

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**EĞİRDİR GÖLÜNDEN İZOLE EDİLEN
YEŞİL MİKROALG (CHLOROPHYTA)
Scenedesmus protuberans Fris.'in
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN
ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeliha DEMİREL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: **612.01.00**

Sunuş Tarihi : 30.05.2006

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Meltem CONK DALAY

Bornova-İZMİR

Sayın **Zeliha DEMİREL** tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan **“Eğirdir Gölünden İzole Edilen Yeşil Mikroalg (Chlorophyta) *Scenedesmus protuberans* Fris.’ in Antimikrobiyal ve Antioksidan Özelliğinin Araştırılması”** başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **30.05.2006** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Meltem CONK DALAY

.....

Üye :Doç. Dr. Erdal BEDİR

.....

Üye : Doç. Dr. Atakan SUKATAR

.....

ÖZET

**EĞİRDİR GÖLÜNDEN İZOLE
EDİLEN YEŞİL MİKROALG
(CHLOROPHYTA) *Scenedesmus
protuberans* Fris.'in
ANTİMİKROBİYAL VE
ANTIOKSİDAN ÖZELLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DEMİREL, Zeliha

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Meltem CONK DALAY

Mayıs 2006, 147 Sayfa

Bu çalışmada, alg biyokütlesine etki eden optimum parametrelerin ve farklı koşullarda yetiştirilen hücrelerin antioksidan ve antibakteriyal aktivitelerindeki değişimin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Isparta' nın Eğirdir gölünden izole edilen yeşil bir mikroalg olan *Scenedesmus protuberans* Fritsch.'in antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. *S. protuberans*' ın farklı kültür ortamlarında, ışık şiddetlerinde ve sıcaklıklarda büyüme eğrileri araştırılmıştır. Daha sonra *S. protuberans* Soxhlet aparatı kullanılarak farklı çözücülerde ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon metodu ile 9 bakteri ve 1 mayaya karşı uygulanmıştır. β -karoten renk açılması ve DPPH ölçüm metotları kullanılarak antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bundan başka, Fenol-Ciocalteau prosedürü kullanılarak ekstraktların fenolik içerikleri belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Scenedesmus protuberans*, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, β -karoten renk açılması, DPPH ölçümü, Fenol-Ciocalteau.

ABSTRACT

**Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of
Green Microalgae (Chlorophyta)
Scenedesmus protuberans Fris. Isolated From Lake Egirdir**

DEMIREL, Zeliha

MSc. in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

May 2006, 147 Pages

Aim of this study are to determine optimum parameters affecting the algal biomass of *Scenedesmus protuberans* and to investigate antimicrobial and antioxidant activity variations of the algae grown in different conditions.

The green microalgae *Scenedesmus protuberans* Fritsch., isolated from the Egirdir Lake, Isparta, Turkey, was examined for its antioxidant and antimicrobial activities. Growth curves of *S. protuberans* grown in different culture media, light intensities and temperatures were studied. Then *S. protuberans* was extracted with different solvents by using Soxhlet apparatus. The extracts were tested against 9 bacteria and 1 yeast by the disc diffusion method for the antimicrobial activity. Antioxidant activity was evaluated by using β -carotene bleaching and DPPH methods. Furthermore, phenolic content of the extracts were determined by Fenol-Ciocalteau procedure.

Keywords: *Scenedesmus protuberans*, antimicrobial activity, antioxidant activity, β -carotene bleaching, DPPH assay, Fenol-Ciocalteau.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında bana her zaman destek olan danışmanım Doç. Dr. Meltem CONK DALAY'a çok teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren ve destekleyen Doç. Dr. Erdal BEDİR' e, ve yardımlarından dolayı Doç. Dr. Atakan SUKATAR'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım sırasında sorularımı yanıtlayan ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR'e, Ebru MANAV' a ve Ferda Fethiye YILMAZ KÖZ'e çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu aşamasında da maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan sevgili ailem; annem Gülseren DEMİREL, babam Nuh DEMİREL, ablam Zeynep AKSU ve enişteme Erdal AKSU'ya bana inandıkları ve güvendikleri için tüm kalbimle teşekkür ederim.

.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XXIII
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Mikroalgler.....	3
2.1.1 Mikroalglerden elde edilen antibiyotikler	6
2.1.2 Karotenoidler.....	8
2.1.3 Antioksidan ve antimikrobiyal aktivite.....	12
2.2 Mikroalg Üretimi İçin Gerekli Olan Faktörler	21
2.2.1 Işık.....	22
2.2.2 Sıcaklık.....	24
2.2.3 Besin faktörleri	25
2.3 Mikroalg Üretim Sistemleri	27
2.4 Mikroalg Alt Akım İşlemleri	32
2.4.1 Hasat.....	32
2.4.2 Kurutma.....	40
2.4.3 Hücre parçalama.....	44

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devamı)

	<u>Sayfa</u>
2.4.4 Ekstraksiyon.....	48
2.5 <i>Scenedesmus sp.</i>	53
2.5.1 <i>Scenedesmus sp.</i> 'nin genel özellikleri	53
2.5.2 <i>Scenedesmus protuberans</i> ' ın sistematığı	56
2.5.3 <i>Scenedesmus sp.</i> 'nin hücre biyolojisi	58
2.5.4 <i>Scenedesmus sp.</i> 'nin kimyasal kompozisyonu ...	60
2.5.5 <i>Scenedesmus sp.</i> ticari üretimi yapan ülkeler	63
3. MATERYAL VE METOT	65
3.1 Materyal	65
3.1.1 Organizma	65
3.1.2 Mikroorganizmalar	65
3.1.3 Kültür ortamları	65
3.1.4 Mikrobiyolojik Besiyeri.....	68
3.1.5 Işık kaynağı.....	69
3.1.6 Ekipmanlar	70
3.1.7 Kimyasallar	70
3.2 Metot.....	71
3.2.1 Stok kültür hazırlanması	63
3.2.2 İnokulum hazırlanması	72

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devamı)

Sayfa

3.2.3 Kültür sistemleri.....	73
3.2.4 Hücre konsantrasyonunun belirlenmesi	75
3.2.5 Büyüme hızı hesaplamaları	78
3.2.6 Ekstraksiyon.....	78
3.2.7 Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan metotlar	81
3.2.8 Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan metot.....	84
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	86
4.1 <i>Scenedesmus protuberans</i> 'ın Üretiminde Işık, Sıcaklık Ve Kültür Ortamının Etkisi.....	86
4.1.1 Işık kaynağının etkisi	86
4.1.2 Kültür ortamlarının etkisi.....	106
4.1.3 Spesifik büyüme hızlarının etkisi.....	112
4.1.4 Optimum üretim koşullarının seçilmesi, hasat ve verim.....	113
4.2 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi.....	114
4.2.1 β -Karoten renk açılması sonuçları	114

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devamı)

	<u>Sayfa</u>
4.2.2 DPPH süpürme aktivitesi sonuçları	118
4.2.3 Toplam fenol analizi sonuçları	120
4.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	123
4.3.1 Disk difüzyon metodunun sonuçları	123
5. ÖNERİLER	132
KAYNAKLAR DİZİNİ	133

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Karotenoid sentezi.....	11
2.2 Hayvan hücre zarında astaksantin, β -karoten ve C vitamininin bulunması.....	14
2.3 Algal biyokütlenin elde edilmesi için gerekenler.....	22
2.4 <i>Haematococcus</i> hücresinin foto koruyucu astaksantin sistemi.	23
2.5 Alglerin heterotrofik ve otorotrof gelişimi.....	27
2.6 Şekilde yeni ikili otomatik hedefli mikrodalga yardımcılı Soxhlet ekstraksiyonu	48
2.7 Karbondioksit için basınç sıcaklık faz diyagramı	49
2.8 Süperkritik ekstraksiyon ve çözünürlük belirlenmesinde şematik akış planı.....	51
2.9 Mikroalglerden EPA'nın elde ediliş şeması.....	53
2.10 <i>Scenedesmus</i> 'un değişik türleri	54
2.11 Kardeş coenobia oluşması.....	55
2.12 <i>Scenedesmus protuberans</i>	56
2.13 <i>Scenedesmus maximus</i> ' un hücre duvarı yapısı	60
2.14 <i>Scenedesmus</i> ' un karotenoid biyosentezi	61
3.1 Stok kültür hazırlanması	72

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.2 Kültür dolabındaki üretim.....	74
3.3 Denemelerde kullanılan 2L kültür kabı	74
3.4 Kültür dolabındaki üretim.....	74
3.5 Kesikli kültürün büyüme eğrisi.....	75
3.6 Neubauer kamarası	77
3.7 Soxhlet aparatında ekstraksiyon	80
4.1 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki farklı kültür ortamlarından alınan örneklerin zamana karşı hücre sayım değerleri.....	87
4.2 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 750 nm'deki absorbans değerleri	88
4.3 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 685 nm'deki absorbans değerleri	89
4.4 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 650 nm'deki absorbans değerleri	89

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 560 nm'deki absorbans değerleri.....	90
4.6 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD ortamlarının zamana karşı pH değerleri değişimi	91
4.7 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki farklı kültür ortamlarından alınan örneklerinin zamana karşı hücre sayım değerleri	92
4.8 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 750 nm'deki absorbans değerleri.....	93
4.9 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 685 nm'deki absorbans değerleri.....	94

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.10 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 650 nm'deki absorbens değerleri	95
4.11 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 560 nm'deki absorbens değerleri	95
4.12 <i>S. protuberans</i> için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD ortamlarının zamana karşı pH değerleri değişimi	96
4.13 <i>S. protuberans</i> için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki farklı kültür ortamlarından alınan örneklerin zamana karşı hücre sayım değerleri	97
4.14 <i>S. protuberans</i> için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve Patent kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 750 nm'deki absorbens değerleri	98

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

Sekil**Sayfa**

- 4.15** *S. protuberans* için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 685 nm'deki absorbans değerleri..... 99
- 4.16** *S. protuberans* için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 650 nm'deki absorbans değerleri..... 100
- 4.17** *S. protuberans* için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 560 nm'deki absorbans değerleri..... 100
- 4.18** *S. protuberans* için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD ortamlarının zamana karşı pH değerleri değişimi 101
- 4.19** *S. protuberans* için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki farklı kültür ortamlarından alınan örneklerin zamana karşı hücre sayım değerleri 102

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

Sekil

Sayfa

- 4.20** *S. protuberans* için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 750 nm'deki absorbans değerleri 103
- 4.21** *S. protuberans* için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 685 nm'deki absorbans değerleri 104
- 4.22** *S. protuberans* için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 650 nm'deki absorbans değerleri 104
- 4.23** *S. protuberans* için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 560 nm'deki absorbans değerleri 105
- 4.24** *S. protuberans* için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD ortamlarının zamana karşı pH değerleri değişimi 106

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.25 <i>S. protuberans</i> için BBM ortamın 22° C deki 15 ve 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi	107
4.26 <i>S. protuberans</i> için BBM ortamın 28° C deki 15 ve 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi	108
4.27 <i>S. protuberans</i> için BG-11 ortamın 22° C deki 15 ve 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi	109
4.28 <i>S. protuberans</i> için BG-11 ortamın 28° C deki 15 ve 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi.....	109
4.29 <i>S. protuberans</i> için RD ortamın 22° C deki 15 ve 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi	110
4.30 <i>S. protuberans</i> için RD ortamın 28° C deki 15 ve 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi.....	111

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.31 Kör, standart (BHT) ve BBM ortamında, 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22° C sıcaklıkta yetiştirilen <i>S. protuberans</i> 'ın metanol, kloroform ve aseton ekstralarının (örneklerin) zamana göre β -karoten süpürme oranları	115
4.32 Kör, standart (BHT ve Vitamin E) ve 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22° C ve 28° C sıcaklıklarda, BBM, BG-11 ve RD ortamlarında yetiştirilen <i>S. protuberans</i> ' ın metanol ekstralarının (örneklerin) zamana göre β -karoten süpürme oranları	117
4.33 BBM ortamında 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22° C sıcaklıkta <i>S. protuberans</i> 'ın metanol, kloroform ve aseton ekstralarının DPPH % süpürme aktivitesi	119
4.34 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22° C ve 28° C sıcaklıklarda, BBM, BG-11 ve RD ortamlarında ve yetiştirilen <i>S. protuberans</i> 'ın metanol ekstralarının DPPH % süpürme aktivitesi.....	120
4.35 BBM ortamında 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22° C sıcaklıkta yetiştirilen <i>S. protuberans</i> 'ın metanol, kloroform ve aseton ekstralarının antioksidan aktivite ile toplam fenol içeriğinin bağlantısı	121
4.36 Gallik asit kullanılarak çizilen R^2 grafiği.....	122

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.37 22°C ve 28°C sıcaklıklarda BBM, BG-11 ve RD ortamında yetiştirilen <i>S. protuberans</i> 'ın metanol ekstrelerinin antioksidan aktivite ile toplam fenol içeriğinin bağlantısı.....	123
4.38 <i>S. protuberans</i> ekstresinin <i>Escherichia cloaceae</i> 'e karşı etkisi	127
4.39 <i>S. protuberans</i> ekstresinin <i>B. subtilis</i> 'e karşı etkisi	129
4.40 <i>S. protuberans</i> ekstresinin <i>Streptococcus faecalis</i> 'e karşı etkisi	129
4.41 22°C ve 28°C sıcaklıklarda BBM, BG-11 ve RD ortamında ve yetiştirilen <i>S. protuberans</i> 'ın metanol ekstrelerinin ince tabaka kromatografisi (TLC).....	130
4.42 22°C ve 28°C sıcaklıklarda BBM, BG-11 ve RD ortamında ve yetiştirilen <i>S. protuberans</i> 'ın metanol ekstrelerin ince tabaka kromatografisinin (TLC) 254 nm görünümü	131

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Alg ürünlerinin ticari uygulaması	5
2.2 Mikroalglerin sentezledikleri karotenoidler	10
2.3 Ticari kullanılan mikroalg kültür sistemleri ve algal türlerin kültürleri	29
2.4 Farklı ticari algal kültürler sistemlerinin özelliklerinin karşılaştırılması	31
2.5 Mikroalglerin hasatında kullanılan bazı santrifüjlerin karşılaştırılması	40
2.6 Alglerin kurutmasında kullanılan kurutma işlemleri	41
2.7 Çözücülerin sınıflandırılması	46
2.8 <i>Dunaliella salina</i> ’ dan β -karoten ekstraksiyonu için kullanılan metotlar	52
2.9 İnsan gıdaları ve farklı alglerin kuru ağırlıklarındaki (%) kimyasal kompozisyonu	62
2.10 Farklı sınıflardaki alglerin lipid içeriği	63
2.11 <i>Scenedesmus</i> üreten şehirler ve ülkeleri	64
3.1 Bold’s Basal Ortamı’nın Kompozisyonu	66
3.2 Blue Gren Algae (BG-11) ortamı kompozisyonu	67

ÇİZELGELER DİZİNİ (devamı)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.3 RD Medium kompozisyonu.....	68
3.4 Kullanılan ekipman markaları ve özellikleri	70
3.5 β -Karoten renk açılması metodu.....	82
3.6 DPPH süpürme aktivitesi metodu.....	83
3.7 Toplam fenol analizi metodu	84
4.1 <i>S. protuberans</i> suşunun üretimi için farklı kültür ortamları, ışık şiddetleri ve sıcaklıklarında ulaşılan, maksimum günde en yüksek hücre konsantrasyonları ve spesifik büyüme hızları	112
4.2 β -Karoten renk açılması metodunun BBM ortamında yetiştirilen <i>S. protuberans</i> 'ın metanol, kloroform ve aseton ekstrelerinin değerleri	116
4.3 β -Karoten renk açılması metodunun değerleri	118
4.4 BBM ortamında 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22° C sıcaklıkta yetiştirilen <i>S. protuberans</i> metanol, kloroform ve aseton ekstrelerinin test organizmalarına karşı gösterdiği inhibisyon zon çapları.....	125

ÇİZELGELER DİZİNİ (devamı)

Çizelge

Sayfa

- 4.5** Standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm)..... 126
- 4.6** 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde, 22°C ve 28°C sıcaklıklarda, BBM, BG-11 ve Patent ortamında yetiştirilen *S. protuberans* 'ın metanol ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi 129

1.GİRİŞ

Mikroalgler biyokütle ve bazı metabolitleri açısından ticari öneme sahiptirler. Dünya genelinde 30.000'in üzerinde mikroalg çeşidi olduğu tahmin edilmektedir. Şu ana kadar yaklaşık 100 tanesi üzerinde akademik olarak çalışılmış ve bunlardan sadece birkaç tanesine de ticari anlamda ilgi gösterilmiştir. 1950'lerin başından itibaren, mikroalglerin büyük ölçekte gıda, yem, lipid, vitamin, pigment, gübre, farmasötik ve diğer özel kimyasalların hammadde kaynağı olarak kullanımları konusunda pek çok çalışma yürütülmüştür.

Canlılarda serbest radikalleri elimine eden antioksidanları günlük diyetlerinde almaları gerekmektedir. Bu maddeler canlıda serbest radikallerden oluşacak zarara karşı canlıyı korumaktadır. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek (onlarla bağ kurarak) hücrelere zarar vermelerini engellemişlerdir. Bu özellikleriyle hücrelerin anomalileşme ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azalttıkları için, daha sağlıklı ve yaşlılık etkilerinin minimum olduğu bir yaşam, yaşama şansımızı yükseltmektedir.

Antimikrobiyal olarak günümüzde, doğal olarak üretilen bir çok antibiyotik madde daha etkili olmaları için suni yollardan modifiye edilmişlerdir.

Mikroalgler bulundurdıkları metabolitleri ile antioksidan ve antimikrobiyel özellik gösteren maddeler içermektedir. Mikroalg üretimi için ülkemizin iklimsel koşulları ve çevre şartları çok uygundur. Bu metabolitlerin özelliklerinin ve üretim yöntemlerinin laboratuvar çalışmaları ile belirlenmesi sonucunda oluşacak bilgi birikimi üniversite ve sanayi işbirliği ile yeni, yüksek katma değerli ürünlerin ekonomiye kazandırılabilmesinde kullanılabilecektir.

Bu çalışmanın amacı; Eğirdir Gölü'nden izole edilen *Scenedesmus protuberans* türünün laboratuvar koşullarında üretim koşullarını saptamak, büyük çaplı üretim sistemlerine geçiş öncesi karşılaşılabilecek problemlerin azaltılmasında önemli bir ara basamak olarak görülmüşlerdir. Biyokütle üretiminde etkin olan parametrelerin bilinmesi büyük çaplı çalışmalara geçmek için bir ara basamak olarak değerlendirilmişlerdir. Son dönem çalışmalar yeni üretim sistemleri geliştirilmesi yanında, parametreler ve biyosentez mekanizmalarının belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada, izole edilen yerel *Scenedesmus protuberans* suşunun laboratuvar koşullarında üretim parametreleri incelenmiş ve farklı üretim koşullarında elde edilen biyokütlelerden üretilen ekstraktların verimliliği hesaplanarak birim ekstrelerin antioksidan ve antimikrobiyel aktiviteleri ölçülmüştür.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Mikroalgler

Mikroalg türleri tahmini 22.000 ile 26.000 arasındadır. Bunlardan 50 tanesinin biyokimyası ve ekofizyolojisi kesin olarak bilinmektedir. Mikroalglerin çoğu fotosentetik mikroorganizmalardır. Bazı kaynaklarda siyanobakteriler önceleri mavi-yeşil algler olarak isimlendirilmiş ve mikroalglerin içine katılmışlardır. Bu onların bazı fizyolojik benzerliklerinin yanı sıra üretim prosesinde de aynı sistemlere dayandırılmasından kaynaklanmaktadır. Fotosentetik canlılardır, oksijen çıkarırlar, doğada besin zincirinin ilk halkasıdır. Bir çok mikroalg akuatik (sucul) çevrede yaşamaktadır. Bazı türler çeşitli sucul bitkilerin ve hayvanların yüzeyinde yaşamaya uyum sağlamıştır. Alglerden meydana gelen çevre problemleri; su borularında kirliliğe yol açmaları ve suları kontamine etmeleri, yüksek azot ve fosfor bulunan sularda “algal bloom” alg patlamasına yol açmaları ve su içinde yaşayan canlıların gelişimini engellemektedir. Bazı deniz mikroalgleri (dinoflagellatlar) içeriklerinde bulunan güçlü ekzotoksinler nedeni ile kabuklu deniz hayvanlarında toksin birikimine neden olurlar ve bunun sonucunda gıda zehirlenmesine neden olurlar. Çünkü onlar güçlü ekzotoksinlere sahiptir. Alglerin endüstriyel kullanımı, biyokütlesi ve pigmentlerinin gıda ve sağlık amaçlı kullanımına yöneliktir. Şehir hayatı içinde market ve sağlık besini dükkanlarında satışa sunulan ürünler halini alırken, daha küçük çaplı üretimler ile kasabalarda atık su arıtımı ile

entegre sistemlerde proteince zengin gıda veya yem katkısı olarak kullanımı mümkün olmaktadır.

Biyolojik kütle kaynağı olarak mikroalglerin avantajları;

- ✓ Mikroalgler fotosentez yaparak ışık enerjisinden organik bileşikler üretirler,
- ✓ Biyokütlelerinin direkt olarak hasat edilip kullanılması mümkündür
- ✓ Bazı mikroalglerin içeriğinde yüksek miktarda bulunan pigmentler, proteinler, karbohidratlar, lipidler ticari değere sahiptir.
- ✓ Mikroalglerin seçilmesindeki amaç, kolay hücre bölünmesine sahip olmaları, yaşam döngüsünü birkaç saatte tamamlamaları, genetik modifikasyonlarının kolay ve hızlı olmasındandır.
- ✓ Mikroalgler yüksek tuzluluktaki sularda ve deniz suyunda gelişebilmektedir. Verimsiz topraklarda açılan havuzlarda üretim yapılması halinde bu bölgelerden protein verimliliği elde edilmesi mümkün olmaktadır,
- ✓ Algal biyokütle üretim sistemi operasyonu ustalık ve yatırım istemektedir. Örneğin; tam otomatik olmayan kısımlarda iş gücüne ve maddi kaynağa ihtiyaç olmaktadır (Sasson,1997).

Mikroalg kültürleri genellikle bakteri ve mayalara göre daha kompleks ve pahalı olmaktadır. Çünkü alglerin gelişim oranı yavaş olmakta ve biyoreaktör dizaynlarında ışığa ihtiyaç duymaktadır (Sasson, 1997).

Mikroalglerin biyokütleleri farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Örneğin; hayvan beslenmesinde, organik gübre olarak, toprak koşullarını düzenleyici, akuakültürde besin olarak, hızlı gelişmekte olan ülkelerin halk sağlığı problemlerinin çözülmesine yardımcı olarak ve ayrıca atıkların biyolojik arıtımında uygulanmaktadır. Son gelişmeler ışığında alglerin potansiyel ürünleri olarak farmasötik amaçlı; polisakkaritler, lipidler, proteinler, karotenoidler, pigmentler, vitaminler, steroller, enzimler, antibiyotikler ve diğer kimyasallar (prekürsörler); hidrojen, hidrokarbonlar ve diğer yakıtlar (metan, alkol vb) gibi çeşitli bileşikler elde edilmektedir (Çizelge 2.1) (Becker, 1995).

Çizelge 2.1 Alg ürünlerinin ticari uygulaması (Becker, 1995)

I- Gıda	Yetersiz beslenen çocuk ve yetişkinlerin beslenmesinde protein ilavesi olarak
II-Yem	Kümes, inek, domuz, balık ve bivalerin beslenmesinde protein ve vitamin ilavesi olarak
III-Sağlıklı Beslenme Ürünleri	Sağlıklı besin ürünlerinde algal biyokütlenin katkı ve destek amacıyla kullanımı
IV- Terapötik	Deri kanseri tedavisinde β -karoten kullanılmaktadır. Algal antibiyotikler tedavide, hidroksilazitler deri metabolizmasını yükseltmekte ve prostagladin γ -linoleik asiti stimüle etmektedir. İsootropik bileşikler kolesterol sentezini düzenlemektedir.
V- Pigmentler	β -karoten (Provitamin A) gıda renklendiricisi ve gıdalara ilave edilmektedir. Ksantofiller tavuk ve balık beslenmesinde, fikobilinler gıda renklendirici, tanı kiti, kozmetik ve analitik ayıraç olarak kullanılmaktadır.
VI- Kimyasal Kaynak Olarak	Gliserol gıdalarda, farmasötiklerde, kozmetiklerde, meşrubatlarda kullanılmaktadır. Yağ asitleri, lipidler, vakslar, steroller, hidrokarbonlar, aminoasitler, enzimler, vitamin E ve C, polisakkaritler, yapıştırıcı ve iyon değiştirici olarak kullanılmaktadır.
VII- Yakıtlar	Uzun zincirli hidrokarbonlar ve esansiyel yağlar, yanabilir yağlar, hidrojen ve biyogaz
VIII- Hormonlar	Oksinler, giberellinler ve sitokinler
X- Diğerleri	Organik gübreler, toprak iyileştiriciler, atık arıtımı

Son yıllarda mikroalg kültürleri biyolojik ve fizyolojik çalışmalarda denenmiş ve yaşayan organizmalar için çeşitli kimyasal ajanların etkileri test edilerek uygun ortamlar bulunmuştur.

Sağlıklı beslenme amaçlı yapılan kültürlerden genellikle filamentli siyanobakteri *Spirulina sp.* ve tek hücreli yeşil alg *Chlorella sp.* üretimi yapılmakla beraber az miktarda *Scenedesmus sp.* kültürü yapılmaktadır (Becker, 1995).

Pigment üretiminde *Spirulina sp.*, *Dunaliella sp.* ve *Haematococcus sp.* tercih edilmiştir. Alg kültürlerinde kullanılan cihazlar hızla gelişmektedir. Modern araştırmaların ilgi alanları olarak; taksonomi, morfoloji, fizyoloji, biyokimya, genetik mühendisliği, doku kültürü, gıda üretimi, ziraat, tıp ve atık arıtımı oluşturmaktadır (Becker, 1995, Tripathi et al., 2000).

Ticari üretimde dış ortamda kültüre edilen mikroalgler açık havuzlarda yetiştirilmektedir. Buralarda belirleyici faktör çevre koşulları olduğu için pH, sıcaklık, azot seviyesi, tuzluluk ve CO₂ miktarı gibi koşulların kontrolü zor olmaktadır (Tripathi et al., 2000).

2.1.1 Mikroalglerden elde edilen antibiyotikler

Doğal antibiyotiklerin sayısının yaklaşık 13500 olduğu bulunmuştur. Bunların 5500 tanesi aktinomisetlerden, 3300 tanesi yüksek yapılı bitkilerden elde edilirken, günümüzde yaklaşık 90 tanesi

kullanılmaktadır. Doğal ürünler ilaç olarak kullanılmakla birlikte aynı zamanda sentetik analoglarının hazırlanmasında ve yapı aktivite çalışmalarında model teşkil etmiştir. Son yıllarda biyoaktif moleküllerin veya yeni bileşikler için öncü olabilecek bileşiklerin keşfine ihtiyaç duyulmuştur. Mikroalgler bu tip bileşikler için önemli potansiyele sahiptir.

1953 yılında yapılan çalışmalarda mikroalglerin antibiyotik ürettiği ve ardından çok sayıda mikroalg ekstraktı ve ekstrasellüler ürünün antimikrobiyel (antibakteriyel, antifungal, antiprotozoal) aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. 1988’de yapılan bir çalışmada 300 tatlı su alginin %10’unda antibakterial aktivite, 532 deniz ve tatlı su alginin ise %5’inde antifungal aktivite saptanmıştır (Borowitzka, 1999).

Avustralya’daki Roche Araştırma Enstitüsü Marina Farmakognozi (RRIMP) de ilk olarak deniz algleri ve invertabratların (omurgasızların) ekstrelerinde antimikrobiyel aktivite taraması yapılmıştır.

Hücre ekstraktları ve gelişme ortamlarındaki çeşitli tek hücreli alglerin (*Chlorella sp.*, *Chlamydomonas pyrenoidosa* vb.) gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı *in vitro* mikrobiyal aktivitesi gösterilmiştir. *In vitro* antifungal aktiviteler en yaygın yeşil alglerden, diatomlardan ve dinoflagellatlıların ekstraktlarından elde edilmektedir (Borowitzka, 1999; Becker, 1995)

Çeşitli çalışmalarda, *Nostoc muscorum* (Bloor, S., Englan, R., 1994), *Phormidium sp.* (Fish, S.A., Codd, G.A., 1994), *Anabeana sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Pseudoanabaena sp.*, *Synechocystis sp.* (Kreitlow et al., 1998), *Calothrix parietina* (Issa, A.A., 1999), *Spirulina platensis* (Ozdemir et al., 2004) ekstrelerinin bazı patojen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyel etkilerinin olduğu görülmüştür.

2.1.2 Karotenoidler

Karotenoidler doğada geniş yayılım gösteren renkleri sarıdan kırmızıya değişen izoprenoid polien pigmentlerdir. Bütün fotosentetik organizmalarda örneğin mikroalglerde *de novo* yol izi ile üretilmektedir. Günümüzde yapısı tanımlanan 600 den fazla doğal karotenoid bulunmuştur. Bunların 100 den fazlası mikroalglerden elde edilmiştir. Yeşil alglerden *Dunaliella sp.* ve *Haemetaoccus sp.* nin yüksek düzeyde karotenoidlere sahip olduğu bulunmuştur (Cohen, 1999).

Karotenoidler, sekiz tane beş karbonlu (izoprenoid) birimden oluşan alifatik ve alisiklik yapıların sarı, turuncu veya kırmızı renkli lipofilik pigmentleridir. Bu bağlanma neticesinde molekülün merkezine en yakın olan metil grupları 1,5 pozisyonunda olmakla birlikte diğer tüm lateral metil grupları 1,6 pozisyonundadır. Likopen, alglerde bulunan tüm karotenoidlerin öncülü olup, 40 karbonlu polien fitoenin adım adım basamaklı desatürasyonları ile sentezlenmektedir.

Karotenoidler 2 temel gruba ayrılır;

- a. Karotenler; oksijensiz hidrokarbonlardan oluşan pigmentler
- b. Ksantofiller; karotenlerin oksijenli türevleri olup, epoksi-, hidroksi-, ketonik-, karboksilik-, glikozidik-, allenik-, yada asetilen- grupları içermektedir.

Tüm alglerin karotenoid içerdiği bulunmuştur. Her bir türün genellikle 5 ila 10 arasında ana formu bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca alglerdeki çeşitliliğin yüksek bitkilere kıyasla çok daha fazla olduğu gösterilmiştir (Becker, 1995).

Karotenoidler çift bağların sayısına göre bir çok cis-trans izomerini içermektedir. Doğada tüm trans formları daha baskın olarak bulunmuştur. Karotenoidlerin konjuge çift bağlarının sayısı ne kadar fazla olursa renkleri o kadar koyu olmaktadır. Fakat konjuge çift bağlar dayanıklı olmayıp, havanın oksijeni, ısı, UV ışınları ile parçalanmakta ve renksizleşebilmektedir (Cohen, 1999).

Mikroalgler uygun üreme koşulları altında kloroplastlarında primer karotenoidleri, stres koşullarında sitoplazmada sekonder karotenoidleri sentezlemektedir. Bunların başlıcalarının likopen, ksantofil, β -karoten, violaksantin, zeaksantin ve astaksantin olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.1).

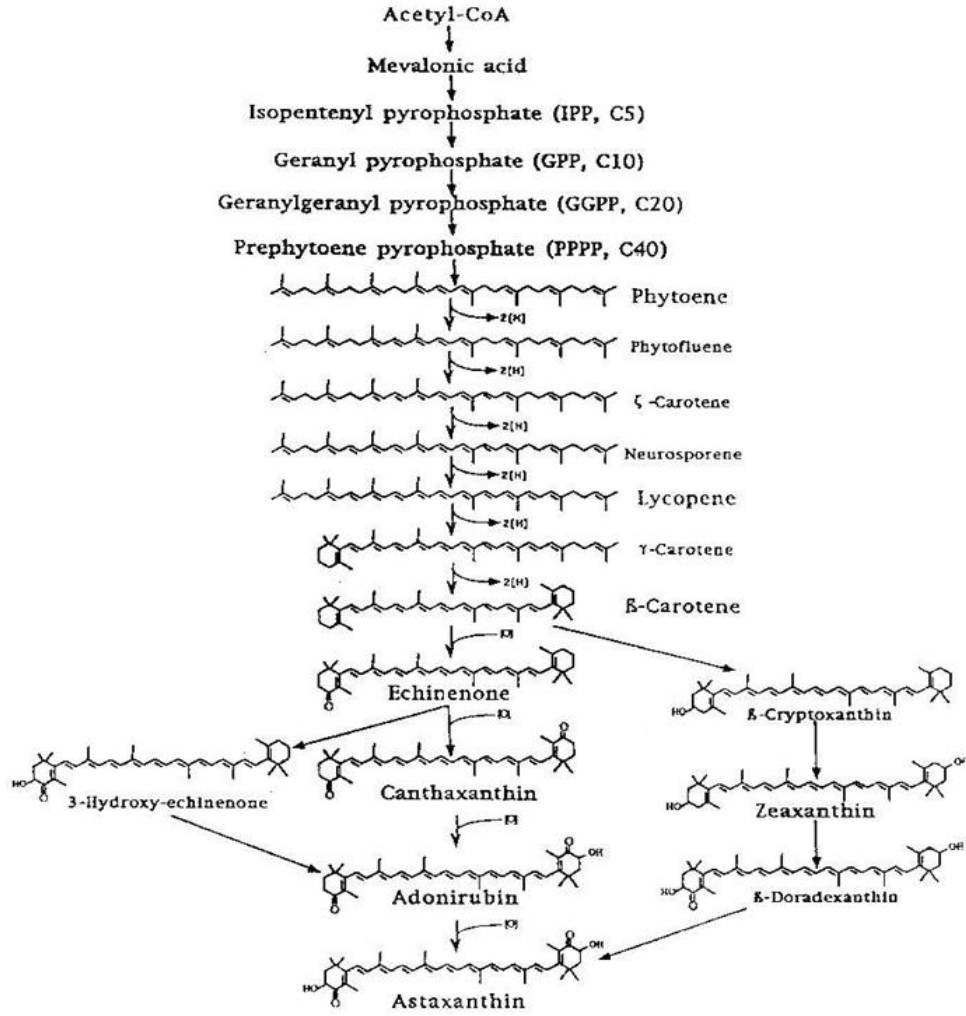
Çizelge 2.2 Mikroalglerin sentezledikleri karotenoidler (Cohen, 1999)

Mikro alg	Karotenoid
Mavi-yeşil alg	β -karoten, zeaksantin
Kırmızı alg	Lutein, kriptoksantin
Sarı-kahverengi alg	Heteroksantin, neoksantin
Diatomlar	Diatoksantin, diadinoksantin
Yeşil alg	β -karoten, astaksantin

Antioksidan aktivitesinde konjuge çift bağ içeren karotenoidler serbest oksijenin etkisini gidermektedirler. Biyokinetik olarak; karotenoidlerin parçalanmasıyla vücut kompartmanlarının fizikokimyasal yapıları içine bağlanmaktadır. Bunlar lipofilik moleküllerin absorblanmasına ve yağ sentez yollarının transferine yardımcı olmaktadır (Alfermann and Verpoorte, 2003).

Karotenoidlerin biyolojik aktiviteleri farklı kategoriler altında incelenmektedir.

- a. İşlevi; fotosentezde yardımcı pigmentler, fotoduyarlılığa karşı koruyucu, A vitaminin enzimatik bağlanmalarında aracılık etmektedir.
- b. Faaliyeti; antioksidan aktivitesinde, immün yanıtları güçlendirmek, mutagenesis ve transformasyonu inhibe etmektedir.
- c. Ortak etkisi; bazı kanser risklerini, bazı kardiovasküler hastalıkların risklerini ve katarakt riskini azaltmaktır (Alfermann and Verpoorte, 2003).



Şekil

2.1

Karotenoid

sentezi

(<http://ind.ntou.edu.tw/~b0232/Haematococcus.files/image005.jpg>)

2.1.3 Antioksidan ve antimikrobiyal aktivite

Antioksidanlar, diğer moleküllerin oksidasyonunu engelleyen ya da geciktiren bileşikler olup bunu, oksitleyici zincir reaksiyonlarının başlamasını veya çoğalmasını engelleyerek gerçekleştirirler (Velioglu et al., 1998).

Antioksidan özellik gösteren bir kimyasal bileşik, diğer kimyasala oksijen bağlanmasına engel olur veya kimyasalın elektron kaybetmesini engeller. Antioksidanlar bir çok yolla tepki gösterir. Antioksidanlar oksitlenmeye karşı koruma sağlar. Bu nedenle kısaca “indirgeyici ajanlar” da denilmektedir (Velioglu et al., 1998).

Oksidasyonun depo maddelerde enerjinin serbest bırakılması için gerekli olmasıyla birlikte, bazı oksidasyon türleri istenmeyen etkilere sahiptir. Örneğin; hücre zarındaki PUFA (polidoymamış yağ asitleri)’ların bir çift bağının oksidasyonu bu zarın bu parçasındaki yapısal kısımları parçalayabilir. Yağ asidinin oksidasyonu ilk olarak peroksitlerin ve yüksek derecede reaktif olan serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Son yağ asidi daha kısa zincirlere parçalanır, oksijen içeren bu bileşiklerin kimyasal özellikleri, orijinal bileşikten çok farklıdır. İki besleyici madde olan, E vitamini ve selenyumun yağ asitleri ve A vitaminindeki çift bağların oksidasyonu ile ilişkili olan antioksidanlar olarak görev aldığı görülmektedir (Selenyum, glutatyon peroksidaz enziminin bir parçası olarak fonksiyon gösterir). E vitamini ve selenyum

istenmeyen oksidasyonlardan korunmada sinerjik etki göstermektedir (Robinson, et al., 1997).

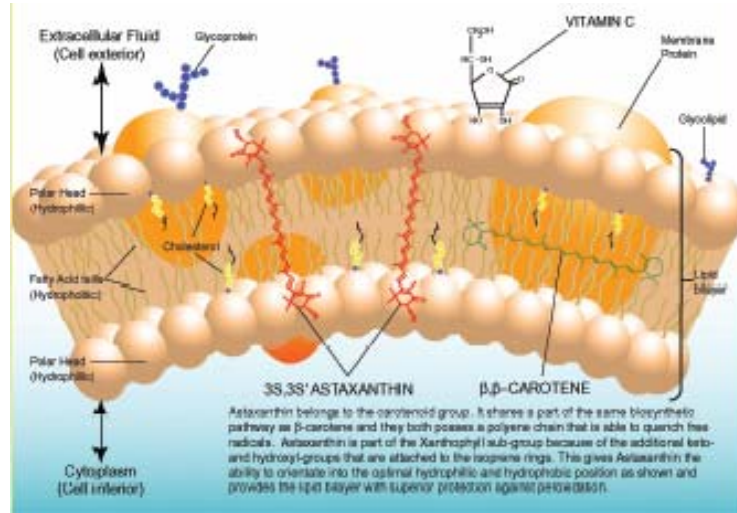
C vitamini (askorbik asit) güçlü bir kimyasal indirgeyici ajandır. Kolajen sentezinin teşvikinde indirgeyici ajan olarak rol oynamaktadır. Ayrıca C vitamini intestinal track de olduğu gibi +3 değerlikli demirin (Fe^{+3}), +2 değerlikli demire (Fe^{+2}) dönüşümünde de indirgeyici ajan olarak hizmet etmektedir (Robinson, et al., 1997).

Oksijen zehirli bir molekül olmasına rağmen aeroblar sadece oksijen varlığında yaşamlarını sürdürebilir çünkü bunlar antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmiştir.

Antioksidan savunma mekanizmalarının işlevleri;

1. Serbest radikalleri ve diğer reaktif türlerin katalitik olarak uzaklaştıran ajanlardır. Örneğin; süperoksitdismutaz, katalaz, peroksidaz enzimleri ve tiyol-spesifik antioksidanlar,
2. Demir, bakır iyonları ve Hem gibi öncül oksidanların bulunabilirliğini minimize eden proteinlerdir. Örneğin; transferrinler, haptoglobinler, hemopeksin ve metalothionein,
3. Biyomoleküller diğer mekanizmalarca oluşabilecek zararlara (oksidatif zarar da dahil) karşı koruyan proteinlerdir. Heat Shock proteinleri gibi,

4. ROS (Reaktif Oksijen Türleri) ve RNS (Reaktif Azot Türleri) uzaklaştıran düşük moleküler ağırlıklı ajanlardır. Örneğin; glutasyon, α -tokoferol, bilirubin ve ürik asit. Özellikle askorbik asit ve α -tokoferol gibi düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar besinlerle alınır. Bu nedenle antioksidan savunması ve beslenme arasında üstü kapalı bir ilişki vardır (Şekil 2.2) (Halliwell and Gutteridge, 1999).



Şekil 2.2 Hayvan hücre zarında astaksantin, β -karoten ve C vitamininin bulunması (<http://www.astareal.com/Astaxanthin.aspx>)

Serbest radikallerin zararlı etkileri;

1. Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonu; biyolojik yapılar, özellikle membranlar yüksek oranda doymamış lipid içermektedir. Bu lipidler bir radikal başlatıcı ile ya da oksijen varlığında oksidasyona uğrarlar. Lipid peroksitler hücresel hasara

yol açan, metabolizmayı değiştiren ve dokulardaki kan akımını azaltan etkin kimyasal maddelere sahiptirler.

2. Aminoasitler ve proteinlere etkisi; doymamış ve sülfür içeren aminoasitler (triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein) ile bunların bulunduğu proteinler serbest radikaller aracılığıyla modifikasyona uğrayabilmektedir.
3. Nükleik asit ve DNA'ya etkisi; nükleik asitlerde baz modifikasyonu, DNA'da iplikçik kopması nedeni ile mutasyonlar ve hücre ölümlerine sebep olmaktadır.
4. Karbonhidratlara etkisi; hücre yüzeyindeki reseptörlerde ve hiyalürik asidin eklenmesi sonucunda sinovial sıvı viskozitesinde değişiklikler olabilmektedir,
5. Kofaktörlere etkisi; nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin miktarlarında ve aktivitesinde azalma meydana gelmektedir.
6. Nörotransmitterlere etkisi; serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitterlerin miktarında ve aktivitesinde azalma meydana gelmektedir (www.herbalinfo.com/antioxidans.htm; www.ilcnet.com/nutrition/radical.htm; www.ceri.com/freerad.htm).

Antioksidanlar iki ana kategori altında toplanır. Bunlar sentetik ve doğal olanlar olarak sınıflandırılmaktadırlar.

Genel olarak, sentetik antioksidanlar çeşitli derecelerde alkil sübstütüsyonuna sahip fenolik yapıdaki bileşikler olup doğal antioksidanlar, fenolik bileşikler (tokoferoller, flavonoidler ve fenolik

asitler), azot bileşikleri (alkaloidler, klorofil türevleri, amino asitler ve aminler) ya da askorbik asit olabileceği gibi karotenoidler de olabilmektedir (Velioglu, et al., 1998).

Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve terci bütillhidro-kuinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar 20. yy başından beri antioksidan olarak kullanılmaktadır (Velioglu et al ., 1998).

Sentetik antioksidanlar, BHA ve BHT genellikle hayvani ve bitkisel yağlarda oksidatif bozunmayı azaltarak, gıdada katkı maddesi olarak depolanmaktadır. Sentetik antioksidanlar insan sağlığında toksik ve karsinogenik etkiye sahiptir. Sentetik antioksidanlar karaciğerin şişmesine neden olup karaciğer enzim aktivitesini etkilemektedir. Doğal kaynaklardan elde edilen antioksidanlar gıdaların bozulmasını önlemekte güçlü alternatiflerdir. Doğal olanların sentetik antioksidanlara göre avantajlarından biri, insan sağlığına zarar vermemesidir. Doğal olarak baharatlar, literatürlerde bitkiler ve fındık ekstrelerinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (Rehman et al., 2003).

Bitkisel gıdalar, fizyolojik gereksinimleri yerine getirdiğinden sağlık için gereklidir. Düzenli ve sıklıkla tüketilirse insan sağlığını korumaktadırlar. *In vitro* yapılan çalışmalarda fitokimyasalar, gıdalarda güçlü antioksidan potansiyeline sahip olup hastalık risklerini azaltmış, kanser ve kardiovasküler hastalıklara karşı koruyucu olmaktadır. Gıdalarda bulunan antioksidanlar, vitaminler, askorbik asit, α -tokoferol ve β -karoten'dir. C, E vitaminleri ve β -karoten, çalışmalarda antioksidan

özellik gösteren maddeler olarak geçen flavonoidler, isoflavon, anthosiyan, kateşin ve isokateşinden daha fazla etkili olmaktadır. Bileşiklerin ayrılmasında; askorbik asit ve vb. hidrofilik, karotenoidler ve vb. ise lipofilik özellik göstermektedirler (Arnao et al., 2001).

Epidemiyolojik çalışmalarda gıdalarda bulunan zengin fenolik bileşikler kalp hastalıkları riskini azaltmaktadır. Fenoller redoks ürünlerinde indirgeyici ajanlar olmaktadır, bu özelliklerini hidrojeni bağlayarak serbest oksijeni bırakarak ve metalleri şelatlayarak gösterirler. Sentetik antioksidanlar gıda uygulamalarında yerini doğal antioksidanlara bırakmaktadır. Mantar, beyaz lahana, karnıbahar, sarımsak, brokoli, fasulye, pancar ve mısır yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Diğer sebzelerden ıspanak, kırmızı biber, soğan, kabak, kıvırcık marul da yüksek antioksidan madde kaynağıdır.

Sarımsak ekstraktları; kardiovasküler ve antikanser ajanı olarak kullanılmaktadır. Mantar, beyaz lahana, karnıbahar ve sarımsak hastalıklardan korunmada önemli rol oynamaktadır. Bazı farklı sebze ekstraktları antimutajenik aktiviteye sahiptir. Ispanak, hafıza kaybının yaşandığı durumlarda ve Alzheimer hastalarında “Beyin gıdası”dır. Brokoli glukozinolatların kaynağı olduğundan antikanser aktivite göstermektedir (Kaur and Kapoor, 2002).

Lipid peroksidasyon sadece ekşimsi koku ve tat yaratmaz bunun yanında gıdaların pişirilmesi, işlenmesi ve depolanması, aşamalarında esansiyel yağ asitlerini ve vitaminleri parçalayarak güvenilirliği ve kaliteyi

düşürmektedir. Lipid peroksidasyon, yaşlanma, kalp hastalıkları ve karsinogenezise neden olmaktadır. Gıdaların oksitlenmesinin önlenmesinde bazı yollar kullanılmaktadır; örneğin vakum altına alma veya havanın azotla değiştirilmesi ya da sıcaklığın düşürülmesi. Endüstriyel gıda işletmelerinde gıdaların raf ömürlerinin uzatılması, besin değerlerinin kayıbedilmemesi ve zararlı maddelerin oluşmasını azaltmak için ürünlere yüksek etkili antioksidanlar eklenmektedir (Jiangning et al., 2004).

Sentetik antioksidanlar hayvanlar üzerinde test edilmiş ve sonuçta BHA ve BHT'nin vücutlarında biriktiği ve bunun sonucu olarak karaciğere zarar vererek karsinogenik etki yaptığı görülmüştür (Jiangning et al., 2004).

Bazı ülkelerde örneğin Japonya ve Avrupa da tert-butylhydro-quinon (TBHQ) kullanımı yasaklanmıştır. Sentetik antioksidanların gıdalarda kullanılması gelecekte diğer ülkeler tarafından da yasaklanacaktır. Bunların yerine günümüzde doğal antioksidanlar araştırılmaktadır (Suja et al., 2005).

Fitofenolik bileşikler biyolojik sistemlerde antioksidan olaylara yardımcı olmaktadır. Serbest radikaller, singlet oksijenin tutulmasını sağlamaktadır. Bir çok çalışmada yüksek bitkilerdeki fenolikler insan sağlığı ve kanserle ilişkilidir. Pratt (1992)'de o zamana kadar alglerde bulunan doğal antioksidanları yayınlamıştır. Mikroalglerdeki fenol ve fenolik antioksidanlar araştırılmıştır. Yüksek bitkiler ile farmastötik

potansiyeldeki alglerin sekonder metabolitleri ile ilişkilidir. Farmastötik aktivitedeki algal metabolitler; fenolikler, terpenler ve karotenoidlerin; kemoteropatik, antimikrobiyel ve antikanser aktiviteleri gösterilmiştir (Duval et al., 2000).

Sentetik kimyasallar yerine bitkilerin doğal ürünlerinden yeni antibakteriyal ve antioksidan ajanların gelişimi araştırılmaktadır. Bir çok bitkinin esansiyel yağlarının ve ekstraktlarının antimikrobiyel ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiş ve literatürlerde belirtilmektedir (Sökmen et al., 2004).

Antimikrobiyel; çok az yoğunlukta dahi mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli ikincil metabolitlerdir. Bunlar mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici bakteriostatik ve fungostatik olabildikleri gibi mikroorganizma ölümüne sebep olan bakteriosit ve fungusit gibi maddelerde olabilirler (Gülay, 2002). Mikroorganizmalardan elde edilen, küçük dozlarda diğer mikroorganizmaları öldüren ve insan organizmasına zararlı etkisi görülmeyen doğal veya sentezlenmiş maddeler olarak da tanımlanmaktadır (Talaro et al., 1993)

Fleming (1929), antibiyotik duyarlılık deneyini uygulamak için ilk yöntemi geliştirmiştir; bu yöntemde bir petri kutusunda agar besiyeri, ortadan kenara çok yakın bir yerde, dik olarak keserek bir şerit halinde dışarı almıştır. Açılan bu hendeğe veya boşluğa küf özeti (penisilin gibi) içeren besiyeri konmuştur. Bu hendeğe dik bir açıda paralel olarak

değişik bakteri kültürleri yayma yöntemi ile ekilmektedir. İnokulasyondan sonra kültürlerin üreme ve inhibisyon bölgeleri gözlenerek kültürlerin duyarlılığı değerlendirilmektedir (Beşe, 1989).

İkinci dünya savaşı sırasında bir çok değişik antibiyotik bulunmuş ve değişik mikroorganizmalara karşı duyarlılık modelleri saptanmıştır; yeni antibiyotikler medikal uygulamada “olağanüstü” ilaçlar olarak kabul edilmektedir.

Foster ve Woodruff (1943), duyarlılık testlerinin uygulamasında, ilk kez antibiyotik emdirilmiş süzgeç kağıtlarının kullanılmasını önermişlerdir. Araştırmacılar, yoklanacak organizma ile önceden inokule edilen petri kutusundaki besiyeri üzerine bir antibiyotik emdirilmiş şeridi yerleştirerek duyarlılık testi yapmaktadır.

Vincent ve Vincent (1947), antibiyotik solüsyonu kağıt disklerde kurutulduktan sonra kullanılabileceğini ve böyle taze solüsyonlara her vakit gereksinme duyulamayacağını göstermektedirler (Beşe, 1989).

Farmöstotik özellikteki bitkilerin esansiyel yağları ve ekstraktlarının antibakteriyel ve antioksidan özelliği bir çok literatürde gösterilmektedir (Sökmen ve ark., 2003).

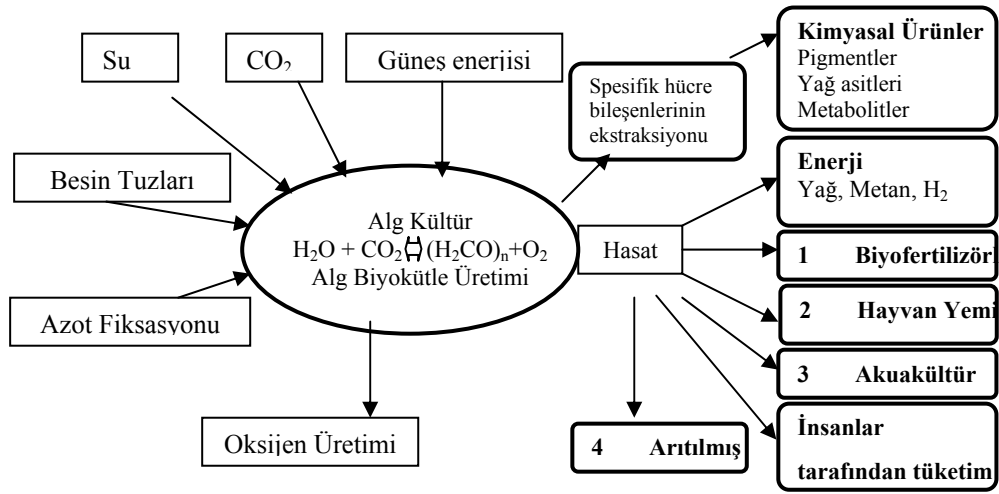
Antibakteriyal ilaçların etki mekanizmaları temel olarak bölgelere yönelmekte ve dört türlü etki mekanizması olduğu kabul edilmektedir.

1. Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu,
2. Hücre membran fonksiyonunun inhibisyonu,
3. Protein sentezi inhibisyonu,
4. Nükleik asit sentezinin inhibisyonudur (Çolak, 2000).

2.2 Mikroalg Üretimi İçin Gerekli Olan Faktörler

Alg biyoteknolojisinde kullanılan ana içerikler Şekil 2.3 de görülmektedir. Alg biyokütlesinin eldesinde ana girdiler ve çıktılar sayesinde ürünler elde edilmektedir. Potansiyel ürünler daha sonra ticari ürünlere dönüştürülmektedir (Vonshak and Torzillo, 2003).

Ticari üretimde kullanılan mikroalglerin belirlenmesinde önemli basamaklar altında gerçekleştirilmektedir. İlk olarak bu metabolitler bilimsel literatürlerden yararlanılarak araştırılmalıdır. Metaboliti üreten mikroalgler seçilmelidir. Üretim sürecine geçilmeden laboratuvar ortamında organizma geliştirilmekte ve ürettiği metabolit miktarı için uygun koşullar belirlenmektedir. Ticari üretimde kullanılacak uygun sistemler seçilmelidir. Organizma açık sistemler için uygun değil ise fotobiyoreaktörler dizayn edilmektedir. Bu sistemlerde alg üretimi ve metabolit ekstraksiyonu için gerekli hesaplamalar yapılmalıdır. Son olarak bu ürünlerin satılacağı marketlere sunulmalıdır (Olaizola, 2000).

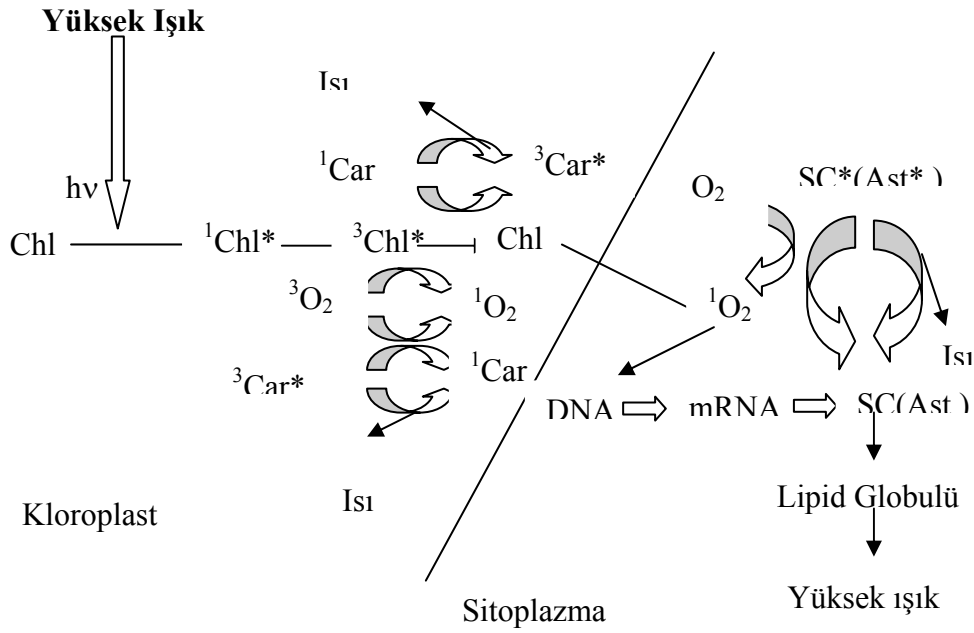


Şekil 2.3 Algal biyokütlenin elde edilmesi için gerekenler (Vonshak ve Torzillo, 2003)

2.2.1 Işık

Algler fotosentez yaptıkları için biyokimyasal kompozisyonları için ışık etkisi kontrol edilmelidir. Alg hücrelerinin hücre kompozisyonlarının dinamiği değişime uğrayarak, fotosentez ve hücre gelişimi ile biyokimyasal ve fizyolojik özelliği artmaktadır. Işık yoğunluğunun azalmasındaki genel trend hücrelerdeki klorofil a ve ışığı tutan pigmentler (klorofil b, klorofil c, fitobiliproteinler ve birincil karotenoidler) kullanılmaktadır. Diğer yandan yüksek ışık yoğunluğunda klorofil a ve diğer pigmentler fotosentezin azalmasını gerçekleştirirken ikincil karotenoidler artarak (zeaksantin, β -karoten, astaksantin) fotokoruyucu ajanlar olarak görev yapmaktadırlar. Karotenoidlerin birikmesi türlerin yapısına göre değişmektedir. Örneğin; plastidlerde

bulunan plastoglobüller veya sitoplazmik lipidler fotosentetik canlıların yüksek ışıktan korunmasında rol oynamaktadır. Karotenoidlerin birikmesinde karbon ve azotun hücreye akışının azalmasıyla stres koşullarında olmaktadır (Şekil 2.4) (Richmond, 2004).



Şekil 2.4 *Haematococcus* hücresinin foto koruyucu astaksantin sistemi. *Uyarılma Durumu, SC, İkincil Karotenoidler, Ast., Astaksantin ve esterleri (Cohen, 1999)

Işık, mikroalg fotosistemlerinin antenleri ile yakalanmaktadır. Antenler fotosentezin gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Bunlar, fotonları tutarak enerji reaksiyon merkezlerine göndermektedirler. Antenlerin yapısında pigmentler ve proteinler görev almaktadır. Hücreler farklı ışık yoğunluklarına adapte olabilmek için fotosistem sayılarında veya anten

boyutlarında değişim göstermektedirler (Vonshak and Lu, 1999, 2002; Fox, 1996).

Laboratuar ortamında suni aydınlatma için floresan lambaları (daylight veya cool- white) kullanılmıştır. Farklı tipteki floresan lambalarının verdiği ışık şiddeti de farklı olmaktadır. Kullanılan ışık kaynağının ortamı ısıtmasından kaçınılmalıdır. Bu sebeple, ışık kaynağı olarak floresan lambalarının kullanılması daha uygun olmakla birlikte maliyeti de daha fazladır (Cirik and Gökpınar, 1993; Sukatar, 2002).

2.2.2 Sıcaklık

Çevresel faktörlerin en önemlisi olan sıcaklık biyokimyasal reaksiyonları etkilemektedir. Sıcaklığın membran lipid içeriğine etki ettiği çalışmalarla gösterilmektedir. Sıcaklığının azalmasıyla gelişim optimum seviyenin altına düşmekte ve membran sisteminde bulunan doymamış lipidlerin derecesi artmaktadır. Hücrelerin membranlarının stabilitesi ve akışkanlığı artmakta, tillakoid membranlar azalan sıcaklık etkisinde fotosentetik yapılarını korumak için fotoinhibisyonu gerçekleştirmektedir (Richmond, 2004).

Üretimde mikroalglerin çoğu 16-27 °C arasındaki sıcaklığı tolere edebilmektedir. 16 °C den düşük sıcaklıklar üremeyi yavaşlatırken, 35 °C den yüksek sıcaklıklar genellikle öldürücü etki göstermektedir (Sukatar, 2002).

Sıcaklık artışları buharlaşmayı arttırarak üretimde hacim kaybına neden olurken kültür dengesini olumsuz yönde etkilemektedir (Vonshak and Torzillo, 2003). Mikroalgler metabolizmalarını ve fizyolojik aktivitelerini doğrudan etkileyen sıcaklık değişimlerine hemen tepki vermektedirler. Sıcaklık arttığında solunum hızı artmakta, artan solunum biyokütle kayıplarını arttırmaktadır (Cohen, 1999).

2.2.3 Besin faktörleri

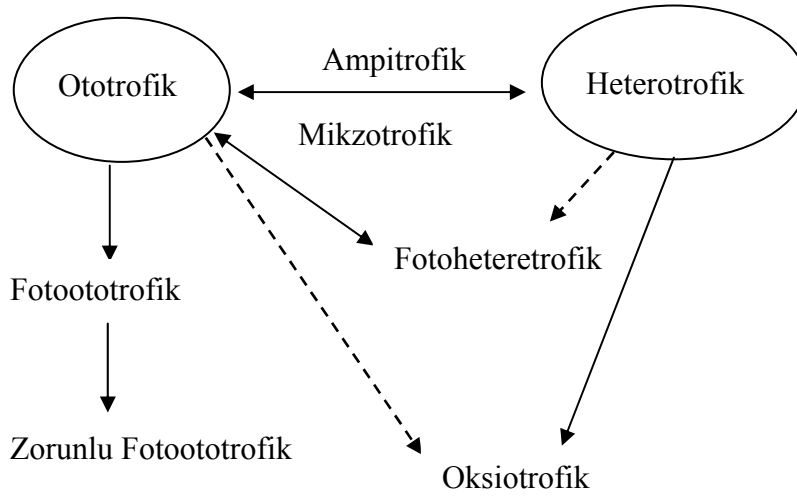
Azot, kültür büyümesini etkileyen ana faktördür. Genellikle kültür ortamına nitrat, amonyak veya organik kaynaklı üre kullanılmaktadır. Amonyum nitrat suda çözüldükten sonra algler tarafından alınır. Algler tarafından ilk olarak amonyum tüketildiğinden ortam pH' sı düşer, ardından nitratın geç tüketilmesiyle veya tüketilmemesiyle pH artmaktadır. Bu nedenle ortama amonyum nitrat dikkatli bir şekilde ve az miktarda ilave edilmelidir. Üre kullanımından kaçınılmalıdır. Çünkü üre, maliyeti düşürürken bakteri gelişimine neden olur. Bakteriler, alg kültüründen daha hızlı gelişmekte ve alg kültürünün gelişimini baskılamaktadır (Sukatar, 2002, Richmond, 2004, Becker, 1995)

Fosfor, ana makrobesleyici olarak hücresel metabolik ürünler ile mikroalglerin büyümesi ve gelişmesinde bazı yapısal ve fonksiyonel göreve sahiptir. Fosfor ortamda fosfor tuzları(K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$) şeklinde bulunmaktadır. Bu tuzlar fosfor kaynağı olarak kullanılmakta ve aynı

zamanda tampon özelliğinden yararlanılarak pH dengesinin kurulmasını sağlamaktadır(Richmond, 2004, Sukatar, 2002).

Demir, iz mineral elementtir. Mikroalgler için çok az miktarda gereklidir, fazla doz uygulanırsa toksik etki yaratmaktadır. Stok solüsyon olarak önceden karışım olarak hazırlanmalı ve buzdolabında saklanmalıdır.

Mikroalgler besin içeriğine göre farklı modellerde üretilmektedir. Bunlar; fototrofik, heterotrofik ve miksotrofik modellerdir (Şekil 2.5). Fototrofik modelde algler besin ihtiyacını inorganik karbon kaynağından, metabolizması için gerekli enerjiyi ise ışıktan sağlamaktadır. Heterotrof modelde ise algler kültür ortamına ilave edilen organik karbon kaynağını kullanarak enerji ve besin ihtiyacını karşılamaktadır. Miksotrofik modellerde ise algler enerji ve besin ihtiyacını hem ışık hem de organik karbon kaynağını kullanarak sağlamaktadır. Mikzotrofik üretimin bazı dezavantajları vardır. Düşük ışık ve düşük organik karbon miktarı hücre üremesini engellemekte, yüksek ışık ve yüksek organik karbon miktarı da üremeyi kısıtlamaktadır (Richmond, 2004; Cohen, 1999).



Şekil 2.5 Alglerin heterotrofik ve otorotrof gelişimi (Richmond, 2004).

2.3 Mikroalg Üretim Sistemleri

Fototrofiklerin (bakteri, alg ve bitki hücreleri) gelişimi veya fotobiyolojik reaksiyonların gerçekleştirilmesinde kullanılan reaktörlere fotobiyoreaktörler denilmektedir. Geniş alanlarda açık havuzlar kullanılarak geliştirilen mikroalg kültürleri için fotobiyoreaktörlerde de üretim yapılabilinmektedir (Sukatar, A., 2002; Richmond, A., 2004). Kültür ortamı dış etkilere açık ise açık sistemler (outdoor), ortamın dış çevre ile ilişkisi kesildiğinde ise kapalı sistemler (indoor) olarak adlandırılmaktadır (Vonshak, and Torzillo, 2003).

a) Açık sistemler

Açık havuz sistemlerinde alg kültürleri basit yöntemlerle tasarlanmaktadır. Bunlar; havuzlar, derin ve sığ sirküler kanallardan oluşmaktadır. Açık havuzların iki önemli avantajı bulunmaktadır. Bunlar

kolay inşa edilmesi ve işletmesinin kolay olmasıdır. Açık sistemlerin dezavantajlarından birisi iklime bağılı üretimin yıl boyu yapılamamasından dolayı işletme giderlerinin karşılanmasında sorun çıkarmaktadır. İklimsel değışimlere bağılı ideal su seviyesinin yüksekliğı ayarlanmalıdır. Büyük çapta alg üretimi yapan işletmeler de dizayn parametrelerine ve bazı temel mühendislik görüşlere ihtiyaç duyulmaktadır (Vonshak, and Torzillo, 2004, Sukatar, 2002; Lee, 2001).

Ekonomik açıdan bakıldığında, bu sistemler, kapalı sistemlere oranla daha avantajlıdır. Gerek malzeme, gerekse ışıık kaynağı açısından daha ucuz olan bu sistemler, sadece ekolojik toleransı yüksek ve kontaminasyonlara az duyarlı olan alglerin üretimleri için uygundur.

Açık havuzlar; göller ve doğaı havuzlar, eğimli sistemler, dairesel havuzlar, kanallı havuzlar olarak sınıflandırılmalıdır (Çizelge 2.3) (Richmond, 2004).

Çizelge 2.3 Ticari kullanılan mikroalg kültür sistemleri ve algal türlerin kültürleri (Borowitzka, 1999)

Kültür Sistemleri	Algler	Yaklaşık Maksimum Hacmi	Uygulama Alanı
Tanklar	Bir çok tür	1×10^4	Dünyada Geniş
Büyük açık havuzlar	<i>Dunaliella salina</i>	1×10^9	Avusturalya
Dairesel havuzlar rotasyon bölümlü	<i>Chlorella spp.</i>	1.5×10^4	Tayvan, Japonya
Kanalı havuzlar	<i>Spirulina spp.</i> , <i>Chlorella spp.</i> , <i>Dunaliella salina</i>	3×10^4	Japonya, Tayvan, Amerika, Tayland, Çin, Hindistan, Vietnam, Şili, İsrail
Kaskat sistemli	<i>Chlorella spp.</i>	3×10^4	Çek Cumhuriyeti, Bulgaristan
Geniş torbalar	Bir çok tür	1×10^3	Dünyada Geniş
Fermentörler (heterotrofik)	<i>Chlorella spp.</i> , <i>Cryptocodinium cohnii</i>	$> 10^3$	Japonya, Tayvan, Endonezya, Amerika
İki fazlı sistem (indoor kapalı reaktör ve sonra outdoor çarklı havuzlar)	<i>Haematacoccus phuvialis</i>	?	Amerika

b) Kapalı sistemler

Fotobiyorektörlerde yapılan üretimler, mikroalg kültürünün dış ortamla gaz alışverişini ve kontaminasyon riskini engellemektedir (Richmond, 2004).

Fotobiyoreaktörlerde alg kütlesi pigmentler, polisakkaritler, çok doymamış yağ asitleri gibi değerli ürünlerinin elde edilmesinde kullanılmaktadır. Ticari üretim için dizayn edilen ve işletilen fotobiyoreaktörlerde amaç yüksek biyokütle konsantrasyonunda ve kontrollü işletme şartları altında tek hücre eldesi sağlamaktır (Vonshak and Torzillo, 2004).

Tübüler fotobiyoreaktörler olarak; Serpantin fotobiyoreaktör, Manifold fotobiyoreaktör, Helical fotobiyoreaktör (bio-coil PBR) ve Perdeli düzenlenen manifoldlar kullanılmaktadır. Flat fotobiyoreaktör ise; Flat alveolar paneller, Cam plateler, Kritik değerlendirmeli flat plate sistemler'dir (Çizelge 2.4) (Richmond, 2004).

Çizelge 2.4 Farklı ticari algal kültürler sistemlerinin özelliklerinin karşılaştırılması (Borowitzka,1999).

Reaktör Tipi	Karıştırma	Işıktan faydalanma verimi	Sıcaklık kontrolü	Gaz transferi	Alg üzerindeki hidrodinamik stres	Tür kontrolü	Sterilite	Ölçek büyütme	Kaynaklar
Karıştırılmayan, sığ havuzlar	Çok zayıf	Zayıf	Yok	Zayıf	Çok düşük	Zor	Yok	Çok Zor	Borowitzka and Borowitzka, 1989
Tanklar	Zayıf	Çok zayıf	Yok	Zayıf	Çok düşük	Zor	Yok	Çok zor	Fox, 1983
Dairesel karıştırmalı havuzlar	Orta	Orta-İyi	Yok	Zayıf	Düşük	Zor	Yok	Çok zor	Tamtya, 1957; Stengel, 1970; Sceder, 1981
Dönen çarklı, kanallı havuzlar	Orta-İyi	Orta-İyi	Yok	Zayıf	Düşük	Zor	Yok	Çok zor	Wetssman and Goebel, 1987; Oswald, 1988
Karıştırmalı tank reaktörler (içten ya da dıştan aydınlatmalı)	Genellikle uniform	Orta-İyi	Mükemmel	Düşük-Yüksek	Yüksek	Kolay	Kolayca mümkün	Zor	Pohl et al., 1988
Hava kaldırmalı reaktörler	Genellikle uniform	İyi	Mükemmel	Yüksek	Düşük	Kolay	Kolayca mümkün	Zor	Jüttner, 1977
Torba kültürleri	Değişken	Orta-İyi	İyi (kapalı alanda)	Düşük-Yüksek	Düşük	Kolay	Kolayca mümkün	Zor	Baynes et al., 1979
Panel reaktörler	Değişken	Mükemmel	Mükemmel	Yüksek	Düşük-Yüksek	Kolay	Mümkün	Zor	Hu et al., 1996; Tredict and Zitetti, 1997
Tübüler reaktörler (serpantin tipinde)	Değişken	Mükemmel	Mükemmel	Düşük-Yüksek	Düşük-Yüksek	Kolay	Mümkün	Orta derecede	Richmond et al., 1993; Torzillo,1997
Tübüler reaktörler (Sarmallı tipte)	Dğişken	Mükemmel	Mükemmel	Düşük-Yüksek	Düşük-Yüksek	Kolay	Mümkün	Kolay	Borowitzka, 1996

2.4 Mikroalg Alt Akım İşlemleri

Biyoproseslerde, ürünün biyoreaktörde oluşmasını izleyen tüm ayırma ve saflaştırma işlemleri genel olarak “alt akım işlemleri” diye adlandırılır. Biyoteknolojik ürün ayırma ve saflaştırma işlemlerindeki basamaklara ve yöntemlere karar verilirken, üretim koşulları göz önüne alındığı gibi, ürünün elde edilmesinden sonra nasıl ve nerelerde kullanılacağıda dikkate alınarak çift yönlü bir etkileşim mekanizması ile değerlendirilmelidir. Mikroalglerin üretiminde maliyetlerin optimize edilmesi için alt akım işlemleri ile birlikte bir bütün olarak düşünülmesi gerekmektedir. Alt akım işlemleri masrafları, toplam üretim masraflarının ihmal edilemeyecek kadar önemli bir bölümünü oluşturduğu kesindir (Lee, 2001; Vardar-Sukan, 2005).

2.4.1 Hasat

Mikroalglerin kültür ortamından ayrılmasında kullanılacak yöntem seçilirken algin özellikleri dikkate alınmalı, hücre büyüklüğü ve fizyolojik yapısı incelenerek en uygun hasat yöntemi seçilmelidir.

Ortamdan algin ayrılmasında pek çok problem ile karşılaşılabilir. Örneğin; kümelenmeyi önlemek amacı ile bir kimyasal kullanıldığında ortam içeriği etkilenmektedir veya santrifüj yapıldığında hassas alg hücreleri oluşan kayma kuvvetleri altında zarar görerek hücre parçalanması gerçekleşerek, ortama hücresel içerik geçebilmektedir. Bu da algin son ürününün kalitesini etkilemektedir.

Uygun hasat yöntemi seçilirken aşağıdaki noktalar göz önüne alınmalıdır (Becker,1995);

1. Ne tür algin hasatının yapılacağı? (tek hücreli, filamentöz, vb.)
2. Hasat işlemini yapacak ekipman sürekli mi yoksa kesikli mi çalışacağı?
3. Hasatın yapılacağı ekipmanın sadece ön konsantrasyon işlemi için mi kullanılacağı? Tek bir basamakta konsantrasyon işlemi yapılabilecek mi? Yoksa ekipmana geçilmeden önce ön konsantrasyon işleminin yapılması gerekli mi?
4. Elde edilen konsantre maddenin içindeki kuru madde miktarı ne kadar?
5. Yatırım sermayesi ne kadar olacak?
6. İşletme giderleri ne olacak?

Sedimentasyon

Bir partikül sürekli faz içinde hareket ettiği zaman, hızı iki kuvvet tarafından etkilenir. Birincisi, partikül ile akışkan arasındaki yoğunluk farkından doğan kaldırma kuvvetinin partikülü hızlandırmasıdır. İkincisi, partikülün hareketinin neden olduğu sürüklenme kuvvetinin partikülü geçiktirmesidir. Sonunda, kaldırma kuvveti ve sürüklenme kuvveti eşitlenirler ve partikül sabit bir hızla hareket eder. Buna göre; yerçekiminden faydalanarak yapılan çöktürme işleminde sıvı içinde bulunan asılı partiküllerin ayrılması sağlanmıştır. Bu yöntem, ucuz ve basit bir yöntemdir. Asılı duran bu partiküllerin sıkıştırılabilir özelliği olmamalıdır. *Scenedesmus sp.* ve *Chlorella sp.* de karşılaşılan sorun ise

bu türlerin sıkıştırılabilme özelliğinden dolayı hasatında sedimantasyon kullanılmamaktadır (Becker, 1995).

Lamella separatör; Lamella separatörde de doğal yerçekiminden faydaniılmaktadır. Basamaklı yüzeylerden oluşan kaskatlı sistemlerin kombinasyonu ile çökme işlemi gerçekleştirilmektedir. Eğim sayesinde çöküntü alt seviyelere kadar ulaşabilmekte ve oradan da uzaklaştırılması sağlanmaktadır (Becker, 1995).

Flokülasyon

Bireysel hücrelerin ya da partiküllerin daha büyük kümeler haline getirilerek kültür ortamından ayrılması yoluna gidilmektedir. Bu işleme de flokülasyon adı verilmektedir. Alg hücrelerinin logaritmik üreme fazında, yüzeylerindeki negatif yük oldukça yüksektir. Bu nedenle nötralizasyonu zor olmaktadır. Algler bulundukları yüzeylere yayılmaktadır. Beklenerek üreme hızlarının azalması ile negatif yük azalmakta ve hücreler kümeleşerek dibe çökmektedir. Bu olaya otokümelenme (autoflocculation) denilmektedir. Ortama multivalent katyonlar veya katyonik polimerler eklenerek kümelenme hızlandırılmaktadır. Hızlı büyüyen türlerin hasat işlemleri oldukça pahalı olmaktadır. Yavaş üreyenlerin hasatı hem kolay hem de daha ucuz olmaktadır. Flokülasyonda kullanılmak üzere seçilen ürünler ucuz, toksik olmayan ve az konsantrasyonlarda bile etkili olanları tercih edilmektedir (Becker,1995; Molina Grima et al., 2003).

Alglerin şekli ve büyüklüğü de çökmeye etki eden önemli faktörlerdir. Optimum büyüme koşulları altında mikroalg süspansiyonlarının çökme eğilimleri oldukça kararlı olmaktadır. Kümeleşmeyi teşvik eden faktörler arasında besinin kısıtlı olması veya CO₂ değişimi ile yetersiz olan yüksek fotosentetik aktivite önemli değişkenlerdir. Bazı durumlarda otokümelenme; CO₂ kullanılarak pH değişimi ile ayarlanabilmektedir. Otokümelenmeyi etkileyen diğer bir faktör de magnezyum, kalsiyum ve karbonat tuzlarının kopresipitasyonunun nitrat ve fosfat asimilasyonu etkilemesidir.

Köpük oluşturarak ayırma; köpük ayırımı yüzey aktivitesindeki farklılıklar kullanılarak çözeltinin bileşenlerini ayırma işlemidir. Bu yöntem, “Adsorptif kabarcık ayırma işlemleri” adını alan bir grup teknikten biridir. Bu işlemler iki grupta toplanabilir, bunlar köpük ayırımı ve köpük flotasyonudur. Köpük ayırımı, homojen bir çözeltiden bileşiklerin ayrılması ya da konsantre edilmesini sağlarken, köpük flotasyonu partikül halindeki maddelerin ayrılması ya da konsantre edilmesinde kullanılmaktadır (Vardar-Sukan, 2005; ; Wang et al., 1979).

Su üzerinde durmanın mantığı; süspansiyon içindeki katı partiküllerin (alg) hava kabarcıklarına tutunarak yüzeye çıkmasıdır. Genellikle alglerin yüzeye çıkması, dibe çökmesinden daha kolay olmaktadır (Becker, 1995).

%4-6 oranında süspanse partikül içerenler, su yüzeyinde birikerek biyokütlenin yüzeyde toplanmasını sağlamaktadır. Gaz kabarcıkları küçük olmalıdır.

Filtrasyon

Filtrasyon, sıvıyı bir katı dayanak veya filtre ortamından geçirilerek, katıların ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir. Katıların özelliklerini iyileştirmek için bazı ön işlemler kullanılmaktadır. Örneğin; katılar, diatome toprak gibi sisteme eklenen başka katıların yardımı (filtre yardımcı maddeler) ile de hızlı bir şekilde sıvıdan uzaklaştırılmaktadır (Wang et al., 1979).

Mikrostrainer; filamentli alglerin hasat edilmesinde bu sistemden yararlanılabilmektedir. 20 µm den küçük alglerin tutulamaması bu sistemin olumsuz yönlerinden biridir.

Hasat tekniğinin potansiyel bir dezavantajı havuzda filamentli olan alglerin toplanabilmesidir. Küçük alg türleri için uygun olmayan bu yöntem daha çok filamentli türler için tercih edilmektedir. Örneğin, yeşil alglerden *Scenedesmus sp.* 20 µm den küçük olan açıklıklarda tutulabilmektedir. *Chlorella sp.* ise 5 µmlik açıklıklardan geçmektedir (Becker, 1995).

Belt filter; küçük alg hücrelerin eldesinde kullanılan flokülant kimyasalların kullanılması maliyeti arttırmaktadır. Ayrıca ürünü kontamine etmektedir. Bu nedenlerden dolayı belt filterler

kullanılmaktadır. Filtre ortamı kağıt fiber bir madde ile kaplanmıştır. Kağıt fiber kaplama alg hücrelerinin birikmesine yardımcı olmaktadır. Bu yöntemdeki en büyük kısıtlama final ürününün kağıt fiber ve alg karışımı içermesidir. Bu nedenle sadece geniş getiren hayvanlarda yem olarak kullanılmaktadır (Becker, 1995).

Döner vakumlu filtre; mikroorganizmaların sıvıdan ayrılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Astar (precoat) olarak uygulanan filtre yardımcısının bir kısmı da tamburun her bir dönüşü ile birlikmiş katı madde ile birlikte uzaklaştırılmaktadır. Bu şekilde bir sonraki çevrim için temiz bir yüzey sağlanmış olmaktadır. Yüzeyin bir bölümüne vakum uygulanan dönen içi boş bir silindir, içinde ayrılmak istenen biyolojik süspansiyon bulunan bir tanka yerleştirilmektedir. Sıvı vakum borularından emilerek geniş bir bölmede toplanmaktadır. Sonra, bir piston pompa yardımıyla buradan uzaklaştırılmaktadır. Hücrelerin kazınmasında, filtre yardımcıları kullanılmadan bezle kaplanmış bir tambur kullanılmaktadır. Bu durumda, katıların uzaklaştırılması için pozitif hava basıncına ve bıçağa gerek duyulmaktadır (Vardar-Sukan, 2005; Wang et al., 1979).

Chamber filter pres; ilave basınç kullanılarak yapılan bir filtrasyon aletidir. Alg ayırmak için 16×10^5 Pa basınç kullanılmaktadır. Filtre kekinin uzaklaştırılmasında pozitif basınç kullanılmaktadır. Bu makineler diğerlerine göre daha küçük yapılmaktadır. Çünkü filtrasyon döngüsü kısa olmaktadır. Filtre kumaşları patates nişastası ile kaplandığında

pozitif basınç sayesinde *Scenedesmus sp.*'nin tamamı hasat edilebilmektedir. Tek dezavantajı pahalıdır (Becker, 1995).

Santrifügasyon

Santrifügasyon katılar ile içinde bulundukları sıvı arasındaki yoğunluk farkından yararlanılarak gerçekleştirilen bir işlemdir. Santrifügasyon sonucu elde edilen konsantre katı, filtrasyon sonucu ortaya çıkandan farklıdır. Santrifügasyonda elde edilen katı konsantre macun kıvamındadır (Vardar-Sukan, 2005; Wang et al., 1979).

Bütün mikroalglerin uzaklaştırılmasında en direkt yol santrifüjlemedir. Santrifüj sırasında dibe çöktürme diğer hasat yöntemlerine göre daha kolay yapılmaktadır. Santrifüjleme güvenilir ve basit bir yöntem olmasının yanı sıra oldukça masraflıdır ve yüksek enerji tüketimi nedeniyle bu yönteme her durumda başvurulmamaktadır (Becker, 1995, Molina Grima et al., 2003).

Santrifüjlerin, farklı özelliklere sahip süspansiyonların işlenmesi için geliştirilmiş çeşitleri bulunmaktadır. Bunlar iç yapılarına göre sınıflandırılırlar (Çizelge 2.5).

Chamber santrifüj; düşük yoğunlukta katı içeren ortamlarda kullanılmaktadır. Az madde miktarlarının elde edilmesinde tercih edilen santrifüj çeşididir.

Plaka şeklindeki santrifüjler; endüstriyel alanda farklı yoğunluklarda olan sıvı fazların ayrılmasında kullanılmaktadır. *Scenedesmus sp.* cinsi mikroalglerin hasatında başarılı şekilde uygulanmaktadır. Plaka şeklindeki santrifüjlerde ayırım sürekli yapılabilir.

Nozzle (lüleli) santrifüjler; maya endüstrisinde kullanılmaktadır. Süspansiyon öncelikle elekten geçirilmelidir. Çünkü uzaklaştırılan partiküller tıkanmaya neden olabilmektedir. Asılı duran katı partikül miktarının çok olması halinde ise seperatörde bir ön konsantrasyon işlemi yapılmalıdır.

Decanter (aktarıcı); konsantre maddenin içinde katı madde miktarı yüksek olduğunda kullanılan bir yöntemdir. Bu sistem sürekli olarak süspansiyon ile beslenmelidir.

Çizelge 2.5 Mikroalglerin hasatında kullanılan bazı santrifüjlerin karşılaştırılması (Molina Grima et al., 2003).

Makine	Çalışma	Konsantrasyon	Alg	Süspansiyondaki (%) katı madde oranı	Tüketilen m ³ başına enerji (kW h)	Hasat maliyeti ^a	Güvenilirlik
Self-cleaning disk-stack santrifüj Westfalia	Sürekli süspansiyonlarda; konsantrasyonda sürekli olmayan	Bir adım	<i>Scenedesmus</i> <i>Coelastrum</i> <i>proboscideum</i>	12 (120)	1	1	Çok iyi
Nozzle deşarjlı santrifüj Westfalia	Sürekli	Final konsantrasyonu için ön konsantrasyon	<i>Scenedesmus</i> <i>C. proboscideum</i>	2-15 (20-150)	0,9	0,72	İyi
Decanter bowl santrifüj Westfalia	Sürekli	Final konsantrasyon	<i>Scenedesmus</i> <i>C. proboscideum</i>	22%(11)	8	-	Çok iyi
Hidrosiklonlar AKW	Sürekli	Ön konsantrasyon	<i>C. proboscideum</i>	0,4 (4)	0,3	9	Fakir

^a İşçileri kapsamamaktadır.

2.4.2 Kurutma

Hasat ve konsantrasyon işlemi sonunda elde edilen alg biyokütlesinin saflaştırılması gerekmektedir. Ürün %10 dan az su içermelidir. %2'nin altında nem içeren ürünlerde hiçbir biyolojik işlem gerçekleşmemektedir. Alg üretiminin en önemli basamaklarından biri kurutmadır (Çizelge 2.6) ve kurutma işlemi toplam üretim maliyetinin bazen %30'una ulaşabilmektedir (Becker, 1995; Richmond, 2004).

Çizelge 2.6 Alglerin kurutmasında kullanılan kurutma işlemleri (Becker, 1995).

Metot	Yararı	Kısıtlamalar	Alg	Önemli noktalar
Drum-kurutma	Hızlı ve faydalı	Pahalı	Spirulina dışındaki tüm alglere	Hücre duvarında kırılmalara yol açar. Ürünü steril eder.
Sprey ile kurutma	Hızlı ve faydalı	Pahalı	Tüm alglerde	Ürünü steril eder. Selülozik hücre duvarlarının kırıldığı garanti edilemez.
Güneş altında kurutma	Sermaye çok düşük	İklima bağlı, uzun süre alır	Tüm alglerde	Biyokütle fermente edilebilir. Sterilizasyon mümkün değildir. Selülozik hücre duvarları kırılmaz.
Güneş enerjili kurutucu ile kurutma	Sermaye az	İklima bağlı	Tüm alglerde	Selülozik hücre duvarı kırılmaz. Sterilizasyon mümkün değildir.
Çapraz akışlı kurutma	Güneş ve güneş enerjili kurutucu ile kurutmada hızlıdır. Drum kurutma yönteminden ucuzdur.	Elektrik ile çalışır.	Tüm alglerde	Selülozik hücre duvarı kırılmaz. Sterilizasyon mümkün değildir.

Vakum raflı kurutma	Nazik işlemler	Pahalı	Tüm alglerde	Selülozik hücre duvarı kırılmaz, ürün hidrofobiktir. Sterilizasyon mümkün değildir. Hücre içeriği korunur.
Dondurarak kurutma	Nazik işlemler	Pahalı	Tüm alglerde	Selülozik hücre duvarını parçalanmaz. Sterilasyon mümkün değildir. Hücre içeriğini korur.

Güneş altında kurutma

Bu yöntem kolay ve en ucuz kurutma yöntemlerinden biridir. Havaya bağlı olduğundan ürünün çürüme riski bulunmaktadır.

Büyük ölçekli çalışmalarda ise, büyük kurutma yatakları plastik ile kaplanarak hazırlanır. Plastik yüzey üzerine alg çamuru ince film tabakası halinde yayılarak, kurumaya bırakılır (Becker, 1995).

Güneş enerjili kurutucu ile kurutma

Güneş enerjisi kullanılarak tasarlanmış bir kurutma dolabı içinde gerçekleştirilen kurutma şeklidir. Teorikte aynı mantık üzerine dizayn edilmiş değişik uygulama şekilleri mevcuttur. Güneş ısısının arttırıldığı siyah camlı bir bölmeden geçen hava kullanılarak tepsilere konmuş biyokütle raflı bir sistemde kurutulabilir (Fox, 1983). Ayrıca basit bir şekilde, siyah boyalı bir cam tepsi üzerine delikli bir örtü örtülmek

suretiyle iç ısı 60-65°C'ye yükseltilerek de kurutma sağlanabilir (Becker, 1995). Kurutma süresini kısalttığı için güneş altında kurutma yönteminden daha ucuzdur.

Drum kurutma

Bu kurutma metodunda, döner tamburun yüzeyi krom ile kaplamalıdır. Tamburun ısıtılmasıyla yüzeyindeki ıslak kompost veya biyokütle kurutulmaktadır. Tamamen sindirilebilir ve bakteriyolojik olarak güvenli bir ürün elde edilmektedir. Beslenme açısından incelendiğinde, yapılan kurutma işleminden elde edilen ürünün mükemmel olduğu kanıtlanmıştır. Bu yöntem yüksek yatırım masrafları ve enerji tüketimi olmasına rağmen tercih edilen bir yöntemdir. (Becker, 1995).

Sprey ile kurutma

Spreylenen alg konsantresinin püskürtülerek maruz kaldığı ısı sayesinde kurutulması ve toz halinde elde edilmesi yöntemidir. Pompalanmasının mümkün olması için kültürün konsantre bir şekilde kurutucuya verilmesi gerekmektedir. Ticari olarak en çok tercih edilen yöntemlerdendir.

Freeze drying (liyofilizasyon)

Liyofilizasyon 3 kısımdan oluşmaktadır,

1. Materyalin dondurularak katılaştırılması,
2. İlk kurutmada nemi %20'nin altına indirerek süblimleşmenin sağlanması,
3. Desorpsiyon veya ikinci kurutma ile nem miktarının %1'in altına indirilmesi.

Bu işlemde su 4,6 mm Hg basınç altında su buharına dönüşmektedir. Basınç altında oluşan ısı enerjisi buzu doğrudan su buharına dönüştürmektedir (Richmound, 2004).

İlk kurutma fazında donan su uzaklaştırılırken, ikinci kurutma fazında ise sorbent su uzaklaştırılmaktadır. Toplam kurutma zamanı bu iki adımın birleşmesiyle belirlenmektedir. Donma fazından sonra, iç basıncın azalmasıyla ortamdaki suyun süblimleşmesi sağlanmaktadır. Süblimleşme sırasında gizli bir ısı oluşmaktadır. Sıcaklığın oluşması iki sorunu ortaya çıkarmaktadır. Bunlar;

- A. Yüksek sıcaklığı ürünün tolere edememesi,
 - 1. Biyoaktivite kaybı,
 - 2. Renk değişimi,
 - 3. Kimyasal yıkım veya biyokimyasal reaksiyonlar,
- B. Kurutma katında yapısal deformasyonların oluşmasıdır (Snowman, 1996).

Liyofilizasyon, yüksek değerdeki market ürünleri için tercih edilebilecek bir kurutma yöntemidir.

2.4.3 Hücre parçalaması

Biyolojik ortamlarda bir metabolitin uzaklaştırılarak saflaştırılması, genellikle hücre parçalanmasını gerektirir. Metabolit, hücre içinde çözünen ve çözünmeyen formda bulunabilir. Çözme ve saflaştırma amacıyla hücre parçalanmasında geniş bir değişim gösteren

membranların yapısal özelliği önemlidir. Bu işlemlerin yapılmasında birkaç yol izlenmektedir. En yaygın kullanılan mekanik işlemler; yüksek basınç homojenizatör, yüksek hızlı bıyalı değirmenler veya ultrasonik titreşimler, mekanik olmayan işlemler ise; fiziksel parçalama (dondurma ve çözündürme, osmotik şok, kurutma), enzimatik yöntemler ve kimyasal yöntemlerdir (organik çözenler) (Richmound, 2004).

Hücre parçalamada kimyasal yöntemler

Hücrelerin hücre zarlarını patlatarak veya hidrolizleyerek de parçalanabildiği bilinmektedir. Hücre duvarları; asitler, alkaliler, organik çözenler ve deterjanlarla kimyasal etkileşime girerler. Hücre membran geçirgenliğinde değişime ve hücre parçalanmasına neden olan kimyasal yöntemler, kısa sürede gerçekleşmeli ve gerektiğinde mekanik yöntemler ile de desteklenmelidir. Membran geçirgenliğindeki değişimde hücre tamamen parçalanmadan sitoplazmik bileşenlerin ekstraksiyonu gerçekleşmiş olmaktadır. Ayrıca, kullanılan kimyasallar analiz sırasında girişim yapabileceğinden, ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabilmelidir (Richmound, 2004).

Çözen olarak toluen, alkoller ve alkanlar kullanılmaktadır. Çözen seçiminde en iyi yol deneylerle çözünürlük parametrelerinin belirlenmesidir (Richmound, 2004).

Çözücü (solvent) seçimi ile belli bir kimyasal yapı grubu, inaktif veya istenmeyen bazı bileşikler düşük oranda, tüketmek mümkündür. En önemli faktör, çözücü ve çözünen bileşiklerin polaritesidir. Çözücü

seçiminde genellikle polarite, çözünürlüğü uygun olan, kaynama noktası düşük, maliyeti düşük, insan sağlığı üzerine etkisi en az olan ve tutuşabilirliği çok az olanlar seçilmelidir (izelge 2.7) (Cannell,1998).

Çizelge 2.7 çözücülerin sınıflandırılması
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Solvent>)

Solvent (özücü)	Kimyasal Formülü	Kaynama Noktası	Polarite	Yoğunluk
Non-Polar Solventler				
Hekzan	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	69 °C	2.0	0,655 g/mL
Benzen	C ₆ H ₆	80 °C	2.3	0,879 g/mL
Toluen	C ₆ H ₅ -CH ₃	111 °C	2.4	0,867 g/mL
Dietil eter	CH ₃ CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₃	35 °C	4.3	0,713 g/mL
Kloroform	CHCl ₃	61 °C	4.8	1,498 g/mL
Etil asetat	CH ₃ -C(=O)-O-CH ₂ -CH ₃	77 °C	6.0	0,894 g/mL
Tetrahidro furan (THF)	$\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--O--CH}_2\text{--CH}_2\text{--}$	66 °C	7.5	0,886 g/mL
Polar Aprotik Solventler				
Aseton	CH ₃ -C(=O)-CH ₃	56 °C	21	0,786 g/mL
Asetonitril (MeCN)	CH ₃ -C≡N	82 °C	37	0,786 g/mL
Dimetilformamit (DMF)	H-C(=O)N(CH ₃) ₂	153 °C	38	0,944 g/mL
Dimetilsülfoksit (DMSO)	CH ₃ -S(=O)-CH ₃	189 °C	47	1,092 g/mL

Polar Protik Solventler				
Asetik asit	$\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$	118 °C	6.2	1,049 g/mL
<i>n</i> -Bütanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	118 °C	18	0,810 g/mL
Isopropanol	$\text{CH}_3\text{-CH(-OH)-CH}_3$	82 °C	18	0,785 g/mL
<i>n</i> -Propanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	97 °C	20	0,803 g/mL
Etanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	79 °C	24	0,789 g/mL
Metanol	$\text{CH}_3\text{-OH}$	65 °C	33	0,791 g/mL
Formik asit	H-C(=O)OH	100 °C	58	1,21 g/mL
Su	H-O-H	100 °C	80	0,998 g/mL

Hücre parçalamada mekanik yöntemler

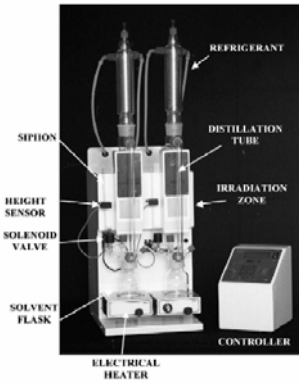
Yüksek basınç homojenizatörü; büyük çaplara uygulanabilecek en uygun mekanik parçalama yöntemidir. Alg hücreleri için en çok Monton-Gaulin yüksek basınç homojenizatörü kullanılmaktadır.

Yüksek hızlı bilyalı değirmenler; *Scenedesmus obliquus* ve *Spirulina platensis* alglerini parçalamakta yüksek hızlı bilyalı değirmenler kullanılmaktadır. Homojenizöre göre avantajı her hangi bir tıkanmanın olmamasıdır (Hedenskog et al.1969).

Ultrasonik titreşimler; sıvı içindeki ultrasonik dalgalar, basınç değişimi meydana getirirler. Basınç sayesinde şok dalgaları oluştururlar. Aynı zamanda sıcaklık artışı olurken, serbest radikallerde meydana gelir. Laboratuvar çapında mikroalgleri parçalamak için kullanılmaktadır (Richmond, 2004).

2.4.4 Ekstraksiyon

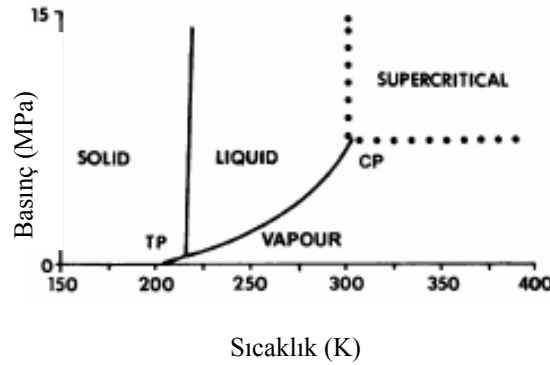
Solvent destekli ekstraksiyon metotlarında en çok Soxhlet cihazı kullanılmaktadır. Soxhlet cihazında bütün işlem boyunca örneğe çözücü değmesi devam etmekte, filtrasyon istememesinden dolayı da kolaylık sağlamaktadır. Soxhlet ekstraksiyonunun dezavantajı, zaman alması ve çok fazla organik çözücünün, işlem sonrası eliminasyonunun zor olmasından kaynaklanmaktadır (Crespo Punin et al., 2005). Luque-Garcia ve Luque de Castro 2003 yılında Mikrodalga yardımcı ekstraksiyon (MAE) ile Soxhlet aparatını birleştirmiştir. Kullanılan bu cihaz ile birlikte Soxhlet ekstraksiyonu sırasında kaybedilen zaman azalmaktadır. Bu cihaza hedeflenmiş mikrodalga yardımcı soxhlet ekstraksiyonu (focused micro-wave assisted Soxhlet extraction) (FMASE) denilmektedir (Şekil 2.6). Bu alet uzun ekstraksiyon zamanı kısaltmakta ve hedef mikrodalga enerjisi kullanılarak toplam ekstrakt hacminin %75-85'inin geri kazanılması sağlanmaktadır (Luque-Garcia and Luque de Castro, 2003).



Şekil 2.6 Şekilde yeni ikili otomatik hedefli mikrodalga yardımcı Soxhlet ekstraksiyonu (Luque-Garcia et al., 2003)

Son yıllarda geleneksel ayırma metotlarından farklı olarak süper kritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) kullanımı artmıştır. Analitik kimyada, mikrodalga yardımcı(assisted) ekstraksiyonu (MAE), basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE) ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) gibi yeni teknikler kullanılarak organik solvent miktarı azaltılmaktadır (Hartonen, et al. 2002). Organik solventlerin negatif etkilerini ortadan kaldırmak için süperkritik karbondioksit kullanılmaktadır (Berg, et al.,1998). Bu teknikler ile Soxhlet, sonikasyon ve hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu sistemlerine göre daha iyi ürün elde edilmektedir (Crespo Punin et al., 2005).

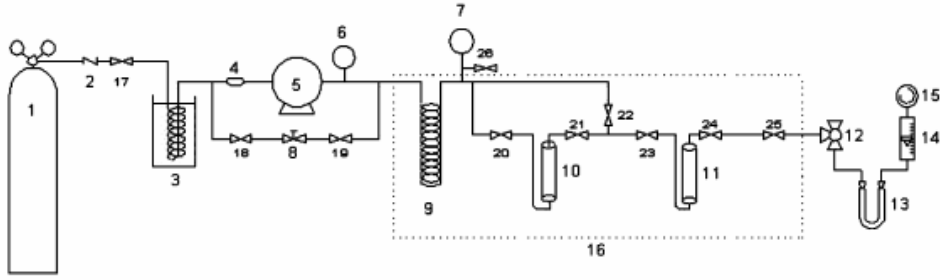
Şekil 2.7 de kritik sıcaklık değerinin üzerinde ne türlü basınç uygulanırsa uygulansın; gaz,sıvı haline getirilemediğinden, bu sıcaklık değerine “Gazın kritik sıcaklığı”, aynı şekilde, maddenin kritik sıcaklığında gazın sıkıştırılabilmesi için gereksinim duyulan basınç değerine de “Gazın kritik basıncı” denilmektedir (Mendes, et al., 2003).



Şekil 2.7 Karbondioksit için basınç sıcaklık faz diyagramı (Mendes, et al., 2003)

Çözünen madde miktarı, çözücünün gücüne, heteromoleküler etkileşimine ve çözücünün yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Süperkritik karbondioksitte CO₂ (Şekil 2.8) kullanımı sıvılara göre giderek artan bir önem kazanmaktadır. Çünkü karbondioksit toksik olmadığı için, hem kalıntı hemde çevre açısından problem oluşturmaz. Yanıcı ve korozif değildir. Maliyeti düşük olup, saf halde eldesi mümkündür. Diğer yandan düşük sıcaklıklarda çalışıldığından, üründe istenmeyen termal degradasyonun da önüne geçilmektedir. Viskozitesi düşük, difüzyon katsayısı yüksek olduğundan katı matrislere kolayca nüfuz edebilmektedir. Diğer organik çözücüler ile karşılaştırıldığında uçuculuğu yüksektir.

Organik ve inorganik tuzlar, şekerler, glikozitler, amino asitler, saponinler, taninler ve fosfolipidler gibi polar bileşikler ve proteinler, polisakkaritler ve politerpenler gibi polimerler CO₂'de çözünmediğinden CO₂ ekstraktlarında bu tür maddeler bulunmaz. Polar bileşikler için CO₂ kötü bir çözücüdür. Bunun için CO₂ su, metanol, etanol gibi polar bileşikler ile karıştırılarak polaritesi artırılabilir (Mendes, et al., 2003).



Şekil 2.8 Süper kritik ekstraksiyon ve çözünürlük belirlenmesinde şematik akış planı: 1. Gaz tübü, 2. Kontrol vanası, 3. Buz dondurucu, 4. Filtre, 5. Pompa, 6-7. Manometreler, 8. Geri basınç düzenleyici, 9. Isı değiştirici, 10-11. Ekstraktör, 12. Üç yollu vana, 13. Cam U tübü, 14. Rotametre, 15. Islak test metre, 16. Su banyosu, 17-26 Vanalar (Mendes, et al., 2003)

Alglerden β -karoten ekstraksiyonunun eldesi hakkındaki bazı metotlar Çizelge 2.8 de verilmiştir. β -karoten ve klorofil hücrelerden çözücüler veya sıvı yağlar kullanılarak ekstrakte edilmektedir. Ekstraksiyon verimini arttırmak için, hücreler parçalandıktan sonra yüksek polariteye sahip olan organik solventler seçilmektedir. β -karoten ayırımında organik fazın ayrımı içinde ayırma ve saflaştırma uygulanan bazı metotlar bulunmaktadır (Hejazi, et al., 2002).

Çizelge 2.8 *Dunaliella salina*’ dan β -karoten ekstraksiyonu için kullanılan metotlar (Hejazi, et al., 2002).

Kırma Metodu	Ekstraksiyon Çözücüsü	Kaynaklar
Osmotik şok	Etanol, hekzan, siklohegzan, benzen	Avron&Ben-Amotz (1980)
Isıl uygulamalar	Halojenat, alifatik veya aromatik hidrokarbon	Ruegg (1984)
Homojenizasyon	Sıvı yağ	Nonomuru (1987a,1987b)
Kırma eklemenden	Süper-kritik CO ₂	Leorenzo (1991)
Osmotik şok ve mekanik metot	Hegzan,siklohegzan,petrol eter	Haigh (1994)
Isıl Uygulamalar	Sıvı yağ	Sasol-Chem. Co. (1994)
Güçlü çözen (Metanol)	Metilen klorit ve etanol	Mitsubishi-oil Co.(1994)a
Güçlü çözenler	Aseton, metanol, dietileter	Liang&Pang(1997)b
Isıl uygulamalar ve organik çözenler	Bir asit esteri ile yağ karışımı	Heidlas et al. (1998)c

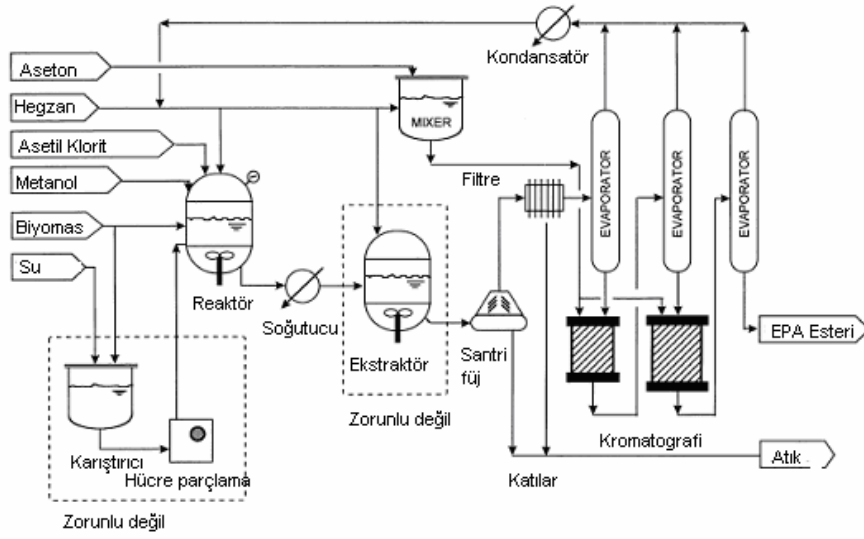
a maya (*Rhodotorula glutinis*)

b alg *Spirulina*

c farklı doğal kaynaklar içeren alglerden

Büyük çapta mikroalglerin biyokütlesinden eicosapentaenoic asit (EPA) esteri yüksek saflıkta (>%95) elde edilmektedir. İşlem üç adımda gerçekleşmektedir (Şekil 2.9);

1. Alg biyokütlesinden ekstraksiyon ile yağ esterlerinden transesterifikasyon,
2. Gümüş iyon kolon kromatografisi,
3. Klorofilin uzaklaştırılmasıdır (Belardi Hassan, et al. 2000).



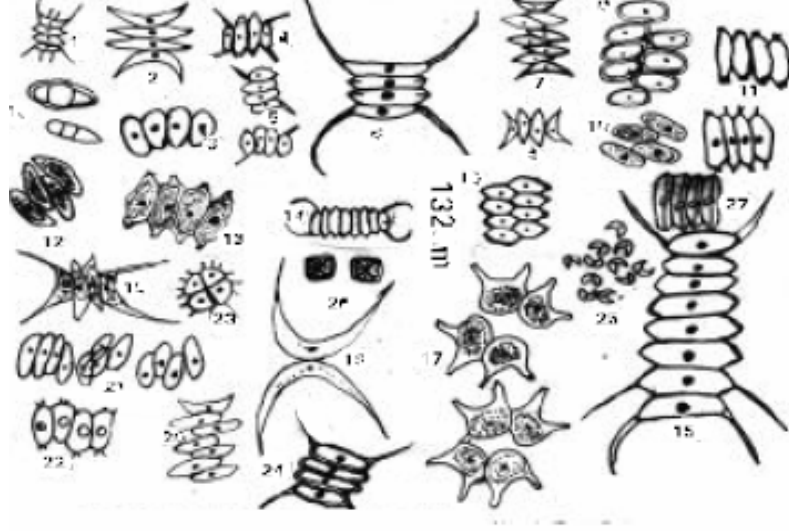
Şekil 2.9 Mikroalglerden EPA'nın elde edilış şeması (Belardi Hassan, et al. 2000).

2.5 *Scenedesmus sp.*

2.5.1 *Scenedesmus sp.*'nin genel özellikleri

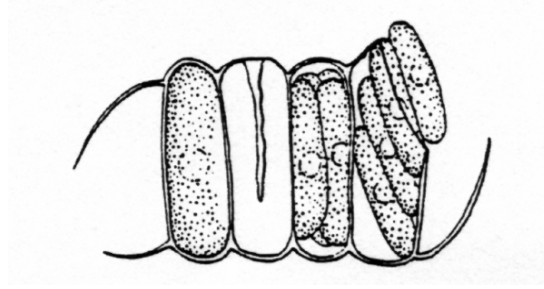
Chlorophyta (Yeşil algler) içinde yer alan *Scenedesmus*'un fertlerinin genel görünüşü mekik biçimindedir. Bazıları tek ve bazıları da 2, 4, 8 veya 16 lı coenobia halindedir. Türe göre sayısı, yeri ve şekli değişen boynuza benzer çıkıntıları bulunmaktadır. Her hücrede 1 kromatafor, 1 çekirdek ve 1 pirenoid bulundurur. Göz ve kamçı yoktur. Protein maddesince zenginliği nedeniyle son zamanlarda kültürü yapılarak gıda olarak kullanılmaktadır (Güner, and Aysel, 1991).

Scenedesmus' un bir çok farklı formu bulunmaktadır (Şekil 2.10). Oval veya fusiform hücreler yan yana dizilerek coenobiaları oluşturur.



Şekil 2.10 *Scenedesmus*'un değişik türleri;1 *Scenedesmus abundans*, 2 *S. acuminatus*, 3 *S. arcuatus* Lemm., 4 *S. armatus*, 5 *S. armatus* var. *bicaudatus*, 6 *S. armatus* var. *major*, 7 *S. bijugatus*, 8 *S. acuminatus*, 9 *S. bijugatus* f. *irregularis*, 10 *S. bijugatus* var. *alternans*, 11 *S. denticulatus* var. *australis*, 12 *S. incrassatulus*, 13 *S. obliquus*, 14 *S. opoliensis*, 15 *S. quadricauda* (Trap.) Breb. var. *setosus*, 16 *Scenedesmus platydiscus*, 17 *Sorastrum americanum*, 18 *Selenastrum westii*, 19 *Scenedesmus acuminatus* var. *acuminatus*, 20 *S. baculiformis*, 21 *S. acutus*, 22 *S. denticulatus*, 23 *Tetrastrum staurogeniaeforme*, 24 *Scenedesmus quadricauda*, 25 *Kirchneriella obesa*, 26 *Crucigenia tetrapedia*, 27 *Scenedesmus acutiformis* Sch. (Leghari et al, 2001)

Üremeleri otokoloniler ve zoosporlar ile sağlanmıştır. Gelişim şartları altında üreme prosesi 3 aşamada gerçekleşmektedir. Bunlar; DNA eşlemesi, çekirdek bölünmesi ve protoplast füzyonu ile sonuçta sekiz tek hücreli otosporları oluşturmaktadırlar (Şekil 2.11) (Tukaj ve ark., 2002).



Şekil 2.11 Kardeş coenobia oluşması

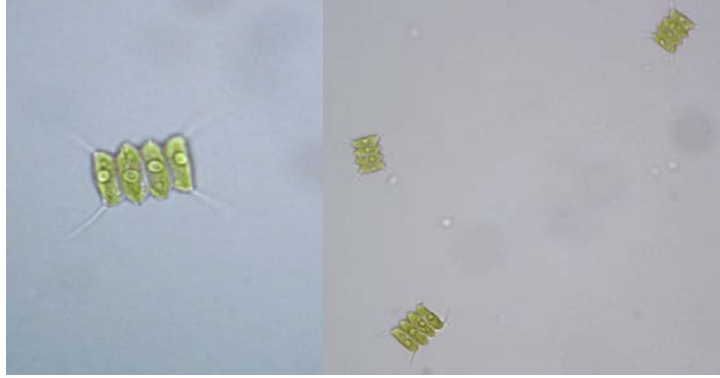
(<http://io.uwinnipeg.ca/~simmons/2152web/2152/lb3pg2.htm>)

Yeşil alglerden özellikle *Scenedesmus* cinsi üyeleri limnolojinin bir çok alanındaki işlemlerde kullanılmaktadır. Sucul araştırma, teknoloji ve su yönetimi gibi sayısız alanda standart organizma olarak kullanılmaktadır. Algin gelişimi, morfolojisi ve yaşam döngüsü çalışmalarla belirlenmiştir. *Scenedesmus* herbivor zooplanktonlar için iyi bilinen gıda kaynağı olduğu deneylerle kanıtlanmıştır.

Standart alg gelişim alanında kimyasaldan başka etkili olan predatörler olmaktadır. Bir çok araştırma uygulamalarında alg hücrelerinin biyokimyasal kompozisyonu, onların kalitesinin belirlenmesinde önemli bir özellik olmaktadır. Bunlar algin pigment ve yağ asitleri kompozisyonu ile yakından ilişkilidir. Pigmentlerden algal hücre fizyolojisi hakkında bilgi alınırken, lipidler ve yağ asitleri ise algal besin değerlerinin belirlenmesinde önemlidir. Algin pigment kompozisyonu ekstraksiyonunda ve analizinde problemlerle karşılaşmaktadır. Analitik problemler önceden belirlenmiştir. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile akuatik sistemlerdeki klorofil ve diğer fotosentetik pigmentlerin belirlenmesi sağlanmaktadır. Ekstre edilemeyenler de pigmentlerin tamamının belirlenmesi zor olmaktadır.

Wright ve ark. (1997), denizsel algler için ekstraksiyon metotlarını belirlemiştir. Buna rağmen bazı yöntemler hala bir çok biyokimyasal ve fizyolojik soruları içeren *Scenedesmus* için yeterli olmamaktadır (Wiltshire et al., 2000).

Lipidler ve yağ asitleri analizi konusunda bir çok farklı hazırlık yöntemi ve analitik teknikleri içeren literatürler yayınlanmaktadır. Ama lipid ekstraksiyonundaki klasik çalışmalarda kullanılan örneklerin çoğu hayvan dokuları ile ilgilidir. Literatürlerde mikroalglerin yağ asitleri ve lipid içeriği ile ilgili standart ekstraksiyon metodu bulunamamaktadır. Yayınlanan ekstraksiyon metotları; solventler, homojenizasyon, sonikasyon, çalkalama ve karıştırmayı içermektedir (Wiltshire et al., 2000).



Şekil 2.12 *Scenedesmus protuberans* 400X

2.5.2 *Scenedesmus protuberans*' in sistematığı

Scenedesmus sp. nin sistematikteki yeri (Becher, and Venkataraman, 1981; Güner, and Aysel, 1991);

Phylum: Chlorophyta

Class : Chlorophyceae

Order : Chlorococcales

Family : Scenedesmaceae

Genus : Scenedesmus

Strain : *Scenedesmus protuberans* Fris.

Chlorophyceae:

Hücre Duvarı: Çok tabakalı yapıdadır. İç membran pektin, selüloz, selüloz ile birlikte polisakkaritleri içermektedir. Dış membran musilajlı ve pektoz tabakalar, fibriller bulundurmaktadır.

Kloroplast: Bulundurmakta, plazma membranına bağlı, pigmentleri içermektedir. Farklı biçimler de, lamellar çiftleri içermektedir.

Pigmentler: Klorofil a ve klorofil b. Karotenoidler yüksek bitkilerdeki spektruma benzemektedir.

Vakuol: Genelde bulunmaktadır. Hücrede osmotik basıncın düzenlenmesinde görevlidir.

Nukleus: Bulunmakta, membran ile çevrili nükleik asit ve protein içermektedir.

Mitokondri: Bulunmakta, solunum ve lipid metabolizmasında görev almaktadır.

Ribozom: Bulunmaktadır, 80 S.

Depo Ürünleri: Nişasta, amiloprotein ve lipidler.

Endoplazmik retikulum : Bulunmaktadır.

Üremesi: Hücre bölünmesi, sporlar, eşeysel üreme ile gerçekleşmektedir (Becker and Venkataraman, 1981).

2.5.3 *Scenedesmus sp.*' nin hücre biyolojisi

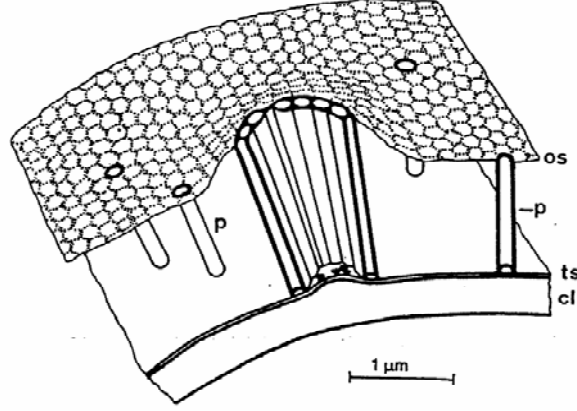
Bir yeşil alg olan *Scenedesmus* Chlorococcales ordosu içinde tipik olarak 2, 4, 8 veya yaklaşık 16 hücreler halinde düzenli coenobia oluşturmaktadırlar. Bu topluluklara kısaca coenobia adı verilmektedir. Coenobia çevre koşulları altında parçalanarak tek hücreli olma eğilimindedir. Bu hücrelerin boyut ve şekillerinde çeşitlilik meydana gelmektedir. Bilinen 200' den fazla tür içeren *Scenedesmus*'un çok azı heterogenus içermektedir.

Scenedesmus türlerinde farklı koşullarda geliştirilen fizyolojik karakterizasyon örnekleri;

1. *Scenedesmus spp.* hidrojenaz yapabilme yeteneğindedir. Işıklı ortamlarda O_2 ve H_2 azalan basınç altında H_2 serbest bırakmaktadır. CO_2 azaldığında, H_2S ve organik hidrojen donorlerinden H_2 çıkarmaktadır. Karanlıkta organik maddeden H_2 ve CO_2 ürünlerini oluşturmaktadır.
2. Azot, fosfor ve potasyum eksikliğinde sekonder karotenoidleri (ksantsantin, astaksantin) oluşturmaktadır.
3. Jelatini sıvılaştırıcı ekstrasellüler proteazı serbest bırakmaktadır.
4. Nişasta hidrolizinde ekstrasellüler amilaz potansiyelini serbest bırakılmaktadır.
5. Asit toleransı, standart şartlar altındaki ölçümleri ile karşılaştırıldığında azalmaktadır.

6. Kessler (1977), *Scenedesmus* suşlarının düşük tuz konsantrasyonunda yaşadıklarını ve tatlı su organizmaları olduklarını göstermektedir (Borowitzka ve Borowitzka, 1992).

Scenedesmus genusu çok-tabakalı hücre duvarına sahiptir. İç tabaka selüloz içeren hemiselüloz matriks içinde yer almaktadır. Dış ile üçüncü ara tabaka dirence bağlı dejenerasyona uğrayabilen politerpen, sporopollenin yapısındadır (Şekil 2.13). *S. obliquus* genellikle otocoenobianın dışında çift kamçılı gametler de oluşturmaktadır. Önce kardeş hücreler serbest kalmakta, sonra iç selülozik tabaka çözülmeaktadır. Kardeş hücrelerin sporopollenin tabakası olmadığından ilk bileşiklerin sentezlenmesinden sonra selülozik tabakadan hücreler serbest kalmaya başlarlar. Sonra sporopollenin tabakanın ardından hücre duvarının kırılmasıyla kardeş coenobia serbest kalmaktadır. Gelişim fazında selülozik tabaka kalınlaşmaktadır. Laboratuvar kültürlerinde hücre döngüsü 24 saat iken, dış ortamlardaki kültürlerde ise hücre döngüsü 48 saatte veya daha fazla sürede tamamlanmaktadır (Borowitzka and Borowitzka, 1992).



Şekil 2.13 *Scenedesmus maximus*' un hücre duvarı yapısı (cl: selülozik tabaka, ts: trilaminar sporopollenik tabaka, os: ağ gibi olan yapı dış sporopollenik tabaka, p: iletişim desteği) (Borowitzka and Borowitzka, 1992)

2.5.4 *Scenedesmus sp.*'nin kimyasal kompozisyonu

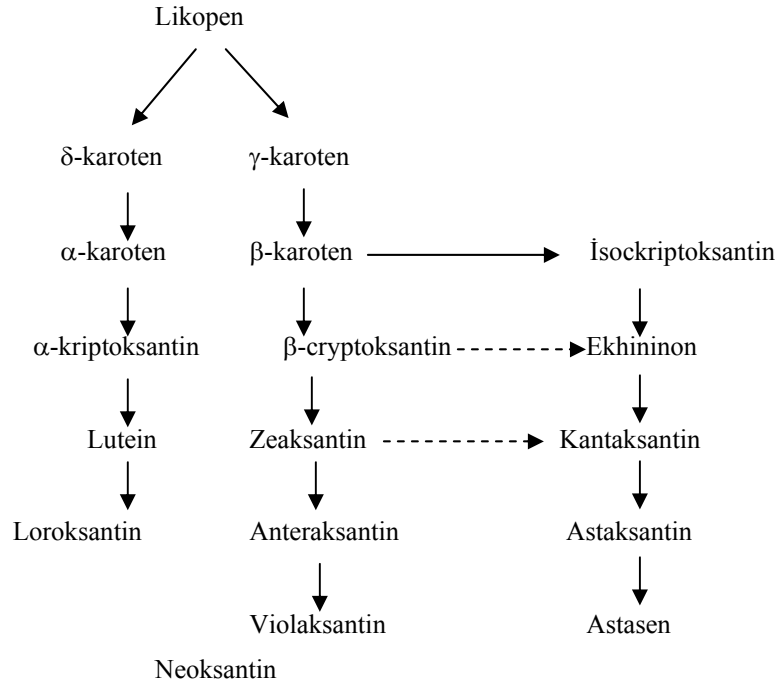
Scenedesmus türlerinin dış kültürlerindeki kuru biyokütlesinin ham protein içeriği %50 ile %53 arasındadır. *Scenedesmus* üretiminin artırılmasıyla, tek hücre proteini kaynağı olarak kullanımı mümkün olmaktadır (Çizelge 2.9) (Borowitzka ve Borowitzka, 1992).

2.5.4.1 *Scenedesmus*' un karotenoid biyosentezi

Yeşil alglerin pigment kompozisyonunun içeriği yüksek bitkilere benzemektedir. Bunlar; β -karoten, α -karoten, lutein, violaksantin, neoksantindir (Şekil 2.14) (Bishop et al., 1995 ve Orosa et al., 2000).

Scenedesmus sp. yeşil alginin fotosentetik aktivitesi yüksek bitkilerdeki gibi olmuştur. Fotosentezde, klorofiller ve karotenoidler yapısal ve

fonksiyonel görev almaktadırlar (PSII ve PSI). Karotenoidlerin meydana gelmesine ışık tutan kompleksler fotosentez için klorofiller ile etkileşim halindedir. Karotenoidlerden lutein ürünler ile birlikte aktif PSII de gerekmektedir. PSI unitelerinde karotenoid sentezi bulunmamıştır (Wiltshire et al. 2000).



Şekil 2.14 *Scenedesmus*' un karotenoid biyosentezi (Bishop et al., 1995; Orosa et al., 2000)

Çizelge 2.9 İnsan gıdaları ve farklı alglerin kuru ağırlıklarındaki (%) kimyasal kompozisyonu (Becker, 1995).

Maddeler	Protein	Karbonhidratlar	Lipidler	Nükleik asit
Ekmek Mayası	39	38	1	-
Pirinç	8	77	2	-
Yumurta	47	4	41	-
Süt	26	38	28	-
Et	43	1	34	-
Soya	37	30	20	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47		1.9	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	³ -5
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5

Çizelge 2.10 Farklı sınıflardaki alglerin lipid içeriği (Borowitzka and Borowitzka, 1992).

Alg Sınıfları	Toplam Lipidler (%) kuru ağırlık)	Toplam Lipidlerin Yüzdesi		
		Doğal lipidler	Glikolipidler	Fosfolipidler
Cyanobacteria	2-23	11-68	12-41	16-50
Chlorophyceae	1-70	21-66	6-26	17-53
Crysophyceae	12-72	-	-	-
Cryptophyceae	3-17	-	-	-
Xanthophyceae	6-16	44	17	39
Rhodophyceae	1-14	41-58	42-59	-
Bacillariophyceae	1-39	14-60	13-44	10-47

2.5.5 *Scenedemus sp.* ticari üretimi yapan ülkeler

Almanya 1953 yılında yapılan araştırmalarda atık CO₂'i kullanarak *Chlorella sp.* ve *Scenedesmus acutus* üretilmişlerdir. Dortmund daki çalışmalarda Soeder ve ekibi alg kültürleri için yeni teknikler geliştirmiştir. Kanallı havuzlarda, çarklı karıştırmayı kullanmışlardır.

1970'ler de Alman Hükümeti alg kültürlerinin arttırılması için çeşitli ülkelerde bazı projeleri desteklemiş ve geliştirilmesine izin vermiştir. Örneğin; Hindistan'da, Dortmund'da geliştirilen teknoloji kullanılarak *Scenedesmus* kültürü yapılmıştır. Daha sonra bunu Tayland ve Peru da kullanmıştır (Çizelge 2.11).

1960'lar da kütle retiminde *Scenedesmus* Çekoslavakya da Hidrobotanik Endüstrisinde Trebon da kaskatlı tip havuzlarda geliştirilmiştir. Aynı sistemde Bulgaristan *Chlorella* retimi yapmaktadır (Sasson, 1997).

Çizelge 2.11 *Scenedesmus* reten şehirler ve lkeleri (Vieira and Baylina,1995)

řirket	Teknolojiler	lke	retim
Euta	Açık Sistem	Brezilya	Biyokütle
Nova Fronteira	Açık Sistem	Brezilya	Biyokütle
Biyoteknoloji Ens.	Laboratuar, pilot tesis	Almanya	Biyokütle
Sekine Ens.	Büyük lekli CO ₂ li fermentör	Japonya	Akuakültür için Biyokütle
Martin Marietta Corporation	Açık Sistem	Amerika	Biyokütle

3.MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Organizma

Bu çalışmada kullanılan *Scenedesmus protuberans* 'ın orijini Isparta'daki Eğirdir Gölü'dür. Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonundan (EGE-MACC) sağlanmıştır.

3.1.2 Mikroorganizmalar

In vitro antibakteriyel çalışmalarında dokuz bakteri suşu; *Streptococcus faecalis* ATCC 8043, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. cloacae* ATCC 13047, *Escherichia coli* ATCC 29998, *Salmonella typhimurium* CCM 583, *Bacillus cereus* CCM 99) ve bir tane maya (*Candida albicans* ATCC 10239) Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından sağlanmıştır.

3.1.3 Kültür ortamları

Scenedesmus protuberans 'ın kültürü için Bold's Basal (BBM), Blue Green Algae (BG-11) ve RD Medium kültür ortamları kullanılmıştır. Ortam içeriği destile suda çözüldükten sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Katı ortam hazırlamak için

litreye 15 g agar ilave edilmiştir. Kültür ortamlarının kompozisyonu Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.1 Bold's Basal Ortamı (BBM)'nin kompozisyonu (<http://www.ccap.ac.uk/media/recipes.htm#>)

	Stoklar	200 mL Destile H₂O
1	NaNO ₃	5,0 g
2	MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,5 g
3	NaCl	0,5 g
4	K ₂ HPO ₄	1,5 g
5	KH ₂ PO ₄	3,5 g
6	CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,5 g

7	İz Element Çözeltisi	1L Destile H₂O
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,82 g
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,44 g
	MoO ₃	0,71 g
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,57 g
	Co (NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,49 g

	Stoklar	100 mL Destile H₂O
8	H ₃ BO ₃	1,14 g
9	EDTA-KOH Çözeltisi EDTANa ₂ KOH	5,0g 3,1 g
		1L Destile H₂O
10	FeSO ₄ . 7H ₂ O Kons. H ₂ SO ₄	4,98 g 1,0g

Ortam;

Stok Çözeltilerden 1-6' ya kadar olanların her birinden 10,0 mL

Stok Çözeltilerden 7-10' a kadar olanların her birinden 1,0 mL

1 litrelik balon joje içerisine stok çözeltilerden Çizelge 3.1'de belirtilen oranlarda ilave edildikten sonra 1L' ye tamamlanmıştır.

Çizelge 3.2 Blue Gren Algae (BG-11) ortamı kompozisyonu (Sukatar, 2002)

	Stoklar	1L Destile H ₂ O
1	NaNO ₃	150 g
2	K ₂ HPO ₄	4 g
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6 g
5	Sitrik asit	0,6 g
6	Ferik Amonyum Sülfat	0,6 g
7	Na ₂ Mg EDTA (disodium magnesium salt)	0,1 g
8	Na ₂ CO ₃	2 g

9	İz Metal Çözeltisi (A ₅ +Co)	g/1L Destile H ₂ O
	H ₃ BO ₃	2,86
	MnCl ₂ .4 H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,390
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
	Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,05

Ortam;

Stok Çözeltilerden 1-8' e kadar olanların her birinden 10,0 mL

Stok Çözeltilerden 9'dan 1,0 mL

1 litrelik balon joje içine stok çözeltilerden belirtilen miktarlarda eklendikten sonra 1L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3 RD Medium kompozisyonu (Rudic and Dudnicenco, 2000)

	mg/1L Destile H ₂ O	g/1L Destile H ₂ O
NaNO ₃	300	3
KH ₂ PO ₄	20	0,2
K ₂ HPO ₄	80	0,8
NaCl	20	0,2
CaCl ₂ . 2H ₂ O	47	0,47
MgSO ₄ . 7H ₂ O	10	0,1
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,1	0,001
MnSO ₄ . H ₂ O	1,5	0,015
H ₃ BO ₃	0,3	0,003
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,3	0,003
FeCl ₃ . 6H ₂ O	17	0,17
Co(NO ₃) ₂ . H ₂ O	0,2	0,002
EDTA	7,5	0,075

1 litrelik stok hazırlandıktan sonra 100 mL bu stoktan alınıp 1L'lik balon jode destile su ile tamamlanarak ortam hazırlanmıştır.

3.1.4 Mikrobiyolojik Besiyeri

Mueller Hinton Agar içeriği;

	g/L
Et karışımı	2,0
Kazein pepton	17,5
Nişasta	1,5
Kalsiyum klorit	0,050
Magnezyum sülfat	0,020

3.1.5 Işık kaynağı

Işık kaynağı olarak Philips marka (18W/54) day light floresan lambalar kullanılmıştır.

Işık şiddetini ölçmek için kuantum sensörlü kuantum metre kullanılmıştır (www.egc.com/illumination.html).

Işık Kaynağı	Foton dan W/m²	W/m² den Foton	Foton dan Lüks	Lüks dan Foton	W/m² den Lüks	Lüks den W/m²
Gün ışığı	0.219	4.57	54	0.019	0.249	4.02
Cool white floresans	0.218	4.59	74	0.014	0.341	2.93

$$1 \text{ mol foton} = 6,022 \times 10^{23} \text{ foton}$$

$$1 \text{ } \mu\text{mol/m}^2\text{sn} = 1 \text{ } \mu\text{E/m}^2\text{sn}$$

$$1 \text{ W daylight} = 5\text{-}4,6 \text{ } \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$$

$$1 \text{ W cool white} = 4,6 \text{ } \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$$

3.1.6 Ekipmanlar

Çizelge 3.4 Kullanılan ekipman markaları ve özellikleri

Otoklav	Hirayama Hiclave (HVE-50)
Santrifüj	Hettich Universal 32R
Spektrofotometre	Unicam-Helios- α
Lüksmetre	Lutron LX-105
pH-metre	Hanna PI 9321
Vorteks	Stuart Scientific SA 2
Analitik Terazî	Metler Toledo
Membran Filtre Ünitesi	Sartorius SM 16309
Su Banyosu	Memmert
Hot Plate	Stuard Scientific
Liyofilizatör	Edwards-Modulyo
Kültür Dolabı	Uğur
Mikroskop ve Fotoğraf Çekim Aparatı	Olympus CH40
Etüv	Memmert
Rotary Evaporatör	Bibby
Derin Dondurucu	Arçelik
Filtrasyon Sistemi	Sartorius
UV lambası ve kabini	Cannas

3.1.7 Kimyasallar

α -tocopherol (vitamin E), BHT (bütilated hidroksitoluen), β -karoten, Tween 20, Linoleik asit, DPPH (2,2- difenil-2 pikrilhidrazil hidrat), Gallik asit, Folin-Ciocalteu reaktifi, Na_2CO_3 , Mueller Broth Sıvı₁, Mueller broth Agar, Metanol, Kloroform, Aseton, TLC (Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)).

3.1.7.1 Çözeltiler

DPPH çözeltisi; % 0,004 DPPH methanol içinde çözülür.

Toplam fenol analizi çözeltiler;

Gallik Asit (0,005g/100mL)

Folin-Ciocalteu reaktifi V(1:10)

Na₂CO₃ (6g/100mL)

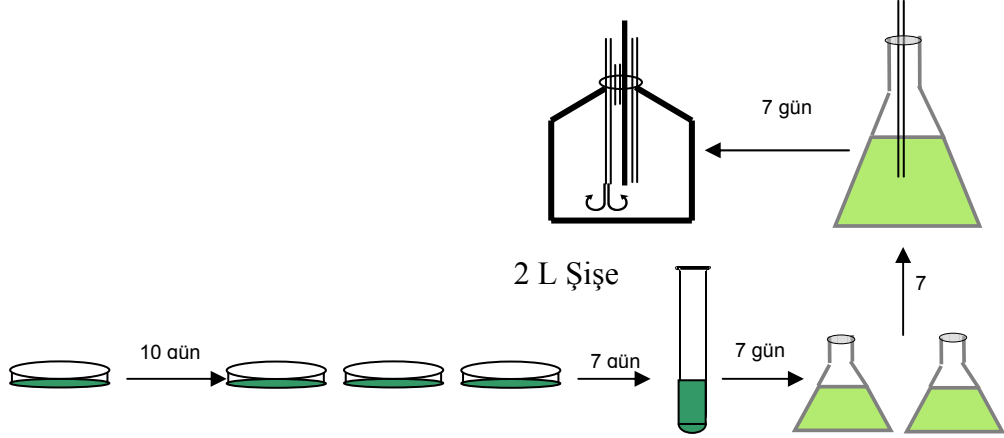
% 30 Sülfirik asit çözeltisi

3.2 Metot

3.2.1 Stok kültür hazırlanması

Ege-MACC'den alınan *Scenedesmus protuberans* ilk olarak Bold's Basal katı kültür ortamı içeren petri kabına çizgi ekim yöntemi ile inokule edilerek 10 gün boyunca koloni oluşturmak üzere kültür dolabında inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem en az üç kez tekrarlanmıştır. Monoalgal ve aksenik koloniler elde edilinceye kadar devam edilmiştir. Daha sonra steril BBM sıvı ortamı içeren otoklavlanmış 10 mL' lik test tüplerine ateş yanında öze yardımıyla aktarılmıştır. Bir hafta bu tüpler vorteks ile karıştırılarak çöken alglerin homojen dağılması ve havalanması sağlanmıştır. Bir hafta sonra 10 mL'lik tüplerden steril 250 mL'lik erlenlere aktararak kültür dolabında 25°C altında 15

$\mu\text{mol}/\text{m}^2$ snışık şiddeti altında gelişmesi sağlanmıştır. Bir hafta sonra karıştırma sağlaması için hava beslemesi yapılarak 500 mL'lik erlenlere alınmıştır. Üç hafta sonra hacim artırmak için yarısı 2 L'lik kültür şişesine, diğer yarısı ise kontrol olarak 1 L'lik steril otoklavlanmış hava beslemeli erlenlere aktarılmıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.2).



Şekil 3.1 Stok kültür hazırlanması

3.2.2 İnokulum hazırlanması

Çalışmada kullanılacak kültürlerin aynı özellikte olması deneylerin güvenilirliği bakımından önem taşımıştır. Bu nedenle deneylerde kullanılacak aşı kültürlerinin sabit koşullarda hazırlanması gerekmiştir.

Scenedesmus hücrelerinin üretiminde hazırlanan inokulum için inkübasyon süresi 7 gün olarak belirlenmiştir. 7 günlük inkübasyon periyodu sonunda hücreler logaritmik büyüme evresine girmiştir. Bu kültürden besin ortamı ilave edilmesi sonucu 750 nm'de $0,500 \pm 0,03$

absorbans verecek miktarda alınarak hazırlanmıştır. Aşı kültürün üretimi 1 L'lik havalandırılmalı erlenlerde 22°C'de, 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde, çift taraflı aydınlatma uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Tüm kültürlerin üretimi steril Bold's Basal ortamında, monoalgal olarak üretimi sürdürülmüştür. İnokulasyonlar, aseptik şartlarda gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Kültür sistemleri

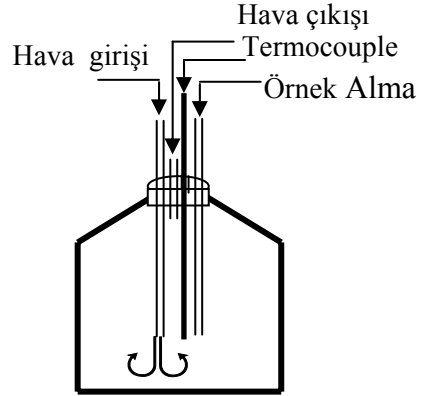
Kültürlerin üretimi için 2 L'lik otoklavlanabilen şişelerde sıcaklık kontrollü bir iklim dolabında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3, Şekil 3.4). 2 adet 30 cm boyunda 0,6 cm çapında pyreks boru örnek alma ve hava besleme amacıyla, 1 adet 10 cm pyreks boru ise hava çıkışı olarak kullanılmak üzere, şişelerin kapaklarına açılan deliklere dış ortamdan gelebilecek kontaminasyonu engellemek amacıyla silikon hortum parçaları ile sabitlenmiştir. Örnek almak için kullanılacak boruya 15 cm, hava beslemesi için kullanılacak boruya ise 30 cm uzunluğunda, 5 mm'lik iç çapa sahip silikon hortum bağlanmıştır. Tüm bağlantıların dış ortamla temas edecek kısımları pamuk ve alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Üretimde beslenen hava 1 L/dak'dır.

Kültür dolabında üretim sıcaklığı sırasıyla 22±2°C ve 28±2°C olarak denenmiştir. Kültürün aydınlatılmasında tek ve çift taraflı day light floresan kullanılmıştır.

Işık kaynağı olarak kullanılan floresanlar ile kültür kapları arasındaki mesafedeki ışık şiddeti Lux-metre cihazı ile ölçümlenerek belirlenmiştir. Deneme dolabı dışarıdan gelen ışık geçişini engellemek için 3 kat kartonla kaplanmıştır.



Şekil 3.2 Kültür dolabındaki üretim kabı



Şekil 3.3 Denemelerde kullanılan 2L kültür kabı

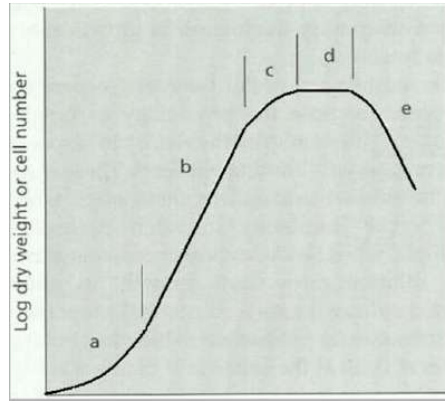


Şekil 3.4 Kültür dolabındaki üretim

3.2.4 Hücre konsantrasyonunun belirlenmesi

Literatürlerde büyüme takibinin birkaç farklı dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm ile belirlendiği görülmüştür (Chen et al.,1996; Pelizer et al., 2003).

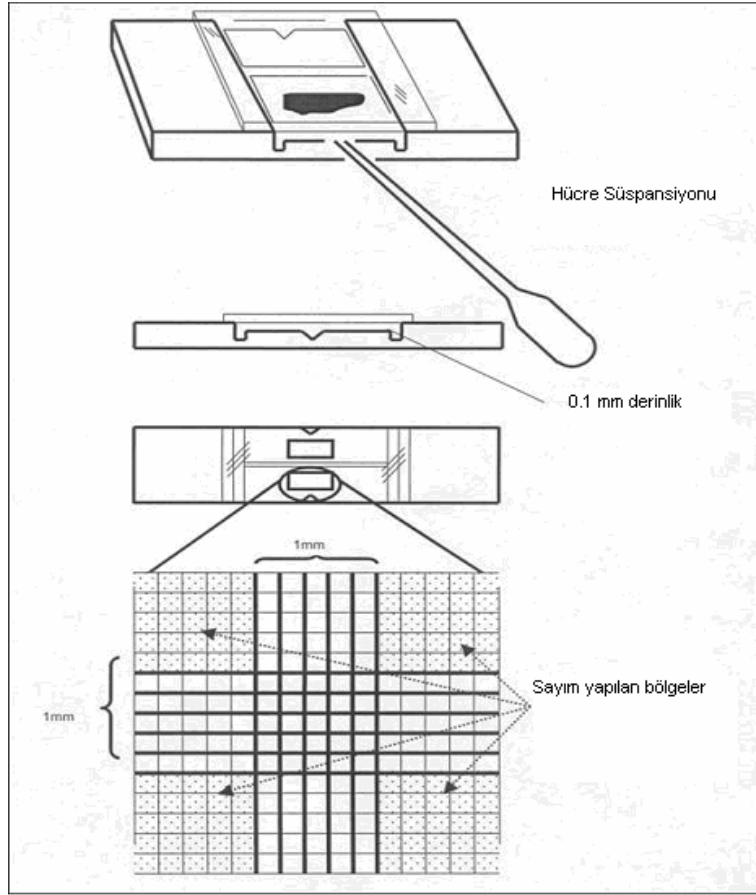
Çalışmada kültürün büyüme takibi için kullanılacak dalga boyu belirlenirken dalga boyu taraması yapılmış ve dört farklı dalga boyu belirlenmiştir. Kültür ortamı kör olarak kullanılarak 560, 650, 685 ve 750 nm'de ölçümler yapılmıştır. Günlük absorbansın yanında Neubauer kamarası ile hücre sayımı ve kültürdeki pH değişimi belirlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Kesikli kültürün büyüme eğrisi (a) Lag faz; (b) eksponansiyel veya logaritmik gelişme fazı; (c)durgunlaşma fazı; (d)stasyonere faz; (e)ölüm fazı. (http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/chap4_im.htm)

3.2.2.1 Hücre sayım yöntemi:

Mikroskopik hücre sayımı Neubauer kamerası kullanılarak yapılmıştır. Kamaranın üzerinde lamelin oturacağı yer hafifçe ıslatılır ve lamel kamara üzerinde ileri geri hareket ettirilerek, hareketsiz şekilde kalması sağlanmıştır. Sayılacak örnek homojenize edildikten sonra pastör pipeti ile bir miktarı alınır ve sayıma hazır hale getirilen kamaraya dikkatlice doldurulur. Hücrelerin tüm kamara alanına homojen olarak dağılması sağlandıktan sonra sayım işlemine başlanır. Sayım işlemi dört kez tekrarlandıktan sonra ortalaması alınarak mL'deki hücre sayısı hesaplanır. Neubauer kamarasındaki 9 adet 1 mm²'lik kareler farklı şekillerde bölünmüştür. Kamaranın total hacmi 9×10^{-4} mL'dir (Şekil 3.6) (Cirik ve Gökpınar, 1993; Stein,1973).



Şekil 3.6 Neubauer kamerası (<http://www.hm.saglik.gov.tr/pdf/kitaplar/css49.pdf>)

3.2.2.1 pH ölçümü

Günlük pH ölçümlerinde Hanna PI 9321 marka pH metrenin günlük kalibrasyonu pH 7 ve pH 10 tamponları ile yapılmıştır.

3.2.5 Büyüme hızı hesaplamaları (Becker, 1995)

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{\Delta t}$$

μ ; Spesifik büyüme hızı

x_2 ; t_2 zamanındaki hücre konsantrasyonu

x_1 ; t_1 zamanındaki hücre konsantrasyonu

$\Delta t = t_2 - t_1$

$$D.T = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$D.T$; İkilenme süresi

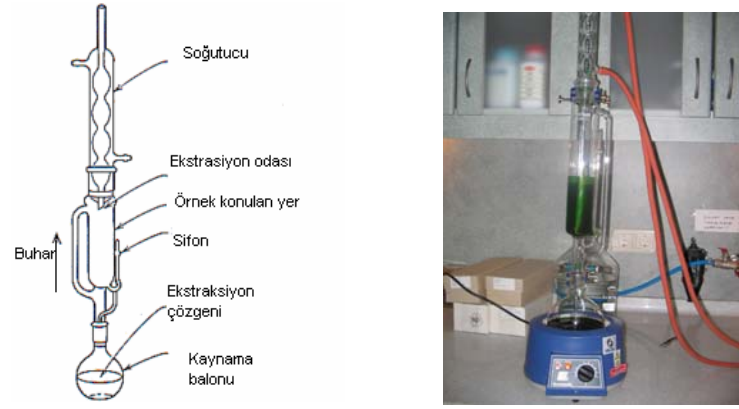
Büyüme hızı hesaplamalarında üretim periyodunun 0. gününde sistemin kurulması için harcanan zaman ve hücrelerin yeni koşullara adapte olma süreci dikkate alınarak 0. gün hesaplamalara ilave edilmemiştir. Ayrıca denemeler sırasında üretim periyodunda ulaşılan maksimum değer x_2 olarak kabul edilmiştir.

3.2.6 Ekstraksiyon

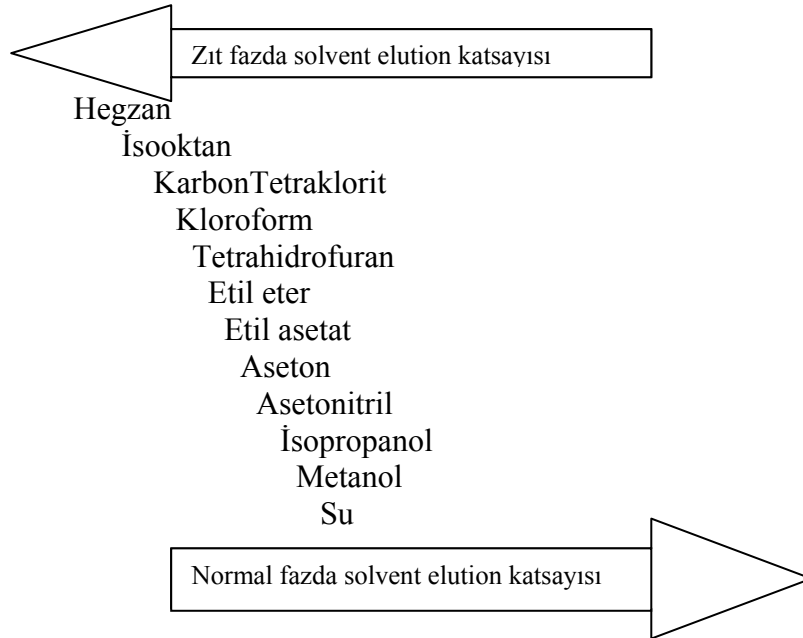
Büyüme eğrileri belirlendikten sonra, sekonder metabolit üretiminin en fazla olduğu evre olan stasyoner faza ulaşan hücrelerin santrifüj veya filtrasyon yöntemi kullanılarak hasatı gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilene kadar filtrant derin dondurucuda ve karanlıkta muhafaza edilmiştir. Liyofilize edilen materyal porselen havanda öğütülerek partiküllerin eşit boyuta gelmesi sağlanmıştır.

Soxhlet aparatının, örnek haznesine filtre kağıdı içine kuru test materyali yerleştirildikten sonra kullanılacak solvent ilave edilmiş ve soğutucusu takılarak sistem kurulmuştur. Solvent ısındıkça buharlaşır, soğutucuda geçeren yoğunlaşır ve örnek materyalin konulduğu haznede toplanır. Test materyali ılık solvent ile yavaş yavaş dolduktan sonra sifon yaparak kaynama balonuna iner. Bu yöntemde döngü uzun sürede gerçekleşir (yaklaşık 18 saat) (Şekil 3.7) (Saifuddin and Chua, 2003). Bu ekstraksiyon yönteminin avantajı, ekstrakt üzerinden temiz ılık solventin düzenli olarak geçirilerek işlemin tekrarlanabilir olmasıdır. Soxhlet'e 5'er gram tartılan örnek ve seçilen çözücü (metanol, aseton, kloroform) ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (60°C de 24 saat) (Demirel et.al,2005). Bu işlemden sonra solventin uzaklaştırılması ve yüzde verim hesabının yapılması amacıyla rotary evaporatör kullanılmıştır.

Polariteye dayanan ekstraksiyon yapılmıştır. Çözücülerin artan polaritelerine göre sıralanması elutropik seri oluşmaktadır. Seçilen bir ortamın elutropik seriye göre etkisini belirlemek için üç farklı polariteye sahip olan çözücü (metanol, aseton ve kloroform) kullanılmıştır. Bunlardan en polar olan metanolün, ekstraksiyon için yeterli olduğu belirlenmiş ve örneklerin ince tabaka kromatografisi (TLC) yapılmıştır. TLC'nin 0,25-mm silika jel ile ön kaplaması yapılmıştır (Vina A. Yang and Carol A. Clausen, 2004).



Şekil 3.7 Soxhlet aparatında ekstraksiyon



3.2.7 Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan metotlar;

3.2.7.1 β -Karoten renk açılması metodu

S. protuberans' in 2 farklı ışıktaki ve 3 farklı ortamdaki metanol ekstraktlarının değerleri, standart olarak kullanılan sentetik BHT ve Vitamin E'nin değerleri ile karşılaştırılarak antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Bu metot β -karoten-linoleik asit modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Suja et al., 2005; Amin et al., 2004; Velioglu et al., 1998; Radonic and Milos, 2003; Amin and Tan, 2002). Hazırlanan β -karoten çözeltisinden (0,2 mg/mL kloroform) 1 mililitre alınır, 50 mL' lik şiliftli balona konulur. Balon içine 0,02 mL linoleik asit ve 0,2 mL %100 Tween 20 ilave edilir. Kloroformun uzaklaştırılması işlemi için rotary evaporatör kullanılmıştır (40°C'de 10 dak). 50 mL destile su yavaş yavaş karıştırılarak lipozom emülsiyon çözeltisi hazırlanır. Kör olarak kullanılmak üzere β -karoten içermeyen bir emülsiyon hazırlanır (Çizelge 3.5).

Farklı test tüpleri içine 5'er mL emülsiyondan ilave edilir. Bunların üzerine %100'lük metanol içinde çözülen örnekler 0,2'şer mL eklenir. Sonra test tüpleri 45°C su banyosunda 2 saat bekletilir. Test tüpleri 15 dakikalık aralıklarla 470 nm'de absorbans değerleri spektrofotometre ile okunur. Örnekler üç tekrarlı yapılmıştır.

Çizelge 3.5 β -Karoten renk açılması metodu (Amin et al., 2004; Velioglu et al., 1998)

	β -karotenli emülsiyon mL	β -karotensiz emülsiyon mL	Metanol (% 100) mL	Örnek (1mg/mL metanol) mL
Kör	-	5	0,2	-
Standart	5	-	0,2	-
Örnekler	5	-	-	0,2
470 nm’de absorbands değerleri okunur				

Antioksidan Aktivitesinin (AA), örneğin kontrole göre yüzde inhibisyonu cinsinden hesaplanması;

$$AA = [(R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}}] \times 100,$$

Oksidasyon oranının (ROR) hesaplanması;

$$ROR = R_{\text{örnek}} / R_{\text{kontrol}},$$

Antioksidan aktivite katsayısının (CAA) hesaplanması;

$$CAA = [(A_{120} - A_{120}^0 / A_0^0 - A_{120}^0)] \times 1000$$

$$R_{\text{kontrol}} = A_0^0 - A_{120}^0 \text{ (0 dak. kontrol absorbandsı - 120 dak. kontrol absorbandsı)}$$

$$R_{\text{örnek}} = A_0 - A_{120} \text{ (0 dak. örnek absorbandsı - 120 dak. örnek absorbandsı)}$$

3.2.7.2 DPPH süpürme aktivitesi metodu

DPPH’ın metanol ile hazırlanan mor renkli çözeltisi hidrojen atomları veya elektronlarının bağlanma yetenekleri nedeniyle saf bileşiklere ve ekstraktlara konulduğunda, renginde açılma meydana gelmektedir

(Sökmen et al., 2004). Tartılan katı ekstraktlar test tüplerine eklenir ve üzerine DPPH metanol çözeltisinden 5'er mL konulur. Homojen hale getirilen örnekler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 517 nm'de absorbansı ölçülür (Çizelge 3.6)(Koleva et al., 2003; Xu et al.,2005; Suja et al.,2005; Murthy et al. ,2002; Amin and Tan, 2002).

Çizelge 3.6 DPPH süpürme aktivitesi metodu (Koleva et al., 2003; Xu et al.,2005; Suja et al.,2005; Murthy et al. ,2002; Amin and Tan, 2002).

	Kör	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Standart
Örnek (mg)	-	0,3	0,6	0,10	-
Metanol (mL)	10	5	5	5	5
DPPH çöz. (mL)	-	5	5	5	5
Vortekslenir 30 dakika beklenir ve 517 nm' de absorbans değerleri okunur					

Radikal süpürme aktivitesinin hesaplanması;

$$\% \text{ RSA} = 1 - (A_{517 \text{ nm}} \text{ Örnek} / A_{517 \text{ nm}} \text{ Standart}) \times 100$$

3.2.7.3 Toplam fenol analizi metodu

Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak toplam fenol miktarı belirlenmiştir (Amin et al., 2004; Velioglu et al., 1998; Duval et al., 2000; Joe, et al., 1998). Metanol ekstraktlarının, konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanır. Bu ekstraktan 100 µL alınarak test tüpüne aktarılır. Üzerine

0,75 mL Folin- Ciocalteu reaktifi ilave edilir. 0,75 mL sodyum karbonat eklenerek karıştırılır ve 90 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometre ile 725 nm’de absorbanları okunur. Standart grafiği 0,01-0,04 mg/mL konsantrasyon aralığında gallik asit ile hazırlanır ve örnekteki fenol konsantrasyonları belirlenir (Çizelge 3.7).

Standart kalibrasyon eğrisinin standart sapması $R^2 = 0,9994$ olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.7 Toplam fenol analizi metodu (Velioglu et al., 1998; Duval et al., 2000)

	Kör	ST 1	ST 2	ST 3	ST 4	ST 5	ST 6	Örnek
Gallik asit	-	0.02	0,03	0,04	0,06	0,08	0,1	-
Örnek	-	-	-	-	-	-	-	0,1
Destile su	0,1	0,08	0,07	0,06	0,05	0,02	-	-
Folin- Ciocalteu reaktifi	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Vortekslenir ve 5 dakika beklenir								
Na₂CO₃	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
90 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra 725 nm’ de absorbanları okunur								

3.2.8 Antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesinde kullanılan metot;

Disk difüzyon metodu;

Bakteri suşlarının inokulumu nutrient broth, maya suşu malt ekstrakt broth içinde sırasıyla 24 ve 48 saat, $30 \pm 0,1$ °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Mc Farland metodu kullanılarak, bakteri suşları ve maya suşu

konsantrasyonlarının $1,0 \times 10^7$ – $1,0 \times 10^8$ mL⁻¹ ve $1,0 \times 10^5$ – $1,0 \times 10^6$ mL⁻¹ olması sağlanmıştır. Bakteri ve maya suşları, laminar flow içinde steril petri kutularına eşit miktarlarda ayrı ayrı ilave edilmiştir. Ardından bunların üzerine akzenik şartlar altında, otoklavlanarak sterilize edilen muller hinton agar ve malt ekstrakt agar eşit şekilde eklenmiş ve katılaşması beklenmiştir (Ozdemir et al., 2004; Ördög et al., 2004; Candan et al., 2003; Filbo-Lima et al., 2002; Karaman et al., 2003; Sökmen et al., 2003).

Antimikrobiyal aktivitesinde disk difüzyon metodunda öncelikle BBM ortamında 22° C 75 µmol/m²sn şartlarında üretilen *S. protuberans*' in farklı ekstraktları (metanol, kloroform ve aseton) kullanılmıştır. Konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde metanol ekstreleri hazırlanmıştır. Yapılan diğer çalışmada farklı ortam koşullarında üretilen *S. protuberans*' in metanol ekstraktları ile denemelere devam edilmiştir. 6 mm çaplı steril kağıt filtre disklerle (Schleicher and Schül, Nr 2668, Germany) 20 ve 30 µL'lik *S. protuberans* ekstreleri emdirilmiştir. Agarları katılaşan petri kutuları içine ekstrakt emdirilmiş filter kağıtları yerleştirilmiştir. Bakteri suşlarının bulunduğu petri kutuları 30 ± 0,1 °C de 48 saat, maya suşu bulunan petri kutusu ise 25 ± 0,1 °C 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petri kutularındaki diskler bakteri ve maya suşlarının gelişimini inhibe ederek zon oluşturmuştur. Bu zonların çapları milimetre cinsinden ölçülmüştür.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 *Scenedesmus protuberans*'ın Üretiminde Işık, Sıcaklık Ve Kültür Ortamlarının Etkisi

Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Kültür Koleksiyonundan (EGE-MACC) alınan *S. protuberans*'ın üretiminde ışık, kültür ortamı, sıcaklık parametrelerinin etkileri incelenerek en uygun üretim koşulu belirlenmeye çalışılmıştır.

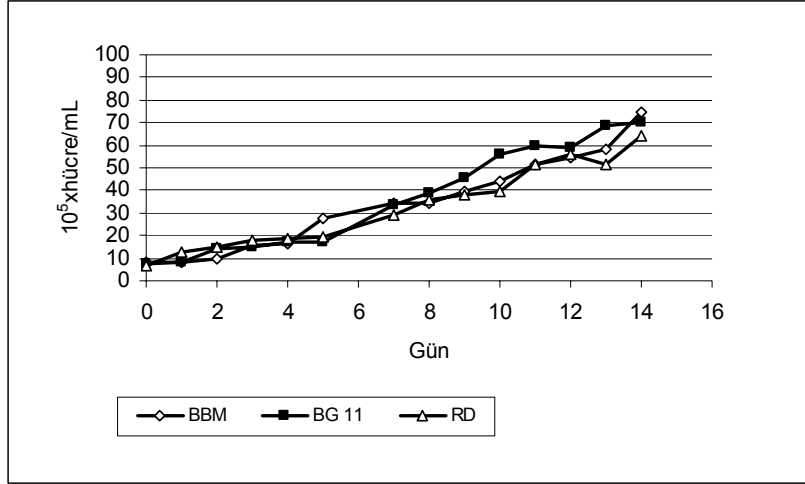
Üretim parametrelerinin belirlenmesi için öncelikle küçük çapta denemeler yapılmıştır. 2 L' lik kültür şişelerinde yapılan denemelerde, 2 farklı ışık, 3 farklı kültür ortamı ve 2 farklı sıcaklığın hücre üremesi üzerine etkileri eş zamanlı olarak incelenmiştir. Denemeler 15 ve 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddeti, 22° C ve 28° C sıcaklık ve BBM, BG-11 ve RD kültür ortamları kullanılarak yapılmıştır. Denemeler için diğer üretim koşulları ve inokulasyon miktarları eşit tutulmuştur.

4.1.1 Işık kaynağının etkisi

4.1.1 Tek taraflı aydınlatmanın etkisi

S. protuberans için 15 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki farklı kültür ortamlarındaki hemasitometrik hücre sayım değerlerine Şekil 4.1'de bakıldığında, 14 günlük üretim periyodunda 5. günden itibaren kültür ortamlarının hücre üremesine etkisi belirginleşmeye

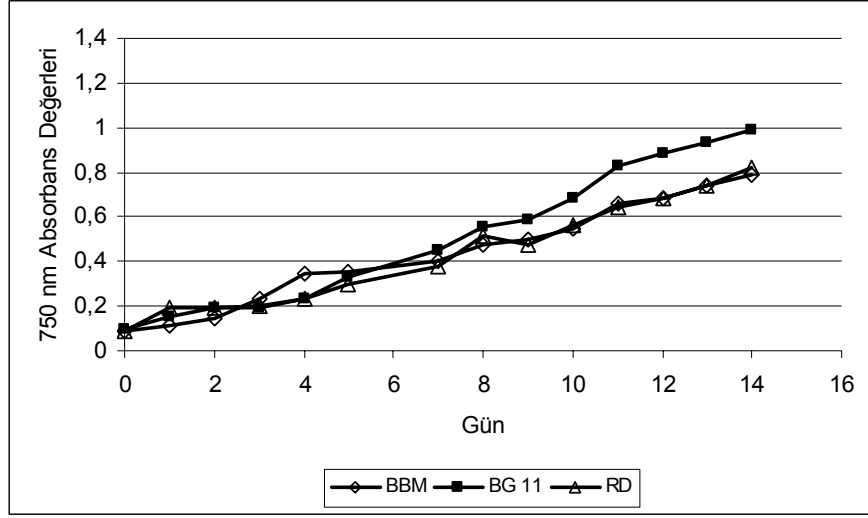
başlamış olup, BG-11 ortamında, BBM ve RD kültür ortamlarına göre üremenin daha fazla ivme kazandığı gözlemlenmiştir. BG-11 ortamındaki hücre sayısı 11. günde başlangıç hücre yoğunluğuna göre 5 kat artmıştır.



Şekil 4.1 *S. protuberans* için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki farklı kültür ortamlarından alınan örneklerin zamana karşı hücre sayım değerleri

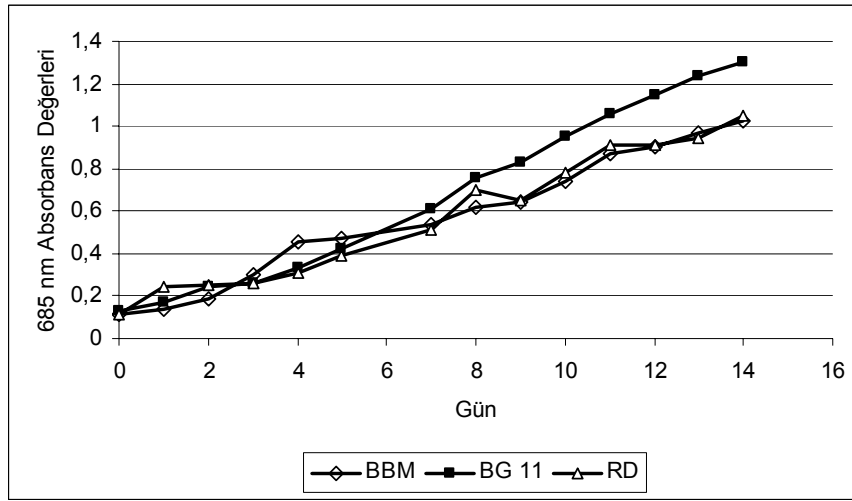
Aynı deneyden alınan örneklerin spektrofotometrik değerlerine bakıldığında, *S. protuberans* için yapılan 14 günlük denemede BBM, BG-11 ve RD ortamlarında hücre yoğunluğunun artmaya devam etmekte olduğu görülmüştür. Pek çok sekonder metabolitin üretimi stasyoner fazda en yüksek düzeye ulaşmaktadır (Babaoğlu et al.,2002). Spektrofotometrik değerler ve hücre sayılarına bakılması sonucu, 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddeti ve 22° C sıcaklıkta, hücrelerin durağan faza ulaşamadıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4. 2, Şekil 4. 3, Şekil 4. 4, Şekil 4. 5).

750 nm’ deki absorbans değeriinde BG-11 ortamının hücre üremesinin diğer iki ortama göre hızlı olduğu Şekil 4.2 de görülmektedir. Hücre yoğunluğunun BBM ve RD ortamında BG-11’e göre daha az olduğu görülmüştür.



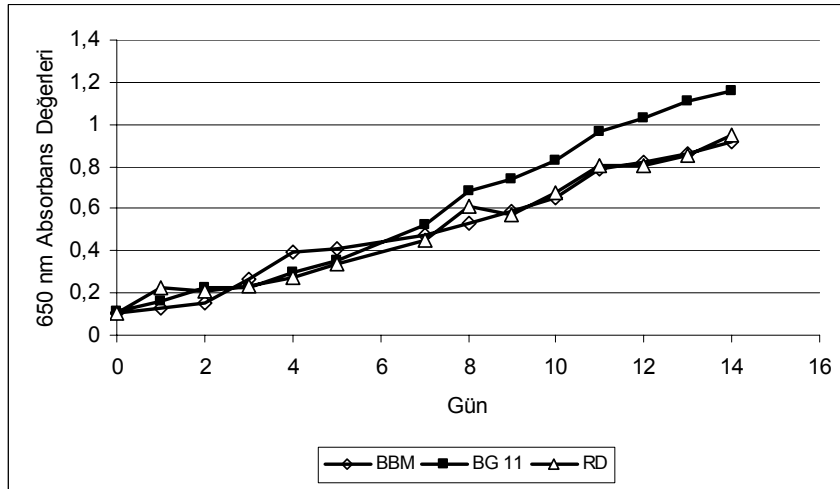
Şekil 4.2 *S. protuberans* için 15 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 750 nm’deki absorbans değerleri

685 nm’ deki absorbans değerlerine bakıldığında, RD ve BBM ortamlarının 14. günde 1 absorbans değerinin üzerine çıkarken, BG-11’in 13. günde 1 absorbans değerinin üzerine çıktığı belirlenmiştir (Şekil 4. 3).

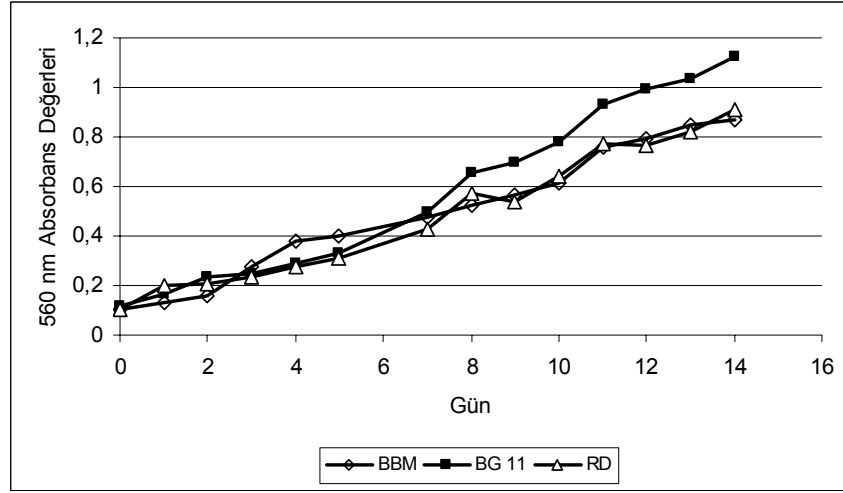


Şekil 4.3 *S. protuberans* için $15 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 685 nm'deki absorbans değerleri

650 ve 560 nm de alınan değerlerin 685 nm ile paralellik gösterdiği Şekil 4.4 ve Şekil 4.5 te gösterilmiştir.

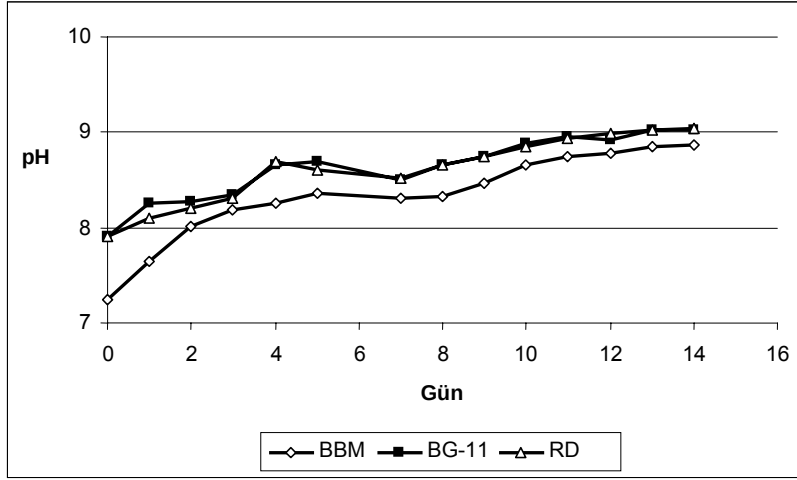


Şekil 4.4 *S. protuberans* için $15 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 650 nm'deki absorbans değerleri



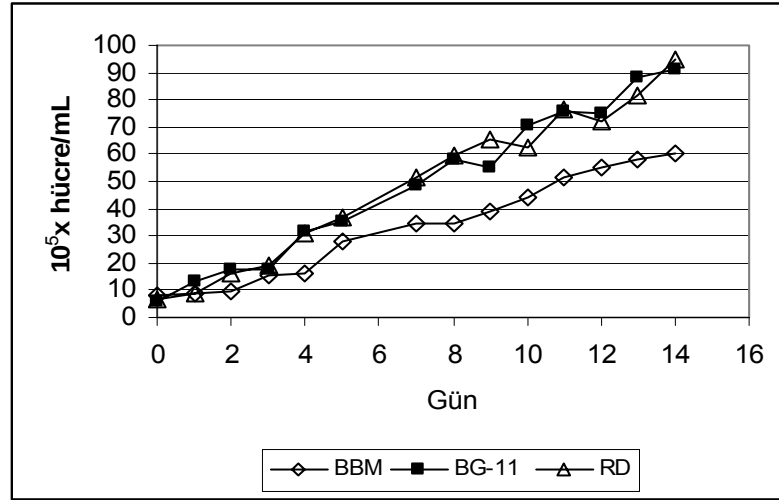
Şekil 4.5 *S. protuberans* için $15 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 560 nm'deki absorbans değerleri

Örneklerin pH değerleri günlük olarak ölçülmüştür. BBM ortamının pH değerinin diğer iki ortama göre daha az olduğu görülmüş ve RD, BG-11 ortamlarının değerlerinin birbirlerine yakın olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 *S. protuberans* için 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD ortamlarının zamana karşı pH değerleri değişimi

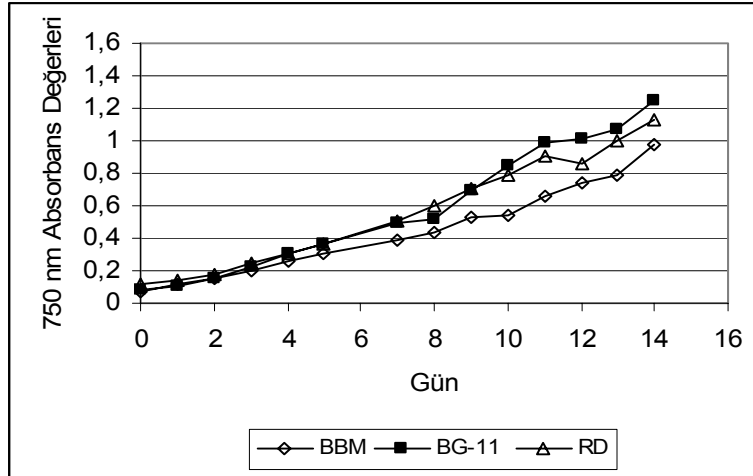
15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde, sıcaklık artırıldığında (28°C) alınan değerlere (Şekil 4.7) bakıldığında, 14 günlük üretim periyodunun 4. günden itibaren kültür ortamlarının hücre üremesine etkisi belirginleşmeye başlamıştır. BG-11 kültür ortamının üretim periyodunda 13 günlük üretim sonunda başlangıç kültür konsantrasyonuna göre 11,75 kat artış ile $75,2 \times 10^5$ hücre/mL değerine ulaşırken, BBM kültür ortamı 14 günlük üretim sonunda 13,81 kat artış ile $88,4 \times 10^5$ hücre/mL değerine ulaşmıştır. RD kültür ortamı 9. günde hücre üremesini yavaşlatmış ve üretim periyodunun 10. gününde ise başlangıç hücre yoğunluğuna göre 9,75 kat artışı saptanmıştır.



Şekil 4.7 *S. protuberans* için 15 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki farklı kültür ortamlarından alınan örneklerin zamana karşı hücre sayım değerleri

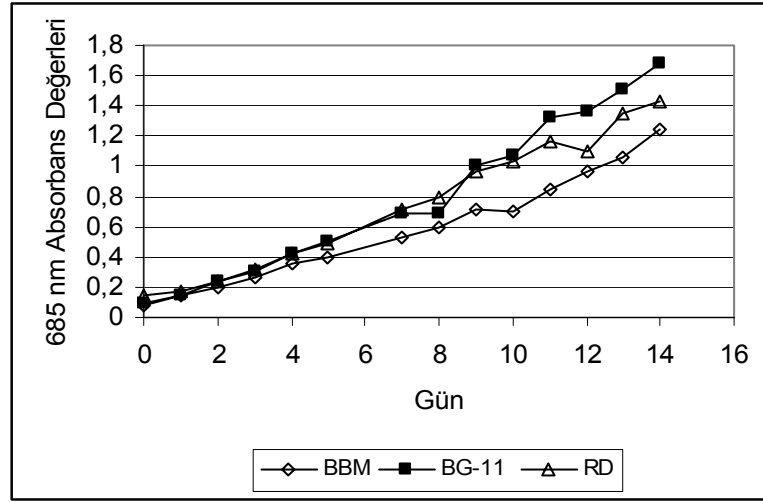
Aynı deneyden alınan örneklerin absorbans değerleri 560, 650, 685 ve 750 nm’de günlük olarak ölçülmüştür. Hücrelerin aynı ışık şiddetinde (15 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$), sıcaklığın artırılmasıyla da durağan faza ulaşamadıkları belirlenmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11).

Sıcaklığın artırılmasıyla, RD ortamında hücre yoğunluğunun 750 nm’deki absorbans değerlerine bakıldığında, arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.8). 28° C de hücre yoğunluğunun RD ve BBM ortamlarında BG-11’e göre daha az olduğu görülmüştür.



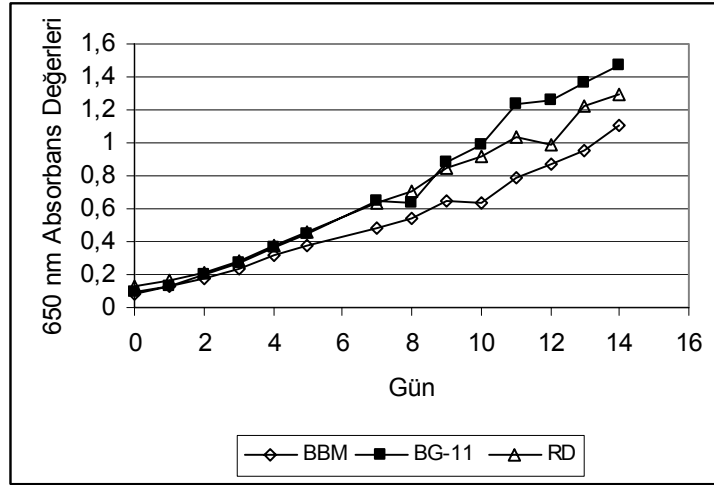
Şekil 4.8 *S. protuberans* için 15 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 750 nm'deki absorbans değerleri

Kültürlerin 685 nm'deki absorbans değerlerine bakıldığında, BG-11 ortamında 9. günde, RD ortamında 10. günde, BBM ortamında ise 13. günde 1 değerinin üzerine çıktığı görülmüştür (Şekil 4. 9).

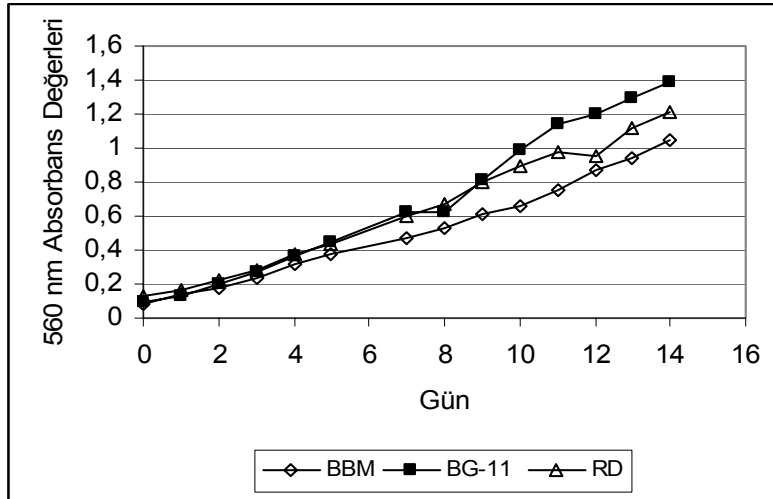


Şekil 4.9 *S. protuberans* için $15 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 685 nm'deki absorbans değerleri

28°C sıcaklıktaki 650 ve 560 nm de alınan değerlerin 685 nm ile paralellik gösterdiği Şekil 4.10 ve Şekil 4.11 de gösterilmiştir.

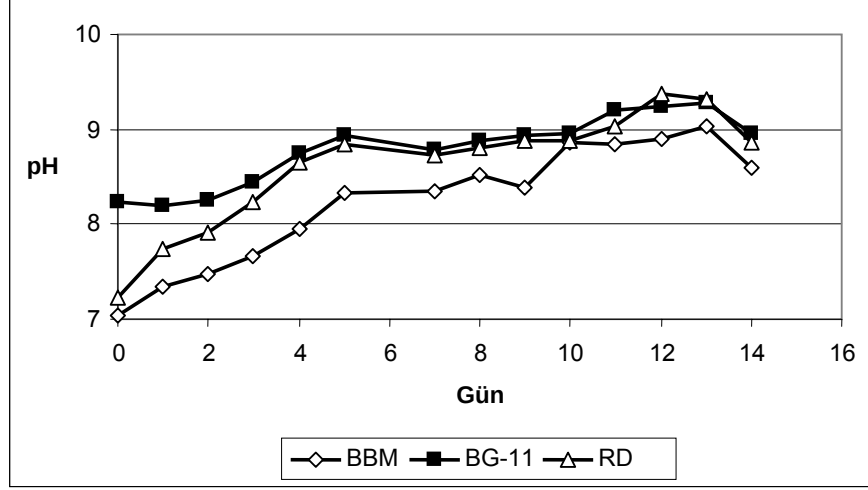


Şekil 4.10 *S. protuberans* için $15 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 650 nm'deki absorbans değerleri



Şekil 4.11 *S. protuberans* için $15 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 560 nm'deki absorbans değerleri

Örneklerin pH değerleri günlük olarak ölçülmüştür. Sıcaklığın arttırılması ile solunum hızı artmış ve pH'da da artışa neden olmuştur (Şekil 4.12). BBM, RD ve BG-11 ortamlarının pH değerleri arasında çok fazla fark olmadığı görülmüştür.

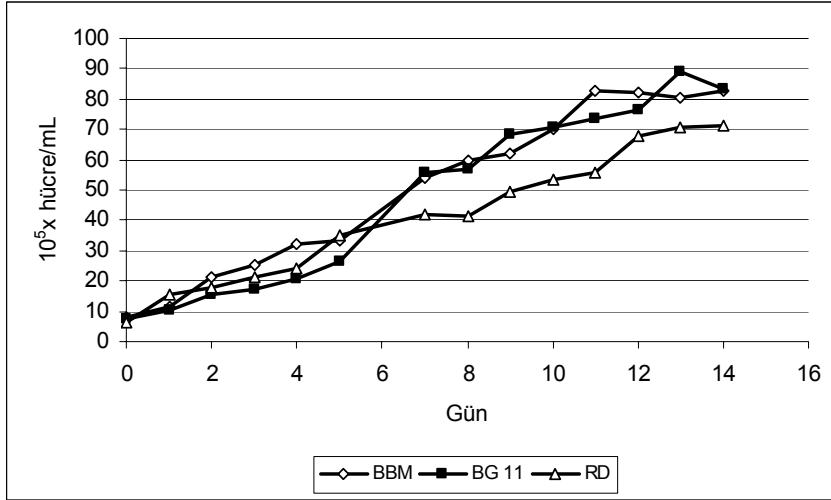


Şekil 4.12 *S. protuberans* için $15 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD ortamlarının zamana karşı pH değerleri değişimi

4.1.1.2 Çift taraflı aydınlatmanın etkisi

S. protuberans için $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22°C sıcaklıktaki farklı kültür ortamlarında hücre sayım değerlerine Şekil 4.13 de bakıldığında, 14 günlük üretim periyodunda 5. günden itibaren kültür ortamlarının hücre üremesine etkisinin belirginleşmeye başladığı görülmektedir. Üremenin BBM ve BG-11 kültür ortamlarında, RD ortamına göre daha fazla ivme kazandığı gözlemlenmiştir. Hücre sayımlarının sonucunda, BBM kültür ortamının üretim periyodunda 11. günden itibaren hücre sayısının çok fazla artmadığı gözlenmiştir. BG-11

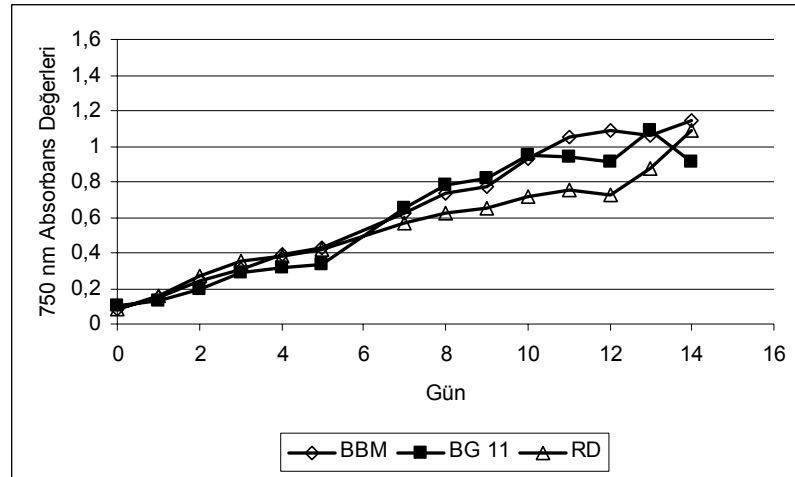
ortamı 13. günde 13,27 kat artış ile $89,2 \times 10^5$ hücre/mL değerine ulaşırken, BBM kültür ortamı 14 günlük üretim sonunda 10,31 kat artış ile $82,5 \times 10^5$ hücre/mL değerine ulaşmıştır (Şekil 4. 13).



Şekil 4.13 *S. protuberans* için $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22°C sıcaklıktaki farklı kültür ortamlarından alınan örneklerin zamana karşı hücre sayım değerleri

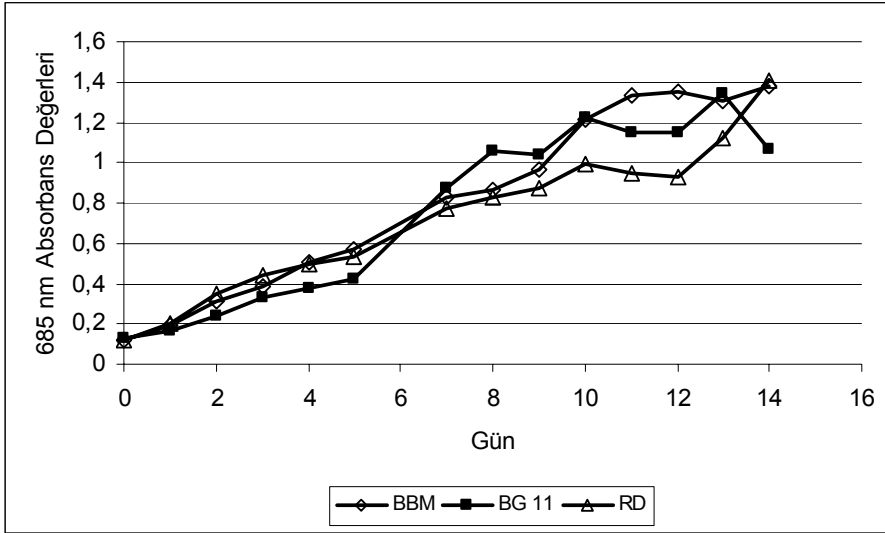
Örneklerin spektrofotometrik değerlerine bakıldığında, yapılan 14 günlük denemede, BBM ortamında 11. günde, RD ve BG-11 ortamlarının ise 10. günde durağan faza ulaştığı belirlenmiştir. BBM, BG-11 ve RD ortamlarının durağan faza geçtiği görülmüştür. (Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17).

750 nm ' deki absorbans değerlerinde ilk 5 gün paralellik göstermiş ve 10. günden sonra ortamlarda hücre artışın durduğu Şekil 4.14 te belirtilmiştir.



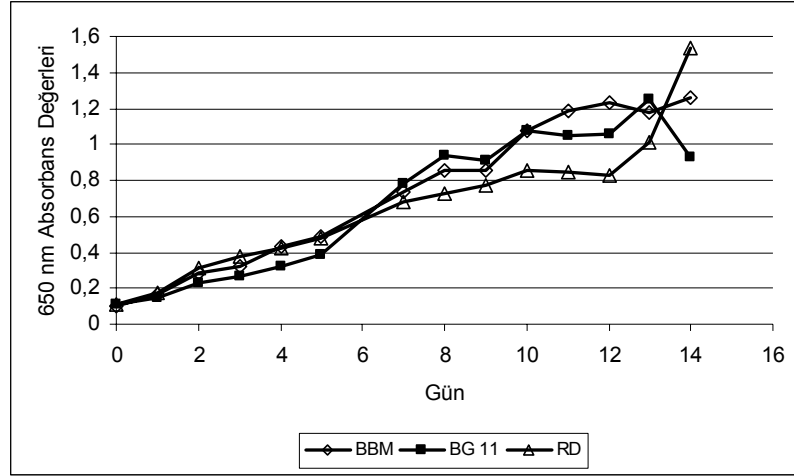
Şekil 4.14 *S. protuberans* için $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 750 nm 'deki absorbans değerleri

Şekil 4.15' e bakıldığında BBM, BG-11 ve RD ortamlarının 10. günden sonra durağan faza girdikleri belirlenmiştir. BBM ve RD ortam 12. günden sonra artışa geçmiştir.

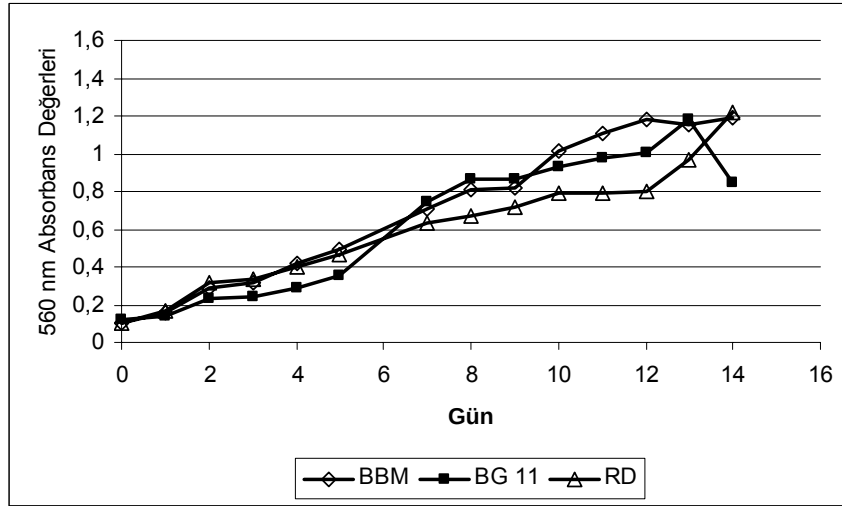


Şekil 4.15 *S. protuberans* için $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 685 nm'deki absorbans değerleri

650 ve 560 nm de alınan değerlerin 685 nm ile paralellik gösterdiği Şekil 4. 16 ve Şekil 4. 17 de gösterilmiştir. RD ortamında 12. günden sonraki artış 650 nm de belirtilmiştir.

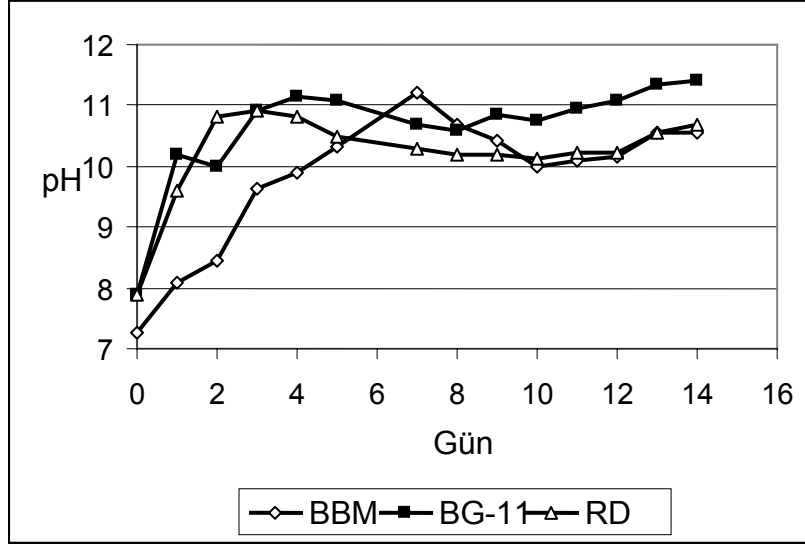


Şekil 4.16 *S. protuberans* için $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 650 nm 'deki absorbans değerleri



Şekil 4.17 *S. protuberans* için $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamınlarından zamana karşı alınan örneklerin 560 nm 'deki absorbans değerleri

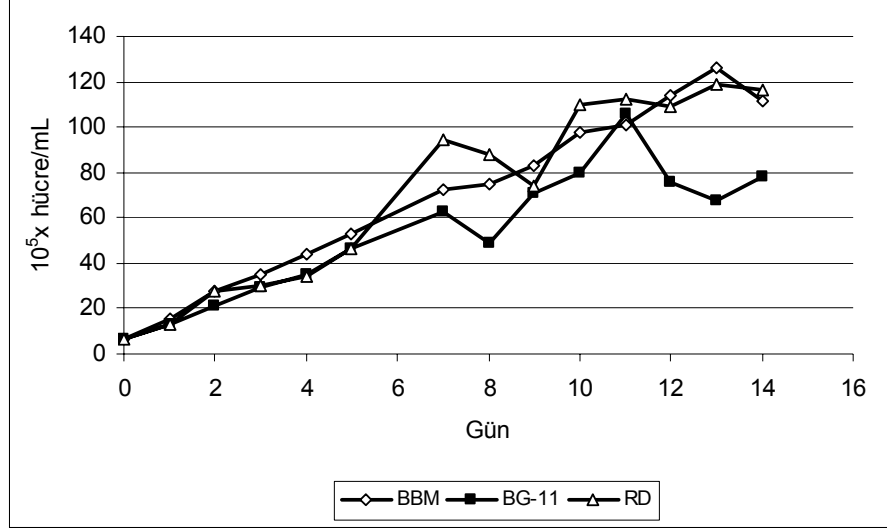
S. protuberans için $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22°C sıcaklıktaki pH değerleri günlük olarak ölçülmüştür. BBM ortamının pH değerinin diğer iki ortama göre daha az olduğu saptanmıştır. 7. günde değerin arttığı sonradan RD ve BG-11 ortamlarının değerlerinin altına indiği görülmüştür. RD, BG-11 ortamlarının pH değerleri arasında paralellik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 *S. protuberans* için $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 22°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD ortamlarının zamana karşı pH değerleri değişimi

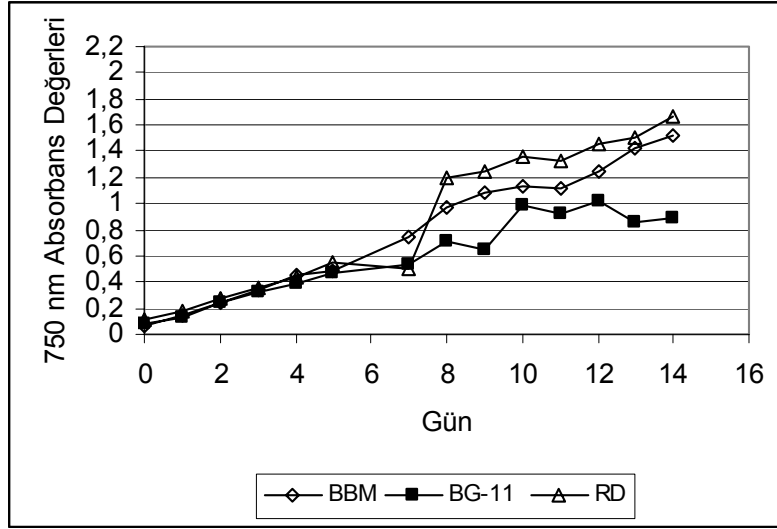
S. protuberans için Şekil 4. 19' a bakıldığında 14 günlük üretim periyodunda 5. günden itibaren kültür ortamlarının hücre üremesine etkisi belirginleşmeye başlamış olup BBM ortamındaki hücre artışının lineer olduğu görülmüştür. RD ve BG-11 ortamlarındaki değişimler de gösterilmiştir. BG-11 kültür ortamının üretim periyodunda 8. gününde yapılan sayımlarda hücre sayısında azalma olduğu saptanmıştır. BBM ortamı 13. günde 19,75 kat artış ile $126,4 \times 10^5$ hücre/mL değerine

ulaşırken, BG-11 kültür ortamı 11. günde başlangıç hücre sayısına göre 16,5 kat artış gösterirken 14 günlük üretim sonunda 4,25 kat azalma yaşandığı belirlenmiştir.



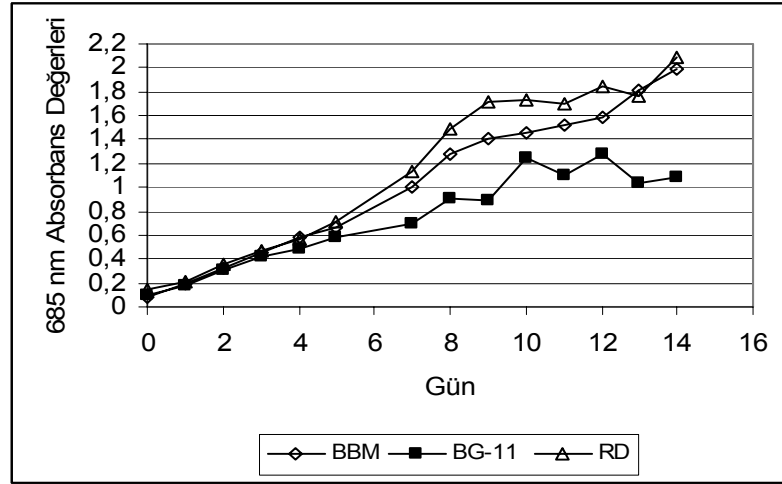
Şekil 4.19 *S. protuberans* için 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28° C sıcaklıktaki farklı kültür ortamlarından alınan örneklerin zamana karşı hücre sayım değerleri

Örneklerin spektrofotometrik değerlerine bakıldığında, 750 nm'deki absorbans değerlerinden (Şekil 4. 20) BBM ve RD ortamlarının 9. gününde sonra durağa faza girerken, BG-11 ortamı 10.günde durağan faza ulaştığı fark edilmiştir. BBM ve RD ortamları 13. günde artışa geçerken BG-11 ortamında azalma dikkati çekmektedir (Şekil 4. 20, Şekil 4. 21, Şekil 4. 22, Şekil 4. 23).



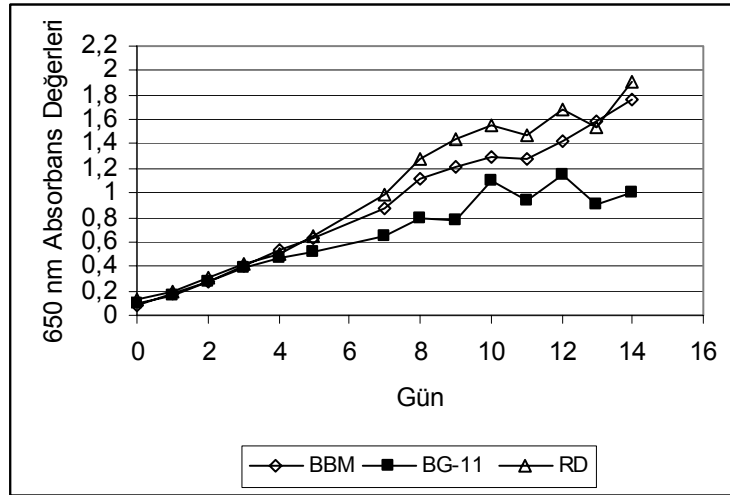
Şekil 4.20 *S. protuberans* için $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 750 nm 'deki absorbans değerleri

Şekil 4.21' e bakıldığında BBM, BG-11 ve RD ortamlarındaki kültürler 8. güne kadar logaritmik artış gösterirken 10. günden sonra durağan faza girdikleri belirlenmiştir. BG-11 ortamında ise 12. günden sonra azalışa geçmiştir.

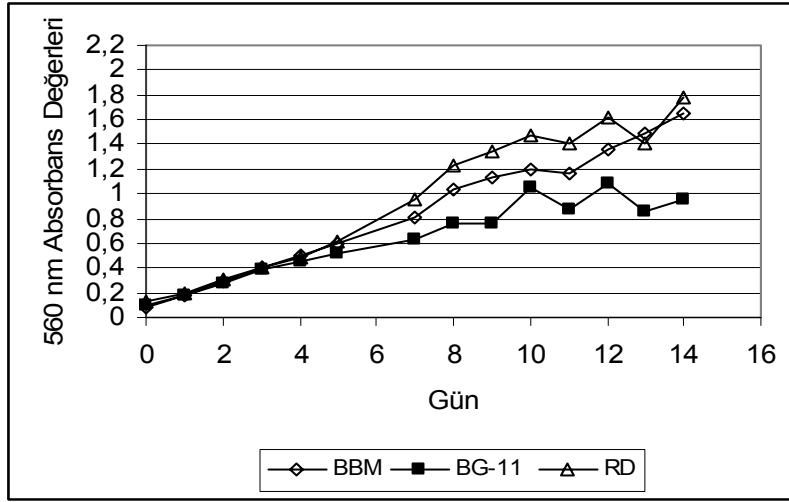


Şekil 4.21 *S. protuberans* için $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 685 nm'deki absorbans değerleri

650 ve 560 nm de alınan değerlerin 685 nm ile paralellik gösterdiği Şekil 4.22 ve Şekil 4.23 de belirtilmiştir.

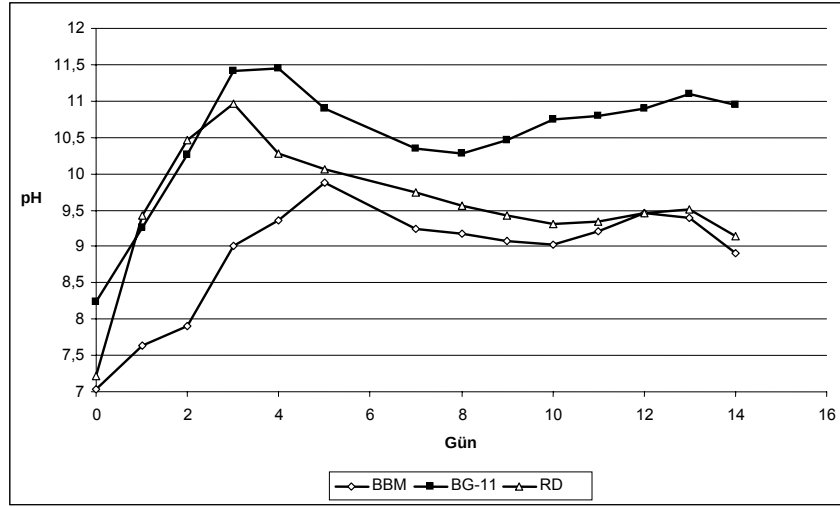


Şekil 4.22 *S. protuberans* için $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 650 nm'deki absorbans değerleri



Şekil 4.23 *S. protuberans* için $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD kültür ortamlarından zamana karşı alınan örneklerin 560 nm'deki absorbans değerleri

Örneklerin pH değerleri günlük olarak ölçülmüştür. BG-11 ortamının 3. günün sonunda pH'sının 11,5'e ulaştığı saptanmıştır. RD ortamının pH'sı ise 11 değerine ulaşmıştır. BBM ortamının pH değeri 5 günlük üretim sonunda 10 değerine yaklaşmış daha sonra bütün ortamların pH değerlerinde azalma meydana gelmesi dikkat çekmektedir. 6. günden sonra BBM ve RD ortamlarının değerlerinin paralellik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.24).

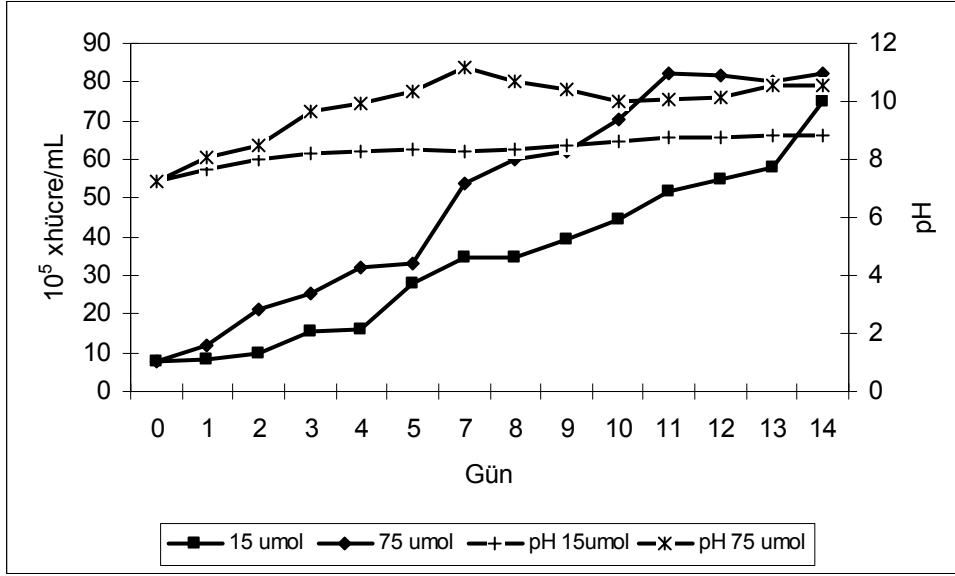


Şekil 4.24 *S. protuberans* için $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde ve 28°C sıcaklıktaki BBM, BG-11 ve RD ortamlarının zamana karşı pH değerleri değişimi

4.1.2 Kültür ortamlarının etkisi

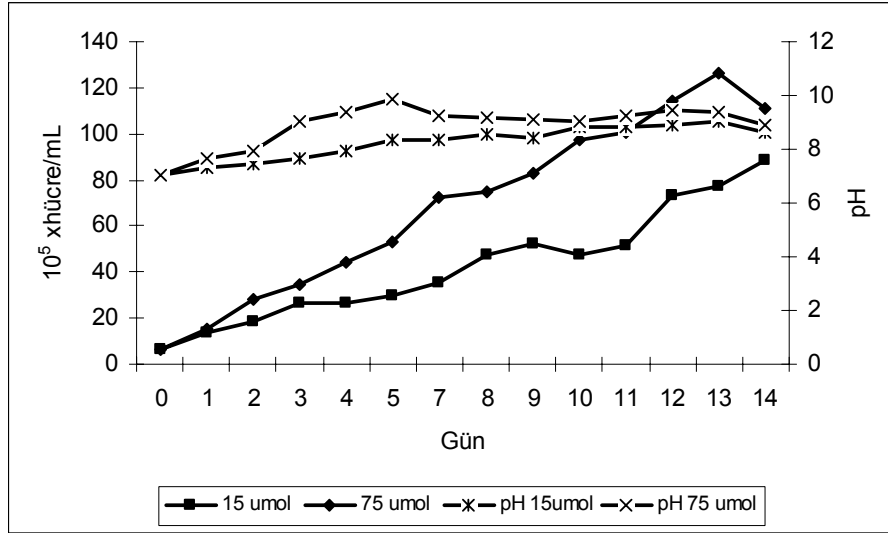
4.1.2.1 BBM kültür ortamının etkisi

S. protuberans için BBM ortamının 22°C sıcaklıkta, 15 ve $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetlerinde, pH ölçümleri ve hücre sayım değerlerini Şekil 4.25' te karşılaştırılmıştır. İlk 14 günlük süreden sonra hücre sayıları başlangıç konsantrasyonuna göre $15 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde %108 artış göstermekte iken $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde %148 artış olduğu belirlenmiştir. $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 11. günde itibaren 3 günlük hücre sayılarının birbirlerine yakın değerler olduğu görülmektedir. Hücre sayısındaki artış ile birlikte pH değerlerinde artış belirlenmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 *S. protuberans* için BBM ortamının 22° C deki 15 ve 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi

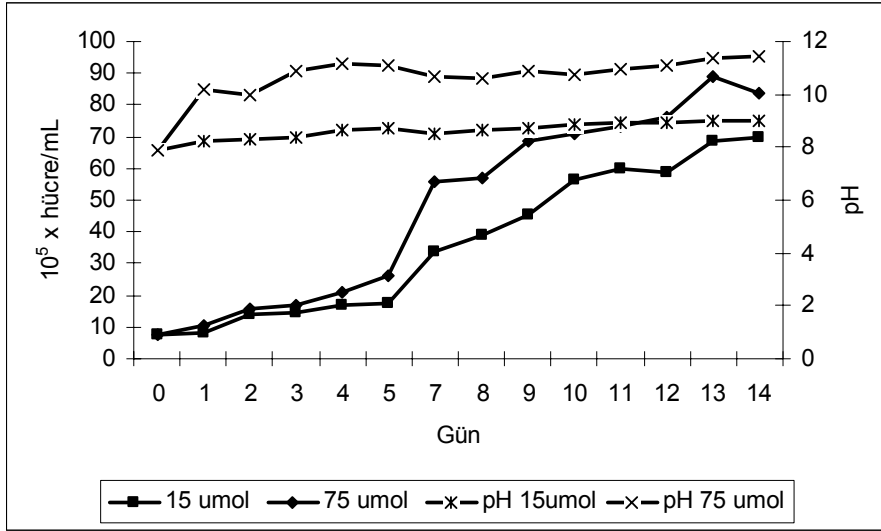
Aynı deneyde sıcaklık artırıldığında (28° C), 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 7. günden 13. güne kadar geçen sürede hücre sayısı %74'lük artış olduğu fark edilmiştir. Sıcaklığın artmasıyla hücre sayısında da artışa neden olduğu saptanmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 *S. protuberans* için BBM ortamın 28° C deki 15 ve 75 μ mol/m²sn ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi

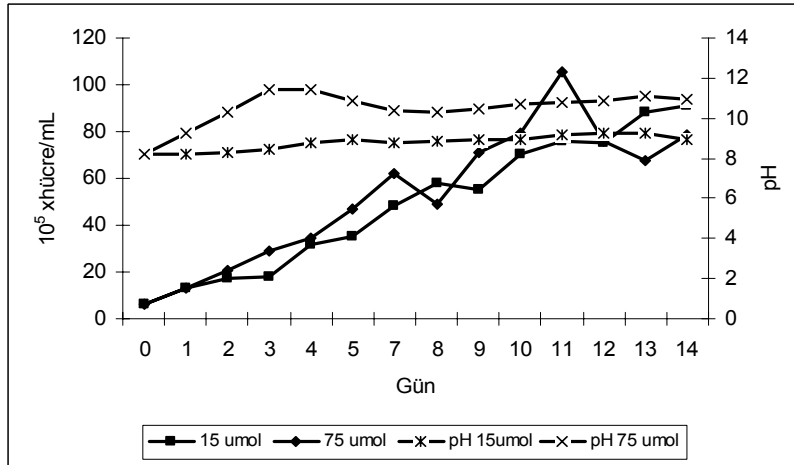
4.1.2.2 BG-11 kültür ortamının etkisi

S. protuberans için BG-11 ortamının 22° C sıcaklıkta, 15 ve 75 μ mol/m²sn ışık şiddetlerinde, pH ve hücre sayım değerleri Şekil 4.27 de karşılaştırılmıştır. pH ve hücre sayısındaki artışın, ışık şiddetlerindeki artışla paralel olduğu görülmüştür. BBM ortamına göre bu sıcaklıkta 10. günden sonra 3 günlük değerlerinin birbirlerine yakın olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 4.27). pH değerinin çift taraflı aydınlatma uygulandığında yükselmesiyle kültürde çökelmeler meydana gelmiştir.



Şekil 4.27 *S. protuberans* için BG-11 ortamının 22° C deki 15 ve 75 µmol/m²sn ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi

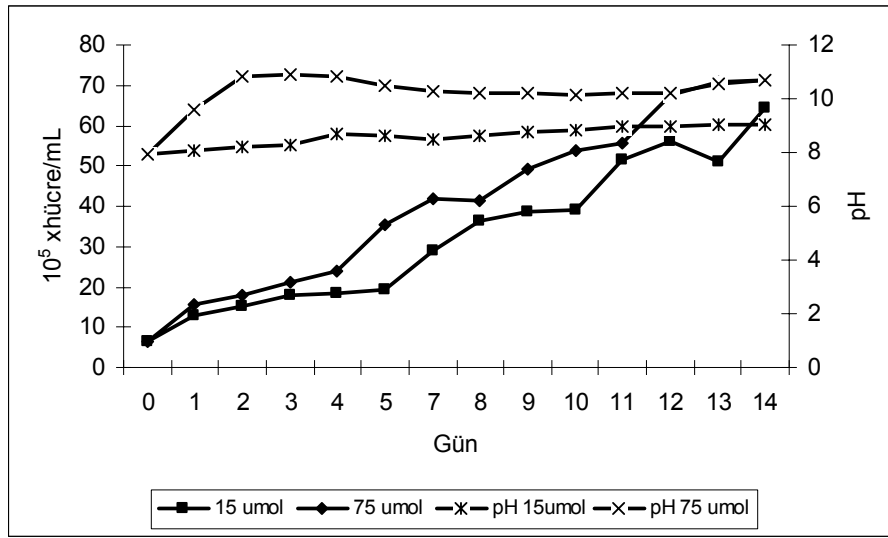
Aynı deneyde sıcaklık artırıldığında (28°C), 75 µmol/m²sn ışık şiddetinde beklenen artış gözlenmemiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 *S. protuberans* için BG-11 ortamının 28° C deki 15 ve 75 µmol/m²sn ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi

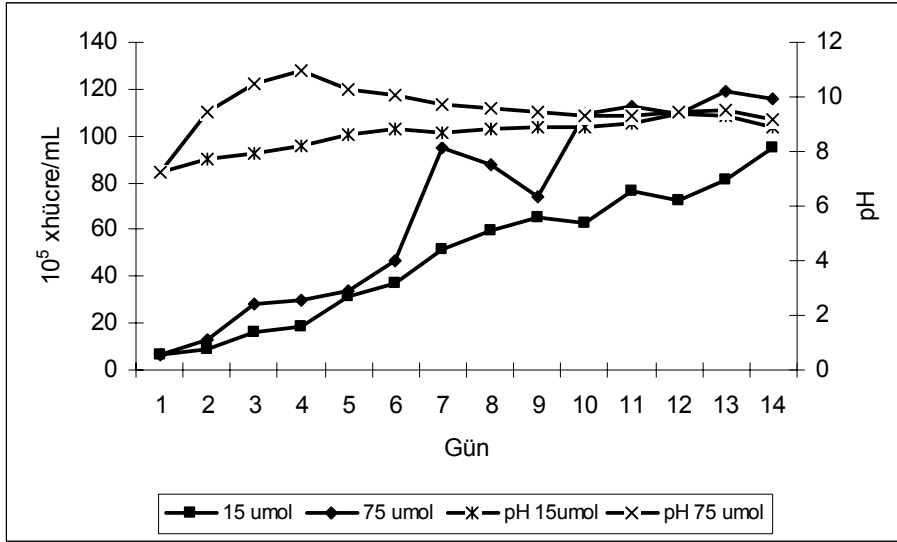
4.1.2.3 RD kültür ortamının etkisi

S. protuberans için RD ortamının 22° C sıcaklıkta, 15 ve 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetlerinde, pH ölçümleri ve hücre sayım değerlerini Şekil 4.29 de görülmektedir. İlk günlerde pH değerinde yüksek bir artış gözlenmesine rağmen 7. günden itibaren birbirlerine yakın değerlere ulaşmıştır. Yüksek ışık yoğunluğunda 7. günden 13. güne kadar geçen sürede hücre sayısı %60 artış göstermiştir.



Şekil 4.29 *S. protuberans* için RD ortamının 22° C deki 15 ve 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi

Aynı deneyde sıcaklık artırıldığında (28°C), yüksek ışık şiddetinde 7. günde hücre sayısını %102 değerinde arttırırken, 9.gün %52 azalış yaşandığı saptanmıştır (Şekil 4.30).



Şekil 4.30 *S. protuberans* için RD ortamın 28° C deki 15 ve 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetlerinin ve pH'larının zamana bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkisi

4.1.3 Spesifik büyüme hızlarının etkisi

Çizelge 4.1 *S. protuberans* suşunun üretimi için farklı kültür ortamları, ışık şiddetleri ve sıcaklıklarında ulaşılan, üretim periyodu sonundaki hücre konsantrasyonları ve spesifik büyüme hızları

	Hücre kons. (x10 ⁵ hücre/mL)	Spesifik Büyüme Hızı (μ gün ⁻¹)	Üretim periyodu sonu (gün)	İkilenme Süresi (gün)	İkilenme Süresi (saat)
BBM 15μmol 22°C	75	0,170	14	4,07	97,85
BG-11 15μmol 22°C	70	0,132	14	5,25	126,03
RD 15μmol 22°C	64,4	0,121	14	5,73	137,48
BBM 15μmol 28°C	88,4	0,129	14	5,37	128,95
BG-11 15μmol 28°C	91,2	0,139	14	4,99	119,68
RD 15μmol 28°C	94,8	0,147	14	4,71	113,17
BBM 75μmol 22°C	82,5	0,152	11	4,56	109,44
BG-11 75μmol 22°C	89,2	0,157	13	4,41	105,95
RD 75μmol 22°C	71,4	0,115	14	6,03	144,65
BBM 75μmol 28°C	126,4	0,137	13	5,06	121,42
BG-11 75μmol 28°C	105,6	0,181	11	3,85	92,42
RD 75μmol 28°C	119,2	0,132	13	5,25	126,03

4.1.4 Optimum üretim koşullarının seçilmesi, hasat ve verim

Optimum kültür ortamının belirlenmesinde BG-11 ortamının kullanılmamasının nedeni yüksek pH değerinde kültür kabında çökelmeye neden olmasıdır. RD kültür ortamının ise diğer ortamlara göre kontaminasyona çok açık olduğu saptanmıştır. Yapılan denemeler sonucunda *S. protuberans*'ın üretimi için optimum üretim ortamının BBM, optimum koşulların ise 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddeti ve 22° C sıcaklıkta olduğuna karar verilmiştir. Bu verilerin ışığında, BBM ortamında, üretim periyodunun 12. günden sonra durağan faza ulaştığından, rutin olarak filtrasyon (Wattman No:1 filtre) ile hasatının yapılması uygun bulunmuştur. 2 L'lik üretim şişesinden, hasat ve liyofilizasyon işlemlerinden sonra yaklaşık 0,30 g kuru hücre elde edilmiştir. BBM ortamında üretilen kültürden elde edilen liyofilize biyokütlenin metanol, aseton ve kloroformla ekstraksiyonları yapılmış ve en uygun çözücü olarak metanol seçilmiştir. Solvent seçiminden sonra 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddeti ve 22° C sıcaklıkta BG-11 ortamındaki kültür 11. günde filtrasyon (Wattman No:1 filtre) ile ayrılırken, RD ortamı 10. günde santrifüj (5000 rpm de 5 dak.) kullanılarak sıvı kültür ortamından ayrılmıştır. 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddeti ve 28° C sıcaklıkta BBM ve RD ortamındaki kültür 9. günde BG-11 ortamındaki kültür ise 10. günde hasat edilmiştir.

Scenedesmus protuberans'ın BBM ortamında 22°C'de, 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde üretilen metanol, kloroform ve aseton ekstraksiyonunun verim hesapları;

BBM(Bold's Basal Medium)	22° C Verim (%)
Metanol Ekstresi	% 20,862
Kloroform Ekstresi	% 18,430
Aseton Ekstresi	% 12,025

Scenedesmus protuberans'ın farklı üretim (75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde, 22°C ve 28° C sıcaklıkta, BBM, BG-11, RD ortamlarında) koşullarında yapılan metanol ekstraksiyonunun verim hesapları;

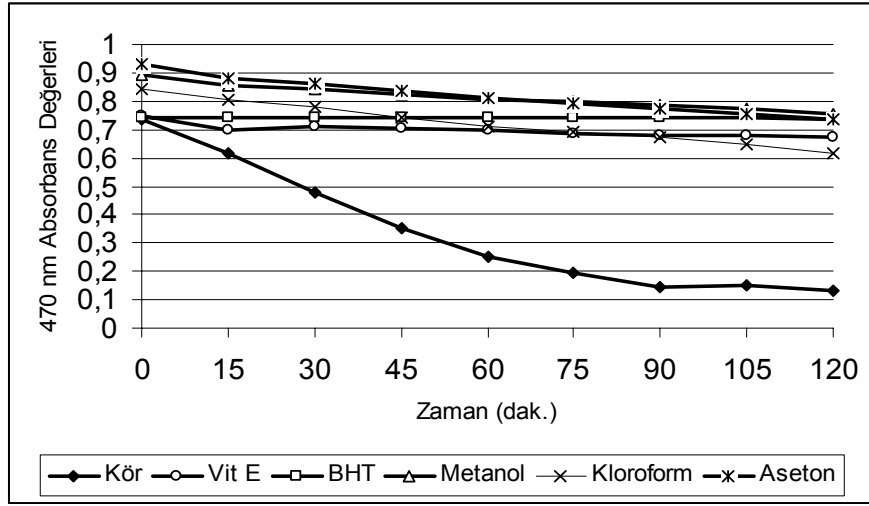
Metanol Ekstresi	22° C Verim (%)	28° C Verim (%)
BBM (Bold's Basal Medium)	20,862	28,074
BG-11 (Blue Gren Algae)	28,354	30,723
RD Medium	27,554	20,224

4.2 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

4.2.1 β -Karoten renk açılması sonuçları

Toplam antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan bu yöntemde, kullanılan ekstrelerin β -karotenin renk açılmasını engelledikleri belirtilmiştir. Deneyin düzgün yapılabilmesi için kontrolün içerisinde antioksidan bileşiklerin bulunmaması gereklidir. Ekstrelerde β -karoten bulunmadığı zaman antioksidan aktivitenin absorbans değeri düşmektedir. Bu olay, β -karoten yokluğunda linoleik asidin oksidasyonundan kaynaklanmaktadır (Amin, et al., 2004; Velioglu, et al., 1998).

β -Karoten renk açılması deneyinde sentetik antioksidan olarak BHT ve Vitamin E kullanılmıştır. 120 dakika sonunda BHT'nin 470 nm'deki absorbans değerinin 0,740 civarında sabit değerde kaldığı gözlenmiştir. BBM ortamında $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddeti ve 22°C sıcaklıkta yetiştirilen *S. protuberans* suşu ilk olarak farklı solventler (metanol, aseton ve kloroform) ile ekstre edilmiştir. Çalışmada metanol ekstresinde, standart değere (BHT ve Vitamin E) göre en az azalma olduğu saptanmıştır. Bunu aseton ve kloroformun izlediği belirlenmiştir. Metanol, kloroform ve aseton ekstralarının β -Karoten-linoleik asit çözeltisindeki değişimi Şekil 4.31 de verilmiştir.



Şekil 4.31 Kör, standart (BHT) ve BBM ortamında, $75 \mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22°C sıcaklıkta yetiştirilen *S. protuberans* 'ın metanol, kloroform ve aseton ekstralarının (örneklerin) zamana göre β -karoten süpürme oranları

Antioksidan aktivitesinin, antioksidan aktivite katsayısı ile doğru orantılı iken oksidasyon oranı ile ters orantılı olduğu bulunmuştur. Çizelge 4.2 de

metanol ekstrenin, aseton ve kloroform ekstrilerine göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Demirel, et.al. 2005).

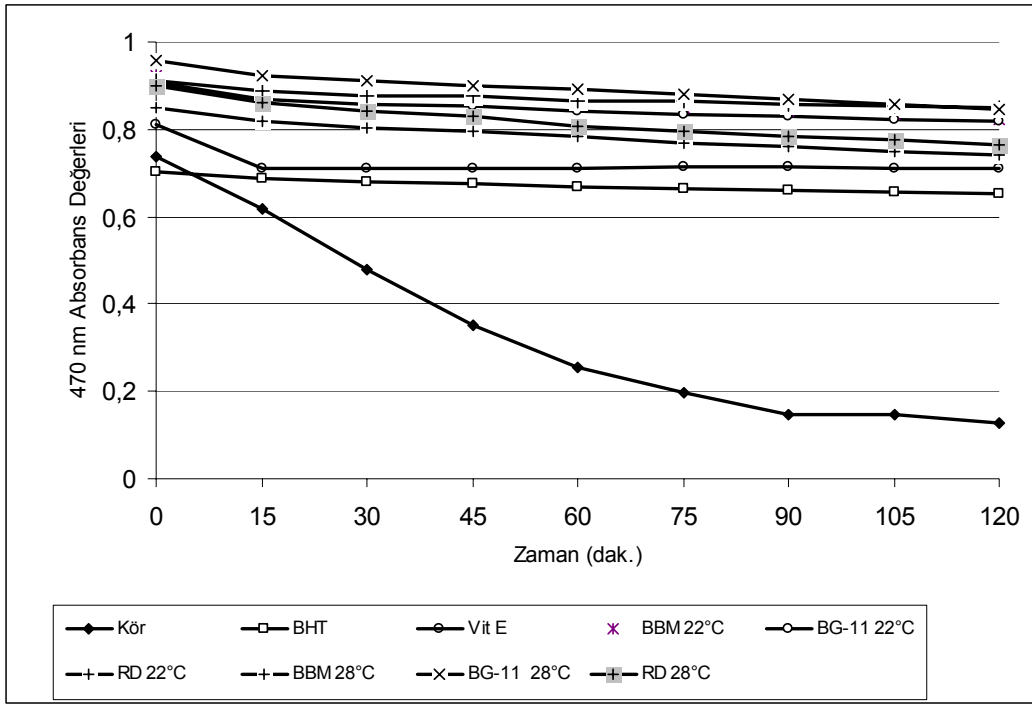
Çizelge 4.2 β -Karoten renk açılması metodunun BBM ortamında yetiştirilen

S. protuberans 'ın metanol, kloroform ve aseton ekstrilerinin değerleri

	Antioksidan Aktivitesi (AA)	Oksidasyon oranı (ROR)	Antioksidan aktivite katsayısı (CAA)
BHT	%96.68	0.033	978.56
Vitamin E	%88	0,124	1102
Metanol	%80.79	0.22	1030
Kloroform	%63.65	0.36	805
Aseton	%68.42	0.32	998

Metanol ekstresinden en iyi sonucun elde edilmesinden dolayı 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22° C ve 28° C sıcaklıklarda, farklı kültür ortamlarında üretimi yapılarak, metanol ekstrileri hazırlanmıştır. Bu ekstrilerin antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinin etkileri karşılaştırılmıştır.

Sentetik antioksidan olarak kullanılan BHT'nin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmasına rağmen, 22°C RD ortamında yetiştirilen *S. protuberans* ' ın diğer sentetik antioksidan olan Vitamin E'den daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Körün 45 dakika sonra ilk absorbans değerinin yarısına indiği belirlenmiştir. Sentetik antioksidanlarda azalmanın daha az olduğu Şekil 4.32 gösterilmiştir.



Şekil 4.32 K r, standart (BHT ve Vitamin E) ve 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22  C ve 28  C sıcaklıklarda, BBM, BG-11 ve RD ortamlarında yetiştirilen *S. protuberans*'ın metanol ekstrelerinin ( rneklerin) zamana göre β -karoten süpürme oranları

Çizelge 4.3'e bakıldığında metanol ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin en yüksek değerinin, 22 C'de RD ortamında yetiştirilen kültüre ait olduğu (%90,27) belirlenmiştir. 28 C'deki RD ortamında yetiştirilen kültürün ekstresinin %85,41 değerinde olduğu hesaplanmıştır.

Her iki sıcaklıkta da RD ortamında üretilen kültürün antioksidan aktivitesi, diğer ortamlarda üretilen kültürlerin ekstrelerine göre daha yüksektir ( izelge 4.3).

Çizelge 4.3 β -Karoten renk açılması metodunun değerleri

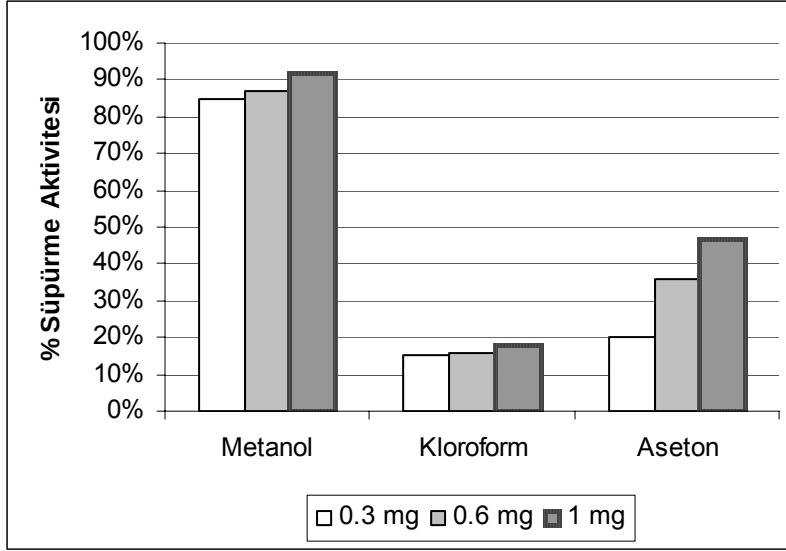
	Antioksidan Aktivitesi (AA)	Oksidasyon oranı (ROR)	Antioksidan aktivite katsayısı (CAA)
BHT	%93,71	929,89	0,073
Vitamin E	%85,12	1008,6	0,149
BBM 75μmol 22°C	%84,84	1165,95	0,152
BG-11 75μmol 22°C	%84,41	1158,80	0,139
RD 75μmol 22°C	%90,27	972,44	0,097
BBM 75μmol 28°C	%82,69	1181,49	0,173
BG-11 75μmol 28°C	%82,69	1194,56	0,173
RD 75μmol 28°C	%85,41	1078,88	0,146

4.2.2 DPPH süpürme aktivitesi sonuçları

DPPH radikalide, kararlı lipofilik radikal modeli gibi düşünülmektedir. Lipofilik radikallerdeki zincir reaksiyonu yağ otooksidasyonu başlatmıştır. DPPH'nin antioksidan tepkimelerinde, DPPH'nin serbest radikalleri ile birlikte 1,1-difenil-2-pikrilhidrazine dönüşmüştür. Ekstrelerin antioksidan süpürme potansiyelleri renk açılması derecelerine göre belirlenir (Kotamballi, et al., 2002, Xu, et al., 2005).

Farklı konsantrasyonlarda alınan örneklerden, metanol ekstresinde süpürme aktivitesinin %80'in üzerinde olduğu belirlenmiştir. Metanol ekstresindeki örnek konsantrasyonun artması ile elde edilen antioksidan süpürme değerlerinde büyük bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.33). Aseton ekstresinden miktarı 1 mg'dan 0,3 mg'a düşürüldüğünde,

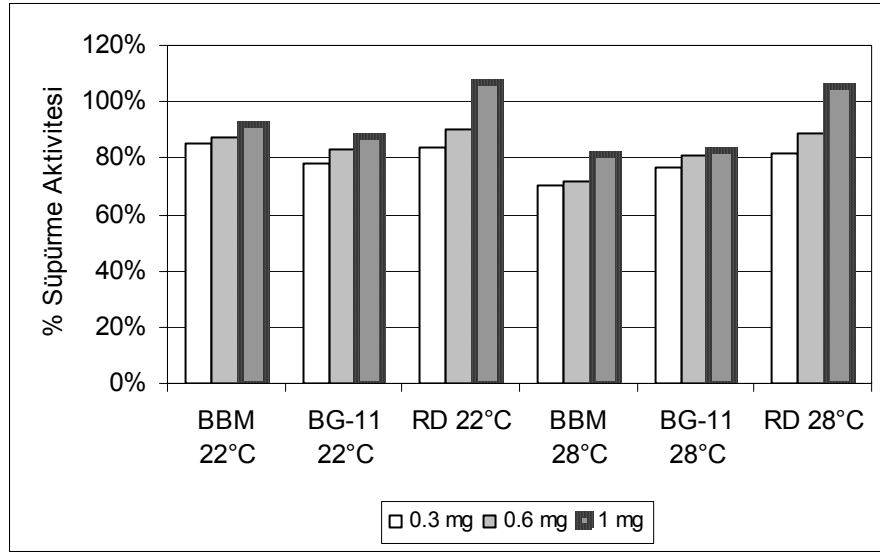
antioksidan süpürme aktivitesi de %46'dan %20'ye inmiştir. Kloroform ekstresinde ise örnek konsantrasyonun artması ile aktivitenin değişmediği gözlenmiştir (Demirel, et.al.,2005).



Şekil 4.33 BBM ortamında $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22°C sıcaklıkta *S. protuberans* 'ın metanol, kloroform ve aseton ekstraktlarının DPPH % süpürme aktivitesi (Demirel, et.al.,2005)

Metanol ekstresinden en iyi sonucun elde edilmesinden dolayı $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22°C ve 28°C sıcaklıklarda, farklı kültür ortamlarında üretimi yapılarak, metanol ekstraktları hazırlanmıştır.

22°C RD ortamında üretilen kültürden alınan 0,3 mg, 0,6 mg ve 1 mg'lık ekstraktlarının DPPH süpürme aktivitesi sırasıyla % 84, % 90 ve % 107 olarak bulunmuştur (Şekil 4.34). 22°C sıcaklıkta yetiştirilen kültürlerin 28°C sıcaklıkta yetiştirilen kültürlere göre daha yüksek süpürme aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.34).

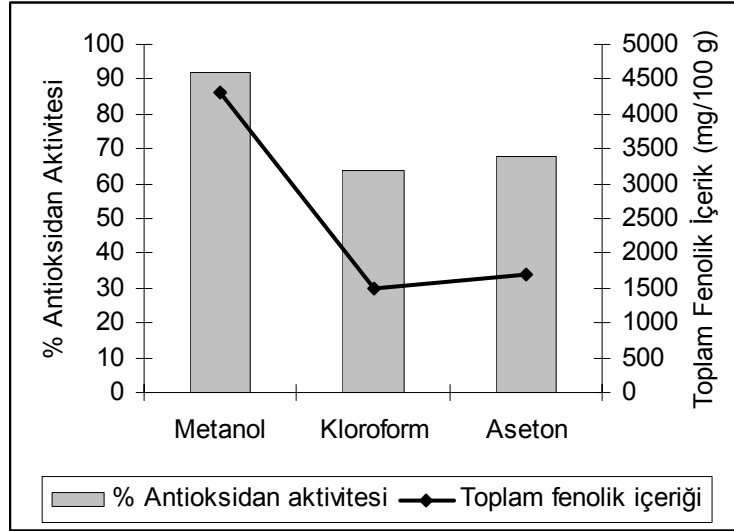


Şekil 4.34 75 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde 22° C ve 28° C sıcaklıklarda, BBM, BG-11 ve RD ortamlarında ve yetiştirilen *S. protuberans* 'ın metanol ekstraktlarının DPPH % süpürme aktivitesi

4.2.3 Toplam fenol analizi sonuçları

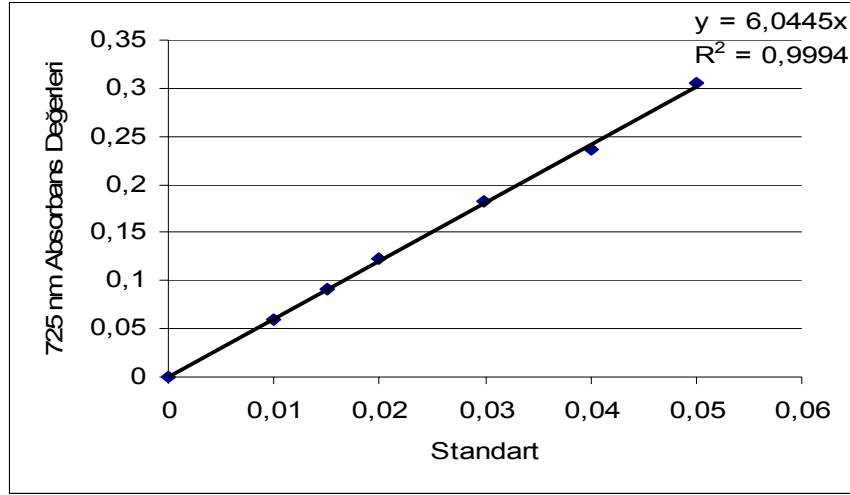
Fitofenolik bileşiklerin biyolojik sistemlerde antioksidan aktivite gösterdiği çeşitli yayınlarda belirtilmiştir. Yüksek bitkilerde bulunan fenoller insan sağlığını korumakta ve kanser riskini azaltmaktadır. Bazı çalışmalarda antioksidan aktivite ve toplam fenol içeriği arasında ilişki olmadığı ifade edilse de, bazı çalışmalarda bu ilişki gösterilmiştir (Amin et. al., 2004, Sökmen et.al., 2004). Bu çalışmada metanol, kloroform ve aseton ekstraktlarının antioksidan aktivitesi ve toplam fenol içeriği paralellik göstermiş olup, bir çok çalışmada belirtilen ilişkiyi desteklemiştir.

Şekil 4.35’de toplam fenol içerikleri en yüksek olan ekstre 2400 mg/100 g değeri ile metanoldür. Aseton için 1700 mg/100 g ve kloroform içinde 1500 mg/100 g değerleri saptanmıştır.



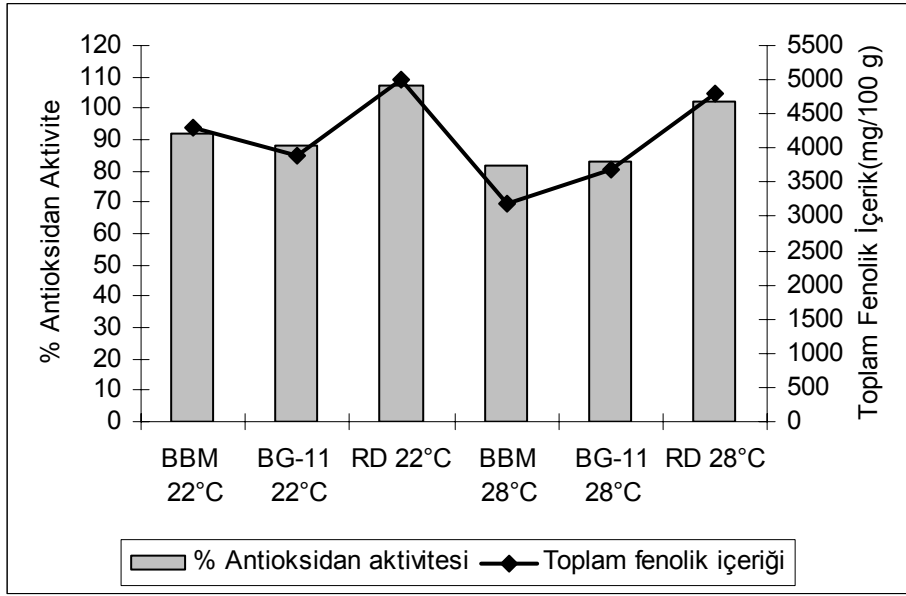
Şekil 4.35 BBM ortamında $75 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ n ışık şiddetinde 22°C sıcaklıkta yetiştirilen *S. protuberans* 'ın metanol, kloroform ve asetone ekstraktlarının antioksidan aktivite ile toplam fenol içeriğinin bağlantısı

Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak toplam fenol miktarı belirlenmiştir. Standart kalibrasyon eğrisinin çiziminde standart olarak galik asit kullanılmıştır. Standart grafiği $R^2=0,9994$ olarak hesaplanmış ve deneyde kullanılmıştır (Şekil 4. 36).



Şekil 4.36 Toplam Fenol Analizi için Gallik Asit Standart Grafiği

22°C sıcaklıkta yetiştirilen kültürlerin, 28°C sıcaklıkta yetiştirilen kültürlere göre daha yüksek fenolik içeriğe sahip oldukları Şekil 4.38 de gösterilmiştir. 22°C sıcaklıkta RD ortamında üretilen kültürün metanol ekstresinin toplam fenol içeriği 5000 mg/ 100 g olarak hesaplanmıştır. 22°C BBM ortamında üretilen kültürün fenol içeriği 4300 mg/ 100 g iken 28°C sıcaklıktakinin fenol içeriğinde %25,6 azalma olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.37 22°C ve 28°C sıcaklıklarda BBM, BG-11 ve RD ortamında yetiştirilen *S. protuberans* 'ın metanol ekstraktlarının antioksidan aktivite ile toplam fenol içeriğinin bağlantısı

4.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

4.3.1 Disk difüzyon metodunun sonuçları

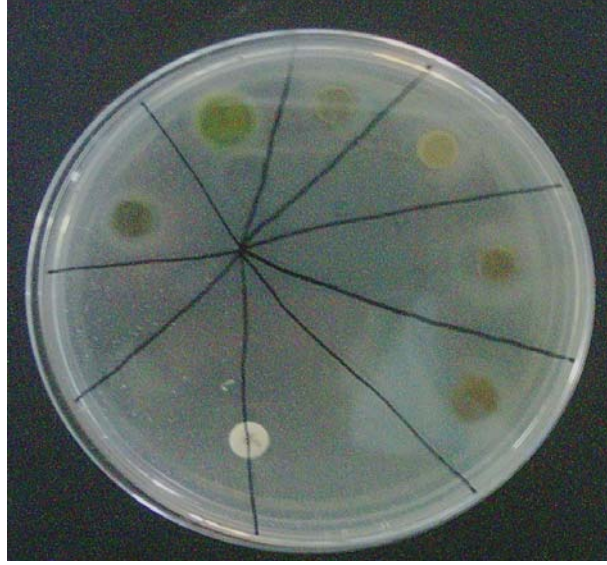
Mikroalg ve siyanobakterilerden antimikrobiyel madde elde etmek için yürütülen çalışmaların sayısının giderek arttığı görülmektedir. Bloor and Ennglan (1991) *Nostoc*'un, Fish and Cood (1994) *Phormidium*'un, Kreitlow et.al. (1999) *Anabeana*, *Oscillatoria*, *Pseudoanabaena* ve *Synechocystis* cinslerinin çeşitli izolatlarının, Issa (1999) *Oscillatoria angustissima* ve *Calothrix parietina* türlerinin çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir.

Genellikle bu araştırmacıların çeşitli çözücülerde elde ettikleri ekstraktların hem Gr (-) hem de Gr (+) bakterilere karşı etkili olduğu görülmüştür.

Disk difüzyon metodu kullanılarak *S. protuberans*' ın farklı solvent (metanol, kloroform ve aseton) ekstraktları, metanolde çözüldükten sonra 20 ve 30 µL' si disklere emdirilmiş ve 45°C sıcaklıktaki kurutma fırınında 15 dakika bekletilmiştir. Bekleme sonrasında diskler kurumuş ve metanolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kuruyan diskler, bakteri ve besi yeri dökülmüş petri kutuları içine yerleştirilerek antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir. Gram- pozitif ve gram-negatif bakterilerin her iki grubu üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Maya örneğinde (*Candida albicans*) aseton ekstraktında ölçülen zon çapının en geniş olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.5 Standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm)

Test Mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonları (mm)	
	Tobramisin	Nistatin
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	9	nt
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	18	nt
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10	nt
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	7	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6	nt
<i>E. cloaceae</i> ATCC 13047	13	nt
<i>Escherichia coli</i> ATCC 29998	4	nt
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 583	4	nt
<i>Bacillus cereus</i> CCM 99	7	nt
<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	Nt	12
Tobramisin (15µg/disk); Nistatin (30µg/disk); nt, test edilmedi		



Şekil 4.38 *S. protuberans* ekstresinin *Escherichia cloaceae*'e karşı etkisi

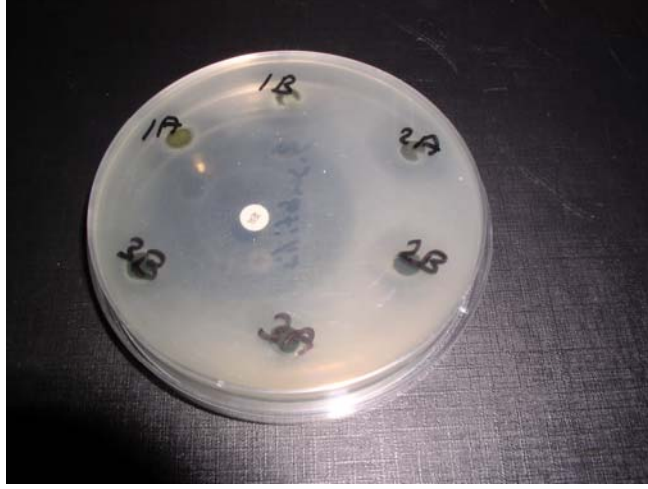
75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde üretilen farklı kültürlerin üretimi yapılarak metanol ekstreleri hazırlanmıştır. Bu ekstreleri antimikrobiyal aktivitelerinin etkileri Çizelge 4.6' da gösterilmiştir. Metanol ekstrelerinin bakteriler üzerindeki etkisi az olmasına rağmen maya üzerinde antifungal etkisinin arttığı gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ ışık şiddetinde, 22°C ve 28°C sıcaklıklarda, BBM, BG-11 ve RD ortamında yetiştirilen *S. protuberans* 'ın metanol ekstratlarının antimikrobiyel aktivitesi

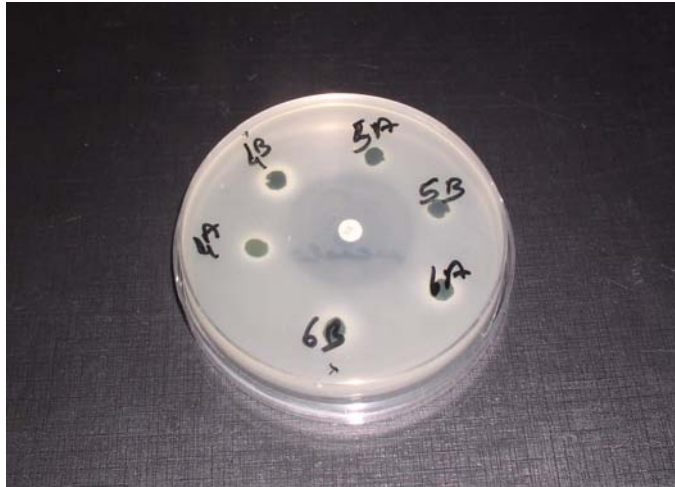
Test Mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonları (mm)											
	BBM 22°C		BG-11 22°C		RD 22°C		BBM 28°C		BG-11 28°C		RD 28°C	
	20 μL	30 μL	20 μL	30 μL	20 μL	30 μL	20 μL	30 μL	20 μL	30 μL	20 μL	30 μL
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	-	0,5	-	-	-	0,5	0,5	1	0,5	1	0,5	1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	0,5	-	-	0,5	1	1	2	0,5	1	0,5	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. cloaceae</i> ATCC 13047	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 29998	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 583	-	0,5	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	0,5
<i>Bacillus cereus</i> CCM 99	-	1	1	2	-	0,5	1	2	-	-	0,5	2
<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	4	5	2	4	1	2	5	6	2	-	3	4
Disk filtre kağıdı çapı (6mm); -, aktivite yok												

S. protuberans suşunun ekstraksiyonunda kullanılan solventlerin polaritesi azaldıkça antimikrobiyal etkisinin arttığı, polaritesinin

arttırılması ile de antioksidan etkisinin artmakta olduğu bu deneyler ile kanıtlanmıştır.

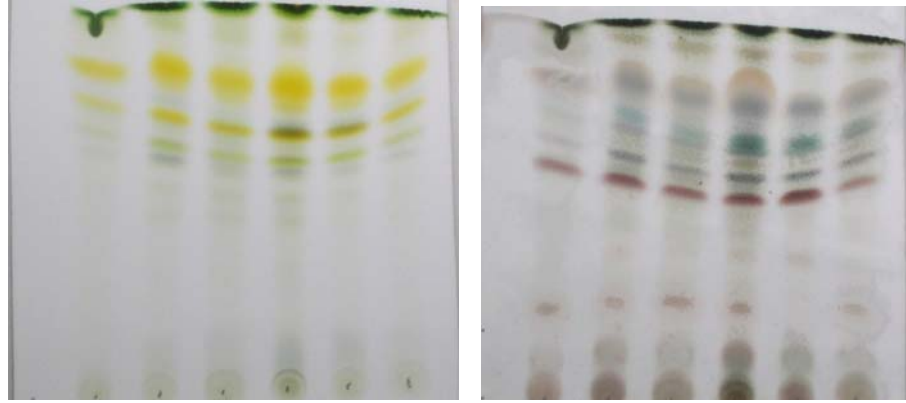


şekil 4.39 *S. protuberans* ekstresinin *B. subtilis*'e karşı etkisi



şekil 4.40 *S. protuberans* ekstresinin *Streptococcus faecalis*'e karşı etkisi

S. protuberans'ın farklı sıcaklık ve farklı ortamlarda yetiştirildikten sonra elde edilen metanol ekstraktlarından 1 mg/mL yoğunlukta hazırlanan metanol çözeltilerinin, ince tabaka kromatografisi (TLC) ile analizi yapılmıştır. TLC de metanol ekstresinin ayrılabilmesi için ön denemeler sonucunda CHCl_3 : MeOH (90:10) solvent sisteminin uygun olduğu tespit edildi (Şekil 4.42).



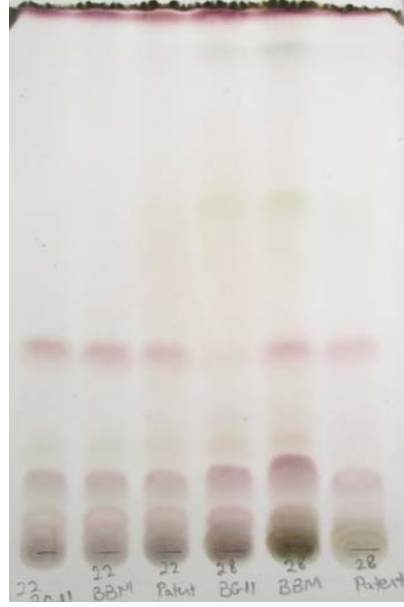
(a)

(b)

Şekil 4.41 22°C ve 28°C sıcaklıklarda BBM, BG-11 ve RD ortamında ve yetiştirilen *S. protuberans*'ın metanol ekstraktlarının ince tabaka kromatografisi (TLC) a-90:10 Kloroform: Metanol tankında sürüklendi b-90:10 Kloroform: Metanol tankında sürüklendi %20'lik sülfürik asit püskürtüldükten sonraki görüntüsü

Numuneler plağın alt kısmından 1 cm yükseklikte, olacak şekilde pastör pipeti ile 5'er kez tatbik edildi. Tatbikler kurutma makinesi ile kurutulduktan sonra 90:10 CHCl_3 : MeOH sistemi ile doyurulmuş olan TLC tankı konularak 15 cm yürütüldü. Tanktan çıkarılan plak kurutulduktan sonra 254 nm de UV kabin içinde görüntülendi. Ardından %30'luk H_2SO_4 plak üzerine püskürtülerek 110°C etüv içinde 5 dak. tutularak spotların

belirgin hale gelmesi sağlandı. Şekil 4.41 ve 4.42’de TLC’lerin fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 4.42 22°C ve 28°C sıcaklıklarda BBM, BG-11 ve RD ortamında ve yetiştirilen *S. protuberans* 'ın metanol ekstrelerinin ince tabaka kromatografisinin (TLC) 254 nm görünümü

5.ÖNERİLER

Tatlı su kaynaklarında *Scenedesmus* türlerinin çok geniş dağılıma sahip olduğu bilinmektedir. Türkiye'nin, iklimsel özellikleri ve su kaynaklarının zenginliği nedeniyle mikroalg florasının çeşitliliği çok yüksektir. Dünya genelinde 30.000'in üzerinde mikroalg çeşidi olduğu tahmin edilmektedir. Şu ana kadar yaklaşık 100 tanesi üzerinde bilimsel çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan sadece birkaç tanesi ticari anlamda değerlendirilmektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen verilerin ışığında, Isparta'nın Eğirdir Gölü'nden izole edilen *Scenedesmus protuberans* suşunun aktivitesinin en yüksek olduğu üretim koşulu olan 22°C sıcakta ve RD ortamında yetiştirilebileceği tespit edilmiştir. Uygun fotobiyoreaktör dizaynı yapılarak bu türün üretimi, kontrollü bir şekilde gerçekleştirilebilir. Bu koşullarda üretilen biyokütlenin ve ekstraktların kozmetik, farmasötik ve gıda sanayilerinde kullanımına ülke ekonomisine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Scenedesmus protuberans ekstraksiyonundan sonra, aktiviteden sorumlu olan metabolitler saptanarak bu metabolitlerin biyokütle içinde oranının artırılması yönünde araştırmaların devam etmesi düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Alfermann, A.W. and Verpoorte, R., 2003, Biological Activity of Carotenoids and Their Bioavailability in the Human Organism, Metabolic Engineering of plant Secondary Metabolism, Kluwer Academic Publishers, pg: 95

Amin, I., Tan, S.H., 2002, Antioxidant Activity of Selected Commercial Seaweeds, Mal Journal Nutr, 8(2): 167-177

Amin, I., Zamaliah, M.M., Chin W.F., 2004, Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables, Food Chemistry, 87: 581-586

Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M., 2001, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, Food Chemistry, 73: 239-244

Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2002, Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları ISBN: 975-6652-04-7 Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları pg:211-261

Becker, E.W., 1995, Microalgae:Biotechnology and Microbiology, Cambridge University Press,

Kaynaklar dizini (devam)

Becker, W.E. and Venkataraman, L.V., 1981, Biotechnology and Exploitation of Algae – The Indian Approach-, pg: 19-24

Belardi Hassan E., Molina E., Chisti Y., 2000, A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil, Enzyme and Microbial Technology, 26, 516-529

Beşe, M., 1989, Mikrobiyolojide kullanılan antibiyotik duyarlılık ve Deneme Yöntemleri, İstanbul, syf: 10-16

Berg, B.E., Lund, H.S., Kringstand, A., Kvernheim, A.L., 1998, Routine analysis of hydrocarbons, PCB and PAH in marine sediments using supercritical CO₂ extraction, Chemosphere, 38, (3), 587-599

Bishop, I.N., Urbig, T., Senger, H., 1995, Complete separation of the β,ϵ -and β,β - carotenoid biosynthetic pathways by a unique mutation of the lycopene cyclase in the green alga, *Scenedesmus obliquus*, FEBS Letters, 367: 158-162

Bloor, S., Englan, R.R., 1994, Elucidation and Optimization of the Medium Costituens Controlling Antibiotic Production by the Cyanobacterium *Nostoc muscarum*, Enzym. Microbiol.Technol.,13: 76-81

Kaynaklar dizini (devam)

Borowitzka, A.M. and Borowitzka L.J.,1992, Micro-algal Biotechnology, Cambridge University Press, pg:59-80

Borowitzka, A.M., 1999, Commercial production of microalgae: ponds, tanks,tubes and fermenters, Journal of Biotechnology, 70: 313-321

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, A.H., 2003, Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae), Journal of Ethnopharmacology, 87: 215-220

Cannell, R.J.P., 1998, Natural product isolation, Humana press inc., Printed in the United States of America, pg:1-91

Chen F., Zhang Y., Guo S., 1996, Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture, *Biotechnology Letters*, Vol 18, 5, 603-608p.

Cirik, S., ve Gökpınar, Ş., 1993, Plankton bilgisi ve kültürü, Ege Üniversitesi Yayınları, 47, İzmir, 274.

Cohen, Z., 1999, Chemicals From Microalgae, British Library Cataloguing-in-Publication Data, pg:419

Kaynaklar dizini (devam)

Crespo Punin M.O., Yusty Lage M.A., 2005, Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the determination of PCBs in seaweed samples, *Chemosphere*, 59, 1407-1413

Çolak, D., 2000; Antimikrobiyal İlaçlar ve etki Mekanizmaları, Genel Bakteriyoloji, syf:81-89

Demirel, Z., Conk Dalay, M. , Ozdemir, G. 2005, Antioxidant and Antibacterial Activity of *Scenedesmus protuberans* Fritsch. Isolated from Egirdir Lake, Turkey; European society of Microalgal Biotechnology, 6th European Workshop May 23rd until 25th 2005, Sözlü Sunum

Duval, B., Shetty, K. and Thomas, W.H., 2000, Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after Exposure to UV light, *Journal of Applied Phycology*, 11: 559-566

Filbo-Lima, J.V.M., Carvalbo, A. F.F.U., Freitas, M. S., Melo, M.M.V., 2002, Antibacterial Activity of Extracts of Six Macroalgae From The Northeastern Brazilian Cost, *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 311-313

Kaynaklar dizini (devam)

Fish, S.A., Codd, G.A., 1994, bioactive Compound Production by Termophilic and Thermotolerant Cyanobacteria, W., J., Microbial., Tech., 10:338-341

Fox, R., 1996, Spirulina: production and potantial, EDISUD publication, Aix-en-Provence, 231 p.

Fox, R., 1983, Algoculture, The microalgae Spirulina (Cyanophyceae). A study of the contions necessary for their growth. Development of orginal production systems, particularry with reference to a village ecosystem. Doctora thesis, 336 p.

G  lay, Z., 2002, Antibiyotik Duyarl  lık Testlerinin Yorumu, Toraks Dergisi, Cilt 3, Sayı 1 Syf:75-88

G  ner, H., Aysel, V., 1991, Tohumsuz Bitkiler Sistematięi, Ege   ni. Fen Fak. Kitaplar Serisi No:108, syf: 128-129

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., 1999, Antioxidant Defences, Free Radikal In Biology And Medicine, Third Edition, Oxford University Pres, pg:105-231

Kaynaklar dizini(devam)

Hedenskog, G., Enedo, L., Vendlova, Prokes, B.T.I., 1969, Investigation of some methods for increasing the digestibility in vitro of microalgae. *Biotechnology, Bioeng.*, 11 (1), 37-51

Hejazi, A.M., Lamarliere, C., Rocha, M.S., Vermue, M., Tramper, J., Wijffels, R.H., 2002, Selective Extraction of Carotenoids from the Microalga *Dunaliella salina* with Retention of Viability, *Biotechnology and Bioengineering*, 79 (1), 29-36

Issa, A.A., 1999, Antibiotic Production by the Cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina*, *Env., Toxic and Pharm.*, 8:33-37

Jiangning, G., Xinchu, W., Hou, W., Qinghua, L., Kaishun, B., 2004, Antioxidant from a Chinese Medicinal Herb-*Psoralea corylifolia* L., *Food Chemistry*, 91: 287-292

Joe, A.V., Yong, H., Xuehui, S., Ligia, Z., 1998, PhenolAntioxidant Quantity and Quantity in Foods: Vegetables, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 46:3630-3634

Karaman, İ., Şahin, F., Güllüce, M., Ögütçü, H., Şengül, M., Adigüzel, A., 2003, Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L., *Journal of Ethnopharmacology*, 85: 231-235

Kaynak dizini (devam)

Kaur, C. and Kapoor, H.C., 2002, Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables, International Journal of Food Science and Technology, 37:153-161

Koleva, I. I., Linssen, PH. J., Beek, A. V. T., Evstatieva, N. L., Kortenska, V., Hadjieva, N., 2003, Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (Labiatae) grown in Bulgaria, Journal of the Science of Food and Agriculture, 83: 809-819

Kreitlow, S., Mundt, S., Lindequist, U., 1998, Cyanobacteria- A Potential Source of New Biologically Active Substances, J.,Biotech., 70:61-63

Lee, Y. K., 2001, Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential, Journal of Applied Phycology, 13:307-315

Leghari, S. M., Arbani, S.N. and Jehangir, T.M., 2001, Chlorococcales (Chlorophyta) of Sindh, Pakistan, OnLine Journal of Biological Sciences 1 (6): 451-455, 2001

Luque-Garcia, J.L., Luque de Castro, M.D., 2003, Extraction of polychlorinated biphenyls from soils by automated focused microwave-assisted Soxhlet extraction, Journal of Chromatography A, 998, 21-29

Kaynaklar dizini (devam)

Mendes-Pinto, M.M., Raposo, M.F.J., Bowen, J., Young, A.J., Morais, R., 2001, Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of

Haematococcus pluvialis: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability, Journal of Applied Phycology, 13:19-24

Mendes, R.L., Beatriz P.N., Cardoso, M.T., Pereira, A.P., Palavra, F.A., 2003, Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae, Inorganica Chimica Acta, 356, 328-334

Molina Grima, E., Belarbia, E.-H., Acie'n Ferna'ndeza, F.G., Robles Medina, A., Yusuf Chistib, 2003, Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, Biotechnology Advances, 20:491–515

Murthy, C.N.K., Singh, R.P., Jayaprakasha, K.G., 2002, Antioxidant Activities of Grape (*Vitis vinifera*) Pomace Extracts, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50: 5909-5914

Olaizola, M., 2000, Commercial product of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors, Journal of Applied Phycology, 12: 499-506

Kaynaklar dizini (devam)

Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P., Abalde, J., 2000, Production and analysis of secondary carotenoids in green algae, *Journal of Applied Phycology*,12: 553-556

Ozdemir, G., Karabay, N. U., Dalay-Conk, M., Pazarbasi, B., 2004, Antibacterial Activity of Volatile Component and Various Extracts of *Spirulina platensis*, *Phytotherapy Research*, 18: 754-757

Ördög, V., Stirk W.A., Lenobel, R., Bancirova, M., Strnad, M., Staden, J.V., Szigeti, J., Nemeth, L., 2004, Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites, *Journal of Applied Phycology*, 16: 309-314

Pelizer L.H., Danesi E.D.G., Rangel C.O., Sassano C.E.N., Carvalho J.C.M., Sato S., Moraes I.O., 2003, Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation, *Journal of Food Engineering*, 56, 371-375p.

Radonic, A., Milos, M., 2003, Chemical Composition and *In Vitro* Evaluation of Antioxidant Effect of Free Volatile Compounds From *Satureja montana* L.,37 (6): 673-679

Kaynaklar dizini (devam)

Rehman, Z., Salariya, A. M., Habib, F., 2003, Antioxidant activity of ginger extract in sunflower oil, Journal of the Science of Food and Agriculture, 83: 624-629

Richmond, A., 2004, Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Science Ltd

Robinson, C.H., Lawler, M.R., Chenoweth, W.L., Garwick, A.E., 1997, Roles of Nutrients in Regulation, Normal and Therapeutic Nutrition, Seventeenth Edition, Macmillan Publishing Company New York, pg: 254-255

Rudic, V., and Dudnicenco T., 2000, Process for cultivation of green alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow), MD Patent, Nr. a 2000 0154.

Saifuddin, N., Chua, K.H., 2003, Extraction of tetrachloroethylene from weathered soils: A comparison between soxhlet extraction and microwave-assisted extraction, Malaysian Journal of Chemistry, Vol. 5, No. 1, 30-33

Sasson, A., 1997, Mikroalgal Biotechnologies: Recent Developments and Prospects for Developing Countries, BIOTECH Publication 1/2542, pg: 3, 46

Kaynak dizini (devam)

Snowman, J.W., 1996, Lyophilization, Downstream processing of natural products. 275-300

Sökmen, A., Sökmen, M., Daferera, D., Polissiou, M., Candan, F., Ünlü-Vardar, G., and Dönmez, E., 2003, Antimicrobial Activity of Essential Oil and Methanol Extracts Of *Achillea sintenisii* Hub. Mor. (Asteraceae), Phytotherapy Research, 17: 1005-1010

Sökmen, A., Sökmen, M., Daferera, D., Polissiou, M., Candan, F., Ünlü, M., and Akpulat, H. A., 2004, The in vitro antioksidant ve Antimicrobial Activities of the Essensital Oil and Methanol Extracts of *Achillea biebersteini* Afan. (Asteraceae), Phytotherapy Research, 18: 451-456

Suja, K.P., Jayalekshmy, A., Arumughan, C., 2005, Antioxidant aktivite of sesame cake extract, Food Chemistry, 91: 213-219

Sukatar, A., 2002, Alg Kùltür Yöntemleri, Ege Üni. Fen Fak. Kitapları Serisi No:184, syf: 104

Stein, J. R., 1973, Handbook of Phycological Methods Culture Methods and growth measurements, pg: 290-293

Kaynaklar dizini (devam)

Talaro, K., Talaro, A., 1993, Foundations in Microbiology, Wm. C. Brown Publishers, Chapter 10, pg: 296-310

Tripathi, U., Sarada, R., Ravishankar, G.A., 2000, A culture method for microalgal forms using two-tier vessel providing carbon-dioxide environment:

studies on growth and carotenoid production, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17: 325-329

Tukaj, Z., Mikulin-Matusiak, K., Lewandowska, J., Szurkowski, J., 2002, Changes in the pigment patterns and the photosynthetic activity during a light-induced cell cycle of the green alga *Scenedesmus armatus*, Plant Physiology and Biochemistry, 41: 337-344

Vardar-Sukan, F., 2005, Alt akım işlemleri, Biyomühendislik ders notları

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B.D., 1998, Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products, J. Agric. Food Chem., 46: 4113-4117

Vieira, V., and Baylina, N., 1995, Necton Microalgae Biotechnology Directory, Escola Superior de Biotecnologia Portuguesa, pg: 13-23

Kaynaklar dizini (devam)

Vina A. Yang and Carol A. Clausen, 2004, Antifungal Metabolites of *Lactobacilli*, Woodframe Housing Durability and Disaster Issues Conference, Aladdin Resort & Casino Las Vegas, Nevada, USA

Vonshak, A., and Lu, C., 1999, Characterization of PSII photochemistry in salt-adapted cells of *Spirulina palentis*, New Phytol., 141: 231-239.

Vonshak, A., and Lu, C., 2002, Effects of salinity stress on photosystem II function in *Spirulina palentis* cells, Physiologia Plantarum, 114: 405-413.

Vonshak, A., and Torzillo, G., 2003, International workshop and training course on photobioreactors, Ebiltem Yayınları, İzmir, 66

Vonshak, A., and Torzillo, G., 2004, Biotechnology for Algal Mass Cultivation, Applied Course on Production and Monitoring of Microalgal Growth, İzmir

Wang, D.I.C., Cooney, L.C., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrey, A.E., Lilly, M.D., 1979, Fermentation and Enzyme Technology, A wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York

Kaynaklar dizini (devam)

Wiltshire, H. K., Boersma, M., Möller, A., Buhtz, H., 2000, Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae), Aquatic Ecology, 34: 119-126

Xu, J., Chen, S., Hu, Q., 2005, Antioxidant activity of brown pigment and extracts from black sesame seed (*Sesamum indicum* L.), Food Chemistry, 91: 79-83

<http://www.ccap.ac.uk/media/recipes.htm#>

<http://www.hm.saglik.gov.tr/pdf/kitaplar/css49.pdf>

<http://ind.ntou.edu.tw/~b0232/Haematococcus.files/image005.jpg>

<http://www.astareal.com/Astaxanthin.aspx>

www.herbalinfo.com/antioxidans.htm

www.ilcnet.com/nutrition/radical.htm

www.ceri.com/freerad.htm

<http://en.wikipedia.org/wiki/Solvent>

www.egc.com/illumination.html

http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/chap4_im.htm

ÖZGEÇMİŞ

Zeliha DEMİREL 1980 yılında Ankara’da doğmuştur. Orta ve lise eğitimini Ankara Bahçelievler Deneme Lisesinde tamamlamıştır. Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümünün Genel Biyoloji opsiyonundan 2003 yılında, Biyolog unvanını alarak mezun olmuştur. 2003 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünde Yüksek Lisans Öğrenimine başlamıştır.