

## Meke Krater Gölü'nden (Konya/Türkiye) İzole Edilen *Dunaliella tertiolecta* Mikroalgının Nötral Lipid İçeriğine pH Değişimlerinin Etkisi\*

Zeynep ELİBOL ÇAKMAK

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul

Geliş : 20.02.2018

Kabul : 24.04.2018

**Araştırma Makalesi / Research Paper**

Sorumlu Yazar: zeynep.cakmak@medeniyet.edu.tr

E.Dergi ISSN: 1308 -7517

DOI: 10.22392/egirdir.397153

### Özet

Bu çalışmada, halofil bir yeşil mikroalg olan *Dunaliella tertiolecta*'nın büyüme ortamındaki pH değişikliğinin biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol üretimi ve ilgili parametrelerde meydana gelen değişimi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Mikroalgler Johnson's besin ortamında farklı pH'larda (pH=4, 6, 8, 10) 25 gün boyunca uygun şartlarda kültüre alınmış ve büyümeleri takip edilmiş, triaçilgliserol üretimleri ve ilgili parametreler analiz edilmiştir. Mikroalglerin büyüme ortamının başlangıç pH'sındaki düşüşle doğru orantılı olarak büyüme hızı, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarında artış, net oksijen üretim ve tüketim hızında önemli bir değişim belirlenmezken nötral lipid ve triaçilgliserol üretiminde de artma olmuştur. Diğer taraftan ortam pH'sı 10 olarak ayarlandığında ise mikroalglerin çoğalma hızında önemli bir değişim belirlenmezken, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarında düşüş, net oksijen üretim ve tüketim hızlarında azalma olmuş, nötral lipid ve triaçilgliserol üretiminde dikkate değer bir değişim gözlenmemiştir. Elde edilen sonuçlar *D.tertiolecta*'dan biyodizel hammaddesi üretimi için ortam pH'sını düşürmenin etkili bir sonuç alınabilecek pratik bir yöntem olduğunu göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Biyodizel, *Dunaliella tertiolecta*, pH, Triaçilgliserol.

### Impact of pH changes on neutral lipid production of the microalga *Dunaliella tertiolecta* isolated from Meke Crater Lake (Konya/Turkey)

#### Abstract

In this study, the impact of a change in pH of the growth medium on the production of triacylglycerol (used as a biodiesel feedstock) and related parameters were evaluated in a green halophilic microalga *Dunaliella tertiolecta*. Microalgae were cultured in Johnson's nutrient medium with different initial pH values (pH = 4, 6, 8, 10) under suitable conditions for 25 days and growth was followed, triacylglycerol production and related parameters were analyzed. There was an increase in the growth rate, total chlorophyll and carotenoid contents, net oxygen production and consumption ratio did not show a significant change as accompanied by a remarkable increase of neutral lipid and triacylglycerol content of microalgae in proportion to a decrease in initial pH. On the other side, there was a decrease in the total chlorophyll and carotenoid content accompanied by a decrease in both oxygen production and consumption ration while there was no significant change in growth rate, neutral lipid, and triacylglycerol production of microalgae when the medium pH is adjusted as 10. Results show that lowering the initial pH of the growth medium might be used as a practical approach for induction of biodiesel feedstock production by *Dunaliella tertiolecta*.

**Keywords:** Biodiesel, *Dunaliella tertiolecta*, pH, Triacylglycerol.

\*Bu çalışma, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (Proje no: TAGEM-16/ARGE/44) tarafından desteklenmiş olup, İstanbul Medeniyet Üniversitesi'nde yürütülmüştür.

## GİRİŞ

Besin zincirinin temel üreticileri konumunda olan mikroalgler çok değişik ekolojik şartlara sahip ortamlara adapte olabilen, ototrof veya heterotrof beslenen, ökaryot ya da prokaryot yapıda ve milyarlarca yıldır varlıklarını çeşitlenerek sürdürebilmiş, su sistemlerinde serbest azotun bağlanmasından, su ve havadaki serbest oksijenin büyük bir kısmının üretiminden sorumlu olan özel mikroorganizmalardır (Van den Hoek vd., 1995). Şimdiye kadar tanımlanmış potansiyel kullanım alanları içinde gıda, yem katkı maddesi, organik gübre olarak, atıkların biyolojik arıtımında, küresel ısınmayla mücadelede, farmasötik ve terapötik amaçlı, kimyasal madde kaynağı olarak, pigment ve antioksidan kaynağı olmakla beraber özellikle yenilenebilir enerji kaynağı olarak kullanılmaları dikkat çekici olmuştur (Chisti, 2007). Özellikle fosil yakıtlara bağımlılığın azaltılmasına katkı sağlayabilecek bir potansiyel sunan mikroalglerden biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol eldesine yönelik çalışmalar artarak devam etmektedir.

Mikroalglerde lipid içeriğinin artırılmasına yönelik şimdiye kadar uygulanmış olan makrobesin element stresi (azot ve fosfor açlığı), sıcaklık ve ışık stresi uygulamalarının yanında ultraviyole (UV) ışın stresi, tuz stresi, pH ve ağır metal stresi uygulamaları ile genetik mühendisliği yaklaşımlarına da başvurulmuştur (Sharma vd., 2012). Fakat çoğu mikroalg türü sadece makroelement açlığı gibi stres koşulları altında triaçilgliseridin (TAG) büyük bir miktarını üretir (Schenk vd., 2008). Yapılan çalışmalarda *Phaeodactylum tricornutum*, *Scenedesmus* sp., *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans*, *C. reinhardtii*, ve *Nannochloropsis* sp., mikroalglerinde azot (N) konsantrasyonundaki azalma ile paralel olarak TAG düzeylerinde ve fosfolipid içeriğinde de artışlar olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte hücre bölünme hızında ilk günden itibaren gözlenen keskin düşüşler N açlığında ekonomik açıdan değerlendirilince istenilen biyokütleyi sağlayamadığı görülmüştür (Widjaja vd., 2009)

Mikroalglerdeki lipid miktarı genellikle %20-50 arasında değişirken bazılarında bu oran %80' e kadar çıkabilir (Brennan ve Owende, 2010). *Dunaliella salina* 'da böyle bir tür olup hücre içeriğinin %70'ine kadar yüksek çevresel tuzluluğa cevapta lipid birikimi gösterir (Takagi ve Yoshida 2006). Dünyada ticari düzeyde pilot havuzlarda toplu kültürü yapılan *Dunaliella* sp. algal biyomasının sıvı yakıta doğrudan dönüşümü ekonomiye katkı sağlar. Tek hücreli denizel mikroalg türü *Dunaliella tertiolecta*'nın %36-42 oranında yağ verimine sahip olduğu bildirilmiştir (Tsukahara ve Sawayama, 2005). *D. tertiolecta* üretiminin basit olması, yüzeyde topaklaşmaması, yüksek oranda tuz toleransı ve geniş ölçekte dış kültivasyonda kullanılabilir olmasıyla biyoteknoloji endüstrisinin dikkatini toplamıştır (Elenkov vd., 1996). Stres koşulları altında, *Dunaliella* cinsi mikroalgler karotenoid, gliserol (Hadi vd., 2008), vitamin ve protein (Ghoshal vd., 2002) gibi değerli kimyasal maddeleri önemli miktarlarda biriktirebilir. *Dunaliella* cinsi mikroalgler endüstriyel üretim için uygun miktarlarda  $\beta$ -karoteni (kuru ağırlığın %14'ü kadar) yüksek ışık yoğunluğu, artan sıcaklık, yüksek tuzluluk ve besin eksikliği (sülfat eksikliği, nitrat eksikliği) gibi stres koşulları altında biriktirebilir (Coesel vd., 2008). Dahası, *Dunaliella* cinsi mikroalglerin hücre duvarına sahip olmadığından ötürü ince plazma membran yapısı ozmotik değişikliklere cevapta hücre şekli ve hacmindeki hızlı değişimlere izin verir (Avron, 1992). Bu sebeplerle, biyodizel ve karotenoid gibi katma değeri yüksek ürün üretimi için *Dunaliella* türleri içerisinde özellikle *D. tertiolecta* türü önemli bir biyoteknolojik potansiyel barındırır.

Algal üretimdeki en önemli faktörlerden biri pH'tır. Çünkü CO<sub>2</sub>'in ve temel besinlerin çözünürlüğünü ve kullanılabilirliğini belirler ve algal metabolizmada önemli bir etkiye sahip olabilir (Chen ve Durbin, 1994). Aynı zamanda pH, suda karbon içerikli türlerin nispi konsantrasyonlarını belirleyici olan önemli bir faktördür (Azov,1982).Bununla birlikte, pH'nın eser metallerin biyoyararlanımını ve deniz fitoplanktonuna toksisitesini kontrol etmede önemli olduğu belirtilmiştir (Gensemer vd., 1993). Bu çalışmada *Dunaliella tertiolecta* türü, kolay bulunabilmesi, özgün morfolojik özelliği, kontaminasyona dayanıklı olması, soğuğa ve sığağa adaptasyonu ve farklı pH gereksinimleri gibi faktörler göz önüne alınarak seçilmiştir. Fitoplanktonların büyüme hızı ve lipid miktarı üzerine pH'ın direkt etkileriyle ilgili çok az çalışma vardır. Bu çalışmada biyodizel üretimi için *Dunaliella tertiolecta*'nın büyüme, biyodizel hammaddesi olarak kullanılan nötral lipid üretim ve karotenoid üretimi üzerine büyüme ortamının başlangıç pH'sındaki değişikliklerin etkisi değerlendirilmiştir.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Türün İzolasyonu, Tanımlanması ve Büyütme Koşulları

*Dunaliella tertiolecta* mikroalgi Konya ilinde bulunan volkanik bir tuz gölü olan Meke Krater Gölü'nden (37°41'7"N 33°38'28"E), izole edilmiştir. *D. tertiolecta* türü morfolojik (Borowitzka ve Borowitzka, 1988a) ve genetik özelliklerine göre tanımlanmış olup genetik olarak 18S rRNA geninin sekans analizi yapılarak teşhis edilmiştir. PCR'la çoğaltılan genomik DNA parçasının sekans analizi Hoham vd. (2002)'ye göre yapılmıştır. 18S ribosomal RNA bölgesini içeren genomik DNA'dan DNA çoğaltımı ileri: 5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGT-3' ve geri: 5'- ACTAAGAACGGCCATGCAC-3' birbirini takip eden primerler kullanılarak PCR'la gerçekleştirilmiştir. Aynı primerler Sanger sekanslama için de kullanılmıştır. *D. tertiolecta* türü ve ilgili türler arasındaki 18S rRNA genlerinin sekans karşılaştırması BLASTN programı kullanan NCBI veri tabanı ile yürütülmüştür.

*D. tertiolecta* IMCC-37 türünün stok hücre kültürü %20'lik tuz konsantrasyonuna sahip Modifiye Johnson sıvı besiyerinde yetiştirilmiştir (Hejazi ve Wijffels, 2003). Bu büyüme çözeltisi, *Dunaliella* türlerinin kültüre alınması için kullanılan standart çözeltilerdendir ve içeriği kısaca 1 L çözelti için 200 g NaCl, 1,5 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 g KNO<sub>3</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,2 g KCl, 0,2 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,04 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0024 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,0018 g Na<sub>2</sub>EDTA, 0,04 g NaHCO<sub>3</sub> ve mikro-besin elementlerinden 0,6 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,4 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,06 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,05 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,05 mg ZnCl<sub>2</sub>, 0,04 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O olarak belirlenmiş, kontrol grubu için ortam pH'sı 8,0'e ayarlanmıştır. Deney için dört ayrı grup tasarlanmış olup 1 L'lik dört ayrı modifiye Johnson sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Her birinin tuz (NaCl) konsantrasyonu (w/v) % 20 olup, pH'ları NaOH veya HCl ile 4, 6, 8 (kontrol) ve 10'a ayarlanmıştır. Denemelerde, ölçüm hassasiyeti 0,01 pH, ölçüm toleransı ±0,02 pH ve ölçüm aralığı 0,00 – 14,00 olan pH metre (Thermo, USA) kullanılmıştır. *D.tertiolecta* türü içerisinde 50 ml sıvı besin ortamı bulunan ve pH'sı 4, 6, 8 ve 10'a ayarlı 100 ml'lik erlenlerde kültüre alınmıştır. Mikroalgler 25°C sıcaklıkta, yoğunluğu 250 µE/(m<sup>2</sup>/s) olan sürekli ışık altında, 120 rpm ayarlı sıcaklık kontrollü çalkalayıcıda 25 gün boyunca inkübe edilmiştir. Büyüme optik yoğunluğa göre 2. 5. 10. 15. 20. ve 25. günlerde UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak 680 nm'de ölçülmüştür. Hücre sayımları doğrudan sayım ile ışık mikroskobu kullanılarak 1 mm kalınlığındaki sayım kamarası ile (Neubauer) izlenmiştir (Spolaore

vd., 2006). En az üç tekrar yapılmıştır ve bir ml kültürdeki hücrelerin ortalama sayısı dilüsyon oranı da hesaba katılarak bulunmuştur.

### **Mikroalglerin Net Oksijen Üretim ve Tüketim Değerlerinin Belirlenmesi**

*D.tertiolecta*'nın net fotosentetik oksijen oluşum aktivitesi Clark-tipi oksijen elektrot sistemi (Hansatech Oxytherm, Hansatech Ins. Ltd., Norfolk, UK) kullanılarak oksijen üretim ve tüketim verimi olarak ölçülmüştür. Absorbans değeri  $A_{680} = 2,0$ 'ye ayarlı hücre kültüründen 2 ml örnek reaksiyon kuyucuklarına alınmış ve 25°C'de sürekli olarak manyetik karıştırılmıştır. Hücreler ilk etapta 2 dk'lığına karanlık koşullara adapte edilip, ölçümler  $O_2$  elektrotla hücre süspansiyonunda karanlık solunuma girişin başlangıcıyla alınmış ve  $O_2$  oluşumunda ışığa doygunluk oranının ölçülmesiyle takip edilmiştir. Her bir işlem süreci 5 dk kadar kaydedilmiştir. Kuyucuklardaki aydınlatma yoğunluğu 480  $\mu E/(m^2/s)$  olarak ayarlanmıştır. Net fotosentetik oksijen oluşumu, oksijen oluşum hızından tüketilen oksijen oranının çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.

### **Toplam Klorofil ve Toplam Karotenoidlerin Spektrofotometrik Tayini**

Klorofil *a*, *b* ve karotenoid miktarı Jeffrey ve Humphrey (1975) 'den modifiye edilerek spektrofotometrik metotla belirlenmiştir. Dondurulmuş hücreler ( $1 \times 10^7$  hücre) 500 ml %90'lık aseton karışımıyla yeniden süspansiyon edilip 15 dk. karıştırılmış ve 15000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmişlerdir. Süpernatant 96 kuyucuklu plağa yüklenmiştir. Süpernatant absorbansları sırasıyla 750, 664, 647, 470 ve 630 nm dalga boylarında %90'lık aseton körüne karşı okunmuştur. Klorofil *a*, *b* ve karotenoid miktarları Jeffrey ve Humphrey (1975), denklemleri kullanılarak hesaplanmış olup toplam klorofil sonuçları klorofil *a* ve *b*'nin toplamı olarak sunulmuştur (Lichtenthaler, 1987).

### **Nötral Lipidlerin Tayini**

Nötral lipidlerin boyanması işlemi Elsey vd., (2007)'nin tarif ettiği şekil üzerinde küçük değişiklikler yapılarak modifiye edilmiş olup, Nil kırmızısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık olarak  $29,3 \times 10^4$  hücre/ml 22  $\mu$ l hacimde  $7,8 \times 10^{-5}$  M yoğunluktaki Nil kırmızısıyla (Invitrogen) boyanmış ve karanlıkta 15 dk karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakılıp iki kere yıkanmıştır. Nil kırmızısı ile boyanmanın nispi floresans yoğunluğu Floresans spektrofotometre (Agilent Technologies Carry Eclipse) kullanılarak 486 nm eksitasyon ve 570 nm emisyon dalga boylarında miktarsal olarak ölçülmüştür.

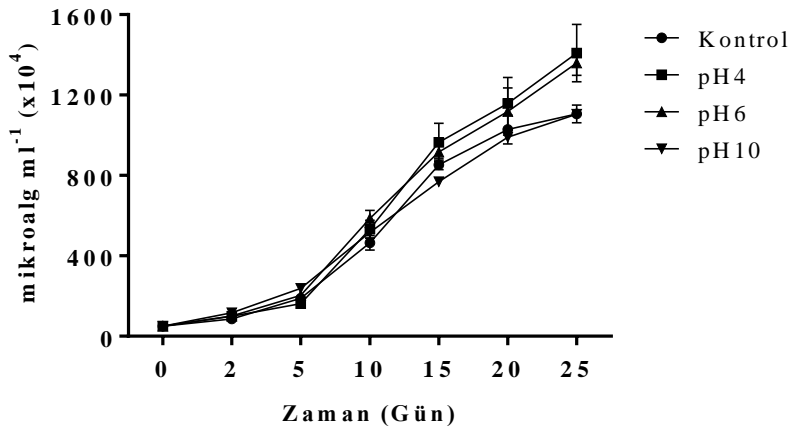
### **Triaçilgliserollerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile Ölçümü**

FTIR ölçümü için 25 gün boyunca farklı pH ortamlarında inkübasyona bırakılan ve inkübasyon son gününde örneklenen mikroalglerin yoğunlukları eşitlenmiştir ( $A_{680}=4$ ). Eşit yoğunlukta alınan mikroalgler santrifüjlenmiştir ve 40°C' de 1 saat vakum altında tutulmuştur. Kurumuş alg örnekleri pellet haline getirilmiş ve örnek modülü üzerine yerleştirilmiştir. Numune alıcısının kızılötesi spektrumu, 4000-400  $cm^{-1}$  dalga boyu aralığında 128 tarama ile ATR modülü ile desteklenmiş Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (PerkinElmer-L160000A, USA)'nde kaydedilmiştir (Mairet vd.,2011). FTIR pik değerleri, trigliseritlerin ester grubu (C=O) titreşimi ( $1744 cm^{-1}$ ) ve amid I absorpsiyonuna ( $1652 cm^{-1}$ ) göre değerlendirilerek nispi TAG ve karbonhidrat miktarları TAG ve karbonhidrat bantlarının amid I bandına ( $1652 cm^{-1}$ ) oranlanmasıyla belirlenmiştir.

Tüm ölçümler en az iki farklı zamanda üç tekrarlı yapılmış, 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.

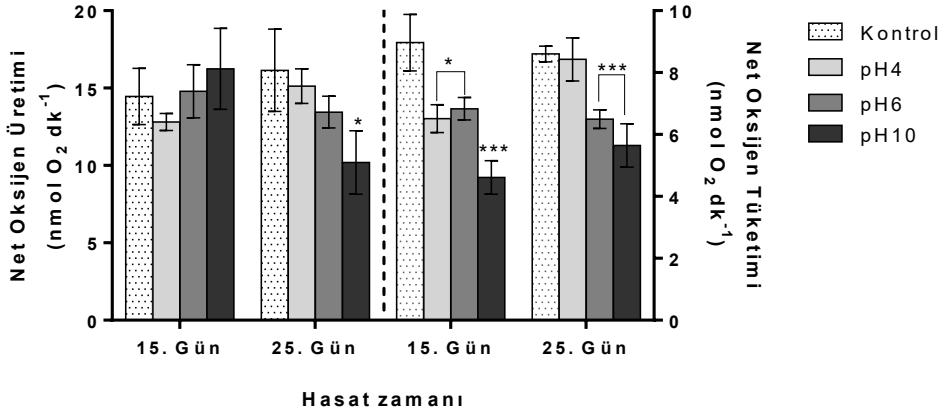
## BULGULAR

Yapılan çalışmada, *Dunaliella tertiolecta* mikroalgi, başlangıç pH değeri asidik olduğunda daha hızlı bir büyüme göstermiş, başlangıç pH değeri bazik olduğunda önemli bir değişim kaydedilmemiştir. *D.tertiolecta*'nın büyüme ortamı asidik pH, 4 ya da 6 olarak ayarlandığında 25 günlük inkübasyon periyodunun sonunda hücre yoğunluğu kontrole kıyasla yaklaşık olarak sırasıyla %27 ve %23 oranında daha fazla biyokütle ulaşmıştır. pH 10'da ise kontrole kıyasla dikkate değer bir değişim belirlenmemiştir (Şekil 1).



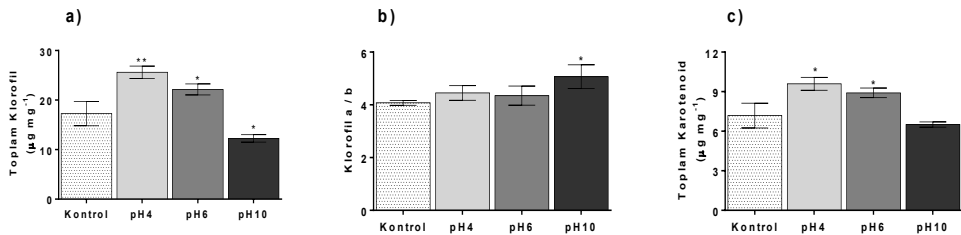
Şekil 1. *Dunaliella tertiolecta* türünün farklı pH değerlerine bağlı olarak hücre yoğunluklarındaki değişimler

İnkübasyonun son gününde kontrole kıyasla asidik pH değerlerinde net oksijen üretim hızı önemli oranda değişmezken bazik pH 10 da düşüş kaydedilmiştir. *D.tertiolecta*'nın büyüme ortamı asidik pH 6 olarak ayarlandığında 25 günlük inkübasyon periyodunun sonunda net oksijen üretim hızı kontrole kıyasla yaklaşık olarak %17 oranında düşüş göstermiş ancak bu değer istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bazik pH 10'da ise kontrole kıyasla yaklaşık olarak %37 olmak üzere önemli oranda net oksijen üretim hızı düşmüştür. İnkübasyonun 15. gününde mikroalgelerde net oksijen tüketim hızı kontrole kıyasla sırasıyla pH 4, pH 6 ve pH 10'da azalmıştır. İnkübasyonun son gününde, asidik pH 6'da kontrole kıyasla yaklaşık olarak %25 oranında düşüş sergilemiştir. Bazik pH 10'da ise kontrole kıyasla yaklaşık olarak %34 olmak üzere önemli oranda net oksijen tüketim hızı düşmüştür (Şekil 2).



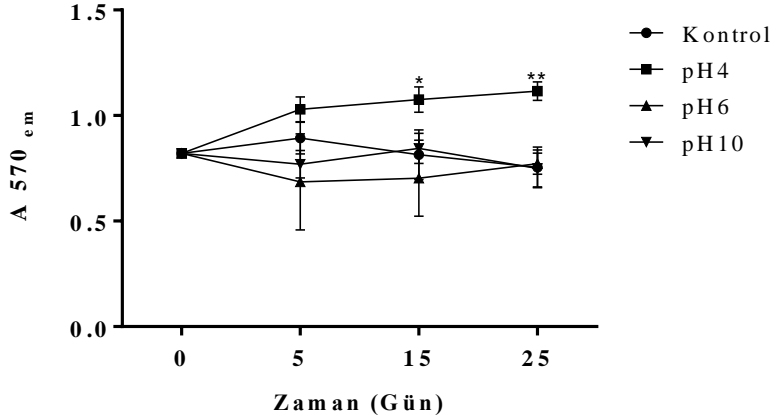
Şekil 2. *Dunaliella tertiolecta*'da farklı pH değerlerine cevapta net oksijen üretim ve tüketim hızındaki değişiklikler

Mikroalglerin toplam klorofil içerikleri kontrol grubuna kıyasla, asidik ortamlar pH 4 ya da 6 'da sırasıyla %48 ve %29 oranında artış bazik ortamda ise %28 oranında düşüş gözlenmiştir (Şekil 3a). Klorofil-a/b oranı pH 4 ve pH 6'da kontrole kıyasla önemli bir değişim göstermediği halde pH 10'da önemli oranda artış kaydedilmiştir. Klorofil-a/b oranında bazik pH'de %24 artış kaydedilmiştir (Şekil 3b). Toplam karotenoid miktarı ise pH 4 ve pH 6' da kontrole kıyasla artarken pH 10'da kontrole ve diğerlerine kıyasla azalmıştır. En yüksek karotenoid miktarı, kontrole kıyasla pH 4'te en düşük miktar ise pH'10 da gözlenmiştir. Asidik pH 4 ya da 6 'da kontrole kıyasla yaklaşık olarak sırasıyla %34 ve %24 artış gözlenirken pH 10'da görülen düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Şekil 3c).



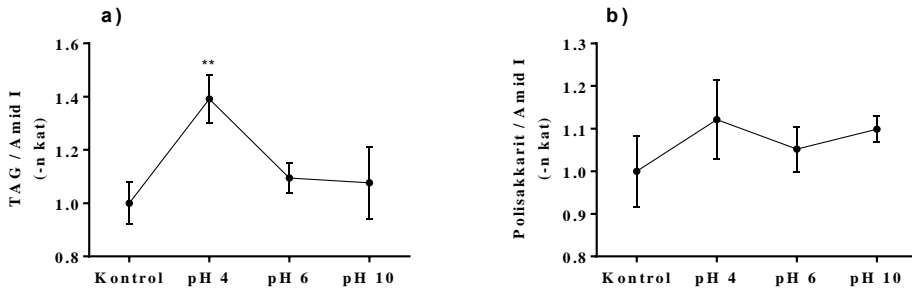
Şekil 3. *Dunaliella tertiolecta*'da farklı pH değerlerine cevapta toplam klorofil, klorofil-a/klorofil-b ve toplam karotenoid miktarındaki değişimler

Mikroalglerin çoğalma hızlarındaki artış ile toplam lipid içeriklerindeki artışlar birlikte ele alındığında 25 günlük inkübasyon periyodunun sonunda asidik pH 4 ve pH 6 değerlerinde kontrole kıyasla büyümede artış varken, pH 4'e ayarlanmış gruptaki mikroalglerin nötral lipid içeriklerindeki artış inkübasyonun 15. ve 25. günlerinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. *D.tertiolecta*'nın büyüme ortamı asidik pH 4'e ayarlandığında kontrol grubuna kıyasla inkübasyonun 15. gününde yaklaşık olarak %32, 25 günlük inkübasyon periyodunun sonunda da yaklaşık olarak % 47 daha yüksek olarak belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. *Dunaliella tertiolecta*'da farklı pH değerlerine cevapta toplam nötral lipid içeriğinde meydana gelen değişiklikler

Mikroalglerin TAG içeriklerinin belirlenmesinde Fourier Transform Infrared spektroskopisinden (FT-IR) faydalanılmıştır. Böylece yapılan diğer fizyolojik ölçümler ile birlikte farklı ortam pH'larına cevapta mikroalglerde lipid ve karbohidrat metabolizması arasındaki bağlantı ile ilgili bulgular elde edilmiştir. Elde edilen değerler; 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyları arasında alınmış olan ölçümlerden daha önce TAG için spesifik olduğu belirlenen 1744  $\text{cm}^{-1}$  ve karbohidratlar için spesifik olduğu bildirilen 1045  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunda edinilen değerlerin, çevresel değişime cevapta önemli bir değişim sergilemediği belirtilen 1652  $\text{cm}^{-1}$  de absorban veren Amid I değerine oranı ile elde edilmiştir. *D.tertiolecta*'nın büyüme ortamı başlangıç pH'sı asidik pH 4 olarak ayarlandığında inkübasyon periyodunun sonunda TAG miktarı kontrole kıyasla yaklaşık olarak %39 oranında artış göstermiştir (Şekil 5a). Asidik pH 6 ve bazik pH 10'daki düşük orandaki artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Diğer taraftan, mikroalglerin içerdikleri polisakarit miktarları üzerine başlangıç pH'sının önemli bir etkisi belirlenmemiştir (Şekil 5b).



Şekil 5. *Dunaliella tertiolecta*'da farklı pH değerlerine cevapta TAG ve polisakarit miktarlarında meydana gelen değişiklikler

## TARTIŞMA ve SONUÇ

*Dunaliella tertiolecta* türünün farklı pH değerlerine bağlı olarak hücre yoğunluğundaki değişimlere göre pH 10'da kontrole kıyasla pek bir değişim gözlenmezken asidik pH'nın (pH 4, 6) büyümeyi hızlandırdığı kaydedilmiştir (Şekil 1). Benzer çalışmalarda da yüksek pH'nın, CO<sub>2</sub>'den karbon alımını sınırladığı gibi algal büyümeyi de baskı altına aldığı (Azov, 1982; Chen ve Durbin, 1994) diğer bir deyişle yüksek pH'ın, alglerin serbest CO<sub>2</sub>'e afinitesini düşürdüğü belirtilmiştir (Azov, 1982). Pruder ve Bolton (1979), *Thalassiosira pseudonana* hücrelerinin düşük pH'a (6,5) adapte olduklarını pH (8,8)'de daha düşük büyüme hızına sahip olduklarını gözlemlemişlerdir. Benzer sonuçlar Chen ve Durbin (1994), tarafından da desteklenmiştir. Fotosentez hızı ve algal büyümenin pH 9'da minimum olduğu, fakat karbon alım hızının ortam pH'sı 8,3'e düşürüldüğünde artırıldığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmada pH 10'da kontrole kıyasla büyümede önemli bir değişim gözlenmese de inkübasyon süresi arttıkça durgun bir faz da gözlenmemiştir. Fakat Goldman vd. (1982), iki deniz mikroalg türü biri diyatom *Phaeodactylum tricorutum* ve diğeri prasinofit *Dunaliella tertiolecta*, daha önceki bulgularla tutarlı olarak 9,5'un üzerindeki pH değerlerini tolere edemediklerini bildirmişlerdir. İki türün pH 8,0-8,2'de maksimum durgun faz biyoması verdiğini gözlemlemişlerdir. Bazı araştırmacılara göre de fitoplankton büyüme hızındaki pH'a bağlı değişimlerin gerçekte çözünmüş inorganik karbon çeşitlenmesi ve konsantrasyonu yüzünden olabileceği rapor edilmiştir (Gensemer vd., 1993).

Alkali pH'a benzer asidik koşullar da besin alımını değiştirebilir (Gensemer vd.,1993) veya metal toksisitesini uyarabilir (Anderson ve Morel, 1978) ve böylece algal büyümeyi etkileyebilir. Yapılan bu çalışmada 25 günlük inkübasyon süresince asidik pH değerlerinde mikroalglerin büyümesi artmıştır (Şekil 1). *Dunaliella tertiolecta* mikroalgi, başlangıç pH değeri asidik olduğunda daha hızlı bir büyüme göstermiş, başlangıç pH değeri bazik olduğunda önemli bir değişim olmamıştır. Büyüme ortamı asidik pH 4 ya da 6 olarak ayarlandığında 25 günlük inkübasyon periyodunun sonunda hücre yoğunluğu kontrole kıyasla yaklaşık olarak sırasıyla %27 ve %23 oranında artmıştır. Kontrol dâhil tüm gruplarda inkübasyon süresi arttıkça büyüme giderek artmıştır. Bu sonuçlar inkübasyon süresinin pH ile birlikte büyüme üzerinde etkili bir faktör olduğunu göstermiştir. Fakat önceden de belirtildiği gibi, alglerin çoğu türü maksimum olarak nötral pH (7,0-7,6) civarında büyür. Bu durum *Ceratium lineatum*, *Heterocapsa triquetra* ve *Prorocentrum minimum* (Hansen, 2002) ve *Chlamydomonas applanata* (Visviki ve Santikul, 2000) türleriyle çalışıldığında da gözlemlenmiştir. Visviki ve Santikul (2000), *Chlamydomonas applanata* 'da pH 1,4-8,4 aralığı içinde nokta artışlarla büyümeyi gözlemlemişlerdir. Araştırmalarının sonucunda, pH 1,4 'den 3,4'e hiçbir büyüme gözlenmezken beş güne kadar ki süreçte pH 5,4 ile 8,4 arasında *katsal* büyüme olduğunu ve optimum büyümenin pH 7,4'te gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

*D.tertiolecta*'nın büyüme ortamı asidik pH 4 olarak ayarlandığında net oksijen üretim ve tüketim hızlarında kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişim kaydedilmemiştir. Diğer taraftan ortam başlangıç pH'sı 6 olarak ayarlandığında 25 günlük inkübasyon periyodunun sonunda net oksijen üretim hızı kontrole kıyasla yaklaşık olarak %17 oranında düşüş gösterirken bazik pH 10'da ise kontrole kıyasla yaklaşık olarak %37 olmak üzere önemli oranda net oksijen üretim hızı düşmüştür. Net oksijen tüketim hızı ise, asidik pH 6'da 25 günlük inkübasyon periyodunun sonunda kontrole kıyasla yaklaşık olarak %25 oranlarında düşüş sergilemiştir. Bazik pH 10'da kontrole kıyasla yaklaşık olarak %34



olmak üzere önemli oranda net oksijen tüketim hızı düşmüştür. Cabello vd. (2015), *Scenedesmus obtusiusculus* mikroalginde ortam pH değerleri nötralden uzaklaştıkça fotosentez ve solunum hızlarında düşüşler olduğunu bildirmiştir.

Çalışmada toplam klorofil miktarı kontrole kıyasla en yüksek miktar pH 4'te en düşük miktar pH 10'da gözlenmiştir. Asidik ortamlar pH 4 ya da 6 'da sırasıyla toplam klorofil miktarları %48 ve %29 oranında artış bazik ortamda ise %28 oranında düşüş göstermiştir. Klorofil-a/b oranında ise pH 4 ya da 6 'da kontrole kıyasla önemsenmeyecek derecede artış görülürken bazik pH 10 da %24 artış kaydedilmiştir. Toplam karotenoid miktarı ise kontrole kıyasla pH 4'te en yüksek, pH 10 da ise en düşük miktarda gözlenmiştir. Asidik pH 4 ya da 6 'da kontrole kıyasla yaklaşık olarak sırasıyla %34 ve %24 artış göstermiştir. Başka bir çalışmada ise Coleman ve Colman (1981), *Coccochloris peniocyctis*'de fotosentez üzerine dış pH'ın etkilerini araştırmışlar ve totalde birikmiş karbon ve oksijen oluşumunda pH 5,0 ve 6,0'da önemli bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Hücre dışındaki pH'nın değişimi sadece büyüme hızını değil ayrıca hücre dışı üretimi de etkilemektedir (Myklestad ve Swift, 1998). Fotosentez yapma etkinlikleri yapılarında bulundukları klorofil ve karotenoid miktarları ile paralellik göstermektedir. Stres altındaki mikroalglerin fotosentez hızını yavaşlatmak için çoğunlukla klorofil içeriklerini azaltmaları da beklenen bir sonuçtur. Alglerin CO<sub>2</sub>'e olan afinitesi düşük pH'da artmaktadır (Azov,1982). *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginin karbon alımı üzerine pH'ın etkilerini gösteren iki önemli çalışmada nötral pH'nın altında (pH<7,0) fotosentez için CO<sub>2</sub>'in etkili kullanıldığı (Moroney ve Tolbert,1985), ve bazik pH'da (pH 7,0-9,5) ise karbonik asiti etkili karbon kaynağı olarak kullandığı rapor edilmiştir (Colman vd., 2002).

Fotosentez etkinliği mikroalglerin lipid içeriklerinde de meydana gelen değişim üzerine etkili bir faktördür (Thompson, 1996). Bu çalışmada asidik pH 4, mikroalglerde klorofil miktarını buna bağlı büyümeyi de artırarak fotosentezi aktive ettiği gibi trigiliserit birikiminde de artışa neden olmuştur. *D.tertiolecta*'nın büyüme ortamı asidik pH 4'e ayarlandığında 25 günlük inkübasyon periyodunun sonunda nötral ipit miktarı yaklaşık olarak % 47 artmıştır. pH 6'da ve pH 10'da ise önemsenmeyecek değerler ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde *D.tertiolecta*'nın büyüme ortamı asidik pH 4 'te inkübasyon periyodunun sonunda TAG miktarları kontrole kıyasla yaklaşık olarak sırasıyla %39 artış göstermiştir. pH'ın uyarıcı stres etkisi nedeniyle lipid birikiminin gerçek mekanizmasının bilinmediği fakat yapılan birkaç çalışmada ise *Chlorella CHLOR-1*'da alkali pH'ın lipid birikimini uyardığı (Guckert ve Cooksey , 1990) ve bunun morfolojik araştırmalarla da desteklendiği görülmüştür (Shah vd., 2013). Yine benzer sonuçlar *Chlorella sp.*'de pH - 8'de %23 lipid birikimiyle maksimum lipid üretimi 0,1995 g/L olarak bulunmuştur (Rai vd., 2013). Asit tolere eden alglerde ise hücre metabolizmayı devam ettirmek için bir mekanizmanın geliştiği ve algal büyümenin asidik koşullar altında pek etkilenmediği belirtilmiştir (Gehl ve Colman, 1985). Böyle bir mekanizma asit tolere eden algleri dış pH dalgalanmalarına cevapta iç pH'ı ayarlama yeteneği sağlayacaktır. *Dunaliella acidophila* gibi bazı algler büyüme ortamında asidik koşullara, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ün yüksek konsantrasyonlarının sebep olduğu ozmotik dengesizliği önlemek için gliserol biriktirerek adapte olmakta (Fuggi vd., 1988) diğer türler *Chlamydomonas sp.* ve *Pinnilaria braunii var. amplicephala* (asidofil olmayan diyatom) hayli asidik koşullar (pH 1) altında triaçilgliseritler gibi depo lipidleri biriktirmektedirler. Asidik koşullar altında incelenen diğer bir adaptasyon membran akışkanlığını düşüren ve yüksek proton konsantrasyonunu inhibe eden doymuş yağ asidi miktarındaki artış olmuştur (Brennan ve Owende, 2010).

Böyle bir adaptasyon *Chlamydomonas* sp.,’de rapor edilmiş olup toplam yağ asidi miktarı pH 7’de %2 den pH 2,7’de %2,4 ‘e artmıştır (Poerschmann vd., 2004).

Mikroalgler metabolizmalarındaki işleyişe bağlı olarak değişen oranlarda protein, karbohidrat, yağ ve nükleik asit içerirler. Lipidler ve yağ asitleri ise depolama ürünleri ve enerji kaynağı olarak sentezlenmektedir. Dolayısıyla mikroalgler strese maruz kaldıklarında, sitoplazmalarında serbest yağ cisimleri biriktirme eğiliminde olup üretilen doğal yağ (lipid) formunun, biyodizel üretimi için uygun yapıda oluşu, onları biyodizel üretiminde ayrıcalıklı bir yere koymuştur. Bu çalışmada, *D. tertiolecta* mikroalginde özellikle düşük pH’ a cevapta büyüme hızı, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarındaki artışa paralel olarak nötral lipid ve triaçilgliserol üretiminde de artış olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, bazik pH’da ise mikroalglerin çoğalma hızında önemli bir değişim belirlenmezken, toplam korofil ve karotenoid miktarlarında düşüş, net oksijen üretim ve tüketim hızlarında azalma olmuş, nötral lipid ve triaçilgliserol üretiminde dikkate değer bir değişim gözlenmemiştir. Elde edilen sonuçlar *D.tertiolecta*’dan biyodizel hammaddesi üretimi için ortam pH’sını düşürmenin etkili bir sonuç alınabilecek pratik bir yöntem olduğunu göstermiştir.

## KAYNAKLAR

- Anderson, D.M. & Morel, F.M.M. (1978). Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnol. Oceanogr.*, 23, 283–295.
- Avron, M. & Ben-Amotz, A. (eds) (1992). *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton.
- Azov, Y. (1982). Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1300–1306.
- Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (1988a). Algal growth media sources of algal culture. In *Micro-algal Biotechnology*. ed. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. University Press, New York: Cambridge, pp. 465–465.
- Brennan, L. & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 14, 557–577.
- Cabello, J., Cervantes A.T., Sánchez L., Revah S. & Morales, M. (2015). Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresource Technol.*, 181, 128-135.
- Chen, C.Y. & Durbin, E.G. (1994). Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 109, 83–94.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
- Coesel, S. N., Baumgartner, A. C., Teles, L. M., Ramos, A. A., Henriques, N. M., Cancela, L. & Varela, J. C. S. (2008). Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Mar. Biotechnol.*, 10, 602–611.
- Coleman, J.R. & Colman, B. (1981). Inorganic carbon accumulation and photosynthesis in a blue-green alga as a function of external pH. *Plant Physiol.*, 67, 917–921.
- Colman, B., Huertas, I.E., Bhatti, S. & Dason, J.S. (2002). The diversity of inorganic carbon acquisition mechanisms in eukaryotic microalgae. *Funct. Plant Biol.*, 29, 261–270.
- Elenkov, I., Stefanov, K., Dimitrova Konaklieva, S. & Popov, S. (1996). Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora vagabunda*. *Phytochemistry*, 42, 39–44.
- Elsley, D., Jameson, D., Raleigh, B. & Cooney, M.J. (2007). Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 639–642.

- Fuggi, A., Pinto, G., Pollio, A. & Taddei, R. (1988). The role of glycerol in osmoregulation of the acidophilic alga *Dunaliella acidophila* (Volvocales, Chlorophyta): Effect of solute stress on photosynthesis, respiration and glycerol synthesis. *Phycologia*, 27, 439–446.
- Gehl, K.A. & Colman, B. (1985). Effect of external pH on the internal pH of *Chlorella saccharophila*. *Plant Physiol.* 77, 917–921.
- Gensemer, R.W., Smith, R.E.H. & Duthie, H.C. (1993). Comparative effects of pH and aluminum on silica limited growth and nutrient uptake in *Asterionella ralfsii* var. *Americana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 29, 36–44.
- Ghoshal, D., Mach, D., Agarwal, M., Goyal, A. & Goyal, A. (2002). Osmoregulatory isoform of dihydroxyacetone phosphate reductase from *Dunaliella tertiolecta*: Purification and characterization. *Protein Expr. Purif.*, 24, 404–411.
- Goldman, J.C., Azov, Y., Riley, C.B., & Dennett, M.R. (1982). The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. biomass regulation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 57, 1–13.
- Guckert, J.B. & Cooksey, K.E. (1990). Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH induced cell cycle inhibition. *J. Phycol.* 26, 72–79.
- Hadi, M. R., Shariati, M. & Afsharzadeh, S. (2008). Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by *Dunaliella* sp. algae isolated from the Gave khooni salt marsh, Iran. *Biotech. Bioproc. Eng.*, 13(5), 540–544.
- Hansen, P.J. (2002). Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: Implications for species succession. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 279–288.
- Hejazi, M.A. & Wijffels, R.H. (2003). Effect of light intensity on production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. *Biomol. Engin.* 20(4- 6), 171–175.
- Hoham, R. W., Bonome, T. A., Martin, C. W. & Leebens-Mack, J. H. (2002). A combined 18S rDNA and rbc-L phylogenetic analysis of *Chloromonas* and *Chlamydomonas* (Chlorophyceae, Volvocales) emphasizing snow and other cold-temperature habitats. *J. Phycol.*, 38,1051–64.
- Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol. Pflanz*, 167,191-194.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, 148,350-382.
- Mairet, F., Bernard, O., Masci, P., Lacour, T. & Sciandra, A. (2011). Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis affinis galbana* under nitrogen limitation. *Bioresource Technology*, 102, 142–149.
- Moroney, J.V. & Tolbert, N.E. (1985). Inorganic carbon uptake by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, 77, 253–258.
- Myklestad, S.M. & Swift, E. (1998). A new method for measuring soluble cellular organic content and a membrane property,  $T_m$ , of planktonic algae. *Eur. J. Phycol.*, 33,333–336.
- Poerschmann, J., Spijkerman, E. & Langer, U. (2004). Fatty acid patterns in *Chlamydomonas* sp. as a marker for nutritional regimes and temperature under extremely acidic conditions. *Microb. Ecol.*,48, 78–89.
- Pruder, G.D. & Bolton, E.T. (1979). The role of CO<sub>2</sub> enrichment of aerating gas in the growth of an estuarine diatom. *Aquaculture*,17, 1–15.
- 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 Bioenergy*, 58, 251–257.
- Schenk P, Thomas-Hall S, Stephens E, Marx U, Mussgnug J, Posten C et al (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Res.*, 1(1),20–43

- Shah, M.U.S., Radziah, C.C., Ibrahim, S., Latiff, F. & Othman M.F. (2013). Effects of photoperiod, salinity and pH on cell growth and lipid content of *Pavlova lutheri*. *Ann. Microbiol.*, 64, 157-164. DOI: 10.1007/s13213-013-0645-6.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H. & Schenk, P. M. (2012). High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies*, 5,1532-1553.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101,87-96.
- Takagi, M. & Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 101,223–226.
- Thompson, Jr. G. A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta.* 1302,17–45.
- Tsukahara, K. & Sawayama, S. (2005). Liquid Fuel Production using Microalgae. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 48(5),251-259
- Van den Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H.M. (1995). *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Visviki, I. & Santikul, D. (2000). The pH tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 38, 147–151.
- Widjaja, A., Chien, C.C. & Ju, Y.H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 40, 13–20.