



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



Nanofrustulum shiloi VE *Scenedesmus obliquus*
**TÜRLERİNİN FARKLI KOŞULLARDA
KAROTENOİD ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Dilan DEMİR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Nanofrustulum shiloi VE *Scenedesmus obliquus*
**TÜRLERİNİN FARKLI KOŞULLARDA
KAROTENOİD ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Dilan DEMİR

Danışman : Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2022

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / ~~Doktora Tezi~~ olarak sunduğum “**Nanofrustulum shiloi ve Scenedesmus obliquus Türlerinin Farklı Koşullarda Karotenoid Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

16 / 02 / 2022

İmzası

Dilan DEMİR

ÖZET

***Nanofrustulum shiloi* ve *Scenedesmus obliquus* TÜRLERİNİN FARKLI KOŞULLARDA KAROTENOİD ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

DEMİR, Dilan

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

Şubat 2022, 109 sayfa

Çeşitli biyolojik aktiviteleri sayesinde özellikle sağlık alanında kullanılabilecek mikroalgal karotenoidlerden loroksantin ve fukoksantin miktarının farklı koşullar denenerek artırılmasının ve bu koşulların mikroalgal biyokütle üzerindeki etkisinin belirlenmesi bu çalışmanın temel amacıdır.

Fukoksantin miktarının takibi *Nanofrustulum shiloi* türü ile, loroksantin miktarının takibi *Scenedesmus obliquus* türü ile yapılarak farklı koşullar altındaki karotenoid değişimleri belirlenmiştir. Işık şiddeti, havalandırma hızı, azot türü ve oksidatif stres her iki mikroalg türündeki karotenoid miktarlarının değişimlerinin takibinde seçilen parametrelerdir.

Değişen koşullarda elde edilen veriler göz önünde bulundurularak her iki mikroalg türü için en yüksek miktarda karotenoid üretiminde gerekli optimum koşullar belirlenmiş ve panel fotobiyoreaktörlerde optimum koşullarda büyük ölçekli üretime geçilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Nanofrustulum shiloi*, *Scenedesmus obliquus*, karotenoid, fukoksantin, loroksantin.



ABSTRACT

DETERMINATION OF CAROTENOID PRODUCTION POTENTIALS OF *Nanofrustulum shiloi* and *Scenedesmus obliquus* SPECIES UNDER DIFFERENT CONDITIONS

DEMİR, Dilan

MSc. in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

February 2022, 109 pages

The main aim of this study is to increase the amount of lutein and fucoxanthin, which are microalgal carotenoids that can be used especially in the field of health thanks to their various biological activities, by trying different conditions and to determine the effect of these conditions on microalgal biomass.

Carotenoid changes were determined under different conditions was followed the amount of fucoxanthin with *Nanofrustulum shiloi* species, and the amount of lutein with *Scenedesmus obliquus* species. Light intensity, aeration rate, nitrogen type and oxidative stress are the parameters chosen to monitor the changes in carotenoid amounts in both microalgae species.

Considering the data obtained under changing conditions, optimum conditions for the production of the highest amount of carotenoids were determined for both microalgae species and large-scale production was started in panel photobioreactors under optimum conditions.

Key words: *Nanofrustulum shiloi*, *Scenedesmus obliquus*, carotenoid, fucoxanthin, lutein.

ÖNSÖZ

Mikroalglerin dünyasını, mikroalglerin en değerli metabolitlerinden olan karotenoidleri tanımak, daha fazlasını öğrenmek ve literatüre katkıda bulunmanın heyecanı ile aktif bir süreçte yer alınmıştır.

İZMİR

16/02/2022

Dilan DEMİR



İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK	ii
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
TABLolar DİZİNİ	xxvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxxı
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Mikroalgler	3
2.1.1. Mikroalglerin Ticari Kullanımı	4
2.2. Mikroalg Üretimi	7

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
2.2.1. Besin Ortamı.....	7
2.2.2. Kültür Koşulları.....	10
2.2.3. Üretim Yöntemleri.....	13
2.2.4. Üretim Sistemleri.....	14
2.3. Mikroalglerden Karotenoid Üretiminde Alt Akım İşlemleri.....	23
2.3.1. Hasat	23
2.3.2. Kurutma	27
2.3.3. Hücre Parçalama.....	27
2.4. Karotenoidler	31
2.4.1. Karotenoidlerin Biyolojik Aktiviteleri	32
2.4.2. Karotenoidlerin Ticari Kullanımı	34
2.4.3. Karotenoid Ekstraksiyonu	35
2.4.4. Sabunlaştırma	38
2.5. Mikroalglerden Elde Edilen Karotenoidlerin Saflaştırılması ve Belirlenmesi.....	38

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
2.5.1. Kromatografi	38
2.5.2. Karotenoid Analizinde Metabolomikler.....	42
2.5.3. Spektroskopi.....	42
2.5.4. Kimyasal Dramatizasyon	44
2.6. <i>Nanofrustulum shiloi</i> ve Fukoksantin	44
2.6.1. <i>Nanofrustulum shiloi</i> 'nin Sistematığı	44
2.6.2. Fukoksantin	45
2.7. <i>Scenedesmus obliquus</i> ve Loroksantin	48
2.7.1. <i>Scenedesmus obliquus</i> 'un Sistematığı.....	48
2.7.2. Loroksantin.....	49
3. MATERYAL VE METOT.....	50
3.1. Materyal	50
3.1.1. Mikroalgler	50
3.1.2. Kültür ortamları	50
3.1.3. Ekipmanlar	52
3.2. Metot	53

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
3.2.1. Stok Kültür Hazırlanması	53
3.2.2. İnokulum Hazırlanması	53
3.2.3. Kültür sistemleri	53
3.2.4. Büyüme hızının belirlenmesi	58
3.2.5. Karotenoid üretimi alt akım işlemleri.....	59
3.2.6. Analizler	61
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	63
4.1. <i>Nanofrustulum shiloi</i> 'nin Büyümesi ve Fukoksantin Üretimi.....	63
4.1.1. <i>Nanofrustulum shiloi</i> 'nin Büyümesinde ve Fukoksantin Üretiminde Farklı Işık Şiddeti ve Havalandırma Hızlarının Etkisi	63
4.1.2 <i>Nanofrustulum shiloi</i> 'nin Büyümesinde ve Fukoksantin Üretiminde Farklı Azot Kaynağının Etkisi.....	73
4.1.3. <i>Nanofrustulum shiloi</i> 'nin Büyümesinde ve Fukoksantin Üretiminde Oksidatif Stresin Etkisi.....	76
4.1.4. <i>Nanofrustulum shiloi</i> 'nin 6 L Panel Fotobiyoreaktörde Üretimi.....	80
4.2. <i>Scenedesmus obliquus</i> 'un Büyümesi ve Loroksantin Üretimi	81

İÇİNDEKİLER (devamı)

Sayfa

4.2.1. <i>Scenedesmus obliquus</i> 'un Büyümesinde ve Loroksantin Üretiminde Farklı Işık Şiddeti ve Havalandırma Hızının Etkisi	82
4.2.2. <i>Scenedesmus obliquus</i> 'un Büyümesinde ve Loroksantin Üretiminde Farklı Azot Kaynağının Etkisi.....	91
4.2.3. <i>Scenedesmus obliquus</i> 'un Büyümesinde ve Loroksantin Üretiminde Oksidatif Stresin Etkisi.....	93
4.2.4. . <i>Scenedesmus obliquus</i> 'un 6 L Panel Fotobiyoreaktörde Üretimi	96
5. ÖNERİLER	98
KAYNAKLAR DİZİNİ	99



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Açık sistemler.....	16
2.2 Düz Panel Fotobiyoreaktör.....	17
2.3 Tubuler/borulu fotobiyoreaktör.....	18
2.4 Kabarcık kolon (a) ve hava kaldırmalı reaktör (b).....	19
2.5 Helisel borulu reaktör.....	20
2.6 α -şekilli reaktör	21
2.7 İnce Tabaka Fotobiyoreaktörler	22
2.8 <i>Nanofrustulum shiloi</i> hücresinin SEM görüntüsü	44
2.9 Fukoksantin Yapısı.....	45
2.10 Fukoksantin, Fukoksantinol ve Amarosiaksantin'in kimyasal yapıları.....	46
2.9 Lutein'in kimyasal yapısı	49
3.1 <i>Nanofrustulum shiloi</i> 'nin küçük ölçekli üretimi	54
3.2 <i>Scenedesmus obliquus</i> 'un küçük ölçekli üretimi	54
3.3 <i>S. obliquus</i> hücrelerinin sabunlaştırma kolonlarında faz ayrımı ...	61
4.1 <i>Nanofrustulum shiloi</i> hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.....	63
4.2 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm 'deki zamana bağlı absorbans grafiği	64

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

Şekil

Sayfa

4.3 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm 'deki zamana bağlı absorbans grafiği	64
4.4 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.....	65
4.5 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği	65
4.6 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm 'deki zamana bağlı absorbans grafiği	67
4.7 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm 'deki zamana bağlı absorbans grafiği	67
4.8 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.....	68
4.9 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği	68

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

Şekil

Sayfa

4.10 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm 'deki zamana bağlı absorbans grafiği	70
4.11 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm 'deki zamana bağlı absorbans grafiği	70
4.12 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.....	71
4.13 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarındaki (1, 3, 5 L/dk) üretimlerden alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği	71
4.14 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için farklı azot kaynaklarında alınan örneklerin 600 nm 'deki zamana bağlı absorbans grafiği.....	74
4.15 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için farklı azot kaynaklarında alınan örneklerin 680 nm 'deki zamana bağlı absorbans grafiği.....	74
4.16 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için farklı azot kaynaklarında alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği	75
4.17 <i>Nanofrustulum shiloi</i> için farklı azot kaynaklarında alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği	75
4.18 <i>N. shiloi</i> oksidatif deney setlerinde hücre büyümesinin gözlemlenmesi.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

Şekil

Sayfa

4.19 <i>N. shiloi</i> için oksidatif stres uygulamasında alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği	77
4.20 <i>N. shiloi</i> için oksidatif stres uygulamasında alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği	78
4.21 <i>N. shiloi</i> için farklı oksidatif stres uygulamalarında alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği	78
4.22 <i>N. shiloi</i> için farklı oksidatif stres uygulamalarında alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği	79
4.23 <i>N. shiloi</i> için 6 L üretimde örneklerin 600 nm 'deki zamana bağlı absorbans grafiği.....	80
4.24 <i>N. shiloi</i> için 6 L üretimde örneklerin 680 nm 'deki zamana bağlı absorbans grafiği.....	80
4.25 <i>N. shiloi</i> için 6 L üretimde zamana bağlı hücre sayım grafiği.....	81
4.26 <i>Scenedesmus obliquus</i> hücrelerinin mikroskop görüntüleri	81
4.27 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği	82
4.28 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği	83

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

Şekil

Sayfa

4.29 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 50 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.....	83
4.30 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 50 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği	84
4.31 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 150 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği	85
4.32 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 150 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği	86
4.33 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 150 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.....	86
4.34 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 150 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği	87
4.35 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 300 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği	88
4.36 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 300 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği	88

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

Şekil

Sayfa

4.37 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.....	89
4.38 <i>Scenedesmus obliquus</i> için 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği	89
4.39 Farklı azot koşulları altında <i>S. obliquus</i> 'un büyümesi	91
4.40 <i>Scenedesmus obliquus</i> için farklı azot kaynağında (sodyum nitrat, sodyum nitrit, amonyum klorür, üre) alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.....	92
4.41 <i>Scenedesmus obliquus</i> için farklı azot kaynağında (sodyum nitrat, sodyum nitrit, amonyum klorür, üre) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.....	92
4.42 <i>S. obliquus</i> için farklı azot kaynağında (sodyum nitrat, sodyum nitrit, amonyum klorür, üre) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.....	93
4.43 <i>S. obliquus</i> için farklı oksidatif stres koşullarında (Kontrol, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$, $\text{NaOCl} + \text{Fe}^{2+}$, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOCl}$) alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.....	94
4.44 <i>S. obliquus</i> için farklı oksidatif stres koşullarında (Kontrol, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$, $\text{NaOCl} + \text{Fe}^{2+}$, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOCl}$) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.....	94

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

Şekil

Sayfa

4.45 <i>S. obliquus</i> için farklı oksidatif stres koşullarında (Kontrol, $H_2O_2 + Fe^{2+}$, $NaOCl + Fe^{2+}$, $H_2O_2 + NaOCl$) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.....	95
4.46 <i>S. obliquus</i> için 6 L üretimde örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği	96
4.47 <i>S. obliquus</i> için 6 L üretimde örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği	97
4.48 <i>S. obliquus</i> için 6 L üretimde örneklerin zamana bağlı hücre sayım grafiği	97



TABLolar DİZİNİTabloSayfa

2.1	Açık ve Kapalı sistemlerin karşılaştırılması.....	15
2.2	Hasat yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	25
2.3	Hücre parçalama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	30
2.4	Fukoksantin üretimi yapan firmalar	48





ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 BG-11 stok çözelti hazırlanması ve kullanımı	50
3.2 BBM stok çözelti hazırlanması ve kullanımı	51
3.3 Kullanılan ekipmanlar ve markaları	52
3.4 Farklı fiziksel koşullar için kurulan deney setleri	55
3.5 Farklı azot kaynakları için kültür ortamlarındaki miktarlar	56
3.6 Farklı oksidatif stres uygulamaları için kültür ortamlarındaki miktarlar.....	57
3.7 Farklı kimyasal koşullar için kurulan deney setleri	57
3.8 Ekstraksiyon parametreleri.....	60
4.1 <i>N. shiloi</i> için 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin klorofil a, klorofil c ve toplam karotenoid değerleri.....	66
4.2 <i>N. shiloi</i> için 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin klorofil a, klorofil c ve toplam karotenoid değerleri.....	69
4.3 <i>N. shiloi</i> için 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin klorofil a, klorofil c ve toplam karotenoid değerleri.....	72
4.4 <i>N. shiloi</i> için farklı ışık şiddeti ve havalandırma hızındaki üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve fukoksantin miktarı	73
4.5 <i>N. shiloi</i> için farklı azot kaynağındaki (sodyum nitrat, sodyum nitrit, amonyum klorür, üre) üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve fukoksantin miktarı	76

ÇİZELGELER DİZİNİ (devamı)

Çizelge

Sayfa

- 4.6 *N. shiloi* için farklı oksidatif stres koşullarındaki (Kontrol grubu, H_2O_2 + Fe^{2+} , $NaOCl$ + Fe^{2+} , H_2O_2 + $NaOCl$) üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve fukoksantin miktarı 79
- 4.7 *S. obliquus* için 50 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin spektrofotometrik klorofil a, b ve toplam karotenoid değerleri.....84
- 4.8 *S. obliquus* için 150 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin spektrofotometrik klorofil a, b ve toplam karotenoid değerleri 87
- 4.9 *S. obliquus* için 300 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin spektrofotometrik klorofil a, b ve toplam karotenoid değerler 90
- 4.10 *Scenedesmus obliquus* için farklı ışık şiddeti ve havalandırma hızındaki üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve loroksantin miktarı 91
- 4.11 *S. obliquus* için farklı azot kaynağındaki (sodyum nitrat, sodyum nitrit, amonyum klorür, üre) üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve loroksantin miktarı 93
- 4.12 *S. obliquus* için farklı oksidatif stres koşullarında (Kontrol, H_2O_2 + Fe^{2+} , $NaOCl$ + Fe^{2+} , H_2O_2 + $NaOCl$) üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve loroksantin miktarı 95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

dk: dakika

L: Litre

ROS: Reaktif Oksijen Türler

N. shiloi: *Nanofrustulum shiloi*

S. obliquus: *Scenedesmus obliquus*

μ : Spesifik büyüme hızı



1. GİRİŞ

Günümüzde yaşanan en büyük küresel zorluklardan biri iklim değişikliğidir. Hızla artan dünya nüfusuna sürdürülebilir gıda, hammadde ve enerji tedariği giderek güçleşmektedir. Bitkiler fotosentez sayesinde fosil enerji kaynaklarını tüketmeden güneş ışığı ve karbondioksit yardımıyla tüm bileşenleri sürdürülebilir şekilde üretebildiklerinden dolayı biyokütle için oynadıkları rol önemlidir. Bununla beraber mevcut hatta azalmakta olan tarımsal alan ve birim alan başına verimin artırılmasının zorluğu sınırlamalara neden olmaktadır.

Bu sınırlamadan çıkmanın ümit verici bir yolu mikroalglerdir. Bazılarına göre tek çözüm kaynağı olan mikroalglerin biyoekonomi için yeni bir tür biyokütle üretim potansiyeli çok büyüktür. Mikroalgler birim alan başına bitkilerden beş kat daha fazla biyokütle oluşturabilirler ve üretimleri için bitkilerdeki gibi değerli bir tarım alanına ihtiyaç duymamaktadırlar. Kuru alanlar, çorak araziler, acı su bölgeleri, açık denizler, havuzlar, göller gibi herhangi bir alanın mikroalglerden biyokütle elde etmekte kullanılması mümkündür.

300.000'den fazla türü bulunan mikroalgler birçok biyoaktif bileşiğin kaynağıdır. Bu biyoaktif bileşikler arasında karotenoidler (astaksantin, fukoksantin vb.), uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), proteinler, klorofiller, vitaminler, benzersiz çeşitli pigmentler, fotosentetik depolama ürünleri, hücre duvarları, lipitler, fikobiliproteinler, polisakkaritler, hidrokarbonlar, polimerler, peptidler, toksinler, ikincil metabolitler ve dahası yer almaktadır.

Karotenoidlerin biyolojik aktiviteleri araştırılıp edinilen bilgiler arttıkça, araştırmacıların bu moleküllere olan dikkati her geçen gün daha da artmaktadır. Bu moleküllerin antiobezite, antimikrobiyal, antikanser, antiviral, kardiyovasküler protektif özellik gibi bir çok biyolojik aktivitesi tanımlanmıştır. Özellikle radikal oksijen türlerini süpürme özellikleri ile antioksidan aktiviteleri hala araştırılmaya devam edilmektedir.

Mikroalglerden elde edilecek biyolojik moleküller farmakolojik, nutrasötik, gıda takviye, hayvan yemi, kozmetik gibi bir çok alanda kullanılabilir. Bu moleküllerin ticari kullanımı, mikroalg üretim yöntemini ve alt akım işlemlerini belirlemeye yardımcı olmaktadır. Hayvan yemi ya da gübre kullanımı gibi daha az sterilite gerektiren mikroalgal biyokütle üretimleri açık havuzlarda yapılırken, farmasötik üretimler gibi alanlarda kullanılacak mikroalgal biyokütle üretimleri için kapalı ve kontrollü sistemler kullanılmaktadır. Üretimi tamamlanan mikroalglerin hasat ve kurutma işlemlerinden sonra elde edilen kuru biyokütle gerekli karotenoid uygun şekilde seçilen ekstraksiyon, sabunlaştırma ve saflaştırma basamaklarına tabii tutulmaktadır.

Mikroalglerden karotenoid üretimi sırasında çeşitli stres koşullarına maruz bırakılan hücrelerdeki karotenoid miktarlarının farklılık gösterdiği çeşitli araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır. Tuzluluk, besin kıtlığı, ışık şiddeti gibi farklı

koşullar altında mikroalglerin karotenoid içeriği değişmektedir. Karotenoidlere verilen önem arttıkça hücrelerin içeriğini arttırmak da önemli bir amaç haline gelmiştir.

Bu çalışmada mikroalg üretiminde farklı koşulların uygulanmasıyla hücrelerin karotenoid içeriklerinin değişimi gözlemlenmiştir. Fukoksantin eldesi için *Nanofrustulum shiloi* ve loroksantin eldesi için *Scenedesmus obliquus* kullanılmıştır. Mikroalg üretimi için seçilen farklı koşullar; ışık şiddeti, havalandırma hızı, farklı azot kaynağı ve oksidatif stres uygulanması şeklindedir. Bu çalışmada uygulanan farklı koşullar ile hücre içeriğindeki seçilen karotenoid miktarlarının artırılması amaçlanmıştır. Hem karotenoidlerin ticari kullanımına avantaj sağlamak hem de bu alanda yeterli çalışma olmayan literatüre katkı sağlamak hedeflenmiştir.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Mikroalgler

Algler, fotosentezi verimli bir şekilde gerçekleştirebilen çok çeşitli bir organizma grubudur ve morfoloji ve boyut temelinde alt gruplara ayrılabilir. Algler makroalg ve mikroalg olarak iki ana gruba ayrılır. Makroalgler, türleri arasında yer alan yosun gibi yüksek bitkilerin köklerine, gövdelerine ve yapraklarına benzeyen yapılarda organize olan birden fazla hücreden oluşur (Bux, 2013).

Mikroalgler ise deniz, tatlı su, çöl kumları ve kaplıcalardan kar ve buza kadar Dünya üzerindeki hemen hemen bütün ekosistemlerde en çok bulunan ve tüm yosunların %70'ini temsil eden, filamentler veya agregatlar oluşturabilen, yüksek büyüme oranına sahip, tuzlu su, tatlı ve nehir ağzı gibi çeşitli nişlerde bulunan tek hücreli fotoototrofik (klorofil a içeren) prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalardır (Johansen, 2012; Jacop-Lopez et al., 2020; Malcata et al., 2019).

Yaklaşık 4,5 milyar yıl önce oluşan Dünya'nın atmosferi bugüne göre karbondioksit açısından daha zengindi ve hemen hemen hiç serbest oksijen içermemekteydi. İlk yaşam formlarının ortaya çıkmasından sonra oksijen üreten mikrobiyal fotosentezin sonucunda bugün var olan oksijen bakımından zengin nefes alınabilir bir atmosfer elde edildi. Günümüzün siyanobakterileri ve mikroalgleri, fotosentez yapan ilk mikropların torunlarıdır. Bu mikroorganizmalar güneş enerjisini kullanarak Dünya'daki CO₂'nin yaklaşık %50'sini fotosentez yoluyla asimile edip organik madde ve O₂ oluşturdıkları için küresel karbon döngüsünün temelidir (Johansen, 2012; Jacop-Lopez et al., 2020; Malcata et al., 2019).

Günümüzdeki gelişmiş bitki yaşamının, bu basit mikroskobik bitki benzeri varlıklardan evrimleştiği düşünülmektedir. Mikroalgler daha önce de belirtildiği gibi hem ökaryotik hem de hücre organellerinin membranlarla sınırlandırılmadığı prokaryotik organizmalardan oluşan tahmini 350.000 türe sahip heterojen bir polifiletik fotosentetik organizma grubudur (Bux, 2013; Jacop-Lopez et al., 2020).

Mikroalglerin ana filumları, morfolojik özelliklerine, pigment bileşimlerine, membran tilakoidleri ve kloroplast organizasyonuna, fotosentetik depolama ürünlerinin kimyasal yapısına, karbohidrat besin rezervine, flagella yapısına, hücre duvarının kimyasına ve düzenine göre sınıflandırılmıştır (Jacop-Lopez et al., 2020; Bux, 2013; Levine and Fleurence, 2018).

Taksonominin sürekli ve hızlı revizyon altında olması, tüm algler için kabul edilebilir, kolayca tanımlanabilir bir sınıflandırma sistemi bulunmamasının nedenidir. Alg grubunun polifiletik yapısı geleneksel taksonomik gruplamalarla bir şekilde tutarsızdır ve bu taksonomik görüşün bilgi biriktikçe değişebileceğini unutmamak gerekir (Malcata et al., 2019).

Ağırlıklı olarak prokaryotik mikroalgler; Cyanophyta (siyanobakteriler-mavi yeşil algler) ökaryotik mikroalgler; Glaucophyta, Rhodophyta (kırmızı algler), Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta (Dinophyceae – dinoflagellatlar), Euglenophyta, Chlorarachniophyta, Chlorophyta (yeşil algler), Ochrophyta (kahverengi algler – ör: Eustigmatophyceae), Chrysophyceae (altın rengi algler), Bacillariophyceae (diatomlar), Charophyta, Cryptophyta gruplarında incelenmektedir. Bunlardan yalnızca Glaucophyta tatlı su habitatlarıyla sınırlıdır. Rhodophyta ve Haptophyta genel olarak denizlerde ve kalan filumlar hem deniz hem de tatlı su sistemlerinde bulunabilir, bu grupların filogenetik sınıflandırması konusunda hala birkaç farklılık vardır (Jacop-Lopez et al., 2020; Bux, 2013; Malcata et al., 2019; Levine and Fleurence, 2018).

2.1.1. Mikroalglerin Ticari Kullanımı

Mikroalglerin çeşitliliği çok geniştir ve birkaç biyoaktif bileşik için umut verici bir kaynaktır. Mikroalgler; karotenoidler (astaksantin, fukoksantin vb.), uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), proteinler, klorofiller, vitaminler, benzersiz çeşitli pigmentler, fotosentetik depolama ürünleri, hücre duvarları, müsilajlar, lipitler, fikobiliproteinler, steroller, polisakkaritler, hidrokarbonlar, polimerler, peptidler, toksinler ve ikincil metabolitler dahil olmak üzere deniz kaynaklarındaki bazı yüksek biyoaktif makromoleküllerin gerçek üreticileri olarak kabul edilir (Kim, 2011, 2015; Johansen, 2012; Cohen, 1999).

Makroalgler, insanlar tarafından en az son 4700 yıldır gıda, ilaç, kozmetik ve gübre olarak kullanılmaktadır, ancak hem makroalg hem de mikroalglerin ticari üretimi nispeten yenidir. Karada, yosunlardan türeyen bitkiler tüm yiyecek ve yemlerimizi sağlar. Bu da tüm yaşamın algere ve onların öncüllerine kadar izlenebileceğini göstermektedir. Bir süredir, mikroalgler de yetiştirilmekte ve insanlar tarafından kullanılmaktadır. (Posten and Chen, 2016; Jacop-Lopez et al., 2020).

1948 yılından sonra Almanya, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri mikroalg kültürlerini odak noktaları haline getirmişlerdir. Mikroalglerin ticari büyük ölçekli üretimi, 1960'ların başında bir gıda katkı maddesi olarak *Chlorella* kültürü ile Japonya'da, 1970'de *Spirulina* kültürü ile Meksika'da başlamıştır. 1986 yılında Avustralya'da β -karoten üretmek için *Dunaliella salina*, astaksantin üretimi için *Haematococcus pluvialis* ve su ürünleri yetiştiriciliği için diğer türler kullanılmış, daha sonra ise mikroalg yetiştiriciliği İsrail, Amerika Birleşik Devletleri ve Hindistan gibi ülkelerde yayılarak genişleyen dünya üretimine geçilmeye başlanmıştır. O zamandan beri, mikroalgler, karotenoidler gibi biyolojik ürünlerin çekici kaynakları haline gelmiş ve son yıllarda bunların kullanımı, atık su arıtılmasında ve CO₂ fiksasyonunda, biyoyakıtları ve çevresel ajanları da içerecek şekilde genişlemiştir (Johansen, 2012).

Mikroalglerin, kimyasal ve farmakolojik yenilik ve çeşitlilik sağladığı ve deniz kaynaklarında bulunan bazı yüksek düzeyde biyoaktif bileşiklerin gerçek

üreticileri oldukları kabul edilmiştir. Biyolojik aktiviteleri yüksek olan farklı bileşikler üretebildikleri için çeşitli insan gıdalarında ve hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Balık yetiştiriciliği için kırmızı boya astaksantin ve sağlıklı insan beslenmesi için çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) piyasaya sürülen ürünlere örnek olarak verilebilir. Bununla birlikte, dünya çapında üretilen miktar yalnızca birkaç bin tondur (Posten and Chen, 2016; Kim, 2011). 2004 yılında, mikroalg endüstrisi, pazara hakim olan *Chlorella*, *Spirulina* ve *Dunaliella* ile yılda 7000 ton kuru madde üretecek şekilde büyümüştür (Johansen, 2012).

Cyanobacterium *Anthrospira* ve rhodophyta *Porphyridium*, doğal boyalar olarak ve farmasötik uygulamalar için kullanılan fikobiliproteinlerin (yani fikoeritrin ve fikosiyanın) ana ticari üreticileridir. *Chlorella*, *Arthrospira* ve *Nostoc*, kimyasal bileşimleri nedeniyle insan ve hayvan beslenmesi için dünya çapında yetiştirilmektedir. Mikroalgler, azalan petrol bazlı yakıtlar için her derde deva olarak görülmektedir ve daha kısa zincirli yağ asitlerinin üstünlüğü, dizel yakıt potansiyelleri açısından önemlidir. Mikroalglerden biyodizel, biyometan, biyohidrojen, biyobütanol vb. biyoyakıtlar üretilir. Alg bazlı yakıt kullanımının net sera gazlarının küçük bir kısmıyla sonuçlanacağına (araştırmanın doğrulanması gerekse de) yaygın olarak inanılmaktadır (Bux, 2013; Malcata et al., 2019).

Mikroalglerin biyokütle düzeyindeki potansiyeli şu şekilde özetlenebilir:

- Birçok tür, yüksek tuz konsantrasyonlarındaki suda bile büyür ve su temini ile ilgili sorunları azaltır (Posten and Chen, 2016).
- Birçok tür için karbon akışı, fotosentetik etkinlik kaybı olmaksızın lipidlere veya karbonhidratlara bölünebilir. Spesifik hücre yapısı sayesinde pigmentlerin, yani antioksidanların veya diğer kuvvetli indirgeyici bileşiklerin birikmesi mümkündür. Hücre içi konsantrasyonlar, klasik kara bitkilerinin çok üzerindedir. Aslında, fotosentez her iki durumda da aynıdır, ancak tek hücreli habituslarından dolayı tüm hücrelere besin maddeleri ve CO₂ eşit derecede iyi sağlanabilirken, daha yüksek bitkiler karmaşık makroskopik yapılarından dolayı başka şeylere de yatırım yapar (Posten and Chen, 2016; Posten and Walter, 2012).
- Birkaç günde daha yüksek verimlilik (biyokütle) göstererek, yeni ortamlara ve yüksek lipid içeriğine kolayca adapte edilebilir (Malcata et al., 2019).
- Mikroalglerin, filiz, yapraklar, kök veya gövde kısımları olmadığı için tamamı veya tüm bileşenleri sorunsuz bir şekilde kullanılabilir.
- Farklı mikroalg türleri, ticarileştirme için çok sayıda farklı bileşik içerir ve bu da biyorefineriye karlı hale getirir (Posten and Chen, 2016).

Bolluk açısından en önemli dört alg grubu yeşil algler (Chlorophyceae), diatomlar (Bacillariophyceae), mavi-yeşil algler (Cyanophyceae) ve altın rengi alglerdir (Chrysophyceae). Prokaryotik mikroalg olan siyanobakteriler diğer adıyla mavi-yeşil algler genel olarak *Spirulina* (*Arthrospira platensis* ve *Arthrospira maxima*) ile anılır (Bux, 2013; Kim, 2015). En yaygın ticari olarak kullanılan mikroalg cinsler *Arthrospira* (*Spirulina*), *Chlorella*, *Dunaliella* ve *Haematococcus*'tur. Bağışıklık sistemi güçlendirme, viral enfeksiyonlarda ve

kanser başlangıcında azalma, ön ve probiyotik etkileri, hemogloblin konsantrasyonlarında artış ve kan şekeri seviyelerinde ve bakteri popülasyonlarında azalma gibi faydaları bulunmaktadır. Ek olarak, mikroalgal kaynaklı, omega 3 ve 6 uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) nörolojik ve kardiyak gelişim için kullanılır ve cilt hastalıkları, romatizma, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, kanser ve kolesterol seviyelerinde azalmayı destekler. *Haematococcus pluvialis*, yakın zamanda bir besin takviyesi olarak onaylanan ve suda kültürlenmiş somon balığının kırmızısı pembe etinden sorumlu yem katkı maddesi olan astaksantin pigmentini üretir. Astaksantin alımı, antikor üretimiyle ilişkilendirilmiş olup antitümör ve antiinflamatuvar aktivitesi ile kolon, mesane, karaciğer, meme ve ağız kanserlerinin inhibisyonu; Parkinson ve Alzheimer hastalığı riskinin azalması; ve kardiyovasküler sağlığın gelişmesinde etkilidir. *Astrosphaera* ve *Chlorella*'dan elde edilen ekstratlar kırışıklık azaltmayı destekleyen, tahrişi önleyen, güneşten koruma ve onarıcı etkilerinden dolayı cilt bakım ürünlerinde bulunabilmektedir. Mikroalgler; antibakteriyel, antiviral, antifungal, enzim inhibe edici, immüno-uyarıcı, sitotoksik ve antiplazmodiyal aktivitelere sahip çok çeşitli aktif maddeler üretebilir ve izole edilen maddelerin çoğu poliketid, amid, alkaloid ve peptid gruplarına aittir, bu biyolojik aktivitelerinden dolayı özellikle sağlık alanı olmak üzere birçok alanda ticari değer kazanmaktadır. Mikroalgler gıda endüstrisinde, eczacılıkta, parfüm, ilaç, biyoyüzey aktif maddeler, biyoyakıt, biyoinsektisitlerin üretiminde ve bilimsel araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra biyoremediasyon proseslerinde (atık su arıtımı ve sera gazlarının azaltılması) kullanılabilmektedir (Johansen, 2012; Jacop-Lopez et al., 2020; Levine and Fleurence, 2018).

Nispeten az sayıda mikroalg ticari olarak, genellikle açık havuzlarda yetiştirilir. Açık havuzlarda üretim yapılması durumunda, buharlaşmadan kaynaklanan su kayıplarının yerini alacak su sağlanmalıdır, bu tuzlu su veya deniz suyu olabilir. Daha az ölçüde, kültürler, tamamen kapalı fotobiyoreaktörlerde yetiştirilir. Kapalı fotobiyoreaktörlerde buharlaşma potansiyel olarak önlenabilir. Ayrıca, mikroalgler tüm yıl boyunca hasat edilebilir. Bu, bazı proses mühendisliği ekipmanlarını gerektirir, ancak klasik tarımsal çalışma olmaksızın endüstriyel ölçekte geliştirilebilir. Fotobiyoreaktörlerde yetiştirmenin pahalı olması nedeniyle nispeten küçük üretim hacimlerinde yüksek değerli algler için tercih edilmektedir. Kapalı fotobiyoreaktörlerde kontaminasyonun ve kültür koşullarının daha iyi kontrolü, açık havuzlara kıyasla bunlarda daha geniş bir mikroalg yelpazesinin yetiştirilmesine izin vermektedir (Posten and Walter, 2012; Jacop-Lopez et al., 2020).

Mevcut araştırmalar, su ürünleri yetiştiriciliği, kozmetik, ilaç ve hayvan ve insan beslenmesinde diğer yeni potansiyel biyoteknolojik uygulamaları hedeflemektedir. Gelecekteki araştırmaların, ürün rekabetçiliğini çeşitlendirmek ve ekonomik olarak iyileştirmek için genetik mühendisliği yoluyla mikroalgal suş iyileştirmesine odaklanması öngörülmektedir (Bux, 2013).

2.2. Mikroalg Üretimi

Çoğu mikroalg, kloroplast varlığı sebebiyle fotosentez yoluyla fotoototrofik olarak büyümesine rağmen heterotrofik kültürler de olmak üzere iki ana yetiştirme modu vardır. Fotoototrofik yetiştirme fikri ilk olarak 1940'ların başında karbon ve enerji kaynakları olarak CO₂ ve ışık enerjisi kullanılarak Almanya'da önerilmiştir.

Fotoototrofik yetiştirme kolayca sürdürülebilse de ışığın emilmesi ve saçılması nedeniyle kültürlerin içinde hem ışık yoğunluğu hem de fotosentez verimliliği düşüktür. Bu sebeple alg büyümesi, ışığın bu tür homojen olmayan dağılımı ile büyük ölçüde sınırlandırılır.

Heterotrofik yetiştirme, organizmanın hücre büyümesini ve diğer fizyolojik olayları desteklemek için CO₂ ve ışık yerine karbon ve enerji kaynakları olarak organik karbon maddelerini kullanmasını ifade etmektedir. Işık kısıtlamasının ortadan kalkmasıyla hücreler hızla büyüüp yüksek hücre kitle üretimi kolaylıkla elde edilebilmektedir. Heterotrofik yetiştirmenin yüksek maliyetleri göz önüne alındığında, bu mod genellikle lutein ve astaksantin gibi mikroalglerden katma değerli bileşiklerin üretimi için kullanılmaktadır (Posten ve Chen, 2016).

2.2.1. Besin Ortamı

Fotootrofik mikroalg üretiminde temel gereksinimler, yeterli kültür koşullarının (pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen) sağlanmasına ek olarak besinlerin (karbon, nitrojen, fosfor, vb.) sağlanmasıdır (Jacob-Lopes et al., 2020a).

Farklı mikroalg türlerine göre besin gereksinimleri farklılık gösterebilse de temel gereksinimler aynıdır. Karbon (C), oksijen (O₂), hidrojen(H₂), fosfor(P) ve nitrojen(N₂) anahtar besinlerdir. Besin ortamındaki su (H₂O), H ve O elementlerini sağlayarak bu elementlerin gereksinimini karşılamaktadır. Kültür ortamında bulunan N₂ miktarı, hücre büyümesini doğrudan etkilemektedir. Azot tükenmesi büyümeyi ve biyokütle üretkenliğini azaltabilir, ancak lipidler ve karbonhidratlar üzerinde olumlu bir etkisi vardır.

Mikroalgler; kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), sodyum (Na), potasyum (K), demir (Fe), manganez (Mn), kükürt (S), çinko (Zn), bakır (Cu), kobalt (Co), bor (B) gibi mikrobeseinlere küçük miktarlarda ihtiyaç duymaktadır. Bunlar alg hücrelerinin enzimatik aktivitesi üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Besin ortamının yanı sıra mikroalglerin yetiştirilmesi için uygun ışık ve sıcaklıklar da gerekmektedir (Grobbelaar 2013; Malcata et al., 2019; Gayen et al., 2019).

Makrobeseinler genellikle azot, fosfor ve silikon olarak kabul edilir, ancak silikon sadece diatomlar, silikoflagellatlar ve bazı krizofitler için gereklidir (Andersen, 2005).

2.2.1.1. Nitrojen (N)

Azot, alg kültürlerinin ihtiyaç duyduğu ana besindir. Bazı ortamlarda nitrik asit de kullanılmasına rağmen, nitrojen genellikle nitrat, amonyum veya üre olarak sağlanır. Algler ayrıca bir N-kaynağı olarak nitriti kullanabilir (Luque ve diğerleri 1994). Bu nitrojen kaynaklarının bir kombinasyonu sağlandığında algler genellikle bunları şu sırayla kullanır: amonyum > nitrat > üre. Bununla birlikte, hem nitrat hem de amonyak, optimal laboratuvar kültürü koşulları altında tek N kaynağı olarak sağlandığında benzer büyüme oranlarını destekliyor gibi görünmektedir (Borowitzka et al., 2016; Malcata et al., 2019).

Amonyum genellikle mikroalgler tarafından en hızlı kullanılan N kaynağı olmasına rağmen, muhtemelen metabolizması için daha düşük enerji ihtiyacı nedeniyle, yüksek konsantrasyonlarda amonyum, amonyak (NH₃) türleşmesi nedeniyle çoğu alg türü için öldürücü değilse de zararlıdır. Amonyum (NH₄⁺), sıcaklığa ve pH'a bağlı olarak suda:



reaksiyonu ile amonyak açığa çıkmasına sebep olmaktadır. Amonyak yüksek konsantrasyonlarda algler için toksik olabilen bir maddedir. Farklı alglerin amonyağa duyarlılığında bazı farklılıklar vardır. Alkali pH ve yüksek sıcaklıklar, amonyum yerine yukarıdaki denklemde görüldüğü gibi amonyak oluşumuna yol açar. Yüksek alg fotosentez oranları ortamın alkalileşmesine yol açar ve yüksek konsantrasyonlarda amonyak ile sonuçlanabilir; ancak algler tarafından amonyum alımı ortamın asitleşmesine ve bunlardan herhangi biri alg ölümüne yol açabilir (Borowitzka et al., 2016; Malcata et al., 2019).

Işık, mikroalgler tarafından nitrat ve nitrit alımını uyarır ve etkili nitrat alımı için genel bir CO₂ gereksinimi vardır. Özellikle tatlı su alglerinde nitrat alımı ortamın alkalileşmesine yol açarken, NH₄⁺ alımı asitleşmeye yol açar. Üre alımının ise ortamın pH'ı üzerinde çok az etkisi vardır (Borowitzka et al., 2016; Malcata et al., 2019).

2.2.1.2. Fosfor (P)

Fosfor enerji transferi, nükleik asit sentezi vb. gibi birçok hücresel süreç için gereklidir (Dyhrman 2016). Çoğu mikroalg, organik P kaynaklarının kullanımına izin veren uyarılabilir hücre dışı fosfatazlara sahip olmasına rağmen, mikroalgler için tercih edilen form ortofosfat (PO₄²⁻)'tır. Birçok alg, fazla miktarda P mevcut olduğunda, hücre içinde esas olarak polifosfat gövdeleri şeklinde fazla P biriktirir ve bu depolanan P, herhangi bir geçici P eksikliğini iyileştirebilir. Yüksek fosfat konsantrasyonları alg büyümesini engelleyebilir ve türler arasında yüksek fosfata toleranslarında büyük farklılıklar vardır (Malcata et al., 2019).

2.2.1.3. Silikon (Si)

Ortama silikon ilavesi genellikle yalnızca frustüllerinin(silisten dış iskeletleri) oluşumu için silikon gerektiren diatomların kültürü için gereklidir.

Diatomların silikon gereksinimi türler arasında büyük farklılıklar gösterir. Diatom büyümesi Si açlığı altında nitrojen veya fosfor oluşumuna göre daha hızlı bir şekilde inhibe edilir. Yetersiz Si, DNA sentezinin ve hücre bölünmesinin durmasına ve diatom *Skeletonema costatum* gibi bazı türlerde hücre ölümüne yol açabilir (Borowitzka et al., 2016; Malcata et al., 2019).

2.2.1.4. Demir (Fe)

Demir, tüm alg ortamlarının önemli ve temel bir bileşenidir. Fotosentetik organizmalarda demir bakımından zengin elektron taşıma zincirlerini sürdürmek için gereklidir. Bu nedenle, Fe'yi büyük ölçekli kültürlerle tedarik etmek önemlidir. Çoğu laboratuvar ortamında Fe, demir EDTA, demir sitrat veya demir askorbat gibi şelatlı bir formda sağlanmaktadır. Bununla beraber, bu şelatlı Fe kaynakları pahalıdır ve büyük ölçekli kültürler için Fe sağlamada demir klorür kullanılabilir.

Son zamanlarda demir nanoparçacıklarının mükemmel bir Fe kaynağı olduğu gösterilmiştir, ancak büyük ölçekli kültürlerde kullanımlarının mümkün olup olmadığı henüz belirlenmemiştir. Mikroalgler tarafından Fe alımı aktif bir süreçtir. Mikroalglerin Fe gereksinimleri de türe özgüdür (Marchetti and Maldonado 2016).

Demir algler için gereklidir, aynı zamanda oldukça reaktiftir ve hidroksil radikalleri üreten Fenton reaksiyonu nedeniyle potansiyel olarak toksiktir. Fe kaynağından bağımsız olarak, çok yüksek Fe konsantrasyonları, bununla birlikte, büyümenin azalmasına ve potansiyel olarak hücre ölümüne neden olabilir. Bu nedenle, özellikle ortam geri dönüştürülecekse, alg ortamına Fe ilavesi dikkatli bir şekilde yönetilmelidir (Borowitzka et al., 2016; Huang et al., 2014).

2.2.1.5. İz Elementler

Mikroalglerin yetiştirilmesinde bakır (Cu), selenyum (Se), manganez (Mn), kükürt (S), kobalt (Co), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), sodyum (Na), potasyum (K), nikel (Ni), bor (B), brom (Br), çinko (Zn) gibi bir dizi eser element gerekmektedir. Bu eser elementleri sağlama ihtiyacı, kısmen kültürlerde kullanılan su kaynağının bileşimine bağlıdır. Örneğin, deniz suyu kullanılıyorsa, genellikle büyük ölçekli kültürlerle ek eser elementler sağlamaya gerek yoktur. Bununla birlikte, kullanılan tatlı su kaynağına bağlı olarak, tatlı su alg kültürlerinin belirli eser elementlerle desteklenmesi gerekebilir. Ancak ortam geri dönüştürülürse (veya çok yüksek yoğunluklu kültürlerde) bazı eser elementler büyüme için sınırlayıcı bir faktör olabilir. Örneğin, N kaynağı olarak üre kullanıldığında, üreaz enziminin çalışması için Ni gereklidir. Benzer şekilde Zn, karbonik anhidraz için bir kofaktördür (Moroney et al., 2001; Borowitzka et al., 2016).

2.2.1.6. Vitaminler

Kültürlenmiş mikroalg türleri için genellikle üç vitamin – B12 vitamini (siyanokobalamin), tiamin ve biyotin – kullanılır, ancak çok az alg üç vitaminin hepsine ihtiyaç duymaktadır. Mikroalg türlerinin %50'den fazlası eksojen B12

vitamini (kobalamin), %20'den fazlası B1 vitamini (tiamin) ve sadece yaklaşık %5'i B7 vitamini (biyotin) gereksinimleri bulunmaktadır (Croft et al., 2006).

Dunaliella salina, *Haematococcus pluvialis* ve *Chlorella sp.* gibi şu anda geniş çapta kültürü yapılan türlerin çoğu vitamin gereksinimine sahip değildir; bununla birlikte, kültürlenecek türler genişledikçe, ek vitaminlerin sağlanmasının yeniden gözden geçirilmesi gerekebilir. Ancak bu gereksinim potansiyel olarak aksanik olmayan alg kültürlerinde vitamin gereksinimlerini karşılayabilen ilişkili heterotrofik bakteriler tarafından karşılanabilmektedir. Yine de vitaminlerin çok yüksek yoğunluklu kültürlerde sınırlayıcı hale gelmesi mümkündür.

Vitaminler, ortam otoklavlandıktan sonra aseptik olarak (0,2 mm'lik bir filtreden) eklenir. Vitaminler, otoklavlanmak yerine filtreyle sterilize edilirse (0,2 mm filtrasyon) maksimum etki korunmaktadır. Otoklavlama bazı vitaminlerin bozunmasına neden olabilir, ancak bazı alglerin bu bozunma ürünlerinden bazılarını kullanabileceği düşünülmektedir (Borowitzka et al., 2016; Andersen, 2005).

2.2.2. Kültür Koşulları

2.2.2.1. Işık

Işık, fotosentez reaksiyonunun itici gücüdür, bu nedenle mikroalg kültürlerinde fotosentez hızını ve nihayetinde genel biyokütle üretkenliğini belirleyen ana ve sınırlayıcı faktördür. Işık, fotosentezde inorganik maddeleri organik bileşenlere dönüştürmek için kullanılır, dolayısıyla bu süreç ve mikroalg biyokütlesinin genel metabolizması ve büyümesi için enerji kaynağıdır (Pulz, 2001).

Açık havuzlarda veya kapalı fotobiyoreaktörlerde açık havada büyüyen alg kültürleri, gün boyunca ve mevsime göre değişen çok yüksek ışınımlara maruz kalırlar. Işınımdaki günlük değişimin yanı sıra, bulutlar nedeniyle ve açık havuzlarda, her ikisi de güneş açısına göre değişen yüzey dalgaları tarafından ışığın yansması ve odaklanması nedeniyle daha kısa vadeli farklılıklar da vardır. Kültürlerin hücre yoğunluğunun, alg hücrelerinin yaşadığı ışık ortamı üzerinde büyük bir etkisi vardır. Genellikle sığ havuzlarda ve fotobiyoreaktörlerde kullanılan yoğun kültürlerde, ışınım kültürün yüzeyinden hızla azalır, böylece kültürün daha derinlerindeki hücreler aslında karanlıkta olabilir (Pulz, 2001).

Karıştırma, alg hücrelerini bu karanlık/düşük ışıklı bölgelerden yüksek ışıklı yüzey katmanına dolaştırır, böylece hücreler, frekansı reaktör tipi (havuz, düz plaka, boru şeklinde) tarafından belirlenen değişken bir açık/karanlık desene maruz kalır.

Mikroalglerin fotosentetik aktivitesi, üç farklı bölgede ışık yoğunluğuna tepki olarak değişir. Düşük ışık yoğunluklarında, hücreler ışıkla sınırlıdır ve artan ışığa ile fotosentetik hız artar. Hücreler ışığa doymuş hale geldiklerinde, foton absorpsiyon hızı, Fotosistem II'deki (PS II) elektron devir hızını aşar ve artan ışık yoğunluğu ile fotosentetik oranda daha fazla artış olmaz. Işınım belirli bir noktanın

üzerine çıktığında, hücreler fotosentetik aparatın zarar görmesi nedeniyle foto-engellenir ve fotosentetik hız, ışımanın daha da artmasıyla azalır. Fotoinhibisyon hızla gerçekleşir; geri dönüşü olmayan yıkım birkaç dakika içinde meydana gelebilir ve 10 ile 20 dakika sonra %50'yi aşan hasar meydana gelebilir (Pulz, 2001; Jacob-Lopes et al., 2020a).

Yüksek ışınım altında (örneğin gün ortası güneş ışığı) yoğun alg kültürlerinde, kültür yüzeyindeki aydınlatmanın foto-inhibisyonu indüklemek için yeterli olması muhtemeldir, yüzeyin birkaç santimetre altında ise büyüme için yetersiz olacaktır. Bir reaktör içindeki tek bir hücre tarafından deneyimlenen ışık koşulları sürekli değişmektedir:

- Kültür derinliği veya optik kesit (kültür kabı ne kadar derin veya genişse, hücreler düşük ışık koşullarında o kadar uzun süre harcar)
- Biyokütle konsantrasyonu veya alan yoğunluğu
- Karıştırmanın neden olduğu türbülans hücreler fotik hacme girip çıktıkça açık-karanlık döngüsünü etkiler.(Grobbelaar, 2009; Bux, 2013).

2.2.2.2. Sıcaklık

Sıcaklık, tüm metabolik süreçleri etkiler ve belirli bir alg türünün sıcaklık optimumunun bir kültürün ulaşılabilir üretkenliği üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. Algler, optimum sıcaklıkta olduklarında, mevcut ışığı daha iyi kullanabilirler ve önemli ölçüde fotoinhibisyona uğrama olasılıkları daha düşüktür. Optimal değer altında mikroalglerin performansı yaklaşık olarak her 10 derecede bir yarı yarıya azalmaktadır. (Bernard and Rémond 2012).

Mikroalgler için optimal büyüme sıcaklığı türe özgü olup genellikle 20°C - 30°C aralığında değişmektedir. Ilık koşulları destekleyen suşlar için, 30–35°C optimum sıcaklıklar ve sırasıyla 7–10°C ve 40–45°C minimum ve maksimum sıcaklık değerleri bildirilmiştir. Bununla birlikte, soğuk koşullara adapte edilmiş suşlar söz konusu olduğunda, sırasıyla 18–20°C'lik optimum sıcaklıklar ve 2–5°C ve 25–30°C'lik minimum ve maksimum sıcaklık değerleri bulunmaktadır. (Grimaud et al. , 2014).

Birçok alg türü, düşük büyüme oranlarıyla optimum değerlerinden 15°C'ye kadar daha düşük sıcaklıkları tolere edebilir, ancak optimumdan sadece birkaç derece daha yüksek bir sıcaklık hücre ölümüne yol açabilmektedir (Mata et al., 2010).

2.2.2.3. Tuzluluk, Ozmoregülasyon ve Uyumlu Çözeltiler

Doğada, mikroalgler, tatlı sudan aşırı tuzlu göllere kadar değişen tuzluluktaki sularda büyüebilmektedir. Tek bir tür tarafından tolere edilen tuzluluk aralığı, ozmoregülatör sisteminin bir fonksiyonudur ve alglerin kullandığı ozmoregülatör çözünen(ler)in tipine bağlıdır. Hem organik hem de inorganik çözünenler ozmoregülasyonda rol oynar ve genellikle algler ozmoregülasyonda çözünenlerin bir kombinasyonunu kullanır. Ozmoregülatör çözünenler, hücre zarının su

geçirgenliğine rağmen hücreye veya hücreden net su akışının olmadığı sabit bir durumda metabolik işlemler için su mevcudiyetini korumaya hizmet eder. Bu çözünenler belirli özelliklere sahiptir:

- Osmoregülasyonda genellikle yüksek konsantrasyonlar gerektiğinden yüksek oranda çözünür olmalıdırlar. Örneğin K^+ ve Na^+ nispeten çözünürdür. Organik osmoregülatör çözünen maddeler arasında gliserol asla kristalleşmediği için 'sonsuz' çözünürlüğe sahiptir.

- Yüklü çözünen maddenin yüksek konsantrasyonları hücrede bir yük dengesi sorunu oluşturacağından, çözünen maddeler fizyolojik pH'da yüksüz olmalıdır. Birikmiş inorganik iyonlar, makromoleküller üzerindeki yükler ve karşı iyonlar tarafından uygun şekilde dengelenmelidir.

- Çözünenler, plazma zarı boyunca büyük konsantrasyon gradyanlarına karşı tutulmalıdır ve bu tutulma, pasif ve/veya aktif süreçlerin sonucu olabilir.

- Çözünenler 'uyumlu' olmalıdır, yani yüksek konsantrasyonlarda enzim ve zara bağlı süreçlerin minimal inhibisyonuna neden olmaları gerekir. Bazı uyumlu çözünenler aslında enzim aktivitesi ve fotosistem II kompleksi üzerinde stabilize edici bir etkiye sahiptir.

Büyük ölçekli kültürlerde, özellikle açık hava kültürlerinde, ortam geri dönüştürüldüğünde buharlaşma, yağış ve/veya tuz birikimi nedeniyle ortamın tuzluluğu değişecektir. Bu nedenle, bu kültürlerde yüksek üretkenliği sürdürmek için değişen tuzluluk koşullarına bir dereceye kadar tolerans bulunması istenmektedir. Buharlaşma havuzlarda tuzluluğun artmasına neden olduğu için tuzluluk toleransı çok geniştir. Büyük ölçekli kültürler için özellikle ilgi çekici olan birkaç mikroalg türü geniş bir tuzluluk toleransına sahiptir ve büyüme hızları tuzluluktaki büyük değişikliklerden çok az etkilenmektedir (Borowitzka et al., 2016).

2.2.2.4. pH/CO₂

pH, herhangi bir mikroalg suşunun performansını belirleyen diğer ilgili faktördür. pH'ın çift etkisi vardır. Yalnızca hücrelerin fizyolojik durumunu etkilemekle kalmaz, aynı zamanda kültürde CO₂ mevcudiyetini de belirler. Mikroalg alanında, pH'ı kontrol etmek ve büyüme için hücrelerin ihtiyaç duyduğu inorganik karbon için kültür ortamına CO₂ sağlanmaktadır (Godos et al., 2014).

Bazı suşların 3'ün altındaki aşırı asidik koşullar altında veya 10'un üzerindeki alkali koşullar altında büyüyebildiği bilinse de, çoğu mikroalg suşu için optimal pH aralığı nötre yakındır. Farklı suşlar için minimum, optimum ve maksimum değer aralıklarının sırasıyla 4-5, 7-8 ve 9-10 olduğu bildirilmiştir (Jacob-Lopes et al., 2020).

2.2.2.5. O₂

Çözünmüş oksijen konsantrasyonu, mikroalg hücrelerinin performansını etkileyen bir diğer ilgili faktördür. Hava ile dengede bulunan çözünmüş oksijen

konsantrasyonu, ortam koşullarında sırasıyla tatlı su ve deniz suyu için 8 ila 9 mg/L arasında değişen kültür ortamının sıcaklığı ve iyonik kuvveti ile belirlenmektedir, ancak fotosentez sırasında oksijen üretilir ve bu oksijeni uzaklaştırmak için yeterli mekanizmalar uygulanmazsa kültür ortamında birikir. Çözünmüş oksijenin fazlası, ürünün inhibisyonuna neden olarak fotosentez işleminin etkinliğini azaltır (Jacob-Lopes et al., 2020a).

2.2.3. Üretim Yöntemleri

Mikroalgal biyokütlenin kültivasyonu kesikli, yarı kesikli veya sürekli üretim modlarında gerçekleştirilebilmektedir:

2.2.3.1. Kesikli (Batch) Üretim Modu

Kanal ya da reaktör besleyici ortamla doldurulur ve istenen alg türü büyüyen bir kültürle aşılır. İnokulumun hacmi genellikle kanal içindeki ortamın hacminin %10'udur. Besin ortamı ve mikroalg aşılması tamamlandıktan sonra üretim bitene kadar ortama bir girdi ya da ortamdaki bir çıktı olmamaktadır. Kesikli kültürlerde meydana gelen kültür ortamının besin maddesi konsantrasyonundaki ve fizikokimyasal koşullarındaki değişiklik, hücre konsantrasyonunun artmasıyla biyokütleyi ışıktaki değişiklikler gibi farklı koşullara maruz bırakır. Ancak kesikli kültürler, aseptik koşullar altında olduklarından diğer organizmalar tarafından kontaminasyona karşı daha az hassastır (Johansen, 2012; Posten and Walter, 2012).

2.2.3.2. Yarı Kesikli Üretim Modu

Ardışık biyokütle gruplarının toplandığı ve ortamın değiştirildiği tekrarlanan kesikli kültür, yarı kesikli mod olarak adlandırılmaktadır. Hücreler, basit kesikli ekime göre reaktörde daha uzun süre kalabilir ve besin konsantrasyonları kontrol edilebilir. Yarı kesikli yetiştirmede kinetiği etkileyen ana parametreler, her ikisi de çeşitli çalışmaların konusu olan kesme konsantrasyonu ve taze ortamın değiştirilme hızıdır (Johansen, 2012).

2.2.3.3. Sürekli Üretim Modu

Sürekli kültürlerde, çekildiği hızda sürekli olarak taze bir ortam kaynağı eklenir. Prensip, bu teknik kültürlerin süresiz olarak üstel büyümede kalmasına izin verir. Sürekli bir kültürdeki hücrelerin kararlı durum konsantrasyonu, ya tek bir sınırlayıcı besinin (kemostatlar) konsantrasyonu ile ya da belirli bir hücre yoğunluğunu koruyan bir seyreltme oranının seçimi ile belirlenebilir.

Mikroalglerin sürekli olarak yetiştirilmesi için, diğer yetiştirme yöntemlerine göre daha fazla ekipman ve kontrole sahip tesisler gereklidir, ancak sabit koşulların ve yüksek büyüme oranlarına sahip hücrelerin korunması, bu sistemin sıklıkla kullanıldığını göstermektedir (Johansen, 2012; Andersen, 2005).

2.2.4. Üretim Sistemleri

Mikroalglerin ekonomik ve çevresel olarak uygun ticari ölçekte üretimine ulaşmanın en önemli faktörlerinden biri uygun maliyetli, sürdürülebilir kültür sistemlerinin geliştirilmesidir. Yetiştirme sisteminin tasarımı, hücrelerin yaşadığı çevresel koşulları etkiler ve bu da üretkenliği belirler (Greenwell et al., 2010).

Herhangi bir mikroalg bazlı ürünün sanayileşmesi, açık (havuzlar ve varyasyonları) veya kapalı sistemlerde (fotobiyoreaktörler ve heterotrofik/miksotrofik biyoreaktörler) yapılabilen büyük ölçekli üretim gerektirir.

Pigment üretimi için ticari mikroalg biyokütle ekimi ile ilgili olarak, en yaygın kültür sistemleri türleri, açık kanallar, sığ havuzlar ve boru şeklindeki fotobiyoreaktörlerdir.

➤ Açık sistemler, özellikle kanal havuzları, dünya çapında ticari üretimin %90'ından fazlasında kullanılan baskın tiplerdir. Bu, açık sistemlerin kapalı sistemlerden çok daha ucuz ve işletilmesinin daha kolay olması ve inşaat maliyetinin kapalı sistemlerden daha düşük olmasıyla ilişkilidir. Olumsuz tarafları ise, açık sistemlerin iklim koşullarına ve coğrafi konuma bağımlılık, kirlenme, buharlaşma ve geniş arazi gereksinimleri gibi bazı sorunlarının bulunmasıdır. Yetiştirme koşullarının ve kontaminasyonun sınırlı kontrolü nedeniyle, açık sistemlerin kullanımı, hızlı veya çok seçici koşullar altında büyüyen sağlam mikroalg türleri ile sınırlıdır. Bu sınırlamaları ortadan kaldırmak için, düşük kontaminasyon riski ile hassas kontrollü koşullar altında çok daha geniş bir suş seçiminin büyümesini destekleyen kapalı fotobiyoreaktörler (PBR'ler) geliştirilmiştir. PBR'lerin en büyük dezavantajları, yüksek inşaat ve işletme maliyeti, ölçek büyütme zorluğu ve yüksek kesme gerilimi ile ilgilidir (Chang et al., 2017; Maroneze and Queiroz 2018).

Ticari üretim için kültür sistemi ve kültür modu seçimi, birkaç faktöre bağlıdır:

- kültürün güvenilirliği;
- istenen ürünün tipi ve kalitesi; ve
- işletme ve sermaye maliyetleri (Chang et al., 2017; Maroneze and Queiroz 2018).

Dikkate alınması gereken ilk kriter, garantili bir biyokütle kaynağı anlamına gelen kültürün güvenilirliğidir. Güvenilirliği sağlamak için, mikroalgal suşlar:

- büyüme koşullarında (ışık ve sıcaklık) hızlı büyüme;
- geniş sıcaklık ve ışınım toleransı;
- yüksek kesme ve oksijen toleransı; ve

➤ kontaminasyon olasılığını azaltmak için seçici bir ortamda (örneğin, yüksek tuzluluk veya yüksek pH) büyüme gereklidir (Borowitzka 2018; Jacob-Lopes et al., 2020b)

Ticari alg yetiştirme sistemlerinin tasarımında amaç aşağıdakilere ulaşmaktır:

- Optimum hacimsel ve/veya alansal üretkenlik
- Işık enerjisinin ürüne verimli dönüşümü
- Üretimin tutarlılığı ve güvenilirliği
- Maliyet etkinliği (Bux, 2013).

Açık ve kapalı sistemler karşılaştırılmalı olarak Tablo 2.1’de verilmiştir (Gayen et al., 2019).

Tablo 2.1. Açık ve Kapalı sistemlerin karşılaştırılması

	Kapalı Sistem	Açık Sistem
Kontaminasyon kontrolü	Kolay	Zor
Alan/hacim oranı	Yüksek	Düşük
Kültür yoğunluğu	Yüksek	Düşük
Proses kontrolü	Kolay	Zor
Yatırım	Yüksek	Düşük
Operasyon maliyeti	Yüksek	Düşük
Ölçek büyütme	Zor	Kolay
Işık verimliliği	Mükemmel	Zayıf

2.2.4.1. Açık Sistemler

Tarihsel olarak, ticari üretimin büyük çoğunluğu havuzlar ve lagünler gibi dairesel veya kanal tasarımlı olabilen açık hava sistemlerinde gerçekleşmektedir ve bunlar hala endüstriyel mikroalgal proseslerde en yaygın olarak uygulanan reaktör sistemidir.

Açık sistemlerde büyüme üzerindeki ana kısıtlamalar, kontaminasyonu kontrol etmenin imkansız olması, kültür ortamını sabit tutmanın zor olması ve seyreltik biyokütleyi hasat etmenin pahalı olmasıdır (Carvalho et al., 2006). Açık sistemlerde bir monokültürü sürdürmek, istenen türün baskınlığını garanti etmek için oldukça seçici kültür koşulları gereklidir. Bu nedenle, aşırı koşulları tolere edebilen sınırlı sayıda tür (örneğin, yüksek pH’da büyüyen *Spirulina* ve yüksek tuz

konsantrasyonları gerektiren *Dunaliella*) başarıyla büyütülmektedir (Johansen, 2012; Bux, 2013).

Açık Kanallar

Mikroalg üretimi için açık kanallar veya sığ karışık havuzlar, 1950'lerde ve 1960'ların başında Oswald (Oswald and Golueke, 1968; Oswald, 1988) tarafından tanıtılmış ve büyük mikroalgal üretimi için sığ kanatlı karıştırılmalı kanalların tasarımı ve yapımına ilişkin ilkeler gözden geçirilmiştir.

Uygun bir alt kaplama ve duvar konstrüksiyonu seçimi, bir kanal havuzunun başarısı için önemli faktörlerdir. Kaplama betondan, plastik veya kauçuk malzemeden yapılmış olabilir. Ticari havuzların boyutu 1.000 ila 5.000 m² arasında değişmekte olup, karıştırma havuz başına bir veya iki çark kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yavaş bir hızda (örneğin 10 rpm) dönen büyük çaplı bir tekerlek (yaklaşık 2,0 m çapında), daha hızlı dönen daha küçük çaplı tekerleklere göre tercih edilir, çünkü ikincisi aşırı kesme hasarı ve köpük üretir (Posten and Walter, 2012).

Kanal havuzları şu anda dünya çapında mikroalg üretimi için en geniş reaktörlerdir ve küresel üretimin %90'ından fazlası, düşük maliyeti nedeniyle bu reaktörler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Jacob-Lopes et al., 2020a). Açık sistemlerin örnekleri şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Doğal Sular

Açık sistemler, ilgilenilen mikroalglerin büyümesinin ya doğal olarak meydana geldiği ya da besinlerin eklenmesiyle teşvik edildiği doğal suları, gölleri ve barajları içerir. Hasat yerinde yapılır; örneğin, *Spirulina* ticari olarak Meksika'daki Texcoco Gölü'nden hasat edilir. Doğal olarak hasat edilen mikroalgler yetiştirmede çok az maliyete sahip olsa da, üretkenlik ve ürün kalitesi (biyolojik ve toksikolojik olarak) garanti edilemez (Lee, 2001; Bux, 2013).

Dairesel Havuzlar

Mikroalglerin ilk toplu kültürü dairesel havuzlarda gerçekleştirilmiştir. Genellikle basit, yuvarlak, beton havuzlar veya bentlerdir, havuzun ortasına sabitlenmiş dönen dairesel bir kolla veya elle karıştırılırlar. Havuzun boyutu, dönen motora karşı su direncinin gerilimi ile sınırlıdır. Bildirilen en büyük gölet 50 m çapındadır. *Chlorella* üretimi için Japonya, Tayvan, Endonezya ve Ukrayna'da yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Lee, 2001; Pulz, 2001; Bux, 2013).



Şekil 2.1. Açık sistemler (Jacob-Lopes et al., 2020a)

2.2.4.2. Kapalı Sistemler

İnşa edilmesi ve çalıştırılması açık sistemlerden daha pahalı olmasına rağmen, artan verim vaadi ve daha geniş tür yelpazesi yetiştirme olasılığı, kapalı reaktörlere önemli ilgi gösterilmesine neden olmuştur. Kapalı sistemlerde kontaminasyonu ve çevresel parametreleri kontrol etmek çok daha kolaydır, bu da daha hassas suşların yetiştirilmesine ve potansiyel ürün yelpazesinin genişletilmesine olanak tanımaktadır. (Carvalho et al., 2006).

Düz Panel Fotobiyoreaktörler

Düz panel fotobiyoreaktörler (Şekil 2.2.), mikroalgal süspansiyonun her iki taraftan aydınlatıldığı ve havalandırma ile karıştırıldığı dikey olarak yarı saydam iki paralel düz panelden oluşmaktadır (Posten and Walter, 2012). Panelin yüksekliği normalde 1,8 m'den daha düşüktür, uzunluğu ise teorik olarak sınırsız olabilir, ancak 20 m'nin altındaki tasarımlar önerilmiştir. Bu tip reaktörün tasarımında anahtar faktör panelin genişliğidir; kültür içindeki ortalama ışımayı ve biyokütle üretkenliğini maksimize etmek için 0,03 ila 0,10m arasında değişen dar paneller tercih edilir (Tredici et al., 2015).



Şekil 2.2. Düz Panel Fotobiyoreaktör (Sevilla, İspanya) (Posten and Walter, 2012)

Düz panel fotobiyoreaktörler, reaktörün yüzeyine su püskürtülerek soğutulabilir, ancak bunlar dahili ısı eşanjörleri kullanılarak da kontrol edilebilmektedir. Bu tip fotobiyoreaktörle ilgili başlıca problemler, biyo-kirlenme fenomeninin varlığını, biyokütlenin reaktörün duvarına bağlanmasını, ardından kültür içindeki ışık mevcudiyetini azaltmasını ve son olarak kültürün çökmesini içerir. Reaktörleri inşa etmek için tek kullanımlık malzemeler kullanılarak biyolojik kirlilik ve dış mekan kontaminasyonu risklerinin üstesinden gelinebilir ve bu da

önemli bir maliyet düşüşü sağlar. Reaktör tasarımı, nispeten ince bir dikey paneli çevreleyen iki sert çerçeve arasında bulunan esnek şeffaf bir plastik torbadan oluşur (Jacob-Lopes et al., 2020a).

Alveolar panel, temel düz plaka tasarımında umut verici bir değişikliktir. Alveolar reaktörler, yapısal sertlik sağlayan ve kültür ortamının verimli akışını sağlayan bir dizi dahili kanala (veya alveollere) bölünmüş düz panellere sahiptir (Greenwell et al., 2010). Duvarlar polikarbonat, PVC veya polimetil metakrilattan yapılmıştır. Kültürün üst kümede sirküle edildiği ve alt kümenin sıcaklığı kontrol etmek için bir termostat görevi gördüğü, yatay olarak yerleştirilmiş çift set alveolar paneller kullanılmaktadır. Alveolar paneller de her kanalın altından hava köpürecek şekilde dikey olarak yerleştirilmiştir. (Posten and Walter, 2012; Bux, 2013).

Düz panellerin avantajları arasında, kültür koşullarını kontrol etme, böylece kontaminasyon problemlerini önleme ve güneş ışınımını arazi birimi başına geniş bir yüzeye dağıtarak reaktör yüzeyindeki ışımayı optimize etme ihtimali yer almaktadır. Düz panel fotobiyoreaktörler, güneş enerjisi yakalamayı optimize etmek için dikey veya eğimli olarak kurulabilir. Bu reaktörler, tesadüfi güneş ışığından emilen enerji açısından daha iyi verimliliğe izin vererek güneşe doğru yönlendirilebilir (Carvalho et al., 2006). CO₂ ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları yeterli düzeydedir. Bunlarla beraber, ince fotobiyoreaktörlerin inşası çok daha pahalıdır, temizlenmesi daha zordur ve daha kolay ışık inhibisyonuna ve sıcaklık dalgalanmasına maruz kalır (Wang et al., 2012).

Tubuler Fotobiyoreaktörler (Borulu Fotobiyoreaktörler)

Borulu fotobiyoreaktörler (Şekil 2.3.), özellikle kanal havuzlarında üretimlerini tolere etmeyen duyarlı suşların üretimini içerdiğinde, yüksek değerli uygulamalar için yüksek kaliteli biyokütle üretiminde önerilen teknolojidir. Açık sistemlerden farklı olarak, boru şeklindeki fotobiyoreaktörler, yetiştirme koşullarının daha fazla kontrolüne izin verir, kontaminasyon olasılığı daha düşüktür.



Şekil 2.3. Tubuler/borulu fotobiyoreaktör (Jacob-Lopes et al., 2020a)

Yakın zamanda kurulan boru şeklindeki fotobiyoreaktörlerde mikroalg üreten tesisler Almanya, Fransa, Portekiz, İspanya, Amerika Birleşik Devletleri, İsrail ve Çin gibi ülkelerde bulunmaktadır.

Tübüler fotobiyoreaktörlerin en büyük avantajı, bu sistemlerde daha yüksek biyokütle konsantrasyonlarında çalışarak, kültür parametrelerinin kontrolünü artırarak biyokütle üretmenin güvenilirliğidir (Jacob-Lopes et al., 2020a, Jacob-Lopes et al., 2020b).

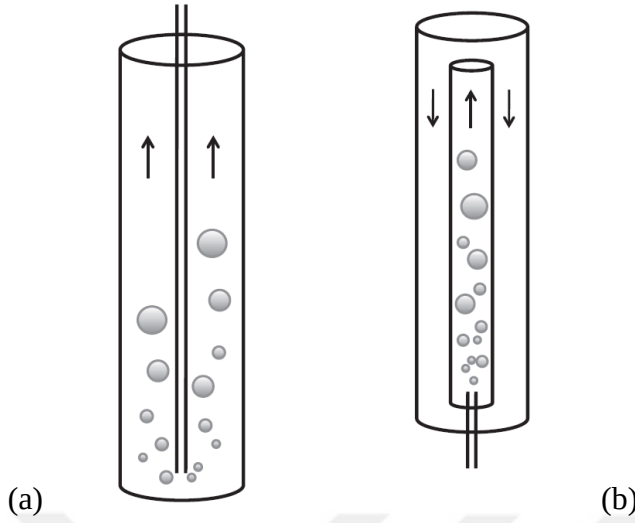
Tüpler genellikle polietilen veya camdan üretilir. Yapı malzemesi için en önemli kriterler şeffaflık, iyi ışık geçişine izin verme ve düşük maliyettir. Ek zorluklar arasında foto-engelleme, sıcaklık kontrolü ve tüp duvarlarının içine yapışan hücreler nedeniyle ışık penetrasyonunun azalmasına neden olan kirlenme yer alır. Dar çaplı boruların temizlenmesi zor olabilir (Ugwu et al., 2008).

Çoğu boru şeklindeki reaktörler üç tipten birine kategorize edilebilir:

1. Alttan gaz püskürtülmesiyle karıştırılmış şeffaf bir dikey tüpten oluşan dikey hava asansörleri veya kabarcık sütunları
2. Genellikle bir gaz transfer sistemine bağlı, yatay olarak uzanan veya istiflenmiş şeffaf, ince çaplı borulara sahip yatay boru sistemleri
3. Dairesel bir çerçevenin etrafına sarılmış ince, esnek borulardan oluşan sarmal boru şeklindeki reaktörler

Hava kaldırma ve kabarcık kolon reaktörleri (Şekil 2.4 a ve b) dikey borulu reaktörlerin örnekleridir. Hava veya CO₂ ile zenginleştirilmiş hava, reaktör boyunca verimli karıştırma ve gaz transferi sağlayarak tabana kabarcıklanır. Kabarcık kolonlu reaktörün en basit şekli asılı bir polietilen torbadır ve bunlar sıklıkla düşük maliyetli bir seçenek olarak kullanılmıştır. Plastik poşetler yüksek şeffaflığa, başlangıçta iyi steriliteye sahiptir ve kolayca değiştirilebilir.

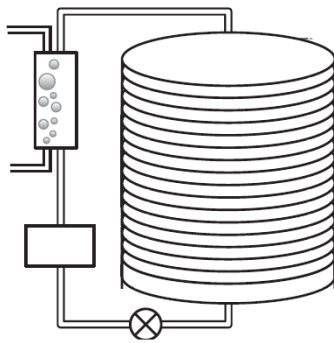
Dikey reaktörler kompakttır, düşük maliyetlidir ve temizlenmesi ve steril tutulması kolaydır; ancak boyutları yüzey-hacim oranı ile sınırlıdır. Herhangi bir tankın, konteynırın veya asılı torbanın ölçeğinin büyütülmesi, 50 ila 100 L arasındaki bir hacimde ışık penetrasyonu ile sınırlanır. Su altı aydınlatması, dalgıç lambalar veya güneş ışığını yeniden yönlendiren optik fiberler şeklinde düşünülmüştür, ancak bunlar ek olarak sistemin maliyet ve enerji ayak izine bağlıdır. Ek olarak reaktörlerin dikey açısı, gelen güneş ışığını yakalamak için ideal değildir (Carvalho et al., 2006; Pulz, 2001).



Şekil 2.4. Kabarcık kolon (a) ve hava kaldırmalı reaktör (b) (Bux, 2013)

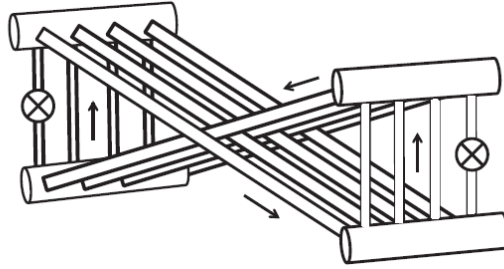
Yatay borulu reaktörler, güneş ışığına olan açıyı artırarak ışık yakalamayı optimize etmek için tasarlanmıştır. İç boru çapları 1,2 ile 13 cm arasında değişmektedir. Güneş kollektöründe kullanılan boru ne kadar ince olursa, ışık yakalama o kadar verimli olur, ancak boru uzunluğu başına kültür hacmi o kadar düşük olur. İnce borular ayrıca aşırı ısınmaya karşı özellikle hassastır ve buharlaşmalı su soğutması (genellikle büyük hacimlerde su gerektirir), boruları suya daldırmak veya boruları örterek veya üst üste bindirerek gölgelendirmek gibi sıcaklık düzenleme mekanizmaları kurulmalıdır. Yatay reaktörlerin en büyük dezavantajlarından biri, yatay boru tesisatı için gereken geniş arazi alanıdır. Açık havuzlara göre artan verimlilik, daha büyük bir arazi alanı gerekiyorsa maliyet etkin olmayabilir (Carvalho et al., 2006).

Helisel borulu reaktörler (Şekil 2.5), gerekli arazi alanını azalttıkları için yatay borulu reaktörlere umut verici bir alternatiftir. Dikey olarak genişleyerek, reaktörün kapladığı alan küçülür, bununla beraber güneş ışığına olan açısı da azalır. Bobinin ortasına bir ışık yerleştirmek, ışık penetrasyonunu iyileştirebilir. Bobinin açısı ve yüksekliği tanımlandığı için ölçek büyütme sınırlıdır.



Şekil 2.5. Helisel borulu reaktör (Bux, 2013)

İlginç bir alternatif tüp düzeni sunan α -şekilli bir reaktör (şekil 2.6); simetrik tasarım, kültürü havalandırmak ve her iki uçtaki dikey tüplerde karıştırmak için hava kaldırma pompalarını kullanır. Bu daha sonra tüpleri 45° açıyla akar, böylece yerden tasarruf ederken tüplerin güneş ışığına açısını en üst düzeye çıkarır. İki CO_2 enjeksiyon noktası ile tüm sistem boyunca akış aynı yönde olduğundan, nispeten düşük hava besleme hızları ile yüksek sıvı akışı ve kütle aktarım hızları korunabilir (Lee et al., 1995; Bux, 2013).



Şekil 2.6. α -şekilli reaktör (Bux, 2013)

Karıştırmalı Tank Reaktörler

Fotosentetik olmayan mikroorganizmaların kültivasyonu için heterotrofik fermenterler rutin olarak kullanılır, özellikle ince kimyasallar ve farmasötikler gibi yüksek değerli ürünlerin eldesinde mikroalg üretimi için kullanılmıştır (Mata et al., 2010). Karıştırılan bir tankın alan-hacim oranı düşüktür; bu nedenle, bir tür iç aydınlatma (örneğin, optik fiberler aracılığıyla yönlendirilen yapay aydınlatma veya güneş ışığı) gereklidir. Bazı algler, glikoz, asetat veya pepton gibi organik substratlar üzerinde mikсотrofik veya heterotrofik olarak büyüebilir. Bu durumda, karbon ve enerjinin bir kısmı veya tamamı organik substrat tarafından sağlanır, böylece büyüme hızının ışık ve CO_2 sağlanmasına bağımlılığını azaltır. Mikсотrofik büyüme oranları (hücrelerin hem hafif hem de organik substratları kullandığı durumlarda) genellikle tamamen fotoototrofik veya heterotrofik olandan (örneğin, *Chlorella* ve *Haematococcus*) daha yüksektir.

Karıştırmalı tank reaktörlerinin başlıca avantajları, işletim parametreleri üzerinde hassas kontrol, steriliteyi koruma yeteneğidir. Kültürlerin sterilitesini korumak, farmasötikler gibi belirli yüksek değerli metabolitlerin üretimi için çok önemlidir. Ortama organik bir substrat eklendiğinde, bakteriler çözünmüş besinler için alglerle kolayca rekabet ettiğinden sterilite önceliklidir (Lee, 2001).

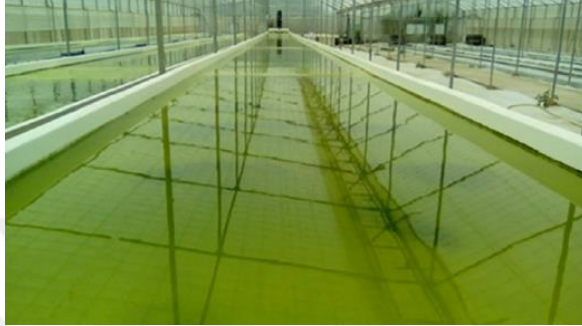
Titreşimli Akış Biyoreaktörler

Titreşimli akış biyoreaktörleri, boru şeklinde bir reaktörde eşit aralıklı orifis plaka bölmeleri içerir. Bu reaktör, akışkanın net akışına uygulanan salınım hareketi nedeniyle ısı ve kütle transferini iyileştirmektedir. Düşük uzunluk-çap oranlarında uzun kalma süreleri ile sonuçlanır. Dolayısıyla bu reaktör tasarımı, azalan pompalama gereksinimleri nedeniyle alg kültürlerini karıştırmak için gereken enerjiyi azaltma potansiyeline sahiptir ve ayrıca sermaye maliyetlerinin düşmesini sağlamaktadır (Harvey et al., 2003; Bux, 2013).

İnce Tabaka Fotobiyoreaktörler

İnce tabaka reaktörlerin (Şekil 2.7) tasarımı, boru şeklindeki fotobiyoreaktörlere benzer çünkü aynı zamanda üç ana bölüme ayrılabilir:

- fotosentezin gerçekleştirildiği yüzey veya döngü;
- kültürün yönetildiği tutma tankı (gaz giderici); ve
- kültürü tanktan yüzeye yeniden sirküle etmek için kullanılan pompa.



Şekil 2.7. İnce Tabaka Fotobiyoreaktörler (Jacob-Lopes et al., 2020a)

Bu tip reaktörün en büyük avantajı, 1,0 cm'nin altı dahil olmak üzere su derinliğini en aza indirebilmek, böylece hücrelerin maruz kaldığı ışık mevcudiyetini ve dolayısıyla biyokütle üretkenliğini en üst düzeye çıkarabilmesidir. İnce katmanlı reaktörlerin önemli bir avantajı, kısa bir ışık yolunda hücrelerin hızlı aydınlık-karanlık döngüsünü indükleyen verimli karıştırmadır. Bu reaktörlerde ışık mevcudiyeti borulu fotobiyoreaktörlere göre çok daha yüksek olduğundan, oksijen üretim hızı da daha yüksektir, bu nedenle yüzeyin toplam uzunluğu boru şeklindeki fotobiyoreaktörlerde boru uzunluğundan daha düşük olmalıdır.

Genel olarak, bu tip reaktörlerin tasarımı hala optimize edilmemiştir, bu nedenle yetersiz pH kontrolü, düşük verimli CO₂ transferi ve aşırı sıcaklık dahil olmak üzere büyük problemler gözlemlenmiştir. Bu tip reaktörlerde, tıpkı kanal reaktörlerinde olduğu gibi, kültürün soğutulmasına katkıda bulunan ana mekanizmanın, sıcaklık kontrol stratejilerinin uygulanmasını çok zorlaştıran suyun buharlaşması olduğunu belirtmek önemlidir (Jacob-Lopes et al., 2020a)

Fotobiyoreaktörlerin Geleceği

Mikroalg üretimi için fotobiyoreaktörler alanındaki gelecekteki eğilimler üç ana açıdan özetlenebilir (Jacob-Lopes et al., 2020a):

- mevcut olanların performansını iyileştiren teknolojilerin geliştirilmesi;
- fiili üretim sistemlerinin büyütülmesi; ve
- mikroalg üretiminin sanayileşmesi.

Kültür koşullarının kontrolünün optimizasyonuna ve bunların mikroalg hücrelerinin gereksinimlerine uydurulmasına olanak tanıyan ve ayrıca biyokütle

Üretim maliyetinin düşürülmesine olanak tanıyan yeni teknolojiler gereklidir. Bu teknolojiler üretim leğinin büyütülmesi, ölçek büyütme kriterlerinin tanımlanması ve daha büyük ölçeklerde sağlam operasyon için uygun makinelerin geliştirilmesi ile ilgilidir (Jacob-Lopes et al., 2020a).

Kültürlerin kontaminasyonunun ve sağlamlığının kontrol edilmesi ihtiyaı, özellikle açık sistemler kullanılırken büyük önem taıtmaktadır. Öte yandan, kapalı reaktörlerin başarılı bir şekilde işletilmesi, kültürleri periyodik olarak kerten biyolojik kirlilik sorununa hala bir çözüm gerektirmektedir. Son olarak, maliyet açısından rekabetçi bir sanayileşme, mikroalg üretimi için sürekli çalışma, kontrol stratejileri, iyi üretim uygulamalarının gerçekleştirilmesi gibi endüstriyel standartlara uygun yöntem ve tesisleri gerektirir. Mikroalg üretiminin dünya çapında artmasını, mikroalglere dayalı değerli bir endüstrinin kurulmasını bu alanlardaki ilerlemeler sağlayacaktır (Jacob-Lopes et al., 2020a).

2.3. Mikroalglerden Karotenoid retiminde Alt Akım İşlemleri

Mikroalglerden yüksek değerli bileşiklerin üretimi, mikroalg biyokütlenin kültivasyon işlemlerini, alg hücrelerinin hasadını, ardından mikroalg karotenoidlerin üretim maliyetini büyük ölçüde etkileyen alt akım işlemlerini içermektedir (Galanakis, 2020).

2.3.1. Hasat

Üretim maliyetlerinin %15-20'sini oluşturan biyokütle hasadı, mikroalg hücrelerinin şekli, boyutu ve yoğunluğu kültür ortamındaki yerleşme oranlarını belirlediğinden tek bir işlemlerle yapılamamaktadır. Mikroalg türlerinin büyük çeşitliliği için uygun ve düşük maliyetli bir tekniğin seçimi, mikroalg biyokütle üretiminde önemli bir sorun oluşturmaktadır (Jacop-Lopez et al., 2020a; Malcata et al., 2019).

2.3.1.1. Sedimentasyon

Yerçekimi kuvvetinin etkisiyle biyokütlenin çökeltilmesi olan sedimentasyon, mikroalg hasadı için en basit yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem, çok az enerji gerektirmesi ve düşük ekipman ve işletme maliyetleri gerektirmesi nedeniyle enerjik ve ekonomik açıdan çok çekicidir (Pahl et al., 2013). Ekipman gereksinimleri ile ilgili olarak, basit çöktürme tankları veya lamel çöktürme tankları olarak da bilinen eğimli kelticiler en yaygın olarak kullanılanlardır. Bu yöntemle ilgili ana dezavantaj, mikroalg çökeltme için gereken süre ile ilgilidir. Bu nedenle, yüksek oranlı alg havuzlarından hızlı biyokütle geri kazanımı için çok verimli olmayabilir. Biyokütlenin karanlık ve statik koşullar altında uzun süre tutulması, solunum ve bakteriyel ayrışma yoluyla önemli biyokütle kaybına neden olabilir (Jacop-Lopez et al., 2020a; Bux, 2013)

2.3.1.2. Flokülasyon

Su ve atık sularda bulunan kolloidal partikülleri uzaklaştırmak için arıtma proseslerinde uygulanan bir teknik olan flokülasyon, düşük maliyetli bir süreç

olduğu için, hem laboratuvar hem de endüstriyel ölçekte bir veya daha fazla kimyasalın eklenmesiyle farklı mikroalg türlerini kültür ortamından ayırmak için hasat tekniği olarak kullanılmaktadır.

Mikroalgal hücre duvarları, süspansiyon içinde kendi kendine kümeleşmeyi önleyen negatif bir yük taşımakta ve bu negatif yük, flokülant adı verilen çok değerlikli iyonların eklenmesiyle karşılanmaktadır. Bunlar katyonik, anyonik veya noniyonik olabilir ve hücreleri, bileşimlerini etkilemeden ve/veya toksik olmadan topaklaştırır, topaklaşma sonrası sedimentasyon süresi kısılır ya da santrifügasyon ile hasat işlemi tamamlanır. Bu flokülantlar iki gruba ayrılmıştır:

- Uygun pH'da polihidroksi kompleksleri oluşturan Al^{3+} ve Fe^{+3} gibi çok değerlikli metal iyonları dahil inorganik maddeler
- İyonik, iyonik olmayan, doğal ve sentetik polimerler dahil polimerik topaklaştırıcılar.

İlk grup arasında, alüminyum sülfat, demir klorür ve demir sülfat, verimliliği iyonik yük ile doğru orantılı olan yaygın olarak kullanılan çok değerlikli flokülantlardır. Fe^{3+} 'nın farklı alg türlerinin hasat edilmesinde %80 etkili olduğu rapor edilmiştir (Knuckey et al., 2006; Jacop-Lopez et al., 2020a; Bux, 2013).

2.3.1.3. Flotasyon

Flotasyon, hava kabarcıklarının küçük katı parçacıklara (<500 μm) bağlanmasına dayanan bir ayırma işlemidir.

Mikroalg hücrelerinin boyutu, çarpışma ve yapışma eğilimi, kabarcık ve hücreler arasındaki bağlanma sürecini etkileyen faktörlerdir. Hidrofilik ve hidrofobik partiküller ayrılır, çünkü hidrofobik partiküller yüzeye çıkan hava kabarcıkları tarafından yakalanır. Yüzeyde yüzdükten sonra, parçacıklar sıyırma ya da süzme işlemi ile toplanabilir. Flotasyon,

- az yer gerektirir;
- çalışma süresi kısadır;
- büyük kültür hacimlerinin işlenmesi için uygundur;
- düşük ilişkili maliyetleri içerir; ve
- yüksek miktarda enerji gerektirmez

Bu yöntemin etkinliğini arttırmanın bir yolu, toplayıcıları (partikülleri daha hidrofobik hale getirebilen reaktifler) kullanmak ve böylece partiküller ve hava kabarcıkları arasındaki birleşmeyi kolaylaştırmaktır (Jacop-Lopez et al., 2020a; Bux, 2013).

2.3.1.4. Santrifügasyon

Santrifügasyon, mikroalglerin bir merkezkaç kuvvetinin etkisiyle kültür ortamından ayrılmasıdır. Kimyasal kullanımını gerektirmeyen, bir çok mikroalg türü için uygun ve yüksek biyokütle geri kazanımı sağlayan, en çok kullanılan ve en hızlı hasat yöntemlerinden biridir. Partikül boyutu ve yoğunluk farkı, santrifüj

ile ayırmada anahtar faktörlerdir. Endüstriyel ölçekte mikroalg hasadında disk yığını, boru şeklinde ve çok odalı santrifüjler kullanılmaktadır. En yaygın çok fazla manuel müdahale gerektirmeyen, ayırma süresi kısa olan ve mikroalg hasadı için en uygun kabul edilen disk yığını santrifüjdür. Ancak bu işlem yüksek enerji ve pahalı ekipman gerektirmektedir. Ayrıca mikroalgal hücrelerin yapısında hasara neden olabilen yüksek yerçekimi kuvvetleri ve kayma gerilimi tarafından yönetilmektedir. (Pahl et al., 2013; Jacop-Lopez et al., 2020a; Bux, 2013).

2.3.1.5. Filtrasyon

Filtrasyon, sıvının mikroalgal biyokütlenin tutulduğu membranlar, elekler veya mikro filtreler gibi belirli filtrelerden akabilmesi için sistem genelinde bir basınç düşüşünün korunmasını gerektiren bir yöntemdir. Gerekli basınç düşüşü, yerçekimi, basınç ve vakum gibi farklı kuvvet türlerinin kullanılmasıyla sağlanmaktadır. Teğet akışlı ve dik akışlı olarak iki filtreleme yöntemi bulunmaktadır. Gözenek boyutlarına göre mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon, membran filtrasyon gibi çeşitleri mevcuttur. (Barros et al., 2015; Bux, 2013).

Tüm bu hasat yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.2.'de verilmiştir (Galanakis, 2020; Jacob-Lopes et al., 2020a).

Tablo 2.2. Hasat yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

Hasat yöntemi	Avantajlar	Dezavantajlar	Biyokütle/Hedef ürününün son uygulaması)
Santrifüj	-Çok yüksek konsantrasyon verimliliği, kontaminasyon yok -Hızlı yöntem -Büyük kültür hacimlerine uygun -Hemen hemen tüm mikroalg türleri için uygundur -Kimyasal içermeyen yöntem)	-Yüksek enerji tüketimi -Yüksek işletme ve bakım maliyetleri -Mikroalgal hücre hasarı meydana gelebilir	-Yüksek değerli ürünler -Nutrasötikler -Kozmetik -Farmasötikler
Flotasyon	-Çok düşük enerji kullanabilir, orta konsantrasyon verimliliği -Basit ve hızlı yöntem -Boyutu 500µm'den küçük olan neredeyse	-Mikroalglerin özelliklerine bağlı olarak flokülant gerekliyse maliyetli olabilir -Yüksek ekipman ve işletme maliyetleri	-Düşük değerli ürünler -Biyoyakıtlar

	tüm mikroalg türleri için uygundur	-Büyük hacimlerine uygun değil -Kimyasalların kullanımını gerektirir (Yüzey aktif maddeler)	
Filtrasyon	-Yüksek konsantrasyon verimliliği, orta düzeyde enerji kullanımı, kontaminasyon yok -Düşük ekipman maliyetleri (sadece pompalama ve membran değişimi) -Düşük enerji tüketimi -Mikroalgal biyokütlenin korunması -Kimyasal içermeyen yöntem -Su geri dönüşümüne izin verir	-Filtrenin kirlenmesi sürekli bakım gerektirir -Zaman alıcı (basınç veya vakum gerektirir) -Büyük hacimlerine uygun değil -Küçük boyutlu mikroalgler için uygun değil	-Orta değerli ürünler -İnsan gıdası -Hayvan Yemi
Flokulasyon	-Düşük enerji, orta konsantrasyon verimliliği, düşük masraf -Basit ve uygun maliyetli yöntem -Düşük enerji tüketimi -Büyük kültür hacimlerine uygun -Hemen hemen tüm mikroalg türleri için uygundur -Biyoflokülanlar biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik değildir	- Mikroalgal biyokütlenin kimyasal ve mikrobiyal kontaminasyonu meydana gelebilir -Kimyasal flokülasyonda kullanılan kimyasallar pahalı olabilir -Süreç, kültür ortamının ph'ına ve iyonik gücüne güçlü bir şekilde bağlıdır -Su geri dönüşümü sınırlıdır	-Düşük değerli ürünler -Biyoyakıtlar

Sedimentasyon	-Basit yöntem -Düşük ekipman ve işletme maliyetleri -Düşük enerji tüketimi -Kimyasal içermeyen yöntem	-Düşük konsantrasyonda ürün eldesi sağlar -Zaman alıcı -Mikroalgal biyokütlenin bozulması meydana gelebilir)	-Düşük değerli ürünler -Biyoyakıtlar
---------------	--	--	---

2.3.2. Kurutma

Hasat sonrası yüksek değerli moleküllerin ekstraksiyonunda kullanılan solventlerle etkileşimi önlemek için nem içeriğinin %12 veya daha azına kadar azaltılmasını sağlamak amacıyla biyokütlenin dehidrasyonu veya kurutulması gerekmektedir. Ekstrakte edilecek bileşenler ısıya dayanıklı olmadığında, hasat edilen biyokütlenin kurutulması için seçilecek yöntem önemli bir adımdır. Güneşte kurutma, püskürtmeli kurutma, dondurarak kurutma (liyofilizasyon) ve tamburlu kurutma bu aşamada kullanılan yöntemlerden bazılarıdır (Galanakis, 2020; Malcata et al., 2019; Kim, 2015).

2.3.3. Hücre Parçalama

Mikroalglerin sert hücre duvarlarının bileşimi ve kimyasal yapısı, fiziksel veya kimyasal strese karşı oldukça dirençlidir, bu direnç karotenoidler gibi değerli hücre içi bileşenlerin hücre dışına salınımını etkilemektedir. Hücre parçalama basamağının amacı, hücre içi ürünleri serbest bırakmak ve ekstraksiyon çözücülere erişimlerini iyileştirmek için hücre duvarlarını parçalamaktır. Bu basamak ile karotenoidler gibi değerli bileşenlerin geri kazanım verimi birkaç kat artmaktadır. Hücre duvarı parçalama yöntemleri, hücresel parçalanmanın çalışma mekanizmalarına göre mekanik ve mekanik olmayan yöntemler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Galanakis, 2020; Jacop-Lopez et al., 2020a; Jacop-Lopez et al., 2020b).

2.3.3.1. Mekanik yöntemler

Mekanik yöntemler basit ve uygun maliyetlidir, hücreler fiziksel güç ile parçalanmaktadır ve evrensel olarak tüm mikroalg türlerine uygulanabilmektedir (Kim et al. 2013).

Bilyeli Öğütme: Katı boncukların öğütme odası içinde hücrelere yüksek hızlı hareketlerinden kaynaklanan enerji aktarımı ile sıkıştırma ve kayma gerilmeleri uygulayarak hücre duvarlarının bozulmasını sağlamaktadır. Biyokütle konsantrasyonu, büyüme fazı (yetiştirme koşullarına bağlı olarak), işlem süresi, boncuk çapı, boncuk yoğunluğu ve boncuk dolgusu gibi çeşitli parametreler hücre

parçalama verimliliğini etkilemektedir. Yüksek parçalama verimliliği, yüksek biyokütle yüklemesi, düşük işletme maliyetleri, ölçek büyütme kolaylığı, düşük emek yoğunluğu ve yüksek ticari kullanılabilirliği başlıca avantajlarındandır (Galanakis, 2020; Jacop-Lopez et al., 2020a).

Yüksek Basınçlı Homojenizasyon: Yüksek basınçlı homojenizasyon, hücre parçalanmasını sağlamak için alg hücre kültürünü yüksek basınç altında pompalayarak küçük boyutlu bir delikten geçmeye zorlamasıyla ani türbülans, kayma gerilimi ve kavitasyon oluşumuna neden olmaktadır. Mikroalg hücre süspansiyonu, dar bir valf yuvası boyunca radyal olarak pompalanmakta ve ardından düşük basınçlı bir odaya salınmaktadır. Hücre parçalanması; hücrelerin valf yuvasına ve çarpma halkasına çarpması, hücrelerin valften hazneye geçerken maruz kaldıkları ani basınç düşüşü ve içerden gaz kabarcıklarının hızlı salınımının neden olduğu kavitasyon kaynaklı meydana gelmektedir (Martin, 2016; Jacop-Lopez et al., 2020a; Jacop-Lopez et al., 2020b).

Yüksek Hızlı Homojenizasyon: Rotor-stator homojenleştiriciler olarak da bilinen en basit ve en etkili hücre parçalama yöntemlerinden biridir. Bir stator içine yerleştirilmiş yüksek hızlı bir rotordan oluşan karıştırma tipi cihazlardır. Hücre bozulmasının mekanizması, karıştırma ve katı-sıvı ara fazındaki türbülans veya kesme gibi mekanik kuvvetler nedeniyle ortaya çıkan hidrodinamik kavitasyonun birleşimidir. Hücre bozulmasının verimliliği, rotor-stator problemlerinin çapı ve tasarımı, besleme viskozitesi, akış hızı gibi farklı proses parametrelerine göre değişmektedir (Gayen et al., 2020).

Ultrasonikasyon: Belirli yoğunluk ve genliklerde 18 kHz'in üzerindeki frekanslarda sonik dalgalar üreterek çalışmaktadır. Sonikasyonun neden olduğu hücre bozulması, sonik dalgaların hızlı sıkıştırma ve dekompresyon döngülerinin neden olduğu kavitasyondan kaynaklanmaktadır (Bevilacqua ve diğerleri, 2018). Hücre bozulması, kavitasyonlar kararsız salınımlara maruz kaldığında ve patladığında meydana gelir ve geçici kavitasyon olarak bilinen bir süreçte aşırı derecede lokalize şok dalgaları ve yüksek sıcaklıklar yaratır. Sonik dalgalar, sürekli bir mikro-kabarcık oluşumu (nadirleşme aşaması) ve içe doğru patlama (sıkıştırma aşaması) döngüsü oluşturmak için süspansiyon ortamına iletilir. Mikrokabarcıkların çökmesi, mikroalg hücrelerini bombalayan ve hücre duvarlarını kesen şok dalgalarını serbest bırakır. Sonikasyonun işlem parametreleri arasında döngü sayısı ve süresi, ultrasonikasyonun gücü, büyüme fazı ve mikroalg türleri bulunmaktadır (Galanakis, 2020; Jacop-Lopez et al., 2020b).

Darbe Elektrik Alanı: Hücreleri yüksek yoğunluklu elektrik alan darbelerine maruz bırakıp yeterince yüksek transmembran voltajda (0,5–1 V), hücre zarının geri döndürülemez şekilde geçirgen olmasına neden olmaktadır. Elektriksel olarak iletken olmayan bir ortam gerektirdiğinden, tuzlu su alg türlerinin işleme tabi tutulmadan önce suyunun alınması ve büyük miktarda tatlı su ile yıkanması gerekmektedir (Jacop-Lopez et al., 2020b).

Mikroalgalar: Bu tekniğin çalışma prensibi, ısı oluşumu ve iç basınçta ani bir artıştır. Mikroalga enerjisinin hücre süspansiyonuna iletilmesi, sıvı parçacıkların hızlı titreşimini tetikler ve hücre matrisinin hızlı ısınmasına yol açar. Hücre içi kinetik enerjideki artış hücre duvarına baskı uygulayarak hücre yırtılmasına neden olur (Jacop-Lopez et al., 2020b).

2.3.3.2. Mekanik olmayan yöntemler

Biyokütle tamamen parçalanmış halde olduğu ve bunun sonucunda da sitoplazmadan ve hücrelerin diğer organellerinden kirletici proteinlerin salınması kaynaklı mekanik yöntemlerden çok iyi verimle ancak daha düşük saflıkla sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir. Böylece mekanik olmayan yöntemler mekanik yöntemlere göre favori ve daha kolay bir alternatif haline gelmiştir (Gayen et al., 2020).

Asit, Alkali, Ozmotik Şok ve İyonik sıvı Uygulamaları: Ozmotik şoka dayalı hücre bozulması, mikroalgal hücrelerin kurutulmasının maliyetli sürecinden kaçınma ihtimali nedeniyle, geleneksel mekanik parçalama yöntemlerine bir alternatif olarak incelenmiştir. Kültür ortamının çözünen konsantrasyonundaki ani değişiklik, hücre sitoplazması ile ortam arasında basınç farkı oluşturur. Bu, türün nispeten zayıf bir hücre duvarına sahip olması durumunda potansiyel olarak hücre yırtılmasıyla sonuçlanabilir. Tatlı su türleri için (*Botryococcus sp.*, *Chlorella vulgaris* ve *Scenedesmus sp.* gibi), kültür ortamına çözünen maddeler (NaCl ve sorbitol gibi) eklenerek tetiklenen hipertonik kaymada ozmotik şok gerçekleştirilir. Tuzlu su türleri (*Dunaliella viridis* gibi) için ozmotik şok, biyokütlenin daha düşük tuz konsantrasyonuna veya tatlı suya aktarılmasıyla indüklenen hipotonik kayma ile gerçekleştirilir. Ozmotik şokun etkinliği, mikroalgin türüne bağlıdır (Galanakis, 2020; Jacop-Lopez et al., 2020b).

Asit ve alkali muameleler, mikroalgal hücre duvarını hidrolize etmede etkili araçlardır. Hücre duvarlarını kırmak için genellikle bir tür kesme kuvveti kullanan mekanik işlemlerden farklı olarak, kimyasal işlemler duvardaki belirli bağlantılara saldırarak bu bağları hidrolize eder ve sonucunda tüm duvarı veya duvar tabakasını çözer. Mikroalgal hücre duvarlarındaki şeker polimerlerinin asit hidrolizi, başka hücre parçalama teknikleri uygulanmadan önce bir ön işlem olarak etkin bir şekilde uygulanmıştır. Etkinliği ve düşük maliyeti nedeniyle en yaygın olarak kullanılan asit sülfürik asittir. Asit veya alkali destekli hücre parçalama yöntemleri, düşük enerji tüketimi, orta düzeyde sermaye maliyeti ve ölçek büyütme kolaylığı gibi avantajları nedeniyle en yaygın olarak kullanılanlardır (Dong et al. 2016; Galanakis, 2020; Jacop-Lopez et al., 2020a).

İyonik sıvılar, büyük asimetrik organik katyonlardan ve küçük organik/inorganik anyonlardan oluşur. İyonik sıvılar; yüksek kimyasal ve termal kararlılık, düşük uçuculuk, ayarlanabilirlik ve inatçı biyokütle bileşenlerini (örneğin lignin) çözme yeteneği gibi yararları vardır. İyonik sıvılar tarafından yapılan ekstraksiyon işleminin, inert solventler olmadıkları için ekstrakte edilen

karotenoidlere zarar verebileceğine dikkat edilmelidir; bu nedenle mikroalglerden karotenoidlerin geri kazanılması için iyonik sıvılar destekli ekstraksiyon istenmez (Gong and Bassi, 2016).

Enzim Uygulamaları: Biyolojik seçiciliği, orta düzeyde reaksiyon koşulları ve ölçek büyütme potansiyeli nedeniyle mikroalgal hücre duvarı bozulması için etkili bir ön arıtmadır. Sonuç olarak, bu ön işlem, mikroalglerden karotenoidleri çıkarmak için uygun olabilir. Bununla birlikte, enzimin yüksek maliyeti ve ön arıtma prosesi boyunca çalışma koşullarının kontrol edilmesi gerekliliği şu anda büyük ölçekli uygulamalarını sınırlandırmaktadır (Lee ve diğerleri, 2017). Proteazlar, lipazlar ve selüloz gibi çeşitli enzimler uygulanabilir. Hidroliz aşaması normal olarak, formülasyonu hidrolize edilecek hücre duvarının bileşimine bağlı olacak olan farklı enzimlerin bir kokteylini gerektirir. Hücre duvarı konfigürasyonu türler arasında önemli ölçüde farklılık gösterdiğinden, enzim kokteylinin bileşiminin her bir spesifik biyokütle için uyarlanması ve optimize edilmesi gerekir. Enzimler pahalıdır ve tedavinin ekonomik olarak ölçeklenebilir olması için geri kazanılıp yeniden kullanılması gerekir. Enzimatik hidroliz normalde nispeten düşük bir sıcaklıkta gerçekleştirildiğinden, termal olarak hassas/kararsız ürünlerin geri kazanılmasında kullanıma potansiyeline sahiptir (Jacop-Lopez et al., 2020a; Jacop-Lopez et al., 2020b).

Hücre parçalama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.3.'de verilmiştir (Jacop-Lopes et al., 2020a).

Tablo 2.3. Hücre parçalama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

Yöntem	Avantajlar	Dezavantajlar
<i>Mekanik</i>		
Bilyeli Öğütme	Tek geçişli işletimde yüksek parçalama verimliliği; yüksek biyokütle konsantrasyonu; reaksiyon sıcaklığını kontrol etmek kolay; ticari olarak temin edilebilen boncuk değirmeni; ölçek büyütme kolay; daha az emek gerekir	Yüksek enerji girişi; ısı üretilebilir ve bu nedenle biyoaktif moleküllere zarar verebilir; alt akım işlemleri için gerekli
Yüksek basınçlı homojenizasyon	Yüksek parçalama verimliliği; ölçek büyütme kolay	Düşük biyokütle yüklemesi; alt akım işlemleri için gerekli; molekül içi seçici olmayan salınımı
Ultrasonikasyon	Üstün parçalama verimliliği; kısa işlem süresi; düşük toksisite; basit operasyon	Sıcaklık kontrolü gereklidir; yüksek enerji ihtiyacı
Darbeli elektrik alanı	Diğer ön arıtma yöntemleriyle birleştirilebilir; ölçek büyütme kolay	Ek ön yıkama ve deiyonizasyon adımları gereklidir; daha yüksek enerji girişi

Mikrodalga	Yüksek kesinti verimliliği; ölçek büyütmek kolay; daha az çözücü gereklidir	Büyük ölçekli reaktör tasarımı ihtiyacı vardır; sıcaklık kontrolü gereklidir
Yöntem	Avantajlar	Dezavantajlar
<i>Mekanik olmayan</i>		
Asit ve alkali	Ölçeklendirmesi kolay; düşük enerji tüketimi; düşük sermaye maliyeti	Karotenoidleri yok etme ihtimali
Ozmotik şok	Ölçeklendirmesi kolay, düşük enerji tüketimi; düşük sermaye maliyeti	Mikroalglerden pigment çıkarılamaz
İyonik sıvı	Yüksek kimyasal ve termal kararlılık; düşük kararsızlık; ayarlanabilirlik; lignini çözebilir	İyonik sıvının yüksek maliyeti; yüksek enerji talebi; toksisite; karotenoidde zarar verir
Enzim uygulamaları	Yüksek seçicilik; orta işleme koşulları; korozyon sorunu yok	Yüksek enzim maliyeti; kararlı işleme koşullarını koruma gerekliliği; zaman alıcı

2.3.3.3. Diğer yeni stratejiler

Buhar patlaması, biyokütleyi sıcaklıklara (160°C ile 260°C arasında değişen) ve buhar basınçlarına (1.03– 3.45 MPa) maruz bırakarak çalışan, hücreleri ortam sıcaklığına getirirken basınçsızlaştırma yoluyla bir hücre duvarı lizizi oluşturan başka bir hücre parçalama şeklidir (Khanra et al., 2018).

Mikroalglerin algisidal mikroorganizmalar (yani bakteri veya virüsler) ile birlikte kültürasyonu, geleneksel hücre duvarı parçalama stratejilerine potansiyel bir alternatif olarak önerilmiştir. Örneğin, Chen, Bai ve Chang (2013) *Chlorella vulgaris* ESP-31'in, lipidlerin geri kazanımını artırmak için mikroalglerin hücre duvarını bozan spesifik sindirim enzimleri salgılayan yerli bakteri *Flammeovirga yaeyamensis* ile birlikte yetiştirilmesini önermiştir. Gözlemlenen sonuçlara göre lipid ekstraksiyon verimi %100'e yakın artmıştır. Genel olarak, mekanik süreçler, yüksek enerji maliyetlerine rağmen, genellikle yüksek ürün geri kazanım verimlerinin yanı sıra iyi süreç kontrol edilebilirliği ve ölçeklenebilirlik sağlar. Bu yöntemler genellikle mikroalg türlerine daha az bağımlıdır ve ayrıca ürünün kontaminasyonuna yol açma olasılığı daha düşüktür (Lee et al., 2012; Galanakis, 2020).

2.4. Karotenoidler

Karotenoidler; fitoplankton, algler, siyanobakteriler, yüksek bitkiler ve fototrofik bakteriler dahil olmak üzere fotosentetik organizmalar ve mantar, maya gibi bazı fotosentetik olmayan organizmalar tarafından de novo sentezlenen, hayvanlar için tek kaynak görevi gören, yağda çözünen, sarı, turuncu veya kırmızı

renkli en önemli doğal pigment gruplarından birini oluşturmaktadır (Isler, 1971; Tanumihardjo, 2013; Krinsky et al., 2004). Fotosentetik organizmalarda bu maddeler ışığı emerek, enerjiyi klorofile aktarır ve ışığı yakalayan komplekslerde yardımcı pigmentler olarak görev yaparlar. Fototrofik organizmalardaki temel işlevleri ışık enerjisini fotosentezde kullanım için absorbe etmekle beraber klorofili ışıktan zarar görmemesi için korumaktır. Karotenoidler, hem fototrofik hem de fototrofik olmayan organizmalarda, hücreleri zararlı oksijen radikallerine karşı korur (Barredo, 2012). Çoğu karotenoid, bir konjuge çift bağ zincirinden oluşan bir kromofor molekülündeki varlığından dolayı parlak renklidir. Bununla birlikte, birkaç karotenoid, insan gözü tarafından tespit edilemeyecek kadar kısa olan polien kromoforlarına sahiptir ve bu maddelerin bir kısmının diğer karotenoidlerin biyosentezinde önemli ara maddeler olduğuna inanılmaktadır (Isler, 1971).

Metabolik yapısal değişikliklere uğrayabilecekleri çeşitli besin zincirlerinde seçici olarak emilebilen karotenoidlerin doğada yılda yaklaşık 100 milyon ton üretildiği tahmin edilmektedir (Barredo, 2012; Krinsky et al., 2004). Bitkilerin çiçek ve meyvelerindeki parlak sarı, turuncu ve kırmızı renklerin çoğundan sorumludurlar, varlıkları genellikle klorofil tarafından maskelenir ve böcek, kuş ve diğer hayvanlarda da görülürler. Ancak hayvanlar karotenoidler için beslenmelerinde bulunanlara bağımlıdırlar ve beslenmelerinden elde edilen karotenoidlerin metabolizmalarındaki dönüşümü karakteristik hayvan pigmentlerine yol açar (Isler, 1971; Tanumihardjo, 2013).

Karotenoidler, karotenler ve ksantofiller olmak üzere iki gruba ayrılır. Karotenler; hidrokarbon karotenoidler olarak da adlandırılır ve sadece karbon ve hidrojenle oluşmuş olup, oksijen içermezler; a-karoten, b-karoten örnek olarak verilebilir. Ksantofiller ise; oksijen içeren karotenoidlerdir. Zeaksantin, kantaksantin, astaksantin ksantofil grubu karotenoidlerdendir. (Barredo, 2012; Rodriguez-Amaya, 2001).

Doğal olarak oluşan karotenoidler, ikincil metabolitler arasında en bol bulunan bileşiklerdir ve iyi bilinen kaynaklardan izole edilmektedir. İlk olarak yaklaşık 30-40 kadar karotenoidin yapıları 1940'ların sonunda listelenmiştir ve karotenoidler üzerindeki çalışmaların devam etmesiyle beraber bilinen karotenoidlerin sayıları da artmakta olduğu için bu liste çeşitli zamanlarda araştırmacılar tarafından güncellenmiştir. Literatürde, şuanda bilinen karotenoid sayısının yaklaşık 800'e ulaştığı bilgisi yer almaktadır (Galanakis, 2020; Britton et al., 2004).

2.4.1. Karotenoidlerin Biyolojik Aktiviteleri

Bitkilerin kloroplastlarında ve kromoplastlarında ve algler gibi diğer bazı fotosentetik organizmalarda doğal olarak bulunan karotenoidlerin, mikroorganizmalar üzerinde çeşitli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Bu aktivitelerin başında organizmalar üzerindeki oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri olan güçlü antioksidan özellikleri yer almaktadır. Ayrıca β -karoten, α -

karoten, γ -karoten ve β -kriptoksantin gibi karotenoidlerin insanlarda en iyi bilinen işlevi vücutta A vitaminine enzimatik dönüşümüyle bu vitaminin biyosentezinde öncül (provitamin A) olarak görev almalarıdır. Büyüme, üreme ve bağışıklık işlevinde gerekli olan A vitamininin özellikle çocuklarda eksikliği yüksek hastalık ve ölüm oranlarına yol açmakta ve gelişmekte olan dünyanın birçok yerinde sorun olmaktadır (Barredo, 2012; Tanumihardjo, 2013). Birçok karotenoid etki mekanizmasından dolayı antioksidan potansiyele, antiinflamatuvar aktiviteye, bağışıklık tepkisini iyileştirme ve kronik hastalıkları önlemeye, antifungal, antibakteriyel, antimalaryal ve hipoglisemik önleyici biyoaktivitelere sahiptir (Galanakis, 2020).

1970'lerden günümüze hızla artan, çağımızın büyük sorunlarından biri olan obezite; kariyovaksüler hastalıklar, diyabet, hipertansiyon gibi hastalıkların riskini de artırmaktadır. Antidiyabetik, antiobezite, kardiyoprotectif ve antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı karotenoidler, çeşitli metabolik hastalıkları yönetmek için farklı ve pozitif bir yolun kapılarının aralanmasını sağlamıştır (Galanakis, 2020).

Sarı renkli bir karotenoid olan krosin; antitümöral, antidepresan, kardiyoprotektif, genoprotektif ve nöroprotektif özelliklerinden dolayı birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Yürütülen *in vivo* ve klinik araştırmalar, krosinin terapötik potansiyelinin varlığını kanıtlamıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda krosin gastrointestinal, immün, endokrin ve kardiyovasküler sistemler gibi birçok insan organı üzerinde faydalı bir etki göstermiştir. Bunlara ek olarak oksidatif stresi engellemiştir ve anti-Alzheimer ajanı olarak da hareket etmektedir. Oral yoldan alınan krosinin gastrointestinal sistemde hidrolizasyonu ile oluşan krosetinin, kötü huylu hücrelerin protein ve nükleik asitlerin sentezlemesini engellediği çeşitli araştırmalar sonucunda bildirilmiştir. Bunun yanı sıra en yaygın karotenoidler arasında olan β -karoten ve lökopen gibi karotenoidlerin tüketimi, kardiyovasküler hastalıklar ve belirli kanserlerin riski ile ters orantılıdır, lutein ve zeaksantin ise gözle ilgili bozuklukları azalttığı bulunmuştur (Galanakis, 2020).

Karotenoidlerde, konjuge karbon çift bağ sistemi, fotosentezde bulunanlar gibi enerji transfer reaksiyonlarında en önemli faktör olarak kabul edilir ve molekülün bu özelliği tekli oksijenin ($1O_2$) söndürülmesine de izin vermektedir. Karotenoidlerin tekli oksijeni söndürme ve serbest radikalleri temizleme yetenekleri antioksidan özellikleriyle ilişkilidir. Birçok dejeneratif hastalığın gelişiminin başlamasında ve yayılmasında biyolojik yapılar üzerindeki oksidatif stres ve serbest radikal saldırısının ana faktörler olduğu düşünülmekle beraber karotenoidlerin bu benzersiz antioksidan özellikleri kardiyovasküler hastalıklar, kanserler, kataraktlar, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, yaşlanma ve obezite gibi kronik hastalıklara karşı koruyucu etkilerini artırmaktadır (Krinsky et al., 2004; Galanakis, 2020).

Karotenoidlerin birçok sağlık faydası biyolojik aktiviteleriyle bağlantılı olup karotenoid açısından zengin besinlerin tüketimi çeşitli dejeneratif hastalıkların riskinin azaltılması ve immün sistemin güçlendirilmesi ile ilişkilidir. Bu faydalar,

karotenoidlerin gıdalar, kozmetikler ve farmasötiklerdeki uygulamalarını çeşitlendirmektedir (Barredo, 2012).

2.4.2. Karotenoidlerin Ticari Kullanımı

Karotenoidler; antioksidan, membran stabilizatörleri ve A vitamini öncülleri gibi birçok biyolojik aktivitesinin olması ve bu aktiviteleri ile sağlığa faydaları arasındaki bağlantıdan dolayı başta kozmetik ve farmasötik endüstri olmak üzere birçok endüstriyel sektörün ilgisini çekmiştir. Bu bileşikler, gıda, tıp ve kozmetik endüstrilerinde renklendiriciler, yem takviyeleri ve nutrasötikler olarak kullanılmaktadır (Barredo, 2012).

Astaksantin ve fitoen gibi karotenoidler makyaj ve dermatolojik tedaviler üretmek için kullanılır. Gıda ve kozmetik endüstrisinde karotenoid bileşiklerinin ilavesi ile insan sağlığı korunur ve iyileştirilir. Karotenoidler, özellikle β -karoten, kantaksantin ve astaksantin su ürünleri yetiştiriciliği, kümes hayvanları ve domuz yemi endüstrilerinde renk artırıcı doğal pigmentler olarak ticari açıdan önemli hale gelmiştir. Astaksantin veya kantaksantin, yetiştirilen somonlarda ve alabalıklarda balık yemine eklenerek etlerine doğadaki türlerin karakteristik rengini verir. Kümes hayvanları endüstrisinde, tavuk derisine ve yumurta sarısına tipik sarı-kırmızı rengi vermek için lutein, biksin ve kapsantin; lökopen ve kantaksantin gibi karotenoidler ise yiyecek ve içecekler için gıda boyası olarak kullanılır. İnsanlar, kuşlar, balıklar ve omurgasızlar dahil olmak üzere hayvanlar aleminin üyeleri karotenoidleri de novo sentezleyemedikleri için beslenmelerinden elde etmek zorundadır (Barredo, 2012; Galanakis, 2020).

Şimdiye kadar bildirilen 700'den fazla karotenoid arasından özellikle β -karoten, astaksantin, kantaksantin, lutein, lökopen ve zeaksantin, farklı endüstrilerde yaygın olarak kullanılan en önemli ve yüksek değerli karotenoidlerdendir. Bu karotenoidlerin küresel pazarı yaklaşık 5 yıl içerisinde şaşırtıcı derecede artmıştır ve gelecek yıllarda daha da artması beklenmektedir. Karotenoidlerin ticari üretimi çoğunlukla kimyasal sentez veya bitki dokusundan ve gıda sanayi atıklarından ekstraksiyon işlemiyle elde edilmektedir. Yüksek saflıkta ve düşük maliyetli karotenoid üretiminin gerçekleştiği kimyasal sentezde istenmeyen yan etkileri olabilen ve çevre dostu olmayan bazı reaksiyon öncülleri ya da biyolojik olmayan yapıdaki yan ürünleri içermektedir. Ayrıca tüketicilerin gıda güvenliği konusundaki bilincinin artması ve doğal ürünlerin sağlık yararları sentetik üretime göre biyolojik üretime talebi gün geçtikçe artırmaktadır. Bitki veya gıda işleme atıkları ile mikroorganizmalardan karotenoid eldesi karşılaştırıldığında gıdalardan (bitki veya gıda işleme atıkları) karotenoid eldesinin karmaşık ekstraksiyon ve saflaştırma (bitkilerden elde edilen karotenoidler katı ve sıvı yağlar, sabunlaştırılmayan bileşiklerin karışımını da içerir) işlemleri, mevsim dalgalanması, kaynaklardaki kısıtlılık, gıda endüstrisi ile rekabet ve arazi gereksinimi gibi fazlaca dezavantajı vardır. Bununla beraber karotenoidlerin mikrobiyal üretiminde, maliyeti düşürmek ve biyokütle üretimini ve/veya

karotenoid sentezini artırarak üretkenliği artırmak için hızlı büyüyen, yüksek miktarda karotenoid biriktiren, karotenoidlerin ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerini kolaylaştıran ve daha düşük maliyetli bir suşun seçimi gibi bazı zorluklar bulunmaktadır. Karotenoid üretiminin potansiyeli modern biyoproses araçlarının ve rekombinant DNA teknolojisinin uygulanması ile artırılabilir. Bu sayede mikroorganizmaların karotenoid üretiminde kullanılması, bu biyoaktif bileşiklere yönelik gün geçtikçe artan talebin karşılanmasına yardımcı olabilir (Barredo, 2012).

Karotenoidler, ışığı emen ve fotosentetik süreçlere güçlü bir şekilde yardımcı olan birincil karotenoidler veya hücre ve klorofilleri fotohasarlardan koruyucu mekanizmalarda önemli rol oynayan ikincil (sekonder) karotenoidler olabilmektedir (Gong and Bassi 2016).

Mikroalglerden elde edilen birçok karotenoid vardır. Bu karotenoidlerin başında:

- lökopen
- β -karoten
- lutein
- astaksantin
- fukoksantin

bulunmaktadır.

Mikroalglerden karotenoid elde edebilmek için çeşitli abiyotik stres faktörleri uygulanabilmektedir. Işık şiddeti, sıcaklık, tuzluluk, besin yoksunluğu gibi farklı koşullar ile mikroalglerin karotenoid içeriği artırılabilir (Galanakis, 2020).

2.4.3. Karotenoid Ekstraksiyonu

En yaygın prosedür, bir organik çözücünün tek aşamalı uygulamasıdır. Karotenoidlerin analizinde birçok farklı organik çözücü ve çözücü kombinasyonu kullanılmıştır ve uygun seçeneğin seçimi verimli bir ekstraksiyon için kritik faktörlerden biridir.

Çözücü veya çözücü karışımı seçimi, karotenoid profilinin geniş polarite aralığına göre yapılır. Bu nedenle, hücresel içerikte polar ksantofillerin ve apolar karotenlerin ve ksantofil esterlerin oluşumu, heksan, dietil eter, etanol, aseton ve diğerleri ile yapılan çözücü kombinasyonlarının kullanılmasını gerektirir. Polar olmayan (karotenler) veya esterlenmiş karotenoidler için sırasıyla heksan ve etil asetat gibi polar olmayan ve orta polar çözücüler seçilirken, polar karotenoidler (ksantofiller) için etanol veya aseton gibi polar çözücüler daha uygundur. Diğer tüm matris bileşenleri, özellikle su, solvent seçiminde de önemli bir rol oynar. Heksan, etanol, etanol/heksan ve bunların aseton ile kombinasyonları, çeşitli biyolojik matrislerde karotenoid analizi için açık ara en yaygın kullanılan çözücülerdir.

Etanol ve aseton, yüksek miktarda su mevcut olduğunda özellikle etkilidir. Katı faz ekstraksiyonu (SPE), biyolojik numunelerin hazırlanmasında çok basit ve uygun maliyetli bir alternatif olmasının yanı sıra çoklu sorbent ve formatların varlığı sayesinde çok yönlüdür. Tipik sorbentler C30 ve C18'i içerirken, diol ve silika kartuşları sadece polar karotenoidler için iyi bir tutuculuk göstermiştir (Shen et al., 2009; Galanakis, 2020).

Ekstraksiyon süresi kısa olmalı ve sıcaklık izlenerek gereksiz aşırı ısınma kontrol edilmelidir. Numunelerin ve ekstraktların doğrudan güneş ışığına maruz kalması, ışığın azaltıldığı veya sarı ampullerle aydınlatılan bir laboratuvarında çalışılarak önlenmelidir (Jacop-Lopez et al., 2020b).

2.4.3.1. Konvansiyonel ve basınçlı solvent ekstraksiyonu

Karotenoidler oksidasyon, ısı ve ışık için kararsız bileşiklerdir. Bu nedenle, ekstraksiyon ve saflaştırma prosedürleri, onları güçlü ışığa maruz bırakmamaya özen göstererek 40 °C'nin altındaki sıcaklıklarda ve hızla gerçekleştirilmelidir (Kaczor and Baranska, 2016).

Karotenoidlere benzer polariteye sahip çözücüler, bu moleküllerin karmaşık karışımlardan verimli bir şekilde geri kazanılması için büyük önem taşımaktadır. Metanol, heksan, etanol ve aseton yaygın kullanılan çözücüler arasındadır. Bunların yanı sıra diklorometanol/metanol, kloroform/metanol ikili ekstraksiyon sistemleri karotenoidlerin ekstraksiyonlarında başarılı sonuçlar vermektedir (Soares et al., 2016).

Ultrasonikasyon veya mikrodalgalar ile birleştirilen çözücü ekstraksiyonlarında çözücü hücrelere girebilir ve karotenoidleri çıkarabilir, böylece daha yüksek verim elde edilmektedir (Galanakis, 2020; Borowitzka et al., 2016).

Birçok karotenoid baza karşı karardır. Bu nedenle, KOH-metanol ile sabunlaştırma, lipid açısından zengin bir numuneden trigliseriti çıkarmak için karotenoid ekstraktlarında yaygın olarak kullanılır. Karotenoid esterinin hidrolizi için sabunlaştırma da mevcuttur. Bununla birlikte, sabunlaşma, alkali kararsız karotenoidler için çeşitli yan reaksiyonlara neden olmaktadır. Raporlanan reaksiyonlar:

1. Astaksantin, astacen'e oksitlenir. Bu reaksiyon, 3-hidroksi-4-keto- β -uç grubuna sahip tüm karotenoidler için meydana gelir.
2. Sabunlaşma ayrıca 2-hidroksi-kantaksantin gibi bir 2-hidroksi-4-keto- β -uç grubu olan karotenoidler üzerinde dehidrasyona neden olur.
3. Fukoksantin ve türevleri, baz ile karşılık gelen hemiketal bileşiklere dönüştürülür.
4. Peridinin de baz altında ayrışır.

5. Tobiraxantns gibi seko-karotenoidler, alkali ortam tarafından benzersiz beş üyeli halkalara sahip karotenoidlere dönüştürülür.

Bu yan reaksiyonlardan kaçınmak için, alkali kararsız karotenoid esterlerin hidrolizi için kolesterol esteraz veya lipaz kullanılarak enzimatik hidroliz uygulanmaktadır (Kaczor and Baranska, 2016).

Ekstrakt daha sonra buharlaştırılacaksa, örneğin pigmentler farklı bir solventte çözülecekse, kullanılacak solventlerin su içermemesi ve kaynama noktalarının 100 °C'nin altında olması gerekmektedir. Ekstrakt doğrudan HPLC'ye enjekte edilecekse ve herhangi bir buharlaşmaya ihtiyaç duymazsa, daha ağır çözücüler veya su içeren çözücü karışımları kullanılabilir (Borowitzka et al., 2016).

2.4.3.2. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu

Yüksek değerli bileşikler yüksek verimle çıkarmak için daha az çözücüye ihtiyaç duyan, daha az zaman kullanan ekstraksiyon tekniğidir. Numunenin oksijensiz ve ışısız bir ortamda tutulmasını içermekte olup kontrollü sıcaklık ve basınçlarda geleneksel solventlerin kullanımına dayanmaktadır. Uygulanan basınç 1500-2000 psi arasında değişmektedir ve ekstraksiyon verimini önemli ölçüde etkilemez.

Ekstraksiyon yüksek basınçta gerçekleştirilir, bu sayede uygulanan sıcaklık ekstraksiyon solventinin kaynama noktasının üzerinde olsa bile solvent sıvı halde tutulur. Yüksek basınç çözücünün biyolojik matrise nüfuz etmesini de kolaylaştırır. Mikroalglerden karotenoid ekstraksiyonu için etkili bir teknik olarak önerilmektedir (Galanakis, 2020; Malcata et al., 2019).

2.4.3.3. Süperkritik ve subkritik solvent ekstraksiyonu

Ucuz ve ölçek büyütmesi kolay olmasına rağmen çevre dostu olmayan, zaman alıcı ve birden fazla buharlaştırma ve konsantrasyon adımı içeren uzun prosedürler gerektiren geleneksel solvent ekstraksiyonu yerine süperkritik ve subkritik (kritik altı) solvent ekstraksiyonu gibi zararlı solventleri içermeyen, çevre dostu yeni ekstraksiyon teknikleri aramak için çaba sarf edilmektedir. Kritik koşullarda, maddeler sıvı halin yoğunluğuna ve gaz halinin viskozitesine sahiptir (Khanra et al., 2018). CO₂, düşük fiyatı ve bulunabilirliği ile inert ve yanıcı olmaması nedeniyle genellikle bir akışkan olarak kullanılmaktadır. Bu ekstraksiyon yöntemlerini etkileyen ana faktörler, basınç, sıcaklık, sıvı akış hızı ve yardımcı çözücülerin kullanımını içermektedir (Chen et al., 2012). Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu kullanılarak mikroalglerden karotenoidlerin çıkarılması için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, Macías-Sánchez ve ark. (2009), çözücü olarak metanol kullanan sonikasyon prosedürlerinin uygulanmasına kıyasla süper kritik CO₂ ekstraksiyonu kullanıldığında daha yüksek seçicilik ve karşılaştırılabilir karotenoid verimleri elde etmişlerdir. CO₂, polar bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun olmayan düşük bir polariteye sahiptir; bununla birlikte, bu strateji, verimi arttırmak ve polar bileşiklerin ekstraksiyonuna izin vermek için diğer geleneksel solventlerle birleştirilebilmektedir (Galanakis, 2020).

2.4.4. Sabunlaştırma

Sabunlaştırma, esterlenmiş ksantofilleri serbest bırakmak ve aynı zamanda örneğin klorofiller ve sabunlaştırılabilir lipidler gibi girişim yapan bileşikler ortadan kaldırmak için karotenoid ekstraktlarına yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu adım sadece kromatografik ayrımı basitleştirmekle kalmayıp belirli matristeki karotenoidlerin doğası ve dağılımı hakkında değerli bilgiler vermektedir. Oda sıcaklığında, karanlıkta, nitrojen atmosferi altında ve/veya antioksidanların eklenmesiyle numune ekstraktlarına metanolik KOH eklenmesi ve gece boyunca sabunlaştırma önerilen prosedürlerdir. Bu adım tüm numuneler için gerekli değildir, ancak mevcut tüm dezavantajlara rağmen, bazı matrisler için sabunlaştırma, analitik çözünürlüğü iyileştirmek ve kromatografik ayırmalarda analitik süreyi azaltmak için gerekli görülmektedir. (Amorim-Carrilho et al., 2014; Inbaraj et al., 2008). Alternatif olarak, bazı kromatografik yöntemler, serbest karotenoidleri ve bunların esterlerini ayırabilir, dolayısıyla bunlar sabunlaştırılmamış ekstraktları analiz etmek için uygulanabilir (Mariutti and Mercadante, 2018).

2.5. Mikroalglerden Elde Edilen Karotenoidlerin Saflaştırılması ve Belirlenmesi

Ekstraksiyon sonrası organik çözücü, kalan hücre kalıntıları ortamdan uzaklaştırılarak elde edilen ham karotenoidler, yüksek oranda saflaştırılmış karotenoid üretmek için bir dizi saflaştırma aşaması gerçekleşmektedir. Karotenlerin ve ksantofillerin geniş yapı yelpazesi ve zayıf stabilitesi, karotenoid analizini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, hepsini analiz etmek için standart bir referans yöntemi yoktur. Doğası gereği zor ve hataya açık olan karotenoid analizi yapılırken analistin hataları önlemek ve güvenilir sonuçlar elde etmek için mevcut tüm analitik ilerlemelerden ve en son teknolojilerden yararlanması gerekmektedir (Galanakis, 2020; Jacop-Lopez et al., 2020a; Rodriguez-Amaya, 2003).

2.5.1. Kromatografi

Ekstrakt, HPLC veya ince tabaka kromatografisi gibi kromatografik yöntemler kullanılarak karotenoidler, kütle spektrometrisi gibi yöntemlerle tanımlanması için ayrılabilir (Borowitzka et al., 2016).

2.5.1.1. İnce tabaka kromatografi (İTK)

Masraf ve eğitim açısından basit bir yöntemdir ve tecrübeli birini izlemek yöntemi öğrenmenin en kolay yoludur. Kullanılacak çözücü bir behere eklenir, ekstrakt örneği bir İTK plakasının kısa ucuna yakın dar bir cam tüp içinden uygulanır, çözücü buharlaştırıldıktan sonra plaka çözücü odasına indirilip kapağı kapatılır. Ayrılma birkaç dakika sonra görülür. Noktaların rengi ne tür pigmentlerin bulunduğu ile ilgili fikir verir. Örneğin; violaksantin veya ϵ -karoten sarı bantlar oluştururken, zeaksantin veya β -karoten daha turuncu-sarıdır. Fukoksantin ve diğer ketokarotenoidler kahverengimsi turuncudur ve astaksantin ve ψ, ψ -karoten plaka üzerinde kırmızı görünür. Klorofillerin rengi yeşilden griye değişir. (Haugan and Liaaen-Jensen 1994; Borowitzka et al., 2016).

2.5.1.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), şimdiye kadar karotenoid ayrımlarında en yaygın kullanılan metodoloji ve dolayısıyla altın standart olarak kabul edilmektedir. (Giuffrida et al., 2018). HPLC, karotenoid analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Karotenoidlerin ayrılmasının, durağan fazın özelliklerinden güçlü bir şekilde etkilendiği iyi bilinmektedir. Bu bağlamda, analizleri için normal ve ters fazlı (RP) dolgular da dahil olmak üzere birçok türde durağan faz kullanılmıştır; bununla birlikte, normal faz, polar olmayan karotenoidlerin zayıf bir şekilde ayrılmasını sağlar. Bu doğal pigmentlerin serbest formları genellikle ters fazlı kolonlarda ayrılır ve aynı şekilde açılmış karotenoidler için de geçerlidir.

Oktadesil (C18) ve triacontil (C30) ligand kolonları, biyolojik matrislerden izole edilen numune ekstraktlarında karotenoid analizi için tercih edilen ve daha fazla çözünen fazlardır.

Karotenoid analizi üzerine yayınlanan makalelerin çoğunda C18 LC kolonları kullanılmıştır, ancak bu faz geometrik izomerleri çözmez ve konumsal izomerleri verimsiz bir şekilde çözer. Polimerik C18 kolonları, monomerik muadillerine kıyasla polar olmayan karotenoidlerin daha iyi ayrılmasını sağlasa da polimerik C30 kolonları ile daha da iyi ayrımlar elde edilmiştir (Sander et al., 2000).

Hücrelerde bulunan pigmentlerin her birinin miktarını ölçmek için analiz yapıldığında da, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tercih edilir. Bu teknik, ilk olarak, çoğu pigmentin iyi bir şekilde ayrılmasını, karotenoid standartlarının önceden enjeksiyonuna dayalı nicelleştirmeyi, aynı standartların alıkonma süresine dayalı olarak verilen varsayılan kimliği ve otomatik olarak özetlenen ve yazdırılan sonuçları verir. Doğru ve dikkatli kullanılan HPLC, kısa sürede mümkün olan en iyi sonuçları verebilir; genellikle bir numunenin analizi 20-60 dakika sürer. HPLC'nin dezavantajı ilk olarak fiyattır. Kuaterner pompalı, diyet dizili dedektörlü ve soğutmalı otomatik enjektörlü iyi donanımlı bir HPLC pahalıdır.

HPLC'nin ikinci bir dezavantajı otomatik analizdir. Bilgisayar, beş ondalık basamakla bulunan her karotenoidin hesaplanan miktarlarını güzel bir şekilde yazdırdığında, sonuçlara inanmak kolaydır. İlk olarak, doğruluk beş ondalık basamak değildir. Kalibrasyonların dayandığı absorpsiyon katsayıları %5'lik bir belirsizliğe sahip olduğundan ve bazı pigmentler için muhtemelen %20 olduğundan, beş ondalık basamak güvenilir değildir. İkincisi, pigmentlerin tanımlanması aslında herhangi bir tanımlama değildir. Bu sadece bir olasılıktır ve pikin cihaz tarafından yanlış tanımlanması veya kromatogramdaki pikin yanlışlıkla birden fazla pigment içermesi nedeniyle yanlış olabilir. Otomatik bir HPLC analizinin sonuçları, her analiz için daima manuel olarak kontrol edilmelidir. Cihaza herhangi bir kütle spektrometre dedektörü bağlanırsa, analizin kesinliği çok ama çok daha yükselmiş olur, ancak böyle bir cihazın maliyeti on kat daha fazla olabilir.

Üçüncü dezavantaj, HPLC'nin analiz edilmesi için yalnızca küçük miktarlarda pigmente ihtiyacı vardır, bu nedenle daha ileri çalışmalar için veya diğer numunelerin sonraki analizleri için bir referans standart olarak tutulması gerektiğinde ayrılan numunelerin toplanması gerektiğinde, gerekli miktarda pigment elde etmek için çok sayıda tekrarlanan analiz gerekir. Burada verilen dezavantajlara rağmen, HPLC araştırmacılar tarafından oldukça beğenilip tercih edilmektedir (Borowitzka et al., 2016; Kaczor and Baranska, 2016).

HPLC sistemi minimumda solvent pompaları, numune enjektörü, analitik kolon, dedektör(ler) ve veri kayıt cihazından, tercihen bir bilgisayardan oluşmaktadır.

Enjeksiyon: HPLC enjeksiyonları, manuel olarak veya otomatik bir enjektör ile gerçekleştirilir. Suyla karışabilen, filtrelenmiş numune ekstraktı, enjeksiyondan önce su veya tampon ile birleştirilir. Bu karıştırma adımı atlanırsa, kromatogramda erken elute olan pigmentler geniş ve asimetric yer alır, bu da niceliklerinin daha az doğru olmasına sebep olur. Enjeksiyon tamponunun tipi, belirli HPLC yöntemine özeldir ve numune ekstraktının tampona oranı, simetrik tepe şekilleri elde etmek için gereken hacimlere dayalıdır. Programlanamayan manuel enjektörler ve otomatik HPLC enjektörleri ile, analist numune ekstraktını ve tamponu birleştirir, dengelenmesi için 5 dakika bekler ve ardından numune karışımını manuel olarak enjekte eder veya numune karışımını hemen HPLC otomatik numune alma bölmesine yerleştirir. Bu karışımların enjeksiyondan önce uzun süre kalmasına izin verilirse pigment kayıpları ve zayıf enjektör hassasiyeti meydana gelebilir (Latasa et al., 2001).

Enjeksiyonlar arasında pigment taşınmasını en aza indirerek veya ortadan kaldırarak ve buharlaşmayı önleyen HPLC şişeleri kullanılarak enjeksiyon doğruluğu ve hassasiyeti artırılır. Enjektör taşınması, çok konsantre bir numune ekstraktından hemen sonra bir reaktif körü enjekte edilerek değerlendirilir. Reaktif körü analiz edildiğinde ortaya çıkan pikler, önceki enjeksiyondan gelen pigmentlerin kontamine sonuçlara sahip olup olmadığını ortaya koymaktadır. Aktarma meydana gelirse, artan konsantrasyon sırasına göre enjekte edilen kalibrasyon standartları, azalan konsantrasyon sırasına göre enjekte edildiğinden farklı doğrusal regresyonlar üretir (Dolan, 2001). Genellikle bulaşma, programlanabilir otomatik enjektörlerle bir "iğne yıkama" adımı kullanılarak veya manuel enjeksiyonlarla, enjeksiyonlar arasında numune döngüsünün tamamen yıkanmasıyla ortadan kaldırılabilir. Enjeksiyon koşulları oluşturulduktan sonra, enjeksiyon hassasiyeti değerlendirilmeli ve daha sonra yeniden değerlendirme yapılmadan enjeksiyon prosedürlerinde herhangi bir değişiklik yapılmamalıdır. Bu tür değişiklikler, erken ayrıştırılan pigmentlerin alıkonma sürelerini, tepe şekillerini ve arasındaki çözünürlüğü ve yanıt faktörlerini değiştirebilir (Andersen, 2005).

Detektör: Kromatogramlar sıklıkla birçok pigment ve bunların bozunma ürünlerini içerir; bu nedenle, klorofilleri bir HPLC floresan detektörü ile ve karotenoidleri bir HPLC absorpsiyon detektörü ile izleyerek klorofiller ve karotenoidler arasında ayırım yapmak faydalı olabilir. Birden fazla dalga boyunu izleyen absorpsiyon dedektörleri de benzer bir amaç için kullanışlıdır; örneğin, karotenoidler için 450 nm ve klorofil ile ilgili pigmentler için 665 nm kullanılabilir.

HPLC foto diyot dizisi dedektörleri, birden fazla dalga boyundan veri toplar ve her bir tepe noktası için absorbans spektrumları elde edilebilir. Bu tür spektrumlar, pigment kimliklerini doğrulamak ve tepe yukarı eğimdeki ve aşağı eğimdeki absorbans spektrumları farklı olacağından pigmentlerin birlikte elute olup olmadığını belirlemek için kullanılır. Yalnızca bir dalga boyunu izleyen HPLC dedektörlerinde, bu dalga boyları çoğu pigment için iyi algılama sağladığından, yaygın olarak 436 veya 440 nm kullanılır (Andersen, 2005).

2.5.1.3. Hızlı kromatografi

Karotenoid analizi için daha küçük partiküllü LC kolonları kullanılarak yöntemimizin hızı ve pik kapasitesi genişletilebilir. Bu bağlamda, hızlı sıvı kromatografisi olarak sınıflandırılması gerekenleri ortaya çıkaran yeni sıvı kromatografi kullanılmaktadır.

Hızlı rezolüsyonlu sıvı kromatografisi (RRLC), ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC), ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) ve ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) terimleri literatürde bulunabilir ve bunların tümü hızlı kromatografi altında toplanır. Bu alternatifler, geleneksel HPLC yöntemlerini büyük ölçüde geliştirmiştir. UHPLC ve/veya UPLC, 2 µm'nin altındaki partiküllerle dolu dar delikli kolonlar ve HPLC'den çok daha yüksek, yüksek karşı basınçlarda çalışan mobil fazlı dağıtım sistemleri kullanır. Bu nedenle, bu alternatif, daha yüksek pik çözme kapasiteleri, daha dar pikler (daha yüksek sinyal-gürültü oranı), daha hızlı analizler ve bir kazanç hassasiyeti gibi geleneksel HPLC sistemlerine göre çeşitli avantajlar sunar. Daha kısa analiz süreleri ayrıca mobil faz çözücülerinden önemli ölçüde tasarruf sağlar (Giuffrida et al., 2018).

2.5.1.4. Diğer kromatografi yöntemleri

Büyük miktarlarda karotenoid (>1 mg) gerektiğinde, kolon kromatografisi kullanılabilir. Karotenoidlerin ekstraktan ilk ayırma prosedürü için yaygın olarak kullanılır. Bu teknik ayırmada zayıftır, ancak en fazla miktarda pigment alır (Borowitzka et al., 2016; Kaczor and Baranska, 2016).

2.5.1.5. Süperkritik akışkan kromatografi (sfc)

Süperkritik akışkan kromatografisi (SFC) 1960'ların başından beri bilinmektedir, ancak enstrümantasyondaki ve analitik performanstaki önemli gelişmeler ve ekipmanın sağlamlığı sayesinde milenyumun başından beri popülerlik kazanmıştır. Her iki tekniğin de birçok özelliğini bünyesinde barındıran bir gaz ve sıvı kromatografisi melezi olarak düşünülebilir. Bu teknik, kimyasal karmaşıklık ile karşı karşıya kaldıklarında numuneleri çözmek için özellikle çekicidir ve bileşikler, CO₂ açısından zengin bir mobil fazda çözünür oldukları sürece, ters fazlı sıvı kromatografisine kıyasla ortogonal bir seçicilik sunar. Ek olarak, CO₂'nin mobil faz olarak kullanımı, HPCL veya UHPLC gibi diğer önceki tekniklere kıyasla gelişmiş güvenlik ve çevresel avantajlar sunar (Galanakis, 2020).

SFC, kiral analitlerin ve izomerlerin ve yapısal olarak birbirine yakın apolar bileşiklerin kompleks karışımlarının etkin bir şekilde ayrılmasında olağanüstü

uygulamalara sahiptir. β -karotenin cis/trans izomerlerinin ayrılması bu teknikle sağlanmıştır (Lesellier et al., 2003).

2.5.2. Karotenoid Analizinde Metabolomikler

Metabolomik/metabonomi, biyolojik bir matrisin (hücre, doku, sıvı, vb.) kimyasal profili olarak düşünülebilir, çünkü en geniş aralıktaki küçük metabolitlerin, ideal olarak bu matriste bulunan tam koleksiyonun (metabolom) sistematik olarak profilini çıkarmayı hedeflemektedir. Metabolomik çalışmaların nihai amacı, belirli bir zamanda ve/veya önceden tanımlanmış bir biyolojik durum altında toplanan bir numunede bulunan metabolitleri karakterize etmektir.

Karotenoid metabolitleri, analitik protokollerin önemli ölçüde rafine edilmesini gerektirse de, metabolomik kullanılarak in vivo olarak karakterize edilebilir. Bugüne kadar, esas olarak karmaşık biyolojik matrislerle etkileşim nedeniyle karotenoid metabolitlerinin parmak izine yönelik ayrıntılı analitik teknikler mevcut değildir. Karotenoidler yüksek verimli bir şekilde ölçüldüğünde, yaklaşım karotenoidomik olarak adlandırılabilir (Galanakis, 2020).

2.5.3. Spektroskopi

Karotenoidlerle çalışırken bir ışık absorpsiyon spektrofotometresine ihtiyaç vardır. Bu, bir dedektör olarak bir HPLC cihazının parçası olabilir, ancak HPLC veya TLC'den izole edilmiş karotenoidler için pigment standartlarının miktar tayini için ortak bir spektrofotometre gereklidir. Pigment kütle spektrometrisi ve nükleer manyetik rezonans analizine tabi tutulduğunda, karotenoidlerin tanımlanmasını "olası"dan (en iyi tahmin) kesin "kanıtlanmış" hale gelir. Ekstraktlardaki pigment içeriğinin ölçülmesi için basit, hızlı ve düşük maliyetli bir teknik olan spektrofotometrinin kullanılması, bazı deneyler için önerilen uygun bir analitik prosedürdür. Temel olarak bu yöntemler, pigment(ler)e özgü pikler olan bazı dalga boylarında absorbans değerini belirler ve ölçülen değerler, pigment içeriğini belirlemek için ampirik olarak elde edilen denklemlere dahil edilir (Borowitzka et al., 2016; Jacop-Lopez et al., 2020b).

2.5.3.1. Görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi

Karotenoidler için, spektrofotometre 350 ile 700 nm arasında tarama ve kayıt yapabilmelidir. Spektrofotometre zaman zaman bir standart analiz edilerek kalibre edilmeli/kontrol edilmeli ve herhangi bir taban çizgisi kayması veya kaydedilen ışık absorpsiyonunun değişmesi durumunda ayarlanmalıdır. Böyle bir cihaz uzun yıllar dayanabilir, sadece zaman zaman yeni bir lambaya ihtiyaç duyabilmekte olup istikrarlı ve güvenilir sonuçlar sunmaktadır. Ana amaç, pigmentin maksimum absorpsiyonunun hangi dalga boyunda olduğunu görmektir; bu, konjuge çift bağ zincirinin uzunluğu hakkında bilgi verir (Borowitzka et al., 2016).

2.5.3.2. Kütle spektrometresi

Kütle spektrometresi, karotenoidler üzerinde kullanılan ikinci en önemli spektroskopik tekniktir. Bağımsız kütle spektrometreleri pahalıdır ve bakımı zordur, ancak günümüzde, bir HPLC cihazına bağlı kütle spektrometre dedektörleri popülerlik kazanmaktadır. Kütle spektrumu, kütlelerini ve dolayısıyla karbon, hidrojen ve oksijen atomlarının sayısını vererek karotenoidin moleküler formülü hakkında bilgi verir. (Borowitzka et al., 2016).

2.5.3.3. IR spektrumu

Hidroksi, karbonil, allen, asetilen gibi fonksiyonel gruplar ve karotenoidlerdeki diğer gruplar hakkında bilgi vermektedir. Fourier dönüşümü (FT) IR, bir alt mikrogram numunesi ile IR spektrumunun ölçülmesini sağlar, ancak IR spektrumundan gelen bilgiler karmaşıktır ve çoğu durumda doğrulayıcı değildir. Bu nedenle, IR spektrometrisi artık sık kullanılmamaktadır (Kaczor and Baranska, 2016).

2.5.3.4. Raman spektroskopisi

Raman saçılması, kızılötesi spektroskopiyi tamamlayıcı olarak bileşim analizi için kullanılır. Biyolojik numunelere uygulandığında, Raman'ın IR spektroskopisine göre en önemli avantajı, su içeriğine karşı düşük duyarlılığıdır. Raman spektroskopisi genellikle numune hazırlama gerektirmez ve numuneleri in vivo analiz etmek için kullanılabilir. Raman spektroskopisi kullanılarak proteinlerin, polisakkaritlerin, lipidlerin, pigmentlerin ve nükleik asitlerin karakteristik spektral imzaları saptanabilir. Bazı durumlarda, belirli alg türlerine özgü biyomoleküller saptanabilir ve tanımlama için kullanılabilir. Raman'ın IR spektroskopisine göre biyoproses izleme ile ilgili bir başka avantajı, bir PBR'nin şeffaf duvarlarından ölçüm yapma ve dolayısıyla gerçekten invaziv olmama olasılığıdır (Posten and Chen, 2016).

Şimdiye kadar, mikroalglerle ilgili Raman saçılmasının çoğu uygulaması, tek canlı hücrelerin Raman mikroskobik sistemleri kullanılarak pigmentler, proteinler ve lipidler için analiz edildiği mikrospektroskopidedir. Raman saçılmasının yüksek uzaysal çözünürlüğü, hücredeki lipid cisimlerinin dağılımının ve bunların beta-karoten içeriğinin ve hücredeki lipid vücut hacminin beta-karoten miktarına göre tahmin edilmesine izin verir. Biyodizel kalitesi için önemli olan lipidlerin doymamışlık derecesi ve geçiş sıcaklıkları ve astaksantin'in sıcaklıkla yapısal değişiklikleri bu yaklaşım kullanılarak araştırıldı. Bireysel mikroalgal hücreler, lazer yakalama Raman mikrospektroskopisi ve PAM florometrisini birleştiren bir cihazda fotosentetik üretkenlikleri ve biyokimyasal bileşimleri değerlendirildikten sonra bir lazer kapnında aktif olarak sıralanabilir. (Posten and Chen, 2016).

IR spektroskopisi gibi Raman spektroskopisi de moleküler titreşim hakkında ayrıntılı bilgi sağlar. Rezonans Raman spektroskopisi, kromofor karmaşık bir biyolojik ortama dahil olsa bile çok düşük konsantrasyonlarda (10^{-8} M'ye kadar) elde edilebilir. Bu nedenle, biyolojik materyallerde bir protein kompleksi ile karotenoidlerin analizi için rezonans Raman spektrometrisi kullanılır. Rezonans

Raman spektroskopisi, fotosentetik proteindeki klorofiller ve karotenoidler gibi pigmentlerin yapılarını ve etkileşimlerini incelemek için çok faydalı bir yöntemdir. Karotenoidlerin karakteristik rezonans Raman bantları $1600-1500\text{ cm}^{-1}$ (C=C germe titreşimi), $1300-1100\text{ cm}^{-1}$ (CC germe/düzlem içi C-H otomat titreşimi), 1000 cm^{-1} (CH₃ otomat titreşimi), ve 960 cm^{-1} (düzlem dışı C-H otomat titreşimi). Karotenoidlerdeki polien zincirinin E/Z geometrisi, spektrumun $1300-1100\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde karakterize edilebilir. Ayrıca, rezonans Raman spektrometrisi, canlı organizmalardaki karotenoidleri tespit edebilir. Son zamanlarda, Uragami ve ark. Raman spektrumunun 3D haritalamasını kullanarak astaksantin uygulanan sıçan derisinde astaksantin tespitinde başarılı olmuştur (Kaczor and Baranska, 2016).

2.5.3.5. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi

NMR spektroskopisi, liyofilize biyokütlenin ve ıslak biyokütlenin içeriğindeki organik bileşiklerin yapısal aydınlatılması için en etkili spektroskopik araç haline gelmiştir (Posten and Chen, 2016). Proton manyetik rezonansı (¹H NMR), uzmanların elinde, bağlı stereokimya da dahil olmak üzere saf bir karotenoidin tam yapısal tespiti için tek spektroskopik yöntem olarak hizmet etmektedir. Karotenoidlerdeki cis bağlarının konumu, ¹H NMR spektroskopisi ile kolayca belirlenmektedir (Krinsky et al., 2004).

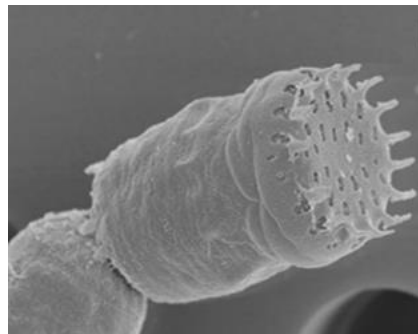
2.5.4. Kimyasal Dramatizasyon

Karotenoidlerdeki hidroksi grupları, karbonil grupları ve epoksitler gibi fonksiyonel grupların tespiti için asetilasyon, trimetil sililasyon, NaBH₄ veya LiALH₄ ile indirgeme, metilasyon ve epoksit-furanoksit yeniden düzenlenmesi gibi kimyasal dramatizasyonlar kullanılmaktadır. Ancak bu yapısal bilgi NMR, MS, kızılötesi (IR) spektrometrisi ve benzerlerinden sağlanabildiği için kimyasal dramatizasyonlar artık çok sık kullanılmamaktadır. Bununla beraber asetilasyon, HPLC ve NMR analizlerini geliştirmek için hala faydalıdır (Kaczor and Baranska, 2016).

2.6. *Nanofrustulum shiloi* ve Fukoksantin

2.6.1. *Nanofrustulum shiloi*'nin Sistematığı

N. shiloi hücresinin elektron mikroskop görüntüsü şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.8. *Nanofrustulum shiloi* hücresinin SEM görüntüsü (Ruocco et al., 2018)

Empire: Eukaryota

Kingdom: Chromista

Phylum: Bacillariophyta

Subphylum: Bacillariophytina

Class: Bacillariophyceae

Subclass: Fragilariophycidae

Order: Fragilariales

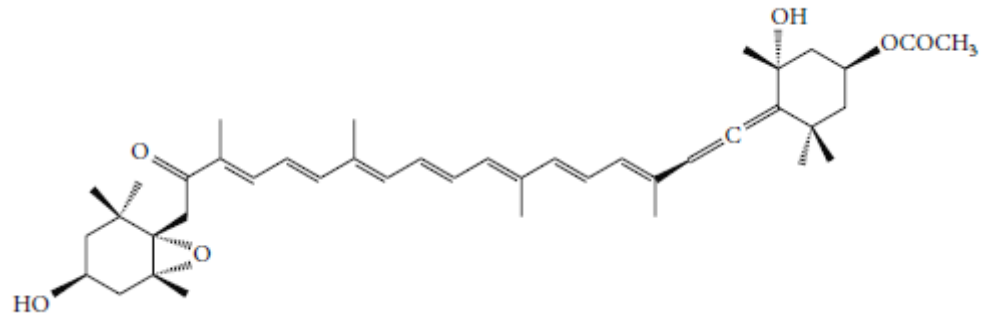
Family: Staurosiraceae

Genus: Nanofrustulum

Species: Nanofrustulum shiloi (Algaebase, 2021)

2.6.2. Fukoksantin

Fukoksantin kahverengi deniz yosunları (makroalg) ve mikroalgler (diatom) tarafından sentezlenebilen ksantofil grubu karotenoidlerdir. (Miyashita et al., 2020)



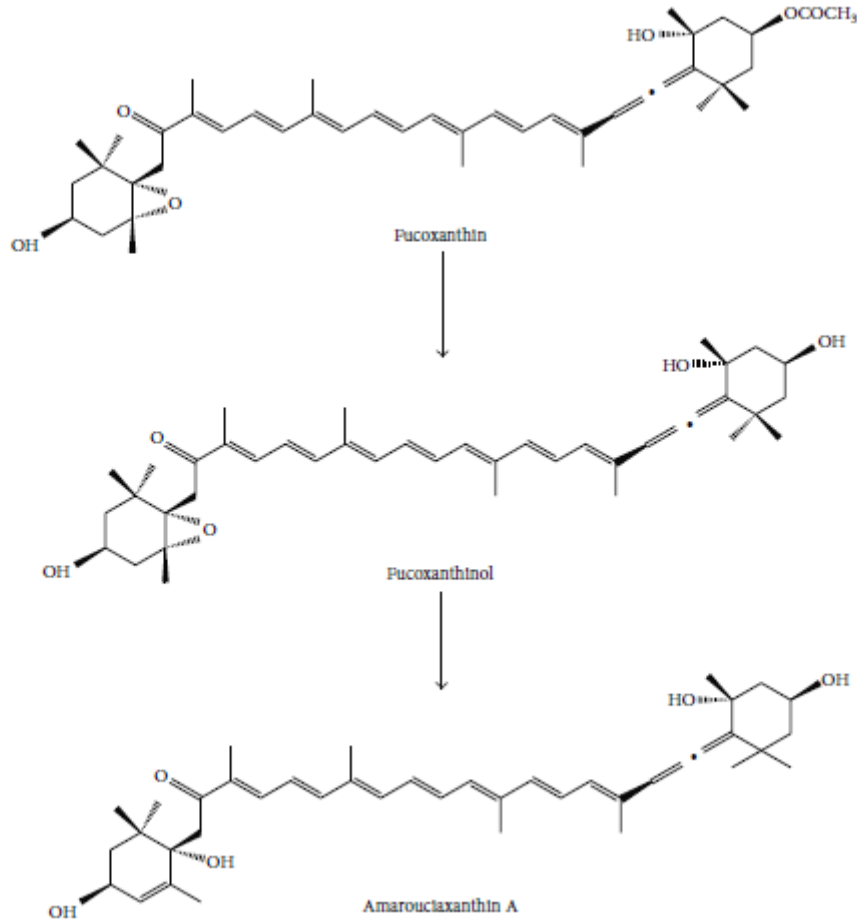
Şekil 2.9. Fukoksantin Yapısı (Zhang et al., 2015)

Fukoksantin, hücreyi ışık hasarından korumak ve klorofil ile birlikte fotosentezde kullanılmak üzere ışığı toplamaktadır.

Fukoksantin alenik bağ, 5,6-monoepoksit ve 9 konjuge çift bağ içeren benzersiz bir moleküler yapıya sahiptir. Fukoksantin bu benzersiz yapısı ve kiralitesi kararsızdır. Isıtma, havaya maruz kalma ve aydınlatmadan kolayca etkilenmektedir (Zhang et al., 2015).

Yapısı: Fukoksantinin farmakolojik aktiviteleri, yapısı ile yakından ilişkilidir. Diğer karotenoidler gibi fukoksantin de depolama esnasında ısıya, ışığa, oksijene, enzimlere, doymamış lipidlere ve diğer prooksidan moleküllere maruz kalmanın bir sonucu olarak bozulmaya elverişlidir. Fukoksantin emilimi ve metabolizmasını bilmek biyoyararlanımını iyileştirmek açısından önemlidir. Fukoksantin ana metabolitleri fukoksantanol ve amarosiaksantin A'dır.

Asai ve arkadaşlarının (2015), fareler üzerinden yaptığı çalışmada fukoksantin uygulamasından sonra gastrointestinal sistemde değişmemiş fukoksantine rastlanmamıştır. Fukoksantino ile hidrolize olmuş, fukoksantanol ile karaciğerde amarosiaksantin A'ya dönüştürülmüştür (Asai et al., 2004).



Şekil 2.10. Fukoksantin, Fukoksantanol ve Amarosiaksantin'in kimyasal yapıları

Fukoksantin oral uygulamalar için çözünürlüğünü dikkate almak gerekir. Araştırmalar sonucunda fukoksantin soya fasulyesi ve bitkisel yağlarla

Sıçanlarda %95 saflıktaki fukoksantin oral alımı ile 4 haftalık çalışma sonucunda belirgin bir toksisite olmadığı sonuca varılmıştır. (Kedarkar et al., 2008). Bu da fukoksantin uygulamasının güvenilirliği ile ilgili yol göstermektedir (Kedarkar et al., 2008).

Antiobezite Etkisi: Araştırmacılar, fukoksantin, plazma ve hepatik trigliserit konsantrasyonlarını, fekal trigliserit, kolesterol ve 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A redüktaz gibi kolesterol düzenleyici enzim aktivitelerini önemli ölçüde azalttığı bu sayede de antiobezitede faydalı bir rol oynayabileceğini bulmuşlardır (Woo et al., 2010).

Antioksidatif Aktivite: Fukoksantin, allenik bağ, epoksit grubu ve hidroksil grubu gibi benzersiz kimyasal yapısı nedeniyle potansiyel bir antioksidan olarak kabul edilmektedir. Önceki çalışmalar, fukoksantin'in etkili bir radikal temizleme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Kawee-ai et al., 2013).

2.6.2.2. Fukoksantinin pazardaki yeri

- Gıda endüstrisi
- Kozmetik Endüstrisi
- ilaç endüstrisi

şeklinde bölümlere ayrılmıştır. Kaynak olarak da Kahverengi deniz yosunu/yosun ve diatomlar kullanılmaktadır.

Fukoksantin pazara önemli katkıları bulunan firmalar Tablo 2.4’de gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Fukoksantin üretimi yapan firmalar (Market Rese)

Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd.	Ningbo Tianhong Biotech Co., Ltd	Shaanxi Sciphar Natural Products Co., Ltd.
Yangling Ciyuan Biotech Co., Ltd.	Changsha Vigorous-Tech Co., Ltd.	Agrochemi Co., Ltd.
Polifenoles Naturales SL	Amicogen Inc	Yigeda Bio-Technology Co., Ltd.

2.7. *Scenedesmus obliquus* ve Löröksantin

2.7.1. *Scenedesmus obliquus*’un Sistematığı

Empire: Eukaryota

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Viridiplantae

Infrakingdom: Chlorophyta infrakingdom

Phylum: Chlorophyta

Subphylum: Chlorophytina

Class: Chlorophyceae

Order: Sphaeropleales

Family: Scenedesmaceae

Subfamily: Scenedesmoideae

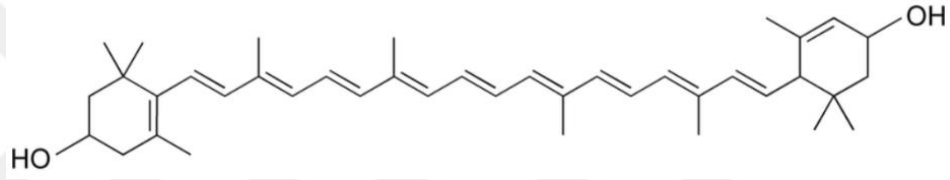
Genus: Scenedesmus

Species: Scenedesmus obliquus (Algaebase, 2021)

2.7.2. Löröksantin

Aitzetmüller ve arkadaşlarının 1968 yılında yaptıkları çalışmada bazı yeşil mikroalglerden benzersiz bir ksantofil grubu luteine benzer bir karotenoid elde edilmiştir. Adsorplanabilirlik ve spektral özellikler açısından farklı bir karotenoid olduğu anlaşılan bu ksantofil löröksantin olarak adlandırılmıştır. Löröksantin, alglerin etanol ile ekstraksiyonu sonrası lutein ile aynı spektral sonuçlar verdiği ve neoksantin kadar polar olduğu görülmüştür Löröksantin sentezi sadece belirli yeşil alg grubu alglerde gerçekleştiği anlaşılmıştır (Ansel, 2008; Lohr, 2009).

Yapılan araştırmalar α -karoten'in luteine ve ardından löröksantine dönüştüğünü göstermiştir (Niyago et al., 1997). *Scenesmus obliquus* (Bishop et al., 1995), *Scenesmus armatus* (Tukaj et al., 2003), *Tetraselmis indica* (Naik and Anil, 2018),



Şekil 2.11. Lutein'in kimyasal yapısı (Arteni, 2015)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroalgler

Bu çalışmada fukoksantin için diatomlardan (Bacillariophyta) *Nanofrustulum shiloi* (EGEMACC 47) ve loroksantin için yeşil mikroalglerden (Chlorophyta) *Scenedesmus obliquus* (EGEMACC 18) türleri kullanılmıştır. Türler, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nde bulunan Ege-MACC (Ege-Microalgae Culture Collection) kültür koleksiyonundan temin edilmiştir (Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonu, 2021).

3.1.2. Kültür ortamları

Çalışmada *Nanofrustulum shiloi* için deniz suyuna BG-11 (Blue Green Algae) (Culture Collection of Algae and Protozoa, 2021) ve *Scenedesmus obliquus* için BBM (Bold's Basal Medium) (Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonu, 2021) kültür ortamları kullanılmıştır. Kültür ortamlarının stok çözeltileri Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanmış ve distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlama işlemi ile sterilize edilmiştir.

Çizelge 3.1. BG-11 stok çözelti hazırlanması ve kullanımı.

Stok Çözeltiden Kullanım (1000 mL distile su için)	Bileşik	Stok Çözelti (g/1000 mL distile su)
10 mL	NaNO ₃	150,0 g
10 mL	K ₂ HPO ₄	4,0 g
10 mL	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g
10 mL	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6 g
10 mL	Sitrik asit	0,6 g
10 mL	Ferrik amonyum sitrat	0,6 g
10 mL	EDTA-Na ₂	0,1 g
10 mL	Na ₂ CO ₃	2,0 g
45,0 g	Deniz tuzu	-
1 mL	İz elementler	g/1000 mL distile su
	H ₃ BO ₃	2,86 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g

	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08 g
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,05 g

Çizelge 3.2. BBM stok çözelti hazırlanması ve kullanımı.

Stok Kullanım (1000 mL distile su için)	Çözüldüğü	Bileşik	Stok Çözelti (g/500 mL distile su)
10 mL		NaNO ₃	150,0 g
10 mL		MgSO ₄ .7H ₂ O	3,75 g
10 mL		NaCl	1,25 g
10 mL		K ₂ HPO ₄	3,75 g
10 mL		KH ₂ PO ₄	8,75 g
10 mL		CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25 g
			g/100 mL distile su
1 mL		H ₃ BO ₃	1,14 g
1 mL	EDTA-KOH Sol.		
		EDTA-Na ₂	5,0 g
		KOH	3,1 g
1 mL	FeSO ₄ .7H ₂ O-der.H ₂ SO ₄ Sol.		
		FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98 g
		der.H ₂ SO ₄	1,0 mL
			g/500 mL distile su
1 mL	İz elementler		g/500 mL distile su
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,41 g

	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,72 g
	MoO ₃	0,355 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,785 g
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,245 g

3.1.3. Ekipmanlar

Kullanılan ekipmanlar ve markaları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan ekipmanlar ve markaları.

Ekipman	Marka
Otoklav	HIRAYAMA (HMC)
Santrifüj	Centrurion Scientific Ltd. (PrO-Research)
Spektrofotometre	Amersham Biosciences (Ultraspec 1100 pro)
Lüksmetre	Lutron (LX-1108)
pH-metre	SM (TM39)
Vorteks	Heidolph (reax top)
Ultrasonik Banyo	HYDRA
Analitik Terazî	RADWAG
Liyofilizatör	CHRIST
Etüv	Mikrotest (mst 30)
Işık Kaynağı	-
Mikroskop	Olympus (CH40)
Rotary Evaporatör	DLAB
Derin Dondurucu	Şenocak

3.2. Metot

3.2.1 Stok Kültür Hazırlanması

Bu çalışmada tercih edilen mikroalg türleri Ege-MACC'ten alındıktan sonra çalışmaya başlamadan önce *N. shiloi* BG-11 ve *S. obliquus* için BBM katı kültür ortamları olacak şekilde petri kabına çizgi ekim yöntemi ile inokule edilerek 10 gün boyunca koloni oluşturmak üzere kültür dolabında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra aynı şekilde steril BG-11 veya BBM sıvı ortamı içeren otoklavlanmış 10 mL'lik test tüplerine ateş yanında öze yardımıyla aktarılmıştır, 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 gelişmesi sağlanmıştır. Bir hafta sonra 500 mL'lik erlenlere, bundan 16 gün sonra da yarısı kullanılarak 2 L'lik kültür şişesine stok kültür olarak kullanılmak üzere aktarılmıştır. Stok kültür hazırlanması ve bekletilmesi sürecinde 500 ml ve 2 L lik üretimlerde ışık şiddeti 100 µE/m²s havalandırma hızı ise 2 L/dk olarak uygulanmıştır.

3.2.2 İnokulum Hazırlanması

Stok kültürlerden üretimin gerçekleşeceği setler için üretim şişelerine inokülasyonları gerçekleşmiştir. Her bir üretim şişesi kendi içlerinde 0. günleri yaklaşık aynı hücre yoğunluğuna sahip olacak şekilde spektrometre sonuçları ve mikroskopik gözlemler kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.3. Kültür Sistemleri

Tüm kültürlerin üretimi oda sıcaklığında sabit ve kontrollü bir üretim odasında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Farklı koşullarda küçük ölçekli üretim

Küçük ölçekli üretim için 2L'lik otoklavlanabilen şişeler, örnek alma ve hava besleme amacıyla 2 adet 30 cm boyunda 0,6 cm çapında pyreks boru ve borularla birleştirilmiş uygun çaplı silikon hortumlar eklentisi ile kullanılmıştır. Şişe ağzındaki çıkışlar pamuk ile kapatılarak hem kontaminasyon engellenmiş hem de hava çıkışına müsait bırakılmıştır. Tüm bağlantıların dış ortamla temas edecek kısımları pamuk ve alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Üretimlerin hazırlanmış halleri şekil 3.1 ve 3.2 'te verilmiştir.



Şekil 3.1. *Nanofrustulum shiloi*'nin küçük ölçekli üretimi



Şekil 3.2. *Scenedesmus obliquus*'un küçük ölçekli üretimi

Fiziksel Koşullar

Üretimde ilk farklılık etkisi fotosentetik bir canlılar için en önemli koşul olan ışık ve gölgelemeye karşı önlem sağlayabilen havalandırma üzerinde aynı anda takip edilmiştir. Işık şiddeti olarak 50 , 150 ve 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ve havalandırma hızı olarak 1 , 3 ve 5 L/dak olarak seçilmiş, sonrasında farklı kombinasyonlar halinde

uygulanmıştır (Çizelge 3.4). Kültürün aydınlatılmasında tek taraflı day light floresanlar kullanılmış ve Lux-metre cihazı ile ölçülen ışık şiddeti değerlerine bağlı olarak kültür kapları ile arasındaki mesafe değiştirilerek Işık şiddeti ayarlanmıştır.

Çizelge 3.4. Farklı fiziksel koşullar için kurulan deney setleri

Fiziksel Koşul	SET 1	SET 2	SET 3
Işık Şiddeti	50 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$	150 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$	300 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$
Havalandırma Hızı	1 L/dak	1 L/dak	1 L/dak
	3 L/dak	3 L/dak	3 L/dak
	5 L/dak	5 L/dak	5 L/dak
*Deney setleri çift tekrarlı uygulanmıştır.			

Kimyasal Koşullar

Kimyasal koşullardaki farklılık için azot türü farklılıkları ve farklı oksidatif stres uygulamalarının etkisi üzerine çalışılmıştır. Kimyasal koşulların etkisinin gözlenmesi için kurulan 2 set çizelge 3.7’de düzenli bir şekilde verilmiştir.

Azot Kaynağı

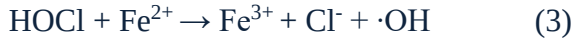
Kültür ortamı içeriğinde bulunmak zorunda olan azot temel prosedürde sodyum nitrattır. Ancak bu çalışmada farklı azot türü kullanımının büyüme ve karotenoid içeriğine etkisi olup olmadığı incelenmesi amacıyla sodyum nitrit, amonyum klorür ve üre kültür ortamındaki azot oranı değişmeyecek şekilde aşağıda verilen hesaplamalar kullanılarak uygulanmıştır (Çizelge 3.5). Fiziksel koşullarla ilgili kurulan 3 setin bütün analizleri tamamlandıktan sonra her mikroalg için elde edilen sonuçlar baz alınarak belirlenen optimum ışık şiddeti ve havalandırma hızı kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. Farklı azot kaynakları için kültür ortamlarındaki miktarlar.

		Kültür Ortamları	
		BG-11	BBM
Azot Kaynağı	MA (g/mol)	Miktar (g/L)	Miktar (g/L)
NaNO ₃ (sodyum nitrat)	84,99	1,5	1,5
NaNO ₂ (sodyum nitrit)	69,00	1,22	1,22
NH ₄ Cl (amonyum klorür)	53,49	0,94	0,94
CH ₄ N ₂ O (üre)	60,06	1,06	1,06

Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türlerinin ($\cdot\text{OH}$ ve $^1\text{O}_2$) açığa çıkmasını sağlayarak oksidatif strese neden olan aşağıdaki mekanizmalar kullanılmıştır (Wei et al., 2008)



Bu çalışmada oksidatif stres içermeyen kontrol grubu ile birlikte 0.1 mM H_2O_2 + 0.1 mM Fe^{2+} , 0.1 mM NaOCl + 0.1 mM Fe^{2+} , 0.1 mM H_2O_2 + 0.1 mM NaOCl şeklinde kimyasalların eklenerek oksidatif strese neden olduğu 3 grup gözlenmiştir. Bu kimyasallar yukarıda mekanizmaları verilen reaksiyonlar ile ortamda reaktif oksijen türleri açığa çıkması ile türlerde oksidatif strese neden olmuştur. Fiziksel koşullarla ilgili kurulan ilk 3 setin her tür için ayrı ayrı belirlenen optimum ışık şiddeti ve optimum havalandırma hızı sonuçları kullanılarak kurulmuştur.

Çizelge 3.6. Farklı oksidatif stres uygulamaları için kültür ortamlarındaki miktarlar.

	Kimyasal kutusu için			Ortam için	
	İçerik (%)	MA (g/mol)	Miktar (M)	Miktar (mM)	Miktar (µl/L)
H₂O₂	50	34,0147	17,49	0,1	5,717552887
NaOCl	10	74,44	1,598	0,1	62,57822278
					Miktar (g/L)
FeSO₄	100	151,908	-	0,1	0,0151908

Çizelge 3.7. Farklı kimyasal koşullar için kurulan deney setleri.

Kimyasal Koşullar	SET 4 (Azot)	SET 5 (Oksidatif Stres)
Azot Türü	sodyum nitrat sodyum nitrit amonyum klorür üre	Set 4 'ün sonucuna göre seçilen azot türü <i>N. shiloi</i> için sodyum nitrat <i>S. obliquus</i> için sodyum nitrit
Oksidatif Stres	Uygulama yok.	Uygulama yok. $H_2O_2 + Fe^{2+}$ $NaOCl + Fe^{2+}$ $H_2O_2 + NaOCl$
*Deney setleri çift tekrarlı uygulanmıştır.		

3.2.3.2. Fotobivoreaktör üretimi

Tüm bağlantıların dış ortamla temas edecek kısımları pamuk ve alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra, 121oC'de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. İki mikroalg türü için de kültür koşulları olarak yukarıda açıklanan 5

set de bütün analizleri ile birlikte tamamlandıktan sonra Çizelge 3.4. belirtilen 3 setin sonuçlarıyla belirlenen optimum ışık şiddeti ve havalandırma hızı, Çizelge 3.7' de belirtilen sırasıyla set 4' ün ve set 5'in sonuçlarıyla belirlenen optimum azot türü ve optimum oksidatif stres koşulu kullanılmıştır.

3.2.4. Büyüme Hızının Belirlenmesi

Mikroalglerin büyüme hızları belirlenmeden önce hücre miktarındaki değişimin tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla hemositometre aracılı hücre sayımı, spektrofotometre ve kuru ağırlık yöntemlerinin tümü kullanılmıştır. her yöntem için alınan veriler aşağıdaki formül üzerinde son değer (X2) ve ilk değer (X1) olarak alınarak hesaplanmıştır (Becker, 1995).

$$\mu = \frac{\ln X2 - \ln X1}{t2 - t1}$$

$$DT = \frac{\ln 2}{\mu}$$

μ : büyüme hızı (gün⁻¹)

DT: ikilenme süresi (gün)

X1: ilk ölçüm değeri

T1: ilk zaman (gün)

X2: son ölçüm değeri

T2: son zaman (gün)

Mikroskopik Görüntüleme ve Hücre Sayımı: Üretim süresince her iki günde bir alınan örneklerin hücre sayımı, ışık mikroskobu kullanılarak (40x büyütme) Neubauer kamerasında (hemositometre) manuel şekilde 2 tekrar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Hemositometreler 0,1 mm veya 0,2 mm'lik farklı derinliklerde bulunabilmekle beraber sayım işleminde 0,1 mm derinlikteki hemositometre kullanılmıştır. (Helena et al., 2016; LeGresley and McDermott, 2010). Hemositometre, her biri 1mm²'den oluşan birkaç alt katmanı bulunan 9 adet kareye sahip 2 bölüm bulundurmaktadır. Her iki bölme toplam 18 kareden 18x10⁻⁴ mL hacimdedir. Sayılan hücre miktarı :

$$d = \frac{10^4}{Q} \times mL^{-1} \times (\text{dilüsyon oranı})$$

formülü ile hesaplanmıştır.

d: Hücre yoğunluğu (hücre/mL)

Q: 1 mm² ' deki ortalama hücre sayısı (Andersen, 2005)

Optik Yoğunluk: Mikroalgal hücre yoğunluğu sayım lamplarındaki sonuçlarla bağlantılı olarak spektrofotometre ile dolaylı yoldan ölçülebilmektedir ve mikroalgal biyokütlenin belirlenmesi için görünür dalgaboyu aralığında (400 nm –

700 nm) ölçüm yapılmaktadır. Çözünmüş ya da askıda olan maddeler gibi mikroalgal olmayan parçacıklar da ışık Emilimi yapabileceği için optik yoğunluğu arttıracaktır bu da spektrofotometrik analizin hata payı olan ancak kolay bir ölçüm tekniği olduğunu göstermektedir. 600 nm ve 680 nm dalga boylarına ayarlanarak spektrofotometrik analizle mikroalgal hücrelerin optik yoğunlukları ölçülmüş ve hücre yoğunluğu ile ilgili değerlendirme yapılmıştır. (Bux, 2013; Joo et al., 2017; Lu et al., 2017). Spektrofotometre için de hemositometredeki ölçümler için uygulandığı gibi iki günde bir iki tekrarlı ölçümler alınmıştır.

Kuru Ağırlık: Mikroalgal biyokütleinin kuru ağırlık ölçümü için filtre kağıtları 105 °C'ye ayarlanmış etüvde bir gece kurutulup desikatörde bir süre bekletilmiş ve darası alındıktan sonra 5'er mL'lik örnekler vakum pompası yardımıyla filtrelerden süzümüştür. Hücrelerin yüklendiği filtre kağıtları 105 °C sıcaklıktaki etüvde kurutulmuş ardından da desikatörde bekletilmiştir. Desikatörden çıkarılan yüklü filtrelerin analitik terazideki tartımı yapılmıştır. Mikroalg hücreleri bulunan filtre ağırlığından boş filtre ağırlığı çıkarılarak kuru ağırlık hesaplaması mg/L cinsinden yapılmıştır (Ho et al., 2013). Örnek alma günleri üretimin 0. günü ile son günü olarak belirlendikten sonra tam ortadaki gün de eklenmiştir.

3.2.5. Karotenoid üretimi alt akım işleri

3.2.5.1. Hasat

Mikroalglerin hasat edilmesi aslında kültür ortamının uzaklaştırılması temeline dayanır. Bu çalışmada hasat işleminde iki mikroalg türü için de temel olarak santrifüjasyon uygulanırken, *N. shiloi* yüksek çökme eğilimi sahip olduğu için santrifüjasyon öncesinde sedimentasyon uygulanmıştır. Küçük ölçekli üretimler ve fotobiyoreaktör uygulaması için hacimlerine bağlı olarak farklı santrifüjler kullanılmıştır.

3.2.5.2. Kurutma

Bu çalışmada daha az karotenoid bozulması ön planda tutularak mikroalglerin içeriğindeki suyu uzaklaştırmak için uygulanan kurutma basamağında liyofilizasyon seçilmiştir.

3.2.5.3. Hücre parçalama

Sert hücre duvarları nedeniyle ekstraksiyon sırasında istediğimiz karotenoid verimini almamız zor olacaktır. Bu nedenle eklenen hücre parçalama basamağında küçük miktarlarda çalıştığımız için mekanik bir parçalama olan havanda parçalama seçilmiştir.

3.2.5.4. Ekstraksiyon

Farklı koşullar altında üretilen mikroalgler hasat ve liyofilizasyon işlemlerinden sonra ayrı ayrı ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Ekstraksiyon için hazırlanan (0,2 g) kuru biyokütlelere kütlece aynı miktarda (0,2 g) CaCO₃ eklendikten sonra 10 mL %100 etanol ilave edildi. Çizelge 3.8'de belirtilen

parametrelere uygun olarak ultrasonik banyoda ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonrasında 5 dakika süre ile 6000 rpm’de santrifüj işlemi uygulandı ve süzüntüler bir şişeye ayrılırken pellet kısmına tekrardan ekstraksiyon işlemi yapıldı. Bu ekstraksiyon döngüleri de aynı çizelge üzerinde tekrar sayısı ile ifade edilmiştir. Tekrarlara ait süzüntüler kendi içerisinde birleştirildikten sonra membran filtrasyon sisteminde naylon filtre kağıdı ile süzülerek berrak süzüntüler elde edildi (Kim et al., 2012; Erdoğan vd., 2021)

Çizelge 3.8. Ekstraksiyon parametreleri (Erdoğan vd., 2021)

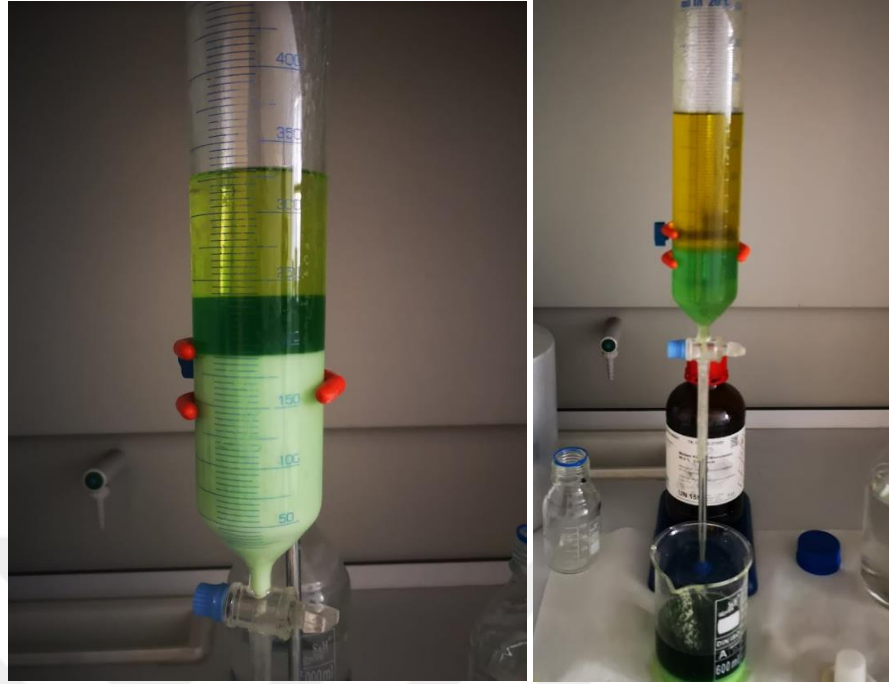
Parametreler	<i>N. shiloi</i>	<i>S. obliquus</i>
Sıcaklık	40°C	30°C
Zaman	20 dk	10 dk
Tekrar	5 tekrarlı	3 tekrarlı

3.2.5.5. Sabunlaştırma

Sabunlaşma basamağında *S. obliquus* türleri metanol içerisinde hazırlanan %10 (w/v) ‘luk KOH çözeltisi hacimce ekstraksiyon sıvısıyla aynı ölçüde eklenerek 4 sa boyunca oda sıcaklığında sabunlaşmaya bırakılmıştır.

Sabunlaşma süresini dolduran KOH içeren renkli ekstrakt ayırma hunisinde toplandı (şekil 3.3). Karotenoidler 10 mL dietil eter ve 10 mL %10 ‘luk Na₂SO₄ solüsyonu ile yıkandı. Tuzun eklenmesi reaksiyonu durdurur ve fazla alkalinin uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Hafifçe çalkalandıktan sonra, fazlar oturmaya bırakıldı ve dietil eter içeren karotenoid fazı toplandı. Bu işlem, üst katman renksiz olana kadar birkaç kez tekrarlandı. Birleşik dietil eter fazı, 0.20 µm naylon membran filtreden (Sartorius) süzüldü. Elde edilen karotenoid çözeltisi tamamen kuruluğa gelene kadar önce vakumlu rotary evaporatörde 25° C 'de 400 mbar altında sonra da azot gazı altında buharlaştırıldı (Erdoğan etc., 2015).

Elde edilen karotenoid çözeltisi önce vakumlu rotary evaporatörde sonra azot gazı altında tamamen kuruluğa kadar sıvı uzaklaştırılmasına maruz bırakıldı.



Şekil 3.3. *S. obliquus* hücrelerinin sabunlaştırma kolonlarında faz ayırımı

3.2.6. Analizler

Bu çalışmada gün aşırı örnek alınarak hem karotenoidlerin hem de klorofil gibi diğer pigmentlerin düzenli artışını gözlemleyebilmek adına teorik hesaplamaları yapılmıştır. Ayrıca daha güvenilir bir metot olan HPLC, mikroalg üretimlerinin sonunda tüm alt akım işlemlerinin tamamlanması ardından tercih edilmiştir.

3.2.6.1. Optik yoğunluk ve spektrofotometrik pigment analizi

Mikroalgal üretimin 0.gününden itibaren gün aşırı örnekler alınarak klorofil a ve b ile karotenoid miktarının tayini yapıldı. Bu yöntem için 5 ml örnek 20 °C sıcaklıkta 6000 rpm 'de 15 dak. santrifüjlenerek pellet alındı. Pellet üzerine 1'e 1 oranında saf DMSO ilave edilerek vorteksledikten sonra, 50 °C sıcaklıkta 30 dk sonik banyo ile ekstraksiyonu sağlandı. Ekstraktlar tekrar santrifüjlenerek süpernatantdan klorofil a, b ve toplam karotenoidlerin belirlenmesi için 665, 649 ve 480 nm'lerde spektrofotometrede ölçülünerek, verilen formüller ile hesaplandı (Wellburn, 1994).

$$C_a = 12,47 \times A_{665} - 3,62 \times A_{649}$$

$$C_b = 25,06 \times A_{649} - 6,50 \times A_{665}$$

$$C_c = (A_{631} + A_{581} - 0,3 \times A_{664}) / 62,2$$

$$C_{x+c} = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b) / 220$$

3.2.6.2. Karotenoid miktarlarının HPLC analizi

Bu çalışmada tüm prosesleri tamamlanan mikroalg tabanlı karotenoidlerin doğru bir şekilde tayinin yapılması ve miktarlarının belirlenmesi için karotenoidlerin analizinde yaygın kullanımı ile bilinen C30 (25 cm, 4.6 ID, 5 µm) kolon tercih edilerek analizler Ege Üniversitesi MATAH HPLC laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

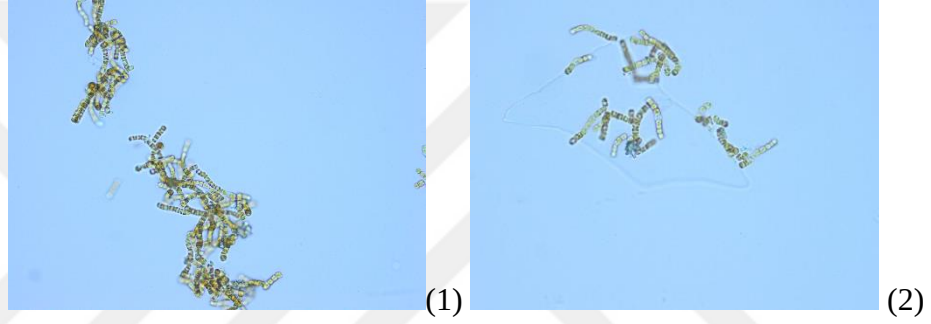


4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. *Nanofrustulum shiloi*'nin Büyümesi ve Fukoksantin Üretimi

Bu çalışmada EGE-MACC'ten alınan *Nanofrustulum shiloi* hücrelerinin üretiminde ve *Nanofrustulum shiloi*'den fukoksantin eldesinde optimum üretim koşullarını belirlemek için ışık şiddeti, havalandırma hızı, azot türü ve oksidatif stres koşulları incelenmiştir. 1 L'lik küçük ölçeklerde bu koşullarda üretim gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Belirlenen optimum üretim koşulları altında 6 L'lik panel fotobiyoreaktöre geçilerek büyük ölçekli üretimi yapılmıştır.

Şekil 4.1'de *Nanofrustulum shiloi* hücrelerinin inokülasyonu öncesindeki örneklerin mikroskobik görüntüleri yer almaktadır.

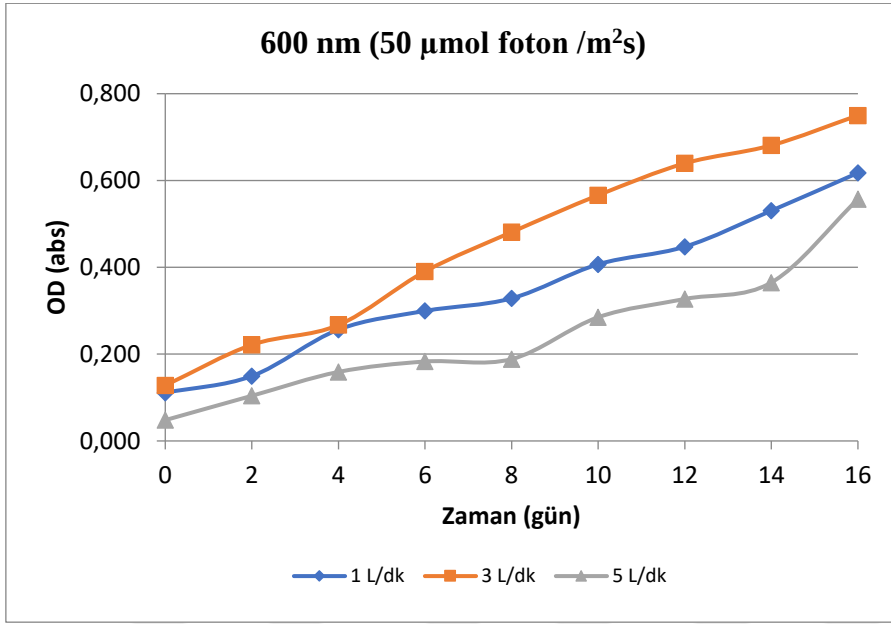


Şekil 4.1. *Nanofrustulum shiloi* hücrelerinin mikroskobik görüntüleri 1) Derişik 2) Seyreltik (400x büyütme)

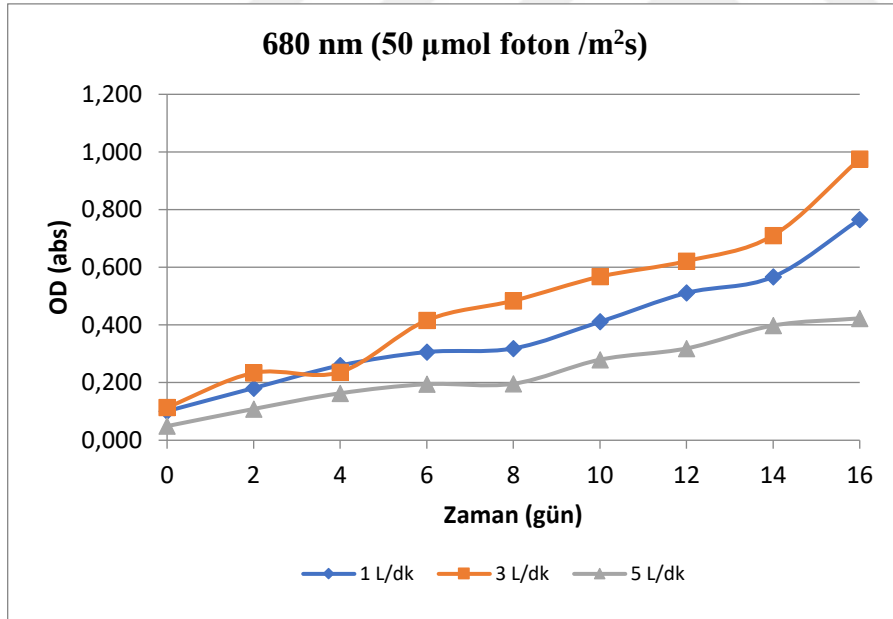
4.1.1. *Nanofrustulum shiloi* 'nin Büyümesinde ve Fukoksantin Üretiminde Farklı Işık Şiddeti ve Havalandırma Hızlarının Etkisi

4.1.1.1. 50 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 1, 3, 5 L/dk havalandırma hızında üretim

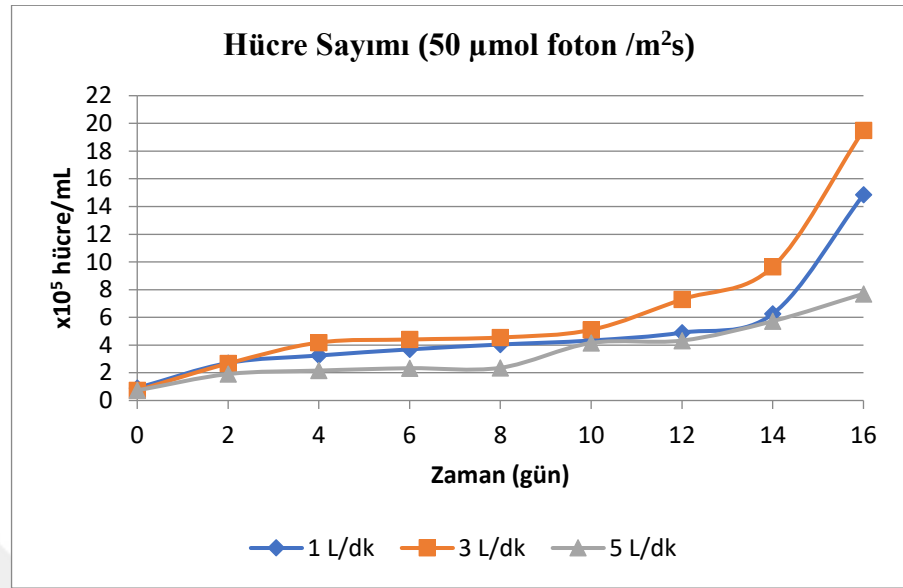
Nanofrustulum shiloi için 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarındaki 16 günlük üretimlerin spektrofotometrik ölçüm değerlerine ait grafikler Şekil 4.2 (600 nm) ve Şekil 4.3'de (680 nm) verilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda üç havalandırma hızında da 6. günden itibaren başlayan 16 günlük üretimin sonunda hücre büyümesinde belirgin bir artış olduğu görülmektedir. Bu belirtilen sürede ulaşılan sonuçlara bakılarak Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4'te yer alan grafiklere göre 1 L/dk için hücre miktarındaki artış sırasıyla 2,1, 2,5 ve 4,0 kat olarak ortalama 2,9 kat; 3 L/dk için 1,9, 2,3 ve 4,4 kat olarak ortalama 2,8 kat ve 5 L/dk için 3,0, 2,2 ve 3,3 kat olarak ortalama 2,8 kat hesaplanmıştır. Bu değerlendirmelere göre *Nanofrustulum shiloi* için 50 $\mu\text{mol foton / m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde en iyi üretimin 1 L/dk havalandırma hızında elde edildiği görülmüştür.



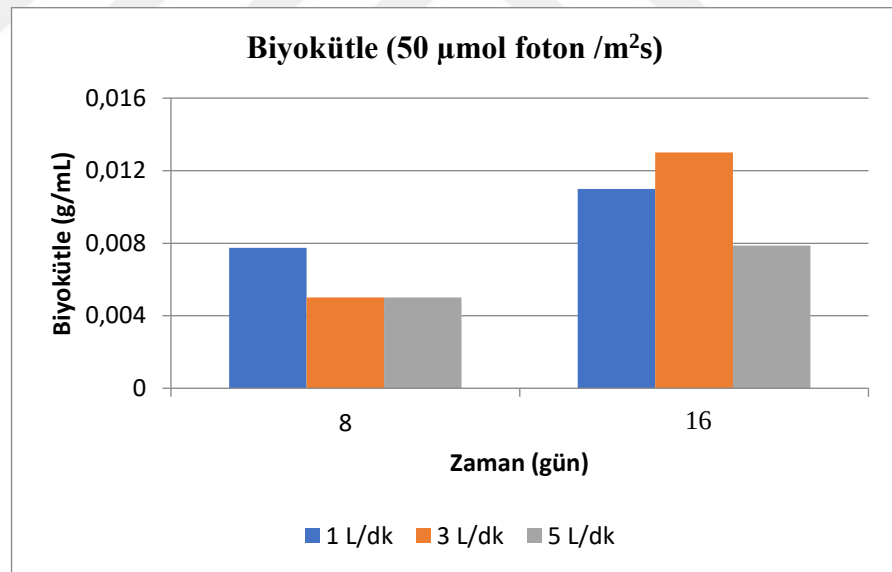
Şekil 4. 2. *Nanofrustulum shiloi* için 50 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 3. *Nanofrustulum shiloi* için 50 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 4. *Nanofrustulum shiloi* için 50 µmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.



Şekil 4. 5. *Nanofrustulum shiloi* için 50 µmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği.

Üretimler inokulum miktarları eşit ve 0,004 g/mL olarak başlatılmıştır. 8 ve 16. gün sonunda alınan örneklerin kuru ağırlık miktarları şekil 4.5'te verilmiştir. Bu grafiğin sonuçlarına göre 16. gündeki kuru ağırlık miktarı 3 L/dk havalandırma hızında daha yüksek gibi görünse de spesifik büyüme hızının 1 L/dk'da yüksek olması ile en iyi biyokütle miktarı bu koşullarda elde edilmiştir. Havalandırma hızının mikroalg hücreleri üzerinde karıştırma etkisi yaratması sebebiyle 3 L/dk'da

daha homojen örnekler alındığı için grafikte yüksek çıkmıştır. Düşük ışıkta düşük havalandırma hızı daha etkilidir.

Çizelge 4. 1. *N. shiloi* için 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin klorofil a, klorofil c ve toplam karotenoid değerleri.

Günler	Klorofil a			Klorofil c			Karotenoid		
	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk
0	0,53	0,24	0,08	0,9694	1,4341	0,6865	0,2515	0,3441	0,1586
2	0,25	1,09	0,26	2,1696	2,4703	1,1977	0,5417	0,6391	0,2894
4	0,64	0,52	0,29	3,4043	2,9389	1,1463	0,8644	0,7219	0,2711
6	0,20	1,85	0,65	4,9027	6,7613	3,2765	1,2511	1,7505	0,8462
8	1,46	3,31	0,53	5,9084	8,2283	3,7154	1,5255	2,1738	0,9401
10	3,03	2,94	1,55	6,5193	7,1358	3,8328	1,7254	1,8305	0,9705
12	3,24	3,95	2,09	8,1189	8,9429	5,1929	2,1151	2,3450	1,3332
14	5,85	3,70	4,57	10,5056	10,5177	10,1567	2,8702	2,7647	2,7323
16	6,71	5,78	5,04	10,1704	10,7741	10,8135	2,8379	2,9184	2,7909

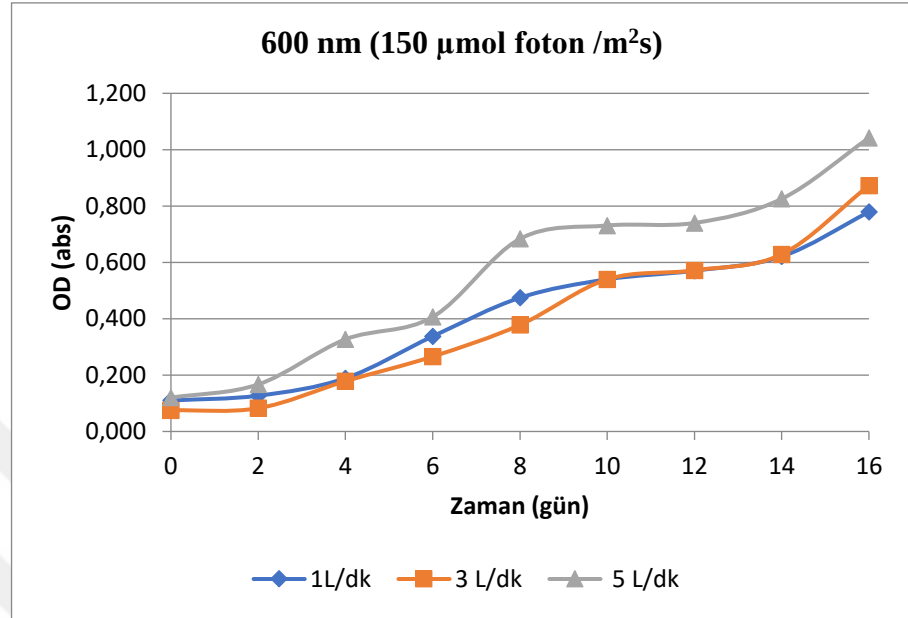
Gün aşırı alınan örneklerin ekstrelerinden elde edilen klorofil a, c ve toplam karotenoid miktarları son güne kadar artış göstermiş ve son gün yakın sonuçlar vermiştir. Bu karotenoid miktarının fukoksantin içeriği hasat sonrası HPLC analizi ile yapılmıştır.

4.1.1.2. 150 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 1, 3, 5 L/dk havalandırma hızında üretim

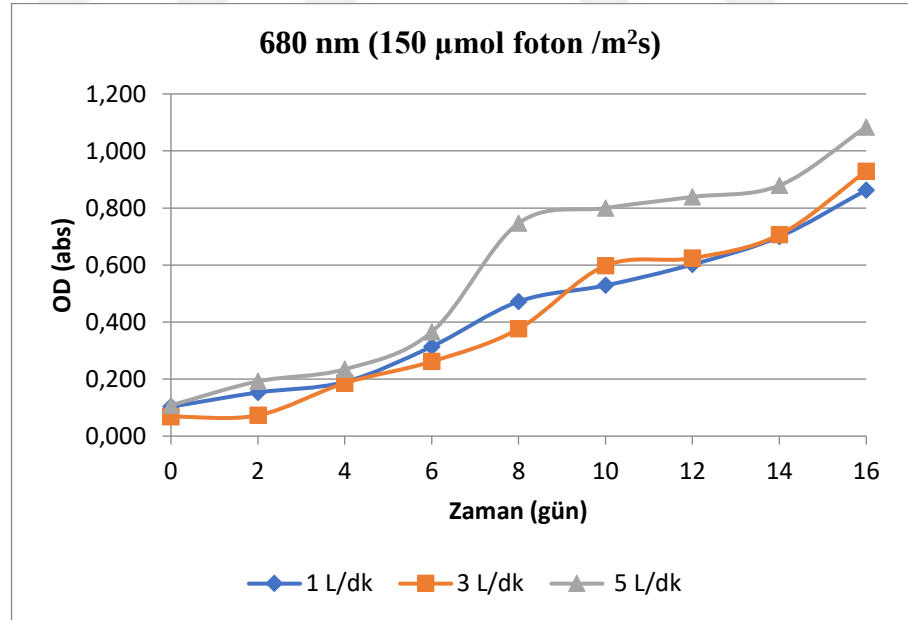
Nanofrustulum shiloi için 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarındaki 16 günlük üretimlerinin spektrofotometrik ölçüm değerlerine ait grafikler Şekil 4.6 (600 nm) ve Şekil 4.7 (680 nm)'de verilmiştir. Grafiklerde görüldüğü gibi 1, 3 ve 5 L/dk havalandırma hızlarında 6. günden itibaren yüksek ivmelenme mevcuttur. 1 ve 5 L/dk hızlarında 8 ile 14.gün arasında, 3 L/dk'da ise 10 ile 14. gün arasında durağan faz görüntüsü vardır. 14. günden sonra üç denemede de tekrar bir artışın meydana geldiği görülmektedir. Bu durağan faz görüntüsünün sebebi hücrelerin agregat oluşturmaya meyilli yapısı kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle 6. günden 16. güne kadar olan süreç göz önünde bulunarak değerlendirmeler yapılmıştır. Bu 10 günlük süreçteki üretimin Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8'e göre 1 L/dk'da sırasıyla 2,3, 2,7 ve 4,3 kat; 3 L/dk'da 3,2, 3,5 ve 3,3 kat ve 5 L/dk'da 2,6, 2,9 ve 2,5 kat artış gösterdiği hesaplanmıştır.

Bu veriler göz önünde bulundurularak 3 ve 5 L/dk'nın 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ 'deki spektrofotometrik ölçümlerinin ve hemasitometrik hücre sayımının, iyi karıştırılma ile agregat oluşumu önlediği için birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. 1 L/dk havalandırma hızının karıştırma etkisi düşük olduğu için üretim sonundaki hücre miktarı ile spektrofotometrik ölçümler arasında fark gözlenmektedir. Ayrıca bu karıştırma etkisi hücrelerin ışıktan faydalanma süresini

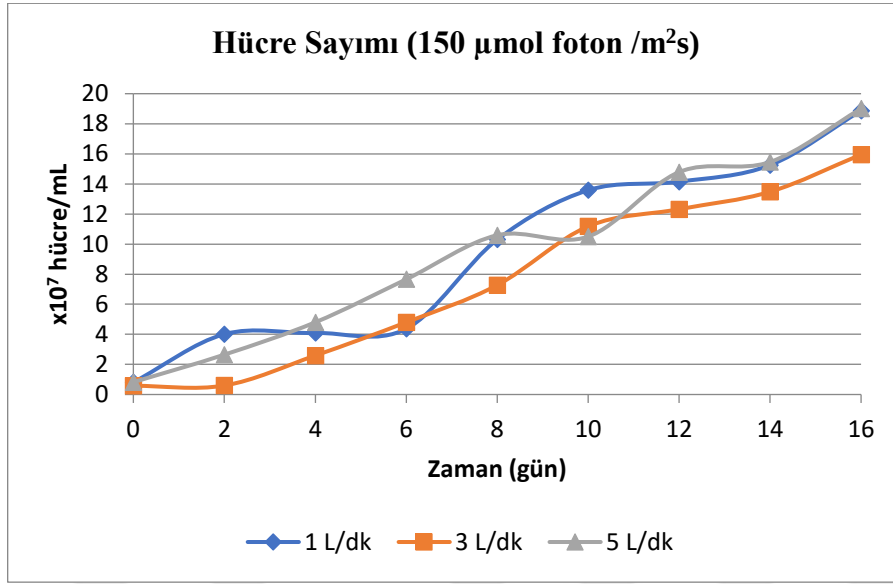
de belirlemektedir. 5 L/dk havalandırma hızında hücreler karıştırmanın etkisiyle ışıktan daha fazla yararlanabildikleri için daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.



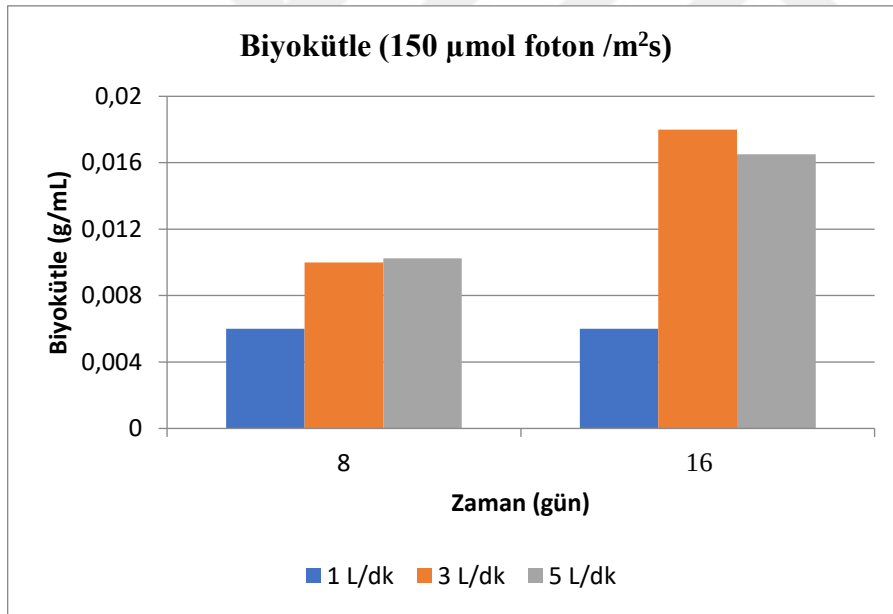
Şekil 4. 6. *Nanofrustulum shiloi* için 150 μmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm’deki zamana bağlı absorbens grafiği.



Şekil 4. 7. *Nanofrustulum shiloi* için 150 μmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm’deki zamana bağlı absorbens grafiği.



Şekil 4. 8. *Nanofrustulum shiloi* için 150 µmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.



Şekil 4. 9. *Nanofrustulum shiloi* için 150 µmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği.

Gün aşırı alınan kuru ağırlık ölçümlerine göre 1 L/dk havalandırma hızında diğer havalandırma hızlarına göre oldukça düşük üretim olduğu görülmüştür. Havalandırma hızının artışının hücrelerin büyümesinde ve ışıktan yararlanmasında etkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum spesifik büyüme hızları dikkate alındığında tutarlı bulunmuştur.

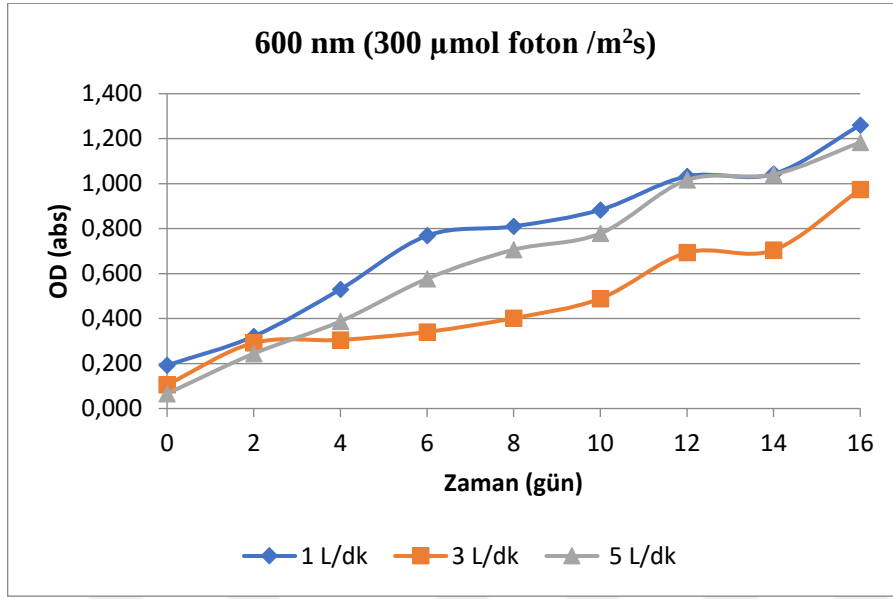
Çizelge 4. 2. *N. shiloi* için 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin klorofil a, klorofil c ve toplam karotenoid değerleri.

Günler	Klorofil a			Klorofil c			Karotenoid		
	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk
0	0,28	0,22	0,40	0,4148	0,3842	1,0933	0,1120	0,1169	0,3204
2	0,60	0,46	0,62	1,5965	1,4397	2,1037	0,4374	0,3814	0,5804
4	1,88	1,50	2,45	3,1133	2,7195	4,0812	0,8458	0,7276	1,1083
6	2,10	1,43	3,79	5,3521	5,1592	7,1230	1,4513	1,3757	1,9459
8	4,56	4,49	6,80	6,9076	6,1793	9,2002	1,9483	1,7078	2,6056
10	3,61	5,03	6,51	6,1801	8,3867	10,6688	1,6561	2,2432	2,9028
12	3,49	4,82	8,86	5,0819	9,1688	13,4807	1,3659	2,4263	3,7480
14	0,19	3,99	0,64	5,1198	9,6760	7,2862	1,2375	2,5243	1,8439
16	8,72	7,88	10,85	15,1601	23,3971	20,9477	4,1512	6,5106	5,7499

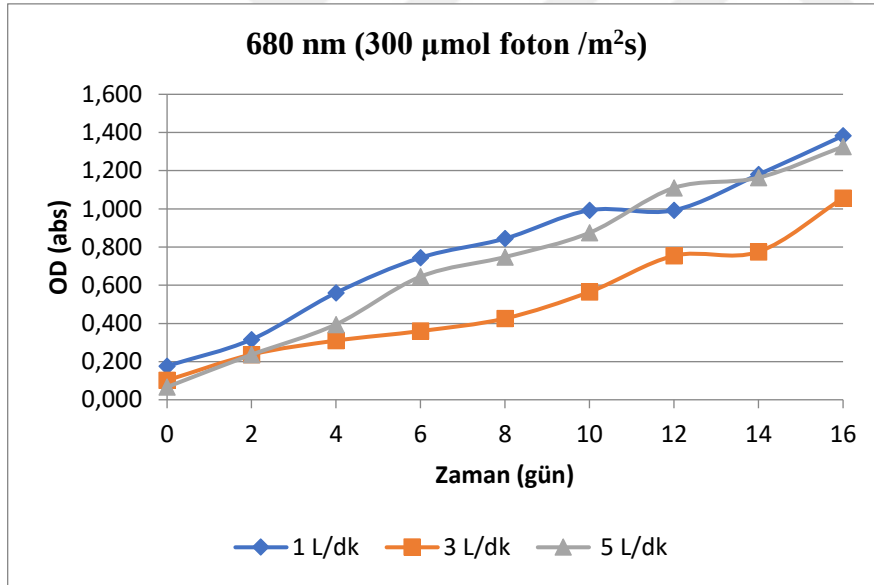
Gün aşırı alınan örneklerin ekstraksiyon sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Toplam karotenoid miktarı 3 L/dk havalandırma hızında daha yüksek miktarda elde edilmiş görünse de HPLC sonuçlarında en yüksek fukoksantin miktarı 5 L/dk havalandırma hızında meydana gelmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında *N. shiloi*’nin havalandırma hızına göre hücre içeriğindeki karotenoidlerin oranlarının değiştiğini söylemek mümkündür.

4.1.1.3. 300 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 1, 3, 5 L/dk havalandırma hızında üretim

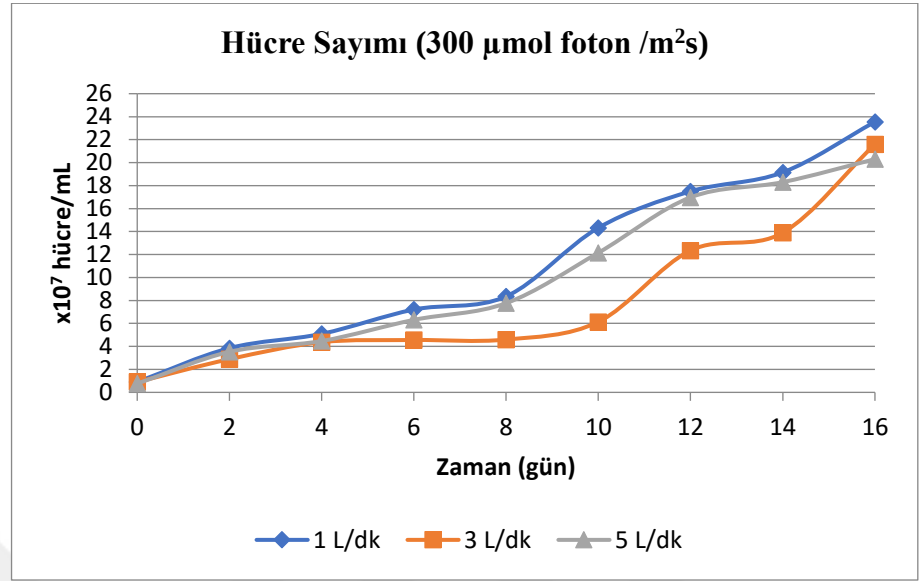
Nanofrustulum shiloi için 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarındaki 16 günlük üretimlerinin spektrofotometrik ölçüm değerlerine ait grafikler Şekil 4.10 (600 nm) ve Şekil 4.11 (680 nm)’de verilmiştir. Görüldüğü gibi ilk günden itibaren artış gözlenmektedir. Durağan fazda gibi görünen kısımlar flock oluşturan hücreler kaynaklı homojen örnek alınamamasındandır. Çünkü sonraki ölçümlerde artış yine meydana gelmiş, hücreler ölüm fazına geçmemiştir. Hücre büyümesinin ivmelendiği 4 ile 12. günler arasına bakılarak; 600 nm spektrofotometrik ölçümde 1, 3 ve 5 L/dk’da hücre miktarında sırasıyla 1,9, 2,3 ve 2,6 kat artış; 680 nm spektrofotometrik ölçümde sırasıyla 4,0, 2,4 ve 2,8 kat artış ve hemasitometrik sayımda (Şekil 4.12) sırasıyla 3,4, 2,8 ve 2,8 kat artış gözlenmektedir. Ortalama artışlara bakılacak olursa 1, 3 ve 5 L/dk’da sırasıyla 3,1, 2,5 ve 3,0 kat artış gözlemlenmektedir. Elde edilen verilere göre yüksek ışık şiddetinde havalandırma hızının etkisinin olmadığı görülmektedir. Hücreler ışık doygunluğuna ulaştığı için karıştırılmaya ihtiyaç duyulmadığı düşünülmektedir.



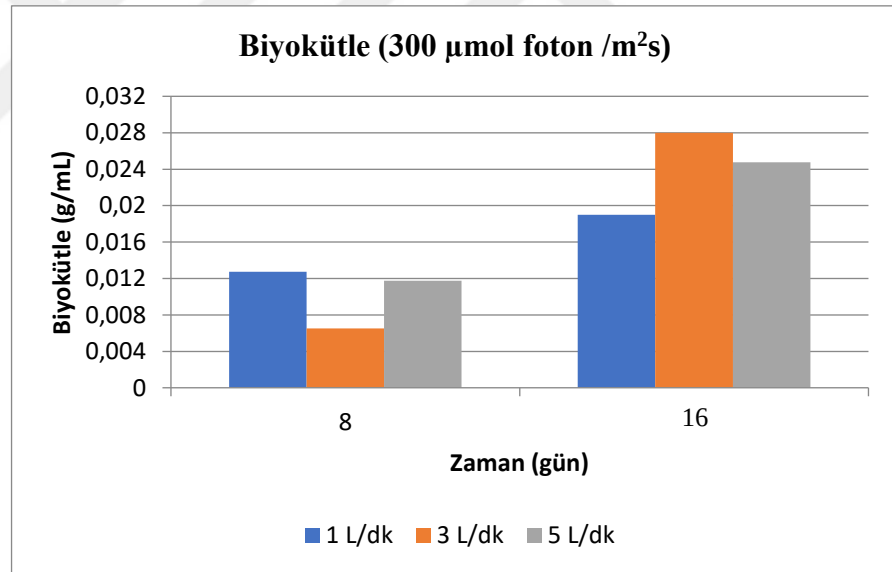
Şekil 4. 10. *Nanofrustulum shiloi* için 300 μmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 11. *Nanofrustulum shiloi* için 300 μmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 12. *Nanofrustulum shiloi* için 300 µmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.



Şekil 4. 13. *Nanofrustulum shiloi* için 300 µmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği.

Kuru ağırlık ölçümleri (Şekil 4.13) ile yukarıda yapılan hesaplamalar arasında tutarsız bir sonuç elde edildiği görülmektedir. Bunun sebebinin de düşük havalandırma hızının agregat oluşturan hücrelerin homojenizasyonunu sağlayamaması ve bu agregasyon sebebiyle 1 L/dk'da daha az miktarda biyokütlenin örnek kabına alınmasıdır. Yüksek havalandırma hızının sağladığı karıştırma ile daha homojen bir dağılımla hücrelerin örnek kabına alındığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3'te yer alan sonuçlara göre 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde klorofil a miktarı en yüksek 5 L/dk havalandırma hızında, klorofil c miktarı en yüksek 1 L/dk havalandırma hızında elde edilmiştir. Karotenoid miktarı ise en yüksek 1 L/dk havalandırma hızında elde edilmiştir. HPLC ile elde edilen sonuçlarda en yüksek fukoksantin miktarı 5 L/dk havalandırma hızında bulunmuştur. Bu sonuç toplam karotenoid miktarının yüzdesel olarak 5L/dk havalandırma hızında yüzdesel olarak daha yüksek fukoksantin barındırdığını göstermektedir.

Çizelge 4. 3. *N. shiloi* için 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin klorofil a, klorofil c ve toplam karotenoid değerleri.

Günler	Klorofil a			Klorofil c			Karotenoid		
	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk
0	0,07	0,16	0,59	0,8794	0,9212	1,1125	0,2087	0,2218	0,2965
2	1,07	0,13	0,47	2,2629	2,3698	1,9582	0,5801	0,5947	0,4904
4	1,29	0,47	0,58	4,7114	3,0265	2,8666	1,1969	0,7699	0,7170
6	4,94	1,07	3,63	12,4807	6,1785	9,6599	3,3301	1,6437	2,5673
8	6,81	2,83	3,18	16,3344	7,7235	11,6310	4,3669	2,0084	3,0018
10	10,63	2,86	6,18	22,1109	6,9349	15,0539	6,0717	1,8128	3,9887
12	9,78	4,21	8,30	21,0354	11,3256	18,0426	5,8313	3,0389	4,8559
14	10,82	5,27	10,94	25,6712	13,4003	22,4566	6,9866	3,5941	6,1427
16	12,67	9,18	12,79	23,3319	15,3851	20,3143	6,5371	4,3098	5,6637

4.1.1.4. Farklı ışık şiddeti ve havalandırma hızı sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi

Nanofrustulum shiloi için farklı ışık şiddeti ve havalandırma hızlarında yapılan üretimlerin spesifik büyüme hızları karşılaştırıldığında 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde en iyi üretim sırasıyla 1 L/dk > 5 L/dk > 3 L/dk olarak; 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde en iyi üretim sırasıyla 5 L/dk > 3 L/dk > 1 L/dk olarak; 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde en iyi üretim sırasıyla 1 L/dk > 5 L/dk > 3 L/dk olarak elde edilmiştir. Bu mikroalglerin üretimleri sonrası elde edilen fukoksantin miktarları karşılaştırıldığında (Çizelge 4.4.) bütün ışık şiddetlerinde en iyi fukoksantin miktarları 5 L/dk > 3 L/dk > 1 L/dk olarak görülmektedir. Bu sonuçlar havalandırma hızının fukoksantin üretimi üzerinde etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

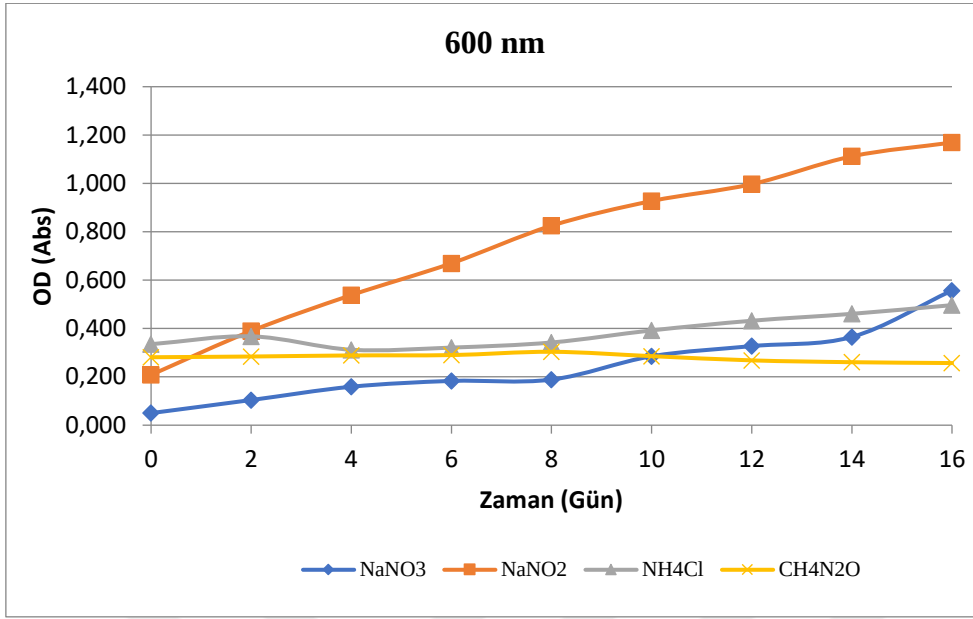
Çizelge 4.4' e bakılarak spesifik büyüme hızı en iyi 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddeti ve 5 L/dk havalandırma hızında elde edilmiş olsa da bu çalışmada karotenoid eldesinin optimizasyonu hedeflendiği için ve büyük bir fark ile daha yüksek miktarda fukoksantin elde edildiği için 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde ve 5 L/dk havalandırma hızında büyük ölçekli üretime geçilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 4. 4. *N. shiloi* için farklı ışık şiddeti ve havalandırma hızındaki üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve fukoksantin miktarı.

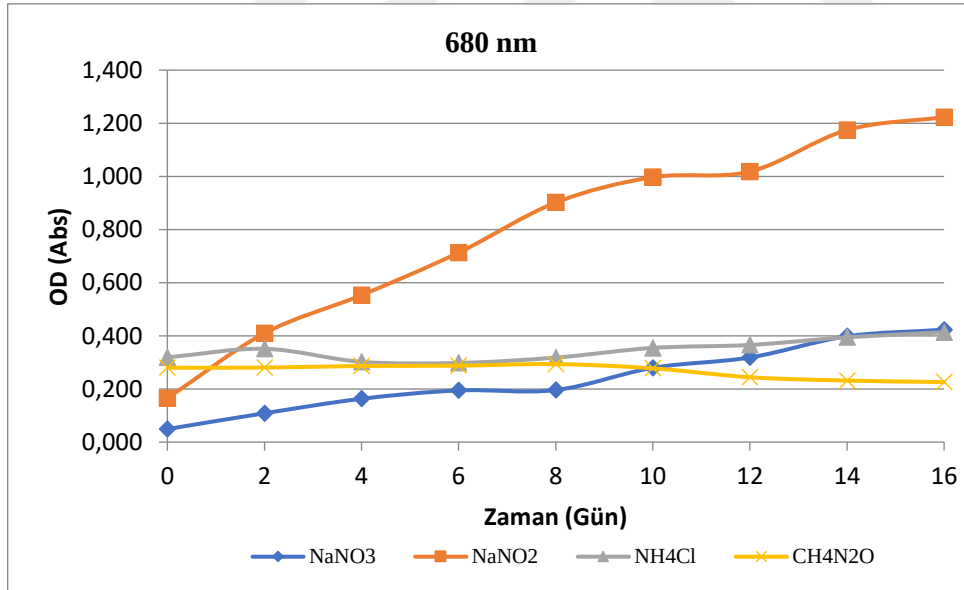
SET	Işık şiddeti ($\mu\text{mol foton}/\text{m}^2\text{s}$) ve Havalandırma hızı (L/dk)	Spesifik Büyüme hızı μ (gün^{-1})	İkilenme Süresi (gün)	Son Biyokütle (g/2L)	Fukoksantin (mg/g)
Kontrol	100 – 2	0,110	6,307	0,80	13,16
1	50 – 1	0,175	3,951	0,49	33,52
	50 – 3	0,160	4,330	0,56	38,06
	50 – 5	0,166	4,178	0,37	51,05
2	150 – 1	0,203	3,409	0,55	10,86
	150 – 3	0,224	3,089	0,88	19,75
	150 – 5	0,330	2,099	0,86	23,47
3	300 – 1	0,269	2,578	1,02	21,85
	300 – 3	0,188	3,684	0,73	26,79
	300 – 5	0,221	3,143	1,01	28,04

4.1.2. *Nanofrustulum shiloi*'nin Büyümesinde ve Fukoksantin Üretiminde Farklı Azot Kaynağının Etkisi

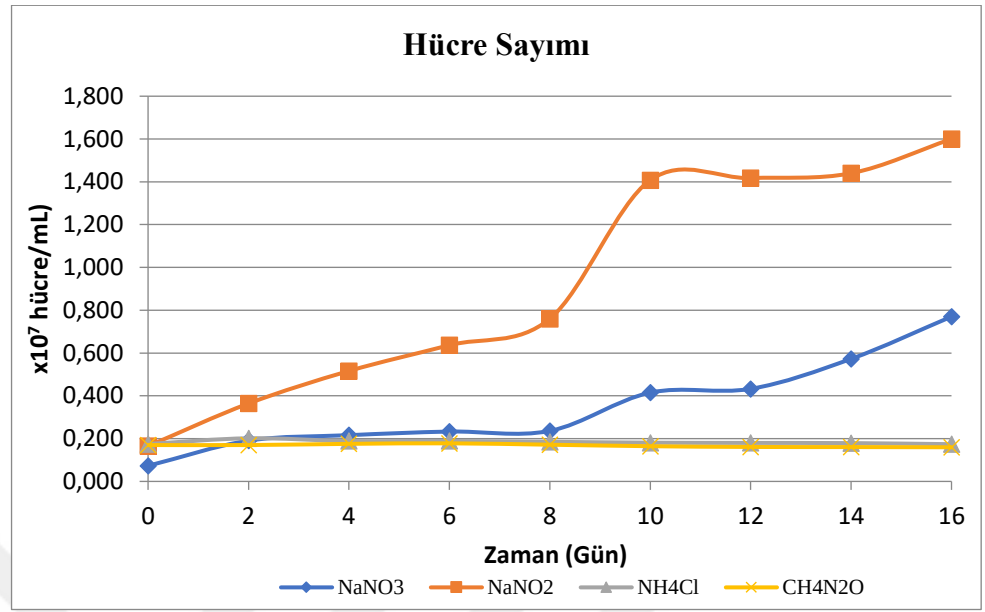
Nanofrustulum shiloi için en uygun olduğu belirlenen $50 \mu\text{mol foton}/\text{m}^2\text{s}$ ışık şiddeti ve 5 L/dk havalandırma hızı sabit tutularak farklı azot kaynakları (nitrat, nitrit, amonyum klorür, üre) için deney seti kurulmuştur. 16 gün boyunca üretime devam edilirken gün aşırı üretimden alınan örneklerin 600 nm ve 680 nm'deki spektrofotometrik ölçüm değerleri ve hemasitometrik hücre sayım değerleri sırasıyla şekil 4.14, 4.15 ve 4.16'da verilmiştir. Grafiklerden de görüldüğü üzere en yüksek miktarda biyokütle üretimi nitrit (NaNO_2) varlığında, sonrasında kontrol grubu olarak kabul edilen nitrat (NaNO_3) varlığında elde edilmiştir. Nitrit varlığının *N. shiloi* hücrelerini yüksek oranda üremeye teşvik ettiği anlaşılmaktadır. Amonyum klorür ve üre varlığında ise hücrelerin ölümü 0. günden itibaren gerçekleşmiştir. *N. shiloi*'nin bu stres koşulları altında varlığını sürdüremediğini gözlemlenmiştir.



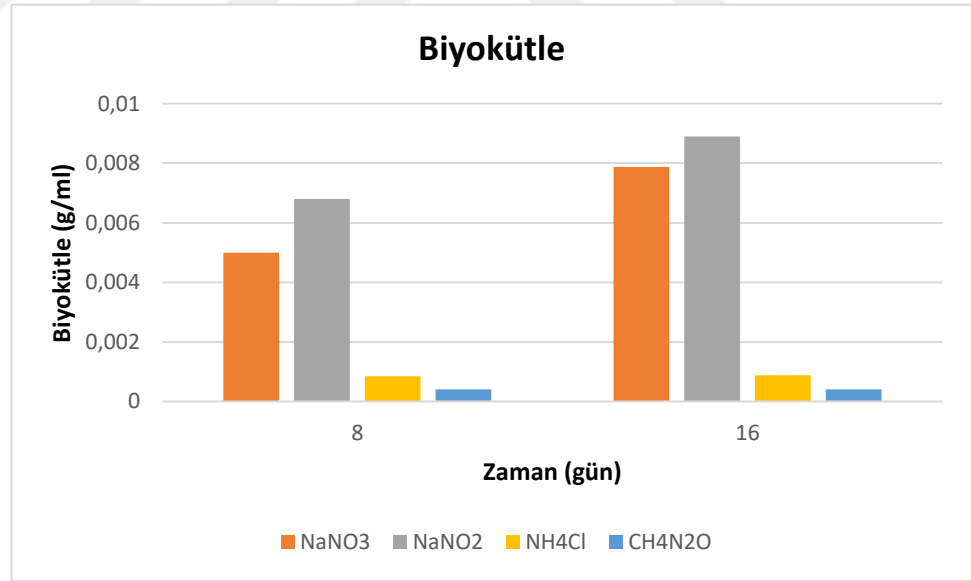
Şekil 4. 14. *Nanofrustulum shiloi* için farklı azot kaynaklarında alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 15. *Nanofrustulum shiloi* için farklı azot kaynaklarında alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 16. *Nanofrustulum shiloi* için farklı azot kaynaklarında alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.



Şekil 4. 17. *Nanofrustulum shiloi* için farklı azot kaynaklarında alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği.

Şekil 4.17’de verilen biyokütle grafiğine göre amonyum klorür ve üre bulunan ortamın biyokütlesi sabit gözlenmekte, nitrit ve nitrat bulunan ortamda biyokütle miktarının arttığı gözlenmiştir. Sonraki bölümde görüleceği gibi amonyum klorürlü ortamda hücreler ölüm fazına geçmişlerdir ve ölçülen biyokütle değeri ölü hücre floklarının örnek kabına gelmesi sebebiyledir. Son biyokütle

miktarları göz önüne alınarak nitritli ortamdan en yüksek miktarda biyokütle elde edildiği ve bunu nitratin takip ettiği görülmektedir.

Çizelge 4. 5. *N. shiloi* için farklı azot kaynağındaki (sodyum nitrat, sodyum nitrit, amonyum klorür, üre) üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve fukoksantin miktarı.

SET	Azot Kaynağı	Spesifik Büyüme Hızı μ (gün^{-1})	İkilenme Süresi (gün)	Son Biyokütle (g/2 L)	Fukoksantin (mg/g)
4	Nitrat (NaNO_3)	0,166	4,178	0,37	51,05
	Nitrit (NaNO_2)	0,1615	4,292	1,24	19,18
	Amonyum Klorür (NH_4Cl)	-	-	0,31	-
	Üre ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)	0,0403	17,216	0,10	2,56

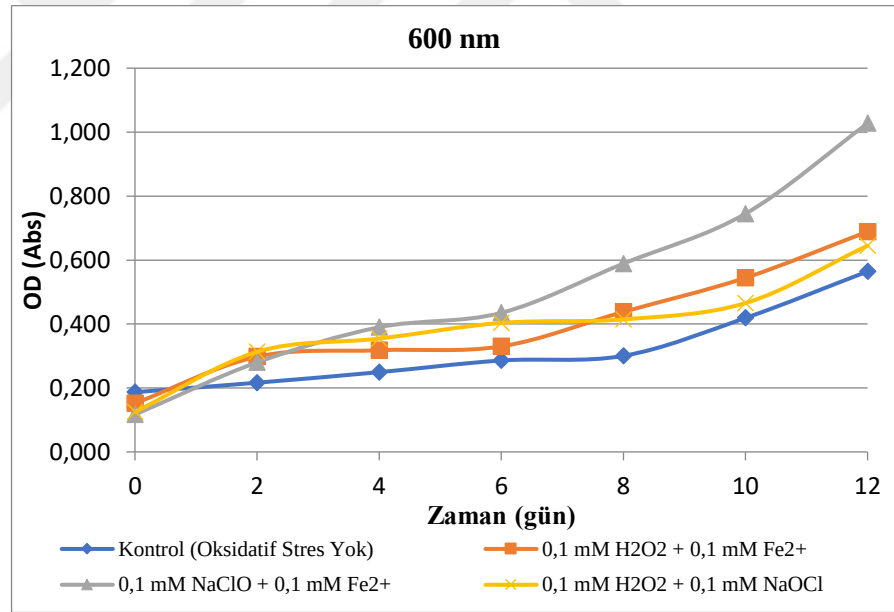
Çizelge 4.5'te de görüldüğü gibi hem spesifik büyüme hızı hem de elde edilen fukoksantin miktarı en yüksek olan mikroalgler azot kaynağı olarak nitratin kullanıldığı ortamdır. Bu sebeple ölçek büyütmede azot kaynağı olarak nitratin kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.3. *Nanofrustulum shiloi*'nin Büyümesinde ve Fukoksantin Üretiminde Oksidatif Stresin Etkisi

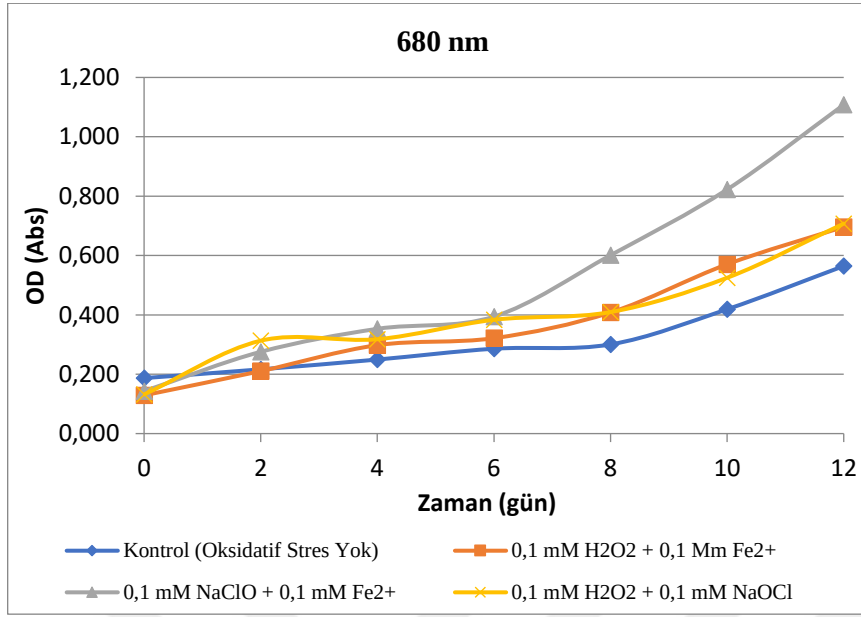
Farklı ışık şiddeti ve havalandırma hızı deney setlerinin sonucuna göre *N. shiloi* için en uygun koşul olarak belirlenen $50 \mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddeti ve 5 L/dk havalandırma hızı sabit tutularak farklı oksidatif stres faktörleri (kontrol, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$, $\text{NaOCl} + \text{Fe}^{2+}$, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOCl}$) için deney setleri kurulmuş ve çift tekrarlı ölçümler yapılmıştır. $\text{H}_2\text{O}_2 + 0,1 \text{ mM Fe}^{2+}$ ve $\text{NaClO} + 0,1 \text{ mM Fe}^{2+}$ stres koşullarına maruz bırakılan deney setlerinde şekil 4.18'de görüldüğü üzere hücre büyümesi durduğu için üretim 12. günde sonlanmıştır. 12 gün boyunca devam eden üretimden gün aşırı alınan örneklerin spektrofotometrik sonuçları ve hemasitometrik hücre sayım sonuçları şekil 4.19 (600 nm), şekil 4.20 (680 nm) ve şekil 4.21'de verilmiştir. *N. shiloi* hücrelerinin agregat oluşturmaya meyilli yapısından dolayı spesifik büyüme hızı ve hasat sonrası biyokütle miktarı ile gün aşırı alınan örneklerin spektrofotometrik ölçüm ve hemasitometrik hücre sayımları birbiri ile tutarlı sonuçlar vermemektedir. Bu sebepten dolayı en iyi oksidatif stres koşulu belirlenirken hasat sonrası biyokütle ve fukoksantin miktarları göz önünde bulundurulmuştur.



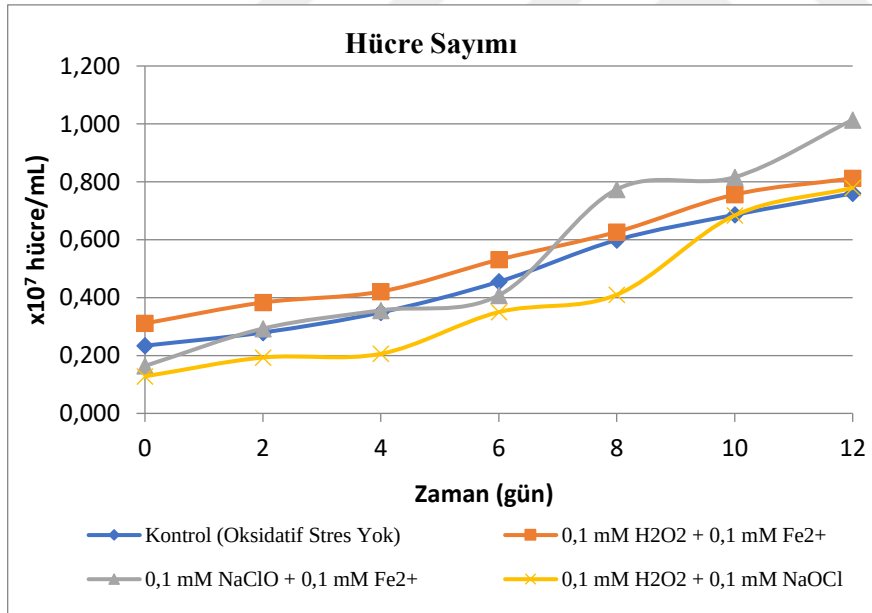
Şekil 4.18. *N. shiloi* oksidatif deney setlerinde hücre büyümesinin gözlemlenmesi



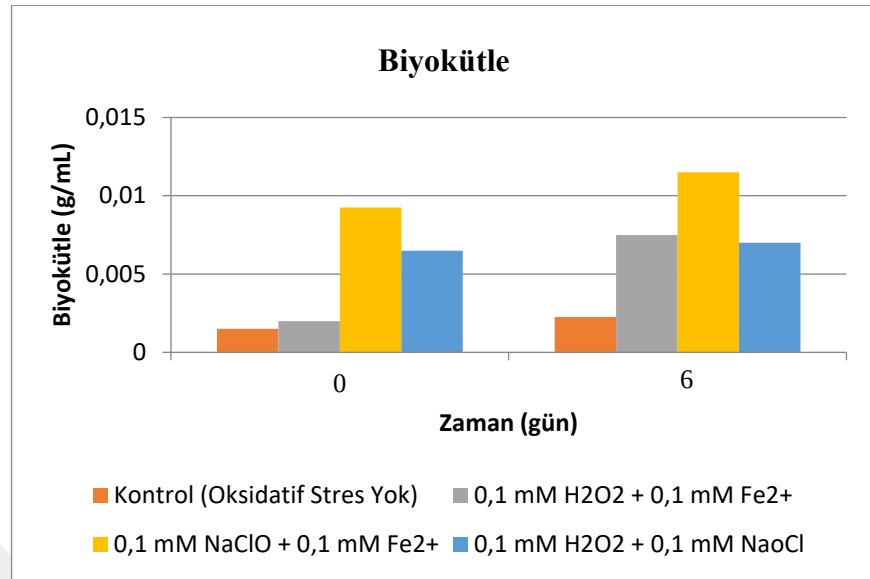
Şekil 4. 19. *N. shiloi* için oksidatif stres uygulamasında alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 20. *N. shiloi* için oksidatif stres uygulamasında alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 21. *N. shiloi* için farklı oksidatif stres uygulamalarında alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.



Şekil 4. 22. *N. shiloi* için farklı oksidatif stres uygulamalarında alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği.

16 günlük üretimin 12. günde sonlanmasının sebebi $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ ve $\text{NaOCl} + \text{Fe}^{2+}$ oksidatif stresli ortamlarda *N. shiloi* hücrelerinin ölüm fazına girmiş olmalarıdır. Her ne kadar biyokütle grafiğinde (şekil 4.22) en yüksek biyokütle miktarı $\text{NaOCl} + \text{Fe}^{2+}$ ilaveli ortamda gibi görünse de alınan örnekte ölü flok hücre ve hücre parçacıkları yer aldığı için böyle bir sonuç elde edilmiştir.

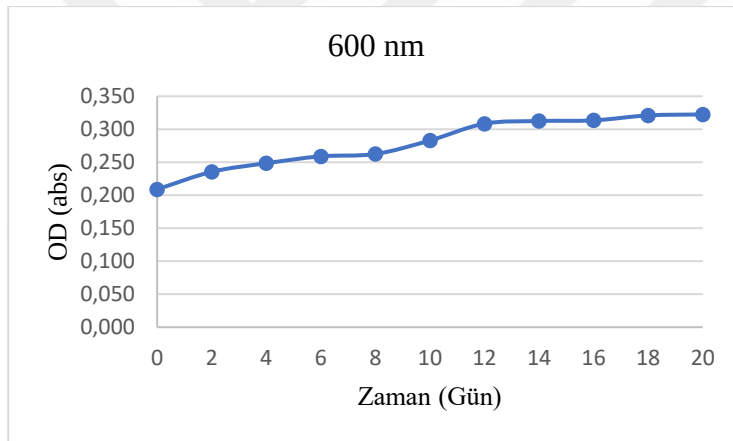
Çizelge 4.6'te görüldüğü gibi spesifik büyüme hızı en yüksek kontrol grubundadır. Ancak $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOCl}$ stres koşullarındaki spesifik büyüme hızı ile oldukça yakındır. Bu yakınlığa rağmen fukoksantin miktarının $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOCl}$ stresine maruz kalan ortamda neredeyse 2 katına çıktığı görülmektedir. Demir içermeyen oksidatif strese maruz bırakılan hücrelerin daha yüksek miktarda fukoksantin üretimine teşvik ettiği anlaşılmaktadır. Ölüm fazına geçen hücrelerin sadece demir içeren iki oksidatif stres gruplarında meydana gelmesi demir ile hücrelerin metabolik yolları arasındaki bir ilişkiden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4. 6. *N. shiloi* için farklı oksidatif stres koşullarındaki (Kontrol grubu, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$, $\text{NaOCl} + \text{Fe}^{2+}$, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOCl}$) üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve fukoksantin miktarı.

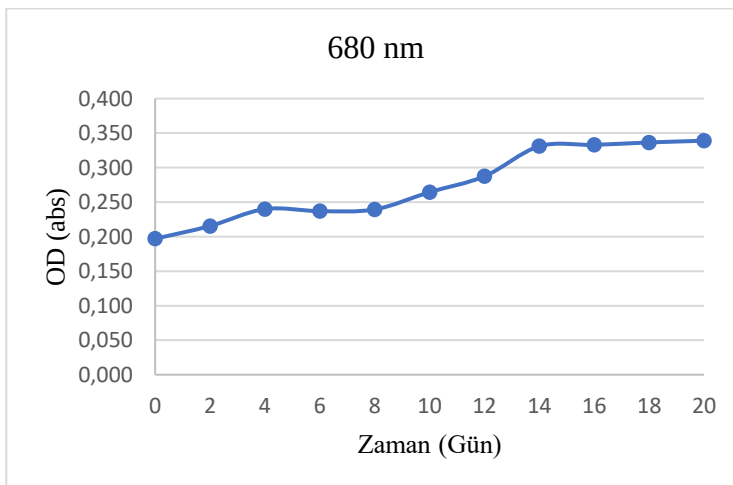
SET	Oksidatif Stres Kaynağı	Spesifik Büyüme Hızı μ (gün ⁻¹)	İkilenme Süresi (gün)	Son Biyokütle (g/2 L)	Fukoksantin (mg/g)
5	Kontrol Grubu (Oksidatif Stres Yok)	0,1662	4,1703	1,10	50,17
	0,1 mM $\text{H}_2\text{O}_2 + 0,1$ mM Fe^{2+}	0,1416	4,8964	0,38	58,20
	0,1 mM $\text{NaClO} + 0,1$ mM Fe^{2+}	0,1515	4,574	0,46	65,14
	0,1 mM $\text{H}_2\text{O}_2 + 0,1$ mM NaOCl	0,1631	4,2506	0,84	97,45

4.1.4. *Nanofrustulum shiloi*'nin 6 L Panel Fotobiyoreaktörde Üretimi

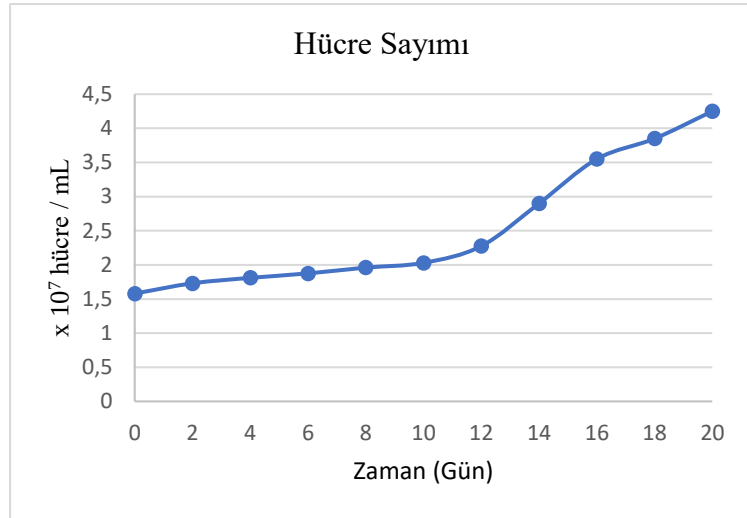
N. shiloi için yapılan farklı ışık şiddeti, havalandırma hızı, azot kaynağı ve oksidatif stres denemeleri sonrasında optimum karotenoid üretimi $50 \mu\text{mol foton} / \text{m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde, 5 L/dk havalandırma hızında, nitrat içeren ve $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOCl}$ kimyasallarıyla oksidatif stres uygulanan koşullar olarak belirlenmiş ve 6 L'lik büyük ölçekli üretime geçilmiştir. Üretim sonrasında elde edilen spektrofotometrik ve hemisitometrik hücre sayımı sonuçlarına ait grafikler Şekil 4.23 (600 nm), Şekil 4.24 (680 nm) ve Şekil 4.25 (hücre sayımı)'de verilmiştir. Önceki bölümlerdeki biyokütle sonuçları göz önünde bulundurularak küçük ölçekli üretimlerde elde edilen en yüksek biyokütle miktarından yaklaşık üç kat fazla biyokütle beklenerek büyük ölçekli üretim kurulmuştur. Üretim sonrasındaki son biyokütle miktarına göre yaklaşık 6 kat fazla biyokütle hasat edilmiştir. Bu da *N. shiloi* hücrelerinin büyük ölçek üretiminde panel fotobiyoreaktörlerin kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Bu tip reaktör ile hücrelerin fotosentez için gerekli ışıktan yeterli miktarda faydalanabildiği ve karışımın yeterli olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.23. *N. shiloi* için 6 L üretimde örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği



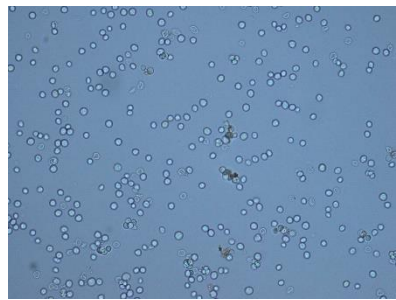
Şekil 4.24. *N. shiloi* için 6 L üretimde örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği



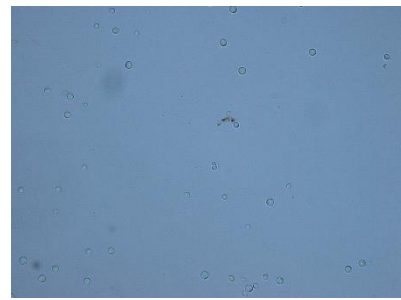
Şekil 4.25. *N. shiloi* için 6 L üretimde zamana bağlı hücre sayım grafiği

4.2. *Scenedesmus obliquus* 'un Büyümesi ve Loroksantin Üretimi

Bu çalışmada EGE-MACC'ten alınan *Scenedesmus obliquus* hücrelerinin üretiminde ve *Scenedesmus obliquus*'tan fukoksantin eldesinde optimum üretim koşullarını belirlemek için ışık şiddeti, havalandırma hızı, azot türü ve oksidatif stres koşulları incelenmiştir. 1 L'lik küçük ölçeklerde bu koşullarda üretim gerçekleştirilerek analizler yapılmıştır. Belirlenen optimum üretim koşulları altında 6 L'lik panel fotobiyoreaktöre geçilerek büyük ölçekli üretimi yapılmıştır. Şekil 4.26'te *Scenedesmus obliquus* hücrelerinin üretimi için kurulan sistemlerden alınan örneklerin mikroskop görüntüleri verilmiştir.



(1)



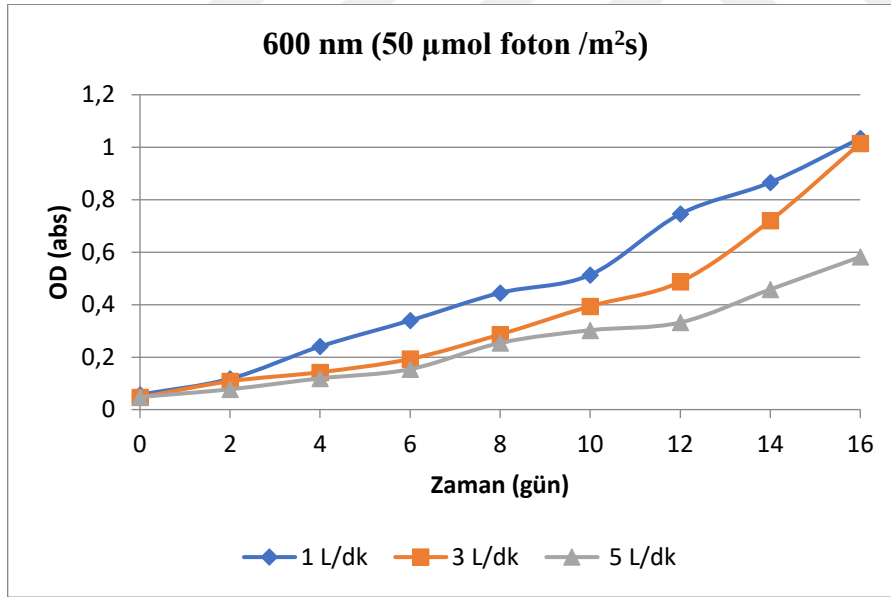
(2)

Şekil 4. 26. *Scenedesmus obliquus* hücrelerinin mikroskop görüntüleri 1) derişik 2) seyreltik. (400x büyütme)

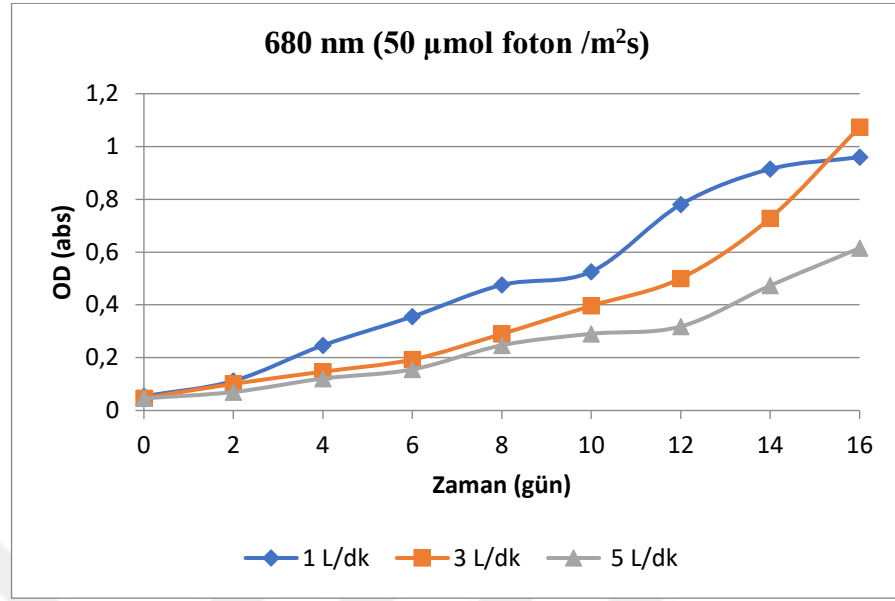
4.2.1. *Scenedesmus obliquus*'un Büyümesinde ve Loroksantin Üretiminde Farklı Işık Şiddeti ve Havalandırma Hızının Etkisi

4.2.1.1. 50 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 1, 3, 5 L/dk havalandırma hızında üretim

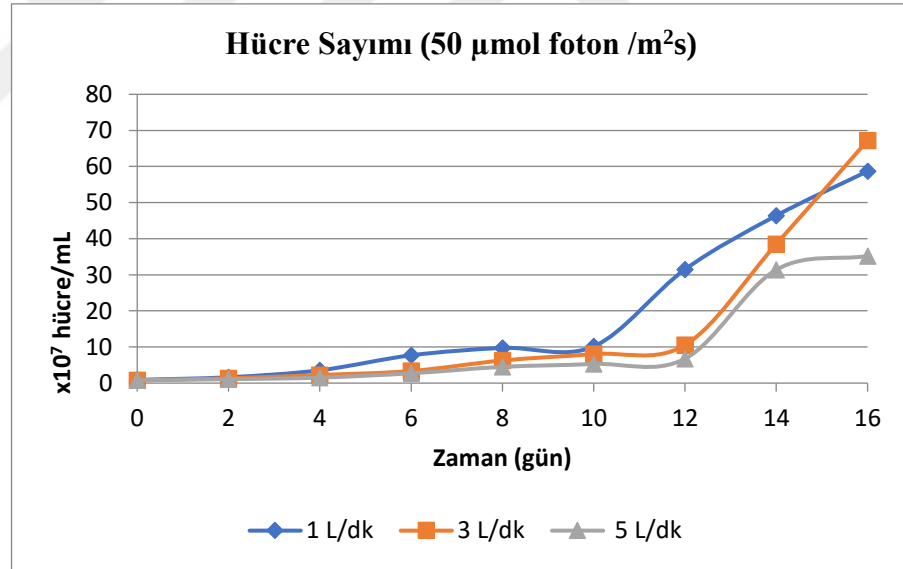
Scenedesmus obliquus 50 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarındaki 16 günlük üretimlere ait spektrofotometrik ölçüm değerlerine ait grafikler Şekil 4.27 (600 nm) ve Şekil 4.28'de (680 nm) verilmiştir. Bu grafiklere ve hücre sayımının yer aldığı Şekil 4.29'ya bakılarak hücre miktarında 10. gün ile 12. gün arasında belirgin bir artış görülmektedir. Bu 2 günlük süreç baz alınarak değerlendirmeler yapılmıştır. Hücre miktarında 1 L/dk havalandırma hızında 600 nm, 680 nm ve hücre sayımına göre sırasıyla 1,4, 1,5 ve 3,1 kat; 3 L/dk havalandırma hızında sırasıyla 1,2, 1,3 ve 1,3 kat; 5 L/dk havalandırma hızında 1,1, 1,1 ve 1,3 kat artış gözlemlenmektedir. Ortalamalara göre değerlendirme yapıldığında en yüksek hücre büyümesine 1 L/dk havalandırma hızında ulaşıldığı sonucuna varılmıştır. Buna göre düşük ışık şiddetinde havalandırma hızının hücre büyümesinde etkisi olmadığı anlaşılmaktadır.



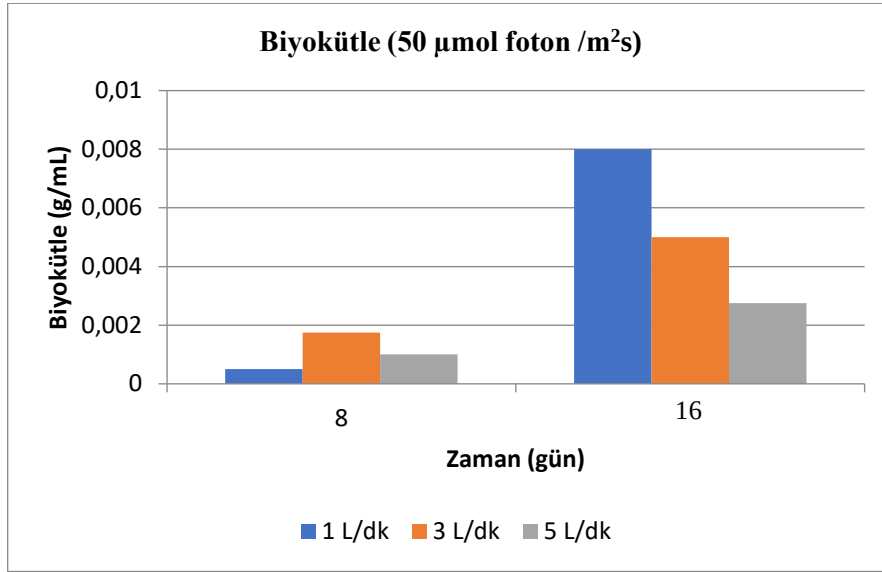
Şekil 4. 27. *Scenedesmus obliquus* için 50 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 28. *Scenedesmus obliquus* için 50 μ mol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 29. *Scenedesmus obliquus* için 50 μ mol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayısı grafiği.



Şekil 4. 30. *Scenedesmus obliquus* için 50 µmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği.

S. obliquus hücrelerinin kuru ağırlıklarına bakıldığında (Şekil 4.30) ise hücre büyümesi ile tutarlı sonuçlar gözlenmektedir. Üretim sonundaki kuru ağırlık miktarı da hücre büyümesinde olduğu gibi en yüksek 1 L/dk havalandırma hızında elde edilmiştir.

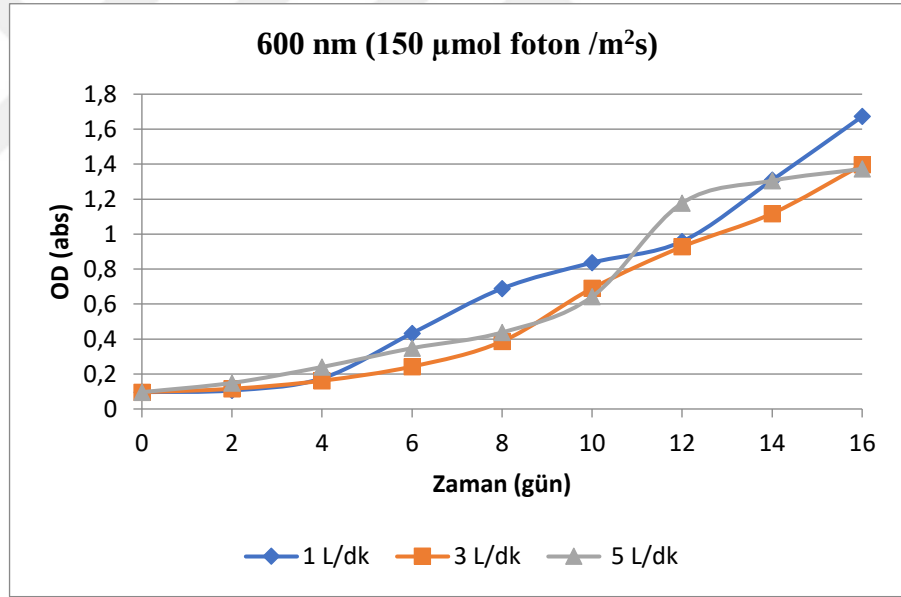
Çizelge 4. 7. *S. obliquus* için 50 µmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin spektrofotometrik klorofil a, b ve toplam karotenoid değerleri.

Günler	Klorofil a			Klorofil b			Karotenoid		
	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk
0	0,32	0,22	0,21	0,3684	0,3266	0,3081	0,0581	0,0279	0,0098
2	0,73	0,53	0,37	0,6504	0,5233	0,4672	0,1276	0,1326	0,0563
4	1,73	0,99	0,79	1,1704	0,7575	0,7024	0,4151	0,2454	0,1964
6	2,88	1,86	1,13	1,7562	1,2553	0,8953	0,6606	0,4482	0,2813
8	4,05	2,17	1,99	2,3851	1,3582	1,2900	0,8977	0,5121	0,4616
10	3,52	2,51	1,90	2,0804	1,6013	1,2576	0,7912	0,4643	0,3928
12	6,27	3,62	2,09	3,5925	2,2126	1,3225	1,2009	0,5947	0,4008
14	7,10	5,20	2,63	4,0847	3,1519	1,6518	0,9712	0,9467	0,5174
16	10,81	6,40	4,40	6,2393	3,9957	2,6403	2,0273	1,1243	0,8742

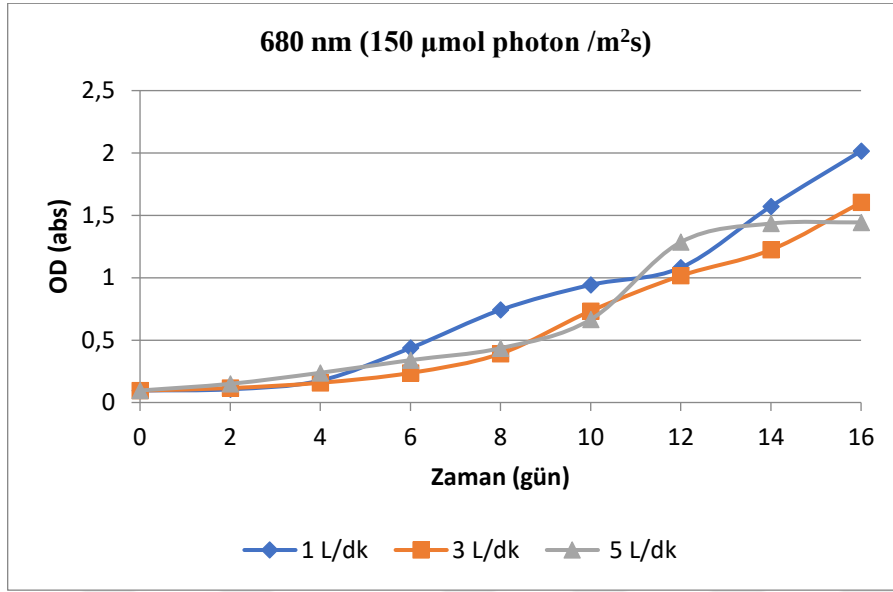
Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi hücrelerin toplam karotenoid miktarları 50 µmol foton/m²s ışık şiddetinde 1 L/dk havalandırma hızı için en yüksek değerdedir ve bu sonuçlar HPLC analizinden elde edilen loroksantin sonuçları ile benzerdir. Bu durumda hücreler düşük ışık şiddetinde düşük havalandırma hızında daha çok karotenoid üretmiştir.

4.2.1.2. 150 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 1, 3, 5 L/dk havalandırma hızında üretim

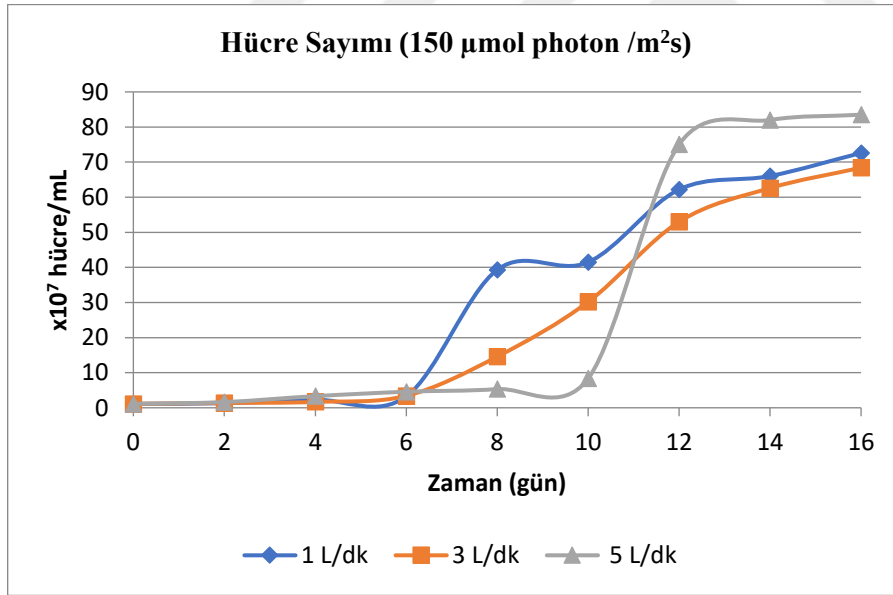
150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarındaki 16 günlük üretimlere ait spektrofotometrik ölçüm değerlerine ait grafikler Şekil 4.31 (600 nm) ve Şekil 4.32'de (680 nm), hemasitometrik hücre sayımına ait grafik ise şekil 4.33'de verilmiştir. Büyümenin ivmelendiği 8 ile 12. gün arasına bakıldığında 600 nm'deki ölçümlere göre 1, 3 ve 5 L/dk havalandırma hızlarında biyokütle sırasıyla 1,4, 2,4 ve 2,7 kat; 680 nm'de sırasıyla 1,4, 2,6 ve 2,9 kat ve hücre sayımına bakıldığında sırasıyla 1,6, 3,6 ve 14,1 kat artış görülmektedir. Bu ışık şiddetinde yapılan üretimde havalandırma hızının artması hücre miktarının artmasını sağlamaktadır. Havalandırma hızının hücrelerin ışıktan yararlanmasını arttırdığı bu sayede biyokütlenin arttığı anlaşılmaktadır.



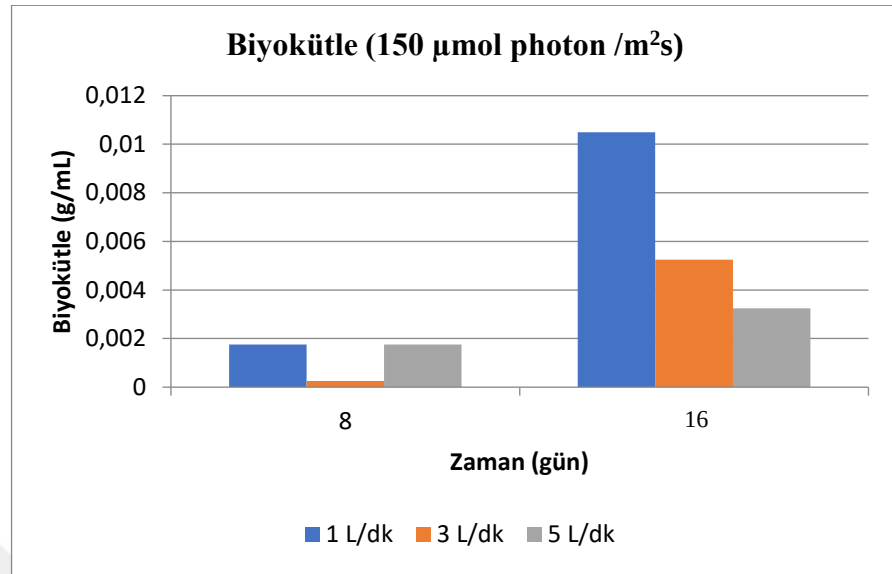
Şekil 4. 31. *Scenedesmus obliquus* için 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 32. *Scenedesmus obliquus* için 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 33. *Scenedesmus obliquus* için 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.



Şekil 4. 34. *Scenedesmus obliquus* için 150 µmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği.

Çizelge 4.8'e göre 150 µmol foton/m²s ışık şiddetinde en yüksek klorofil a, b ve toplam karotenoid miktarı 1 L/dk havalandırma hızında elde edilmiştir. Fukoksantin miktarı da en yüksek 1 L/dk havalandırma hızında saptanmıştır.

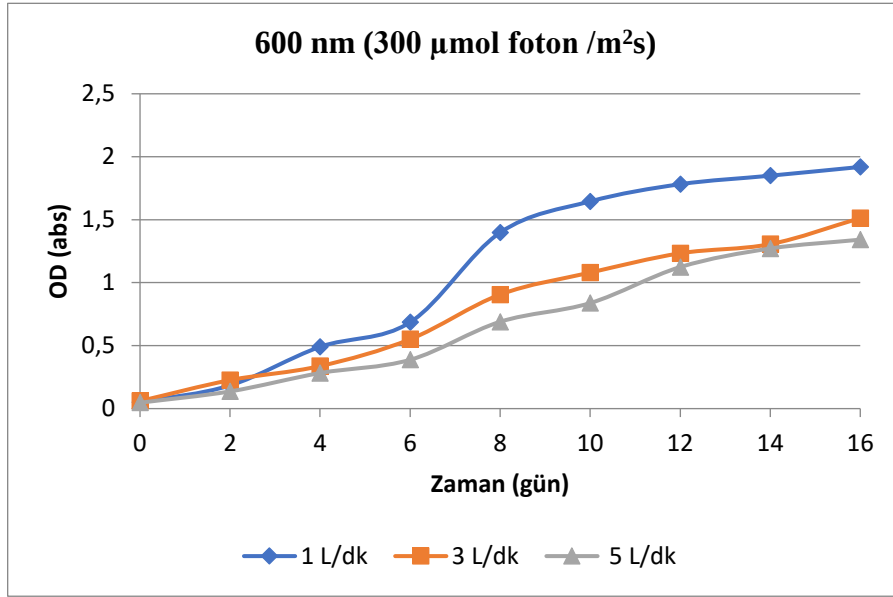
Çizelge 4. 8. *S. obliquus* için 150 µmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin spektrofotometrik klorofil a, b ve toplam karotenoid değerleri.

Günler	Klorofil a			Klorofil b			Karotenoid		
	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk
0	0,84	0,84	0,84	0,5139	0,5139	0,5139	0,1513	0,1513	0,1513
2	0,64	1,10	1,00	0,3743	0,6772	0,5886	0,1479	0,2393	0,2138
4	1,48	1,29	1,97	0,8414	0,8234	1,1624	0,3152	0,2684	0,41565
6	4,02	1,94	2,82	2,3202	1,1536	1,6574	0,8115	0,4338	0,6078
8	6,12	2,67	3,04	3,2645	1,4824	1,7311	1,3434	0,6219	0,6477
10	7,29	5,78	5,04	4,0089	3,2464	2,7710	1,5591	1,2225	1,1021
12	8,81	8,97	9,10	5,0151	5,1835	5,1872	1,8360	1,8439	2,0832
14	11,91	12,93	9,10	8,8061	8,8792	5,6369	2,8365	2,6332	2,1096
16	16,51	12,52	8,24	12,8042	7,2133	4,683	4,1958	2,9041	1,9659

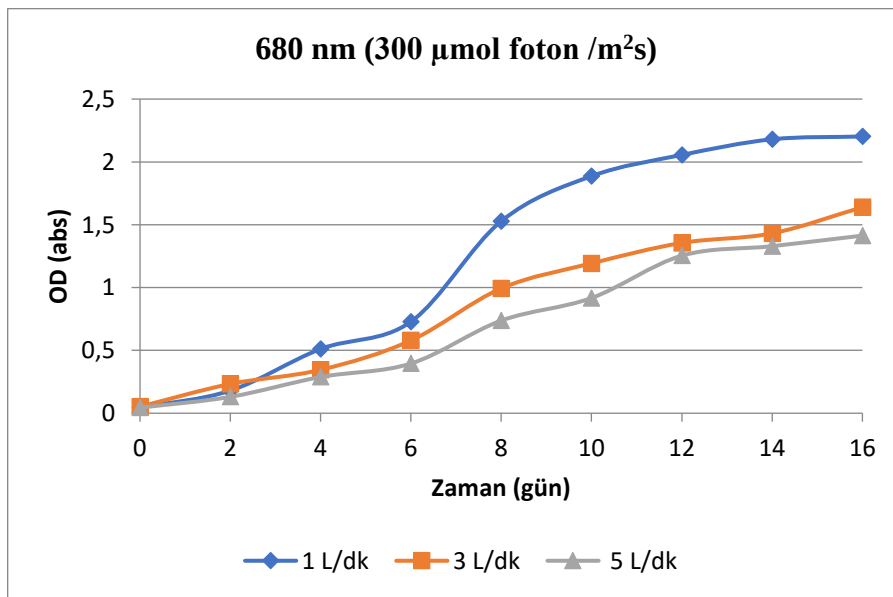
4.2.1.3. 300 µmol foton m⁻² s⁻¹ ışık şiddetinde 1, 3, 5 L/dk havalandırma hızında üretim

S. obliquus hücrelerinin 300 µmol foton/m²s ışık şiddetinde 1,3 ve 5 L/dk havalandırma hızlarında gün aşırı alınan örneklerin ölçümleri spektrofotometrik ve hemasitometrik hücre sayımı ile yapılmış ve Şekil 4.35 (600 nm), Şekil 4.36 (680 nm) ve Şekil 4.37 (hücre sayımı)'da verilmiştir. 600 nm'deki ölçümlere göre 1, 3

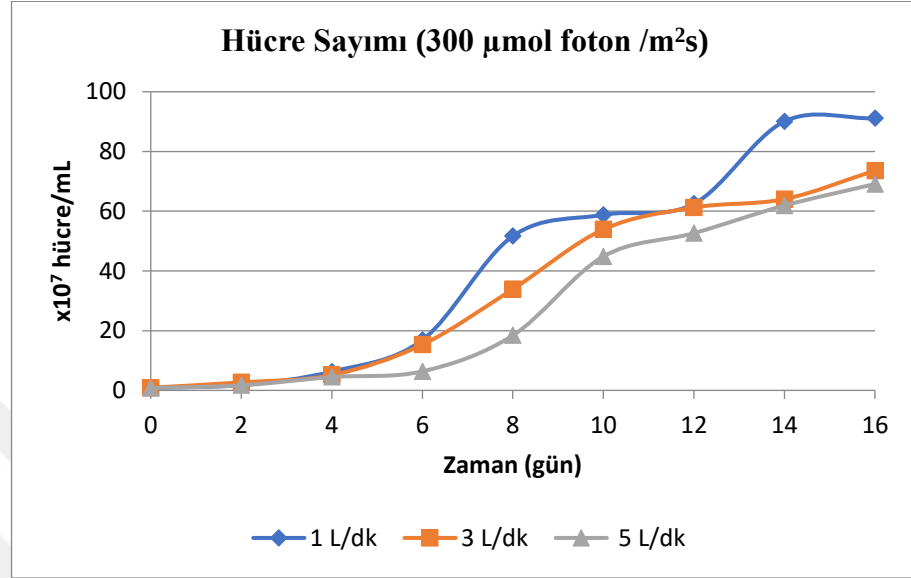
ve 5 L/dk havalandırma hızlarında hücre büyümesinde sırasıyla 3,3, 3,2 ve 2,9 kat; 680 nm’de sırasıyla 3,6, 3,5 ve 3,1 kat; hücre sayımında sırasıyla 9,3, 10,5 ve 10,0 kat artış gözlenmiştir. 1,3 ve 5 L/dk havalandırma hızlarında ortalama olarak hücre miktarında sırasıyla 5,4, 5,7 ve 5,3 kat artış meydana gelmiştir. Bu ışık şiddetinde hücrelerin ışığa doygunluğu için yüksek havalandırma hızı ile karıştırmaya ihtiyaç duymadığı anlaşılmaktadır. Hücreler ortalama bir havalandırma hızı ile de maksimum fotosentez yapabileceği ışığı kullanabilmektedir.



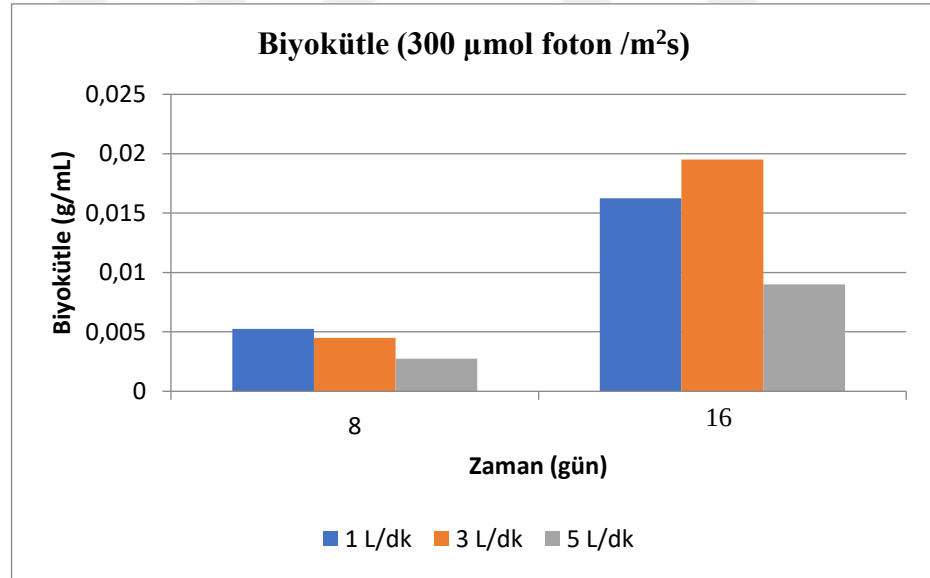
Şekil 4. 35. *Scenedesmus obliquus* için 300 µmol foton/m²s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 600 nm’deki zamana bağlı absorbanans grafiği.



Şekil 4. 36. *Scenedesmus obliquus* için 300 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 37. *Scenedesmus obliquus* için 300 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.



Şekil 4. 38. *Scenedesmus obliquus* için 300 μmol foton/ m^2s ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin zamana karşı biyokütle grafiği.

Şekil 4.38'ye göre 16 günlük üretim sonundaki biyokütle miktarı bu ışık şiddeti için en yüksek 3 L/dk havalandırma hızında elde edilmiştir. Hasat sonrası ulaşılan toplam biyokütle miktarı ile tutarlı sonuçlar görülmektedir.

300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde gün aşırı alınan örneklerin ekstraksiyon sonuçlarına göre (Çizelge 4.9) hücre içeriğindeki en fazla klorofil a, b ve toplam karotenoid miktarı 1 L/dk'da bulunmaktadır. HPLC analizinden elde edilen verilerde ise en fazla loroksantin miktarı 5 L/dk'da gözlenmiştir. Bu da bize 1 ve 3 L/dk'daki havalandırma hızına göre 5 L/dk havalandırma hızında daha yüksek oranda loroksantin varlığı bulunduğunu göstermektedir.

Çizelge 4. 9. *S. obliquus* için 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde farklı havalandırma hızlarında (1, 3, 5 L/dk) alınan örneklerin spektrofotometrik klorofil a, b ve toplam karotenoid değerleri.

Günler	Klorofil a			Klorofil b			Karotenoid		
	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk	1 L/dk	3 L/dk	5 L/dk
0	0,29	0,24	0,32	0,1939	0,2013	0,2059	0,1372	0,1039	0,1433
2	0,85	1,81	0,90	0,5979	1,1063	0,5501	0,1806	0,4212	0,2761
4	3,25	2,02	2,23	1,8392	1,2519	1,3633	0,8154	0,5480	0,5718
6	5,68	4,37	2,47	3,0516	2,4161	1,4458	1,2866	0,9519	0,5889
8	9,66	6,17	6,53	5,3602	3,5164	3,7901	2,4285	1,5883	1,4306
10	10,97	5,51	7,24	6,4142	10,1294	4,2878	2,7745	-0,0675	1,2798
12	9,87	6,77	8,76	6,0242	3,8977	5,3752	2,2945	1,5870	1,5959
14	8,94	5,98	8,72	5,5808	3,4984	5,4291	1,9060	1,3734	1,4171
16	10,33	7,64	8,74	6,1897	4,4766	5,1882	3,0399	2,0086	2,1077

4.2.1.4. Farklı ışık şiddeti ve havalandırma hızı sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi

Çizelge 4.10' e bakıldığında hücrelerin hasat sonrası toplam biyokütleleri göz önüne alındığında spektrofotometrik ölçümler ile tutarlı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Maksimum spesifik büyüme hızlarının farklı olmasının biyokütle üzerinde çok etkisi olmadığı gözlenmektedir. En yüksek ışık şiddeti olan 300 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ altındaki üretimlerden 1 L/dk ve 3 L/dk havalandırma hızlarında yaklaşık aynı biyokütle miktarları elde edilmiştir. Bu ışık şiddetinde hücreler kolayca maksimum fotosentez seviyesine ulaşması nedeniyle havalandırma hızının arttırılması bir etki yaratmamıştır. Üstelik 5 L/dk havalandırma hızına çıkıldığında hücreler zarar görmeye başlamıştır. 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde yapılan üretimde havalandırma hızı arttıkça hücre miktarı artmıştır. Bu artışın nedeni ışıktan faydalanmanın havalandırma hızı ile arttırılmasıdır. 50 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddeti altındaki hücreler ışık şiddetinin çok düşük olması nedeniyle yeterli fotosentez yapamamış ve üremelerini iyi arttıramamışlardır. Bunun yanı sıra havalandırma hızı ışıktan faydalanmayı etkilemediği gibi 5 L/dk'ya çıkıldığında hücreler zarar görmüştür. 5 L/dk düşük ve yüksek ışık şiddetindeki üretimlerde hücrelere zarar verdiği görüldüğüne göre 150 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde bu zararın görülmemesinin nedeni aslında ışık koşulunun üreme için çok elverişli olmasındandır.

Hedef karotenoid olan loroksantin miktarı en iyi kontrol grubundan elde edildiği için büyük ölçek üretimin koşulları olarak da 100 μmol foton/ m^2s ışık şiddeti ve 2 L/dk havalandırma hızı seçilmiştir.

Çizelge 4. 10. *Scenedesmus obliquus* için farklı ışık şiddeti ve havalandırma hızındaki üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve loroksantin miktarı

SET	Işık şiddeti (μmol foton / m^2s) ve Havalandırma hızı (L/dk)	Max. Spesifik Büyüme hızı μ (gün^{-1})	İkilenme Süresi (gün)	Biyokütle (g/2L)	Loroksantin (mg/g)
Kontrol	100 – 2	0,3027	2,2899	0,57	2,40
1	50 – 1	0,3806	1,8214	0,63	0,69
	50 – 3	0,2832	2,4475	0,52	0,53
	50 – 5	0,3122	2,2199	0,27	0,46
2	150 – 1	0,4921	1,4086	0,81	1,74
	150 – 3	0,3038	2,2819	0,85	1,09
	150 – 5	0,4312	1,6077	0,97	0,8
3	300 – 1	0,4177	1,6595	0,98	0,48
	300 – 3	0,3525	1,9664	1,01	0,62
	300 – 5	0,3339	2,0761	0,79	1,06

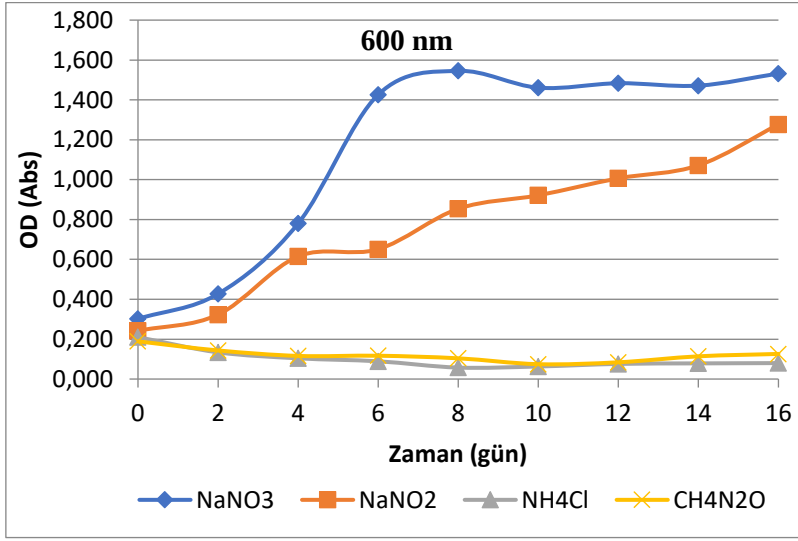
4.2.2. *Scenedesmus obliquus*'un Büyümesinde ve Loroksantin Üretiminde Farklı Azot Kaynağının Etkisi

Optimum koşul olarak belirlenen 100 μmol foton/ m^2s ve 2 L/dk havalandırma hızlarında farklı azot kaynakların etkisi değerlendirildiğinde Şekil 4.39'de görüldüğü gibi hücreler amonyum klorür ve üre içeren ortamlarda büyümemiş ölüm fazına geçmiştir.

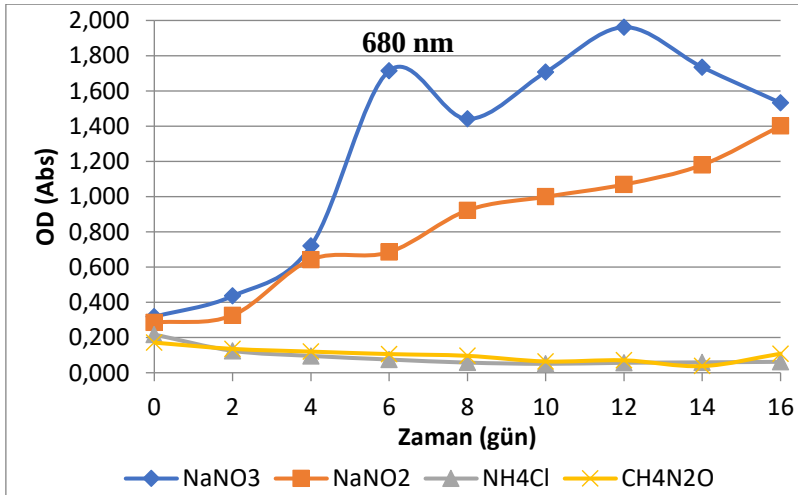


Şekil 4.39. Farklı azot koşulları altında *S. obliquus*'un büyümesi

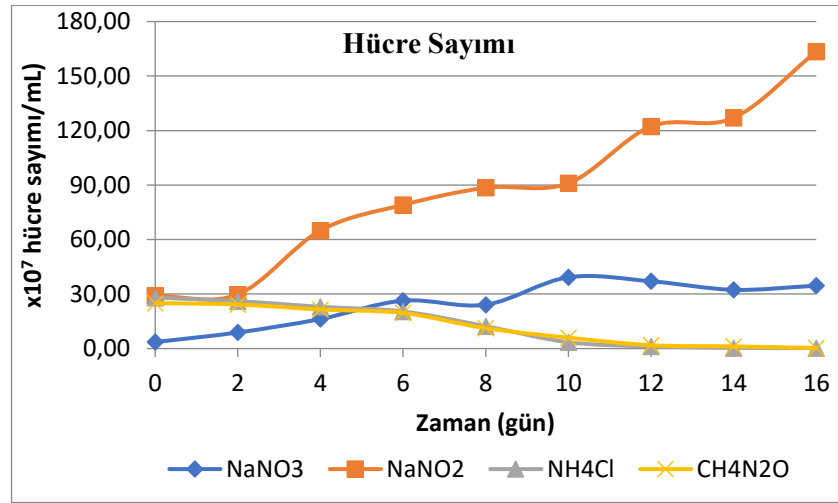
Kontrol grubu nitrat, nitrit, amonyum klorür ve üre içeren ortamlardan alınan gün aşırı örneklerin spektrofotometrik ve hemasitometrik hücre sayımı sonuçlarına ait grafikler Şekil 4.40 (600 nm), 4.41 (680 nm) ve 4.42 (hücre sayımı)'de verilmiştir. 600 nm ve 680 nm'deki ölçümler birbiri ile tutarlı olduğu için bu ölçümler baz alınarak yapılan değerlendirmede nitrat içeren ortamdaki hücre büyümesi sırasıyla 5,1 ve 4,8 kat; nitrit içeren ortamdaki hücre büyümesi 5,3 ve 4,9 kat artmıştır. Hücre sayımında ise nitrat ve nitrit için 9,7 ve 6 kat artış gözlenmektedir. Hücre sayımındaki yüksek farklılık seyreltme oranında bir hata yapılmış olabileceğini aklı getirmektedir ve değerlendirmeye tabii tutulmamıştır.



Şekil 4. 40. *Scenedesmus obliquus* için farklı azot kaynağında (sodyum nitrat, sodyum nitrit, amonyum klorür, üre) alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 41. *Scenedesmus obliquus* için farklı azot kaynağında (sodyum nitrat, sodyum nitrit, amonyum klorür, üre) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 42. *S. obliquus* için farklı azot kaynağında (sodyum nitrat, sodyum nitrit, amonyum klorür, üre) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.

Çizelge 4.11’te görüldüğü gibi nitrat ve nitrit içeren ortamlardaki son biyokütle miktarları ve spesifik büyüme hızları birbirine yakın iken elde edilen loroksantin miktarı nitrit ilaveli ortamda nitratlı ortama göre 2,3 kat daha fazladır. Bu da nitritin hücre içeriğindeki loroksantin miktarını artırıcı şekilde metabolik yolda etkili olduğunu düşündürmektedir.

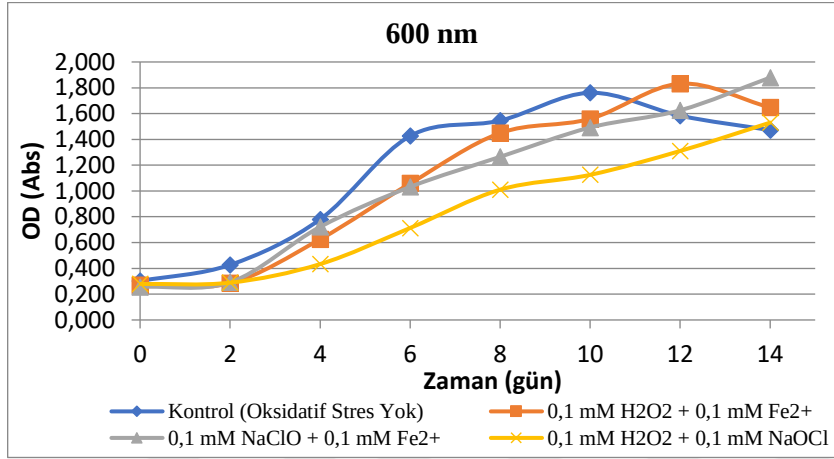
Çizelge 4. 11. *S. obliquus* için farklı azot kaynağındaki (sodyum nitrat, sodyum nitrit, amonyum klorür, üre) üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve loroksantin miktarı

SET	Azot Kaynağı	Spesifik Büyüme Hızı μ (gün ⁻¹)	İkilenme Süresi (gün)	Son Biyokütle (g/2 L)	Loroksantin (mg/g)
4	Nitrat (NaNO ₃)	0,3027	2,2899	0,57	2,40
	Nitrit (NaNO ₂)	0,3220	2,1527	0,65	5,46
	Amonyum Klorür (NH ₄ Cl)	-	-	-	-
	Üre (CH ₄ N ₂ O)	-	-	-	-

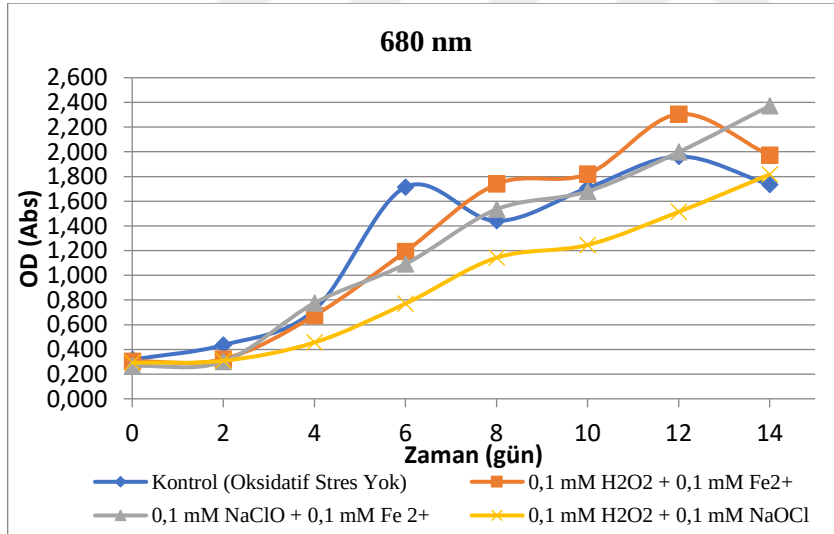
4.2.3. *Scenedesmus obliquus*’un Büyümesinde ve Loroksantin Üretiminde Oksidatif Stresin Etkisi

Farklı oksidatif streslerin uygulandığı koşullardan gün aşırı alınan örneklerin spektrofotometrik ölçüm ve hücre sayım sonuçlarına ait grafikler Şekil 4.43 (600 nm), Şekil 4.44 (680 nm) ve Şekil 4.45 (hücre sayımı)’da verilmiştir. Kontrol grubu, H₂O₂ + Fe²⁺, NaOCl + Fe²⁺ ve H₂O₂ + NaOCl uygulanarak oksidatif stresin etkileri gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ve H₂O₂ + Fe²⁺ bulunan ortamlardaki hücrelerin sırasıyla 10 ve 12. günden sonra ölüm fazına geçtikleri anlaşıldığı için üretim 14. günde sonlandırılmıştır. 14 günlük üretim sonunda kontrol grubundaki hücre miktarı 600 nm, 680 nm ve hücre sayımında sırasıyla 4,9,

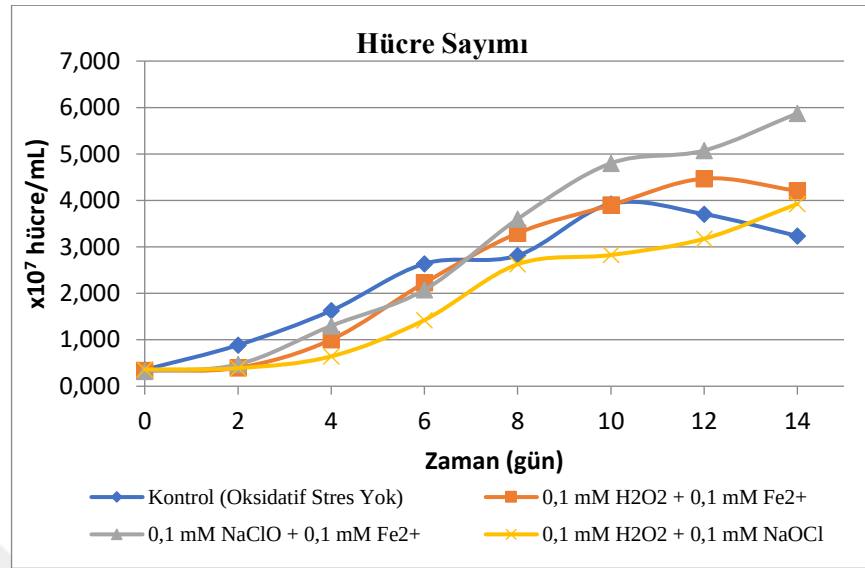
5,4 ve 9,1 kat ile ortalama 6,5 kat; $H_2O_2 + Fe^{2+}$ uygulanan ortamda sırasıyla 6,1, 6,5 ve 12,4 kat ile ortalama 8,3 kat; $NaOCl + Fe^{2+}$ uygulanan ortamda sırasıyla 5,4, 6,2 ve 10,9 kat ile ortalama 7,5 kat artış göstermiştir. Bu durumda biyokütle artışı üzerinde en etkili oksidatif stres kaynağı $NaOCl + Fe^{2+}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 43. *S. obliquus* için farklı oksidatif stres koşullarında (Kontrol, $H_2O_2 + Fe^{2+}$, $NaOCl + Fe^{2+}$, $H_2O_2 + NaOCl$) alınan örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 44. *S. obliquus* için farklı oksidatif stres koşullarında (Kontrol, $H_2O_2 + Fe^{2+}$, $NaOCl + Fe^{2+}$, $H_2O_2 + NaOCl$) alınan örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği.



Şekil 4. 45. *S. obliquus* için farklı oksidatif stres koşullarında (Kontrol, H₂O₂ + Fe²⁺, NaOCl + Fe²⁺, H₂O₂ + NaOCl) alınan örneklerin zamana bağlı hücre sayımı grafiği.

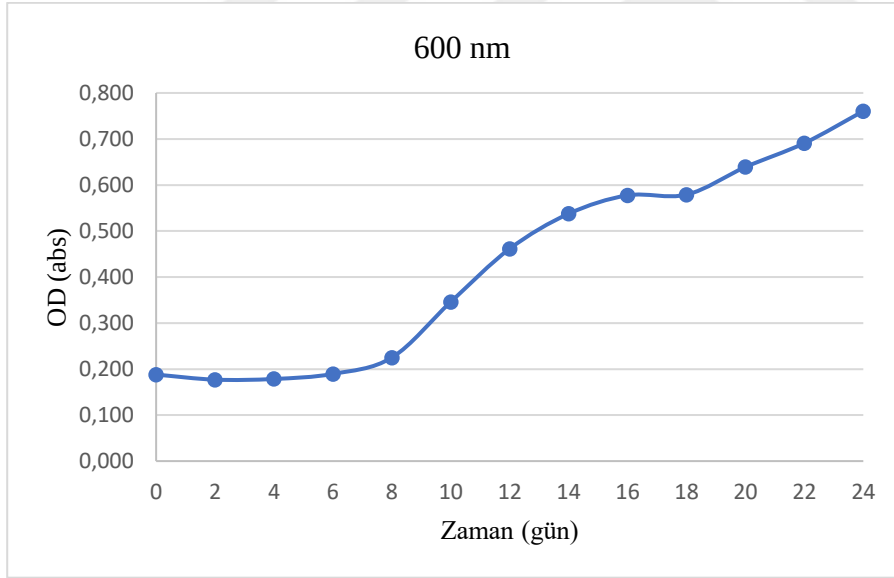
Çizelge 4.12’te görüldüğü gibi biyokütle miktarının en az ve neredeyse birbirine eşit olduğu kontrol ve H₂O₂ + NaOCl gruplarında loroksantin miktarları birbirine eşittir. Kimyasal ilave ekstra masraf yaratacağı için kontrol grubu yani oksidatif stres uygulanmadığı grupta en yüksek miktarda loroksantin elde edildiği sonucuna varılabilmektedir.

Çizelge 4. 12. *S. obliquus* için farklı oksidatif stres koşullarında (Kontrol, H₂O₂ + Fe²⁺, NaOCl + Fe²⁺, H₂O₂ + NaOCl) üretimlerin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, hasat sonu biyokütlesi ve loroksantin miktarı.

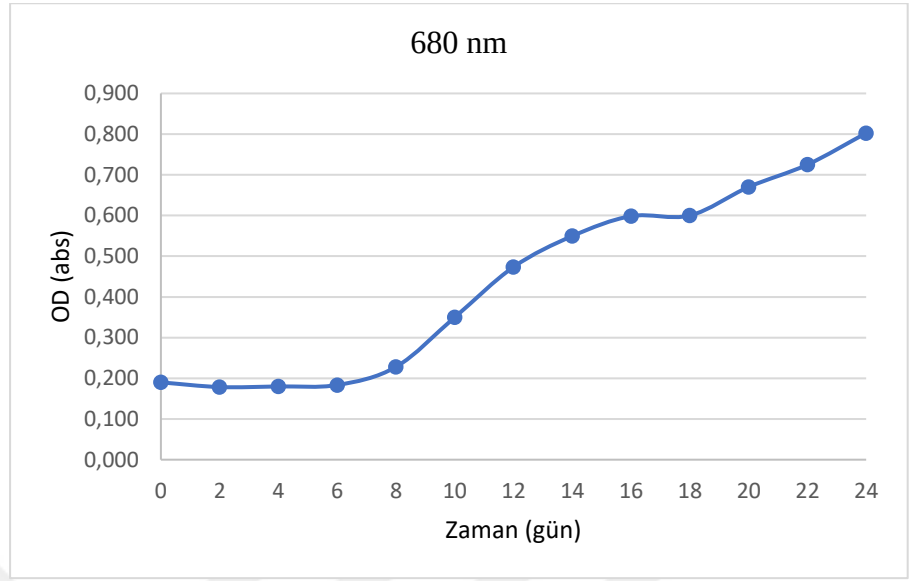
SET	Oksidatif Stres Kaynağı	Spesifik Büyüme Hızı μ (gün ⁻¹)	İkilenme Süresi (gün)	Son Biyokütle (g/2 L)	Loroksantin (mg/g)
5	Kontrol Grubu (Oksidatif Stres Yok)	0,3045	2,2767	0,55	2,35
	0,1 mM H ₂ O ₂ + 0,1 mM Fe ²⁺	0,4625	1,4986	0,68	2,03
	0,1 mM NaClO + 0,1 mM Fe ²⁺	0,5087	1,3626	1,09	1,34
	0,1 mM H ₂ O ₂ + 0,1 mM NaOCl	0,3239	2,1397	0,58	2,35

4.2.4. *Scenedesmus obliquus*'un 6 L Panel Fotobiyoreaktörde Üretimi

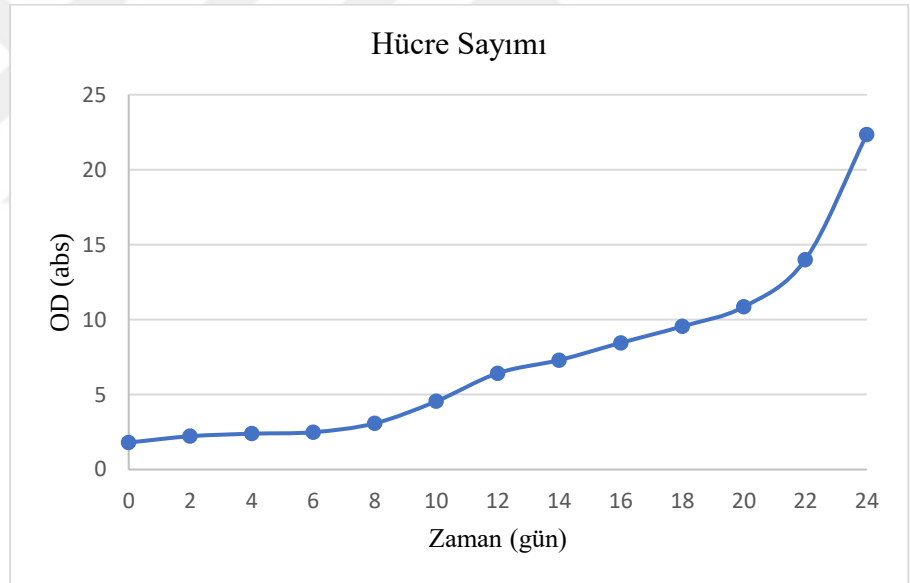
S. obliquus için yapılan farklı ışık şiddeti, havalandırma hızı, azot kaynağı ve oksidatif stres deneyleri sonrasında optimum karotenoid üretimi $100 \mu\text{mol foton} / \text{m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde, 2 L/dk havalandırma hızında, nitrit içeren ve oksidatif stres uygulanmayan koşullar olarak belirlenmiş ve 6 L'lik büyük ölçekli üretime geçilmiştir. Üretim sonrasında elde edilen spektrofotometrik ve hemisitometrik hücre sayımı sonuçlarına ait grafikler Şekil 4.46 (600 nm), Şekil 4.47 (680 nm) ve Şekil 4.48 (hücre sayımı)'de verilmiştir. Önceki bölümlerdeki biyokütle sonuçları göz önünde bulundurularak küçük ölçekli üretimlerde elde edilen en yüksek biyokütle miktarından yaklaşık üç kat fazla biyokütle beklenerek büyük ölçekli üretim kurulmuştur. Üretim sonrasındaki son biyokütle miktarına göre yaklaşık 5 kat fazla biyokütle hasat edilmiştir. Bu da *S. obliquus* hücrelerinin büyük ölçek üretiminde panel fotobiyoreaktörlerin kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Grafiklerde de görüldüğü gibi üretim sonunda hücreler henüz durağan faza geçmemiş büyümeye devam etmişlerdir. Sonuç olarak panel fotobiyoreaktörlerde *S. obliquus* ile uzun süreli üretim yapılacağı anlaşılmıştır.



Şekil 4.46. *S. obliquus* için 6 L üretimde örneklerin 600 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği



Şekil 4.47. *S. obliquus* için 6 L üretimde örneklerin 680 nm'deki zamana bağlı absorbans grafiği



Şekil 4. 48. *S. obliquus* için 6 L üretimde örneklerin zamana bağlı hücre sayım grafiği

5. ÖNERİLER

Karotenoidler gıda, farmasötik, nutrasötik, kozmetik alanlarında kullanılabilen ve antioksidatif, antikanser, antiviral gibi bir çok biyolojik aktivitesi bulunan doğal pigmentlerdir. Araştırmacılar tarafından biyolojik aktiviteleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedir.

Özellikle gıda katkı maddesi olarak kullanılan sentetik pigmentlerin sağlık açısından zararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bu sebeple de gıda sektöründeki kullanımları kısıtlanmaktadır. Bu kısıtlama, doğal pigmentlere yönelimin artmasına neden olmaktadır. Böylece de ilerleyen zamanlarda karotenoidlere olan ilgili gittikçe artacaktır.

Çalışma literatüre katkı olarak değerlendirildiğinde ve çalışmaya ait tüm veriler göz önünde bulundurulduğunda önerilen verimli üretim şartları aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

N. shiloi türü ile fukoksantin üretiminde:

- ışık şiddeti: 50 μmol foton / m^2s
- havalandırma hızı: 5 L/dk
- azot kaynağı türü: Nitrat
- oksidatif stres uygulaması: H_2O_2 + NaOCl uygulanan oksidatif stres

S. obliquus türü ile loroksantin üretiminde:

- ışık şiddeti: 100 μmol foton / m^2s
- havalandırma hızı: 2 L/dk
- azot kaynağı türü: Nitrit
- oksidatif stres uygulaması: Oksidatif Stres uygulanmayan koşul

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Algaebase**, https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=45159
(Erişim Tarihi: 10 Temmuz 2021)
- Algaebase**, https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27885
(Erişim Tarihi: 10 Temmuz 2021)
- Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P.** (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 56, 49–73. APR.
- Andersen, R. A.**, 2005, *Algal Culturing Techniques*, UK, 578s.
- Ansel, M. F.**, 2008, *Supplements to the 2nd Edition of Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*, 260s.
- Arteni, A., Fradot, M., Galzerano, D., Mendes-Pinto, M. M., Sahel, J-A., Picaud, S., Robert, B., Pascal, A. A.**, 2015, Structure and Conformation of the Carotenoids in Human Retinal Macular Pigment, *Plos ONE*.
- Asai, A., Sugawara, T., Ono, H., Nagao, A.**, 2004, Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin a in mice and HepG2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites, *Drug Metabolism and Disposition*, 205-211.
- Aitzetmüller, K., Strain, H. H., Svec, W. A., Grandolfo, M., Katz, J. J.**, 1968, Loroaxanthin, a unique xanthophyll from *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*, *Phytochemistry*, 1761-1770.
- Barredo, J. L.**, 2012, *Methods in Molecular Biology: Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae*, Spain, 355s.
- Barros, A.I., Gonçalves, A.L., Simões, M., Pires, J.C.M.**, 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev* 41 (C), 1489–1500.
- Becker, E.W.**, 1995, *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press,
- Bernard O, Rémond B.**, 2012, Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresour Technol* 123:520–527.
- Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Perricone, M., Speranza, B., Campaniello, D., Sinigaglia, M.**, 2018, Nonthermal technologies for fruit and vegetable juices and beverages: Overview and advances. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 2–62.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Bishop, N. I., 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 158-162.
- Borowitzka, M. A., Beardall, J., Raven, J. A.,** 2016, The Physiology of Microalgae, Australia, 681s.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H.,** 2004, Carotenoids Handbook, UK, 550s.
- Bux, F.,** 2013, Biotechnologic Applications of Microalgae, Florida, USA, 227s.
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A. and Malcata, F. X.,** 2006, Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.*, 22, 1490-1506.
- Chang, J. S., Show, P. L., Ling, T. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Tan, C. H., Nagarajan, D., & Phong, W. N.,** 2017, Photobioreactors. In C. Larroche, M. Sanroman, G. Du, & A. Pandey *Current developments in biotechnology and bioengineering: bioprocesses, bioreactors and controls* (pp. 313–352).
- Chen, M., Liu, T., Chen, X., Chen, L., Zhang, W., Wang, J.,** 2012, Subcritical co-solvents extraction of lipid from wet microalgae pastes of *Nannochloropsis* sp. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 205–212.
- Chen, C.-Y., Bai, M.-D., & Chang, J.-S.,** 2013, Improving microalgal oil collecting efficiency by pretreating the microalgal cell wall with destructive bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 170–176.
- Cohen, Z.,** 1999, Chemicals from Microalgae, Israel, 419s
- Croft MT, Warren MJ, Smith AG.,** 2006, Algae need their vitamins. *Eukaryot Cell* 5:1175–1183.
- Culture Collection of algae and protozoa,** https://www.ccap.ac.uk/wp-content/uploads/MR_BG11.pdf (Erişim Tarihi: 02 Nisan 2021)
- Dolan, J. W.** 2001. Autosampler carryover. *LC/GC*. 19:164–8.
- Dong, T., Knoshaug, E. P., Pienkos, P. T., & Laurens, L. M. L.,** 2016, Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. *Applied Energy*, 177, 879–895.
- Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonu,** <http://www.egemacc.com/cultures.php> (Erişim Tarihi: 02 Nisan 2021)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Erdoğan, A., Çağır, A., Dalay, M. C., & Eroğlu, A. E.,** 2015, *Composition of Carotenoids in Scenedesmus protuberans: Application of Chromatographic and Spectroscopic Methods. Food Analytical Methods*, 8(8), 1970–1978.
- Erdoğan, A., Demirel, Z., Karataş, A.B., Çağır, A., Aktürk, M. and Dalay, M.C.,** 2021, Mikroalglerden Yüksek Safılıkta Fukoksantin ve Loroksantin Elde Edilmesi İçin Kültür Koşulları, Ekstraksiyon Parametreleri ve Saflaştırma İşlemlerinin Optimize Edilmesi, 216Z167, TÜBİTAK COST PROJESİ.
- Galanakis, C. M.,** 2020, Carotenoids: Properties, Processing and Applications, Greece, 369s.
- Gayen, K., Bhowmick, T. K., Maity, S. K.,** 2020, Sustainable Downstream Processing of Microalgae for Industrial Application, USA, 355s.
- Godos, I.,** 2014, Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases. *Bioresour. Technol.* 153, 307–314.
- Gong, M., and Bassi, A.,** 2016, Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34, 1396–1412.
- Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., and Flynn, K.J.,** 2010, Placing microalgae on the biofuels priority list: A review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society, Interface/The Royal Society*, 7: 703–726.
- Grimaud, G.M., Mairet, F., Bernard, O.,** 2014. Modelling thermal adaptation in microalgae: an adaptive Dynamics point of view. *IFAC Proc. Vol 19 (2)*, 4376–4381.
- Grobbelaar, J.U.,** 2009, Factors governing algal growth in photobioreactors: The “open” versus “closed” debate. *Journal of Applied Phycology*, 21: 489–492.
- Grobbelaar, J.U.,** 2013, Inorganic algal nutrition. *Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology*, Chapter 8, second edition. Editors, Amos Richmond and Qiang Hu, Wiley Publications.
- Giuffrida, D., Donato, P., Dugo, P., & Mondello, L.,** 2018, Recent analytical techniques advances in the carotenoids and their derivatives determination in various matrixes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(13), 3302–3307.
- Harvey, A.P, Mackley, M.R., and Seliger, T.,** 2003, Process intensification of biodiesel production using a continuous oscillatory flow reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 78: 338–341.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Haugan JA, Liaaen-Jensen S.**, 1994, Blue carotenoids. Part 2. The chemistry of the classical colour reaction of common carotenoid 5,6-epoxides with acid. *Acta Chem Scand* 48:152–159
- Helena, S., Zainuri, M., Suprijanto, J.**, 2016, Microalgae *Dunaliella Salina* (Teodoresco, 1905) Growth using the LED Light (Light Limiting Dioda) and Different Media), 226-230.
- Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J. S.**, 2013, Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock, *Bioresource Technology*, 191-198.
- Huang H, Xiao X, Shi J, Chen Y.**, 2014, Structure – activity analysis of harmful algae inhibition by congeneric compounds: case studies of fatty acids and thiazolidinediones. *Environ Sci Pollut Res.* 21:7154–7164.
- Inbaraj, B. S., Lu, H., Hung, C. F., Wu, W. B., Lin, C. L., & Chen, B. H.**, 2008, Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* linnaeus by HPLC–DAD–APCI–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 812–818.
- Ishikawa, C., Tafuku, S., Kadekuru, T.**, 2008, Antiadult T-cell leukemia effects of Brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, *International Journal of Cancer*, 2702-2712.
- Isler, O.**, 1971, Carotenoids, Switzerland, 932s.
- Jacob-Lopes, E., Maroneze, M. M., Queiroz, M. I., Zepka, L. Q.**, 2020, Handbook of Microalgae-Based Process and Products, UK, 905s.
- Jacob-Lopes, E., Queiroz, M. I., Zepka, L. Q.**, 2020, Pigments from Microalgae Handbook, Brazil, 653s.
- Johansen, M. N.**, 2012, Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy, New York, USA, 475s.
- Joo, H. W., Kim, Y. J., Park, J., Chang, Y. K.**, 2017, Hydrolysis of *Golenkinia* sp. Biomass using Amberlyst 36 and nitric acid as catalysts, *Algal Research*, 32-38.
- Kaczor, A. and Baranska, M.**, 2016, Carotenoids: Nutrition, Analysis and Technology, Poland, 402s.
- Kadekaru, T., Toyama, H., Yasumoto, T.**, 2008, Safety evaluation of fucoxanthin purified from *Undaria pinnatifida*, 304-308.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Kawee-ai, A., Kuntiya, A., Kim, S. M.,** 2013, Anticholinesterase and antioxidant activities of fucoxanthin purified from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*, *Natural Product Communications*, 1381-1386.
- Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., & Bhowmick, T. K.,** 2018, Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 110, 60–84.
- Kim, S.M., Jung, O.N., Cha, K.H., Um, B.H., Chung, D.C., Pan, C.H.,** 2012, A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volume 166, 7:1843–1855.
- Kim, J., G. Yoo, H. Lee, J. Lim, K. Kim, C. W. Kim, M. S. Park, and J.-W. Yang.,** 2013, “Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae.” *Biotechnology Advances* 31 (6):862–876.
- Kim, S. K.,** 2015, Handbook of Marine Microalgae Biotechnology Advances, South Korea, 585s.
- Knuckey, R.M., Brown, M.R., Robert, R., and Frampton, D.M.F.,** 2006, Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35: 300–313.
- Krinsky, N. I., Mayne, S. T., Sies, H.,** 2004, Carotenoids in Health Disease, USA, 568s.
- Latasa, M., van Lenning, K., Garrido, J. L., Scharek, R., Estrada, M., Rodriguez, F., and Zapata, M.,** 2001, Losses of chlorophylls and carotenoids in aqueous acetone and methanol extracts prepared for RPHPLC analysis of pigments. *Chromatographia*. 53:385–91.
- Lee, Y.K., Ding, S.Y., Low, C.S., Chang, Y.C., Forday, W.L., and Chew, P.C.,** 1995, Design and performance of an α -type tubular photobioreactor for mass cultivation of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 7: 47–51.
- Lee, Y.K.,** 2001, Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, 13: 307–315.
- Lee, A. K., Lewis, D. M., & Ashman, P. J.,** 2012, Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, 46, 89–101.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., & Oh, Y.-K.,** 2017, Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244, 1317–1328.
- LeGresley, M., and McDermott, G.,** 2010, Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis-heemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. 25s.
- Lesellier, E., West, C., & Tchaplal, A.,** 2003, Advantages of the use of monolithic stationary phases for modelling the retention in sub/supercritical chromatography. Application to *cis/trans*- β -carotene separation. *Journal of Chromatography A*, 1018, 225–232.
- Levine, I. A. and Fleurence, J.,** 2018, Microalgae in Health and Disease Prevention, UK, 339s.
- Lohr, M.,** 2009, The Chlamydomonas Sourcebook, Carotenoids, 799-817.
- Lu, L., Yang, G., Zhu, B., Pan, K.,** 2017, A comparative study on three quantitating methods of microalgal biomass, Indian Journal of Geo Marine Sciences, 2265-2272.
- Luque I, Flores E, Herrero A.,** 1994, Nitrate and nitrite transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942 are mediated by the same permease. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1184s.
- Macías-Sánchez, M. D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez De La Ossa, E., Lubián, L. M., & Montero, O.,** 2009, Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*, 77, 948–952.
- Malcata, F. X., Pinto, I. S., Guedes, A. C.,** 2019, Marine Macro and Microalgae: An Overview, USA, 332s.
- Marchetti A, Maldonado MT,** 2016, Iron. In: Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA (eds) Physiology of microalgae. Springer, Dordrecht, pp 233–279.
- Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z.,** 2018, Carotenoid esters analysis and occurrence: What do we know so far? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 648, 36–43.
- Maroneze, M. M., & Queiroz, M. I.,** 2018, Microalgal production systems with highlights of bioenergy production. In E. Jacob-Lopes, L. Q. Zepka, & M. I. Queiroz (Eds.), Energy from microalgae (pp. 5–34).
- Martin, G. J. O.,** 2016, Energy requirements for wet solvent extraction of lipids from microalgal biomass. *Bioresource Technology*, 205, 40–47.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Mata, T.M., Martins, A.A., and Caetano, N.S.**, 2010, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 217–232.
- Miyashita, K., Beppu, F., Hosokawa, M., Liu, X., Wang, S.**, 2020, Bioactive significance of fucoxanthin and its effective extraction, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- Moroney JV, Bartlett SG, Samuelsson, G.**, 2001, Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Environ* 24:141–153.
- Naik, S. M., Anil, A. C.**, 2018, Influence of darkness on pigments of *Tetraselmis indica* (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta), *Journal of Photobiology*, 17-22.
- Niyogi, K. K., Björkman, O., Grossman, A. R.**, 1997, The roles of specific xanthophylls in photoprotection, *Plant Biology*, 14162-14167.
- Oswald, W.J., Golueke, C.G.**, 1968, Large scale production of microalgae. In: Mateless, R.I., Tannenbaum, S.R. (Eds.), *Single Cell Protein*. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 271–305.
- Oswald, W. J.**, 1988, Large-scale algal culture systems (engineering concepts). pp. 357–394.
- Pahl, S.L., Lee, A.K., Kalaitzidis, T., Ashman, P.J., Sathe, S., Lewis, D.M.**, 2013, Harvesting, thickening and dewatering microalgae biomass. In: Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R. (Eds.), *Algae for Biofuels and ENERGY*. Springer.
- Pfander, H., Gerspacher, M., Rychener, M., Schwabe**, 1987, Basel, 296s.
- Posten, C. and Chen, S. F.**, 2016, *Microalgae Biotechnology*, Switzerland, 188s.
- Posten, C. and Walter, C.**, 2012, *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*, Germany, 266s.
- Pulz, O.**, 2001, Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 287–293.
- Rodriguez-Amaya, D. B.**, 2001, *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*, Brasil, 64s.
- Rodriguez-Amaya, D. B. And Kimura, M.**, 2004, *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*, Brasil, 56s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Ruocco, N., Costantini, S., Zupo, V., Lauritano, C., Caramiello, D., Ianora, A., Budillon, A., Romano, G., Nuzzo, G., D'Ippolito, G., Fontana, A., Costantini, M.,** 2018, Toxigenic effects of two benthic diatoms upon grazing activity of the sea urchin: morphological, metabolomic and de novo transcriptomic analysis, *Scientific Reports*.
- Sander, L. C., Sharpless, K. E., & Pursch, M.,** 2000, C30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*, 880(1), 189–202.
- Shen, Y., Hu, Y., Huang, K., Yin, S., Chen, B., & Yao, S.,** 2009, Solid-phase extraction of carotenoids. *Journal of Chromatography. A*, 1216(30), 5763–5768.
- Tanumihardjo, S. A.,** 2013, Carotenoids and Human Health, USA, 331s.
- Taylor, S.,** 2011, Advances in Food and Nutrition Research: Implications and Applications, Macro and Microalgae, USA, 466.
- Tredici, M.R., Bassi, N.,** 2015, Energy balance of algal biomass production in a 1-ha “Green Wall Panel” plant: how to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. *Appl. Energy* 154, 1103–1111.
- Tsaloglou, M. N.,** 2016, Microalgae: Current Research and Applications, UK, 152s.
- Tukaj, Z., Matusiak-Mikulin, K., Lewandowska, J., Szurkowski, J.,** 2003, 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.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., and Uchiyama, H.,** 2008, Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99: 4021–4028.
- Wang, B., Lan, C.Q., Horsman, M.,** 2012, Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnol. Adv.* 30 (4), 904–912.
- Wei, D., Chen, F., Chen, G., Zhang, X., Liu, L., Zhang, H.,** 2008, Enhanced production of lutein in heterotrophic *Chlorella protothecoides* by oxidative stress, *Life Sciences*.
- Wellburn, A. R.,** 1994, *The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

Woo, M. N., Jeon, S. M., Kim H. J., 2010, Fucoxanthin supplementation improves plasma and hepatic lipid metabolism and blood glucose concentration in high-fat fed C57BL/6N mice, *Chemico-Biological Interactions*, 316-322.

Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., Kong, R., Han, C., Liu, Z., 2015, Fucoxanthin: A promising Medicinal and Nutritional Ingredient, 10s.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, anlayışı ve sevecenliği ile değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Meltem CONK DALAY'a ve tez çalışmamın her aşamasında yardımcı olup yol gösteren Dr. Ayşegül ERDOĞAN'a ve Dr. Zeliha DEMİREL'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte maddi ve manevi destekleriyle hayatımın her alanında yanımda duran, bana güvenen sevgili ailem; annem Medine DEMİR, babam Cuma DEMİR, kardeşlerim Şeyda DEMİR ve Şükrü DEMİR'e tüm kalbimle teşekkür ederim. On yıldan uzun bir süredir her koşulda yanımda duran, her konuda olduğu gibi tezimde de hiçbir yardımı esirgemeyen değerli arkadaşım Ayça Büşra KARATAŞ'a bütün kalbimle teşekkür ederim.

Tez uygulama ve yazma aşamasında her zaman yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiren ve anlayışlarını esirgemeyen çalışma hayatımdaki değerli hocalarım Doç. Dr. Burcu ÇAKAR ve Uzm. Dr. Pınar GÜRSOY'a, iş arkadaşlarımdan öte olan bu süreçte motivasyonumu kaybetmememi sağlayan Cemre OKUR, Esra KARAÇOBAN ve Özge Berivan KILIÇLAR'a canı gönülden teşekkür ederim.

16/02/2022

İmza

Dilan DEMİR

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI:

Dilan DEMİR

EĞİTİM BİLGİLERİ:

Ege Üniversitesi (Yüksek Lisans)

2018-Halen

Fen Bilimleri Enstitüsü,

Biyomühendislik Bölümü

Ege Üniversitesi (Lisans)

2009-2016

Mühendislik Fakültesi,

Biyomühendislik Bölümü

Nişantaşı Nuri Akın Anadolu Lisesi

2005-2009

YAYINLANAN VE REVİZYONDAKİ MAKALELER

- Erdoğan A., Bayır E., Demirel Z., Karataş A.B., Demir D., Aktürk M. Şendemir A, Conk-Dalay M. Enhanced Productivity of Fucoxanthin From *Amphora capitellata* and Its Selective Cytotoxic Effect on Liver Cancer Cell (2021) Process Biochemistry. PRBI-D-21- 00129R2.

SUNULAN VE KABUL EDİLEN BİLDİRİLER

- Ayça Büşra Karataş, Dilan Demir, Merve Aktürk, Ece Bayır, Zeliha Demirel, Ayşegül Erdoğan, Aylin Şendemir, Meltem Conk-Dalay. Bioactive Fucoxanthin From Microalgae and Its Cytotoxic Effect on HEP3B Liver Cancer Cell Line. Cell Death Symposium 2019. 3-5 Ekim 2019, İstanbul-Türkiye (Poster bildirisi).
- Ayşegül Erdoğan, Zeliha Demirel, Merve Aktürk, Ayça B. Karataş, Dilan Demir, Meltem Conk-Dalay. Carotenogenesis Responses of *Scenedesmus obliquus* to Different Culture Conditions: A Focus on Lutein and Loroanthin. 2nd International Aquatic Biotechnology Symposium. 13-15 Ekim 2021. (Sözlü bildirisi).
- Zeliha Demirel, Ayşegül Erdoğan, Merve Aktürk, Ayça B. Karataş, Dilan Demir, Meltem Conk Dalay Effect of different growth conditions on biomass yield of *Amphora capitellata*. 2nd International Aquatic Biotechnology Symposium. 13-15 Ekim 2021. (Poster bildirisi).