin kuru ağırlığın %14-%63'ü oranında değişebildiği bildirilmiştir (Gouveia ve Oliveira, 2009; O'Grady ve Morgan, 2011). Nötral lipid üretiminin artırılması için yapılan stres uygulamaları bir yana özellikle evsel ve endüstriyel atıksularda diğer yeşil mikroalgere göre daha geniş bir yayılım gösteren *Chlorella* türlerinin oksidatif strese toleranslı oldukları ve bu bölgelerden izole edilen mikroalglerin biyodizel hammaddesi üretimi açısından daha etkili oldukları yönünde bulgular bildirilmiştir (Osundeko vd., 2013; Sibi vd., 2016).

Hidrojen peroksit alglerde çoğunlukla fotosentez ve solunum esnasında normal olarak hücre içerisinde üretilen, ancak aşırı birikmesi durumunda çok sayıda metabolik faaliyeti sekteye uğratan ve oksidatif hasara sebep olabilen güçlü bir oksidanttır (Mallick ve Mohn, 2000). Bu çalışmada, Bitlis il sınırları içerisinde bulunan volkanik bir göl olan Nemrut Gölünden izole edilen *Chlorella* sp. mikroalginde artan yoğunluklarda hidrojen peroksit uygulaması ile mikroalglerde oluşturulan oksidatif stresin düzeyine bağlı olarak lipid miktarında ve formasyonundaki değişiklikler incelenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Türün İzolasyonu, Tanımlanması ve Büyütme Koşulları

Chlorella sp. mikroalgi Bitlis ilinde bulunan bir volkanik göl olan Nemrut Krater Gölünden (42°15'25"N 38°31'11"E), izole edilmiştir. *Chlorella* sp. türü morfolojik (Bellinger ve Sigeo, 2015) tanımlamanın yanı sıra 18S rRNA geninin sekans analizi yapılarak da teşhis edilmiştir. Bu amaçla PCR'la çoğaltılan genomik DNA parçasının sekans analizi (Hoham vd., 2002)'e göre yapılmıştır. Tür tanımlama amacıyla DNA çoğaltımı ve Sanger sekans analizi için ileri 5'-TGATCCTTCYGCAGGTTAC-3' ve geri: 5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3' birbirini takip eden primerler kullanılmıştır. Sekans sonucu elde edilen sonuçlar NCBI-BLAST programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada mikroalgler içerisinde 0,25g/L NaNO₃, 0,18g/L KH₂PO₄, 0,075g/L MgSO₄.7H₂O, 0,025 g/L CaCl₂.2H₂O, 0,075g/L K₂HPO₄, 0,0025g/L NaCl, 0,1g/L Na₂EDTA, 0,05g/L FeSO₄.7H₂O, 0,1g/L H₃B₃, 18,1 mg/L MnCl₂.4H₂O, 2,22 mg/L ZnSO₄.7H₂O, 3,9mg/L Na₂MoO₄.2H₂O, 0,8mg/L CuSO₄.5H₂O, ve 0,5mg/L Co(NO₃)₂.6H₂O bulunan ve pH'sı 6,8'e ayarlanmış olan Bold's Basal Medium büyütme ortamında kültüre alınmışlardır (Bischoff ve Harold, 1963). Çalışma için mikroalgler dört gruba ayrılmıştır. İçerisinde 100ml hacimde 0, 1µM, 5µM, ve 20µM H₂O₂ ilave edilmiş olan BBM çözeltilisi bulunan 250ml'lik erlenlerde kültüre alınan mikroalglerin büyüme hızları 120 rpm devir hızında 26°C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 250 µE/(m²/s) sürekli ışık altında 12 gün boyunca takip edilmiş, inkübasyondan 2, 8, 24, 48 ve 72 saat sonra hasat edilen örnekler belirlenen analizler için kullanılmıştır. Mikroalglerin büyümelerinde meydana gelen değişiklikler her 24 saatte bir optik yoğunluğa göre 680nm dalga boyunda belirlenen absorbans değişimleri esas alınarak takip edilmiştir.

Mikroalglerin İçerdikleri H₂O₂ Yoğunluğunun Belirlenmesi

Mikroalglerdeki H₂O₂ miktarının tayini (Shin vd., 2005)'e göre Amplex Red Hydrogen Peroxide/ Peroxidase Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için 100mg mikroalg örneğinin üzerine 150µl fosfat tamponu (20 mM KH₂PO₄, pH 7.4) ilave edilmiş, 2dk

boyunca sonikasyon ile hücrelerin parçalanması sağlanmış ve 12000 xg devir hızında 5dk boyunca 4°C’de santrifüjlenerek elde edilen süpernatant örnekleri kullanılmıştır.

Toplam Klorofil ve Toplam Karotenoidlerin Spektrofotometrik Tayini

Mikroalglerin içerdikleri toplam klorofil ve karotenoid miktarı (Jeffrey ve Humphrey, 1975)‘den modifiye edilerek spektrofotometrik metodla belirlenmiştir. Tayin için 100g mikroalg örneği üzerine 500 µl %90’lık aseton ilave edilerek 15 dk boyunca karıştırılmış ve 10000 xg devir hızında 5 dk boyunca 4°C’de santrifüj edilmiş, 250µl süpernatant 96 kuyucuklu plağa yüklenmiştir. Süpernatant absorpsiyonları sırasıyla 750, 664, 647, 470 ve 630 nm’dalga boylarında %90’lık aseton körüne karşı okunmuştur. Toplam klorofil ve karotenoid miktarları (Jeffrey ve Humphrey, 1975) tarafından bildirilen denklemler kullanılarak hesaplanmış olup toplam klorofil sonuçları klorofil a ve b’nin toplamı olarak sunulmuştur.

Sitoplazmik Lipid Cisimlerinin Floresans Görüntülenmesi

Mikroalglerde oluşan sitoplazmik lipid cisimlerinin görüntülenmesi amacıyla mikroalgler (Elsev vd., 2007) tarafından tarif edildiği şekilde Nil kırmızısı ile boyanmıştır. Buna göre, 680nm dalga boyunda yapılan ölçüme göre alınarak absorpsiyon değerleri 0,2-0,3 aralığında seyreltilmiş olan 1 ml hacimde mikroalg örneklerinin içerisine 5µg/ml Nil kırmızısı (Invitrogen) ilave edilmiş ve mutlak karanlıkta 15dk boyunca oda şartlarında hafif şekilde çalkalanmak suretiyle karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında örneklerin floresans görüntüleri TXRED (560nm ex-630nm em) filtresi ile floresans mikroskop sistemi (Zeiss AXIO Imager M2) kullanılarak elde edilmiştir.

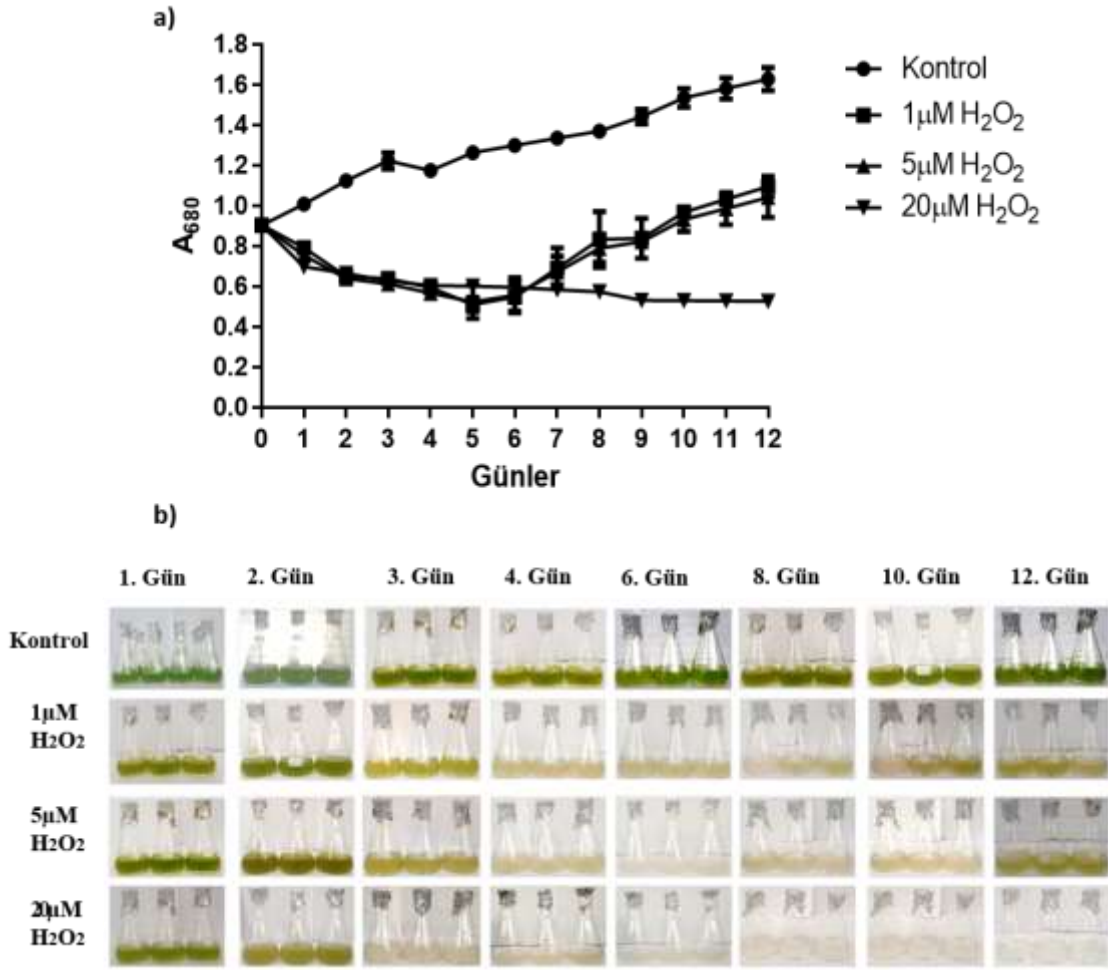
FT-IR analizi ile Triaçilgliserollerin miktarsal tayini

Mikroalglerin ürettikleri triaçilgliserollerin (TAG) miktarsal tayinleri Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR) analizi ile nisbi olarak belirlenmiştir. Ölçüm için 50mg liyofilize edilmiş mikroalg örnekleri pens yardımıyla doğrudan ATR modülü ile desteklenmiş FT-IR (PerkinElmer-L160000A, USA) cihazının örnek modülüne yerleştirilmiştir. Numune alıcısının kızılötesi spektrumu, 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında 128 tarama ile kaydedilmiştir. FTIR analizinde çevresel koşullardan fazla etkilenmeyen absorpsiyon bandı olan Amid 1 (1652 cm⁻¹) değeri doğrulama değeri olarak seçilmiştir. Böylece, trigliseritlerin ester grubunun (C=O) titreşimi (1744 cm⁻¹) ile verdiği absorpsiyon değerinin Amid 1 değerlerine oranlanarak mikroalglerdeki triaçilgliserol konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikler tespit edilmiştir (Mairet vd., 2011). Daha sonra H₂O₂ uygulanan mikroalglerden elde edilen TAG/Amid 1 oranları, H₂O₂ uygulanmayan kontrol grubu ile elde edilen TAG/Amid 1 oranına bölünerek mikroalglerin TAG içeriklerinde meydana gelen nisbi değişim “-n katı değişim” olarak grafiklendirilmiştir.

Bu çalışmada deney iki farklı zamanda 3 biyolojik tekrar kullanılarak yürütülmüş ve elde edilen verilerin ortalamaları sunulmuştur. Değerler arasındaki istatistiksel farklılıklar ikinci dereceden iki kuyruklu student t-test uygulaması kullanılarak değerlendirilmiş, %95 veya daha yüksek oranda farklı olduğu belirlenen veriler önemli bulgular olarak değerlendirilmiştir.

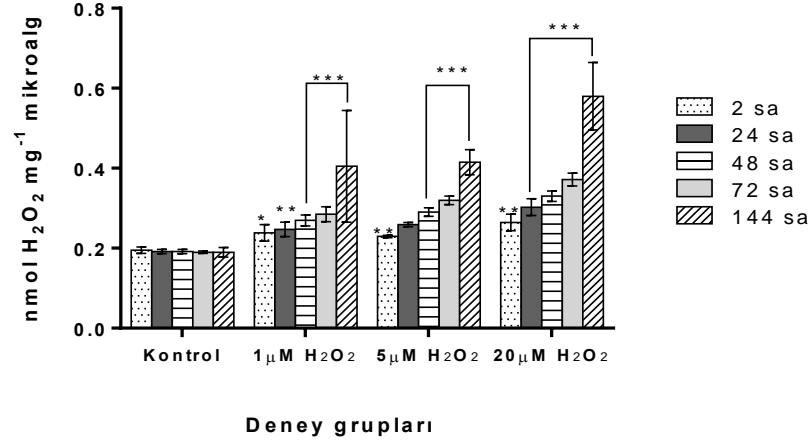
BULGULAR

Herhangi bir stres faktörü uygulandığında mikroalglerin büyümelerinde meydana gelen değişim, stresin şiddeti hakkında bir fikir verebilir. Bu çalışmada mikroalglerin büyümesi ortama 1, 5 veya 20µM H₂O₂ ilave edildiğinde ilk gün sırasıyla yaklaşık %21, %25 ve %31 oranında baskılanmıştır (Şekil 1). Büyümedeki baskılanma zamana bağlı olarak artmış ve 5. günün sonunda büyümedeki baskılanma sırasıyla %59, %60 ve % 62 olarak belirlenmiş, bu süreden sonra 1 ve 5µM H₂O₂ ilave edilmiş olan grupta yeniden büyüme gerçekleşmeye başlamış ve hatta büyüme hızlanmıştır. Büyümedeki baskılanma 1 ve 5µM H₂O₂ uygulanan gruplarda 12 günlük inkübasyonun sonunda %32 ve %36 düzeylerinde iken 20µM H₂O₂ uygulanmış olan grupta büyümedeki baskılanma lineer olarak artmış ve %68 ile en yüksek değere ulaşmıştır (Şekil 1a,b).



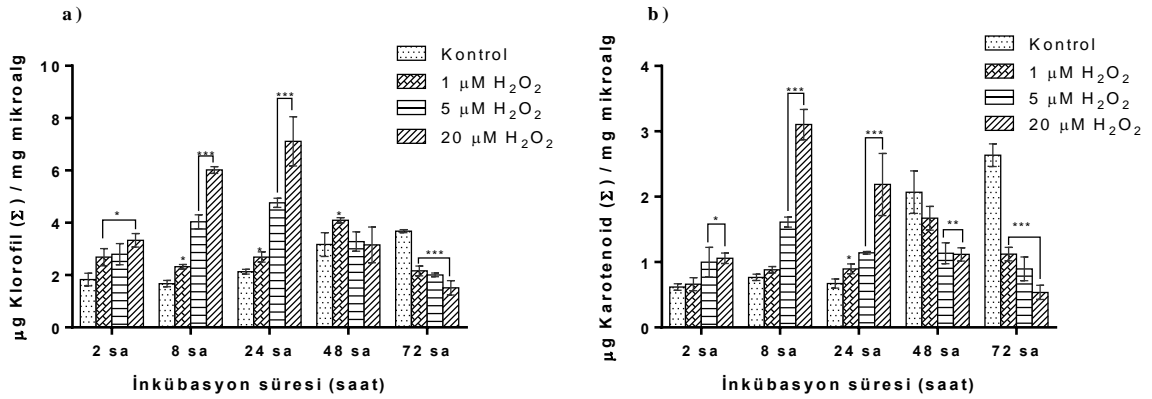
Şekil 1. Artan yoğunluklarda H₂O₂ uygulanan mikroalglerin büyümelerinde meydana gelen değişimi gösteren a) Absorbans ölçümleri ile b) erlen görüntüleri

Mikroalglerin büyümelerindeki baskılanma ilk 5 günlük inkübasyonun sonunda 1µM ve 5µM uygulamalarda en yüksek düzeylere çıkmış, 20µM H₂O₂ uygulanan grupta da bu süreden sonra durağan bir seyir izlenmiştir. Bu sebeple takip eden analizler 5 gün boyunca hasat edilen örnekler kullanılarak yürütülmüştür. Mikroalglerin hücrel H₂O₂ içerikleri ortama uygulanan H₂O₂ konsantrasyonları ile doğru orantı göstermiştir (Şekil 2). Ortam H₂O₂ yoğunluğu arttığında mikroalglerdeki H₂O₂ konsantrasyonu da yüksek değerde bulunmuştur. İnkübasyonun ilk gününde 1µM, 5µM ve 20µM H₂O₂ uygulanan türlerde kontrole kıyasla sırasıyla %22, %18 ve %36 düzeylerinde daha yüksek olarak belirlenen hücrel H₂O₂ konsantrasyonları 5 günlük inkübasyon periyodunun sonunda sırasıyla %113, %119 ve %205 oranında daha yüksek değerler olarak belirlenmiştir.



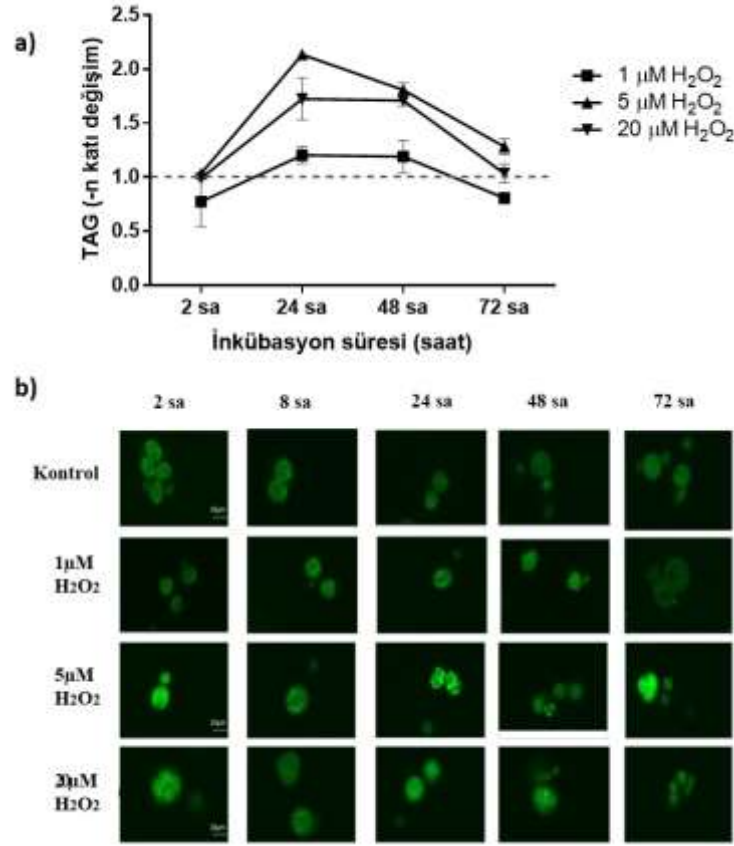
Şekil 2. Mikroalglerin H₂O₂ içeriklerinde zamana bağlı olarak meydana gelen değişim

Mikroalglerin toplam klorofil içerikleri H₂O₂ uygulamasına cevapta ilk 24 saatte artmış, daha sonra önemli oranda azalmıştır (Şekil 3a). H₂O₂ uygulamasından sonraki ilk iki saat içerisinde 1, 5 ve 20 uM H₂O₂ uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %49, %52 ve %81 oranında artış belirlenmiş ve bu artışlar 24 saatin sonunda sırasıyla yaklaşık olarak %26, %123 ve %233 oranlarında artışlar olarak kaydedilse de takip eden günlerde klorofil parçalanması sonucu toplam klorofil miktarında önemli oranda azalma gözlemlenmiştir. Mikroalglerin içerdikleri toplam klorofil miktarı 72 saatlik inkübasyonun sonunda 1, 5 ve 20uM H₂O₂ uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %41, %45 ve %58 oranında daha düşük olarak kaydedilmiştir.



Şekil 3. Mikroalglerin a) toplam klorofil ve b) toplam karotenoid içeriklerinde meydana gelen değişim

Mikroalglerdeki zamana ve H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak toplam klorofil miktarındaki değişime benzer sonuçlar alglerdeki karotenoid miktarındaki değişime paralellik göstermiştir (Şekil 3b). H₂O₂ uygulamasından sonraki ilk iki saat içerisinde 1, 5 ve 20 uM H₂O₂ uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %6, %46 ve %70 oranında artış belirlenmiş bu artışlar 24 saatin sonunda sırasıyla yaklaşık olarak %33, %69 ve %202 oranlarında artışlar olarak belirlense de takip eden günlerde önemli oranda azalma gözlemlenmiştir. Mikroalglerdeki toplam karotenoid miktarı 1, 5 ve 20uM H₂O₂ uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %57, %68 ve %79 oranında daha düşük olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4. Mikroalglerin a) TAG içeriklerinde meydana gelen nisbi değişim ve b) sitoplazmik lipid cisimlerinin floresans görüntüleri

Mikroalglerin triaçilgliserol içerikleri FT-IR analizi ile tayin edilmiştir. Genel olarak H₂O₂ uygulaması *Chlorella* sp. mikroalginin triaçilgliserol üretimi üzerine ilk 24 saatte en yüksek düzeye çıkarmıştır (Şekil 4). Mikroalglerin TAG içerikleri 1,5 µM ve 20 µM H₂O₂ uygulamasına cevapta ilk 24 saatin sonunda yaklaşık olarak sırasıyla 1,2- 2,1 ve 1,7 kat artmış, ancak daha sonra TAG içerikleri lineer düşüş sergilemiştir (Şekil 4a). Böylece TAG içeriğindeki en yüksek artış 5µM H₂O₂ uygulamasından 24 saat sonra belirlenmiştir. Diğer taraftan FT-IR ölçümleri ile elde edilen sonuçlar floresans boyama ile elde edilen görüntülerle uyumludur (Şekil 4b). İnkübasyondan sonraki ilk 8 saatte H₂O₂ stresi uygulanan hücrelerde lipid kesecikleri net bir şekilde görülmüştür. Özellikle 24 saat sonra 5µM H₂O₂ uygulamasında sitoplazmik lipid cisimlerinin oluşumu net bir şekilde artmıştır. 20µM yoğunlukta H₂O₂ uygulanan mikroalglerde zaman içerisinde hücresel bütünlük bozulmaya başlamıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Mikroalglerden biyodizel hammaddesi ve katma değeri yüksek ürün eldesi için uygulanan stresin şiddeti önemlidir. Bu çalışmada, H₂O₂ uygulaması ilk günden itibaren büyümede önemli düzeyde baskılanmaya sebep olmuştur (Şekil 1). Özellikle uygulamanın ilk 5 gününde büyümedeki baskılanma artmış, takip eden günlerde 1 µM ve 5 µM H₂O₂ uygulanan gruplarda büyüme yeniden gelişmiş ve baskılanma ortadan kalkmıştır. Düşük konsantrasyonda H₂O₂ değerinde hücreler hayatta kalabilecek kapasite gösterirken yüksek konsantrasyondaki H₂O₂ yoğunluğu hücrelerin muhtemelen yüksek oksidatif stres ile birlikte membran yapılarında bozulma meydana geldiği için 20µM olarak uygulanan grupta yeniden büyüme gerçekleşmemiş olabilir.

Doğal sularda H₂O₂ yoğunluğu 10µM'a kadar çıkabilmektedir (Cooper vd., 1988). Diğer taraftan artan H₂O₂ yoğunluğuna siyanobakterilere kıyasla ökaryot yapıda mikroalglerin 10 kat daha fazla dayanım gösterdikleri bildirilmiştir (Drábková vd., 2007). Aynı çalışmada 8µM H₂O₂ uygulamasına cevapta *Microcystis aereginosa* siyanobakterisinin büyümesindeki önemli baskılanmanın siyanobakterinin fotosentez verimindeki %50'lik düşüştan kaynaklandığı, *Pseudokirchneriella*

subcapitata yeşil mikroalginin büyümesinde görülen %15'lik baskılanmanın da yine bu algin fotosentez veriminde görülen %7'lik düşüşle doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (Drábková vd., 2007). Bununla birlikte (Mallick ve Mohn, 2000) yaptıkları çalışmada yeşil bir mikroalg olan *Chamydomonas sp.* türünün fizyolojik faaliyetlerinde 10µM H₂O₂ uygulamasına cevapta önemli bir değişim görülmemesini, bu mikroalgde bulunan tiol-modüle enzimlerin H₂O₂'ye karşı hassas olmamasından dolayı mikroalgin fotosentez sistemindeki dayanımdan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada mikroalglerin içerdikleri H₂O₂ konsantrasyonları zamana ve uygulanan H₂O₂ yoğunluğuna paralel bir artış sergilemiştir (Şekil 2). Böylece, ortam H₂O₂ yoğunluğundaki artış mikroalglerde doğrudan oksidatif strese sebep olan bir faktör olarak değerlendirilmiştir. Öte yandan mikroalglerin toplam klorofil ve karotenoid içerikleri H₂O₂ uygulanan gruplarda konsantrasyon ile doğru orantılı olarak ilk 24 saatte artmış, daha sonra da azalmıştır (Şekil 3). Benzer şekilde (Choo vd., 2004) yeşil mikroalglerden *Cladophora glomerata* ve *Enteromorpha ahlneriana*'da oksidatif strese verilen akut cevapta ilk olarak klorofil ve karotenoid üretimindeki artışın önemli olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan *Chlorella sp.* mikroalginin özellikle ilk 24 saatlik inkübasyon süresi içerisinde karşılaştığı oksidatif strese cevapta fotosentez mekanizmaları hücrel redoks dengesinin sağlanmasında başlıca rol oynamış olabilir.

Hücrel redoks homeostazisini bozan olağan dışı stres koşullarına cevapta mikroalgler tarafından TAG sentezlendiği çok sayıda çalışma ile rapor edilmiştir (Zemke vd., 2010; Xin vd., 2018). Bu çalışmada hidrojen peroksit uygulaması ilk 24 saatlik inkübasyonda mikroalglerin TAG içeriklerini istatistiksel olarak önemli oranda artırmıştır. FT-IR analizi ile belirlenen TAG içeriklerindeki değişim 24 saatin sonunda özellikle 5µM H₂O₂ uygulamasında yaklaşık olarak ,1 kat ile en yüksek düzeyde artış olarak kaydedilmiştir (Şekil 4a). Mikroalglerin Nil kırmızısı ile boyanması ile elde edilen floresans görüntüleri de FT-IR ile elde edilen verileri desteklemekte, mikroalglerin sitoplazmik lipid cisimcikleri üretiminin özellikle 5µM H₂O₂ uygulamasının ilk 24 saat içerisinde tetiklediğini göstermiştir (Şekil 4b). Triaçilgliseroller alglerde fotosentez sisteminin düzenlenmesinde önemli biyokimyasal roller üstlenen uzun zincirli yağ asitlerinin üretilmesi için başlıca kaynaktır (Sharma vd., 2012). Yine TAG üretimi oksidatif strese maruz kalan alglerde fotosentez sonucu üretilen enerjinin depo edilebilmesi için çok uygun bir yoldur (Yilancioglu vd., 2014). Son olarak sitoplazmik lipid cisimcikleri şeklinde depo edilen TAG'lerin alglerde fotosentez sisteminin aşırı yüklenmesini engellemek adına ışığı adeta geri yansıtan bir optik koruyucu olarak rol oynayabilecekleri bildirilmiştir (Solovchenko, 2012). Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen sonuçlar, varsayılan 72500 tür (Guiry, 2012) ile temsil edilen alg dünyasında biyodizel hammaddesi olarak TAG üretim etkinliği belirlenecek olan mikroalglerin seçiliminde doğrudan oksidatif stres uyarımının uygun bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

Yüksek yapıli bitkiler gibi ökaryot yapıda olan mikroalglerin depoladıkları ve büyük oranda TAG'lerden teşkil olan nötral lipidlerin biyodizel hammaddesi olarak kullanıma elverişli olmaları bu organizmaları fosil yakıtlara bağımlılığın azaltılabilmesi açısından biyoteknolojik olarak üstün kılmaktadır. Bu çalışmada Nemrut Gölünden izole edilen bir mikroalg olan *Chlorella sp.* türünde 5 µM H₂O₂ uygulamasının 24 saat içerisinde mikroalglerden biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol miktarını iki katın üzerine çıkarmıştır. Bu sayede düşük yoğunlukta H₂O₂ uygulamasının biyoteknolojik açıdan mikroalglerden biyodizel ve katma değeri yüksek ürün eldesinde değerlendirilebilecek uygun bir yaklaşım olduğu sonucuna varılmıştır.

Teşekkür: Bu çalışma, yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Bellinger, E. G., & Sigeo, D. C. (2015). *Freshwater algae: identification and use as bioindicators*: John Wiley & Sons.
- Bischoff, H., & Harold, C. B. (1963). *Some soil algae from enchanted rock and related algal species* (Vol. 1): University of Texas.
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T., Ng, K., & Salley, S. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 102(2), 1649-1655.
- Choo, K.-s., Snoeijs, P., & Pedersén, M. (2004). Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 298(1), 111-123.

- Cooper, W. J., Zika, R. G., Petasne, R. G., & Plane, J. M. (1988). Photochemical formation of hydrogen peroxide in natural waters exposed to sunlight. *Journal of Environmental Science and Technology*, 22(10), 1156-1160.
- Drábková, M., Admiraal, W., & Maršálek, B. (2007). Combined exposure to hydrogen peroxide and light selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Journal of Environmental Science and Technology*, 41(1), 309-314.
- Elibol Çakmak, Z., Olmez, T. T., Çakmak, T., Menemen, Y., & Tekinay, T. (2014). Induction of triacylglycerol production in *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparative analysis of different element regimes. *Bioresource Technology*, 155, 379-387.
- Elibol Çakmak, Z., Olmez, T. T., Çakmak, T., Menemen, Y., & Tekinay, T. (2015). Antioxidant response of *Chlamydomonas reinhardtii* grown under different element regimes. *Phycological Research*, 63(3), 202-211.
- Elibol Çakmak, Z. (2018). Meke Krater Gölü'nden (Konya/Türkiye) izole edilen *Dunaliella tertiolecta* mikroalginin nötral lipid içeriğine pH değişimlerinin etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 14(3), 220-231.
- Elibol Çakmak, Z. (2019). Ammonium nutrition induces triacylglycerol, β -carotene, and lutein production in *Dunaliella tertiolecta* Butcher. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(4), 331-342.
- Elmoraghy, M., Webster, T., & Farag, I. (2012). Microalgae lipid triggering by cooling stressing. *Journal of Energy and Power Engineering*, 6(12), 1918.
- Elsay, D., Jameson, D., Raleigh, B., & Cooney, M. J. (2007). Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 639-642.
- George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T., & Mishra, S. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*—A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology*, 171, 367-374.
- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 36(2), 269-274.
- Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? *Journal of phycology*, 48(5), 1057-1063.
- He, Q., Yang, H., Wu, L., & Hu, C. (2015). Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology*, 191, 219-228.
- Hoham, R., Bonome, T., Martin, C., & Leebens-Mack, J. (2002). A combined 18S rDNA and rbcL phylogenetic analysis of Chloromonas and Chlamydomonas (Chlorophyceae, Volvocales) emphasizing snow and other cold-temperature habitats. *Journal of phycology*, 38(5), 1051-1064.
- Jeffrey, S., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemistry Physiology Pflanzen*, 167(19), 1-194.
- Mairet, F., Bernard, O., Masci, P., Lacour, T., & Sciandra, A. (2011). Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis aff. galbana* under nitrogen limitation. *Bioresource Technology*, 102(1), 142-149.
- Mallick, N., & Mohn, F. H. (2000). Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology*, 157(2), 183-193.
- Mohan, S. V., & Devi, M. P. (2014). Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae. *Bioresource Technology*, 165, 288-294.
- O'Grady, J., & Morgan, J. A. (2011). Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(1), 121-125.
- Osundeko, O., Davies, H., & Pittman, J. K. (2013). Oxidative stress-tolerant microalgae strains are highly efficient for biofuel feedstock production on wastewater. *Biomass & Bioenergy*, 56, 284-294.
- Petkov, G., & Garcia, G. (2007). Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? *Journal of Biochemical Systematics and Ecology*, 35(5), 281-285.
- Sharma, K., Schuhmann, H., & Schenk, P. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532-1553.
- Shin, R., Berg, R. H., & Schachtman, D. P. (2005). Reactive oxygen species and root hairs in Arabidopsis root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Journal of Plant and Cell Physiology*, 46(8), 1350-1357.
- Sibi, G., Shetty, V., & Mokashi, K. (2016). Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels—A review. *Journal of the Energy Institute*, 89(3), 330-334.
- Solovchenko, A. J. R. j. o. p. p. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 167-176.
- Xin, Y., Shen, C., She, Y., Chen, H., Wang, C., Wei, L., & Xu, J. (2018). Biosynthesis of triacylglycerol molecules with tailored PUFA profile in industrial microalgae. *Molecular Plant*, 12 (4), 474-488.

- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., & Cetiner, S. (2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *Plos One*, 9(3).
- Zemke, P., Wood, B., & Dye, D. (2010). Considerations for the maximum production rates of triacylglycerol from microalgae. *Biomass & Bioenergy*, 34(1), 145-151.