

## Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: [www.dergipark.org.tr/ejbcsc](http://www.dergipark.org.tr/ejbcsc)



### Farklı besi ortamlarında yetişen *Chlorella vulgaris* türüne ait protein ve aminoasit kompozisyonunun karşılaştırılması

Merve Kavasbaşıoğlu<sup>1</sup>, Yaşar Aluç<sup>2\*</sup> , İlhami Tüzün<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Kırıkkale University, Faculty of Arts and Sciences, Biology Department, Kırıkkale, Türkiye

<sup>2</sup>Kırıkkale University Research and Application Center of Scientific and Technological Research., Kırıkkale, Türkiye

\*Corresponding author : [alucyasar@gmail.com](mailto:alucyasar@gmail.com)  
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-2650-2290>

Received : 05/05/2020  
Accepted : 25/12/2020

**Özet:** Kırıkkale Kapulukaya barajından izole edilen ve TAP (Tris-Acetate-Phosphate) besiyeri, Nitrat eklemeli TAP besiyeri (N-TAP), Kırıkkale Üniversitesi kampüs gölü (GÖL), Makina ve Kimya Endüstrisi Kurumu (MKEK) atık suyu olmak üzere 4 farklı besi ortamında yetiştirilen mikroalg *Chlorella vulgaris*'in büyüme parametreleri (hücre sayımı, optik yoğunluk ve Klorofil-*a*) takip edilmiştir.

Hızlı büyüme evresinde, besin tuzlarından azotun besi yeri konsantrasyonları tedrici olarak azalmasına rağmen, fosforun azalmayıp yatay şekilde değerler gösterdiği saptanmıştır. Alglerin kimyasal strateji olarak ortamda baskın bulunduğu düşünülen  $H_2PO_4^-$  formunun kullanılmasına öncelik verdiği bu formun tükenmesini takiben  $HPO_4^{2-}$  formunu (besi yerlerine göre MKEK ve GÖL için 8. gün, TAP ve N-TAP için 12. gün) kullanmaya başladıkları tahmin edilmektedir. Bu durum, mikroalglerin hücre kültürü süresince en iyi hayatta kalma yöntemlerini seçerken, makroelementler arasındaki dönüşümlere başvurduğu ve hasat sonunda nihai bir sonuç olarak ortaya çıktığı şeklinde değerlendirilmiştir. Makromoleküller arasındaki değişimler (FTIR analizi), besin tuzu (N veya P veya her ikisi aynı anda) açlığına dayalı stres koşullarının büyümeyi yavaşlattığına, buna karşın metabolik karbon ihtiyacının karbohidratlardan sağlandığına işaret etmiştir.

Hasatı gerçekleştirilen alglerin toplam protein miktarı sırasıyla; N-TAP (2.17 mg/BSA), TAP (1.96 mg/BSA), MKEK atık suyu (0.87 mg/BSA) ve GÖL besi ortamı (0.69 mg/BSA) olarak tespit edilmiştir. Tüm besi ortamlarında (HPLC analizi), Arjinin amino asidi en yüksektir. N-TAP ve TAP besi ortamlarında yetişen alglerin esansiyel ve esansiyel olmayan amino asit içerikleri yaklaşık 5 kat daha yüksektir. Çalışmada kullanılan atık su ve doğal su ortamları, N-TAP ve TAP besi yeri kontrol ortamlarıyla rekabet eder seviyede bulunmamıştır. Bunun sebebi, yeterli azot konsantrasyonlarına karşın fosforun sınırlayıcı rolünün daha belirgin olmasıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Mikroalg, *Chlorella vulgaris*, Amino asit, Protein, HPLC analizi

#### *Comparison of total protein and amino acid compositions of microalgae Chlorella vulgaris grown in different growth media*

**Abstract:** The microalgae species, *Chlorella vulgaris*, isolated from Kapulukaya Reservoir (Kırıkkale), were subjected to four different growth media, being (i) Tris-Acetate-Phosphate (TAP), (ii) Tris-Acetate-Phosphate enriched with N (N-TAP), (iii) Kırıkkale University Campus Lake Water (LW) and (iv) Waste Water from Mechanical and Chemical Industry Company (MKEK) in order to compare its growth by monitoring the parameters, cell count (CC), Optical density (OD) and Chlorophyll-*a* (Chl-*a*).

During the log phase, gradual decreases detected at nitrogen concentrations in all media except for N-riched medium (N-TAP) were not synchronously pronounced at phosphorus concentrations. This was speculated that  $H_2PO_4^-$ , being one of the two species of phosphorus acquired for growth, was used preferably until exhaustion, and then the other species  $HPO_4^{2-}$  was resorted to utilize on day 8 for MKEK and LW, and day 12 for TAP and N-TAP medium. When the differences on the respective amounts of macromolecules occurring as a results of different media and the algal growth on them were analysed, stress conditions due to either P or N starvation or both caused declines at growth but evoked the use of carbohydrates as a carbon source for metabolic demand.

Amounts of total protein measured on the harvested biomass were found to be 2,17 mg/BSA (N-TAP), 1,96 mg/BSA (TAP), 0,87 mg/BSA (MKEK) and 0,69 mg/BSA (LW), respectively. The amount of Arginine was profoundly higher amongst amino acids in all growth media. Both essential and non-essential amino acids were five-fold higher in N-TAP and TAP media compared to waste water (MKEK) and LW. This suggested a general conclusion that the used natural waters (MKEK and LW) were not compatible enough with the controlled media (TAP and TAP-N media) due mainly to that in natural waters phosphorus limited the growth despite efficient N levels.

**Keywords:** Microalgae, *Chlorella vulgaris*, Amino acid, Protein, HPLC analy

## 1. Giriş

Küresel nüfusun 2050 yılına kadar üçte bir oranında artması beklenmektedir. Bu hızlı nüfus yükselişi gıda üretimine olan ihtiyacın %70 artacağı anlamına gelmektedir. Bu yüksek artış ile birlikte gıda üretiminde yetersiz kaynak ve hammadde gibi bir takım sorunların oluşmasına neden olabileceği öngörülmüştür. Alternatif kaynaklara olan ihtiyacın, özellikle protein ihtiyacının kısa sürede tedarik edilmesi beklenen ana besinlerden olduğu bilinmektedir (Becker, 2007).

Tarımsal ürünlerden elde edilmekte olan proteinin, gelecekte, ekilebilir arazi daralması, sentetik gübrelerin neticesinde tatlı su ve denizel kirlilik (ötrofikasyon) vb. nedenlerden dolayı ihtiyacı karşılayamayacağı tahmin edilmektedir. Günümüzde, alg biyokütlesi, hayvan yemi ve biyoyakıt üretimi için potansiyel bir kaynak haline gelmiş ve mikroalgler en önemli alternatif protein kaynaklarından biri olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (Angel ve ark., 2016). Bazı deniz yosunu ve mikroalg türlerinin geleneksel protein kaynakları olan et, süt, yumurta, balık gibi gıdalarla benzer protein seviyeleri içermektedir (Angell, 2016). Su yosunlarının (algler), ek gıda üretimi veya diğer endüstriyel gıda, hayvan yemi ve katkı maddeleri üretimi için kullanılacak 3. nesil hammadde kaynağı olarak kullanılması politikaları da gündeme alınmıştır (Ottens ve ark., 2006). Deniz alglerinin protein içeriği türlere göre değişebildiği ve kuru ağırlığın %9-26'sı proteinden oluştuğu tespit edilmiştir (Bleakly ve Hayes, 2017). Mikroalglerin ise, kuru ağırlığının %6-71'i proteinden oluştuğu gösterilmiştir (Richmond, 2004; Becker, 1994). Ayrıca; vitamin, mineral açısından da zengin olduğu bilinen bazı alg türlerinin bu özellikleri sayesinde insan sağlığı için önemli faydalarının olduğu bildirilmiştir (Bleakly ve Hayes, 2017). Mikroalglerin sağlıkla ilişkili katkıları çok sayıda araştırmaya konu edilmiş durumdadır (Md. Asraful ve ark., 2020; Clemens ve Steven, 2016).

Biyokütlenin üretim maliyetini azaltmak için, mikroalg üretiminde atık su arıtma ve/veya atık su kullanılması, sıklıkla başvurulan yöntemlerden birisi olmuştur. Alglerin atık su arıtımında kullanılmalarında başarılı sonuçlar sağladığı, yapılan pek çok çalışmayla kanıtlanmıştır. (Richmond, 2004; Becker, 1994). Organik maddece zengin sulara algler, fotosentez yaparak serbest oksijen üretir ve bu şekilde organik maddenin aerobik bakteriyel oksidasyonunu desteklerken aynı zamanda oksidasyonla açığa çıkan karbondioksit ve nutrientler, algler tarafından yeni biyomas üretiminde kullanılmaktadır (Monfret ve Unc, 2017; Lu ve ark., 2016).

Bu çalışmada, Kırıkkale Kapulukaya barajından izole edilen *Chlorella vulgaris*, TAP (Tris-Acetate-Phosphate) besiyeri, Nitrat eklemeli TAP medium (N-TAP), Kırıkkale Üniversitesi kampüs gölü (GÖL), Makina ve Kimya Endüstrisi Kurumu (MKEK) atık suyu olmak üzere 4 farklı besi ortamında yetiştirilerek aminoasit miktarları ölçülmüştür. Doğal atık sular ve hazırlanmış besi ortamlarında alg büyümesi ve aminoasit miktarları karşılaştırmak suretiyle değerlendirilmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

Kırıkkale Kapulukaya barajından izole edilen, 4 farklı besi ortamında yetiştirilen *Chlorella vulgaris* türünün Klorofil-a ölçümü, optik yoğunluk ölçümü, hücre sayım işlemi, besiyeri nitrat ölçümü, alglerde toplam protein miktarı, aminoasitlerin HPLC analizi, FTIR cihazı ile organik bileşik ölçümü yapılmıştır.

### 2.1. Klorofil-a Ölçümü

İki mL alg örneği 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip besiyerinden uzaklaştırılmıştır. İki mL aseton ile muamele edildikten sonra vortekslenen numune, 15 dakika 80 °C'de sonikatöre konmuştur. Beş dakika 15000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı alınarak pellet kısmı atılmıştır. Süpernatant kısmı ELİSA'da ölçümler için -86 C°'de saklanmıştır (Jeffrey ve Humphrey 1975).

Optik Yoğunluk (OD) Ölçümü: AquaPen-C AP-C 100 marka cihaz kullanılarak Optik Yoğunluk (OD) ölçümü yapılmıştır. Ayrıca, OD680 nm, OD720 nm, QY ve OJIP parametreleri bir gün ara ile kaydedilmiştir (AquaPen Operation Manual).

### 2.2. Hücre Sayım İşlemi

Örneklerden sayım için sedimentasyon tüplerine (Uthermol) alınan 30 µl alg solüsyonu 2970 µL distile su ile seyreltilmiş ve 30 µL Lugol çözeltisi eklendikten sonra sedimentasyonun tamamlanması için 3 saat bekletilmiştir. Sedimente olan bireylerin inverted mikroskop altında sayımları gerçekleştirilmiştir.

### 2.3. Besiyerinde Nitrat Ölçüm

İnkübasyona bırakılan besi ortamlarından gün aşırı 2 mL besiyeri örnekleri alınarak iyon kromatografisi (IC) cihazında nitrat ve fosfat analizleri yapılmıştır.

### 2.4. Alglerde Toplam Protein Miktarı Tayini

Ön muamele için 10 mg alg örneği, 10 mL lizis tamponu içinde çözdürülmüştür. Çözdürülen alg örneği 1 dk. boyunca homojenize edilmiştir. Ardından sıvı azot içinde dondurularak oda sıcaklığında erimeye bırakılmıştır. Tekrar sıvı azot içinde dondurulmuş ve on dakika sonike edilmiştir. Sonikasyonun ardından yirmi dakika 15000 rpm'de +4°C sıcaklıkta santrifüj edilmiştir. Ön muamele edilmiş biyokütlenin toplam protein miktarını ölçmek için Lowry (Lowry ve ark., 1951) yöntemi uygulanmıştır. Standartların hazırlanmasında 0.2-10 mg arası BSA tartılmış ve 10 mL lizis tamponu içinde çözdürülmüştür. Süpernatantlardan ve protein standartlarından 100'er µL olarak hazırlanan karışıma, 100 µL %10'luk SDS solüsyonu eklenmiş, ardından 100 µL reaktif A eklenerek vortekslenmiştir. Karışımın 50 µL'si alınmış ve 200 µL reaktif C eklenmiştir. 10 dk. karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. 20 µL reaktif C solüsyonu eklendikten sonra 45 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 750 nm'de ELISA'da ölçüm yapılmıştır. Kimyasallar Reaktif A (40 mg NaOH 10 mL distile su içinde çözdürüldü ve 0.2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklendi), Reaktif B (0.1 g NaKTartarat 10 mL distile su içinde çözdürüldü ve 50 mg CuSO<sub>4</sub> eklendi), Reaktif C (20 µL reaktif B 1980 µL reaktif A), Folin reaktifi (1 N), %10 SDS

(5 mg SDS 100 mL distile su içinde çözdürüldü), Lizis tamponu (5 mL lizis tamponu 50 mL distile su içerisinde seyreltildi) (López ve ark., 2010).

### 2.5. Aminoasitlerin Analizi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

50 mg alg örnekleri 24 sa. 110°C'de 10 mL 6 mol HCl ile hidrolize edilmiştir. Hidrolizat 55°C'de vakum pompası ile kurutulmuş ve 5 mL distile su ile tekrar çözdürülmüştür. Ön işlem sonucu özdürülen numuneden ve aminoasit standartlarından 1 mL ependorflara alınmıştır. 500 µL asetonitril ilave edilmiştir. 24 µL fenilzotiyosiyanat eklenmiş ve vortekslenmiştir. 278µL trimetilamin eklenmiş ve vortekslenmiştir. Yarım saat boyunca 70°C'de degas yapılmış ve oda sıcaklığına gelene kadar beklenmiştir. 198 µL HCl eklenmiş ve vortekslenmiştir. 5 dakika 15000 rpm'de santrifüj edilerek. 0.22 µm filtreden geçirilmiştir. HPLC ayrımları, Alltech HPLC C18 kolonu (250 4,6 mm, 5 lm, Grace, IL, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Analiz, 1.0 ml.min-1 akış hızında bir elüsyon sistemi kullanılarak yapılmıştır. Mobil faz A, 0.1 mol NaAcetonitril (97:3, v/v; pH 6.5) ve mobil faz B, acetonitril- chromatographic grade suyu (4:1, v/v). Gradyan koşulları aşağıdaki gibidir: 0-13 dakika, % 100-93 A; 13-23 dk, % 93-77 A; 23-29 dak, 77-65% A; 29-35 dk, % 65-60 A; 35-40 dak; % 60-0 A; 40-45 dakika, % 100 B. Amino asitler, bir UV dalga boyu detektörü kullanılarak tespit edilmiş ve tutma sürelerinin gerçek standartlarla karşılaştırılmasıyla tanımlanmıştır. Niceleme, harici standart yönteme dayandırılmıştır (Xie ve ark., 2017).

### 2.6. Organik bileşik ölçümü (Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi, FTIR)

FTIR spektrumları, ortam sıcaklığında, Bruker Vertex 70 V marka model cihaz ile 400-4000 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında (MIR bölge) ATR ataşmanı kullanılarak elde edilmiştir.

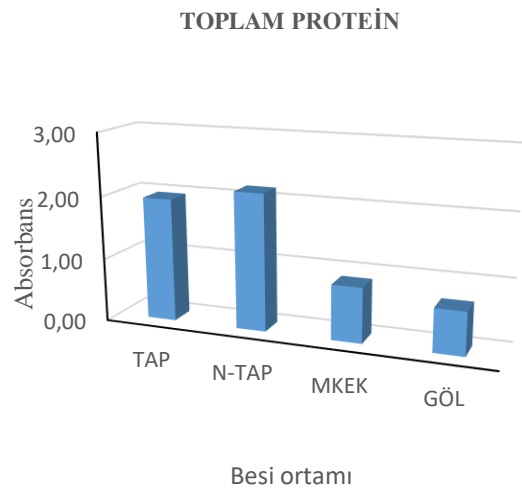
## 3. Sonuçlar

*Chlorella vulgaris* popülasyonunun, 1. gün ilk örneklemede gecikme (lag) evresinde olduğu görülmektedir. Bu evre muhtemelen ikinci günde de devam etmiş ancak örnekleme gün aşırı gerçekleştirilmesi nedeniyle tespit edilememiştir. Üçüncü günden itibaren hızlı bir büyüme evresine giren *Chlorella* kümelerinin söz konusu büyüme davranışı genel olarak 8. güne (veya 10. güne) kadar devam etmiştir. Bu evrede büyüme hızı en yüksektir. Bu evreyi, mikroalg biyokütlesinin maksimum seviyelere ulaştığı ve nispeten yatay bir büyüme davranışına geçtiği, 8. ve 14. günler arasında tespit edilen “durağan ya da yavaşlama” (Stationary Phase) evresi takip etmiştir. Ondördüncü günden itibaren ise, düşüş veya ölüm fazı olarak adlandırılan evreye geçildiği görülmüştür. Log fazı süresince, hızlı bir büyümenin işareti olarak OD, Birey Sayısı ve Chl-*a* değerlerinde saptanan artışlar, besin ortamlarına göre çok az farklılık göstermiştir. Bu dönemde, MKEK ve GÖL SUYU'na ait büyüme değerleri TAP-Kontrol ve N-TAP besin ortamlarına göre ihmal edilebilir derecede olmasına rağmen daha fazladır. Oysa, 8. günden sonra ortaya çıkan durağan faz süresince, MKEK ve GÖL

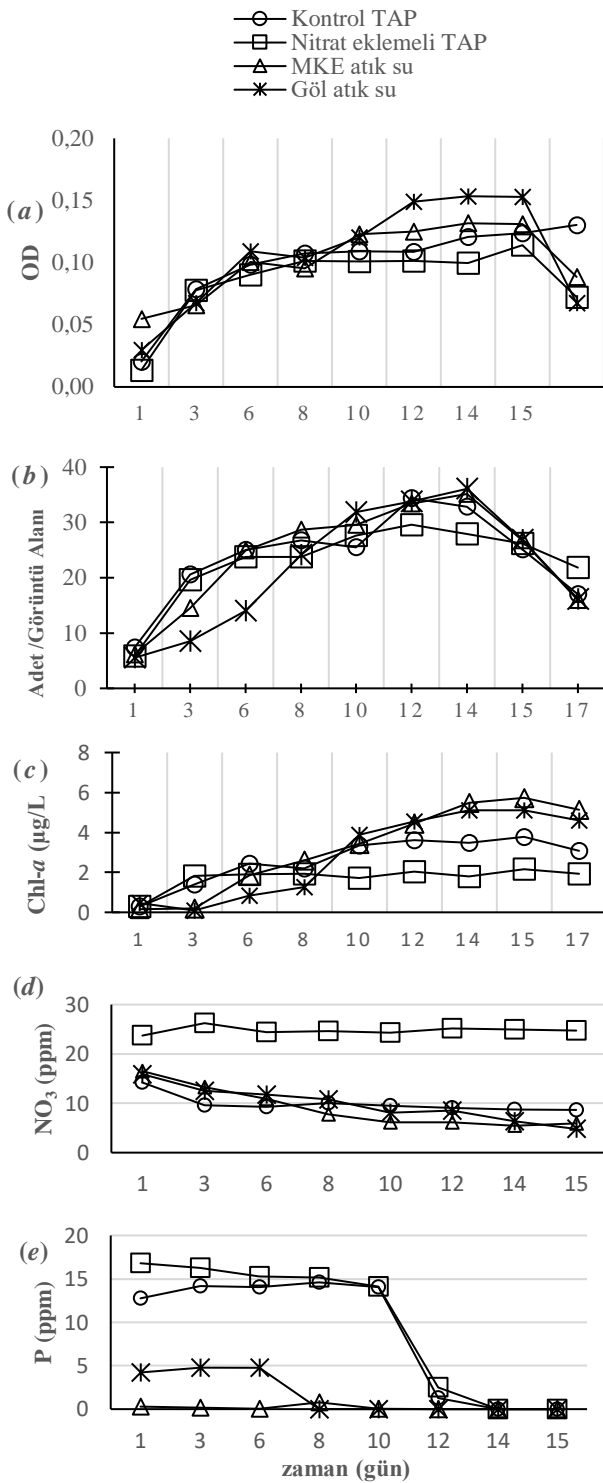
SUYU besin ortamlarına ait biyokütlenin diğerlerine oranla farkedilir derecede daha yüksek miktarlara ulaşmış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1-a, b, c).

*Chlorella vulgaris*'in fotosentez (büyüme) esnasında kullandığı nitrat (NO<sub>3</sub><sup>1-</sup>) ve fosfat (PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) bileşiklerini ortamdaki uzaklaştırma kabiliyetini belirlemek amacıyla büyüme parametreleriyle eşzamanlı gerçekleştirilen analiz sonuçları (Şekil 1-d, e), TAP (Kontrol) besin ortamındaki azot derişimlerinin, büyümenin başından sonuna kadar tedrici olarak azaldığını göstermiştir. Özellikle 8. güne (log fazının sonuna) kadar olan bu azalma oldukça belirgindir ve durağan evrede yatay bir seyir izleyerek devam etmiştir. Bu besin yerinde, fosforun başlangıçtaki yüksek derişimleri log fazının sonuna (8.gün) kadar bir azalma göstermemiştir. Bu tarihten sonraki durağan evrede önce yavaş ve sonrasında keskin bir düşüş göstermiştir. Azot zengini (N-TAP) besin ortamı, kontrol grubu ile benzer şekilde derişimler ortaya koymuş, ancak farklı olarak lag fazında fosforun nispeten kullandığına işaret eden azalmalar sergilemiştir (Şekil 5). MKEK ve GÖL SUYU besin yerlerinde ise, tahmin edildiği üzere, besin tuzu derişimindeki derişimler özellikle fosfor açısından nispeten farklı bir senaryo sergilemiştir. İlk olarak, MKEK ve GÖL SUYU besin ortamlarının fosfor başlangıç konsantrasyonları, TAP ve N-TAP besin yerlerine göre oldukça düşüktür. GÖL SUYU besin ortamındaki fosfor değerleri log fazı sonuna kadar yatay bir seyir gösterdikten sonra, 8. günden itibaren (durgunluk fazında) keskin bir düşüş göstermiş ve 10. günden itibaren tamamen tüketilmiştir. En düşük başlangıç konsantrasyonlarına sahip MKEK atık suyunda ise, aynı şekilde durağan faza gelindiğinde ve devamında neredeyse tamamen tüketilmiş olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1-e).

Büyümenin düşüş evresine geçmesiyle birlikte hasat edilen ve bu son ürünlerde tespit edilen toplam protein miktarları Şekil 2'de gösterilmektedir. Buna göre, TAP-KONTROL besin yeri ve N-TAP (nitrat eklemeli) besin yerine ait biyokütlerde, diğer besin yerlerine göre daha yüksek toplam protein miktarları tespit edilmiştir. Nitratın toplam protein miktarını etkileyen en önemli faktör olabileceği not edilmiştir.



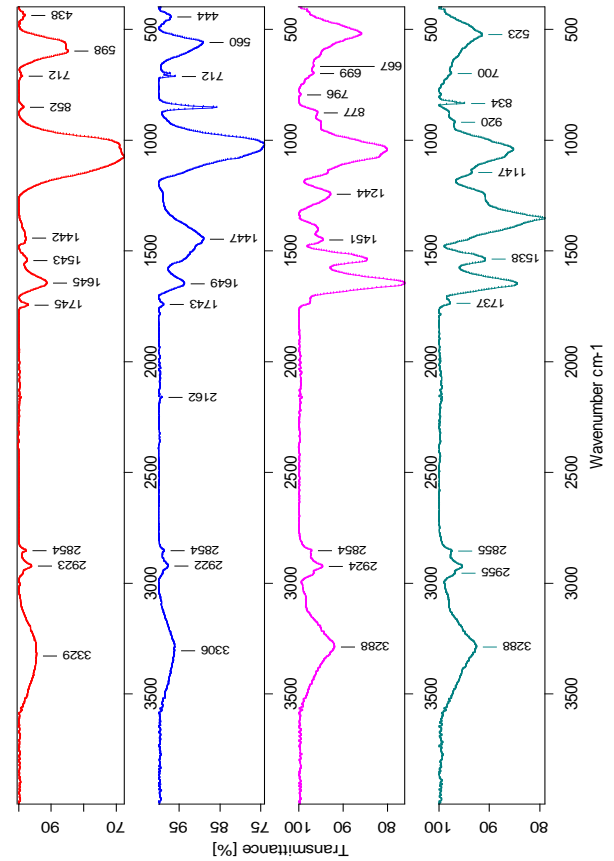
Şekil 2. Farklı besin ortamlarında *C. vulgaris*'in toplam protein miktarı garfığı.



**Şekil 1.** Farklı büyüme ortamlarında a) OD değerleri, b) Hücre sayıları, c) Chl-a değerleri, d) Nitrat (NO<sub>3</sub>) değerleri ve e) Fosfat (P) değerleri zamana bağlı grafikleri.

Farklı besi yerlerinde büyümesini tamamlayan *C. vulgaris*'in hasat edilen biyomasları içerisindeki makromoleküllerin (Karbohidrat, lipit ve proteinler) teşhisleri ve miktarları FTIR analizi ile belirlenerek karşılaştırılmıştır (tablo 1). Titreşim batlarına bakıldığında amid I (C – O germe titreşimleri), amid II (N – H bükülme titreşimleri) titreşim bandları esas alındığında, 1740-1542

cm<sup>-1</sup> civarında protein bandı, 3015-2854 cm<sup>-1</sup> civarında lipit (C=O) bandı, 1080 cm<sup>-1</sup> civarında karbonhidrat bandına (C-O germe titreşimleri) işaret etmektedir. GÖL ve MKEK atık sularında protein miktarının TAP ve N-TAP besi ortamlarına göre daha az olduğu görülmektedir. Bu sonucun, toplam protein miktarlarının farklı besi yerlerinde bulunan sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir. Buna karşılık, farklı besiyerlerindeki karbonhidrat miktarlarının MKEK>GÖL SUYU>TAP>N-TAP olarak bir sıralama gösterdiği tespit edilmiştir. Lipidler için ortaya çıkan sıralama ise GÖL SUYU<MKEK<TAP<N-TAP olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 3).

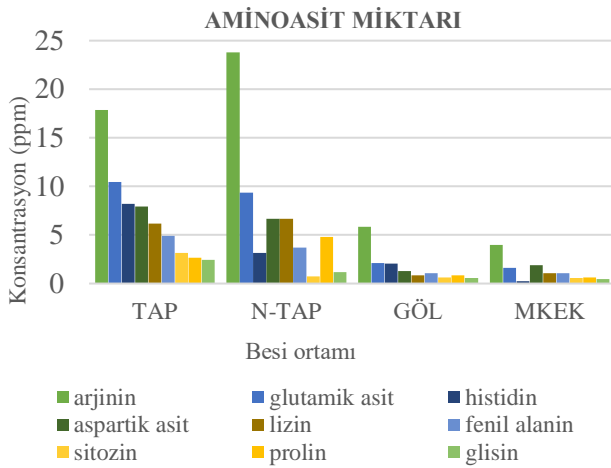


**Şekil 3.** Farklı besi ortamlarında yetişen *C. vulgaris*'in protein, karbohidrat ve lipit içeriğindeki farklılıkların FTIR analizi.

Hasadı yapılan alg biyomaslarında, HPLC kullanılarak aminoasit kompozisyonu ve miktarları belirlenmiş ve besi yerleri arasında karşılaştırmaları yapılmıştır. *C. vulgaris*'in azot bileşiklerinin daha fazla olduğu TAP ve N-TAP besi yerlerinde diğerlerine göre daha yüksek olarak bulunan amino asit miktarları, toplam protein miktarları ile uyumluluk göstermektedir. *Chlorella vulgaris*'te arjinin aminoasidinin bütün besiyerlerinde en fazla olduğu görülmektedir. Arjinin'in analizi yapılan toplam biyokütle içerisindeki oranları, TAP, N-TAP, GÖL SUYU ve MKEK besi yerlerinde sırasıyla %17.8, %23.8, %5.8 ve %4.0 olarak belirlenmiştir. Glutamik asit, en bol miktarda bulunan ikinci amino asittir ve TAP N-TAP GÖL SUYU ve MKEK besi ortamlarındaki yüzdeleri azalan bir şekilde sırasıyla %10.4, %9.4, besi ortamında %2.1 ve %1.9 olarak bulunmuştur.

**Tablo 1.** Büyüme sonunda farklı besi yerlerinde tespit edilen makromoleküllerin % miktarları

Makromolekül	Besi ortamı			
	MKEK	GÖL SUYU	TAP	N-TAP
Karbonhidrat	67	74	80	85
Lipid	95	97	93	94
Protein	85	75	92	94

**Şekil 4.** Farklı besi ortamlarında yetişen *C. vulgaris*'in aminoasit içeriği (HPLC analizi).

#### 4. Tartışma

Çalışmada elde edilen sonuçlardan ilki, *Chlorella*'nın farklı besi yerlerinde aynı şartlar altında yetiştirilen popülasyonlarının ortaya koyduğu nispeten farklı büyüme eğrileri ve son ürün biyokütlesinin makromoleküller açısından kayda değer farklılıkların ortaya çıkmış olmasıdır. Kontrol grubu olarak adlandırılan TAP besi yeri, mikroalg kültüründe en çok başvurulan ortamlardan birisidir. TAP besi yerinin bu anlamda mikroalg büyümesini destekleyen en ideal besin tuzu karışımına sahip olacağı ve optimum büyümeyi ortaya çıkaracağı beklenir. Ancak, bu çalışmadaki sonuçlar değerlendirildiğinde, MKEK ve GÖL SUYU olarak adlandırılan, sırasıyla, atık su ve doğal su niteliğindeki besi yeri ortamları, TAP besi ortamlarına göre daha yüksek biyokütle değerlerine ulaşılmasını sağlamıştır. Bu sonuç, iki farklı açıdan tartışılması gerekmektedir. Birincisi, her mikroalg üretimi çalışmasında olduğu gibi bu çalışmada da son ürün (biyokütle) verimliliği çok önemli olmakla birlikte, büyümenin en başından son ürüne gelinceye kadar bütün aşamalarda üretilen istenen makromolekül (Karbonhidrat, Protein, Lipit, Karotenoid vs.) değişimleri ve bunların optimum noktadaki miktarlarının hedeflenen ürün eldesindeki verimliliğe ulaşma açısından da aynı öneme sahiptir. Nitekim, bu çalışmanın sonuçlarına göre, MKEK ve GÖL SUYU besin ortamları TAP ve azot ile zenginleştirilmiş N-TAP besi yerlerine göre daha yüksek biyokütle üretmiş olmalarına rağmen, daha düşük miktarlarda protein içeriğine sahiptir. Her besi yerindeki alg kültürleri, son aşamaya gelinceye değin, moleküller arasında yoğun değişimler yaşamış olabileceği düşünüldüğünde, son ürünlerdeki makromolekül dağılımı, hedef molekül üretimindeki verimliliği açıklayabilmek için

yeterli olmayabilir. Başka deyişle, büyümenin herhangi bir aşamasında protein miktarı MKEK, GÖL SUYU besi yeri ortamlarında diğerlerine göre daha yüksek olmuş olabilir. Bu nedenle, teknik yetersizlikler nedeniyle ölçülemeyen, büyümenin her evresindeki makromoleküllerin miktar ve değişiklikleri bu çalışmadaki eksikliklerden biri olarak not edilmelidir. Literatürdeki çok sayıda araştırma, mikroalg kültür ortamında bulunan besin tuzlarının (özellikle N ve P) miktar ve değişimlerini alg biyokütlesinin büyüme esnasındaki biyokimyasal dönüşümlerle birlikte değerlendirmektedir (Lai ve ark., 2011; Kamalanathan ve ark., 2015; Arora ve ark., 2016; Santhakumaran, 2020).

Bu çalışmada, alg büyümesine ilişkin sonuçlar incelendiğinde, her bir besiyerinde tipik mikroorganizma büyüme eğrisinin oluştuğu görülmektedir. OD, Chl-*a* ve hücre birey sayıları ile takip edilen büyümede, gecikme (Lag fazı), hızlı büyüme (Log fazı) ve durağan evreleri ayırt edilir bir şekilde ortaya çıkmıştır. Ancak, her bir evredeki alg biyoması veya spesifik büyümesi seçilen besi yerine göre farklılık göstermiştir. Bu farklılıkların, her bir ortamın besin tuzu başlangıç miktarlarına ve kompozisyonuna bağlı olarak ortaya çıktığı genel bir kural olarak kabul edilmelidir (Saito ve ark., 2008). Nitekim, büyümenin ortam kompozisyonuna ve miktarına bağlı olduğu, mikroalg kültürasyonu kullanarak yapılan diğer çalışmalarda da doğrudan veya dolaylı olarak ifade edilmiştir (Ajala ve Alexander, 2020). Ancak, bu çalışmada, lag evresi boyunca olan hızlı büyüme esnasında besin tuzlarından azotun besi yeri konsantrasyonları tedrici olarak azalmasına rağmen, büyümede kullanılan diğer temel element olan fosforun azalmayıp yatay şekilde değerler göstermesi enteresandır. Lag evresinde ortofosfat miktarlarında azalma görülmemesi, fotosentetik büyüme esnasında fosfor kullanılmadığı şeklinde yorumlanmamıştır. Bu durumun, sekonder ortofosfat halindeki fosforun ortamdan alınmış olunabileceği, çalışmada ölçümü yapılan primer ortofosfatların ise bu nedenle sekonder ortofosfat bitinceye kadar azalmadığı şeklinde bir davranış ortaya çıkardığı ihtimali üzerinde daha fazla durulmaktadır (Solovchenko ve ark., 2016). Besi yerinde bulunan fosfatın alg bireyleri tarafından alınması karmaşık bir dinamığe sahiptir. Bu konudaki en önemli faktörlerden birisi, fosfatın ortamdaki türüdür. Ortofosfatın  $HPO_4^{2-}$  veya  $H_2PO_4^-$  şeklindeki serbest bileşikler fotosentezde kullanılan formlarıdır. Her ikisi arasındaki dinamik ve sürekli kimyasal dönüşümleri kültür ortamlarında da gerçekleşir ve bu değişimde en önemli kontrol edici faktör pH olarak ifade edilmiştir. Düşük pH'larda  $H_2PO_4^-$  formu dominanttır (Ullrich-Eberius, 1973). Çalışmamızda, *Chlorella*'nın bütün besi ortamlarında tespit edilen lag fazındaki büyüme esnasında, ortamdaki dominant fosfor türünün  $H_2PO_4^-$  olma ihtimali yüksektir. Ortamın pH ölçümleri gerçekleştirilmemiş olmasına rağmen, büyümenin başındaki pH genellikle daha düşüktür ve biyomas artışıyla birlikte ortamdaki karbon miktarının artmasıyla artar. Durgunluk fazına gelindiğinde ise  $H_2PO_4^-$  tüketildiğinden alg hücrelerinin  $HPO_4^{2-}$  türünü tüketmeye başladığı düşünülebilir. Fosforun alg hücreleri tarafından alınmasını etkileyen diğer bir faktör de, besi yeri ortamında bulunan fosfor başlangıç konsantrasyonunun çok yüksek olmasıdır. Özellikle, alg bireylerinin fosforca zengin

kültüre alınmadan önce fosfor açlığı seviyesine göre fosfor alımını fizyolojik olarak yavaşlattığı söylenmiştir (Cembella ve ark., 1982). Hangi faktörün fosfor alınma dinamiklerinde baskın olduğunun anlaşılabilmesinin daha detaylı bir çalışma ile mümkün olabileceği ortaya çıkmıştır. Bu çalışmaya temel teşkil eden konulardan birisi de alg büyümesinde atık su kullanımının verimliliğinin incelenmesidir. Bu amaçla kültür ortamlarındaki mikroalgün büyümesi ve besin tuzları arasındaki ilişkiye ait elde edilen bulgular, diğer bir konu hakkında da yorum yapılabilmesine olanak sunmuştur. Mikroalg büyümesine ait denemelerde kullanılan atık sulardaki fosfor ve azot, büyümenin durgunluk evresinde tamamen ortamdan uzaklaştırılmış olup, atık su arıtımında alglerin kullanılabilmesi sonucuna ilişkin önemli işaretler ortaya çıkarmıştır. Atık sular, genellikle azot ve fosfor elementlerince zengindir ve doğaya bırakıldığında ötrofikasyon gibi çok önemli bir probleme yol açmaktadır. Bu nedenle arıtılması gereklidir ki, arıtımın da önemli bir maliyeti beraberinde getirdiği bilinmektedir. O halde, çalışmamızda kullanılan *Chlorella vulgaris*'in gıda amaçlı kullanımı hedeflenerek yapılması muhtemel bir üretim faaliyeti sırasında arıtım amaçlı da kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceği söylenebilir. Nitekim, dünya üzerinde hem araştırma hem de uygulamalı ölçekte başarılı sonuçların alındığı bu tür çalışmaların sayısı oldukça fazladır ve artan bir ilgiye de sahiptir (Delgadillo-Mirqueza ve ark. 2016; Monfet ve Unc, 2017; Brar ve ark., 2019; Abdul Hamid ve Lim, 2019; Shelknanlomilan ve ark., 2012). Mikroalg büyümesi esnasında ortamdan azot ve fosforun uzaklaştırılmasında etkin olan çok sayıda faktör arasında N/P oranı özellikle değerlendirilmesi gereken faktör olarak öne çıkmaktadır. İlk başta okyanuslardaki fitoplankton büyümesi için 16/1 olarak (Redfield oranı) geliştirilen bu oranın, sentetik ve doğal atık suların kullanıldığı laboratuvar ortamında (veya pilot ölçekli) yetiştirilen mikroalglerde farklı bir stokiometriye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Aslan ve Kapdan, 2006; Delgadillo-Mirqueza ve ark., 2016; Monfet ve Unc, 2017). Monfet ve Unc (2017) yayınladıkları derlemede, alg büyümesi esnasındaki N ve P giderimi veya birikiminin doğru yorumlamak için, hücre birimlerinin asimilasyon oranı, besi ortamından (substrat) alım miktarı ve organik veya inorganik formdaki nütrientlerin hücre içerisindeki birikimini ayırt edecek ölçümlerin gerektiğini öne sürmüşlerdir. Özellikle, azotun (nitrat, nitrit, amonyum ve üre), fosforun (ortofosfat) farklı formları kültürasyon esnasında sürekli değişebilen dinamik bir yapıya sahiptir ve bu durum özellikle kullanılan doğal atık su çeşidi ve kullanılan alg türüne göre farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle, büyümede N/P oranına ait yorumlarda daha detaylı bir inceleme gerektirmektedir. Bu çalışmada, azot bileşiği olarak sadece nitrat ölçümü yapılabildiği için N/P oranlarına ait yorumların yetersiz olacağı düşünülmektedir. Buna rağmen, çalışmamızda elde edilen, Göl atık suyu ve MKEK atık suyunda 8-14 günler arasında, TAP kontrol besi yerinde (12-15 günleri arasında) tespit edilen N/P oranlarının (6-10 arası) en fazla büyümeye karşılık geldiği ve en fazla fosfor gideriminin gerçekleştiği optimal oran aralığı olduğu söylenebilir. Bu değerler, Wang ve ark.,(2010) tarafından *Chlorella sp.* için 6:1, Sue ve ark.,

(2011)'nin yaptığı çalışmada 3:1 ve Aslan ve Kapdan (2006)'ın yaptığı çalışmada ise 2:1 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen bulgulardan bir diğeri ise, büyüme sonunda ortaya çıkan protein ve amino asit miktarlarının besi yerleri arasında farklılık göstermesidir. Özet olarak, daha yüksek biyokütle oranlarının elde edildiği MKEK atık suyu ve GÖL SUYU ortamlarında daha düşük miktarlarda protein ve amino asit oluştuğu belirlenmiştir. Ortamdaki N ve P besin element değişimlerine göre üç temel makromolekülün birbirlerine dönüşümleri ve dolayısıyla büyümenin evreleri boyunca salınımlarının da değiştiği bilinmektedir (Cheng ve ark., 2016). Mikroalglerin biyodizel amaçlı azot açlığına maruz bırakıldıklarında lipid miktarlarını artırdıkları birçok çalışmada elde edilen yaygın sonuçlardan birisidir (Vassilev ve Vassileva, 2016). Bizim çalışmamızda, lipid miktarları kültür evrelerinin tamamında değil sadece deney sonlandırıldığında FTIR analiziyle ölçülmüş ve sadece besi ortamları arasındaki makromoleküllerin farklılıkları ortaya konulabilmiştir. Buna göre, bütün besi yeri ortamlarında son durgunluk evresinde, azot, ortamda tüketilerek azaltılmış ve hücreler azot açlığına maruz kalmış olmasına rağmen, MKEK ve GÖL SUYU besi ortamının daha fazla lipid moleküllerine sahip oldukları görülmüştür. Bu durumun, diğer ortam şartları aynı olmasına rağmen, besi yerlerinin azot (ve de fosfor) elementi başlangıç konsantrasyonlarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Cheng ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, başlangıç konsantrasyonları daha fazla olan alg kümelerinin lipid miktarlarındaki artışın çok daha düşük olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılara göre, azot açlığına maruz kaldıktan sonra mikroalglerin metabolik enerji açığı diğer karbon içeren bileşiklerin lipitlere dönüştürülmesiyle sonuçlanırken, başlangıç azot konsantrasyonu yüksek olduğunda bu dönüşüme daha az ihtiyaç duyulmakta ve bu da nispeten daha düşük lipid miktarlarıyla sonuçlanmaktadır. Benzer sonuçlar diğer bazı araştırmacılar tarafından da tespit edilmiştir (Klok ve ark., 2013; Li ve ark., 2011). Diğer karbon kaynağı olarak ortamdaki karbohidratların, dönüşümde daha az kullanılmasına bağlı olarak da, MKEK ve GÖL SUYU besi yerindeki miktarları daha fazla bulunmuştur.

*C. vulgaris*'deki toplam protein miktarı değerlendirildiğinde ise; kontrol (TAP) ve nitrat eklemeli (N-TAP) gruplarının toplam protein miktarları, beklenildiği gibi, diğer besiyerlerine göre daha fazladır. Bu durum NO<sub>3</sub> bakımından zengin besi yeri ortamlarının daha yüksek protein oluşumundan sorumlu olduğunu göstermektedir. GÖL SUYU ve MKEK ortamlarında NO<sub>3</sub> ve P'nin alg hücreleri tarafından daha yoğun kullanılıp tüketilmesine ve biyokütle olarak daha fazla artışlar ortaya çıkarmış olmasına rağmen, makromoleküller arasındaki miktarsal dağılımda (ortamdaki başka elementlerin bulunuşu da dahil) diğer bazı faktörlerin etkili olacağını göstermiştir. Bu çalışmada kullanılan *Chlorella vulgaris*'e ait toplam amino asit miktarlarının yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında kantitatif olarak daha fazla olduğu görülmüştür (Richmond, 2004; Becker, 1994). Hasadı yapılan alglerden, HPLC cihazında aminoasit kompozisyonu ölçümü yapılmıştır (Şekil 4). Sonuçlara değerlendirildiğinde *Chlorella vulgaris*'te arjinin amino

asidinin bütün besiyerlerinde en fazla olduğu görülmüştür (Xie ve ark., 2017). Heterotrofik mikroalg örneklerinde en bol bulunan amino asit olan arjinin nitrik oksidin öncüsü ve antiaterojenik özelliklere sahip önemli bir vazodilatör olarak önemlidir (Taboada ve ark., 2010). Tüm besi ortamlarında en fazla miktar arjinine aittir. TAP besi ortamında %17.8, N-TAP besi ortamında %23.8. GÖL besi ortamında %5.8, MKEK besi ortamında %4.0'dır. Lezzet hissini ana bileşeni olan glutamik asit, en bol miktarda bulunan ikinci amino asittir (Bocanegra ve ark., 2009). TAP besi ortamında %10.4, N-TAP besi ortamında %9.4, GÖL besi ortamında %2.1'dir. Yüksek glutamik ve aspartik asit seviyeleri deniz yosunu ürünlerinin karakteristik özel aroma özelliklerinden sorumludur (Bocanegra ve ark., 2009), MKEK besi ortamında da glutamik asit (%1.6) ve aspartik asit (%1.9) %1.5-2.0 arasındadır. N-TAP ve MKEK besi ortamlarında histidin miktarında GÖL ve TAP besi ortamlarına bakıldığında çok az miktarda olduğu gözlenmiştir. N-TAP ve GÖL besi ortamında %0-3.5 arasında iken GÖL ve TAP besi ortamında %2-8.5 arasında seyrettiği gözlemlenmiştir. Tüm besi ortamlarında glisin en az yüzde de gözlemlenmiştir. Glisin değeri %0.1-2.5 arasında seyretmektedir.

## 5. Sonuç

- 1- Yerel olarak izole edilen *Chlorella vulgaris* türüne ait protein ve amino asit değerleri literatürde aynı türün farklı suşları için elde edilen sonuçlarla rekabet edebilecek düzeydedir ve üretim verimliliği potansiyeline sahiptir.
- 2- Denemesi yapılan atık su ve doğal göl sularının biyokütle açısından daha yüksek verimliliğe sahip olduğu ortaya çıkmaktadır.
- 3- Ancak, hedef makromolekül olan protein ve amino asitler açısından düşük değerler sergilemişlerdir. Bu durum, denemesi yapılan bu iki besi ortamının N ve P içerikleriyle yakından ilişkili olduğu düşünülmüştür.
- 4- Gerek P ve N ve gerekse diğer elementlerin optimizasyonu neticesinde hedef moleküllerin artışı sağlayacak araştırmaların planlanması ihtiyacı ortaya çıkmıştır.

## Teşekkür

Bu çalışma, Yüksek Lisans öğrencisi Merve Kavasbaşıoğlu'nun Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yürütmekte olduğu tez çalışmasından üretilmiştir. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından 2019/162 No'lu proje ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

Abdul Hamid N, Lim S. 2019. Evaluation of processing route alternatives for accessing the integration of algae-based biorefinery with palm oil mill. J Clean Prod. 212:1282-1299.

Ajala SO, Alexander ML. 2020. Assessment of *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Oocystis minuta* for removal of sulfate, nitrate, and phosphate in wastewater. Int J Energy Environ Eng. 11:311-326.

Angel AR, Mata L, Nys R, Paul NA. 2016. The Protein Content of Seaweeds: A Universal Nitrogen-to-protein Conversion Factor of Five. Chapter 2.

Angell AR. 2016. Seaweeds as an Alternative Crop for the Production of Protein. PhD Thesis, James Cook University. Jcu, Research online. Chapter 1.

Arora N, Patel AP, Pruthi A. 2016. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. Bioresour Technol. 213:79-87.

Aslan S, Kapdan I. K. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae, Ecol. Eng. 28: 64-70.

Becker EW. 1994. Microalgae - Biotechnology and Microbiology. Cambridge: Cambridge University Press.

Becker EW. 2007. Micro-algae as a source of protein. Biotechnol. Adv, 25 (2): 207-10.

Bleakly S, Hayes M. 2017. Algal Proteins: Extraction, Application and Challenges Concerning Production. A Review. Foods, 6(5):33. <https://doi.org/10.3390/foods6050033>.

Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Ródenas S, Sánchez-Muniz FJ. 2009. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. J Med Food. 12:236-258.

Brar A, Kumar M, Pareek N. 2019. Comparative Appraisal of Biomass Production, Remediation, and Bioenergy Generation Potential of Microalgae in Dairy Wastewater. Front. Microbiol. 10:678.

Cembella JA, Harrison PJ. 1984. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part I. Crit Rev Microbiol. 10:317-391.

Cheng J, Lu H, Huang Y, Li K, Huang R, Zhou J, Cen K. 2016. Enhancing growth rate and lipid yield of *Chlorella* with nuclear irradiation under high salt and CO<sub>2</sub> stress. Bioresour Technol. 203:220-227.

Clemens P, Steven FC. 2016. Microalgae Biotechnology. Springer. ISBN 978-3-319-23808-1.

Delgado-Mirqueza F, Taidi P. 2016. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. Biotechnol Rep. 11:18-26.

Jeffrey SW, Humphrey GF. 1975. New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c1 and c2 in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen (BBP), Bd. 167:191-194.

Kamalanathan M, Pierangelini M, Shearman LA, Gleadow R, Beardall J. 2015. Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*. J Appl Phycol. 28:1509-1520.

Klok AJ, Martens DE, Wijffels RH, Lamers PP. 2013. Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. Bioresour Technol. 134:233-243.

Lai J, Yu Z, Song X, Cao X, Han X. 2011. Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 405: 6-17.

Li Y, Han D, Sommerfeld M, Hu Q. 2011. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. Bioresour. Technol. 102:123-129.

- López CVG, García MCC, Fernández FGA, Bustos CS, Chisti Y, Sevilla JMF. 2010. Protein Measurements of Microalgal and Cyanobacterial Biomass. *Bioresour. Technol.* 101(19):7587-91.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu Q, Zhou W, Min M, Ma X., Ma Y., Chen P, Zheng H, Doan YTT, Liu H, Chen C, Urriola PE, Shurson GC, Ruan R. 2016. Mitigating Ammonia Nitrogen Deficiency in Dairy Wastewaters for Algae Cultivation. *Bioresour. Technol.* 201:33-40.
- Md. Asraful, Jing-Liang X, Zhongming W. 2020. *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. Springer. ISBN 978-981-15-0169-2.
- Monfret, E, Unc A. 2017. Defining Wastewaters Used for Cultivation of Algae. *Algal Res.* 24:520–26.
- Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD. 2006. Dietary Reference Intakes (DRI). The Essential Guide to Nutrient Requirements. Institute of Medicine of The National Academies. Washington, D.C., pp. 144-156
- Richmond A. 2004 *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science.
- Saito JG, Ritt JT. 2008. Some thoughts on the concept of colimitation: three definitions and the importance of bioavailability. *Limnol Oceanogr.* 53(1):276-290.
- Santhakumaran K, Mathew JG, Ray L. 2020. Experimental evaluation of the culture parameters for optimum yield of lipids and other nutraceutically valuable compounds in *Chloroidium saccharophilum* (Kruger) comb. Nov. *Renewable Energy.* 147 (P1):1082-1097.
- Shelknanloymılan L, Atıcı T, Obalı O. 2012. Removal of nitrogen and phosphate by using *Chlorella vulgaris* on synthetic and organic materials waste water. *Biological Diversity and Conservation.* 5/2: 89-94.
- Solovchenko MV, Jablonowski N. 2016. Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. *Biotechnol Adv.* 34(5):550-564.
- Su Y, Mennerich A, Urban M. 2011. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture, *Water Res.* 45: 3351–3358.
- Taboada C, Millán R, Míguez I 2010. Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *J Sci Food Agric.* 90:445-449.
- Ullrich-Eberius C. 1973. Nitrat, Nitrit und Phosphat zur 1250 photosynthetischen Reduktion von Nitrat und Nitrit und zum ATP-Spiegel bei *Ankistrodesmus braunii*. *Planta.* 115:25-36.
- Vassilev S, Christina G. Vassileva CG. 2016. Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application. An overview. *Fuel,* 181:1–33.
- Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Wang Y, Ruan R. 2010. Cultivation of green Algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162: 1174–1186.
- Xie T, Xia Y, Zeng Y, Li X, Zhang Y. 2017. Nitrate Concentration-Shift Cultivation to Enhance Protein Content of Heterotrophic Microalga *Chlorella vulgaris*: Over-Compensation Strategy. *Bioresour Technol.* 233:247-55.