

**İRAN'IN TUZLU GÖLLERİNDEN İZOLE EDİLEN
Dunaliella TÜRLERİNDEN β - KAROTEN ÜRETİM
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

**OPTIMIZATION OF THE CULTURAL
PARAMETERS FOR
 β - CAROTENE PRODUCTION BY *Dunaliella*
ISOLATES FROM SALINE LAKES OF IRAN**

FARAZ ARASH RAD

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ (BİYOTEKNOLOJİ) Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2009

**İRAN'IN TUZLU GÖLLERİNDEN İZOLE EDİLEN
Dunaliella TÜRLERİNDEN β - KAROTEN ÜRETİM
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

**OPTIMIZATION OF THE CULTURAL
PARAMETERS FOR
 β - CAROTENE PRODUCTION BY *Dunaliella*
ISOLATES FROM SALINE LAKES OF IRAN**

FARAZ ARASH RAD

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ (BİYOTEKNOLOJİ) Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından BİYOLOJİ (BİYOTEKNOLOJİ) ANABİLİM DALI 'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Başkan :.....(İmza).....
(Unvanı, Adı ve Soyadı)

Üye (Danışman) :.....(İmza).....
(Unvanı, Adı ve Soyadı)

Üye (Varsa İkinci Danışman) :.....(İmza).....
(Unvanı, Adı ve Soyadı)

Üye :.....(İmza).....
(Unvanı, Adı ve Soyadı)

Üye :.....(İmza).....
(Unvanı, Adı ve Soyadı)

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İRAN'IN TUZLU GÖLLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Dunaliella* TÜRLERİNDEN β - KAROTEN ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Faraz Arash Rad

ÖZ

Dunaliella denizler ve tuzcul alanlarda bulunan, bol miktarda sentezlediği karotenoidleri yolu ile antioksidan kapasitesi olan, yeşil-turuncu renkli bir mikroalgdir. Tuzlalar gibi yüksek tuz konsantrasyonlu alanlarda ancak az sayıda canlı türü canlı kalabilmektedir. Bu tip organizmalar yaşamlarını sürdürebilmek için β -karoten gibi şiddetli ışıktan ve gliserol gibi osmotik basınç farkından koruyucu maddeler sentezlemektedirler. Bu maddeler de ticari açıdan değerli ve önemli bileşikler olup bu nedenlerle üretimleri amaçlanmaktadır. *Dunaliella* mikroalgi de son yıllarda β - karoten üretimi, beslenme, eczacılık, kozmetik ve genetik mühendisliğindeki önemi nedeniyle dikkatlerin ve çalışmaların odağı olmaktadır. Bu nedenlerle yüksek üretim kapasiteli yeni türlerinin identifikasyonu önem kazanan çalışmalar arasında yer almaktadır.

Bu çalışmada İran'ın tuzlu göllerinden elde edilen *Dunaliella* izolatlarının β -karoten üretimlerine etkili kültürel parametrelerin optimize edilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Urummiye ve Mahurlu tuzlu gölleri ile Qum tuzlası ve Gavkhuni bataklığından örnekler alınmış Modifiye Jonson besiyerinde ön kültürleri yapılan ve zenginleştirilen örnekler, tuzluluk ve pH değerlerinin artırılması yolu kontaminasyondan korunmuşlardır. Daha sonra tek koloni ekimleri ile saflaştırılan örnekler 1M NaCl içeren pH değeri 7.5 olarak ayarlanmış ortamlarda $100 \mu\text{mol foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti altında 30 gün üretilmişlerdir.

Yukarıdaki koşullar altında en yüksek oranda β -karoten üreten suş seçilmiş ve çeşitli stres koşullarının (yüksek tuzluluk, yüksek sıcaklık, şiddetli ışık, nitrat ve fosfat içermemesi gibi) uygulanması ile ürün artırımı için çalışmalar yapılmış ve uygun ortamda pH ve KNO_3 konsantrasyonunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda β -karoten üretiminin nitrat ve fosfat kaynağı kısıtlı, pH değeri 7.0 olarak ayarlanan ve 3 M NaCl ile 2M KNO_3 içeren MJ ortamında, 35°C inkübasyon sıcaklığında, şiddetli ışık altında ($400 \mu\text{mol foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) 21 gün

inkübe edilen kültürlerde optimal koşulların sağlanmadığı kültürlerle kıyasla hücre başına karoten miktarı (HBKM) cinsinden olmak üzere yüksek oranda ürün eldesinin (63.26 p.g.hücre⁻¹) mümkün olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmalar sırasında ayrıca ileride yapılacak bazı moleküler biyolojik çalışmalarda daha saf ve temiz bantlar elde etmek için geçerli olacak bir DNA ekstraksiyon protokolü modifikasyonu da yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Dunaliella*, β -karoten, tuzlu göller, DNA ekstraksiyon, stres, optimizasyon

Danışman: Prof.Dr. Nilüfer AKSÖZ, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

OPTIMIZATION OF THE CULTURAL PARAMETERS FOR β - CAROTENE PRODUCTION BY *Dunaliella* ISOLATES FROM SALINE LAKES OF IRAN

Faraz Arash Rad

ABSTRACT

Dunaliella is a type of halophile green-orange microalgae especially found in sea and salty fields and is known for its antioxidant activity because of its ability to create large amount of carotenoids. Few organisms can survive in highly saline conditions such as salt evaporation ponds. To survive, these organisms synthesize high concentrations of β -carotene to protect against the intense light and high concentrations of glycerol to provide protection against osmotic pressure. This offers an opportunity for commercial biological production of these substances. Nowadays microalga *Dunaliella* is under increasing attention for its β -carotene production, its applications in nutritional, pharmaceutical industries, cosmetics and in research field such as genetic engineering. Hence identification of this genus and high productive species has great importance.

In this research optimization of the cultural parameters for β - carotene production by *Dunaliella* isolates from saline lakes of Iran has been studied.

For this purpose sampling was done from varying areas of Urumia salt lake, Maharlu salt lake, Qum saltern and Gavkhuni lagoon. After enrichment of obtained samples, culturation was carried out in modified Johnson media. By altering the salinity concentration and pH during subcultures, contamination was eliminated. After single colony isolation *Dunaliella*' isolates were cultured in media containing 1 M NaCl, pH 7.5, with $100 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, for 30 days and best cultural parameters were selected.

After this processes highest β - carotene producing *Dunaliella* sp. was isolated and was treated under conditions mentioned above and new strength and stressful factors such as high salinity, temprature stress, high light intensity stress, nitrat and phosphate depletion stress and 2 molarities of KNO_3 with CO_2 , was testedfor their effects on β -carotene production. It was concluded that β - carotene

production was the higher in 3M salinity and at high light intensity. By adding the stress conditions and lacking nitrate and phosphate nutritional supply, maximum β -carotene production for per cell was determined. This amount was $63.26 \text{ pg.cell}^{-1}$.

Parallel to these studies a modified whole genomic DNA extraction protocol was also suggested for obtaining more purified and clarified bands.

Keywords: *Dunaliella*, β -carotene, hypersaline lakes , DNA extraction, stress factors, optimization.

Advisor: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ, Hacettepe University, Faculty of Science, Department of Biology, Biotechnology section

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleşmesinde katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişi ve kuruluşlara içtenlikle teşekkür eder.

Doktora çalışmalarım boyunca yardımını, yakın ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam ve değerli danışmanım Prof. Dr. Nilüfer Aksöz'e en en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sayın Prof. Dr. Emir Cansunar ve sayın Prof. Dr. Nilüfer Cihangir, değerli hocalarım ve tez izleme komitesinin üyeleri, tez izleme toplantılarında önerileri ile bu tezin bilimsel ve anlatım dilinin düzeltilmesinde yardımcı olmuşlardır.

Doktora eğitimi sırasında ders aldığım saygı değer tüm hocalarıma teşekkürlerimi suniyorum.

Dr. Amin Hejazi, tez çalışmasının gerçekleştirilmesi için gerekli ortam ve donanımı hazırlamıştır ve bilimsel yardımı geçmiştir.

Bugünlere gelmemi sağlayan, benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, daima moral kaynağım olan rahmetli fedakar babama ve, canım anneme de teşekkür ederim.

Gerek ders ve gerekse tez çalışmalarım sırasında tüm dostluğunu ve desteğini esirgemeyen canım arkadaşım Darioush MAJİDİ'ye teşekkür ederim.

Hazırlamış Olduğum Tezimi

Rahmetli **BABAMIN**

Kutsal Ruhuna Atfederim ...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Öz	i
ABSTRACT	iii
Teşekkürler	v
ŞEKİLLERİN DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Alg Terminolojisi	5
2.2. Canlılar Aleminde Alglerin Yeri	5
2.3. Alglerin Sınıflandırması	6
2.4. Alglerin Kullanım Alanları	8
2.4.1. Alglerin tarımsal kullanım alanları	8
2.4.2. Biyoyakıt üretiminde mikroalgler	9
2.4.3. Beslenmede mikroalgler	10
2.4.4. Tıp ve eczacılıkta mikroalglerin kullanımı	12
2.5. Karotenoidler	15
2.5.1. Karotenoidlerin kimyasal ve fizikokimyasal özellikleri	15
2.5.1.1. Karotenoidlerin aromatik kimyasalları	22
2.5.1.2. Karotenoidlerin ışık absorpsiyonu ve fotokimyasal	23
özellikleri	23
2.5.1.3. Karotenoidlerin biyosentezi	24
2.5.2. Karotenoidler ve sağlık	25
2.5.3. Karotenoid kaynakları	27
2.6. Antioksidan	28

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

2.6.1. Mikroalglerde antioksidan vitaminler ve pigmentler	29
2.7. Mikroalg Kültürasyon ve Üretim Sistemlerin Çeşidi	31
2.7.1. Açık hava sistemleri	34
2.7.2. Kapalı sistemler	35
2.8. <i>Dunaliella</i> 'nın Tarihçesi, Genel Özellikleri ve Sınıflandırması	40
2.8.1. Morfoloji	45
2.8.2. Habitat	50
2.8.3. <i>Dunaliella</i> türlerinin gelişmesi için gerekli olan hammaddeler ve üretimini etkileyen çevresel faktörler	53
2.8.3.1. Karbon	53
2.8.3.2. Azot	54
2.8.3.3. Fosfor	54
2.8.3.4. Magnezyum ve kalsiyum	54
2.8.3.5. Sodyum	55
2.8.3.6. Klor ve Sülfat	55
2.8.3.7. Demir	55
2.8.3.8. İz elementler	56
2.9. Alglerde Üreme	56
2.9.1. Vejetatif üreme	56
2.9.2. Eşeysiz üreme	57
2.9.3. Eşeyli üreme	58
2.10. <i>Dunaliella</i> Üremesinde Fizkokimyasal Faktörlerin Rölü	61
2.10.1. pH	61
2.10.2. Sıcaklık	61
2.10.3. Işık	62

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
2.11. <i>Dunaliella</i> Tarafından β -Karoten Üretimi	62
3. YÖNTEM VE GEREÇLER.....	65
3.1. Çalışılan Göller.....	65
3.2. Örnek Alınması.....	66
3.3. Mikroskopik Gözlemler ve İncelemeler	66
3.4. Doğal Ortamın Tuzluluk ve pH Değerlerinin Saptanması	67
3.5. Mikroorganizmaların Ekim ve Üreme Koşulları.....	67
3.5.1. Örneklerin hazırlanması ve zenginleştirilmesi	67
3.5.2. Kullanılan besiyerlerinin hazırlanması	68
3.5.3. Ortamlara ekim ve üretim	69
3.5.4. Tekrarlı Kültürasyonlar.....	69
3.5.5. Tek koloni izolasyonu	70
3.5.6. Kültürlerde üremenin ölçülmesi	72
3.5.7. Kültürlerde karotenoid ölçümü	73
3.6. Karoten Üretimi İçin Uygun <i>Dunaliella</i> Türünün Seçimi.....	75
3.7. <i>Dunaliella</i> 'da Üreme ve Karoten Üretimini Etkileyen Faktörlerin Araştırılması	75
3.7.1. <i>Dunaliella</i> tarafından karotenoid üretime uygun inkübasyon süresinin saptanması	76
3.7.2. Karoten üretimi için uygun pH değerinin saptanması.....	76
3.7.3. Karoten üretimi için uygun inkübasyon sıcaklık saptanması.....	76
3.7.4. Karoten üretimi için uygun tuz konsantrasyonunun saptanması	77
3.8. Stres Koşullarının Karoten Üretiminde Etkisi	77
3.8.1. Işık ve tuzluluk stresi.....	77
3.8.2. Nitrat ve fosfat stresi.....	78

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

3.8.3. <i>Dunaliella</i> 'da karoten sentezine etkili KNO ₃ oranının saptanması.....	79
3.9. <i>Dunaliella</i> DNA Ekstraksiyonu için Modifiye Yöntem Önerilmesi.....	80
4. BULGULAR	86
4.1. Örneklem Bölgelelerin Dış Görünüşleri, Mikrobik İzlemeler, Zenginleştirme ve İzolasyon	86
4.1.1. Örneklem bölgelerin dış görünüşleri	86
4.1.2. Mikroskopik gözlemler	87
4.1.3. Dört bölgeden alınan örneklerin zenginleştirilmesi	89
4.1.4. Saf <i>Dunaliella</i> ve tek koloni eldesi	89
4.2. Karotenoid Üretimine Etkili Bazı Parametrelerin Saptanması	91
4.2.1. <i>Dunaliella</i> tarafından karotenoid üretime uygun inkübasyon süresinin saptanması	91
4.2.2. <i>Dunaliella</i> tarafından karotenoid üretiminde en uygun pH değerinin saptanması	92
4.2.3. Karoten üretimi için uygun inkübasyon sıcaklık saptanması	97
4.2.4. Karoten üretimi için uygun tuz konsantrasyonunun saptanması sonuçları	101
4.2.5. Işık ve tuzluluk stresi bulguları (1. Stres Fazı)	106
4.2.6. Nitrat ve fosfat stresi bulguları (2. Stresi fazı)	107
4.2.7. <i>Dunaliella</i> 'da karoten sentezine etkili KNO ₃ oranının saptanması bulguları	110
4.2.8. <i>Dunaliella</i> için yeni bir DNA ekstraksiyon yöntemin önerilmesi.....	114
5. TARTIŞMA	116
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	122
KAYNAKLAR.....	123

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ	137
----------------	-----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. İspanya’da <i>Dunaliella</i> kültürasyonu ve β -karoten	3
Şekil 2.1. Bazı mikroalg grupları.....	5
Şekil 2.2. Kossorom gölcüğünde (ÇAD, Afrika) mikroalglerle beslenme	11
Şekil 2.3. Merkezi Birmanya’da <i>Spirulina</i> hasatlaması	12
Şekil 2.4. <i>Chlorella</i> algi (a), <i>Chlorella</i> algından üretilen bazı ürünler (b, c)...	16
Şekil 2.5. <i>Spirulina</i> algi (a), <i>Spirulina</i> algından üretilen bazı ürünler (b, c ve d)	17
Şekil 2.6. İzopren ünitesi (a), Karotenoid yapısı (b).....	18
Şekil 2.7. Halkalı (a) ve halkasız karotenler (b)	19
Şekil 2.8. Karotenoidlerin özellikleri.....	22
Şekil 2.9. Petroliyum eterde likopen, γ -karoten, β - karoten ve α - karoten pigmentlerin absorpsiyon spektrumları	24
Şekil 2.10. karotenoid biyosentez yolu	25
Şekil 2.11. Raceway ve sirküler havuzlarında	35
Şekil 2.12. Büyük torbalarda (big bag sistemi) alg üretimi.....	38
Şekil 2.13. Torbalarda (bag) alg üretimi	38
Şekil 2.14. Açık ve kapalı çatılarda tübüler sistemlerde mikroalg kültürasyonu	39
Şekil 2.15. Dış ve iç ortamda sürekli alg üretimi için Düz-levha tip fotobiyoreaktörler.....	40
Şekil 2.16. C.Hamburger tarafından 1905 yılında çizilmiş <i>Dunaliella salina</i> kırmızı alg.....	42
Şekil 2.17. Seçilmiş <i>Dunaliella</i> türlerinin çizimi.....	43
Şekil 2.18. Kızıldeniz’indeki kıyasal tuzlu sularında bulunan <i>Dunaliella</i> <i>salina</i>	44
Şekil 2.19. <i>Dunaliella</i> türlerinin ışık mikroskop ile mikroskopik resimleri ve hayat döngelerindeki aşamalar.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 2.20. A: <i>Dunaliella viridis</i> hücrelerinin palmella aşamasındaki geniş ölçüde musilaj tabakalar ile gömülmesi	47
Şekil 2.21. <i>Dunaliella salina</i> (1–17): pigment kristallar; (3), granüller; (8), bölünme aşamaları; (10-13), aplanosporler; (14-15), yeşil hücreler, (<i>D. viridis</i> ? 16-17) ve skaning elektron mikroskop ile <i>Dunaliella</i> sp. mikrografı; (18).....	47
Şekil 2.22. Çift flagellumlu <i>D. salina</i> 'nın yüzme modeli	48
Şekil 2.23. A: <i>Dunaliella minuta</i> (CCAP19/5) elektron mikroskop mikrografı	49
Şekil 2.24. <i>Dunaliella bardawil</i> 'in elektron mikroskop mikrografı	50
Şekil 2.25. Uremiyye gölünün, İran'ın batı Azerbaycan'daki fotoğrafı	51
Şekil 2.26. <i>D. viridis</i> 'de palmella aşaması; normal koşulda (sağ) ve laboratuvarıda kültürasyonu yapılmış <i>D. viridis</i> örneği (sol)	57
Şekil 2.27. <i>Dunaliella salina</i> 'da aplanospor aşaması	57
Şekil 2.28. Kırmızı ve yeşil <i>Dunaliella salina</i> 'nın yığılması (sol) ve zigot oluşumu (sağ).....	60
Şekil 2.29. <i>Dunaliella salina</i> 'nın cinsel bölünmesi	60
Şekil 3.1. Örneklem mekânları	65
Şekil 3.2. Örneklem	66
Şekil 3.3. Örneklerin ışık mikroskop ile (×100) incelemesi	67
Şekil 3.4. Ortamlara ekim ve üretim	69
Şekil 3.5. Tek koloni izolasyonu işlemleri	71
Şekil 3.6. Petriden yatık agara tek kolonilerin transferleri	72
Şekil 3.7. Hücre sayımına hazırlanma.....	72
Şekil 3.8. Karotenoid konsantrasyonu ölçümüne hazırlık.....	73
Şekil 3.9. Karotenoid ekstraksiyonu işlemleri	74
Şekil 3.10. Nitrat ve fosfat stresin uygulanması.....	79
Şekil 3.11. DNA ekstraksiyonunda ön hazırlanma malzemeleri.....	81

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 3.12. Örneklerin santrifüjleme aşaması	82
Şekil 3.13. DNA ekstraksiyonunda hücre zarlarının ortalıktan kaldırması	82
Şekil 3.14. DNA ekstraksiyonunda üç fazın gürülmesi	83
Şekil 3.15. DNA ipliğın görünümü ve tüplerin derin dondurucuda bırakılması	83
Şekil 3.16. Santrifüjleme ve çokeltiye 100 µl %75'lik etanol ilavesi	84
Şekil 3.17. Örneklerin kurutulması ve RNase'ın kullanımı	84
Şekil 3.18. Elektroforez aşaması	84
Şekil 4.1. Urumiye gölünün turuncu renkte göl kıyılarındaki alglerin yığını (A ve C) ve Gavhuni bataklığının turuncu ve yeşil bataklık yatağındaki tabakalarda alglerin yığını (B)	86
Şekil 4.2. Toplnmış <i>Dunaliella</i> 'ların mikroskobik görünümü	87
Şekil 4.3. Işık mikroskobunda çekilmiş <i>Dunaliella</i> hücrelerin fotoğrafı, flagellumlar (ok), değişik şekiller, renkler ve fincan şeklinde (kırmızı ok) kloroplast fotoğrafları	88
Şekil 4.4. <i>Dunaliella</i> 'daki farklı tuzluluklarda şekil değişmesi; A ve C : düşük tuzlulukta, 1 molar ve B : yüksek tuzlulukta	88
Şekil 4.5. Zenginleştirme aşamasındaki mikroalg kültürün renk değişim olgusu	89
Şekil 4.6. <i>Dunaliella</i> algın sıvı ortamdaki kültürü ve üremesi	89
Şekil 4.7. katı LB besiyerlerinde mikrobiyal kontaminasyon incelemesi	90
Şekil 4.8. Tek küresel kolonilerin üremesi	90
Şekil 4.9. Yatık agardaki <i>Dunaliella</i> spp. kültürü	91
Şekil 4.10. MJ besiyerinde göl, tuzla ve bataklıklardan alınan mikroalglerin hücre sayılarında meydana gelen zamana bağılı değişimler, (1M NaCl, pH=7.5, 25 °C'de, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün)	93
Şekil 4.11. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin karotenoid üretim değerlerin zamana bağılı değişimlerin karşılaştırması, (1M NaCl, pH=7.5, 25 °C'de, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün)	93

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 4.12. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimlerin karşılaştırması, (1M NaCl, pH=7.5, 25 °C'de, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün)	94
Şekil 4.13. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin farklı pH'ların; pH=6, 7, 8 ve 9, hücre sayılarındaki etkisi, (1M NaCl, 25 °C'de, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün)	95
Şekil 4.14. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin farklı pH'ların; pH=6, 7, 8 ve 9, karotenoid üretimindeki etkisi, (1 M NaCl, 25 °C'de, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün)	96
Şekil 4.15. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin farklı pH'ların; pH=6, 7, 8 ve 9, hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin farklı pH'ların; pH=6, 7, 8 ve 9; etkisi, (1M NaCl, 25 °C'de, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün) ...	96
Şekil 4.16 ve Şekil 4.17. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin iki farklı sıcaklıkta; 20 °C ve 35 °C hücre sayılarındaki etkisi, (1M NaCl, pH=7.5, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün)	98
Şekil 4.18 ve 4.19. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin iki farklı sıcaklıkta; 20 °C ve 35 °C toplam karotenoid konsantrasyonlarına etkisi, (1M NaCl, pH=7.5, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün)	99
Şekil 4.20 ve 4.21. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin iki farklı sıcaklıklarda; 20 °C ve 35 °C hücre başına karotenoid üretimindeki etkisi, (1M NaCl, pH=7.5, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün)	100
Şekil 4.22. 1 M NaCl MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerini hücre sayılarında zamana bağlı değişimler (1M NaCl, pH=7.5, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün)	101
Şekil 4.23. 1 M NaCl MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerini toplam karotenoid miktarlarındaki zamana bağlı değişimler (1M NaCl, pH=7.5, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün)....	102
Şekil 4.24. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimlerin karşılaştırması, (1M NaCl, pH=7.5, 25 °C'de, 100 µmol foton m ⁻² s ⁻¹ , 30 gün)	102

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

- Şekil 4.25 ve 4.26. 2 M NaCl MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerini hücre sayıları ve toplam karotenoid miktarlarındaki zamana bağlı değişimler (2 M NaCl, pH=7.5, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün) 103
- Şekil 4.27. 2 Molar MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimlerin karşılaştırması, (2 M NaCl, pH=7.5, 25 °C'de, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün)..... 104
- Şekil 4.28 ve 4.29. 3 M NaCl MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerini hücre sayıları ve toplam karotenoid miktarlarındaki zamana bağlı değişimler (3 M NaCl, pH=7.5, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün) 105
- Şekil 4.30. 3 Molar MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimlerin karşılaştırması, (3 M NaCl, pH=7.5, 25 °C'de, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün)..... 106
- Şekil 4.31 ve 4.32 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiyye gölünden alınan mikroalglerin hücre sayıları ve toplam karotenoid miktarlarındaki zamana bağlı değişimleri (3 M NaCl, pH=7, 100 ve 400 $\mu\text{mol foton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 30 gün, statik ve Çalkalamalı inkübatör, 35 °C'de) .. 107
- Şekil 4.33. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiyye gölünden alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimleri (3 M NaCl, pH=7, 100 ve 400 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün, statik ve çalkalamalı inkübatörde, 35 °C'de)..... 108
- Şekil 4.34 ve 4.35. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiyye gölünden alınan mikroalglerin hücre sayıları ve toplam karotenoid konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişimleri (3 M NaCl, pH=7, 400 $\mu\text{mol foton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 21 gün, statik ve Çalkalamalı inkübatör, 35 °C'de, nitrat ve fosfat eklenmeden önce)..... 109
- Şekil 4.36. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiyye gölünden alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimleri (3 M NaCl, pH=7, 400 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 21 gün, çalkalamalı inkübatörde, 35 °C'de) 110
- Şekil 4.37 ve 4.38. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiyye gölünden alınan mikroalglerin hücre sayıları ve toplam karotenoid konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişimleri (12 mM KNO_3 , 3 M NaCl, pH=7, 400 $\mu\text{mol foton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 21 gün, çalkalamalı inkübatör, 35 °C'de,)..... 111

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

- Şekil 4.39. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiyye gölünden alınan mikroalglerin hücre başına karoten miktarının zamana bağlı değişimleri (12 mM KNO₃, 3 M NaCl, pH=7, 400 µmol foton.m⁻²s⁻¹, 21 gün, çalkalamalı inkübatör, 35 °C'de,)..... 112
- Şekil 4.40. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiyye gölünden alınan mikroalglerin hücre sayılarındaki zamana bağlı değişimleri (1 M KNO₃, 3 M NaCl, pH=7, 400 µmol foton.m⁻²s⁻¹, 21 gün, çalkalamalı inkübatör, 35 °C'de,)..... 112
- Şekil 4.41. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiyye gölünden alınan mikroalglerin toplam karotenoid konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişimleri (1 M KNO₃, 3 M NaCl, pH=7, 400 µmol foton.m⁻²s⁻¹, 21 gün, çalkalamalı inkübatör, 35 °C'de,)..... 113
- Şekil 4.42. 3 M NaCl içeren MJ besiyerinde Urumiyye gölünden alınan mikroalglerin hücre başına karoten miktarının zamana bağlı değişimleri (1 M KNO₃, 3 M NaCl, pH=7, 400 µmol foton.m⁻²s⁻¹, 21 gün, çalkalamalı inkübatör, 35 °C'de,)..... 113
- Şekil 4.43. İki yöntemden *Dunaliella* DNA ekstraksiyonu karşılaştırması; (A) Olmos, 2002 protokolu ile ekstraksiyon ve (B) bu çalışmada önerilen yöntemi ile DNA ekstraksiyonu 115

ÇİZELGELERLER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Alg gruplarının sınıflandırma şeması	7
Çizelge 2.2. Mikrobiyal kaynaklı ticari olarak üretilen karotenoidler.....	20
Çizelge 2.3. Farklı renkler için önerilen karotenoid miktarları	21
Çizelge 2.4. Karotenoidlerin bazı fonksiyonel özellikleri ve farmakolojik yararları.....	27
Çizelge 2.5. Gıda maddelerinde kullanılan bazı karotenoidler.....	28
Çizelge 2.6. Açık ve kapalı algal sistemlerin avantajları ve dezavantajları ..	33-34
Çizelge 2.7. <i>Dunaliella</i> algin güncel sınıflandırması	41
Çizelge 2.8. Bazı planktonik alglerin yüzüş ve kayış hızları.....	48-49
Çizelge 2.9. <i>Dunaliella salina</i> 'dan özütlenmiş β -karoten'in uygulama potansiyelleri.....	63-64
Çizelge 3.1. <i>Dunaliella</i> kültürasyonu için modifiye Johnson besiyeri	68
Çizelge 3.2. İlk aşamada uygulanan ışık stresi.....	77
Çizelge 4.1. Farklı bataklık ve göllerden alınan örneklerin tuzluluk ve pH'ları ..	87
Çizelge 4.2. <i>Dunaliella salina</i> ortamındaki çeşitli çevresel faktörlerin karotenoid ve biyomas üretiminde etkisi	114

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A°	Angstrom; santimin yüzmilyonda biri
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ASW	Artificial Sea Water (yapay deniz suyu)
DMAPP	Dimetilalilpirofosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetrasetik Asit
FPP	Fornesylpirofosfat
GGPP	Geranilgeranilpirofosfat
GPP	Geranilpirofosfat
HBKM	Hücre başına Karotenoid miktarları
HDL	High-Density Lipoprotein
H _s	Hücre sayısı (10 ⁶ hücre ml'de)
IPP	İzopentilpirofosfat
kb	Kilo base pairs = 1.000 bp
K _m	Karotenoid miktarı
LB	Luria–Bertani
LDL	Low-Density Lipoprotein
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans
p.g	Pikogram
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TAE	Tris-acetate-EDTA
TE	Tris – EDTA
TEN	Tris-HCl-EDTA-NaCl

THP	Tek Hücre Proteini
V	Hacim
x100	Işık mikroskoptaki objektif merceğın (lenz) katsayısı
µg	Mikrogram
µmP.M ⁻² S ⁻¹	Mikromol foton/metre ² .saniye

1. GİRİŞ

Algler fotosentetik ökaryotik organizmalar olup tek veya çok hücrelidirler. Yapı ve pigment içeriklerine bağlı olarak bazen bitki bazen de protist olarak isimlendirilmektedirler. (Borowitzka and Siva, 2007)

Algler sulu ortamların (deniz, göl vs.) en önemli enerji kaynağı ve besin zincirini oluştururlar. Üreme şekilleri seksüel veya aseksüel olabilmektedir, çoğu hareketsizdir ama hareket özelliği gösteren gruplar da vardır. Alglerin boyutları mikroskopik olabileceği gibi, metrelerle de ifade edilebilir ve farklı şekil ve organizasyonlardan oluşurlar. Bilinen tüm algler içindeki en hızlı büyüme oranını gösteren Pasifik Denizi'nin dev su yosunu *Macrocystis pyrifera*'nın yaprakları, çelikleme sonrası haftada 3 ile 4.5 Mt. arası boy vermektedir. Çok yıllık bu algler yaklaşık 60 metre uzunlukta olabilirken, bazen 100 Mt. yüksekliğe kadar ulaşabilirler, öte yandan bu yosunlar yaklaşık 100 kg'lık bir ağırlığa sahiptir. (Borowitzka and Siva, 2007)

Algler, tüm ekosistemlerin bütünlüğünün korunmasında önemlidirler. Okyanuslarda bulunan diyatomlar ve diğer mikroskopik algler (mikroalgler), tüm dünyanın fotosentetik karbon ihtiyacının üçte ikisini üretirler. Sularda, algler tarafından gerçekleştirilen fotosentez, canlılara oksijeni sağlar, algler bunun yanı sıra suda yaşayan canlıların besin ve korunma gibi ihtiyaçlarını da karşılarlar. 17. yüzyılın sonlarından beri, kahverengi alglerin yakılmasıyla mineralce zengin küllerinden sabun, cam, soda ve gübre yapımında kullanılan "potas" elde edilmektedir. Kimyasal maddeler arasında yer alan brom ve iyot ilk kez bu külden izole edilmiştir ve iyot hala Japonya'da deniz yosunlarından elde edilmektedir. Algler yaygın bir şekilde gübre olarak kullanılmaktadırlar. Dünyanın bazı kesimlerinde karın altında yaşayabilen algler, karın baharda pembe görülmesine sebep olurlar (Gualtieri and Barsanti, 2006; Borowitzka and Siva, 2007).

Biyoteknolojik çalışmalarda küf ve mantarların yanı sıra, algler de kullanılır. Alglerin bu konuda tercih edilme nedenleri; günde ağırlıklarını yaklaşık iki katına çıkartabilmeleri, biyoteknolojik işlemlerden geçirilme kolaylıkları, maliyetlerinin düşük olması, çok sayıda yararlı madde içermeleri ve çevresel faktörlere direnç göstermeleri olarak özetlenebilir.

Mikroalglerin ilk kültürü pratik amaçla yapılmıştır. Daha sonra Nobel ödülünü kazanmış Otto Warburg 1919'da yayınladığı çalışmasında yeşil mikroalg Chlorella'yı üretebildiğini bildirmiştir (Gualtieri and Barsanti, 2006; Borowitzka and Siva, 2007; Huseinzadeh, 2008). Alg kültürasyonundaki ürün veriminin, tarımdaki ürün verimine göre daha yüksek olduğu bilinmektedir (Huseinzadeh, 2008). Bir diğer avantaj ise, alglerin çorak topraklarda üreme ve kültürasyon olasıdır; zira algler kalitesiz ve az tuzlu sularda da üreyebilirler (Huseinzadeh, 2008).

Mikroalgler, çeşitli taksonomik gruplara ait, mikroskobik tek hücreli, çok hücreli, planktonik veya bentik alglerdir. Mikroalgler çok küçük su canlılarıdır, ancak mikroskop altında görülebilirler. Su içinde asılı bulunurlar. Binlerce türüne, tatlı ve tuzlu sularda ve denizlerde rastlanır. Fotosentez yapabildikleri için çok çeşitli çevrelerde yaşam sürdürebilirler. Karada çok nemli ortamlarda varlık gösterebilirler. Evrim sırasında karada toplanan ilk mikroorganizmalar oldukları kabul edilmektedir. Bu durum, yıllar önce meydana gelmiş bir olayla kanıtlanmıştır. 1883'de Krakatoa dağının (Java ve Sumatra'nın arasındaki volkanik küçük bir ada), patlamasının büyük bir okyanus alanındaki yaşamı tümüyle yok etmesinden sonra kendi kendine yeniden oluşan ilk mikroorganizma, algler olmuştur (Kaçka, 2003).

Gerek doğal ortamda gerekse laboratuvar koşullarında kültürü yapılan alglerin ekonomideki önemi büyüktür. Bu önem, alglerin çok çeşitli alanlarda kullanılmasından ileri gelir. Mikroskobik alglerin akuatik ekosistemde önemli biyolojik ve ekolojik rolleri vardır. Bunun yanı sıra mikroalgler gerek insan sağlığı gerekse akuakültürde yetiştiriciliği yapılan canlıların beslenmesi açısından önemli maddeler içerirler (Mikroalgler son derece zengin karbonhidrat, protein ve özellikle yağ asidi içeriğine sahiptirler). Kontrollü koşullar altında alglerin yoğun üretimi yapılarak, içerdikleri pigmentler, proteinler, vitaminler, yağ asitleri ve minerallerden ötürü karasal ve sucul canlıların beslenmesinde kullanılabildikleri bildirilmektedir (Durmaz ve ark., 2006; Koray, 2002). Mikroalgler ayrıca, toz yem ve canlı yem üretiminde, gübre kaynağı olarak, suların arıtılmasında, ötrofikasyon kontrolünde, gıda endüstrisinde, içerdikleri pigment maddeleri, antibiyotikler, vitaminler nedeniyle de tıp, eczacılık alanlarında, kozmetik ürünlerinde katkı maddesi olarak ve biyoyakıt üretiminde kullanılırlar (Borowitzka and Borowitzka 1992, 2007).

Basit yapılı, tek hücreli mikroalglerin birçoğu gıda sektöründe değerlendirilir. Özellikle de gelişmekte olan ülkelerde besin kaynağı olarak tüketilirler (Kargın, 2006). Aşırı avlanma ve dünya balık stoklarının bilinçsizce kullanımı ticari öneme sahip kabuklu deniz canlılarının üretiminde; yani akuakültür çalışmalarında önemli artışların meydana gelmesine neden olmuştur. Bu sanayinin genelde büyümesi etkin alg üretim sistemlerinin yetersiz olması nedeniyle de yavaşlamıştır. Tek hücreli mikroalg, ticari öneme sahip birçok su canlısının, özellikle balıkların larva aşamasında önemli besin kaynağı ve rotiferin beslenmesinde kullanılan değerli bir canlı besindir; Çünkü mikroalgler sucul sistemlerin ilk biyolojik CO₂/O₂ dönüştürücüleri, biokütlenin en önemli üreticisidir (Kargın, 2006).

Mikroalgler, biyoteknolojinin gelecekteki en önemli kaynağıdır (Borowitzka, 1992; Tsoglin and Gabel, 2000; Pulz, 2001). Bu hususlar göz önüne alındığında mikroalg üretiminde güvenli, uygun bir üretim sisteminin seçilmesi gerekmektedir. Mikroalg üretimi için önemli temel hususlar; ışık ya da güneş enerjisi, su, karbondioksit ve inorganik zenginleştirici maddelerdir. Bu ihtiyaçlar temin edildiğinde alglerin yoğun miktarlarda üretimi de mümkün olmaktadır. Bazı ülkeler mikroalg üretiminin önemine değer vererek mikroalg konusunda geniş çapta faaliyetlere girmişlerdir; şu anda *Dunaliella*'dan alınan β -karoten (natürel β -karoten) üretimi Hindistan, Çin, Avustralya, Amerika ve İspanya'da yapılmaktadır (Deshpande, 2005; Borowitzka, 2005, 2007) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. İspanya'da *Dunaliella* kültürasyonu ve β -karoten (Tredici, 2007).

Dünya çapındaki natürel β -karoten isteği yıl başına 10-1000 ton tahmin edilmiştir, bu ürünün fiyatı, kilo başına 1000-2000\$'dır.

Bu çalışmada İran'ın tuzlu göllerinden izole edilen *Dunaliella* mikroalglerinin β -karoten üretim kapasitelerin saptanması ve β -karoten üretimi için uygun koşulların araştırılması amaçlanmaktadır. Bir diğer ifade ile *Dunaliella* tarafından β -karoten üretim koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilecektir. Bunun için, değişik sucul ortamlardan izolasyonlar gerçekleştirilecek, elde edilen en iyi alg β -karoten üreticisi seçilecek ve üretime etkili bazı kültürel parametreler saptandıktan sonra çeşitli streslerin (değişik tuzluluk dereceleri, değişik ışık şiddetleri, üreme ortamındaki bazı temel maddelerin eksikliği gibi), β -karoten üretimi ve üremeye olan etkileri araştırılacaktır. Çalışma sonucunda en üretken izole, en uygun üreme ortamı ve bunların yanı sıra β -karoten üretimi için uygun ışık şiddeti belirlenecek ve endüstriyel boyutta β -karoten üretimi için öneride bulunulacaktır. Çalışmada ayrıca *Dunaliella* mikroalgine ait yeni DNA ekstraksiyon protokolünün önerilmesi de amaçlanmaktadır.

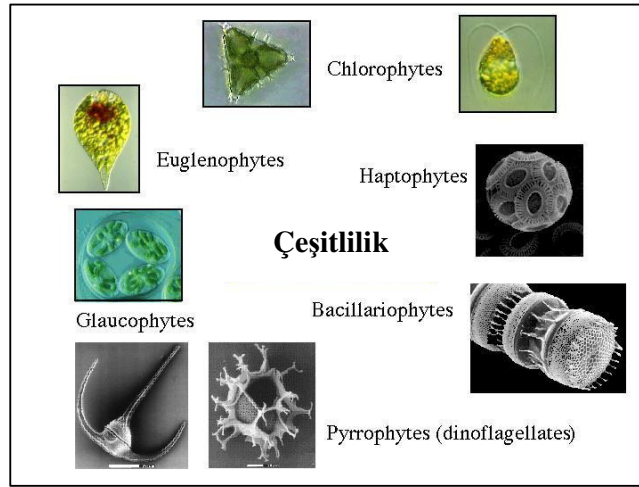
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alg Terminolojisi

Alglerden söz eden ilk kaynak Çin literatüründe yer almakta ve bu kaynaklarda alg “Tsao” olarak ifade edilmektedir. Yunanca ve Latince de alg için sırasıyla Fikis ve Fiyukis denildiği bildirilmektedir. Yunanca’da “Fikis” alg yanı sıra denizin yabani otunu da belirtmektedir. Türkçede günlük konuşmalarda alg “Yosun”, Farsçada “Colbâk” ve İngilizcede seaweed denilmektedir. Uzun zamanlar boyunca Hawaii yerlileri algleri yemek olarak kullanmış ve “Limu” olarak isimlendirmişlerdir (Tredici, 2007). Bilimsel olarak alg bilimine “Phycology” denilir ve bazı kaynaklarda da “Phycology” terimi Algoloji olarak da ifade edilmiştir (Kiyanmehr, 1997).

2.2. Canlılar Aleminde Alglerin Yeri

Su yosunları ya da Algler, büyük çoğunluğu fotosentetik olan ve bitkilere benzemesine karşın, bitkiler alemiyle yakın akraba olmayan sucul canlı bir grubudur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Bazı mikroalg grupları (Gualtieri and Barsanti, 2006).

"Yosun" tanımı çoğunlukla su yosunları (algler) için kullanılsa da; yosunlar, kara yosunları ve su yosunları (algleri) gruplarını kapsayan genel bir terimdir.

Su yosunları, bitkilerin aksine, fotosentez ürünlerini nişasta formunda depolamazlar. Kloroplastları, sitoplazma içerisinde serbest olarak değil, granüller endoplazmik retikulum üzerinde bulunur. Klorofil-c taşırlar ve bitkilerde bulunmayan başka pigment maddeleri bulundurlar. Çeşitli su yosunu gruplarına özel renklerini bu pigment maddeleri verir.

Su yosunlarında, bitkilerdeki yaprak, gövde gibi elemanlara benzeyen, ancak damar dokusu taşımayan, özelleşmemiş vücut bölümlerine "tallus" denir.

Üremeleri, ikiye bölünme, tomurcuklanma, ana bitkinin büyümesi, spor hücrelerinin ya da eşey hücrelerinin üretilmesi şeklinde gerçekleşir. Fotosentetik su yosunları, sucul ortamların birinci derecedeki üreticileri olduklarından önemlidirler.

Alglerin bir diğer önemi de, birçok sucul canlının besin kaynağını oluşturmalarıdır. Ayrıca, çeşitli endüstri alanlarında kullanılan bazı hammaddeler yine bu su yosunlarından elde edilmektedir. Yaşamı sona eren su yosunlarının dış iskeletleri dibe çökerek, denizel kayaçların yapısına katılır.

Algler ve bitkiler bazı benzer depo bileşikler üretilirler, parazitlere karşı ortak bir savunma mekanizması gösterirler ve bazı algler ve bitkiler arasında morfolojik benzerlikler görülmektedir; ancak onların bu benzerliği, farklılıklarına göre daha düşük seviyededir. Algler yüksek ayırım göstermezler; kök, gövde, yaprak ve belirgin iletim dokuları yoktur. Algler için, farkı sınıflandırmalar yapılsa da genel olarak, prokaryotik ve ökaryotik olmak üzere iki ayrı sınıfa dahil edilebilirler. Alg terimi hem mikro ve hem makroalgleri kapsamaktadır.

2.3. Alglerin Sınıflandırması

Fikologların şu anda alg sınıflandırma konusundaki temel görüşleri; alglerin belirgin, kesin ve sistematik sınıflandırma sisteminin olmadığı yönündedir; çünkü hızla ortaya çıkan yeni genetiksel kanıtlar yanı sıra, yeni keşfedilen alglerin hücresel organel ve partikülleri sayesinde, alg sınıflandırması sürekli gözden geçirilmekte ve değiştirilmektedir (Gualtieri and Barsanti, 2006; Borowitzka and Siva, 2007).

Gualtieri ve Barsanti tarafından 2006 yılında, algler için geçici bir sınıflandırma önerilmiştir; Buna göre, prokaryotik algler iki ve ökaryotik algler ise dokuz filuma ayrılmaktadır (Çizelge 2.1) (Gualtieri and Barsanti, 2006).

Çizelge 2.1. Alg gruplarının sınıflandırma şeması (Gualtieri and Barsanti, 2006)

Alem	Filum	Sınıf
Öbakter Prokaryotler	Cyanophyta	Cyanophyceae
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae
Ökaryot	Glaucophyta	Glaucophyceae
	Rhodophyta	Bangiophyceae Şorideophyceae
Ökaryot	Heterokontophyta	Chrysophyceae Xanthophyceae Eustigmatophyceae Bacillariophyceae Rhaphidophyceae Dictyochophyceae Phaeophyceae
	Haptophyta	Haptophyceae
	Chryptophyta	Chryptophyceae
	Dinophyta	Dinophyceae
	Euglenophyta	Euglenophyceae
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae
	Chlorophyta* (* bu tezde incelenecek alg bu düzeye aittir)	Prasinophyceae
		Chlorophyceae*
		Ulvophyceae
		Cladophorophyceae
		Bryopsidophyceae
		Zygnematophyceae
		Trentepohliophyceae
		Klebsormidiphyceae
		Charophyceae
		Dasycladophyceae

2.4. Alglerin Kullanım Alanları

Algler üzerinde birçok çalışma yapılmış olmakla birlikte, bunlardan en önemlileri, büyüme hormonlarıyla (oksin, giberellin, sitokinin) ilgili olmaktadır. Alglerden elde edilen bu ürünlerin, bitki gelişimini %23 artırdığı bildirilmektedir (Akbaba ve ark., 2003). Ancak algler, daha pek çok alanda da kullanılmaktadır.

2.4.1. Alglerin tarımsal kullanım alanları

Algler, tüm dünyada, tarımsal alanda, biyogübre olarak kullanım bulur. Eski yıllardan beri, alg gübreleri özel kültürler için kullanılmaktadır. Örneğin, Fransa'nın Atlantik kıyılarındaki seralarda sebze yetiştiricileri tarafından çilek gübrenmesinde mikroalglerden yararlanılmaktadır (Akbaba ve ark., 2003).

Gübre olarak yalnız kahverengi algler değil, yeşil ve kırmızı algler de kullanılmaktadır. Brezilyalı balıkçıların, sahillerinde bol bulunan alglerden biri olan *Hypnea* türlerini toplayıp, bunları hindistancevizi ve palmyelerin kuvvetli kök yapmaları için gübre olarak değerlendirdikleri bilinmektedir. Yine Brezilya'da *Ulva* ve *Enteromorpha* da aynı amaçlar için toplanıp, kullanılmaktadır (Akbaba ve ark., 2003).

Uzun yıllardan beri, denizler tarafından doğal olarak kıyıya atılan bazı deniz algleri, tarlalarda gübre olarak kullanılmaktadır. Bu konuda Avrupa ülkeleri genelde *Fucus*, *Ascophyllum* ve *Laminaria* cinslerini, Amerika ise *Macrocystis* (esmer alg), *Nereocystis* gibi büyük tatlı su kahverengi alglerini değerlendirmektedirler (Akbaba ve ark., 2003).

Alg tallusları, toprakta uzun süre kaldıkları zaman, kolayca parçalanarak bol miktarda azot ve kalsiyum ortaya çıkarırlar. Ayrıca iz element olarak magnezyum, mangan, bor, brom, iyot, çinko, bakır ve kobalt da içerirler. Dolayısıyla algler bulundukları ortamda toprak bakterilerinin (*Rhizobium* vb.) gelişmesini kolaylaştırır ve etkinliğini artırır. Böylece alg ürünleri, diğer bitkilerin büyümesini teşvik etmektedir (Akbaba ve ark., 2003; Gualtieri and Barsanti, 2006; Huseinzadeh, 2008).

Tarımsal savaşımında, yararlı bitkilere zarar veren bitki, böcek ve benzeri zararlılarla savaşmak için kullanılan ilaçlara alg ürünlerinin katılması, büyük yarar

sağlamaktadır. Bitkileri ilaçlamak için kullanılan %5'lik kalsiyumasetat çözeltisine amonyum alginat (alglerden elde edilen bir yan ürün) eklenirse, asetatin zehirleme etkisi artmakta ve ilaç bozulmadan uzun bir süre kalabilmektedir. Aljinik asitin de (alglerde bulunan asit), böcek öldürücülere karıştırılmasıyla genç sürgünler zararlı böceklerden arındırılmaktadır. Örneğin, arpalardaki çizgi hastalığına ve buğday yanmalarına karşı bu kahve rengi alglerin sulu çözeltileri kullanılmaktadır (Gualtieri and Barsanti, 2006).

2.4.2. Biyoyakıt üretiminde mikroalgler

Son yıllarda baş gösteren petrol bunalımı yeni enerji kaynaklarının gündeme gelmesine yol açmıştır. Bu amaçla biyogaz ve yenilenebilir yakıt üretimi gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Günümüz çalışmaları, mikroorganizma lipidlerinden enerji elde edilmesi ve dizel yakıtlarının yerine bunların kullanımları üzerine yoğunlaşmaktadır. Alglerin yapısındaki yağ ve hidrokarbonlar, sitoplazmada depo maddesi, hücre içinde farklı organellerin zar bileşenleri; hücre dışı yapısına katılan bileşenler olarak üç farklı biçimde organizma içinde bulundurulabilir.

Yapılan çalışmalar sonucu alglerden elde edilen bazı kuru lipid ağırlıklarının, algin toplam ağırlığına oranları *Scenedesmus* %12-40, *Chlorella* %14-22, *Dunaliella* %6-8, *Synechococcus* %11, ve *Botryococcus* %90 şeklinde bildirilmektedir (Raja et al., 2008; Gualtieri and Barsanti, 2006). En yüksek değerlere sahip olan *Botryococcus*'un potansiyel yakıtlarla kıyaslanması halinde bu algden diğer alternatif yakıtlara göre daha fazla yenilenebilen sıvı yakıt elde edilebileceği ileri sürülmektedir (Raja et al., 2008). Yukarıda da belirtildiği gibi *Botryococcus* yüksek oranda hidrokarbon (lipit) içerir, Bu oran kuru ağırlığa göre *Chlorophyceae* ve *Cyanobacteria*'larda %5 olurken, *Botryococcus braunii*'de %90'a ulaşmaktadır (Chisti, 2007; Mousdale, 2008). Bu nedenle, *Botryococcus*, yakıt araştırmalarında tercih edilen bir organizmadır.

2.4.3. Beslenmede mikroalgler

Mikroorganizmaların tümü hücre içinde belirli miktarda protein içerirler; bu proteine “Tek Hücre Proteini (THP)” denir. Patojen olmayan ve toksik madde oluşturmeyan birçok mikroorganizma grubundan bu proteinler elde edilmektedir. Elde edilen bu proteinler de, insan ve hayvan gıdalarına protein kaynağı olarak eklenir. (Durmaz ve Gökpınar, 2006; Gualtieri and Barsanti, 2006).

THP üretimde kullanılan mikroorganizmalar olarak; algler, bakteriler, mayalar, küfler ve mantarlar sayılabilir. Ancak mikroalgler, THP üretiminde en çok kullanılır ve günümüzde, insan ve hayvanların beslenmesinde geniş uygulama alanı bulurlar.

Mikroalglerin tercih edilme nedenlerinden biri, fotosentez yapabilmeleridir. Bu da THP eldesinde maliyetin düşük olmasına yol açar. Alglerin üretiminde ışık gereklidir; ışığın %12-20’si kimyasal bileşimde enerjiye dönüşür. Göllerde kalsiyum karbonat miktarı yüksek olduğundan, THP üretiminde göllerin kullanılması uygundur. THP üretiminde dünyada en yaygın kullanılan alg türü ise *Spirulina maxima*’dır (Şekil 2.2).

Mikroalgler üremek için organik karbon bileşiklerine gereksinim duymazlar. Üremeleri için karbon kaynağı (karbondioksit, bikarbonat), azot kaynağı (nitrat) gerekir. Gelişimleri için, fosfat, sodyum klorür, magnezyum, bakır, klor ve sülfat iyonları gerekir. Bu da düşük maliyetle üretim avantajı sağlar. Ototrofik algler enerjilerini inorganik elementleri veya bileşikleri oksitleyerek karbon ihtiyacını CO₂’den, nitrojen ve diğer mineralleri inorganik bileşiklerden sağlayabilirler. Algler çok kolay ve çabuk ürerler. Örneğin 10¹⁵ litre içerisinde üretilebilecek alg miktarı, tüm dünya nüfusunun gereksinimi olan proteinleri karşılayabilecek kapasitededir (Gualtieri and Barsanti, 2006).

Alglerde ayrıca pek çok karotenoid bulunur. Karotenoidler, birçok bitkide, algde ve fotosentez yapabilen bakteride bulunan, doğal çözünebilen yağ pigmentlerinin bir sınıfıdır. Özellikle β-karoten, likopen, zeoksantin, astaksantin ve lütein pigmentleri, besin renklendirmede ve gıda katkısı olarak kullanılır. Işık ve oksijen radikallerinin zararlarına karşı koruyucu olarak işlev görür.



Şekil 2.2. Kossorom gölcüğünde (ÇAD, Afrika) mikroalglerle beslenme (Tredici, 2007).

Alglerin kullanım avantajlarından biri, gıda atıklarının giderimidir. Günümüzde alglerin endüstriyel düzeyde üretimi için, tatlı su ve kanalizasyon suyu ile doldurulmuş, derinliği 20-30 cm'ye kadar olan, üstü açık, betondan yapılmış, karıştırıcı ve santrifüjleme düzenekleriyle donatılmış havuzlar kullanılmaktadır. Hazırlanmış havuzlara, farklı bir ortamda geliştirilmiş alg kültürleri aşılanır. Havuz ortamındaki pis su, algin gelişimi için azot ve fosfor kaynağı sağlarken, bakteriler tarafından parçalanmış organik maddeler de algin yararlanabileceği küçük yapıtaşlarına dönüştürülürler. Böylece alglerin kolayca üremeleri sağlanır. Bu tip havuzlarda, kanalizasyon suları yerine endüstriyel ve tarımsal atık maddeler de kullanılır. Böylece bu atık maddeler proteine çevrilmiş ve çevre kirliliği ortadan kalkmış olur. Gereksinime uygun besin değeri olan ürünlerle beslenmede de mikroalgler önemlidir. Elde edilen alg ürününün bileşiminde değerli gıda maddeleri bulunur. Alg hücreleri %60'a varan ham protein, %16-55 karbonhidrat (selüloz ve nişasta), yağ ve vitaminleri içerirler. Özellikle, içerdikleri vitaminler bakımından dikkat çekicidirler. A vitamini öncüsü olan β -karoten ve astaksantin, alg ürünüdür.

Bunun yanı sıra E, B₁ (tiyamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niasin), B₆, B₁₂ vitaminleri de mikroalgler tarafından sentezlenmektedir (Durmaz ve Gökpinar, 2006; Akbaba ve ark., 2003; Zeb and Mahmood, 2004).

Alg ürünleriyle beslenmek gelişimsel bakımından da avantaj sağlar. Örneğin *Spirulina*'yı et, yumurta ve soya fasulyesiyle, protein, karbonhidrat ve yağ içeriklerine göre karşılaştırıldığında; Protein: yumurtada %47, ette %43, soya fasulyesinde %37, *Spirulina*'da ise %60-71, Karbonhidrat: yumurtada %4, ette %1, soya fasulyesinde %30, *Spirulina*'da %13-16, Yağ: yumurtada %41, ette %34, soya fasulyesinde %20, *Spirulina*'da %6-7'dir. Görüldüğü üzere algler, bilinen birçok besinden daha fazla oranda protein içerirler. Bu özellikleri onların kullanım alanlarını artırır (Durmaz ve Gökpinar, 2006; Akbaba ve ark., 2003; Zeb and Mahmood, 2004) (Şekil. 2.3).



Şekil 2.3. Merkezi Birmanya'da Spirulina hasatlaması (Tredici, 2007) .

Bir diğer alg olan *Chlorella*'nın yapısında; suda ve yağda çözünen vitaminler (B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂, C, D, E, K, vitaminleri, biotin, folik asit, inositol, pantotenik asit, PABA), doğal renk maddeleri (klorofil a/b-bilinen bitkisel kaynaklar içinde en yüksek oranda β-kroten, ksantofiller), mineral maddeler(aluminyum, çinko, demir, fosfor, kalsiyum, mangnezyum, mangan, nikel, selenyum), çeşitli enzimler, yüksek

miktarda bitkisel protein, nükleik asitler (RNA, DNA) ve çeşitli yağ bileşenleri bulunmaktadır (Altun ve Ark., 2006; Nakayama, 1992; Ötleş, 1999).

Algler yüksek oranda yağ içermeleri nedeniyle vücutta yağın daha fazla depolanmasına neden olurlar. Alglerin bileşiminde bulunan pigmentler (β -karoten, astaksantin, ksantofil, fikobilin), yağ, protein, karbonhidrat ve vitaminler sayesinde, balıkların deri ve yüzgeçlerinde dengeli gelişim ve pigment miktarında artış oluşmasına neden olmaktadır.

Algler birçok gıda maddesinin üzerinde koruyucu zar oluşturmaları nedeniyle konservecilikte de kullanılmaktadırlar. Konserve edilecek madde, aljinat eriyiğiyle ince bir tabaka halinde kaplanır ve normal sıcaklıkta bile uzun süre bozulmaması sağlanmış olur.

Mikroalglerden elde edilen ürünlerden agar, katılaşma özelliğinden dolayı yiyecek sanayiinde kullanım alanı bulmaktadır. Örneğin, pasta, şeker, marmelat, puding, dondurma, mayonez, sos, dayanıklı ekmek yapımında, peynircilikte, salatalarda dayanıklılık ve sabitlik vermek için, şarap, bira ve likör sanayiinde berraklaştırıcı olarak kullanılmaktadır.

Bu üstünlüklerinin yanı sıra alg proteininin hayvan ve insanların beslenmesinde kullanımı, sindirim güçlüğü, tat ve lezzet bakımından fazla ilgi görmemesi ve son ürün maliyetinin yüksek olması nedeniyle sınırlıdır. Ayrıca hastalık etmeni birçok mikroorganizmanın ortamda kolayca gelişebilmesi, alglerin gelişimini sınırladığı için, bir dezavantaj olarak görülmektedir.

2.4.4. Tıp Ve Eczacılıkta Mikroalglerin Kullanımı

Mikroalglerin büyük ölçekli yığın kültürlerinden elde edilen algal biyomasın yanısıra elde edilen proteinler, lipitler, nişasta, gliserol, doğal pigmentler ve biyopolimerler gibi metabolitlere olan ticari ilgi giderek artmaktadır. Kırmızı alglerden (*Gracillaria* sp. ve *Gellidium* sp.) elde edilen agar, kragen ve aljinatlar da tıp ve eczacılıkta çeşitli şekillerde kullanılmaktadır (Akbaba ve ark., 2003).

Kırmızı alglerden; *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta), tek mukoid düzensiz koloniler halinde birleşmiş halde bulunabilir (Durmaz ve ark., 2002; Vonshak,

1988). Hücreler yüksek düzeyde sülfatlı şekerleri üretirler (Durmaz ve ark., 2002; Sing et al., 2000; Vonshak, 1988). Şekerler özellikle büyümenin durgunluk fazında ve azotun sınırlı olduğu ortamda daha yüksek miktarda üretilmektedir (Durmaz ve ark., 2002; Ramus and Groves, 1972).

Zengin bir polisakkarit kaynağı olarak *P. cruentum*'un ticari potansiyeline ilk olarak Golueke ve Oswald (1961) tarafından değinilmiş, ancak o yıllarda algin biyokütle kültürü üzerinde çalışmalar olmadığından değerlendirilmemiştir. Son yıllarda *P. cruentum*'un açık havada tubular fotobiyoreaktörlerde, açık havuzlarda, polietilen ince borularda üretim denemeleri yapılmaktadır (Durmaz ve ark., 2002).

P. cruentum doymamış yağ asitlerinden PUFA (Poly unsature fatty acids), EPA (eicosapentaenoic asit) ve ARA (arachidonic asit) bakımından zengindir. EPA son zamanlarda kalp hastalıklarında ve yüksek kolesterol tedavisinde, kandaki kolesterolü düşürmede, romatizma riskinin azaltılmasında kullanılmaktadır (Durmaz ve ark., 2002; Dyerberg 1986; Simopuolus, 1991). Ayrıca EPA ve ARA gibi bazı çoklu doymamış yağ asitleri insan vücudunda prostaglandinlerin öncülüdür'udur ve prostaglandinlerin yağ metabolizması, kalp atış hızı, kan basıncı üzerinde etkin olduğu bulunmuştur. Astım, romatoid artrit gibi alevlenme dönemleri olan ateşli hastalıkların tedavisinde, peptik ülserlerde, yüksek tansiyonun kontrolünde, kan basıncı ve yağ metabolizmasının düzenlenmesinde etkilidir (Durmaz ve ark., 2002).

70'li yılların başlangıcında Danimarkalı araştırmacılar Eskimo'ların çok düşük oranda kalp hastalığına sahip olduklarını gözlemlemişler ve enerji gereksinimlerinin %60'ını diyetlerini oluşturan yağdan karşılayan Eskimoların kanlarını analiz ettiklerinde yüksek düzeyde eikosapentaenoik ve dokosahekzaenoik asit gibi diğer insanların kanlarında daha düşük miktarda görülen yağ asitlerine rastlamışlardır. Aynı tipte çalışmalar Norveçli ve Japon balıkçılar üzerinde de yapılmış ve bu çalışmalarda göstermiştir ki özellikle soğuk sularda yaşayan balıkları tüketenlerde kalp damar hastalığı daha düşük oranda görülmektedir (Ohshima, 1998; Demirel ve Özpınar, 2003; Kargın ve ark., 2006).

Kırmızı alglerden üretilen agar, mikrobiyolojide besiyeri ortamı hazırlamada, kolon kromatografisinde ve laksatif fonksiyonel katkı olarak kullanılmaktadır. Yine kırmızı

deniz alglerden (*Sagina subulata*) üretilen karagenan ve kondroitin sülfat kozmetik ürünlerinde nemlendirici olarak kullanılmaktadır (Ohshima, 1998).

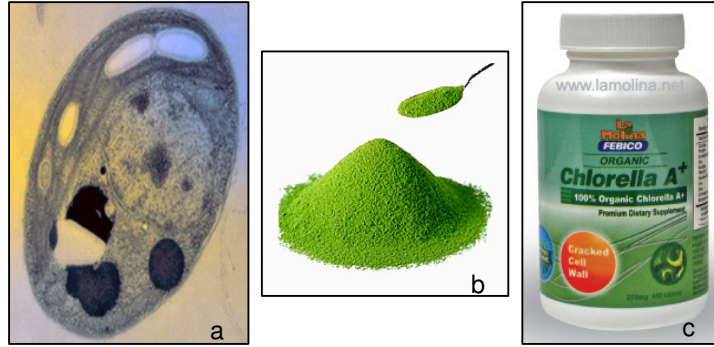
Aljinatlar, tıp ve gereksinimi olan ilaç sanayiinde, ilaçların ana maddesi olarak da kullanılmaktadır. Aljinat ilk olarak 1881 yılında İngiliz kimyacı E.E.C. Stanford tarafından bulunmuştur. Aljinat kurumaddesinin yaklaşık % 40'ını oluşturduğu kahverengi deniz alginden elde edilir. Hücre içi matriksinde sodyum, kalsiyum, magnezyum, stronsiyum ve baryum iyonları içeren bir jel halinde bulunan aljinat, alg dokularına dayanıklılık ve esneklik verir. Su tutma, jel oluşturma, viskoziteyi arttırma ve stabilize edici özelliklerinden dolayı aljinatın sanayide çok geniş kullanım olanakları vardır (Smidsrød and Skjak-Braek, 1990).

Aljinatlar cilt üzerine sürülerek kullanıldığı gibi, ağızdan da alınabilirler. Dermatolojik vakalarda kullanılan sargının (bandaj) ana maddesini oluştururlar. Bunun yanı sıra baryum sülfatla sodyum aljinat, röntgen filmlerinin çekiminde kullanılır. Aynı zamanda Sodyum aljinat, belirli bir akıcılıkta sabit tutularak ve bazı bitkisel yağlarla karıştırılıp sıvı hale getirilen esas etkili kimyasal maddelerle (insülin, antibiyotik, hormon ve vitamin) ile karıştırılarak enjekte edilebilir ya da içilebilir hale getirilerek kullanılabilir.

Sodyum aljinat, başka maddelerle karıştırılarak aç kalmadan zayıflamak için de kullanılır. Kalorisi düşük olan bu jelli madde, mide asidini koyulaştırır ve böylece tokluk hissi oluşturur. Çeşitli aroma ve kalorisiz tat maddeleri eklenerek, zayıflama rejimi için ya da şeker hastalığında kalorisiz tok tutucu yiyecek olarak üretilir. *Chlorella*; vitaminler, amino asitler, ham lif, mineral maddeler, nükleik asitler, enzimler ve CGF(*Chlorella* Gelişme Faktörü) gibi bazı besin öğeleri ve sağlık üzerine etkin maddeler açısından zengin olduğundan insan sağlığı ve beslenmesinde önem taşır (Şekil 2.4).

Mikroalgler diğer mikrobiyal canlılar gibi adsorbsiyon ya da absorpsiyon mekanizmalarıyla ağır metal iyonlarını akümüle edebilmektedirler. Bu nedenle algler atık sulardaki ağır metallerin uzaklaştırılması çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar (Özdiş, 2005; Dönmez ve ark., 1999).

Algler, adsorpsiyon, presipitasyon ve metabolizmaya-bağılı proseslerle fiziksel, kimyasal ve biyolojik mekanizmalarla dış ortamdakinden çok daha yüksek miktarlarda ağır metal iyonlarını biriktirmektedirler (Özdiş, 2005; Gadd, 1988). Ağır metaller canlı hücreler, ölü hücreler ve hücre yüzeyinin yapısal elemanları, hücreden dışarı verilen metabolitler ve polisakkaritler gibi biyokimyasal ürünler tarafından konsantre edilebilmektedirler (Özdiş, 2005; Wong et al., 1984).



Şekil 2.4. *Chlorella* algi (a), *Chlorella* algından üretilen bazı ürünler (b, c) (Tredici, 2007).

Metabolizmadan-bağımsız alınımda metallerin alınımı hücre duvarı bileşenlerince gerçekleşmektedir. Alglerde metalin biyosorpsiyonu genellikle hızlı, geri dönüşümlü ve yaklaşık 5-10 dakikada tamamlanmaktadır (Özdiş, 2005, Gadd, 1988; Zhang and Majidi, 1994). Öldürülmüş alg ya da metabolik olarak inaktive edilmiş algler, biyosorpsiyon miktarının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadırlar.

Spirulina, şişmanlık tedavisinde, krem ya da pomat olarak yaraların kabuk bağlamasını hızlandırmada ve cilt metabolizmasının gelişiminde kullanılır. Ayrıca hayvan ve insan tarafından salgılanamayan bir yağ asidi olan linolenik asit salgılar. Bu yağ asidi, başka bir yağ asidi olan prostaglandinlerle birleşerek; su konsantrasyonu, insülin sentezi ve gastrik asit sentezini etkiler. *Spirulina*'nın içerdiği tüm pigmentler büyümeyi teşvik edicidir. *Taiyo* balıklarından sarı kuyruklu küçük alabalıklar üzerinde yapılan çalışmada, 60 gün boyunca %0.5 lik *Spirulina* diyeti uygulanmış ve alınan sonuçlara göre; ölüm oranında %14 azalma, gelişimde %19 artış, diğer ürünlerde %39'luk artış saptanmıştır. Balık çiftliklerinde *Spirulina*

ürünleriyle beslenen balıklarda karotenoid miktarı 50. 000 ppm üzerine çıkmıştır. (Akbaba ve ark., 2003) (Şekil 2.5).

Dunaliella sp. gliserol ve β -karoten üreticisi olarak bilinir. β -karoten, A vitamininin öncü maddesidir ve eksikliğinde körlüğe kadar giden göz rahatsızlıkları ortaya çıkar .

Haematococcus sp., Alzheimer, Parkinson hastalıklarının tedavisinde, belkemiği zedelenmeleri ve sinir sistemi incinmelerinde, zarar görmüş retinanın iyileştirilmesinde kullanılır (Akbaba ve ark., 2003). Gözdeki reseptörlerin oksitlenmeyle gelişen hasarlardan korumada, damar sertliği, koroner rahatsızlıkları engellemede etkili bir şekilde yararlanılır. Anti tümör ajanı olarak ve bağışlık sisteminin kuvvetlendirilmesinde etkilidir. Ayrıca antioksidan ve afrodizyak özelliklerinden de faydalanılır.



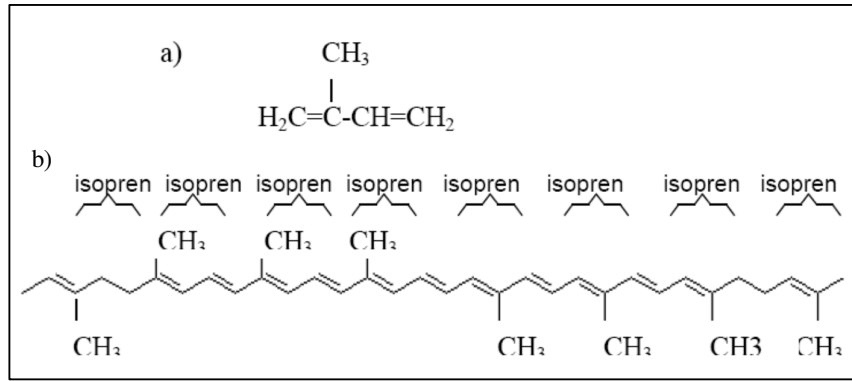
Şekil 2.5. *Spirulina* algı (a), *Spirulina* algından üretilen bazı ürünler (b, c ve d) (Tredici, 2007).

Scenedesmus sp. kadın hastalıklarının tedavisinde, ülser yaralarının ve çocuklarda egzamanın tedavisinde kullanılır. Bu mikroalgle yapılan merhemlerin

kullanılması sonucunda, varis, çıban ve iyileşmeyen yaralarda %90 oranında düzelme olduğu saptanmış durumdadır (Akbaba ve ark., 2003).

2.5. Karotenoidler

Karotenoidler, yağda çözünebilen renk maddeleridir. Karotenoidlerin merkezi iskeleti 8 izoprenoid ünitesinin yan yana dizilmesiyle oluşmuştur. Genel formülü $C_{40}H_{56}$ 'dır, yapılarında çok sayıda çift bağ bulunmaktadır (Türkkan, 2007) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. İzopren ünitesi (a), Karotenoid yapısı (b) (Delgado-Vargas et al., 2000).

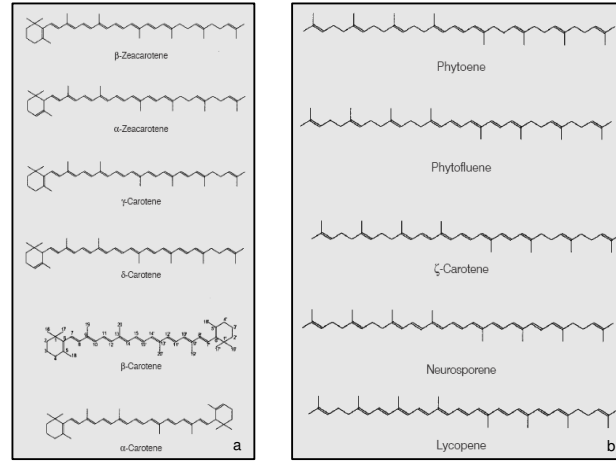
Bitkiler, bazı bakteri, alg ve funguslar tarafından sentezlenen, meyve ve sebzelere sarıdan kırmızıya kadar değişen renkleri veren karotenoidler; geniş dağılımları, yapısal farklılıkları, çok çeşitli etki ve fonksiyonlarıyla doğada bulunan en önemli pigment gruplarından birini oluşturmaktadır. Hayvanlar karotenoid sentezleyemedikleri için diyet aracılığıyla aldıkları karotenoidleri modifiye ederek dokularında depolamaktadır (Rodriguez-Amanya, 2001).

Günümüze kadar 700'den fazla karotenoid çeşidi belirlenmiştir (Astorg, 1997; Britton et al., 2008).

2.5.1. Karotenoidlerin kimyasal ve fizikokimyasal özellikleri

Karotenoid pigmentler; metil grupları bağlanmış alifatik bir konjuge çift bağ sisteminden oluşmaktadır. Diğer bir deyişle yapı, birbirine kovalent olarak bağlanmış izobüten birimlerinden oluşmaktadır. Karotenoidler çeşitli özelliklerine

göre farklı gruplar altında toplanmıştır. Ancak genel olarak, karotenler, ksantofiller, karotenoid ketonlar ve karotenoid asitler olarak dört ana grupta toplanmaktadırlar. Karotenler, yapılarında karbon bulunan karotenoidlerdir, oksijen bulunanlar ise ksantofiller olarak adlandırılır (Bağdatlıoğlu ve Demirbüker, 1999). Ksantofillere örnek olarak β -kriptoksantin, zeaksantin ve lutein verilebilir. Karotenoidler ayrıca zincir uçlarında halka içerip içermemesine göre de siklik (halkalı) ve asiklik (halkasız) karotenoidler olarak da gruplandırılmaktadır. Likopen, fitoen, fitofluen ve ζ -karoten asiklik; α -karoten, β -karoten, δ -karoten ve γ -karoten siklik yapıdaki karotenoidlerdir (Rodriguez-Amanya, 2001) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Halkalı (a) ve halkasız (b) karotenler (Rodriguez-Amanya, 2001).

Fotosentetik sistemlerde karotenoidler fotosentetik tepkime merkezinde önemli bir rol oynarlar; ya enerji transferine katılırlar, ya da reaksiyon merkezini oto-oksidasyondan korurlar. Fotosentez yapmayan organizmalarda karotenoidlerin oksidasyondan koruma mekanizmalarıyla ilişkilidirler.

Karotenoidler üzerine yapılan araştırmalar onların doğal oluşumu, biyolojik aktiviteleri, biyomedikal uygulamaları, fotokimyasal ve elektrokimyasal özellikleri üzerine yoğunlaşmaktadır (Liu et al., 2000; Borowitzka and Siva, 2007).

Şimdiye kadar üzerinde en fazla çalışılan karotenoid, β -karoten ve bunun içeren provitamin A'dır, fakat son yıllarda yapılan araştırmalarla birlikte, diğer karotenoidlerin sahip oldukları farklı özelliklere ait bilgilerde hızlı bir şekilde artış

görülmektedir (Molnar et al., 2000; Borowitzka and Borowitzka, 2007). Algler tarafından sentezlenen karotenoidlerin çoğu 40 C'ludur.

Yüksek oranda karotenoid sentezleyen alg türleri *Dunaliella bardawil* ve *Dunaliella salina*'dır (Malgolith, 1992; Borowitzka and Siva, 2007) (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Mikrobiyal kaynaklı ticari olarak üretilen karotenoidler (Veiga-Crespo et al., 2005).

Mikroorganizma	Karotenoid	Miktar
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaksanthin	1.30 mg/l
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaksanthin	30 mg/g
<i>Halobacterium salinarium</i>	Astaksanthin	265 mg/g
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Kantaksanthin	1 mg/g
<i>Brevibacterium</i> KY-4313	Kantaksanthin	2 mg/l
<i>Haloferax alexandrinus</i>	Kantaksanthin	2156.67 mg/g
<i>Muriellopsis</i> sp.	Lutein	22.7 mg/g
<i>Blakeslea trispora</i>	Likopen	40 mg/l
<i>Flavobacterium</i> sp	Zeaksanthin	0.09 mg/l
<i>Dunaliella salina</i>	β -karoten	2.12 mg/l
<i>Dunaliella bardawil</i>	β -karoten	20.1 pg/cell

Karotenoidlerin renk özellikleri yapılarındaki konjuge çift bağlardan kaynaklanmaktadır. Karotenoidlerde belirli bir renk oluşumu için en az yedi konjuge çift bağ içermelidir. Konjuge bağ sayısı arttıkça renk yoğunluğu da artmaktadır. Beş konjuge çift bağ içeren phytoene renksiz, onbir çift bağ içeren likopen ise kırmızı renklidir. Aynı sayıda çift bağ içeren karotenoidler, siklizasyon nedeniyle, farklı renk tonlarında bulunabilmektedir. Genel olarak karotenoidlerin renkleri, konsantrasyona ve molekülün yapısına bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca farklı karotenoidlerin karışım halinde kullanılmasıyla farklı renk tonları elde edilmektedir (Çizelge 2.3) (Astorg, 1997; Aksan, 2005).

Çizelge 2.3. Farklı renkler için önerilen karotenoid miktarları (Astorg, 1997; Aksan, 2005).

Renk	Kapsantin (mg/l)	Apokarotenal (mg/l)	β -karoten (mg/l)
Sarı	5.3	-	4.2
Turuncu	10.6	4.2	10.6
Turuncu-kırmızı	21.1	16.9	-
Çilek rengi	25.4	21.1	-
Ahududu rengi	31.7	25.4	-
Kiraz rengi	52.8	31.7	-

En iyi bilinen karotenoid β -karoten olmasına rağmen son dönemde daha çok ilgi çeken üç farklı karotenoid vardır; Astaksantin, lutein ve likopen. Astaksantin yeni bilimsel çalışmalarda dikkat çekici hale gelmiştir. Astaksantin birçok organizmada doğal olarak bulunan kırmızı renkli bir pigmenttir. Özellikle kabuklu deniz ürünlerinde (karides, yengeç, istakoz, balık yumurtaları) ve somonda bolca bulunur. Astaksantin bu canlılarda büyümede rol oynar ve vitamin benzeri etkinlik gösterir. (Torrisen and Christiansen, 1995). İnsanlarda ise antioksidan olarak rol oynar. Astaksantin diğer karotenoidlere nazaran yapısında hem oksijenin bulunması ve hem de lipofilik olması nedeniyle kan beyin bariyerini aşarak özellikle santral sinir sistemi ve beyin hücrelerini korur. İki farklı hayvan çalışmasında vitamin E'den mahrum bırakılmış hayvanlara astaksantin verilmiş sonuç olarak da lipit peroksidasyonunun önüne geçilmiştir (Kurashige et al., 1990).

Karotenoidlerin pek çok fizyolojik işlevleri vardır. Yapıları gereği serbest radikalleri etkili bir şekilde elimine ederler ve bağışıklık sistemini güçlendirirler. Epidemiyolojik çalışmalarda diyetinde ve kan plazmasında yüksek oranda β -karoten bulunan kişilerde akciğer kanser riskinin yüksek oranda azaldığı bulunmuştur (Larson, 1997; Duthie et al., 1989), öte yandan sigara içenlerin yüksek dozda β -karoten kullanmasının kanser riskini artırdığı bulunmuştur (Larson, 1997).

Hayvanlar karotenoidleri sentezleyemezler ve onları beslenme yoluyla elde etmek zorundadırlar, buna rağmen bu bileşikler yaygın olarak ve genelde gösteriş amaçlı kullanılırlar. Örneğin, flamingo ve somon balıklarının pembe renkleri, istakozların kırmızı renkleri karotenoidlere bağlıdır.

2.5.1.1. Karotenoidlerin aromatik kimyasalları

Karotenoid yıkım ürünlerinden iyononlar, damaskonlar ve damaskenonlar, parfüm endüstrisinde yaygın olarak kullanılan kokulu maddelerdir. β -damaskenon ve β -iyonon çiçeklerin kokusuna katkıda bulunan başlıca bileşiklerdir. Siyah çay, eski tütün, üzüm ve çoğu meyvedeki tatlı çiçek kokuları karotenoid yıkımı sonucu oluşan aromatik bileşiklerdir.

Tüm karotenoidler, hidrofobik ve lipofilik moleküllerdir ve suda çözünmezler. Aseton, alkol, etileter, tetrahidrofuron, kloroform gibi yağ çözücülerinde çözünürler (Schiedt and Liaaen-Jensen, 1995). Özellikle petrol eteri ve hekzanda hızla çözünürler (Craft and Soares, 1992). Ksantofiller ise, metanol ve etanolde en iyi çözünürler. Bitkilerde ve hayvanlarda karotenoidler ya kristal ya amorf katılar ya da yağ ortamında çözünmüş olarak, koloidal olarak dağılmış veya proteinler ile birlikte bulunmaktadır. Karotenoidler, proteinlerle birlikte bulunduklarında daha stabil bir özellik kazanırlar ve renk özellikleri değişir. Örneğin, karides, yengeç ve istakozda karotenoid-protein kompleksi olarak bulunan astaksantin mavi, yeşil ve pembe renklidir. Isıl işlem uygulaması ile proteinler denatüre olduğunda, astaksantin protein kompleksinden ayrılır ve kırmızı renk ortaya çıkar (Rodriguez-Amaya, 1997; Aksan, 2006). Şekil 2.8.'de karotenoidlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri verilmiştir.



Şekil 2.8. Karotenoidlerin özellikleri (Rodriguez-Amaya, 1997).

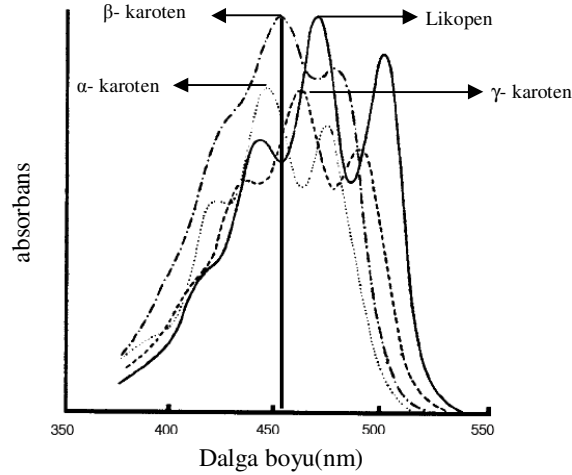
Karotenoidler pigment maddesi olmanın yanı sıra provitamin A aktivitesi ile de dikkat çekmektedir. Ayrıca, karotenoidlerin antioksidan aktiviteleri nedeniyle DNA'da oluşan hasarları azaltmakta ve böylece vücudun bağışıklık sistemini güçlendirerek hastalık oluşum riskini düşürmektedir (Rodriguez-Amaya,1997).

Karotenoidler, oksijen, sıcaklık, ışık, pH, su aktivitesi ve sülfidlerin etkisiyle oksidatif olarak parçalanmaktadır. Oksijen, konjuge çift bağların okside olmasına neden olarak çift bağ sayısını azaltmakta ve azalan çift bağ sayısı ile birlikte karotenoidlerin renk yoğunluğu da azalmaktadır. Işık, organizmada pigment oluşum metabolizmasını etkilemektedir, böylece ışığın etkisi ile birbirine dönüşümünü sağlayarak karotenoid konsantrasyonunu değiştirmekte ve ayrıca pigment parçalanmasını teşvik edici etki yaparak karotenoidlerin yapısını da bozmaktadır. Isıl işlem uygulamasında ise karotenoidlerde enzimatik olan ve enzimatik olmayan değişiklikler oluşmaktadır. Karotenoidler oksijensiz ortamlarda ısıl işlem uygulamalarına daha çok dayanıklıdır. Karotenoidlerin ayrıca farklı pH değerlerinde, farklı izomer yapı gösterdikleri belirlenmiştir. Yüksek pH değerinde poli-, cis- formlarında olan karotenoidlerin düşük pH değerinde cis- izomer formunda artış olduğu saptanmıştır. Ortamın nem oranı ise, karotenoidlerin stabilitesinin korunmasında etkili olmaktadır. Yüksek nem oranında (%10-14) karotenoid parçalanmasının yavaşladığı, düşük nem oranında (<%8) karotenoid parçalanmasının hızlandığı açıklanmıştır. Nemin, ortamdaki serbest radikallere doğrudan etki ederek karotenoidleri oksidasyondan koruduğu belirtilmektedir. Ortamda nem oranının artmasıyla, serbest radikal sayısının azaldığı ve böylece karotenoidlerin oksidasyonunun yavaşladığı açıklanmıştır. Kükürt dioksit ve sülfidlerin, karotenoidleri oksidasyona karşı koruyan en etkili inhibitörler oldukları belirtilmiştir. Gıdaların karotenoid oranının değişmeden depolanması için inert gaz altında ve ışık geçirgenliği az olan ambalajlarda muhafaza edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Bağdatlıoğlu ve Demirbüker, 1999).

2.5.1.2. Karotenoidlerin ışık absorpsiyonu ve fotokimyasal özellikleri

Karotenoidler konjuge çift bağ sayısına göre sarı, turuncu veya kırmızı renk veren bileşiklerdir. Karotenoidlerin maksimum absorpsiyonu konjuge çift bağ sayısına bağlıdır ve 400-500 nm dalga boylarında maksimum absorbansa sahiptirler (Kuşçu, 2002)(Şekil 2.9).

Görünür bölge spektrumları, spesifik karotenoidlerin ilk tanımlanmasında kullanılır. Yapıyı oluşturan bileşenlerin spektrumları yardımıyla gerçek yapıya ait ek bilgiler sağlanır. Karotenoidlerin cis izomerleri 320-360nm dalga boyları arasında da absorpsiyon özelliği gösterirler. Absorpsiyonun yoğunluğu, cis bağı molekülün ortasındaysa çok kuvvetli, molekülün sonundaysa zayıf ya da etkisizdir (Kuşçu, 2002; Berg et al., 2000).

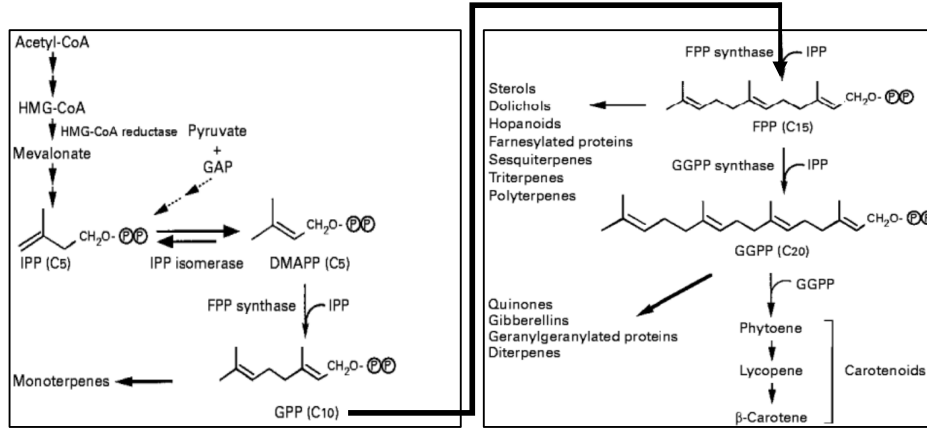


Şekil 2.9. Petroliyum eterde likopen, γ -karoten, β - karoten ve α - karoten pigmentlerin absorpsiyon spektrumları.

2.5.1.3. Karotenoidlerin biyosentezi

Karotenoidler; bitkiler, algler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilen ancak hayvanlar tarafından sentezlenemeyen pigmentlerdir. Karotenoidler, mevalonik asit (MVA) aracılığı ile asetil koenzim A'dan sentezlenmektedir. Tüm izoprenoid bileşiklerinde biyosentez iz yolunun ilk basamağında, 2 molekül geranylgeranyl difosfat (GGDP) molekülünden prefitoen difosfat (PPDP) aracılığı ile 40 karbonlu bir hidrokarbon olan fitoen oluşmaktadır. Üç konjuge çift bağ içeren ve renksiz olan fitoenden, daha sonra her enzimatik basamakta moleküle yeni bir çift bağ eklemek suretiyle bir dizi dehidrojenasyon reaksiyonu geçirdikten sonra 13 tane çift bağ içeren simetrik bir molekül olan likopen oluşmaktadır. Likopenden sonraki basamak ise uç gruplarda halka oluşumudur (siklizasyon). Bunun sonucunda da monosiklik (γ -karoten ve δ -karoten) ve bisiklik (α -karoten ve β - karoten) yapıdaki karotenoidler oluşmaktadır. Ayrıca, α -karoten ve β - karotenin

hidroksilasyonu sonucunda da lutein ve zeaksantin gibi ksantofiller meydana gelmektedir (Britton, 1992, Malgalith, 1992) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. karotenoid biyosentez yolu.

IPP= İzopentilpirofosfat, DMAPP= Dimetilalilpirofosfat, FPP= Fornesilpirofosfat GPP= Geranilpirofosfat ve GGPP= Geranilgeranilpirofosfat

2.5.2. Karotenoidler ve sağlık

Sağlık açısından birçok önemli fonksiyonu bulunan karotenoidlerin başlıca fonksiyonu A vitamininin öncülü olmasıdır. Yapısında iki β -iyonon halkası bulunan β - karoten en yüksek provitamin A aktivitesine sahip olmakla birlikte α - karoten, γ - karoten ve β -kriptoksantin gibi diğer bazı karotenoidler de bu aktiviteye sahiptir (von Elbe and Schwartz, 1996).

Meyve ve sebzelerdeki provitamin A karotenoidlerinin insanlarda A vitamini gereksiniminin %30-100'ünü karşıladığı bildirilmektedir. A vitamini için günlük olarak alınması önerilen miktarın (RDA) ; kadınlar için 700 μ g, erkekler için 900 μ g ve çocuklar için ise ortalama 350 μ g olduğu bildirilmektedir (von Elbe and Schwartz, 1996).

Karotenoidler singlet oksijen yakalayıcı ve antioksidan olarak da oldukça etkilidir. Son zamanlarda biyolojik antioksidan olarak karotenoidler birçok çalışmanın ilgi odağı olmuştur. Ksenobiyotik adı verilen organizmaya yabancı maddeler (sigara, halo hidrokarbonlar gibi çevre kirleticileri, karsinojenler) ve ayrıca çoklu doymamış

yağ asitlerince zengin bir diyet aracılığıyla oluşabilen tekli oksijen (O_2), peroksil radikali ($ROO^\cdot$) süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksi radikali ($OH^\cdot$) gibi çeşitli reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller vücutta normal metabolizma sırasında da oluşabilmektedir. Bu radikaller; DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmekte ve kanser, kalp damar hastalıkları ve sinir hastalıkları gibi birçok dejeneratif hastalığın oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Buna karşılık canlılar, serbest radikallerin bu potansiyel yıkıcı etkilerine karşı kendilerini korumak için çeşitli enzimatik savunma sistemlerine (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, glutation ve peroksidaz) sahiptir. Bu enzimatik savunma sistemlerinin etkinliği; karotenoidler, fenolik bileşikler, E vitamini, C vitamini, gibi doğal antioksidan bileşikler ve esansiyel iz minerallerin (Se,Cu,Zn) gıdalarla yeterince alınmasına bağlıdır (Koca ve Karadeniz, 2003). Özellikle meyve ve sebzeler hem yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmaları hem de iyi bir antioksidan karışımı ve kombinasyonunu temsil etmeleri açısından çok önemli doğal antioksidan kaynakları arasında sayılmaktadır (Karadeniz ve Koca, 2005).

Epidemiyolojik çalışmalar karotenoidce zengin meyve ve sebze tüketiminin kanser kalp-damar hastalıkları ve göz hastalıkları riskini azalttığı bildirmektedir (Dietmar and Bamedi, 2001). Nitekim β - karoten alımı ile akciğer ve mide kanserleri gibi bazı kanser türlerinin görülme sıklığı arasında zıt bir ilişki olduğu belirlenmiş ve karotenoidlerin antikarsinojenik özellikleri ortaya konmuştur (Di Mascio et al., 1991). Lutein ve likopenin akciğer kanseri riskini azaltmada β - karotenden daha etkili olduğu aktarılmaktadır. β - karotenin destek besin ögesi olarak alınması özellikle kanserin ilerleme aşamasında tümör hücrelerinin gelişimini engelleyen veya tümörü yok eden doğal öldürücü hücrelerin aktivitesini de teşvik etmektedir (Astorg, 1997).

Karotenoidlerin glutation-S-transferaz ve glutation peroksidaz gibi karsinojenleri detoksifiye eden enzimlerin aktivitelerini de artırdığı bildirilmektedir (Chidambara et al., 2004; Hughes et al., 1997). Karotenoidlerin kanseri önleyici etkisinin, antioksidan özelliklerinin yanı sıra hücreler arası boşluk bağlantı iletimlerini uyarıcı ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna ilaveten, karotenoidlerde polien zincirinin uç kısımlarında bulunan halka

yapısı, hücreler arası boşluk bağlantı iletimlerinin uyarılmasında etkilidir (Stahl and Sies, 1996). Buna ilaveten, karotenoidlerde polien zincirinin uç kısımlarında bulunan halka yapısı, “konneksin” adı verilen proteinlerden oluşan hücreler arası boşluk bağlantı iletimlerinin uyarılmasında etkilidir (Stahl and Sies, 1996). Kantaksantin ve likopen konneksini uyarmaktadır (Deming and Erdman, 1999).

Karotenoidler, aflatoksin B₁ ve polisiklik aromatik hidrokarbon bileşeni olan benzo[a]piren gibi mutajenik ve karsinojenik bileşiklerin aktivitelerini inhibe etmektedir (Rauscher et al., 1998).

Çeşitli karotenoidler bazı hastalıkların önlenmesinde etkin rol oynamaktadırlar. Karotenoidlerin bazı farmakolojik yararları ve fonksiyonel özellikleri Çizelge 2.4.'de verilmiştir. Düşük karotenoid içeren beslenme şekli ya da kandaki karotenoid seviyesinin düşük olması, hastalık riskini artırmaktadır (Sies and Krinsky, 1995). Bu hastalıkların çoğunda serbest radikallerin vermiş oldukları hasarlar hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır (Diplock, 1991).

Karotenoidler düşük yoğunluklu lipo proteinler (LDL) üzerinde taşındığından, LDL'yi oksidasyondan korumak suretiyle kalp-damar hastalıklarının oluşma riskini azaltmaktadır (Duthie et al., 1989). Göz retinasında bulunan lutein ve zeaksantin, gözü serbest radikallerin ve ışığın zararlı etkilerinden koruyarak (Deming and Erdman, 1999) katarakt ve yaşa bağlı makula bozuklukları gibi göz hastalıklarının oluşumunu engellemektedir (Sommerburg et al., 1998).

Çizelge 2.4. Karotenoidlerin bazı fonksiyonel özellikleri ve farmakolojik yararları (Dufosse' et al., 2005).

Karotenoidlerin fonksiyon ve yararları	Örnek
Provitamin A aktivitesi	β ve α -karoten, β -kriptoksantin
Antioksidan yararı	Bütün karotenoidler
Hücre iletişimde rolleri	β - karoten,kantaksantin, kriptoksantin
Bağışıklık sistemini güçlendirici etkisi	β - karoten
UV'den cildi koruma kapasitesi	β - karoten, likopen
Ciltte leke oluşumunu engelleme rolü	Lutein, zeaksantin
Katarakt oluşumunu engelleme etkisi	β - karoten

2.5.3. Karotenoid kaynakları

Karotenoidler, meyve ve sebzelerde, bitkilerde, balıklarda, kuşlarda, bakterilerde ve alglerde pigment maddesi olarak bulunmakta ve organizmanın sarı, turuncu ve kırmızı renklerini oluşturmaktadır. Bazı yüksek bitkilerin kloroplastlarında yer almakla birlikte Karotenoidlerin renkleri klorofil tarafından baskılanmaktadır (Rodriguez-Amaya, 1997). Doğada bir yılda yaklaşık 100 milyon ton karotenoid üretildiği belirtilmektedir (Rodriguez-Amaya, 1997; Britton et al., 2008).

Gıda maddelerine işleme sırasında katılan karotenoid grubu maddeler gıdanın hem rengini hem de besinsel değerini geliştirmektedir (Çizelge 2.5). Hayvan yemlerine (balık ve tavuk yemi) karotenoid katılarak bu yemlerin besleyici değerinin artması sağlanmaktadır (Türkkan, 2007).

Çizelge 2.5. Gıda maddelerinde kullanılan bazı karotenoidler (Aksan, 2005; Britton et al., 2008).

Gıda Maddeleri	Karotenoid
Süt ürünleri	β - karoten
Et ve et ürünleri	%10 kapsantin
Domates ürünleri	%10 kapsantin
Dondurulmuş ve kurutulmuş yumurta ürünleri	β - karoten
İçecekler ve içkiler	β - karoten
Donmuş ürünler	β - karoten
Margarinler	β - karoten
Tereyağ	β - karoten
Peynir	Anotta
Patlamış mısır	β - karoten
İşlenmiş peynirler	β - karoten
Fırıncılık ürünleri	β - karoten ve

2.6. Antioksidan

Metabolizmanın işleyişi sırasında doğal bir proses olan oksidasyon sonucunda, organizmada çeşitli hasarlar yaratan ve kanser, kalp gibi hayati öneme sahip bazı kronik hastalıkların başlatıcısı olan serbest radikallerin oluşumu, bunlarla mücadele eden antioksidan bileşiklere olan ilgiyi artırmıştır (Durmaz ve Gökpinar, 2006). Serbest radikallerin oluşumu organizmada oksijen kullanımı sırasında

ortaya çıkar. Eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküller hücrelerin zarar gördüğü reaksiyonlar dizisini başlatır.

Antioksidan bileşikler bakımından, karasal kaynaklı gıdaların yanı sıra mikroalg türleri de önemli yere sahiptir. Bazı mikroalg türleri çeşitli stres koşulları altında büyütülürse (azot yetersizliği, yüksek ışık şiddeti, yüksek tuzluluk), hücre içinde beta-karoten, astaksantin, zeaksantin, lutein gibi kuvvetli antioksidan özelliklere sahip pigment maddelerinin biriktirilmesi sağlanabilir. Böylece mikroalgal biyoteknoloji kapsamında, kültür koşullarında çeşitli parametrelerle oynanarak hücreler üzerinde çeşitli fizyolojik stresler yaratılabilir. Bu yolla kültüre alınan hücrelerin istenen ürünü daha fazla üretmesi sağlanabilir.

Mikroalgler içerdikleri çeşitli antioksidan vitaminler bakımından da zengindir (Gökpinar ve ark., 2006). Bu nedenle mikroalgler, son yıllarda yapılan araştırmalarda üzerinde en çok çalışılan biyolojik materyallerden biri haine gelmiştir. Ayrıca, mikroalglerden elde edilen antioksidan bileşiklerden bir kısmı günümüzde ticari olarak da üretilmekte ve büyük talep görmektedir.

2.6.1. Mikroalglerde antioksidan vitaminler ve pigmentler

Mikroalgler akuakültürde sedef, kabuklu canlılar (Crustacea) ve balık türlerinin büyüme safhalarında kullanılan önemli bir besin kaynağıdır. Bunun yanı sıra bazı krustase ve balık türlerinin juvenil ve larva safhalarında tükettikleri zooplankton kültüründe de besin kaynağı olarak kullanılır. Bu nedenle mikroalgler su ürünleri yetiştiriciliğinin “olmazsa olmaz” basamaklarından biridir.

Mikroalglerin besleyici değeri ile ilgili araştırmalar giderek artmakta ve halen ticari olarak üretimi yapılan birkaç türe ilaveten biyokütle kültüre uygun alternatif yeni türlerin keşfine çalışılmaktadır. Böylece akuakültür yanında insan sağlığı yönünden değerli olan yeni türlerin üretimi yapılabilecektir.

β -karoten yağda çözünen bir pigmenttir ve yağda çözünen vitamin A'nın hammaddesidir. Oksidasyon ile oluşan serbest radikalleri süpürür ve oksidasyonun neden olduğu hastalıklara karşı korur. Karotenoidler arasında lutein'in antioksidan aktivitesi α - veya β -karoten kadar yüksek değildir. Ancak karotenoidlerin hücre için antioksidan aktivitesi karışım yüzdelerine bağlıdır.

Karotenoidlerin antioksidan aktivitelerine bağılı olarak kanser oluşumunu inhibe ettikleri pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Gökpınar ve ark., 2006). Bazı karotenoidlerin UV ışık ve kimyasalların neden olduğu tümörleri inhibe ettikleri ve immun cevabı arttırdıkları, yüksek antioksidan aktiviteye sahip vitamin E ve α -tokoferol'ün (vitamin E aktivitesine sahip olan kimyasal madde) ise cildi UV ışığının neden olduğu hasarlara karşı koruduğu gösterilmiştir (Gökpınar ve ark., 2006).

Radikalleri süpürme etkisi ile inhibe eden *Chlorella* ekstraktı, α -tokoferol ve karotenoidler gibi lipofilik antioksidan bileşikler içerir. *Chlorella sorokiniana* H-84'den izole edilen yüksek moleküler ağırlıktaki fotosentetik pigmentler gibi antioksidanlar kozmetik ve farmasötik alanında kullanılabilecek doğal antioksidanlardır (Gökpınar ve ark., 2006) .

Karotenoid biriktirme yeteneğine sahip olan türler arasında *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella zofingiensis*, *Dunaliella salina* ve *Haematococcus pluvialis*'i sayabiliriz.

Dunaliella salina (Chlorophyceae) daha çok tuzla parsellerinde rastlanan yüksek tuzluluğa hücre dışı gliserol salgısı ile osmoregülasyon sağlayarak adapte olabilmiş, yüksek miktarlarda karotenoid biriktirme yeteneğine sahip olduğu bilinen bir kaç mikroalg türünden biridir. *Dunaliella salina* biyoması kuru ağırlığın %2.8 w/w düzeyinde karotenoid içeriğine sahip bir mikroalg türüdür. İçerdiği major karotenoid grubu β -karoten başta olmak üzere, α -karoten, lutein ve likopen içerir. Total karoten içeriğinin %86.5 kadarı β -karoten'den oluşur (Gökpınar ve ark., 2006; Murthy et al., 2005).

β -karoten gibi yağda çözünen pigmentler serbest radikalleri süpürür (scavengering etki) ve lipofilik yapıda olmaları nedeniyle özellikle ROS'un (Reaktif Oksijen Türleri) hücre içi membran yapıları üzerindeki oksidatif baskıyı azaltır. Ayrıca katalaz, peroksidaz ve super oksit dismutaz gibi karaciğer enzimlerinin yeniden onarılmasını sağlar (Gökpınar ve ark., 2006).

Mikroalg türlerinin yanı sıra makroalgler de yüksek antioksidan etkiye sahip bileşikler içermektedir. Alglerdeki yüksek antioksidan etki glutatyon, askorbik asit, α -tokoferol, β -karoten, flavonoidler, hidrokinonlar, fikosiyeninler, prolin, mannitol, myoinositol, fenolik bileşikler ve poliaminler gibi enzimatik olmayan antioksidan bileşikler yüksek düzeyde içermesinden ileri gelir (Gökpınar ve ark., 2006; Mallick

and Mohn, 2000). Örneğin kahverengi alglerden 11, yeşil alglerden 1 ve kırmızı alglerden 5 tür olmak üzere toplam 17 makroalg türü üzerinde yapılan bir araştırmada *Sargassum* spp.'nin en yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Gökpınar ve ark., 2006, Matsukawa et al., 1997).

2.7. Mikroalg Kültürasyon ve Üretim Sistemlerin Çeşidi

Mikroalg kültürleri ile ilgili çalışmalar oldukça uzun bir geçmişe sahiptir. Günümüzde biyoteknoloji alanında elde edilen gelişmeler bu konuya da yansımakta ve üzerinde önemle durulmaktadır, yeşil planktonik alg türlerinden *Chlorella vulgaris*'in yoğun kültürleri ilk olarak 1919'da Warburg tarafından yapılmıştır (Gökpınar ve Büyükişık, 1994). Bu arada diğer türlerin kültürleri de pek çok araştırmacı tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Bu konuda yapılan ilk çalışmalar fizyoloji ve biyokimya alanlarında olup, özellikle fotosentetik döngülerin sırlarını açmaya yöneliktir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli türlerin optimum kültür koşullarını saptamak pek çok araştırmacının odak noktası olmuştur (İlgaz, 2003; Gökpınar ve Büyükişık 1994).

Ticari mikroalg üretiminin başarısı birçok etmene dayanmaktadır; bunlardan biri büyük çaplı alg kültür sistemlerinde az harcamayla verimli ürün elde etme yolunun geliştirilmesidir. Ancak bu gelişim yavaş bir süreçte devam etmektedir. Büyük ölçekli kültür sistemlerinde ışığın etkin kullanımı, sıcaklık, alg kültüründe hidrodinamik dengeyi sağlama, kültürün devamını sağlayabilme gibi ana hususların kıyaslanması gerekmektedir. Sonuçta ekonomik bir sonuca ulaşmak temel hedeftir.

Mikroalglerin kültür ortamında gelişimi çeşitli fazlarda gerçekleşir (İlgaz, 2003; Moretti et al. 1999);

1. Lag-fazı; aşıdan hemen sonra alg hücreleri, sayıca değil boyut olarak artmaya ve besin ortamını absorbe etmeye başlar,
2. Log-fazı; hücreler çok hızlı üreyerek üssel populasyon büyümesine ulaşır,
3. Geçiş fazı (veya azalan büyüme fazı); büyüme hızı yavaşça azalır,
4. Durgun faz; hücre sayısı ölüm oranı ve üreme oranı eşit olduğundan sabit kalır,

5. Azalma fazı; ölüm oranının büyüme oranından fazla olmasıyla hücre sayısı azalır.

Yeni kültür daha iyi üreyebildiğinden ve daha iyi durumda bir populasyon elde edildiğinden fitoplanktonik organizmaların logaritmik faz süresince hasat edilmeleri tavsiye edilmektedir. (De Pauw and Personne, 1988).

Alg türüne bağlı olarak hücre derişimi, logaritmik ,üreme ilk safhalarında yavaş değişir. Ancak bu fazın sonlarına doğru hızla değişmeye başlar. Başlangıçta ortamda mevcut olan nitrat kaynağının %1'i asimile edilirken, log fazı sonunda nitrat kaynağının son %50'si kullanılır (İlgaz, 2003, Gökpınar ve Büyükişik, 1994). Bunu bir durgunluk evresi izler ve ,üreme eğrisinde düz bir hat ile ifade edilir.

Hücrelerin fizyolojik durumu logaritmik fazın başlangıcında sabite yakındır ve ani değişimler göstermez. Hücre fizyolojisi, durgunluk fazının başlangıcında, hücre bölünmesinin durmasından hemen önce bazı değişiklikler göstermeye başlar.

Logaritmik fazdan durgunluk faza geçiş genellikle yavaş olur, ani geçişler daha çok istisnai durumlardır. Bu geçiş, daha çok üreme hızı sıfıra düşünceye kadar yavaş ve kademeli olarak gerçekleşir. Kültür ortamında inorganik besinlerin yüksek düzeyde bulunması halinde, aşırı bir hücre artışı olacaktır. Bu durumda üreme hem ortama difüze olan CO₂ tarafından, hem de hücrelerin birbirini gölgelemesiyle, ışıktan yeterince yararlanamaması sonucu sınırlanır. Bu koşullarda üreme bazı faktörlerin etkisi ile (besinlerin tükenmesi ve toksik hücre dışı salgıların birikmesi) tamamen durduruncaya kadar, gittikçe azalan hızlarda devam edecektir (İlgaz, 2003, Fox, 1983).

Her alg türü en ideal gelişimi kendine özgü spesifik koşulların sağlandığı kültür ortamlarında gösterir. Buna göre, *Spirulina* yüksek pH ve bikarbonat yoğunluğunda, *Chlorella* nutrientçe zengin ortamda, *Dunaliella salina* ise çok yüksek tuzlulukta en iyi üremeyi göstermektedir (Kargın, 2006; Soong, 1980; Belay, 1997).

Günümüzde ticari mikroalg üretiminde, genellikle insan gıdası olarak değerlendirilen ve tıp-eczacılık alanında kullanılan *Chlorella* ve *Spirulina* gibi mikroalgler tercih edilmekte ve yine mikroalglerden *Dunaliella salina* β-karoteni

için, *Hematococcus pluvialis* astaksantin pigmenti için kullanılmakta, bunun gibi birçok mikroalg türünden farklı ürünleri için 30 yıldan fazla süredir yararlanılmaktadır (Dufosse et al., 2005)

Mikroalg üretiminde kullanılan sistemler genel olarak, açık ve kapalı sistemler olarak sınıflandırılabilir. Açık sistemlere, çok farklı amaçlar için üretilmiş olan yapay havuzlar ve doğal sular örnek olarak verilebilir. Teknik kompleksliği bakımından, yaygın olarak kullanılan kanal tipi havuzlarda açık sistem olarak düşünülmektedir. Mikroalg kültüründe kapalı sistemlerden en yaygın olarak kullanılanı ise, kapalı fotobiyoreaktörlerdir. Sistemlerin birbirlerine göre tercih edilmelerini etkileyen parametreler, 1990'lı yıllardan bu yana oldukça önem kazanmıştır. Bir sistem seçimi yapılırken dikkat edilmesi gerekli noktalardan biri, alg kültürlerinin hangi alg üretim sisteminde daha verimli olacağının tespit edilmiş olmasıdır. Bu sistemlerin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları Çizelge 2.6.da verilmektedir. Algal üretim için belirli bir sistemin seçimini etkileyen faktörler ise; bölgenin iklim şartları, toprak ve suyun maliyetleri, alglerin çevresel istekleridir.

Çizelge 2.6. Açık ve kapalı algal sistemlerin avantajları ve dezavantajları (Naz ve Gökçek, 2002).

Parametreler	Açık Havuzlar	Kapalı Sistemler
Kontaminasyon riski	Aşırı yüksek	Düşük
Alan ihtiyacı	Yüksek	Düşük
Su kayıpları	Aşırı yüksek	Hemen hemen yok
CO2 kayıpları	Yüksek	Hemen hemen yok
Kültive edilen türlerin çeşitliliği	Birkaç alg türüyle sınırlıdır.	Yüksektir. Hemen hemen tüm mikroalg türleri kültive edilebilir.
Standardizasyon	Mümkün değil	Mümkündür
Hava şartlarına bağımlılık	Yağış sırasında tam olarak üretim mümkün değildir.	Kapalı konfigürasyonlar aynı zamanda kötü hava şartlarında da üretime olanak sağladığı için önemli değildir.

Çizelge 2.6. devam ediyor.

Üretim sırasındaki Biyomas konsantrasyonu	Düşüktür. 0.1-0.2 g/l	Yüksektir. 2-8 g/l
Muamele proseslerinin randımanı	Düşüktür. Düşük konsantrasyonlardan dolayı büyük hacimler akar.	Yüksektir. Yüksek Konsantrasyonlardan dolayı küçük hacimler akar.

2.7.1. Açık hava sistemleri

Mikroalg kütle kültürleri üzerine yapılan ilk çalışmaların çoğu kapalı sistemlerin üzerinde yoğunlaşmış olmasına rağmen (Burlew, 1953), büyük ticari sistemler çoğunlukla açık sistemlerdir. Bu tür sistemlerin kullanılmasındaki sebep ekonomik olmalarıdır. Kapalı kültür sistemleri çok pahalıdır ve bu sistemlerin çoğunu genişletmek veya büyütmek zordur ve genellikle kapalı sistemler yapay ışık altında iç mekân kültürü olarak kurulmaktadır. Bu durum, mikroalg üretiminin yüksek enerji maliyetleriyle sonuçlanmasına sebep olmaktadır.

Buna karşılık açık hava sistemleri, güneş ışığından yararlanabilme özelliklerinden dolayı fiyat bakımından daha ekonomiktirler. Ancak, açık hava sistemlerinde alglerin az sayıda türü, başarılı olarak geliştirilebilir. Günümüzde kullanılmakta olan bazı açık hava sistemlerine; sığ büyük havuzlar, tanklar, dairesel havuzlar, kanal tipi havuzlar, şelale sistemleri örnek olarak verilebilir.

Açık hava havuz sistemlerinde verimlilik başarıları, teorik olarak mümkün olandan azdır. Çünkü dıştan gelen çevresel etmenleri kontrol etmek zordur. Açık sistemlerde başarılı olabilmek için, daha önce yapılmış olan çalışmalardan elde edilen verilere göre; havuz derinliği, algal hücrelere yeterli ışığı sağlama, karışım için yeterli bir su derinliğini koruma ve buharlaşmadan dolayı iyonik kompozisyondaki büyük değişimlerden sakınma konuları üzerine bir ortak görüş oluşturulmuştur. Bu ortak görüş; çoğu kanal tipi havuzların 20-30 cm arasında bir derinliğe sahip olması şeklindedir. Bütün üretim sistemleri için ışığın sınırlayıcılığı nedeniyle derinlikleri az olması gerekmektedir. Aynı zamanda, bu tür üretim sistemlerinde kirliliğin ve kontaminasyonun sürekli tehdidine ilave olarak, CO₂'in

difüzyonu da açık havuz sistemlerinde gözlemlenen en önemli dezavantajlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak, böyle açık sistemlerin kullanıldığı havuzlara CO₂ ilave edilmesi randımanlı olmakta ve ekonomik görünmemektedir. Aynı zamanda bu tür sistemlerin kapalı sistemlere göre daha büyük bir alan gereksinimi de bilinen bir gerçektir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Raceway ve sirküler havuzlarında (Ark şeklinde 100 m boyunda 1-10 m genişliğinde, 1/2-1 1/2 m derinliğinde olup içerisinden bol miktarda su akan ve yetiştiricilikte kullanılan beton ya da diğer malzemeden yapılmış havuza denmektedir.) *Chlorella*, *Arthrospira*, *Dunaliella* ve *Haematococcus* mikroalglerin ticari üretimi. (Tredici, 2007)

Açık sistemler içinde, yüksek hücre yoğunluklarının sürekli olarak elde edildiği tek açık hava sistemi, şelale tipi sistem olup birçok mikroalg kültürü için kullanılmaktadır (Setlik et al, 1970). Bu sistemde kültür derinliği 1 cm'den daha azdır ve 10 g/l'ye kadar hücre yoğunlukları sürekli olarak korunabilir.

2.7.2. Kapalı sistemler

Açık sistemlerin başarı ile uygulanmasına rağmen, mikroalg kütle kültüründe eğilim kapalı sistemler yönündedir. Bunun sebebi, ilaç, insan ve hayvan tüketimi gibi alanlarda kullanılan algler ve alg ürünlerinin çoğunun, ağır metal ve potansiyel mikroorganizmalardan bağımsız gelişmiş olmalarından doğan gereksinimdir,

ancak son yıllarda bu nedenle, kapalı sistem kavramı her zaman akuakültür sektörünün gündeminde kalmaya devam etmektedir. Buna karşılık bu sistemlerin yüksek maliyetleri, yakın zamana kadar ticari uygulamalarını engellemektedir. Alg kültürü için kapalı fotobiyoreaktörlerin tasarlanması ve çalıştırılmasında önemli sayılabilecek ilerlemeler kaydedilmektedir. Bu reaktör tasarımlarında ana prensip, ışık yolunu indirgemek ve böylece her bir hücreye ulaşan ışığın miktarını arttırmaktır. Ayrıca, gaz değişimini arttırıcı, hücrelere optimum ışık mevcudiyetini sağlayıcı ve iyi karışım sağlayıcı fonksiyonlarında ilave edilmiş olması gerekmektedir (Borowitzka, 2007).

En son gelişmeler, daha geniş bir alana ışığı dağıttığı için bu ana dizayn prensiplerine ilaveten, bir tübular konfigürasyon veya kompakt yassı tip fotobiyoreaktörlere doğru bir eğilimin olduğunu göstermektedir (Tredici ve Materassi 1992 ; Tsoglin and Gabel, 2000). Kapalı fotobiyoreaktörler, aşağıda bahsedilen yararlarına ilaveten, hemen hemen tüm biyoteknolojik parametrelerin kontrolü ve düzenlenmesiyle karakterize edilirler (Pulz, 1992).

1-Temiz alg kültürü elde edilmesi.

2-Işıktan yararlanma randımanının yüksek olmasından dolayı yüksek verimlilik sağlaması.

3-Gün ışığında kullanılma özelliği, birçok türü kontaminasyondan koruduğu ve reaktörlerin açık hava sistemleri gibi çok geniş bir iklim aralıklarında çalıştırılabilmesinden dolayı, bir çok mikroalg kültürünün yapılabilme avantajına sahiptir. Buna karşılık tüm alg türleri bu sistemde kültür için uygun olmayabilir. Özellikle, bazı hassas türler bu sisteme ait sirkülasyon sistemi tarafından zarar görebilir.

4-Kapalı sistemlerde açık sistemlere oranla, kültür şartları daha iyi kontrol edilebilir ve elde edilen son ürünün daha iyi bir kompozisyona ve kaliteye sahip olduğu gözlenmektedir (Chrismadha ve Borawitzka, 1994).

Dış mekânlarda mikroalg üretim sistemleri, doğal gölet, havuzlar ve tanklarda yapılmaktadır. Bununla birlikte tübüler fotobiyoreaktörler ve düz- levha fotobiyoreaktörleri de mikroalg üretiminde yeni tasarımları oluşturmaktadır.

İç mekânlardaki mikroalg üretim sistemleri, iç mekânlarda küçük ölçekli torbalarda mikroalg üretim sistemleri, kapalı ortam koşullarındaki büyük ölçekli “Big Bag” sistemler, tübüler fotobiyoreaktörler, düz-levha fotobiyoreaktörleri olarak bilinmektedir.

Şeffaf kaplarda ya da tanklarda mikroalg üretimi

İç mekânlarda akuakültür amaçlı ve küçük ölçekli mikroalg üretimi, genelde hacimce yaklaşık 1000L'den küçük plastik torbalarda ya da 20-40L'lik kaplarda kesikli üretim yöntemiyle uygulanır. Akuakültürde kullanılan diğer sistemler, geniş torbalar ve polyester tanklardır. Dış mekânlarda büyük ölçekli olarak tasarlanmış polyester tanklardan oluşan sistemlerde doğal güneş ışığından faydalanılarak mikroalg üretimi yapılmaktadır. Bu sistemlerin dezavantajı, üretim performansı garanti altında olmadığı gibi, üretimi önceden belirleme şansı yoktur. Yine küçük ölçekli iç mekânlarda şeffaf kaplarda mikro alg üretimi yapılabilmektedir. Etkin iş gücü ve üretim istenilen kalitededir (Kargın, 2006; Kargın, 2002).

Plastik torbalarda mikroalg üretimi

Bu sistemlerde algler, starter kültürle doldurulmuş plastik torbalarda (>1000) üretilir (Şekil 2.13). Kültür kesikli yöntem ile iç veya dış mekânlarda gerçekleştirilir. Bu sistemlerinde bazı dezavantajları, üretimin kesikli olması nedeniyle etkin işçiliği gerektirmesi ve sistemde hacmin göreceli olarak arttırılmasıdır. Sistemin büyük ölçekte olması ışıktan yararlanmayı kısıtlar. Bu durumda üretim arzu edilen kalitede olmayabilir (Kargın, 2006; Kargın, 2002).

En yaygın kullanılan büyük çaplı sistem (<1000) “big bag” sistemidir (Baynes et al., 1979, Watson, 1979). Bu sistemlerde yaklaşık 0.5m çapında büyük steril plastik torbalar kullanılmaktadırlar. Bu sistemlerde genellikle yarı sürekli üretim yöntemi kullanılmaktadır. Cohen ve Arad (1989) tarafından değişik bir tasarım yapılarak daha dar torbalarda da denenmiş olmakla birlikte; bu sistem ticari üretim amacıyla kullanılmamıştır (Kargın, 2006; Kargın, 2002).

“Big bag” sisteminin ana sorunu, büyük çaplı torbalarda yapay ışık sınırlaması sonucu düşük fotosentez oluşumudur, sıcaklığın kontrol altında tutulabilmesi için sistem iç mekanda oluşturulmalıdır (Şekil 2.12). Bu sistemde iş gücüne daha fazla

ihtiyaç duyulmaktadır, kültürler genelde büyük ölçekli olduğundan yetersiz bir karışım söz konusudur. Bütün bu hususlar alg üretiminde maliyeti artırır unsurlardır (Fulks and Main 1991; Kargın, 2006).



Şekil 2.12. Büyük torbalarda (big bag sistemi) alg üretimi (Tredici, 2007)



Şekil 2.13. Torbalarda (bag) alg üretimi (Tredici, 2007; Tredici, 1999).

Tübüler fotobiyoreaktörler

Teorik olarak algal verimlilik $60 \text{ g/m}^2/\text{gün}$ 'ü aşabilir (Kargın, 2006; Kargın, 2002; Ben-Amotz, 1980; Weisman and Gobel, 1988). Ancak gerçek ürün miktarı, ışık sınırlamasından dolayı çok daha düşüktür. İdeal bir kültür sistemi, alg hücreleri tarafından ışık enerjisinin maksimum absorpsiyonunu sağlayacak şekilde olmalıdır.

Bunu gerçekleştirmenin en iyi yollarından biri yüzey ile hacim oranını maksimize etmektir (S/V) (Kargın, 2006; Kargın, 2002).

Yüksek S/V oranlarıyla mikroalg kültür sistemleri iki kategoride incelenir. Bunlar :

1-Yassı paralel duvarlı ince paneller

2-Tubular fotobiyoreaktörlerdir.

Fotobiyoreaktörlerin çeşitli tasarımları dikkate alınarak üretim verimliliği ve ekonomik olarak uygulanabilirliği araştırılmalıdır. Son zamanlara kadar açık havuz sistemleri mikroalg üretimi için en çok kullanılan sistemlerdi, ancak eczacılık ve kozmetik alanındaki uygulamalarda mikroalgden yüksek kalitede ürünlerin hazırlanmasına yönelik tasarımlar sadece kapalı fotobiyoreaktrlerle uygulanabilir.

Dış mekndaki fotobiyoreaktör, mikroalg üretimi için tasarlanmış, güneş işığının yeterli olduğu dış mekânlarda, saydam silindirik borular içinde algin bulunduğu, sürekli dolaşım sistemine dayanan bir modeldir (Kargın, 2006; Kargın, 2002; Acien Fernandez et al., 1998) (şekil 2.14).



şekil 2.14. Açık ve kapalı çatılarda tübüler sistemlerde mikroalg kültürasyonu (Tomaselli, 1993 and Tredici, 1999).

Düz-levha tip fotobiyoreaktörler

Levha şeklindeki fotobiyoreaktörlerin başlıca ilkesi veya ince çaplı boru fotobiyoreaktör tasarımında temel ilke, yüzey genişliğini arttırarak ışığın etkin kullanımını sağlamaktır. Borulu fotobiyoreaktörlerin içindeki çap önemli bir biçimde azaltılmış ve düz-levha şeklindeki biçimler tercih edilmiştir. Borulu ya da çubuk reaktör tasarımları tamamen cam ve plastik borulardan oluşmuştur. 1980'lerin sonuna doğru yoğunluk kazanan kapalı fotobiyoreaktörlerin gelişimi önem kazanarak, borulu sistemlerin levha tip sistemle benzer potansiyele sahip olduğu, özellikle yatay yönlendirilen boruların dikey durumda uyarlanması da önemlidir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Dış ve iç ortamda sürekli alg üretimi için Düz-levha tip fotobiyoreaktörler (Tomaselli, 1993 and Tredici, 1999).

2.8. *Dunaliella*'nın Tarihçesi, Genel Özellikleri ve Sınıflandırması

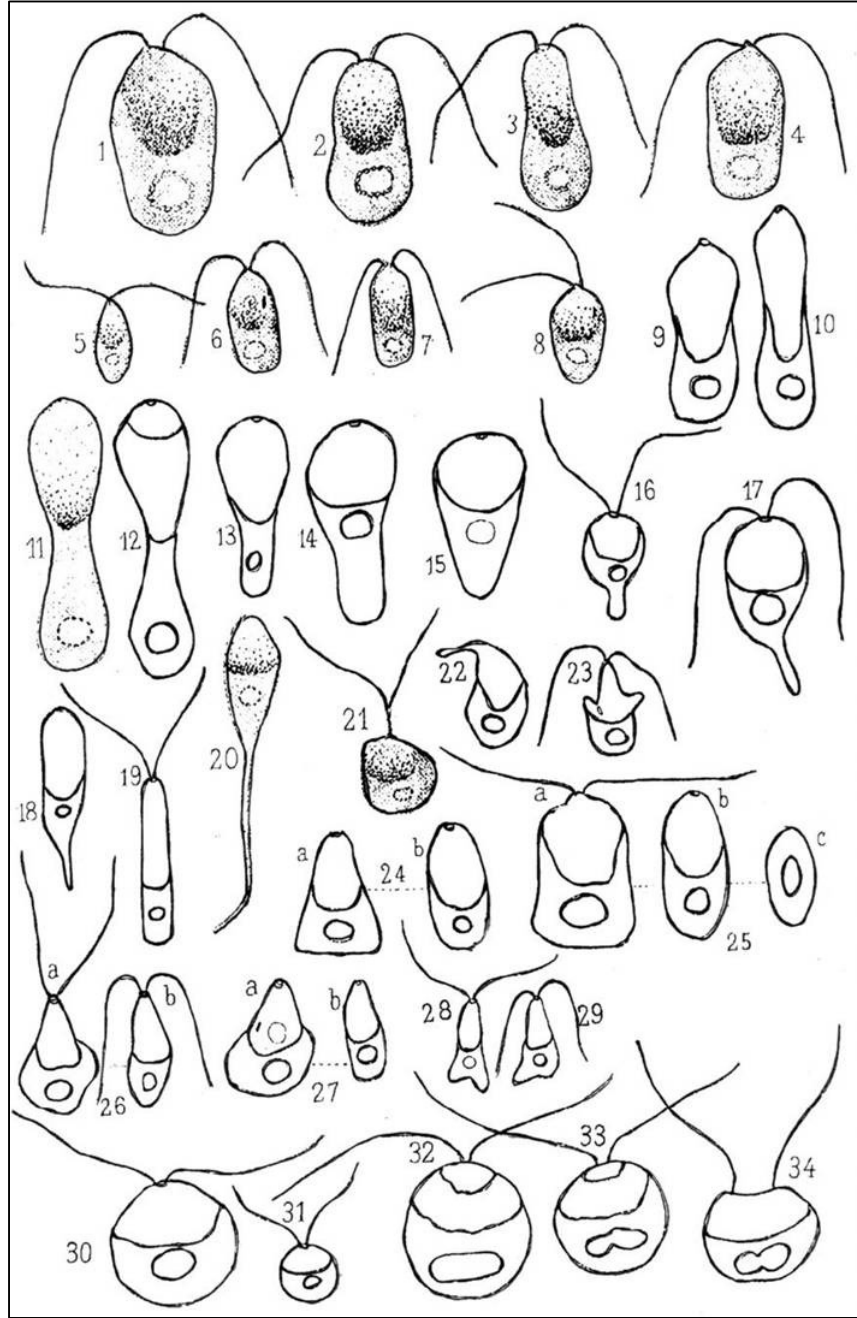
Dunaliella cinsi ilk olarak 1905 yılında Romanya'nın tuzlu göllünden alınmış örneklerinden; Teodoresco tarafından *Dunaliella salina* olarak tanımlanmıştır. Ancak bundan yaklaşık 70 yıl önce mikroalg ilk olarak Dunal tarafından tanımlandığında (1838), onun onuruna Teodoresco tarafından *Dunaliella* adı verilmiştir. Aynı yıllarda Almanya'daki bilim adamı; Clara Hamburger de makalesini aynı konuda yayınlamıştır. Sözü edilen iki yazar *Dunaliella* konusunda mükemmel şekiller çizip ve morfoloji, hücre yapısı, çoğalma ve ekoloji konusunda kapsamlı

bilgiler sundular (Şekil 2.16 ve 2.17). *Dunaliella*'nın yeni türleri çoğunlukla Nicolai ve Baas-becking (1935), Lerche (1937) ve Butcher (1959) tarafından belirlenmiştir (Oren, 2005).

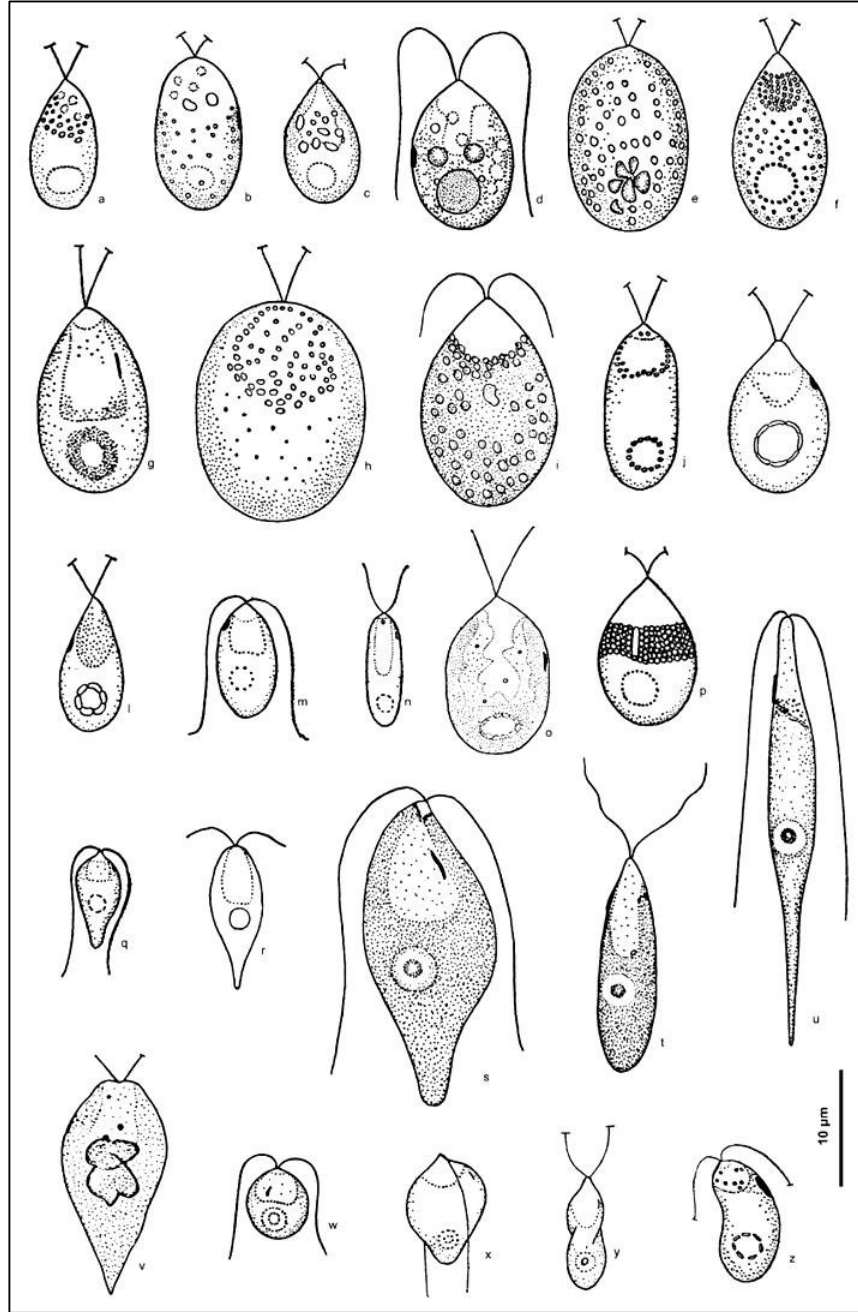
1983 yılına kadar *Dunaliella* cinsi, chlorophyta üyesi olması için *chlorophyceae* sınıfında, *Volvocales* sırasında, *Polyblepharidaceae* ailesinde yer almaktadır. Ettl 1983 yılında değişik sınıflandırmayla *Dunaliella*'yı yeni *Dunaliellales* sırasına yerleştirdi. Şimdilik *Dunaliella* cinsine ait 28 tür tanımlanmaktadır ki bunlardan beşi tatlı sularda ve 23'ü tuzlu çevrelerde bulunmaktadır (Preisig, 1992 ve Borowitzka, M.A. ve Siva, C.J., 2007). Bu sınıflandırma özet olarak çizelge 2.7'de verilmiştir.

Çizelge 2.7. *Dunaliella* algin güncel sınıflandırması (Borowitzka, M.A. ve Siva, C.J., 2007)

Sınıflandırma düzeyleri	Düzeylerin adı
Alem	Protista
Filum	Chlorophyta
Sınıf	Chlorophyceae
Sıra	<i>Dunaliellales</i>
Aile	<i>Dunaliellaceae</i>
Cins	<i>Dunaliella</i>
Tür	<i>D. salina</i> , <i>D. tertiolecta</i> , <i>D. parva</i> , <i>D. quartolecta</i> , <i>D. primolecta</i> , <i>D. viridis</i> , <i>D. bioculata</i> , <i>D. peircei</i> , <i>D. euchlora</i> , <i>D. minuta</i> ve <i>D. polymorpha</i>



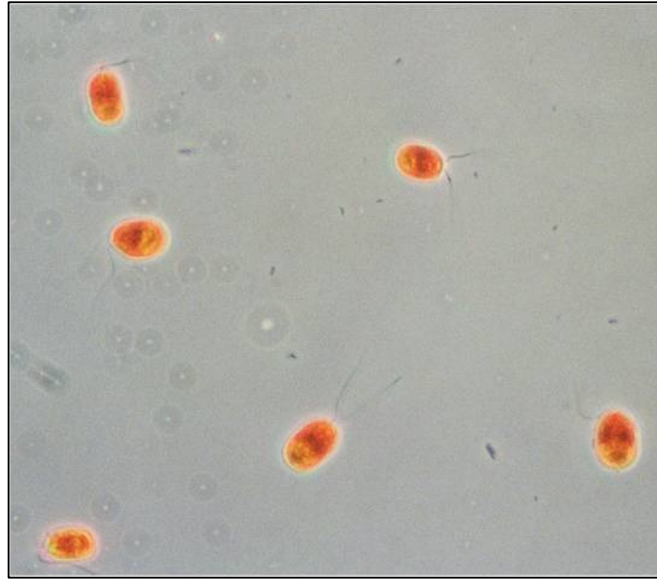
Şekil 2.16. C.Hamburger tarafından 1905 yılında çizilmiş *D. salina* kırmızı alg; (1-4), yeşil alg; *D. viridis*; (5-8), buharlaşma ile damladaki konsantrasyonun yoğunlaşması ve ortaya çıkan çeşitli şekiller; (9-29), sulandırma ile ortaya çıkan küresel algler; (30-31) ve hücre bölünmesinin başlaması; (32-34), (Oren, 2005).



Şekil 2.17. Seçilmiş *Dunaliella* türlerinin çizimi (Massyuk 1973). (a) *D. tertiolecta* (2 m NaCl); (b) *D. tertiolecta* (5 M NaCl); (c) *D. primiolecta*; (d) *D. quartolecta*; (e-g) *D. salina* spp. *salina* f. *salina*; (h) *D. salina* spp. *salina* f. *magna*; (i) *D. salina* spp. *salina* f. *salina*; (j) *D. salina* spp. *salina* f. *oblonga*; (k, l) *D. viridis* var. *viridis* f. *viridis*; (m) *D. viridis* var. *viridis* f. *euchlora*; (n) *D. minuta*; (o) *D. carpatica*; (p) *D. granulata*; (q) *D. terricola*; (r) *D. media*; (s) *D. ruineniana*; (t) *D. baasbeckingii*; (u) *D. gracilis*; (v) *D. peircei*; (w) *D. minutissima*; (x) *D. turcomanica*; (y) *D. turcomanica* ve (z) *D. asymmetrica* (Oren, 2005).

Bu kırmızı, iki flagellumlu ve salin ya tuzlu sularda yaşayan algin keşifi Fransa'nın akdeniz sahilleri Montpellier tuz madenlerinde; 1838'de Dunal tarafından gerçekleştirilmiştir.

Dunal izlediği algleri *Haematococcus salinus* ve *Protococcus* olarak adlandırmıştır. Bu keşif bir araştırma çerçevesinde Paris'in Fen Akademisi tarafından tuzlu sulardaki kırmızı rengin nedenine araştırmak amacı ile gerçekleştirilmiştir. Araştırma zamanındaki tahminler; kırmızı olan suların fiziksel ve kimyasal nedenlerle ortaya çıktığı şeklindedir (Dubinsky ve Oren, 1994). Ondukuzuncu yüzyılın ortasında bu çift flagellumlu ve Dunal olarak adlandırılmış alge, diğer biyologlar tarafından da, tuzlu göllerde ve aşırı tuzluluk derecesinde olan bölgelerde de mesela: Kırım'da, Cezayir'de, Lorraine'de (Fransa) ve Romanya'da rastlanmış ve değişik isimler ile adlandırılmıştır. (Oren, 2005) (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Kızıldeniz'indeki kıyasal tuzlu sularında bulunan *Dunaliella salina* (Oren, 2005)

Kızıldeniz, Afrika ile Asya (Arap yarımadası) arasında yer alan, Hint Okyanusu'na bağlı bir denizdir. Kızıldeniz'in adının, mevsimlik olarak çoğalma patlaması yaşayan *Trichodesmium erythraeum* adlı alg türlerden kaynaklandığı

düşünülmektedir. Ayrıca çevresindeki kıyılarda yer alan mineral bakımından zengin kırmızı renkli dağlardan doğmuş olabileceği tahmin edilmektedir.

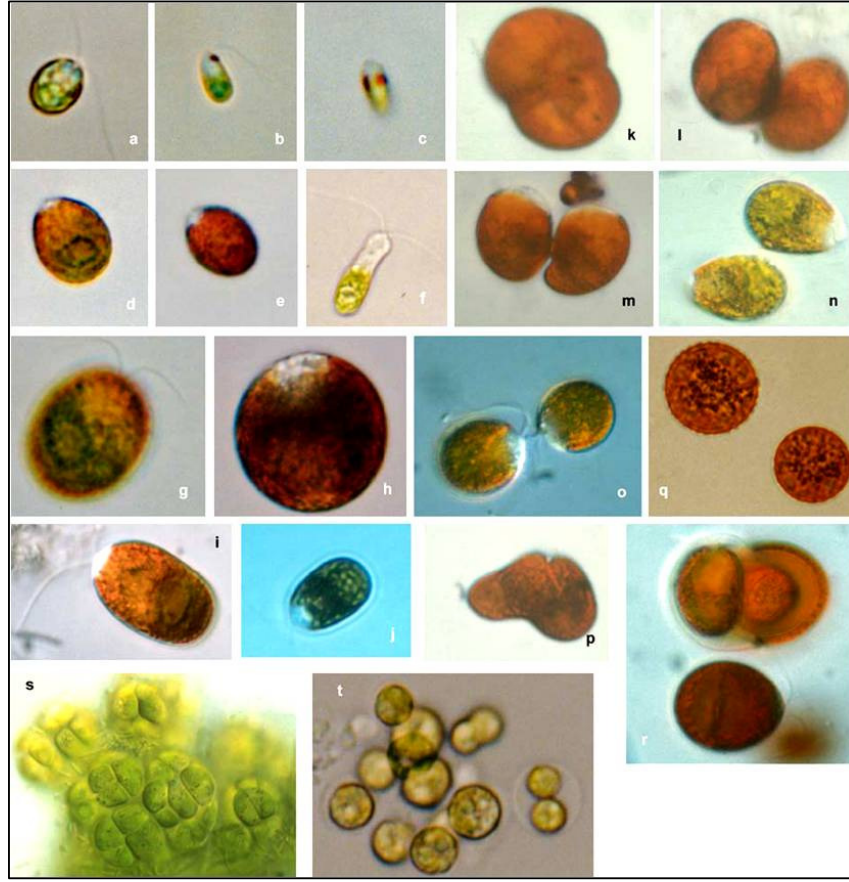
Dunaliella özellikle *D. salina* ekstraselüler gliserol salgılaması, hücre içinde β -karoten biriktirmesi ve yüksek protein içeriği bakımından önemli bir organizmadır. Salgılanan gliserol düzeyi ortamdaki tuz konsantrasyonu ile ilgilidir.

2.8.1. Morfoloji

Dunaliella tek hücreli halotolerant ve duvarsız yeşil mikroalg olarak tanımlanmaktadır. İki kat uzunluğunda ön tarafında bulunan flageli vardır. Genelde hücre şekli ovaldır (4-24 μm ; Oliveira et al., 1993) buna rağmen üreme koşullardaki farklılıklar organizmanın şeklini değiştirebilir. Tıpkı aşağıdaki fotoğraflara göre; oval, küresel, armut ve konikal şekline kadar görülmektedir (Şekil 2.19).

Dunaliella, Chlorophyta'nın diğer üyelerinin tersine kalın bir hücre duvarına sahip değildir. Hücre ince bir elastik membran ile çevrilidir. Bu ince membran, ortamdaki ozmotik değişikliklere tepki olarak hücre şekli ve hacminde hızlı değişimlere izin verir ve hücrelerin ozmotik baskı nedeni ile patlamasına engel olur (Ben-Amotz ve Avron, 1981). Sert hücre duvarsızlığına rağmen genelde yaşlı hücreler bir musilagen (zamlı; glikokaliks) tabakasına sahiptir (Melkonian ve Preisig, 1984; Leonardi ve Caceres, 1994); genelde musilagen tabaka elektron mikroskop ile görülmektedir (Şekil 2.20), ama Çin mürekkebi, mavi alisin ve kırmızı Roteniyum boyalar ile boyalanırsa ışık mikroskopi ile de görünebilir.

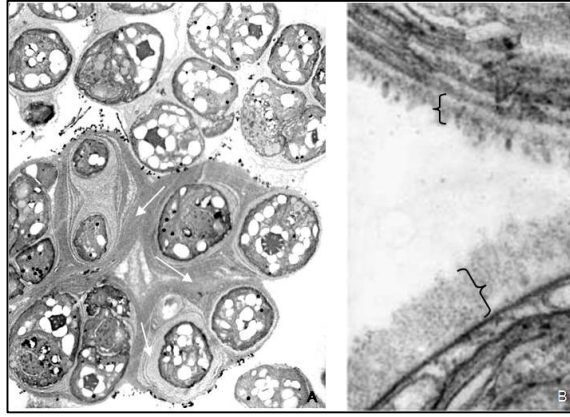
Hücrenin arka semtinde fincan şeklinde büyük bir pirenoidi olan kloroplast vardır. Bu cinsten basit göz organeli (*D. bioculata*'da iki adet) görülmektedir. Bazı türleri yüksek miktarda intertilakoid boşluklarında karotenoidleri içeren yağlı kürecikleri biriktirir ve bu yüzden hücrelere karotenin miktarına bağlı olarak turuncu ya kırmızı görünüm verirler (Şekil 2.19 ve 2.21).



Şekil 2.19. *Dunaliella* türlerinin ışık mikroskop ile mikroskobik resimleri ve hayat döngelerindeki aşamalar (Borowitzka and Siva, 2007). (I) *Dunaliella* türlerinin temel morfolojisi: (a) *Dunaliella quartolecta* (MUR191=CCAP 19/10) (8 μ m); (b) *D. primolecta* (MUR55=CCAP11/43) belirgin tek stigma (6 μ m); (c) *D. bioculata* (MUR26) belirgin çift stigma (6 μ m); (d) *D. salina* (MUR9)(13 μ m); (e) *D. salina* (MUR9) (13 μ m); (f) *Dunaliella* sp.? (MUR202) (12 μ m) stigma yok; (g) *D. salina* (MUR10) (20 μ m); (h) *D. salina* (MUR23) (24 μ m); (i) *D. salina* (23 μ m); (j) *D. salina* (MUR200=CCAP 19/30) (16 μ m).

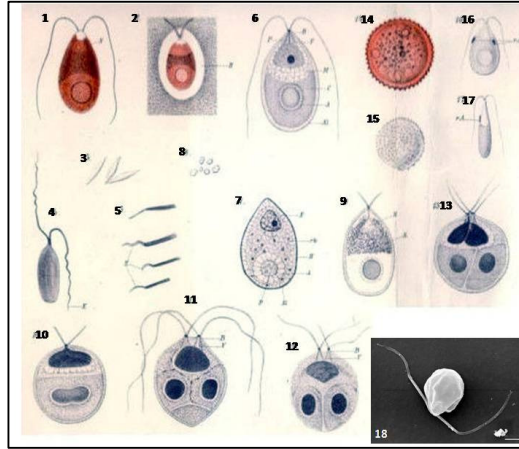
(II) *D. salina*'daki hücre bölünmesi: (k-m); (n) iki *Dunaliella* mikroalgın ayrılmadan son aşaması.

(III) *D. salina*'nın hayat döngelerindeki aşamalar: (o) erken çiftleşme aşaması (22 μ m); (p) gametlerin birleşmesindeki orta aşama ve zigot hücrenin oluşumu (21 μ m); (q) sert duvarlar ile aplanosporler (22 μ m); (r) ortaya çıkan iki hücre ile aplanosporun çimlenmesi hareket eden vejetatif aşağıdaki hücre (vejetatif hücrenin uzunluğu 24 μ m); (s) palmella aşaması (~12 μ m); (t) *D. viridis* var. *palmelloides* kültürasyonundaki palmella aşaması (MUR203=CCAP 19/34) (6 μ m) (Borowitzka and Siva, 2007).

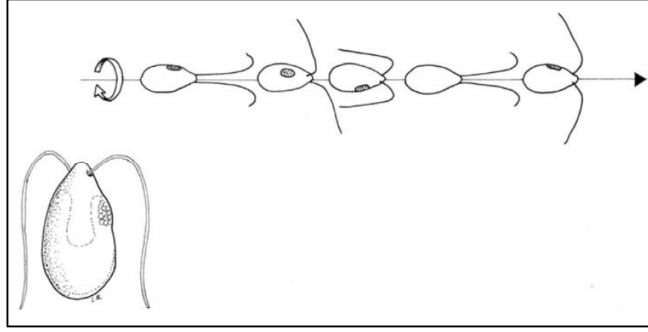


Şekil 2.20. A: *Dunaliella viridis* hücrelerinin palmella aşamasındaki geniş ölçüde musilaj tabakalar ile gömülmesi (elektron mikroskop mikroskrafı), B: İki adet *Dunaliella salina*'nın farklı düzeylerde glikokaliks tabakasının gelişmesi (elektron mikroskop mikroskrafı) (Borowitzka and Siva, 2007).

İki adet kamçı hücrenin ön kısmında bulunur ve uzunlukları türlerin arasında da değişmektedir, kamçı ya hücre uzunluğu kadar ya da daha kısadır (Durmaz ve Gökpınar, 2006; Koray, 2002, Gualtieri and Barsanti, 2006) (Şekil 2.21).



Şekil 2.21. *Dunaliella salina* (1–17): pigment kristallar; (3), granüller; (8), bölünme aşamaları; (10-13), aplanosporler; (14-15), yeşil hücreler, (*D. viridis*?, 16-17) ve skaning elektron mikroskop ile *Dunaliella* sp. mikroskrafı; (18), (Hamburger, 1905, Gualtieri and Barsanti, 2006)



Şekil 2.22. Çift flagellumlu *D. salina*'nın yüzme modeli (Gualtieri and Barsanti, 2006)

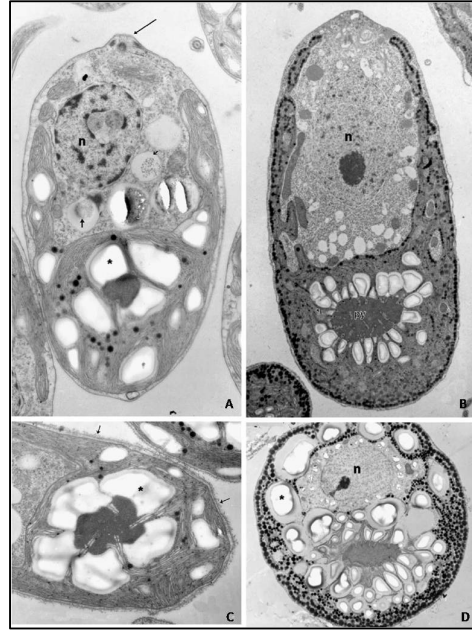
Bir arkada olan kloroplast hücrenin büyük alanını işgal etmektedir ve fincan şeklinde görülmektedir. Bazı normal sularda yaşayan algler hariç, tüm türler bir adet pirenoid (nişasta sentez ve depolamasında rol oynayan bazı alglerin kloroplastında bulunan protein cinsinden bir cisim) içermektedir (Şekil 2.23).

Çizelge 2.8. Bazı planktonik alglerin yüzüş ve kayış hızları (Gualtieri and Barsanti, 2006)

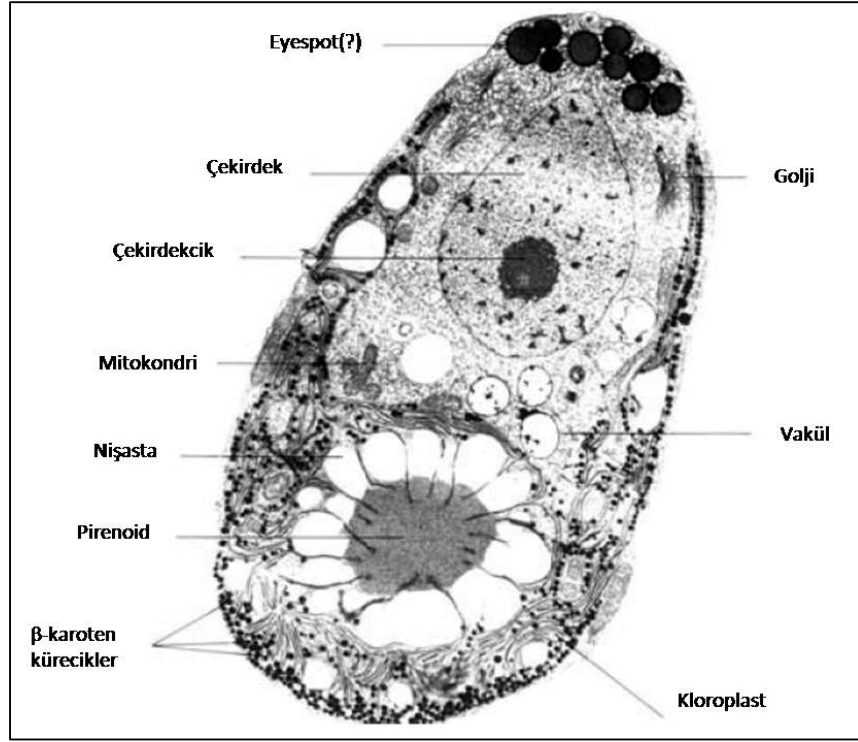
İsim	Orta hız
Gymnodinium gracilentum	500 $\mu\text{m sec}^{-1}$
Symbiodinium sp.	250 $\mu\text{m sec}^{-1}$
Tetraselmis suecica	180 $\mu\text{m sec}^{-1}$
Chattonella sp.	120 $\mu\text{m sec}^{-1}$
Cryptomonad	110 $\mu\text{m sec}^{-1}$
Chlorarachnion reptans	110 $\mu\text{m sec}^{-1}$
Euglena gracilis	100 $\mu\text{m sec}^{-1}$

Çizelge 2.8. devam ediyor

<i>Dunaliella salina</i>	95 $\mu\text{m sec}^{-1}$
<i>Ochromonas danica</i>	80 $\mu\text{m sec}^{-1}$
<i>Bigelowiella natans</i>	70 $\mu\text{m sec}^{-1}$
<i>Pavlova salina</i>	50 $\mu\text{m sec}^{-1}$
<i>Oscillatoria</i> spp.	10 $\mu\text{m sec}^{-1}$
<i>Leptolyngbya</i> spp.	0.004 $\mu\text{m sec}^{-1}$



Şekil 2.23. A: *Dunaliella minuta* (CCAP19/5) elektron mikroskop mikrografı; Hücrenin tepesinde papila (uzun ok), Büyük nişasta (yıldız) taneler ile çevrelenmiş küçük pirenoid, çekirdek (n) ve vaküoller (kısa oklar), B: *Dunaliella salina*, elektron mikroskop ile çevrelenmiş nişasta tanelerle pirenoid mikrografı, C: *Dunaliella viridis*'deki pirenoidin(siyah bölüm) detayı; pirenoidin içine çift tilakoidlerin kısmen girmesi (siyah oklar), D: *Dunaliella salina*'ın eğik kesimi; kloroplastın içindeki yüksek oranda β -karoten ($\leftarrow$) Kürecikler ve nişastalar (Borowitzka and Siva, 2007).



Şekil 2.24. *Dunaliella bardawil*in elektron mikroskop mikrografı (Ben Amotz, 1991).

2.8.2. Habitat

Dunaliella türleri farklı tuzluluk aralıklarında yaşamlarını devam ettirebilmektedirler. Böylece bu türler tatlı sulardan denize, tuz doygunluğu gösteren tuz göllerinden buharlaşmanın yoğun olduğu gölcüklere kadar geniş alanlarda yaşayabilmektedirler.

Dunaliella'nın halotolerant üyeleri doğanın her tarafında başlıca astropikal yörelerde geniş bir dağılıma sahiptir.

Çeşitli sularda örneğin: tatlı sularda (*D. acidophila*, *D. lateralis*, *D. flagellata*, *D. obliqua*, *D. paupera*), deniz suyunda; 2-4% NaCl; (*D. maritima*, *D. polymorpha*, *D. primolecta*, *D. quartolecta*, *D. tertiolecta*) ve hipersalin sularda; (>6% NaCl) *D. parva*, *D. pseudosalina*, *D. salina*, *D. baas-beckingii*, *D. bioculata*, *D. carpatica*, *D. gracilis*, *D. granulata*, *D. media*, *D. minuta*, *D. minutissima*, *D. ruineniana*, *D. terricola*, *D. viridis*, *D. assymetrica*, *D. peircei* ve *D. turcomanica*) yaşayabilme kapasitesine sahiptir (Borowitzka and Siva, 2007).

Dunaliella 1-12 arasında geniş pH aralığında uyum sağlayabilir (Loeblich, 1982; Amotz and Avron, 1983; Amotz, 1987), hipertonic tuzlu sularda, çoğunlukla *D. salina* algı hakimdir ama mezotrof ve oligotrof sularda az seviyede gürölmektedir. *Dunaliella* cinsi bir ökaryotik canlı olarak çevresel koşullara aşırı seviyede direnç göstermektedir, *Dunaliella*'lar, türlerine bağılı olarak düşük tuzluluklardan (<1% NaCl) doygun solüsyonlara (> 35% NaCl) kadar yaşamlarını koruyup ve ürerler, yaklaşık olarak deniz suyu tuz konsantrasyonu %3'tür (Borowitzka and Borowitzka, 1988) (Şekil 2.25).



Şekil 2.25. Uremiyye gölünün, İran'nın batı Azerbaycan'daki fotoğrafı (Arash Rad. F,2007;<http://www.Dunaliella.org/dunabase/habitats/habitats.php?photo=8>).

D. salina türünün %1 ila %35 NaCl konsantrasyonlarında gelişikleri tespit edilmistir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise besiyeri NaCl ile doygunluğa (satürasyona) ulaşmaktadır ve bu koşullarda *D. salina*'nın diğer birçok ökaryot ve prokaryot mikroorganizmadan daha iyi bir gelişim gösterdiği görülmüştür.

Araştırılmış tüm *Dunaliella* türlerinde, hücre içi gliserol konsantrasyonunun kültür ortamında çözünen maddelerin nitelik ve niceliklerine bağlı olduğu ispatlanmıştır (Borowitzka and Borowitzka, 1988; Amotz and Avron, 1973).

Dunaliella türlerinin bu yüksek tuz konsantrasyonlarına tolerans yetenegi veya değişen tuz konsantrasyonlarına uyumun, içinde biriktirdiği uygun bir çözünen madde ile, yani gliserol ile sağlanmaktadır. Burada gliserol, osmoregülasyonu sağlayan çözünmüş bir ajan olarak görev yapmaktadır. Gliserol iyi çözünen bir polihidrik alkol olup, diğer çözünen polihidroksi alkollerle karşılaştırıldığında, metabolik olayları en az inhibe eden alkol olarak karsımıza çıkmaktadır (Borowitzka and Borowitzka, 1988).

Dunaliella türlerinin doğal olarak geliştiği birçok ortamda NaCl'nin temel bir çözünmüş madde olarak rol oynadığı bilinmektedir. NaCl yerine sükroz kullanılan besiyerlerinde de hücredeki gliserol konsantrasyonunun besiyerindeki çözünen madde konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir (Borowitzka et al. 1977).

Hücre içi gliserol konsantrasyonunun dönüşümü (yapım ve yıkım olayları) eşit bir şekilde yapılmaktadır; fakat hücre içi gliserolün yıkım veya yapımındaki dengenin değişmesi besiyerindeki maddelerin konsantrasyonlarının değişmesine bağlıdır. Hücrelerden pasif sızıntıyla veya aktif salgılamayla dışarı çıkan gliserol *Dunaliella* türlerinin normal olan osmoregülatör cevaplarının bir sonucudur. (Borowitzka and Borowitzka, 1988 ve Kaçka, 2003).

Çözünmüş halde bulunan gliserole genelde hücre membranları çok geçirgendir. *Dunaliella* hücreleri 10^4 : 1 gradiyentinden yüksek konsantrasyonlardaki ortama karşın bile gliserolü muhafaza edebilirler, bu durum tuzluluk derecesi yüksek olan ortamlarda osmoregülasyonun sağlanması için gereklidir. Strese maruz kalmamış

Dunaliella popülasyonlarında genel olarak sınırlı bir oranda gliserol sızıntısı görülmektedir. Bazı sızıntılar yaşlı ve ölü hücrelerden de kaynaklanmaktadır.

Gliserolün, *Dunaliella salina*'da, lipit veziküllerinde ve domuz eritrositlerinde sızdırılma kapasitesi yani gliserol difüzyon permeabilitesi NMR (Nükleer Magnetik Rezonans) ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *D.salina* hücre zarlarının gliserole düşük permeabilite gösterdiği tespit edilmiştir. 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda membran permeabilitesi değişmekte, gliserol hızlı bir şekilde ortama sızdırılmakta ve hücreler ölmektedir (Borowitzka and Borowitzka, 1988).

Dunaliella donma noktasının altındaki sıcaklık derecelerinden 45°C'ye kadar olan geniş bir aralıktaki sıcaklıklara tolerans gösterme yeteneğindedir (Gordillo et al., 2001; Durmaz ve Gökpinar, 2006).

Dunaliella 1-2 M NaCl içeren ortamlarda optimal üremeyi göstermektedir (Amotz ve Avron, 1981). Ayrıca doygunluk tuz konsantrasyon sınırına kadar da yüksek iyi üreme gösterir. Halofilik ve halotolerant bakteriler, birkaç siliat türü, *Artemia salina*, birkaç Amoeba ve bazı mantarlar dışında çoğu organizma 2M'ı geçen tuz konsantrasyonlarını tolere edemez (Borowitzka and Borowitzka,1988).

2.8.3. *Dunaliella* türlerinin gelişmesi için gerekli olan hammaddeler ve üretimini etkileyen çevresel faktörler

Dunaliella türlerinin gelişimi için birçok inorganik madde ve faktörlerin gerekli olduğu bilinmektedir. Bu konu ile ilgili de birçok araştırma yapılmıştır (Johnson et al. 1968; Borowitzka and Borowitzka, 1988; Aucken and Nulty 1973; Salagenau 1979; Spectrova et al. 1982). *Dunaliella* türlerinin çoğalması ve gelişmesi için gerekli olan bu maddeler ve çevresel faktörler aşağıda belirtilmiştir.

2.8.3.1. Karbon

Tüm *Dunaliella* türleri fototrof oldukları için inorganik bir karbon kaynağı olan CO₂'e ihtiyaç duyarlar. CO₂ alımı akar su türleri için pek bir problem oluşturmaz (kaçka, 2003) .

İnorganik karbon miktarı ve farklı pH değerlerindeki fotosentez hızı (indirekt olarak) birçok araştırma ile ölçülmüştür. Yapılan araştırmalar sonucunda *D. tertiolecta* ve

D. salina türlerinin (mühtemelen diğer *Dunaliella* türleri de) CO₂'e inorganik karbon kaynağı olarak kullandığı tespit edilmiştir (Kaçka, 2003).

2.8.3.2. Azot

D. salina, *D. viridis* ve *D. tertiolecta* için en iyi azot kaynağı KNO₃ ve NaNO₃'tür (Borowitzka and Borowitzka, 1988; Milko, 1962; Grant, 1968). Nitrit ve nitratların hücre tarafından alınması için ışık ve tampon sistem gereklidir (Borowitzka and Borowitzka 1988; Grant, 1967), diğer amonyum tuzları, örneğin; amonyum asetat, amonyum nitrat, amonyum sitrat ve amonyum klorid genel olarak daha düşük azot kaynakları olarak bilinmektedir. Bunların yüksek konsantrasyonlarda (>2.5 M) bulunması durumunda letal etki yapmaktadırlar. Nitrit ve nitratın hücreler tarafından alınması ortamın alkalizasyonuna sebep olurken, besi ortamına amonyum eklenmesi ise asidifikasyona sebep olmaktadır. Tamponlanma yapılmamış sistemlerde ortam pH'nın kendi kendine değişmesi, alg büyümesini önemli oranda etkilemektedir (Becker, 1994).

Açık hava *Dunaliella* kültürlerinde ürenin N kaynağı olarak kullanılmasıyla yüksek biyomas elde edildiği bildirilmiştir. *D. tertiolecta*'nın gelişmesi için, N sınırlaması sabit tutulan uzun süreli kültürlerde, nitrat. amonyum ve ürenin aynı miktarda kullanıldığı ve her üçüyle de elde edilen verimin aynı olduğu belirlenmiştir (Borowitzka and Borowitzka 1988; Goldman and Reavey, 1979).

2.8.3.3. Fosfor

D. salina ve *D. viridis*'in gelişmesi için gerekli olan optimum fosfat konsantrasyonu yaklaşık olarak 0.02 – 0.025 g l⁻¹ K₂HPO₄'tür (Borowitzka and Borowitzka, 1988'a göre; Gibor, 1956; Milko, 1962). Yüksek fosfat konsantrasyonu ise gelişmeyi inhibe etmektedir (> 5 g l⁻¹). Eğer *D. tertiolecta*'nın gelişme ortamına fosfat yerine gliserofosfat eklenirse gelişme belirgin bir şekilde azalmaktadır (Borowitzka and Borowitzka, 1988'a göre; Lachlan, 1964).

2.8.3.4. Magnezyum ve kalsiyum

Tüm diğer algler gibi *Dunaliella* türleri de büyümeleri için bu katyonlara gereksinim duymaktadırlar (Becker, 1994). *Dunaliella* türleri Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ katyonlarının değişiklik gösterdiği ortamlarda da bulunabilmektedirler. *Dunaliella viridis*'te ise Ca⁺⁺ : Mg⁺⁺ oranı 0.8 ila 20 arasında değişebilir ve bu değişiklikler üremeye etki etmemektedirler. Bu gibi değişiklikler deniz suyunun buharlaşması ile de

olmaktadır. Denizde yaşayan *Dunaliella tertiolecta* için optimum $\text{Ca}^{++} : \text{Mg}^{++}$ oranı 4'tür ve yüksek Mg^{++} konsantrasyonlarında üreme inhibe edilmektedir (Becker 1994; Borowitzka and Borowitzka, 1988'a göre; Bass - Becking 1930).

2.8.3.5. Sodyum

Yapılan birçok araştırmada *Dunaliella*'nın birçok türlerinin gelişmeleri için sodyuma ihtiyaç duydukları belirlenmiştir (Becker, 1994). Yapılan bir araştırmada *D. primolecta* ve *D. tertiolecta* türlerinin gelişme ortamına NaCl yerine MgSO_4 eklenmesinin bu türlerin gelişmesinde herhangi bir engel oluşturmadığı belirlenmiştir. (Borowitzka and Borowitzka, 1988'a göre; Fujii et al., 1983). Ortama MgCl_2 veya LiCl gibi tuzlar eklendiğinde, her ne kadar fotosentez devam etse de üreme gözlemlenmemiştir. *D. tertiolecta* ve *D. viridis*'in gelişme ortamına NaCl yerine sükröz konulduğunda büyümenin engellenmediği görülmüştür.

2.8.3.6. Klor ve sülfat

Dunaliella için gerekli anyonlar hakkında elimizde çok az bilgi bulunmaktadır. Klor ve sülfat eksikliğinde *D. salina*'nın gelişmesi inhibe olmaktadır. Eğer SO_4^{2-} yerine Cl^- eklenirse β -karoten akümüülasyonu teşvik edilmiş olacaktır.

Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Massyuk (1965)'un bulgularında *D. salina*'nın üreme için gerekli olan optimum $\text{Cl}^- : \text{SO}_4^{2-}$ oranı 3.2'dir. Maksimum β -karoten birikimi için ise gerekli olan oran 8.6'dır. Dolayısıyla buradan da anlaşıldığına göre anyon ve katyonların besiyerindeki oranları ve kalitesi alglerin üremesinin etkilemektedir. Örneğin: MgSO_4 *Dunaliella* türlerin gelişmesini hızlandırırken, MgCl_2 hızlandırmamaktadır.

2.8.3.7. Demir

Dunaliella cinsinin büyümesi için demirin düşük konsantrasyonlarda bulunması gerekmektedir. Tuzla doymuş bazı ortamlarda demir sınırlayıcı etken olabilmektedir. Kellatlaşmış demir kaynakları; demir sitrat, demir klorit ve demir sülfitten daha etkilidir (Becker, 1994). *D. salina* ve *D. viridis* için gerekli olan optimum demir konsantrasyonu 1.25 – 3.75 mg l⁻¹'dir.

Yüksek demir konsantrasyonları ise büyümeyi engellemektedir. Besiyerine kellat ajan olarak Na-EDTA eklenmesi demirin hücre tarafından alınmasını sağlamaktadır (Borowitzka and Borowitzka 1988'a göre Milko, 1962).

2.8.3.8. İz elementler

Her ne kadar birçok değişik iz elementler, örneğin, Zn, Cu, Mo ve Va gibileri *Dunaliella* cinsinin büyüme ortamına eklense de bu elementlerin gerekliliği hakkında hiçbir bilgiye sahip değiliz. Yapılan bir araştırmada *D. tertiolecta*'nın üremesi için gerekli olan optimum Mn konsantrasyonu 0.105 ppm olarak belirlenmiştir. Bunun altındaki değerler üremeği engellediği gibi yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstermektedir (Borowitzka and Borowitzka, 1988). Becker (1994)'e göre Kobalt'ın B₁₂ vitaminine bağlanması birçok alg için gereklidir.

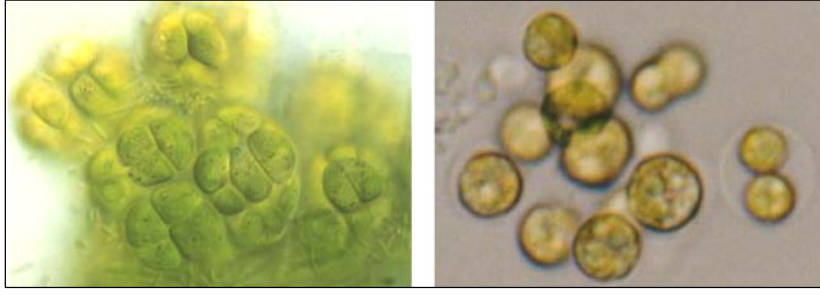
2.9. Alglerde Üreme

2.9.1. Vejetatif üreme

Alglerde vejetatif üreme en yaygın görülen üreme tipidir. Bazı türlerde, hücrenin veya koloninin büyüklüğüne bağlı olduğundan normal büyüme fonksiyonu ile beraber meydana gelir. Yine bazı türlerde ana yapının büyüme süreci devam ederken tallustan parçaların kopması, ayrılması şeklinde görülür. Ayrılan kısımlar da tekrar çimlenir. Bazı türlerde de hücrelerin ikiye bölünmesi şeklinde görülmektedir. Bu tip üremede özelleşmiş üreme organlarına rastlanmaz. *Dunaliella salina*'daki hücre bölünmesi çekirdek bölünmesinden sonra gerçekleşir. Başlangıçta genel olarak algin ön ve arka kısmında bir aralık oluşup, sonra da ön kısmın boşluğu ileriye giderek, sonra da kloroplast ve pirenoid bölünüp ve hücreler birbirinden ayrılırlar (Borowitzka and Siva, 2007).

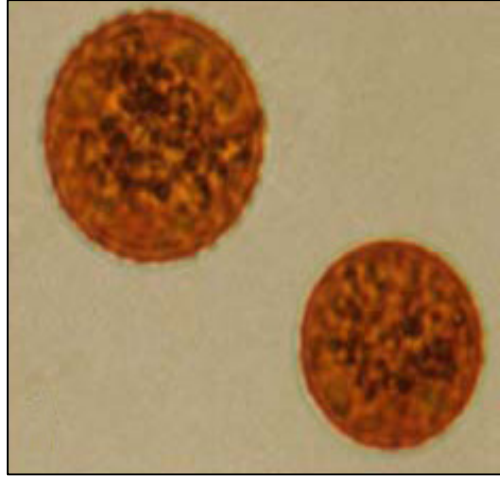
Dunaliella algi stres çevresel koşullara açık kaldığı zaman (örn: tuzluluk ve susuzluğun eksiklik ya bazen artması), bazı türleri palmella aşamasını oluştururlar (Şekil 2.26).

Dunaliella salina, *D. viridis*, *D. minuta* ve *D. lateralis*'de palmella oluşumu görünmüştür. Genelde palmella aşamasında alg, stigma (bir kırmızı göz noktası) içerir ve flagellumunu kaybedip, daha yuvarlak olup ve dışarısında da viskoz tabakayı oluştururlar, bu aşamada hücrenin iç kısmı hızlı şekilde bölünmektedir. Ayrıca *Dunaliella* algi kış koşullarında (düşük tuzluluk, çok soğuk ve kısa gündüz) aplanospor'u oluşum aşamasına girebilir. Aplanospor : Kalınca bir çeperle çevrili, kamçısı bulunmayan, hareket edemeyen sporlardır (Borowitzka and Siva, 2007) (Şekil 2.27).



Şekil 2.26. *D. viridis*'de palmella aşaması; normal koşulda (sağ) ve laboratuvarında kültürasyonu yapılmış *D. viridis* örneği (sol), (Borowitzka and Siva, 2007).

Leonardi ve Caceres (1997)'de aplanospor oluşumunu yaşlı ve nitrojen'siz kültürlerde göstermişlerdir (Şekil 2.27).



Şekil 2.27. *Dunaliella salina*'da aplanospor aşaması (Borowitzka and Siva, 2007).

2.9.2. Eşeyssiz üreme

Bu tip üremede spor adı verilen eşeyssiz üreme hücreleri ile çoğalma olur. Sporlar farklılaşmamış, herhangi bir özelliği olmayan veya farklılaşmış hücrelerde meydana gelebilirler. Sporların meydana geldikleri yapıya sporangiyum denilmektedir. Sporlar birleşme yapmadan, doğrudan çimlenerek yeni bir alg bireyi meydana getirirler. Alglerde çeşitli spor tipleri görülmektedir, bunlardan en sık

rastlanılan zoosporlardır. Zoosporların 1-2-4 veya daha fazla sayıda kamçıları ayrıca renkli göz lekeleri bulunmaktadır. Sıklıkla oluşturdıkları ve çok sayıda meydana getirdikleri için sporla üremede algler fazla sayıda çoğalırlar, uzak mesafelere yayılırlar. Hareketli olmaları da türlerin dağılımını sağlar. Alglerde görülen diğer bir spor tipi de Aplanosporlardır. Aplanosporlar hareketsiz sporlardır. Etrafı kalın bir çeperle çevirili olan aplanosporlara hypnospor denilmektedir. Başka bir aplanospor tipi olan endosporlar ise bir hücrenin içeriğinin veya bir kısmının parçalara ayrılması ile oluşmaktadır. Hareketsiz ve çıplaktırlar. Zoospor veya Aplanosporlar çeşitli alg gruplarında meydana geliş şekillerine ve meydana geldikleri yere göre de çeşitli isimler alırlar. Örneğin diploit bir hücrenin mayoz bölünmesi ile oluşan sporlara meiospor denilir. Bunlar hareketli veya hareketsiz olabilir. Genellikle mayoz bölünme sonucu dörtlü gruplar halinde meydana gelen sporlara tetraspor, bunların meydana geldiği sporangiyuma tetrasporangiyum denilir. *Rhodophyceae*'nin bazı gruplarında sporlar dişi organ içinde oluşur, bunlara karpospor denilir, hareketsiz olup haploit veya diploit olabilmektedirler.

Bazı ipliksi formlarda bir vücut hücresinin kalın bir çeperle çevrilip, içinde besin maddeleri biriktirilerek oluşturulan yapıya akinet denilir. Bu yapı dayanıklı olduğundan ana yapının ölümünden sonra hayatta kalabilir ve yeni dölü oluşturur (çok fazla sayıda tanecik besin maddesi içerir ve koyu renklidirler). Buraya kadar anlatılan vejetatif ve eşeysiz üreme tipleri her an her mevsimde görülebilmektedirler. Belirli dönemlerde görülebilen üreme tipi ise eşeyli üremedir.

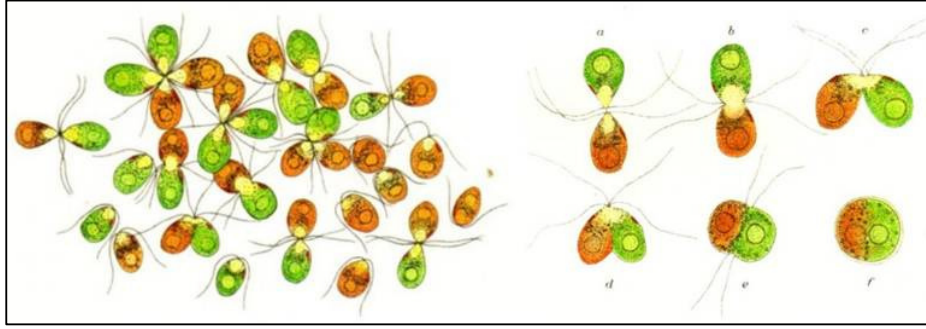
2.9.3. Eşeyli üreme

Eşeyli üreme alglerde ya üreme mevsimi sonunda ya da algin yaşama ortamındaki değişiklikler sonucu veya uygun olmayan şartlar altında kalması halinde görülür. Eşeyli üreme aynı veya iki ayrı fertten meydana gelen eşey bakımından farklı iki üreme hücresi veya çekirdeğin birleşip gelişmesi ile olmaktadır. Eşeyli üremede birleşen eşey hücreleri gamet, iki gametin birleşmesi döllenme, döllenme sonucu oluşan hücre veya çekirdek zigot adını alır. Gametleri meydana getiren döl veya fertlere gametofit, gametlerin içinde meydana geldikleri hücreye gametangiyum denilir. Gametler çepersiz, bazen kamçılı bazen kamçısız hücrelerdir, sporlardan farklı olarak kendi başlarına çimlenip yeni bir birey meydana getiremezler.

Eşeyli üremede birleşen gametler şekil ve büyüklük bakımından birbirinin aynı ise izogamet adını alır. Fiziksel davranışları bakımından (+) ve (-) olarak iki cinsiyete ayrılırlar. Bu tip gametlerle üreme tipine de izogami denilir. Gametler şekil ve büyüklük bakımlarından birbirlerinden farklı iseler bu tip gametlere anizogamet denilir. Anizogametlerin her ikisi de hareketlidir. Bunlardan daha büyük ve nispeten daha ağır hareketli olan dişi, daha küçük ve daha hareketli olan erkek gamet olarak kabul edilir. Bu tip gametlerle gerçekleşen üremeye de anizogami denilmektedir. Anizogaminin ilerlemiş şekli ise oogamidir. Oogamide dişi gamet büyük, çıplak ve hareketsizdir, plazmasında bol yedek besin maddesi taşıyan bir hücredir. Yumurta hücresi veya oosfer adını almaktadır. Erkek gamet ise küçük ve hareketli olup spermatozoit adını alır. Oogamide dişi gametlerin meydana geldiği gametangiyuma anteridyum denir. Bölünmeyen bir ana hücre içindeki iki çekirdeğin birleşmesi tarzındaki üremeye de otogami denilir. Diploitlere özgüdür ve diatomelerde görülür. Eşeysiz üremede hücre ikiye bölünür ve yavru hücrelerden biri daha küçüktür. Hayatını devam ettirebilmek için otogamiye yönelir. Mayoz bölünme ile çekirdeğinden 4 adet haploit çekirdek oluşur, bunların ikisi dejenere olur. Sitoplazma içersinde iki farklı çekirdek kalır. Sitoplazma büyüdüğü için kabuğunu atar. İki çekirdek birleşir ve diploit yeni fert oluşur. Sonuç olarak hedeflenen organizmanın eski büyüklüğüne ulaşmasıdır. Böylece çok küçülmesi sonucu tehlikeye giren hayatını kurtarmış olur. Gametlerin birleşmeleri sonucu meydana gelen zigot alg grupları arasında oldukça farklı şekillerde gelişirler. Genel olarak 3 yol söz konusudur;

1. Zigot kalın bir çeperle çevrili bir kist halini alır, bu bir istirahat hücresidir ve zygospor adını taşımaktadır. Çimleneceği zaman mayoz bölünme geçirerek genellikle 4, bazen daha fazla spor meydana getiriler.
2. Zigot oluşur oluşmaz dinlenme sporu haline gelmeden hemen çimlenir, mayoz bölünme yaparak haploit bitkiyi oluşturur.
3. Dinlenme evresi haline geçmeyen zigot doğrudan çimlenerek gelişir ve diploit bitkiyi oluşturur. Ancak kromozom sayısı ikiye katlanarak gittiğinden mutlaka bir devrede mayoz bölünme meydana gelir. Birleşen gametler bazı türlerde aynı fertten meydana gelir ve bu türler homotallik adını alırlar. Aynı fertlerden gelen gametlerin birleşmesiyle oluşan türlere ise heterotallik türler denilmektedir. Cinsel

cöğalma ilk kez Teodoresco (1905, 1906) ve Lerche (1973) tarafından gösterilmiştir. *Dunaliella*'da izogami araştırmacılar tarafından detaylı olarak anlatılmıştır. Cinsel cöğalma sentetik üreme kültürlerinde nadiren görünebilir ve genelde doğal ortamlarda oluşmaktadır. Borowitzka and Siva 2007 yılında tuzluluğu azaltma ile *Dunaliella salina*'nın izogamik (iki ayrı tipte eşey hücresi yok; izogamik canlılarda erkek - dişi ayrımı yapılamıyor) ve heterotalik olduğunu ispatlamışlardır (Şekil 2.28 ve 2.29).



Şekil 2.28. Kırmızı ve yeşil *Dunaliella salina*'nın yığılması (sol) ve zigot oluşumu (sağ) (Borowitzka and Siva, 2007).



Şekil 2.29. *Dunaliella salina*'nın cinsel bölünmesi; 1: çiftleşmenin ilk aşaması ve çiftleşme kanalının oluşumu, 2: Gamet birleşme ve zigot oluşumunun orta aşaması, 3: kalın duvarlı olan aplanosporlar ve 4: Aplanosporların çimlenmesi; iki yeni hücre ve bir hareketli vejetatif hücre (ok), (Borowitzka and Siva, 2007).

Çiftleşme farklı çiftlerde (+ / -) oluşur, ilk olarak iki hücrenin flagellumları uç kısımlarından birbirine yapışırlar (Şekil 2.30 ve 2.31) sonra pozitif gameti olan

hücre ince çiftleşme tüneli oluşturup ve pozitif gamet ile negatif gamet birleşirler, sonuç olarak dört flagellumu planozigot (zigot) ortaya çıkar. Planozigotlar flagellumlarını kaybedip ve bir kaç tabakalı kalın duvar oluştururlar (Leonardi ve Caceres, 1997). Çimlenmeden önce zigotun içeriği yeşilimsi olup çimlenme sırasında mayoz bölünmesi oluşur ve 4-8 (nadiren: 16-32) hücre ortaya çıkar, son aşamada da zigotun duvarı kırılır ve hücreler serbest kalırlar (Şekiller 2.28 ve 2.29).

2.10. *Dunaliella* Üremesinde Fizyokimyasal Faktörlerin Rölü

2.10.1. pH

Bu faktör, algin metabolizma ve üremesinde önemli etkiye sahiptir. *D. tertiolecta*'nın en uygun (optimum) pH'sı 6'dır, halbuki *D. viridis*'in uygun pH'sı 9'dur. *Dunaliella* algleri geniş pH alanlarda dayanmaktadırlar; örneğin: *D. salina*'nın tahammül ettiği sınır 5.5-11 arasında üreyebilir (Kačka, 2003; Loeblich, 1982).

2.10.2. Sıcaklık

Dunaliella türleri geniş sıcaklık aralıklarına toleranslıdırlar. Halofilik bir tür olan *D. salina*'nın -35°C'den (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Teodoresco 1906, Massyuk 1966) yaklaşık olarak 40°C'ye kadar (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Wegman, Ben-Amotz ve Avron 1980) hayatta kalabildiği rapor edilmiştir. Utah'taki Büyük Tuz Gölündeki *D. viridis* ve *D. salina*'nın -3°C'de değişmeden kalabildiği fakat -18°C'de hareketini kaybettiği görülmüştür (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Post 1977). Yapılan bir araştırmada *D. salina*'nın fotosentezi -8°C'de aktif bir şekilde azalmaktadır. Zorunlu psikrofilik olan *Dunaliella* spp. Antarktika'da da bulunmuştur (Kačka, 2003; Bunt, 1968).

Dunaliella parva ve *D. tertiolecta*'nın sıcaklığa bağlı olan toleransının, bulunduğu ortamdaki NaCl konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmüştür (Borowitzka and Borowitzka, 1988; Eppley and Mocins, 1963; Gimmmler et al., 1978).

Yüksek tuzluluğa adapte olmuş hücrelerin sıcaklığa direnç gösterdiği ve bunu da mühtemelen intrasellüler gliserol konsantrasyonunu artırarak proteinleri korumakla yaptığı sanılmaktadır. İntrasellüler gliserolün yüksek düzeyde biriktirilmesi yeteneği de sıcaklığa bağlıdır. 40°C'nin üstündeki sıcaklıklarda ise

tuzluluğa toleranslı olan *Dunaliella* türleri ve deniz türü olan *D. tertiolecta* gliserolü dışarıya sızdırarak kaybetmeye başlarlar. Bu olay mühtemelen plazma membran komponentlerinin konformasyonel değişikliğine bağlı olabilir (Borowitzka and Borowitzka, 1988).

Türe bağlı olarak *D.salina*'nın optimum sıcaklık aralığı 20°C ila 40°C olduğu rapor edilmiştir. Yapılan bir araştırmada *D. viridis* için optimum yaşama sınırı 14°C - 30°C olduğu ve hayatta kalabilmesi için en üst limitin ise 35°C olduğu tespit edilmiştir (Borowitzka and Borowitzka, 1988; Gibor 1956; Borowitzka, 1981; Kaçka, 2003).

2.10.3. Işık

Işık *Dunaliella* üremesinde gereklidir (Loeblich, 1982 ; Amotz, 1987), buna rağmen *Dunaliella* algi karanlık süresinin uzatılmasında dayanabilmektedir. Wallen ve Geen'e göre (1971) mavi ışıktaki *D. cyclotella* ve *D. salina* beyaz ışığa göre daha çok klorofil üretebilir ve yeşil ışıktaki da klorofil üretim oranı beyaz ışığa göre daha düşüktür.

2.10.4. *Dunaliella* tarafından β-karoten üretimi

Dunaliella algi ekstraselüler gliserol salgılaması, hücre içinde β-karoten biriktirmesi ve yüksek protein içerdiği bakımından önemli bir organizmadır. Salgılanan gliserol düzeyi ortamdaki tuz konsantrasyonu ile ilgilidir. 3 M NaCl gibi yüksek tuz konsantrasyonunda %40 oranında gliserol bulunur (Amotz and Avron, 1980). Son yıllarda biyo-organik bileşiklerin örneğin: β-karoten üretimindeki gibi ilerlemeler sonucunda çoğu ülkelerde β-karoten üretimi, en kullanılan biyoteknolojik süreçler arasında yer almaktadır, büyük çapta β-karoten üretimi pek çok stres faktörlerin örneğin: ışık gücünün yüksekliği, aşırı tuzluluk, ısı derecesi ve besliyiçi maddelerin olasılığı gibi kontrol altındadır. Endüstride β-karoten üretimindeki en yeni stratejiler kapalı ve kültür ortamına indükleyen faktörlerin eklenmesi ile birlikte gerçekleştirilmektedir (Raja, 2007) (Çizelge 2.9).

Çizelge 2.9. *Dunaliella salina*'dan özütlenmiş β -karoten'in uygulama potansiyelleri (Raja et al., 2007).

Önemli üreticiler	İzomer	Uygulama alanları	Kaynaklar
1. Henkel-Cognis nutrition ve Health, Hutt Lagoon and Whyalla, Australia 2. Cyanotech (Kona, Hawaii) USA	9- <i>cis</i>	Gıda ve besine renk verici ajan	Berset, 1990
	all- <i>trans</i>	Hayvan yemlerinde A vitamin kaynağı	Gomez ve Gonzalez, 2004
	9- <i>cis</i> ve all- <i>trans</i>	Yumurta sarısının yetersiz olan A vitamin oranı olan civcivlerde artırıcı rolü	
3. Inner Mongolia, Biological Eng. (Inner Mongolia, China);	9- <i>cis</i> ve all- <i>trans</i>	Antioksidan faaliyeti, peroksiradikalların ortamdaki kaldırılması ve lipit peroksidasyonunun önlenmesi	Terao, 1989
4. Nature Beta Technologies (Eilat);	9- <i>cis</i>	Mide, rahim, pankreas, kolon, rektum, meme, akciğer, prostat ve yumurtalık gibi çeşitli organlarda kanser oluşumunun önlenmesi	Poppel and Goldbohm, 1995
5. Tianjin Lantai Biotechnology (Tianjin, China); 6. Dutch State Mines (DSM; Food Specialties, Netherlands)	9- <i>cis</i> ve all- <i>trans</i>	Hücre içindeki iletişimi etkilemek	Sies and Stahl, 1997

Çizelge 2.9. devam ediyor

	9- <i>cis</i> ve all- <i>trans</i>	İmmün yanıtta regülasyon; monositlerin yüzde çoğaltılması ve yaşlı erkeklerde NK hücreler aktivitesinin çoğaltılması	Williams et al., 2000; Kazi et al., 1997
	9- <i>cis</i>	Neoplastik transformasyonda bulaşması ve üremenin kontrolü	Bertram and Bortkiewitzka, 1995
	9- <i>cis</i> ve all- <i>trans</i>	Hepatoprotektif rolü, sklerodermaya karşı olumlu rolü, güneş ışığına hassasiyetin azalması ve eritropoietik protoporfiri oluşumun önlemesi, retinol, apokarotenoidler, keton, aldehid ve epoksit gibi karotenoidlerin metaboliti	Avron et al. 1987; Peto et al. 1981; Mathews-Roth 1987; Williams et al. 2000

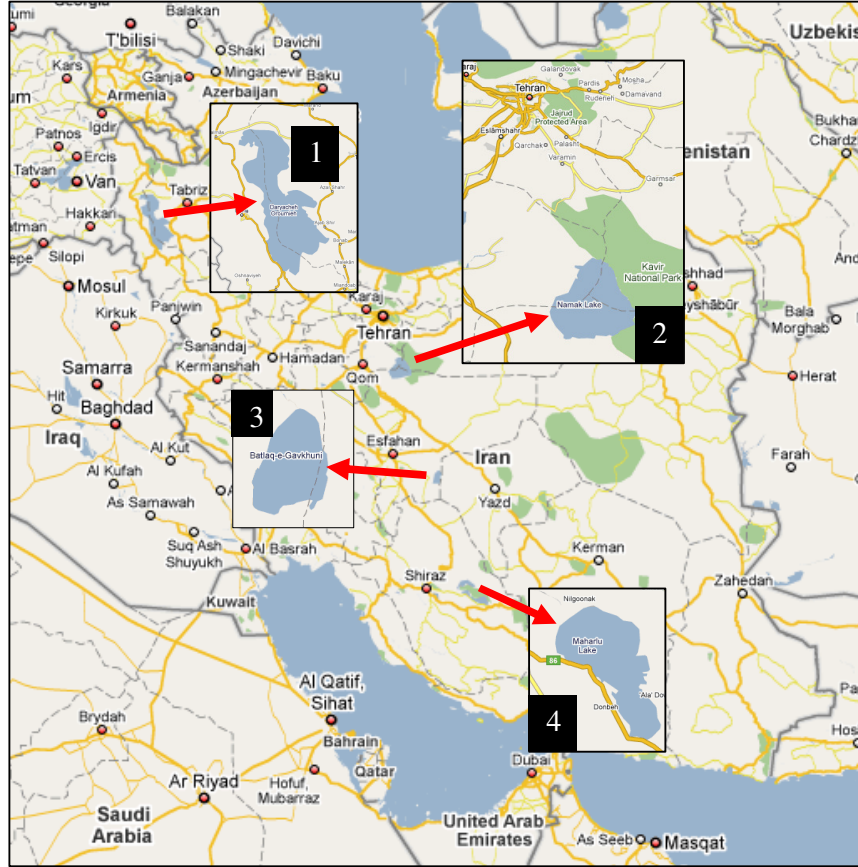
3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Çalışılan Göller

Tuzlu göllerin ve lagünlerin çoğunda görülen kuraklık sonucunda İran'ın sadece dört gölünden alınan örnekler çalışma kapsamına dahil edilmiştir. Bu göller:

1. Urumiyyeh gölü: (alan : 4750 - 6100 km², tuzluluk derecesi: 10 - 350 g/l)
2. Qum tuzlası: (alan : ~ 130 - 280 km², tuzluluk derecesi: 150 - 250 g/l)
3. Gavhuni bataklığı: (alan : ~ 750 km², tuzluluk derecesi: 21,8 – 238 g/l)
4. Maharlu gölü: (alan : ~ 175 km², tuzluluk derecesi: 120 – 280 g/l) gölleridir.

(şekil 3.1)



Şekil 3.1. Örnekleme mekânları (<http://maps.google.se/>, 2006).

3.2. Örnek Alınması

Örnekler yazın son günlerinde ve güzün ilk ayında alınmıştır. Örneklemeye için 100 metrelik mesafelerde, yüzey ve sakin sularda çukurlar oluşturulmuştur. Buralarda bulunan tuz taşları kırılmış ve alt kısımlarında toplanmış olan suları ile kıyı suları kaplara aktarılarak örnek alım işi gerçekleştirilmiştir. Örneklemeye işlemi tamamlanınca uygun havalandırma için kaplar, sıkıca kapatılmadan etiketlendi ve sıcaklık artış olasılığı nedeniyle buz içinde laboratuvara götürüldü. Örneklerin tümünün pH ve tuzluluk değeri de saptandı (Şekil 3.2).

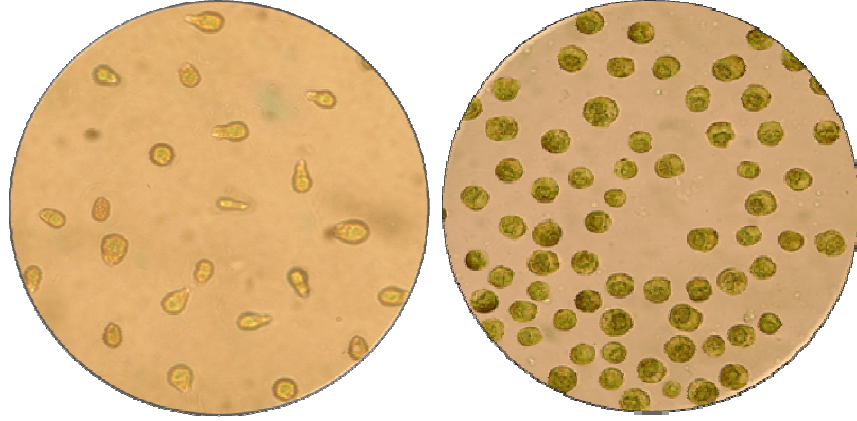


Şekil 3.2. Örneklemeye (Foto : Arash Rad, 2007).

3.3. Mikroskobik Gözlemler ve İncelemeler

Alınmış örneklerin mikroskobik gözlemlerinde tek hücreli, yeşil renkte, kamçı, *Dunaliella* cinsine ait olabilecek mikroalgler tespit edildi, bunun ardından tespit edilen mikroalglerin morfolojik farklılıkları incelendi (Şekil 3.3).

Preparatların hazırlanması için 995 µl mikroalg örnekleri 5 µl Lügol ile karıştırdıktan sonra lam üzerine döküldü ve lamel ile kapatıldıktan sonra ×100 objektif mercek ile izlendi.



Şekil 3.3. Örneklerin ışık mikroskop ile (×100) incelemesi (ZEISS, Germany; Foto : Arash Rad, 2007).

3.4. Doğal Ortamın Tuzluluk ve pH Değerlerinin Saptanması

Laboratuvarda da her örneğin tuzluluğu, tuzluluk ölçer (EC meter WTW) ve pH değeri; pH metre ile (Mettler) saptanmıştır .

3.5. Mikroorganizmaların Ekim ve Üreme Koşulları

3.5.1. Örneklerin hazırlanması ve zenginleştirilmesi

Her bölgenin benzer tuzluluk ve pH değerine sahip olan örnekleri karışık olarak kapaklı kaplara aktarılmıştır. Laboratuara getirilen örneklerin her litresine 5 er ml olacak şekilde 1M KNO₃ ve 0.1 M KH₂PO₄ eklenmiş ve örnekler ağızları sıkıca kapatılmadan belli bir periyodik rejimde 10 gün süreyle fitotronda (iklim odası) inkübasyona bırakılmıştır (25°C, statik fitotron, 100 µmolphoton.m⁻²s⁻¹ ve 14 saat aydınlık/10 saat karanlık). Bu kültürler çalışma boyunca stok olarak kullanılmış, ve gerektiğinde yenilenmiştir.

3.5.2. Kullanılan besiyerlerinin hazırlanması

Bu aşamada Modifiye Johnson besiyeri (MJ) besiyeri kullanılmıştır (Olmos and et al., 2000). Besiyeri yapay deniz suyu olarak kullanılmaktadır ve içeriği çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *Dunaliella* kültürasyonu için modifiye Johnson besiyeri (Olmos and et al., 2002)

Stok solusyon	Miktar (litre'de)
NaCl	1M
MgCl ₂ .6H ₂ O	9.8 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.53 g
Na ₂ SO ₄	3.2 g
K ₂ SO ₄	0.85 g
Tris-Base	12.11 g
KNO ₃ solüsyon (1M)	5 ^{cc}
İz unsur çözeltisi	5 ^{cc}
KH ₂ PO ₄ çözeltisi (0.1M)	5 ^{cc} (otoklav sonrası)
Az miktarda kullanılan çözeltiler (stok)	
CoCl ₂ .6H ₂ O	4 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.72 mg
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25 mg
Na ₂ EDTA	4.578 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	1.259 g
CuSO ₄ .7H ₂ O	10.4 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	17 mg

Nitrat ve fosfat stok olarak sırası ile 1 molar ve 0.1 M olarak hazırlanmış ve besiyerine 5 er ml eklenmiştir. Aynı şekilde iz elementlerde stok halindedir ve hazırlanan ortama 5 ml olacak şekilde ilave edilir (Çizelge 3.1).

Tartım sonrası kimyasallar 250^{cc}'lik temiz erlenlere aktarılmış ve damıtık su ile 985 ml'ye tamamlanmıştır. İz elementler ve Nitrat belirtilen miktarlarda olmak üzere stoklardan ortama eklenmiş, sonra ısıtıcı üzerinde manyetik karıştırıcı ile berraklaşınca kadar karıştırılmış ve ısıtılmıştır. Bu ortam pH 7.5'e ayarlanarak

otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası steril fosfat çözeltisi yine 5 ml olacak şekilde ortama steril şartlarda eklenerek besiyeri hazırlanması tamamlanmıştır. Fosfat çözeltisinin ortama sterilizasyon sonrası eklenme nedeni otoklav işlemi sırasında diğer iyonlarla etkileşim oluşması sonucunda oluşabilecek çökelmelerin önlemesi içindir.

3.5.3. Ortamlara ekim ve üretim

Yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan besiyerlerine ekilen algler, 10 günlük inkübasyon sonrasında tekrar 250 ml. lik erlenlerde yer alan 100 ml MJ besiyerine 50 ml olacak şekilde ilave edildi (25°C, statik fitotron, 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ve 24 saat aydınlık, Şekil 3.4). Mikroalglerin üst kısma doğru yüzme ve toplanmaları nedeniyle örnekler genelde yüzey tabakadan alınmıştır.



Şekil 3.4. Ortamlara ekim ve üretim (Foto : Arash Rad, 2007).

3.5.4. Tekrarlı Kültürasyonlar

Mikroalglerin üremesinden sonra tekrar kültürasyonları (pasaj) yapıldı. Pasajlar süresinde tuz konsantrasyonu kademeli olarak 1.5'ten 3 molar yükseltildi (2 ve 3 M NaCl, 7+7 gün, pH= 7.5, 25°C, statik fitotron, 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ve 24 saat aydınlık), sonra da tekrar 1.5 M NaCl konsantrasyonuna düşürüldü (7 gün, 25°C, statik fitotron, 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ve 24 saat aydınlık). Sonraki aşamada da ortamın pH'sı 7.5 den 10'a yükseltildi (pH= 8, 9 ve 10, 7+7+7 gün, 25°C, statik fitotron, 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ve 24 saat aydınlık).

Bütün bu işlemlerin amacı kontaminasyonu elimine etmektir, zira bu pH ve tuzlulukta *Dunaliella* dışındaki mikroorganizmaların yaşam şansları düşüktür. Sonraki aşamada örneklerin 1.5 molar NaCl içeren ortamlarda (beş kere her 14 günde bir; toplam 70 gün) tekrar kültürasyonları yapıldı (pH= 7.5, 25°C, statik fitotron, 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ve 24 saat aydınlık) .

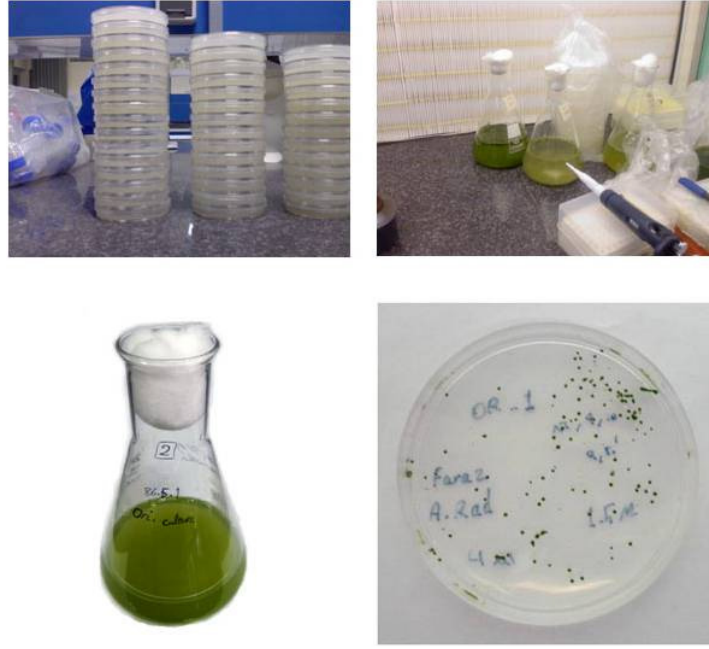
Dunaliella'ya özgü olan üretim ortamında organik maddeler yer almadığından birkaç pasaj sonrası kontaminasyon olasılığı elemine olmaktadır. Kontaminasyon kontrolü için ortamlarda halofilik bakteri varlığı araştırılmış ve bu amaçla da halofil bakterilere uygun LB (Luria-Bertani, Sigma. Ltd) besiyeri kullanılmıştır (1.5 M NaCl, pH= 7.5). Bu ortamlar ekim sonrası statik inkübatörde 37°C'de 24 saat üretime terk edilmiştir.

3.5.5. Tek koloni izolasyonu

LB besiyerlerinde üretim sonrasında *Dunaliella*'nın karışık popülasyonları yer alabileceğinden tek koloni izolasyonuna gidilmiştir. Bu amaçla %1.7 agar ilavesi ile hazırlanan MJ besiyeri kullanılmıştır (1.5 M NaCl, pH= 7.5). Otoklav işleminden sonra (20 dakika ve 121°C) besiyerleri 50°C'ye kadar soğutuldu ve her 100 ml besiyeri başına, 50 μl olacak şekilde, steril fosfat çözeltisi eklenen ortamlar steril Petri plaklarında katı ortam olarak kullanıma sunuldu. (Şekil 3.5)

Bu aşamadan sonra petrilere sıvı stok kültürlerden alınan 2-5 μl örnek, tam steril koşullar altında ilave edilmiş ve steril öze ya da steril Drigalski özesiyle besiyeri yüzeyine yayılmıştır. İklim odasına 15 gün üretime terk edilen ortamlar incelenmiş gerektiğinde üretim için ilave süre tanınmıştır (25°C, pH= 7.5, statik fitotron, 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ve 24 saat aydınlık).

Üretim sonrası her bir tek koloniden örnek alınmış ve yatık MJ agarlara (1.5 M NaCl) ekim yapılmıştır. Ekimin gerçekleştirildiği yatık agarlar, üretimin gerçekleşmesi için en az 15 gün iklim odasında (fitotron) inkübe edilmiştir (25°C, pH= 7.5, statik fitotron, 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ve 24 saat aydınlık). (Şekil 3.6)



Şekil 3.5. Tek koloni izolasyonu işlemleri (Foto : Arash Rad, 2007)

Bu aşamadan sonra petrilere sıvı stok kültürlerden alınan 2-5 µl örnek, tam steril koşullar altında ilave edilmiş ve steril öze ya da steril Drigalski özesiyle besiyeri yüzeyine yayılmıştır. İklim odasına 15 gün üretime terk edilen ortamlar incelenmiş gerektiğinde üretim için ilave süre tanınmıştır (25°C, pH= 7.5, statik fitotron, 100 µmolphoton.m⁻²s⁻¹ ve 24 saat aydınlık).

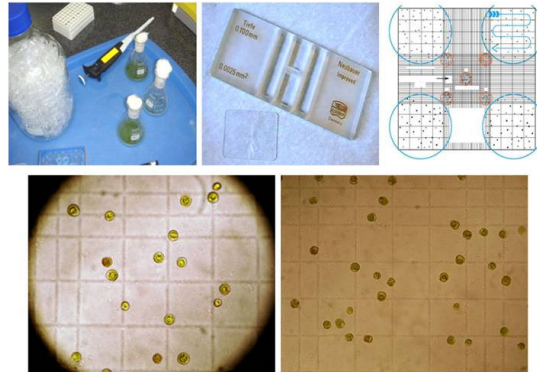
Üretim sonrası her bir tek koloniden örnek alınmış ve yatık MJ agarlara (1.5 M NaCl) ekim yapılmıştır. Ekimin gerçekleştirildiği yatık agarlar, üretimin gerçekleşmesi için en az 15 gün iklim odasında (fitotron) inkübe edilmiştir (25°C, pH= 7.5, statik fitotron, 100 µmolphoton.m⁻²s⁻¹ ve 24 saat aydınlık). (Şekil 3.6)



Şekil 3.6. Petriden yatık agara tek kolonilerin transferleri (Foto : Arash Rad, 2007)

3.5.6. Kültürlerde üremenin ölçülmesi

Sıvı besiyerlerinde üremenin ölçülmesi için hücre sayımları yapılmış ve bu amaçla da Naubaeur (0.1 mm^3) hemositometresi ile sayım gerçekleştirilmiştir. (Şekil 3.7)



Şekil 3.7. Hücre sayımına hazırlanma (Foto : Arash Rad, 2007)

Üremenin bu şekilde ölçülmesi için, sıvı ortam çalkalama ile (elle sallayarak) homojen haline getirilmiş, sonrasında ortamlardan alınan $950 \mu\text{l}$ örnek ependorf tüplere aktarılmıştır. Bu örneklerin üzerine $50 \mu\text{l}$ lügol eklenerek algler öldürülmüş ve lugol eklenmesi ile fiksasyon sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında ise hazırlanan örnekten alınarak lam ve lamel arasına aktarılmış ve aşağıdaki formüller ile 1 ml örnekteki sayılar hesaplanmıştır.

Hücre sayım işlemleri lamın tüm dörtgenlerinde 0.1 mm^3 hacminde 2 tekrarlı olarak yapıldı.

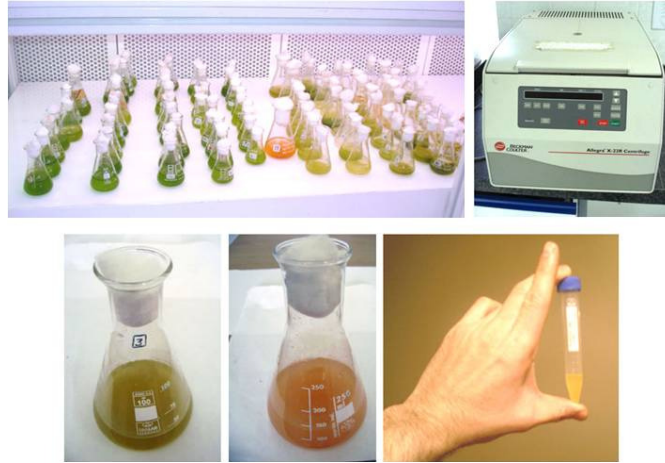
$$\text{Alg sayısı } 1 \text{ ml'de} = n \cdot 1000 / 0.1 \cdot X$$

n= Tüm büyük dörtgenlerde hücre sayı ortalaması (toplam hacim = 1 mm³)

X = Örneklerin uygulanan lügol ile konsantrasyon katsayısı (0.95)

3.5.7. Kültürlerde karotenoid ölçümü

Toplam karoten miktarının tespiti spektrofotometrik yöneme göre aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı: Normal ve stres altında kalan tüm kültürlerden üçer adet örnek alındı. Bu örnekler 15 ml'lik tüplere steril pipet aracılığı ile 2 ml aktarıldı ve 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj (BECKMAN, NGB) edildi (Şekil 3.8). Süpernatant döküldü ve kalan biyokütle üzerine 5 ml %30 metanol'de çözünmüş %5 KOH eklendi.



Şekil 3.8. Karotenoid konsantrasyonu ölçümüne hazırlık (Foto : Arash Rad, 2007).

Klorofilin ortadan kaldırması için elde edilen solüsyon 55°C'de 5 dak. boyunca su banyosunda tutuldu, sonra yine 5 dakika süre ile 5000 rpm'de santrifüj edildi. Yeşil süpernatant (klorofil) atıldı ve turuncu ya sarı renkte olan çökeltiliye de 2 ml hekzan - aseton (9+1) eklendi (Merck %100, Germany). Bu işlem sonrasında solüsyon vorteks ile biyomas renksiz hale gelene kadar karotenoidi özütlemesi için çalkalandı. Örnekler 5 dakika süre ile 2500 rpm'de santrifüje tabi tutulduktan

sonra, solüsyonun üst kısmı spektrofotometre (GENESYS 5), küvetlerine aktarıldı ve absorbans 447nm'de okunuldu (Borowitzka ve Siva, 2007) (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Karotenoid ekstraksiyonu işlemleri (Foto : Arash Rad, 2007).

Karotenoid konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$K = A_{447} \times 3.26 H_b / H_s$$

K : Karoten konsantrasyonu (mg.l^{-1})

A_{447} : Karotenin 447 nanometrede absorbans oranı

H_b : İlk örneklemede mikroalg içeren besiyerin hacmi

H_s : Çözücü ve karotenoid içeren solusyonun son hacmi

Deneyimizde İlk örneklemede mikroalg içeren besiyerin hacmi ile çözücü ve karotenoid içeren solusyonun son hacmi eşit olduğundan dolayı ($H_b = H_s$); formül aşağıdaki şekilde basitleştirilebilir :

$$K_m = A_{447} \times 3.26$$

Karotenoid miktarları farklı tuzluluklarda üretilen birim hücre başına olacak şekilde pikogram olarak hesaplandı.

K_m = Karotenoid miktarı : K_m (mg)

H_s = Hücre sayısı (10^6 hücre ml'de)

HBKM = Hücre başına Karotenoid miktarları (10^{-6} mg karotenoid her hücrede= pikogram.hüc⁻¹)

$$HBKM = \frac{K_m}{H_s}$$

3.6. Karoten Üretimi İçin Uygun *Dunaliella* Türünün Seçimi

Bölüm 3.1'de söz edilen göllerden elde edilen tüm mikroalgler karotenoid üretimi yönünden taranmak amacı ile 1, 2 ve 3 M'lı NaCl içeren MJ besiyerlerinde farklı pH'larda (6, 7, 8 ve 9) ekildi ve 25°C'de, 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ statik fitotronda 30 gün boyunca üretildiler, sonra en üretken suşlarını 21 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde yüksek NaCl molarite, şiddetli ışık, karbon kaynağı eklenmesi, nitrat ve fosfat eksikliğine maruz bırakıldı (3 M NaCl, pH=7, 35°C, 400 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Üreme sırasında fotometre (L1-250A) ile erlenlerin her tarafında ışık şiddetinin ortalama olarak 100 ve 400 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ olması sağlandı. İnkübasyon sonrası üretim ortamlarındaki karotenoid miktarları, hücre sayısı ve hücre başına karotenoid üretim miktarları kıyaslanarak tekrar daha üretken *Dunaliella* sp. seçildi.

3.7. *Dunaliella*'da Üreme ve Karoten Üretimini Etkileyen Faktörlerin Araştırılması

Bir çok araştırma karotenoid üretimindeki artışın farklı inkübasyon koşullarına göre değişiklik gösterdiğine işaret etmektedir (Ben-Amotz and Avron, 1993; Borowitzka and et al., 1984; Ramazanov, 1988; Mironyuk and Einor, 1968; Milko, 1963; Borowitzka, 1989 ve Semenenko, 1980; Fazeli et al., 2006). Bu çalışmada, Desphande (2005) ve Borowitzka (1989 ve 2007)'ye göre hazırlanan

besiyerlerinde izolatların Karoten üretim miktarları ve üremeleri üzerine değişik tuzluluk, sıcaklık, pH, ışık ayrı ayrı hesaplandı.

3.7.1. *Dunaliella* tarafından karotenoid üretime uygun inkübasyon süresinin saptanması

İnkübasyon süresinin karoten üretime etkisinin incelendiği bu çalışma sonrasında inkübasyonun 28. gününün en uygun karoten üretim süresi olduğu saptandı. Bu amaçla hazırlanan ortamlarda NaCl konsantrasyonu 1 M olarak sağlanmış ve inkübasyon bölüm 3.5'te anlatıldığı şekilde olmak üzere 30 gün sürdürülmüştür. Karotenoid miktarı ve üremenin ölçülmesi amacıyla kültürasyonun 10. gününde ve bundan sonra da her iki günde bir örnek alınmıştır. Hücre sayısı her örnekleme yeri ve inkübasyon süresine göre olmak üzere Şekil 4.10 da görülmektedir. Karoten miktarları da mg.l^{-1} olarak saptandıktan sonra Bölüm 3.4.7 de anlatılan şekilde HBKM olarak hesaplanmış ve Şekil 4.12 de gösterilmişti (incelendiğinde 10. güne kadar yetecek kadar hücre sayıları ve karotenoid üretim oranlarında artış gözlenmemiştir).

3.7.2. Karoten üretimi için uygun pH değerinin saptanması

Dışarıda yapılan kültürlerinde *Dunaliella* 7.0–9.0 arasında geniş bir pH aralığına uyum sağlayabilir (Durmaz ve Gökpınar, 2006; Ben-Amotz, 1987; Ben-Amotz ve Avron, 1983). İzole edilen *Dunaliella* türlerinin karotenoid üretim ve hücre çoğalma kapasitelerine pH'nın etkisini araştırmak için, 1 M NaCl içeren pH'ları 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmış MJ besi ortamı kullanılmıştır (Çelekli ve Dönmez, 2006). pH ayarlamalarında 1 N HCl ya 1 N NaOH (Merck) kullanılmıştır. Dört farklı pH'da hazırlanan 36 adet 100^{cc} MJ besiyerlerine (1M NaCl) steril pipet aracılığıyla 50 ml zenginleştirmiş 1 M NaCl'li bir aylık stoklardan ekim yapıldı, sonra da 30 gün boyunca (1 M NaCl, 25°C, 100 $\mu\text{molphoton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) üretim ortamlarında üretilerek karoten miktarları ve hücre sayıları ayrı ayrı hesaplandı.

3.7.3. Karoten üretimi için uygun inkübasyon sıcaklık saptanması

İklim odasında sıcaklık Ben-Amotz (1982 ve 1989) Desphande (2005) ve Garcia (2007)' ve Çelekli ve Dönmez (2006)'ya göre 20°C (1 M NaCl, pH=7.5, 100 $\mu\text{molphoton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), ve çalkalamalı inkübatörde 35°C'de (1 M NaCl, pH=7.5, 100 $\mu\text{molphoton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 30 gün sabit tutulmuş ve bu sıcaklıklardan hangisinin daha

uygun bir inkübasyon sıcaklığı olacağının gösterilmesi için karotenoid üretimi ve hücre sayıları ayrı ayrı hesaplandı.

3.7.4. Karoten üretimi için uygun tuz konsantrasyonunun saptanması

Dunaliella türlerinin üreme ve karotenoid üretimine etkili NaCl konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan denemeler, her örnekten alınan ortam için (bkz. 3.1) 1-3 M NaCl konsantrasyonlarında 30 günde gerçekleştirilmiştir (pH=7.5, 100 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 25 °C).

3.8. Stres Koşullarının Karoten Üretiminde Etkisi

Milko (1963), Borowitzka (1989) ve Marin and et al. (1998)' göre nitrojen ve potasyum kısıtlamasında *Dunaliella*'daki karotenoid bileşiklerinde artış görülmektedir. Ayrıca Stephens ve Gillespie (1976) ve Post (1977)'e göre NO_3^- veya NH_4^+ *Dunaliella* metabolizmasında nitrojen kaynağı olarak yer almaktadır. Stres aşamasında üretim ortamına nitrojen ve potasyum kaynağı eklenmedi ve nitrojen ve potasyum kaynağının eksikliğinin karotenoid üretimindeki etkisi incelendi.

3.8.1. Işık ve tuzluluk stresi

Stoklardan, 3 M NaCl içeren MJ besiyerlere ekim yapıldı (150^{cc} besiyer + 15^{cc} örnek), ve aşağıda anlatıldığı gibi iki aşamada, ışığa maruz bırakıldı (100 ve 400 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 25 °C, 35 °C ve pH=7)

Birinci aşama Çizelge 3.2'de görüldüğü gibi uygulandı.

Çizelge 3.2. İlk aşamada uygulanan ışık stresi

Gün	Işık Şiddeti
10	Az ($100 \mu\text{P.M}^{-2}\text{S}^{-1}$) sürekli floresan ışık altında, 25 °C, pH=7

On'uncu günün sonunda:

1. Hücrelerin üreme hızları saptandı.
2. Karotenoid üretimi ölçüldü.

İkinci aşamadaki uygulama Çizelge 3.3'te görülmektedir.

Çizelge 3.3. Birinci fazın ikinci aşamasında uygulanan ışık stresi

Gün	Işık Şiddeti
11-30	Şiddetli ($400 \mu\text{mP.M}^{-2}\text{S}^{-1}$) 14/10 saat aydınlık/karanlık rejimi altında, inkübatör, 35°C , $\text{pH}=7$

Her iki günde bir (gün aşırı):

1. Hücrelerin üreme hızları saptandı.
2. Karotenoid miktarı ölçüldü .
3. β -karoten konsantrasyon oranı, hücre sayısına göre hesaplandı ve hücre başına pikogram.hücre⁻¹ ifade edildi.

İlk fazda elde edilen sonuçlara göre optimize edilen ortamlardan nitrat ve fosfat stresi etkisi araştırıldı.

3.8.2. Nitrat ve fosfat stresi

1 M NaCl içeren MJ besiyerinde üretilen stoklardan 25 ml alınarak 5 molar NaCl içeren 25 ml'lik MJ besiyerine aktarım yapıldı son NaCl konsantrasyonu 3 M olarak gerçekleştirilen bu ortamlar KNO₃ eklenmeden üretime terk edildi, örnekler 21 gün şiddetli ışığa maruz bırakarak, üçer gün aralıklarla üreme hızları ve karotenoid konsantrasyonu saptandı.



Şekil 3.10. Nitrat ve fosfat stresin uygulanması (Foto : Arash Rad, 2007).

3.8.3. *Dunaliella*'da karoten sentezine etkili KNO_3 oranının saptanması

Sekonder metabolitlerin üretiminde uygun karbon-azot oranının (C/N) tespiti önem taşır (Escamilla et al., 2000; Karakoç and Aksöz, 2004). Bu oranını saptanması için uygun C ve azot kaynaklarının farklı konsantrasyonları ortamda yer alır ve en uygun konsantrasyonların saptanmasının ardından uygun oranın hesaplanması söz konusu olur (Jiménez and Niell, 2003). Çalışmamızda β -karoten üretimi için uygun C/N oranının araştırılması amaçlanmış olmakla birlikte, bu çalışmanın kurulmasında bazı sorunlar söz konusudur. Şöyle ki; bu alg türü zorunlu fototroftur (Durmaz ve Gökpınar, 2006; Ben-Amotz, 1987; Ben-Amotz ve Avron, 1983), bu nedenle ortamda CO_2 varlığı gerekmekte ve bunun kaynağı da atmosferik CO_2 olmaktadır (Gordillo et al., 2003). Dolayısıyla β -karoten üretimi için gerekli C kaynağını saptamak gibi bir çalışmanın yapılması gerekmemekte ve ortamda CO_2 konsantrasyonunun değişmesi gibi bir durum söz konusu olmamaktadır (Zira bu kaynak atmosferdir ve CO_2 konsantrasyonu bilindiği gibi atmosferde %0.035, civarındadır, atmosferik oranından daha yüksek bir oranda örneğin %1 oranda CO_2 uygulamasında karotenoid üretiminde düşüş görülmüştür (Gordillo et al., 2003). Günümüzde *Dunaliella*'nın ticari üretimi ya sonsuz akışlı açık kanallarda ya da doğal lagüner alanlarda yapılır. *Dunaliella*'nın heterotrofik büyüme yeteneği olmayıp, bu türü karanlık bir ortamda asetat veya glikozda büyütme teşebbüsleri başarısız olmuştur (Ben-Amotz, 1987; Browitzka et al., 1992).

Dunaliella spp. için en iyi azot kaynağı KNO_3 ya $NaNO_3$ 'tür (kaçka, 2003, Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'e göre Milko, 1962; Grant,1970). Nitrit ve nitratların hücre tarafından alınması için ısı ve tampon sistem gereklidir,

diğer amonyum tuzları, örneğin; amonyum asetat, amonyum nitrat, amonyum sitrat ve amonyum klorid genel olarak daha düşük azot kaynakları olarak bilinmektedir (Becker, 1994, Borowitzka and Lesley 1988, Grant,1967), bu kaynakların yüksek konsantrasyonlarda (>2.5 M) bulunması durumunda letal etki yaptıkları bildirilmektedir.. Nitrit ve nitratın hücreler tarafından alınması ortamın alkalizasyonuna sebep olurken, besi ortamına amonyum eklenmesi ise asidifikasyona sebep olmaktadır. Tamponlanma yapılmamış sistemlerde ortam pH'nın değişmesi, alg üremesini önemli oranda etkilemektedir (Becker, 1994).

Organik azot kaynaklarından olan üre ve glutamin ise, inorganik azot kaynaklarından daha az etkilidir. (Kaçka, 2003; Borowitzka and Lesley 1988; Milko, 1962; Pristavu and Wegman, 1978).

D. tertiolecta'nın gelişmesi için, N sınırlaması sabit tutulan uzun süreli kültürlerde, nitrat. amonyum ve ürenin aynı miktarda kullanıldığı ve her üçüyle de elde edilen verimin aynı olduğu belirlenmiştir (Kaçka, 2003; Borowitzka and Lesley 1988; Goldman and Reavey, 1979).

Bunun için kurulan düzeneğe MJ sıvı besiyeri 3M NaCl ile, 12 mM veya 1 M KNO_3 içerecek şekilde hazırlandı (Mojaat et. al, 2008; Johnson and et al., 1968). Hazırlanan bu ortamlara stoklardan ekim yapıldı. Ekimler sonrasında ortamlar 35°C 'de, 14/10 ışık/karanlık muamelesi ile, çalkalamalı inkübatörde, 21 gün inkübasyona bırakıldılar. Üretim sonrasında ortamlarda karotenoid ve üreme miktarları hesaplandı. Her iki KNO_3 konsantrasyonlarındaki değerler birbirleri ile kıyaslandı.

3.9. *Dunaliella* DNA Ekstraksiyonu için Modifiye Yöntem Önerilmesi

Dunaliella mikroalglinin moleküler tanımlamalarında DNA ekstraksiyonu için genellikle Olmos; 2002, protokolu kullanılmaktadır ancak bu bu protokolün bazı dezavantajları vardır :

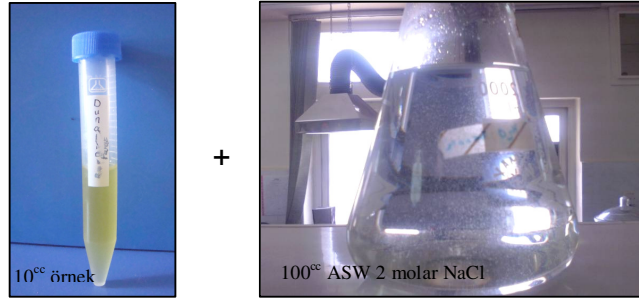
1. Bakterilere ait bir yöntemdir.
2. Mikroalgler için, kalite (saflık) ve miktar açısından düşük ürün vermektedir ve AFLP ve RFLP vs. gibi uygulamalarda kesin sonuçlar vermeyebilir.
3. Zaman bakımından da uzun süren bir yöntemdir.

Önerilen yöntem :

Olmus'un protokolü bu nedenle çalışmamızda modifiye edilerek kullanılmıştır ve avantajları aşağıda ifade edilmiştir :

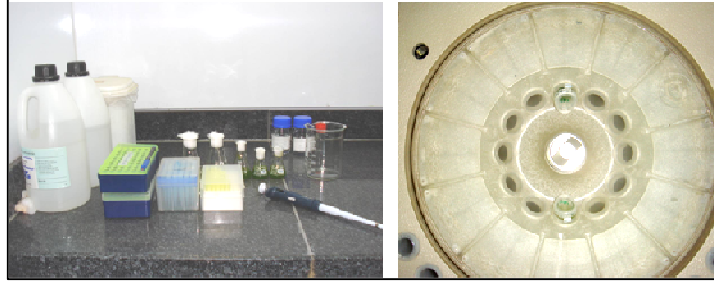
1. Mikroalgelere özel bir protokoldür; özellikle *Dunaliella* algine özgül bir yöntemdir (bu algde hücre duvarı yok!) ve bakterilerde hücre duvarını ortadan kaldırmak için kullanmakta olan maddeler, bu Protokolde, etkisiz durumdadır. Sonuçta daha net bantlar verir; yani: DNA DAHA SAF ELDE EDİLİR.
2. Zaman açısından da daha kısa sürelidir.

Örnekler tekrarlı kültürasyonlardan sonra saf DNA ekstraksiyonuna hazırlandı (Şekil 3.11). İki hafta iklim odasına bırakarak, 25°C, 100 µmP.M⁻²S⁻¹ ve 14/10 saat aydınlık- karanlık rejimi uygulanarak üretildi.

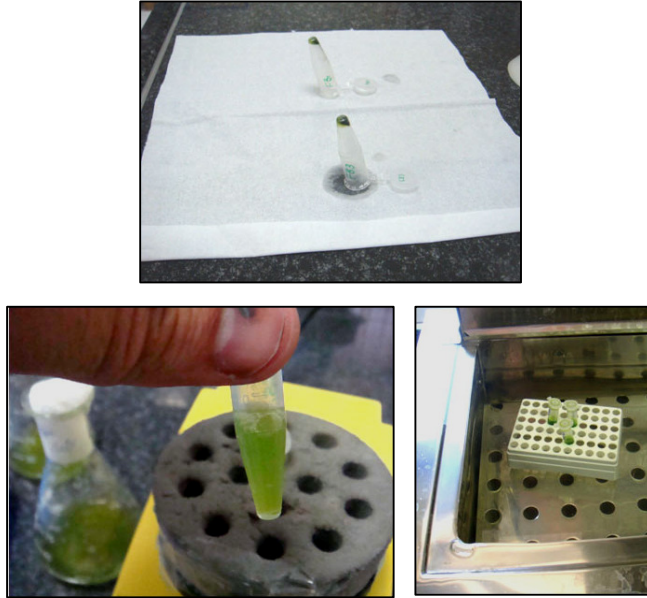


Şekil 3.11. DNA ekstraksiyonunda ön hazırlanma malzemeleri (Foto : Arash Rad, 2007).

Bunun ardından logaritmik üreme dönemindeki kültürden (yaklaşık 12 günlük kültürden) 1.5 ml. örnek alındı ve ependorf tüplerine aktarıldı. 3 dakika süre ile 5000 rpm devirde santrifügasyonun ardından (Şekil 3.12) süpernatant atıldı ve kalan persipitata hücre zarların kaldırılması amacı ile 300 µl lizis tamponu eklendi. Vorteks ile iyice homojenize edilen örnek daha sonra 10 dakika süre ile su banyosunda tutuldu (65°C).

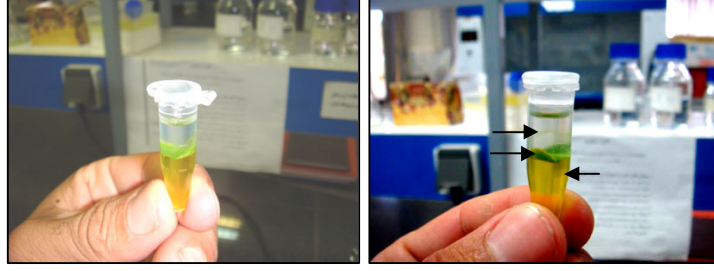


Şekil 3.12. Örneklerin santrifüjleme aşaması (Foto : Arash Rad, 2007).



Şekil 3.13. DNA ekstraksiyonunda hücre zarlarının ortalıktan kaldırması (Foto : Arash Rad, 2007).

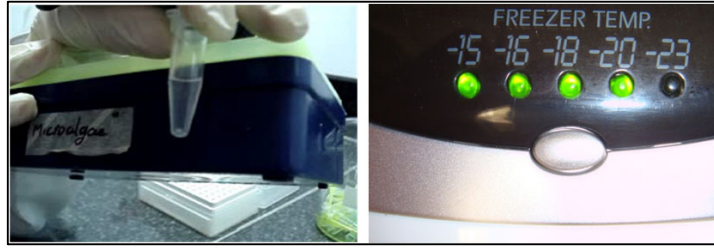
Santrifüjleme aşaması tekrar 10.000 devir/dakika hızda ve 5 dakika süre ile yapıldı sonrasında süpernatant başka tüpe aktarıldı. Tüpe 100 μ l fenol (proteinlerin çöktürmesi için) ilave ederek, 10 dakika beklendi, tüpün ağzı parafilm ile kapatarak, 12000 devir/dakika hızda 15 dakika süre ile santrifüj edildi, bu aşamada üç faz görüntülendi (şekil 3.14). Üst kısım dikkatli şeklide başka tüpe aktarıldı.



Şekil 3.14. DNA ekstraksiyonunda üç fazın gürülmesi (Foto : Arash Rad, 2007).

Süpernatant'a 100 µl İzomil alkol - kloroform (1:24) solüsyonu aktarıldı, ve tüpler 3 - 4 kere altüst edildi.

Santrifüjleme aşaması 10.000 devir hızı ile 5 dakika süre ile yapıldı, sonra eş hacimde soğuk izopropanol ilave edildi; bu aşamada DNA ipliği görüldü ve sonra tüpler derin dondurucuda -20°C'de 10 dakika süre ile bırakıldı.



Şekil 3.15. DNA ipliğinin görünümü ve tüplerin derin dondurucuda bırakılması (Foto : Arash Rad, 2007).

Santrifüjleme aşaması 12.000 devirde 10 dakika süreyle tekrar edildikten sonra, üst kısım atıldı ve çökeltiye 100 µl %75 etanol ilave edildi. Tekrar santrifüjleme 12000 devirde ve 5 dakika süre ile yapıldı.



Şekil 3.16. Santrifüjleme ve çökeltiye 100 µl %75'lik etanol ilavesi (Foto : Arash Rad, 2007).

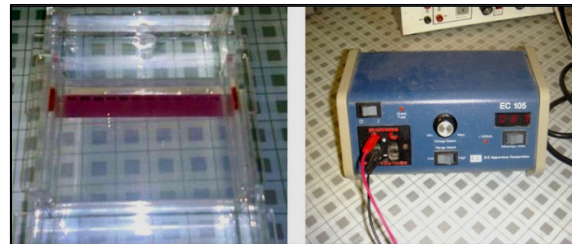
Son aşama :

0.5 µl RNase A eklenmeden önce tüpler kurutma kağıdına ters çevirilerek kurumaya bırakılmıştır, sonra 100 µl Tris- EDTA eklendi.



Şekil 3.17. Örneklerin kurutulması ve RNase'in kullanımı (Foto : Arash Rad, 2007).

Örnekler RNase ilave edildikten sonra pipetaj yolu ile iyice karışım sağlandı. Örnekler ikişer µl olarak daha önce hazırladığımız %1'lik agaroz jelde yürütülüp, 10 kb'lık markır ile sonuçlar kıyaslandı (Şekil 3.18) .



Şekil 3.18. Elektroforez aşaması (Foto : Arash Rad, 2007).

DNA miktarı spektrofotometre ile 230/260 nm'lerde saptandı. Ancak DNA ekstraktının saflığın göstermek için 260/280 nm'ler arasında da okuma yapıldı ve 1.8-2 OD değerinin saptanması ile DNA'nın oldukça saf olduğu anlaşıldı.

4. BULGULAR

Dunaliella yüksek tuzluluklarda hücre içinde önemli miktarda β -karoten biriktirebilen ve bu nedenle ekonomik değer kazanan bir klorofittir (Durmaz ve Gökpinar, 2006). Bu çalışmada *Dunaliella*'nın farklı tuz konsantrasyonlarında ve stres uygulamaları altında kültürleri yapıldı ve yüksek tuzluluklarda *Dunaliella* hücre konsantrasyonları saptandı, bunun yanı sıra hücrelerin önemli ölçüde β -karoten biriktirdikleri gözlemlendi.

4.1. Örnekleme Bölgelerin Dış Görünüşleri, Mikrokobik İzlemeler, Zenginleştirme ve İzolasyon

4.1.1. Örnekleme bölgelerin dış görünüşleri

Örnekleme sırasında göllerin kenarları ve bataklığın yatağında turuncu ve yeşil tabakalar görüldü (Şekil 4.1). Bu tabakalar alg varlığına delil olarak kabul edilmiştir. Çalışılan göllerin tuzluluk ve pH değerleri çizelge 4.1'de görülmektedir.



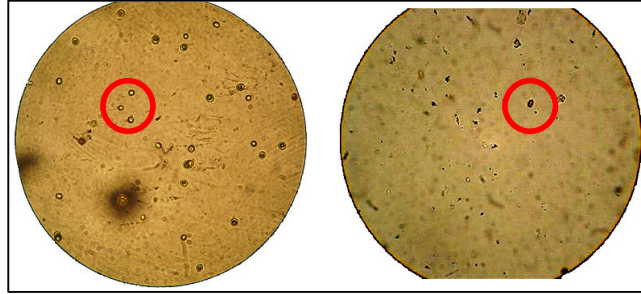
Şekil 4.1. Urumiye gölünün turuncu renkte göl kıyılarındaki alglerin yığını (A ve C) ve Gavhuni bataklığının turuncu ve yeşil bataklık yatağındaki tabakalarda alglerin yığını (B) (Foto : Arash Rad, 2007).

Çizelge 4.1. Farklı bataklık ve göllerden alınan örneklerin tuzluluk ve pH'ları

Göl ve Bataklık	Tuzluluk	pH
Urumiye gölü	9.8 – 350 g/l (0.16 – 6 M)	2.7 – 7.6
Qum tuzlası	105.6 – 328.9 g/l (1.8 – 5.62 M)	7.8 – 8.6
Gavhuni bataklığı	21.8 – 238 g/l (~ 0.4 – 4 M)	6.82 – 8.45
Maharlu gölü	119.5 – 279.9 g/l (2 - ~ 4.8 M)	6.6 – 7.3

4.1.2. Mikroskopik gözlemler

Göllerden alınmış su örnekleri ile mikroskopik ön incelemeler yapıldı. Bu aşamada mobil tek hücreli *Dunaliella*'ların popülasyon yığını düşüktü (Şekil 4.2). Mikroskop altında bu mikroalgle beraber diğer küçük canlılarda görüldü.

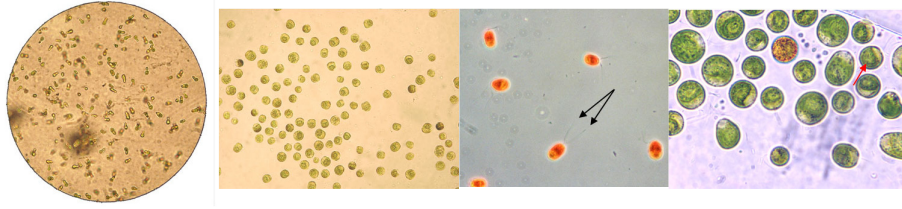


Şekil 4.2. Toplanmış *Dunaliella*'ların mikroskopik görünümü (x40, Foto : Arash Rad, 2007).

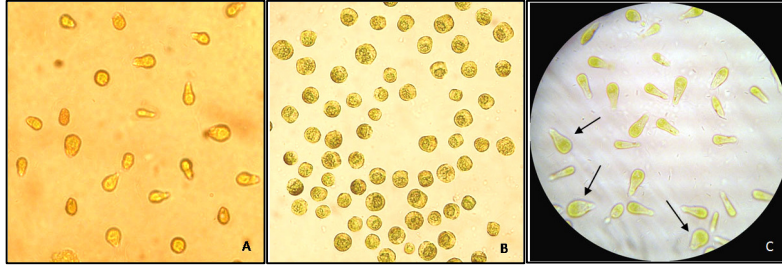
Mikroalglerin sonraki kültürasyonlarda farklı şekilleri görüldü ve başka cinslerin olasılığını ispatladı. Gavhuni bataklığından alınan alglerin çoğunluğu zeytin yeşilinden turucuya kadar görüldü, halbuki çamurlardan alınan mikroalg örneklerin çoğunluğu yeşil renktedirler. Hücreler içerdikleri β -karoten miktarlarına bağlı olarak sarı-yeşil ve sarı-turuncu renklerde gözlenebilirler. Söz konusu renkler alglerin içerdği β -karoten sonucu ortaya çıktığı için bu renkleri gösteren örneklerin yer aldığı ortamlar dikkatlice incelendi. Mikroskopik gözlemlerde *Dunaliella* hücreleri ovoid şeklinden (armut şeklinde) dairesel formlarına kadar görüldüler. Bu hücrelerin iki adet kamçı içerdikleri ve bu kamçılar aracılığıyla bazen hızlı bazen

de yavaş hareket ettikleri saptandı, hücrelerin hacımlarının %40'ı kadarının fincan şeklindeki kloroplasta ait olduğu görüldü (Şekil 4.3).

Dunaliella hücreleri sert hücre duvarı olmaması nedeni ile değişik ışık ve tuzluluk koşullarında çeşitli formlara girdiler; *Dunaliella*'lar yüksek tuzluluk değerine sahip olan sularda kamçılarını kaybeder ve dairesel şekline dönüşürler, eğer ilk ortamdaki koşullarına dönerlerse; kamçılarına sahip olup ve armut şeklinde (ok) görünürler (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Işık mikroskopunda çekilmiş *Dunaliella* hücrelerin fotoğrafı, flagellumlar (ok), değişik şekiller, renkler ve fincan şeklinde (kırmızı ok) kloroplast fotoğrafları (x40 ve x100; Foto : Arash Rad, 2007).



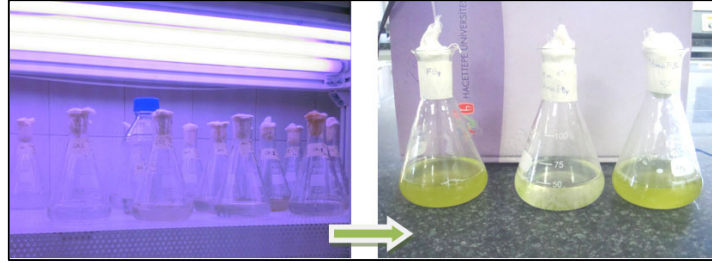
Şekil 4.4. *Dunaliella*'daki farklı tuzluluklarda şekil değişmesi; A ve C : düşük tuzlulukta, 1 molar ve B : yüksek tuzlulukta, (3 M NaCl, x100) (Foto : Arash Rad, 2007).

4.1.3. Dört bölgeden alınan örneklerin zenginleştirilmesi

Zenginleştirme aşamasında; fosfat ve nitrat besin kaynaklarını eklemesinden sonra mikroalgler gelişip çoğaldılar. On günden sonra mikroalglerin çoğalma nedeni ile kültürlerin rengi kademeli şekilde renksiz görünümünden karışık yeşil ve turuncu renklere göründü (şekil 4.5).



Şekil 4.5. Zenginleştirme aşamasındaki mikroalg kültürün renk değişim olgusu, Mikroalglerin MJ sıvı besiyerindeki kültürasyonundan sonra; mikroalgler iyice ürediler (şekil 4.6, Foto : Arash Rad, 2007).



Şekil 4.6. *Dunaliella* algın sıvı ortamdaki kültürü ve üremesi (Foto : Arash Rad, 2007).

4.1.4. Saf *Dunaliella* ve tek koloni eldesi

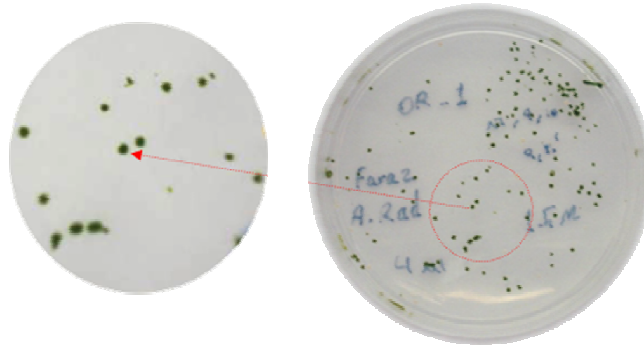
Mikrobiyal kontaminasyon incelemelerinde, katı LB kültürlerin üzerinde sarı renkte olan mukoid koloniler görüldüğü için bakterilerin olasılığı Gram boyamayla ispatlandı. NaCl ve pH konsantrasyonlarını kademeli olarak yükseltme ile (1 M

NaCl'dan 3'e ve pH= 6'dan 9'a) tekrarlı kültürasyonlar yapıp (5'er gün) bakterileri ortamdan kaldırıldı ve sadece kültürlerde saf mikroalg kaldı (Şekil 4.7).

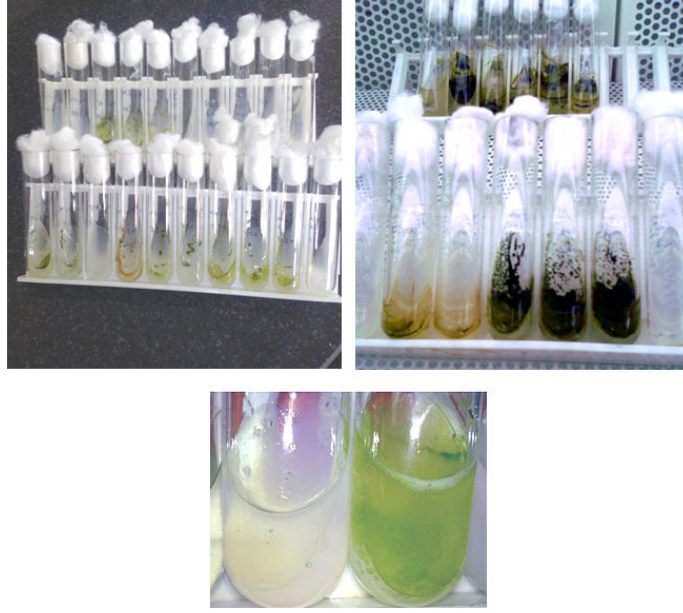
Sıvı MJ besiyerlerinde 30 gün üretilip (1 M NaCl, pH= 7.5, 25°C, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sürekli aydınlatma ve statik fitotronda,), sonra agarlı MJ besiyerlerinde yapılan kültürasyonlardan 15-30 gün sonra tek koloniler görüldü (şekil 4.8). Tek koloniler yatık agarlı tüplere aktarıldıktan yaklaşık 30 gün sonra bol üreme tesbit edildi ve stok olarak saklandı (Şekil 4.9).



Şekil 4.7. katı LB besiyerlerinde mikrobiyal kontaminasyon incelemesi (Foto : Arash Rad, 2007).



Şekil 4.8. Tek küresel kolonilerin üremesi (Foto : Arash Rad, 2007).



Şekil 4.9. Yatık agardaki *Dunaliella* spp. kültürü (Foto : Arash Rad, 2007).

4.2. Karotenoid Üretimine Etkili Bazı Parametrelerin Saptanması

4.2.1. *Dunaliella* tarafından karotenoid üretimine uygun inkübasyon süresinin saptanması

İnkübasyon süresinin karoten üretimine etkisinin incelendiği bu çalışma sonrasında inkübasyonun 28. gününün en uygun karoten üretim süresi olduğu saptandı. Bu amaçla hazırlanan ortamlarda NaCl konsantrasyonu 1M olarak sağlanmış ve inkübasyon Bölüm 3.6.1 de anlatıldığı şekilde olmak üzere 30 gün sürdürülmüştür. Karotenoid miktarı ve üremenin ölçülmesi amacıyla kültürasyonun 10. gününde ve bundan sonra da her iki günde bir örnek alınmıştır. Hücre sayısı her örnekleme yeri ve inkübasyon süresine göre olmak üzere Şekil 4.10 da görülmektedir. Karoten miktarları da mg.l^{-1} olarak saptandıktan sonra Bölüm 3.4.7 de anlatılan şekilde HBKM olarak hesaplanmış ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

Sonuçlara göre; tuzla, bataklık ve tuzlu göllerden alınmış örneklerin en yüksek hücre konsantrasyonu 26.'ı günde, 1 M NaCl'de 2.21×10^6 hücre ml^{-1} 'de ulaştı, en çoğalan izole de Urumiyye gölünden izole edilmişti (Şekil 4.10), diğer örnekler de sırasıyla :

Maharlu gölü örnekleri (28. günde; 2.19×10^6 hücre ml^{-1} 'de)

Qum tuzlası örnekleri örnekleri (26. günde; 2.12×10^6 hücre ml^{-1} 'de)

Gavhuni bataklığı hücre sayısını gösterdiler (26. günde; 1.97×10^6 hücre ml^{-1} 'de)

Sonuçlara göre; tuzla, bataklık ve tuzlu göllerden alınmış örneklerin en yüksek karotenoid konsantrasyonu 28.'i günde, 1 M NaCl içeren MJ besiyerinde 11.9 mg.lit^{-1} 'de ulaştı, en fazla karotenoid üreten örnek de Urumiye gölünden izole edilmişti (Şekil 4.11), diğer örnekler de sırasıyla :

Maharlu gölü örnekleri (28. günde; $11.26 \text{ mg.lit}^{-1}$ 'de)

Qum tuzlası örnekleri örnekleri (28. günde; $11.02 \text{ mg.lit}^{-1}$ 'de)

Gavhuni bataklığı toplam karotenoid konsantrasyonu gösterdiler (28. günde; $10.35 \text{ mg.lit}^{-1}$ 'de)

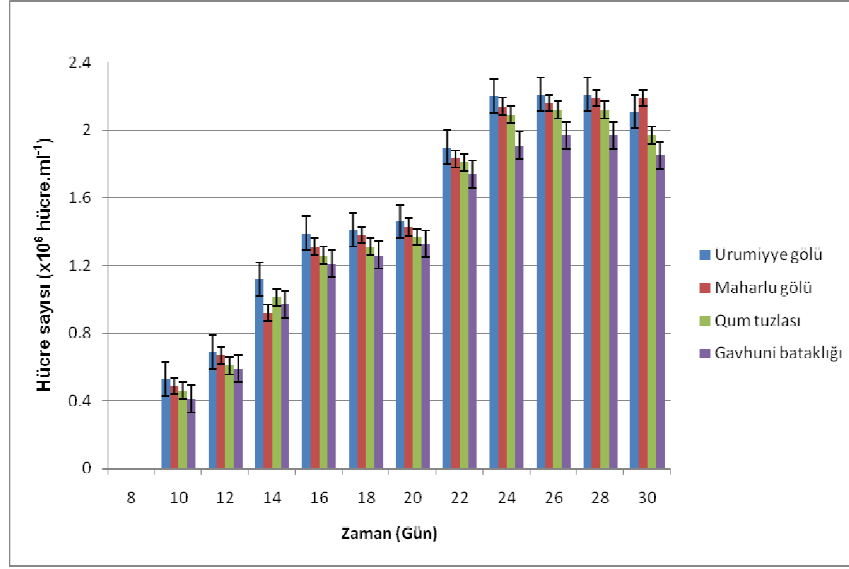
Sonra tüm örneklerin Karotenoid konsantrasyon oranları, hücre sayılarına göre hesaplandı ve hücre başına pikogram olarak ifade edildi.

Bu kıyaslamada *Dunaliella* tarafından en yüksek miktarda üretilen karotenoid 1 M NaCl içeren MJ besiyerinde hücre başına 30.'u günde $5.6 \text{ p.g.hücre}^{-1}$ Urumiyye gölü izolesinde gözlendi (Şekil 4.12), diğer örnekler de sırasıyla :

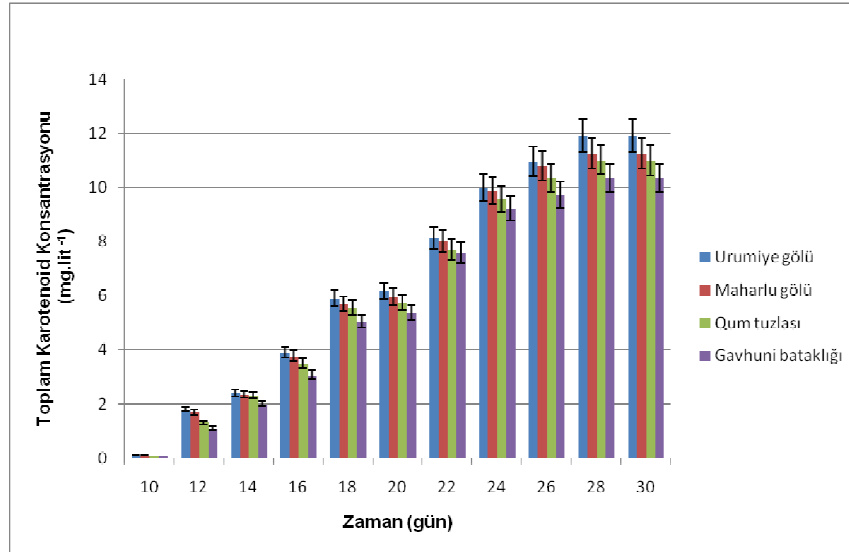
Gavhuni bataklığı örnekleri (30. günde; $5.59 \text{ pg.hücre}^{-1}$)

Qum tuzlası örnekleri (30. günde; $5.58 \text{ pg.hücre}^{-1}$)

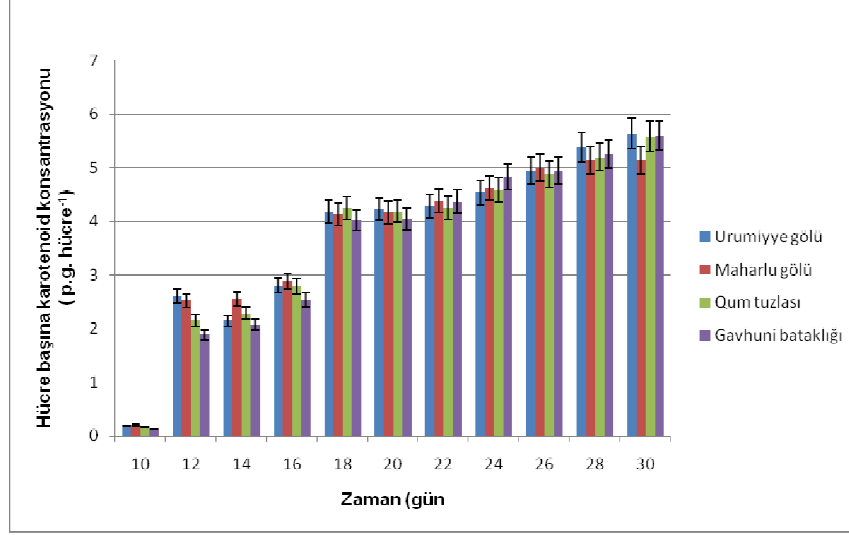
Maharlu gölü örnekleri karotenoid gösterdiler (28. günde; $5.14 \text{ pg.hücre}^{-1}$)



Şekil 4.10. MJ besiyerinde göl, tuzla ve bataklıklardan alınan mikroalglerin hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler, (1M NaCl, pH=7.5, 25°C'de, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).



Şekil 4.11. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin karotenoid üretim değerlerin zamana bağlı değişimlerin karşılaştırması, (1M NaCl, pH=7.5, 25°C'de, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).



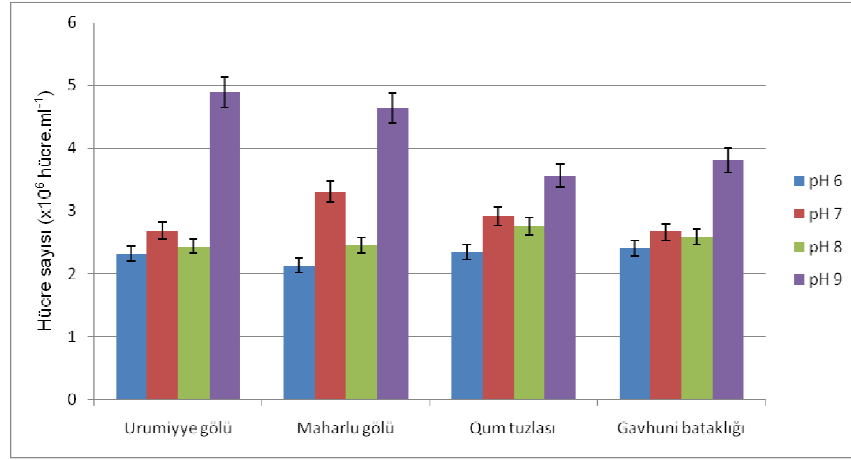
Şekil 4.12. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimlerin karşılaştırması, (1M NaCl, pH=7.5, 25 °C’de, 100 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).

4.2.2. *Dunaliella* tarafından karotenoid üretiminde en uygun pH değerinin saptanması

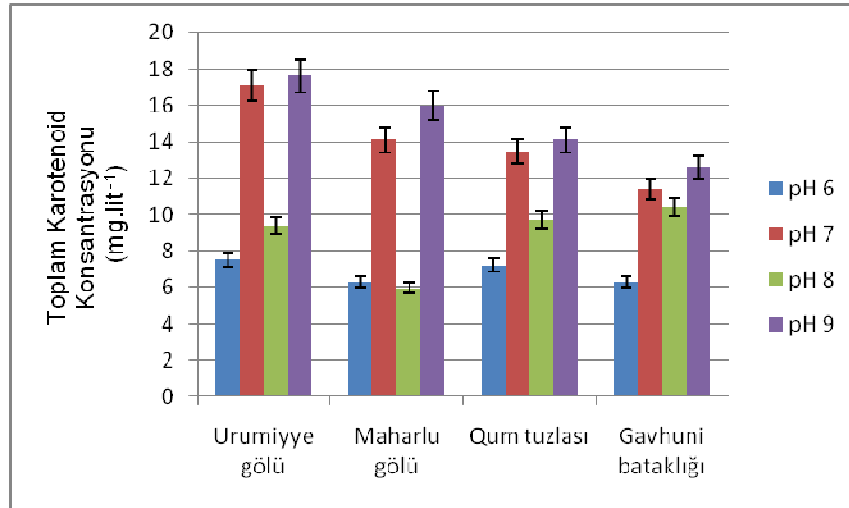
Bölüm 3.6.2’de anlatılan şekilde hazırlanan besi ortamlarına ekilen izolatların üreme ve karoten üretimlerine ortam pH değerlerinin araştırıldığı çalışma sonucunda en iyi üremenin 4.89×10^6 hücre. ml^{-1} olarak Urummiye izolatında ve pH:9.0 a ayarlanan ortamda saptandığı gösterilmiştir (Şekil 4.13). Diğer izolatların da yüksek üreme gösterdiği ortamlar pH:9.0 değerine ayarlanan ortamlardır ve üremenin en iyi görüldüğü ikinci izolat 4.64×10^6 hücre. ml^{-1} olmak üzere Maharlu gölü izolatı olarak saptanmıştır. Bu değer Qum tuzlası için 3.56×10^6 hücre. ml^{-1} olurken en düşük üreme ise Gavhuni bataklığı örneğinde ve 3.81×10^6 hücre. ml^{-1} olarak gerçekleşmiştir. Benzer olarak yine pH:9.0 olan hazırlanan ortamlarda da karotenoid üretimi yüksektir ve bu değer 17.6 mg.l^{-1} olmak üzere yine Urummiye örneğinde en yüksek değerine ulaşmaktadır. Karotenoid üretiminin en iyi görüldüğü ikinci izolat 15.97 mg.l^{-1} olmak üzere Qum tuzlası izolatıdır. Karotenoid üretimi Maharlu gölü izolatı için 14.1 mg.l^{-1} olurken en düşük üreme ise Gavhuni bataklığı örneğinde ve 12.6 mg.l^{-1} olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.14).

Üreme ve Karotenoid üretim miktarlarının hesaplanması ardından Bölüm 3.4.7 de söz edildiği gibi birim hücre başına karotenoid miktarları (HBKM) da saptanmış ve

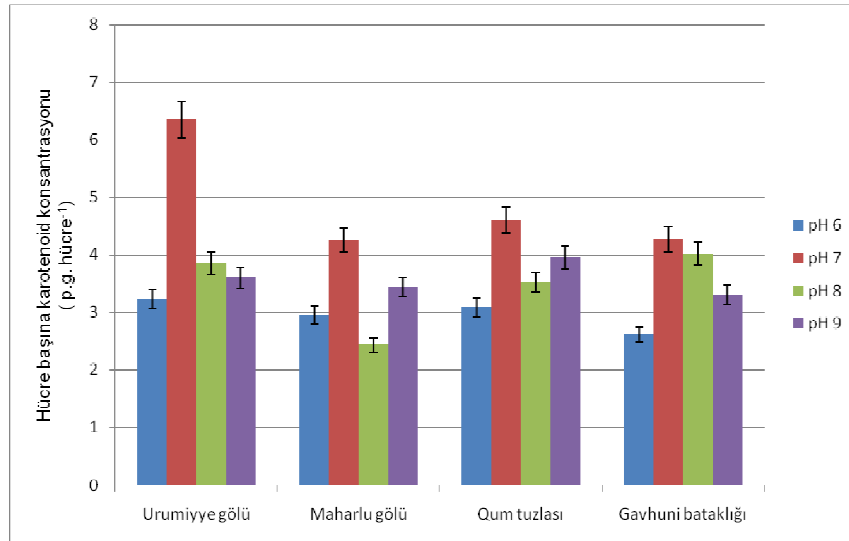
Urummiye izolatında pH:7 olarak hazırlanan ortamda HBKM değerinin 6.35 p.g hücre⁻¹ olarak en yüksek miktarda olduğu gösterilmiştir. Bu değer aynı izolatın pH:9.0 ortamı için 3.59 p.g hücre⁻¹ olarak hesaplanmaktadır. Diğer tüm isolatlar pH:7.0 ortamlarında yüksek HBKM vermektedir (Gavhuni bataklığı izolatı için 4.26 p.g, Mahurlu gölü izolatı için 4.25 p.g ve Qum tuzlası izolatı içinse 4.6 p.g . hücre⁻¹ olmak üzere) (Şekil 4.15).



Şekil 4.13. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin farklı pH'ların; pH=6, 7, 8 ve 9, hücre sayılarındaki etkisi, (1M NaCl, 25°C'de, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).



Şekil 4.14. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin farklı pH'ların; pH=6, 7, 8 ve 9, karotenoid üretimindeki etkisi, (1 M NaCl, 25°C'de, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).



Şekil 4.15. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin farklı pH'ların; pH=6, 7, 8 ve 9, hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin farklı pH'ların; pH=6, 7, 8 ve 9; etkisi, (1M NaCl, 25°C'de, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).

4.2.3. Karoten üretimi için uygun inkübasyon sıcaklık saptanması

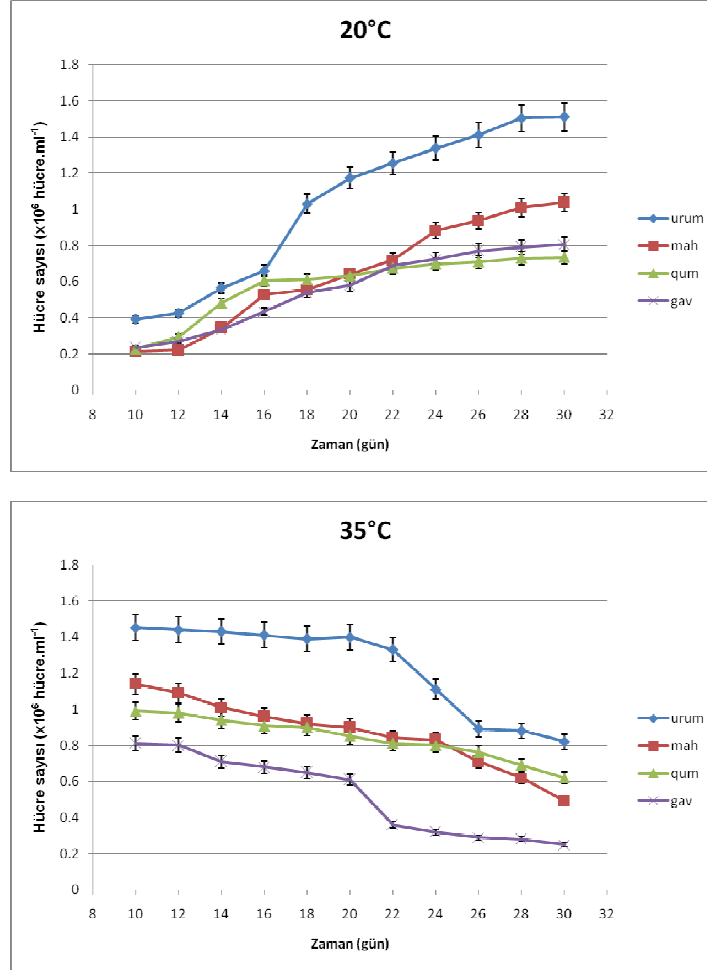
Bölüm 3.6.3'de anlatılan şekilde hazırlanan besi ortamlarına ekilen izolatların üreme ve karoten üretimlerine 20 ve 35°C olmak üzere iki farklı inkübasyon sıcaklık değerlerinin etkisinin araştırıldığı çalışma sonucunda en iyi üremenin Urummiye izolatında 30 gün inkübasyonun süresinde orantılı olarak 35°C de 1.23×10^6 hücre.ml⁻¹ olmak gerçekleştiği saptandı (Şekil 4.17). Aynı sıcaklıkta üremenin en iyi görüldüğü ikinci izolatın orantısı da 0.86×10^6 hücre.ml⁻¹ olmak üzere Mahurlu gölü izolatı olarak saptanmıştır. Bu değer Qum tuzlası için 0.84×10^6 hücre.ml⁻¹ olurken en düşük üreme ise Gavhuni bataklığı örneğinde ve 0.52×10^6 hücre.ml⁻¹ olarak gerçekleşmiştir.

En iyi üremenin Urummiye izolatında 30. günde 20°C de 1.51×10^6 hücre.ml⁻¹ olmak gerçekleştiği saptandı (Şekil 4.16). Aynı sıcaklıkta üremenin en iyi görüldüğü ikinci izolatın orantısı da 1.03×10^6 hücre.ml⁻¹ olmak üzere Mahurlu gölü izolatı olarak saptanmıştır. Bu değer Gavhuni bataklığı için 0.8×10^6 hücre.ml⁻¹ olurken en düşük üreme ise Qum tuzlası örneğinde ve 0.52×10^6 hücre.ml⁻¹ olarak gerçekleşmiştir.

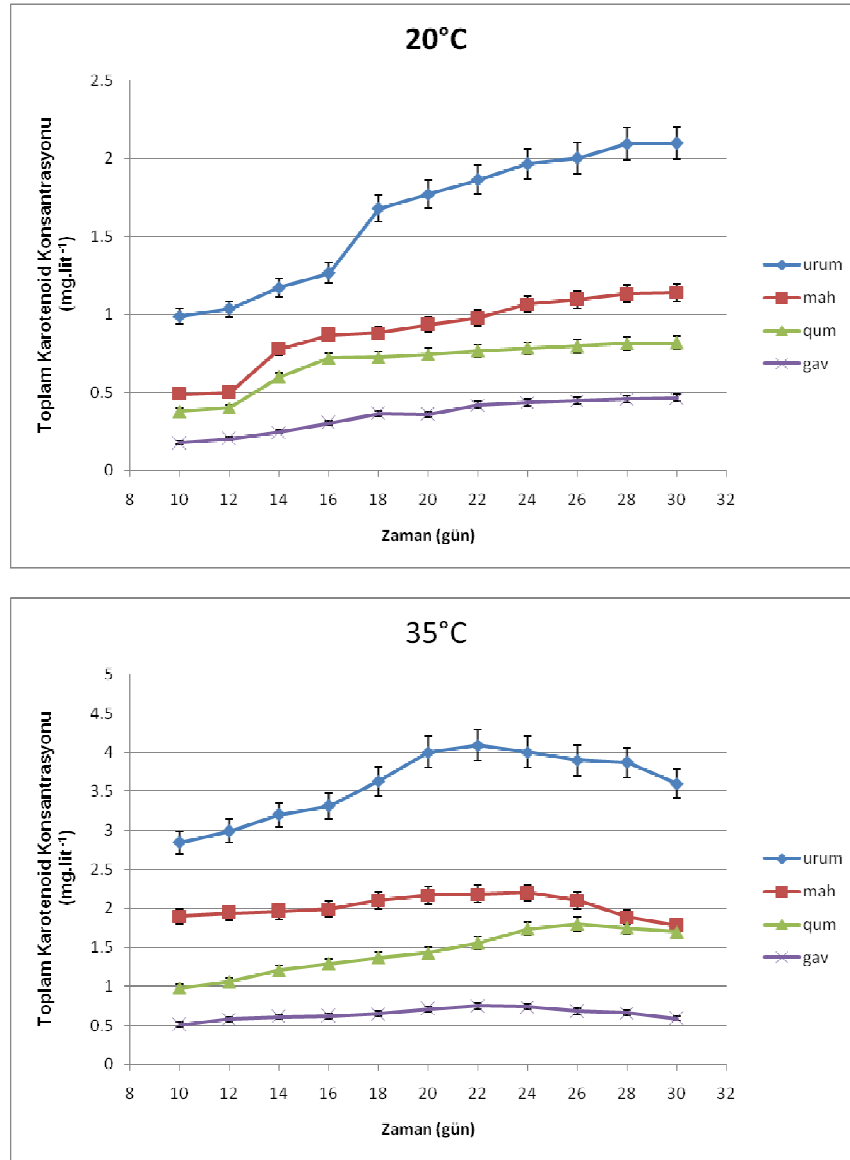
Inkübasyon sıcaklığının 35°C ortamlarda 30 gün boyunca karotenoid üretimi değerlerine bakıldığında bu değer 3.58 mg.l⁻¹ (30 günün ortalaması) olmak üzere yine Urummiye örneğinde en yüksek değerine ulaştı; en maksimum karotenoid üretim değeri de yine Urummiye örneğinde görüldü (20. günde 4mg.l⁻¹) (Şekil 4.19). Karotenoid üretiminin en iyi görüldüğü ikinci izolat 2.01 mg.l⁻¹ (30 günün ortalaması) olmak üzere Maharlou gölü izolatıdır ve maksimum karotenoid üretim değeri de 24. günde 2.18 mg.l⁻¹ ulaştı. Karotenoid üretimi Qum tuzlası izolatı için 1.44 mg.l⁻¹ olurken (30 günün ortalaması ve yüksek değeri de 26. günde de 1.8 mg.l⁻¹'ye ulaştı) en düşük üretim ise Gavhuni bataklığında 0.64 mg.l⁻¹ olarak gerçekleşmiştir (30 günün ortalaması ve yüksek değeride 22. günde 0.75 mg.l⁻¹'ye ulaştı).

Üreme ve Karotenoid üretim miktarlarının hesaplanması ardından birim hücre başına karotenoid miktarları (HBKM) da saptanmış ve Urummiye izolatında 35°C ve 30. inkübasyon gününde HBKM değerinin 4.39 p.g hücre⁻¹ olarak en yüksek miktarda olduğu gösterilmiştir. Bu değer aynı izolatın 20°C inkübasyonu için 1.38 p.g hücre⁻¹ olarak hesaplanmaktadır. Diğer tüm izolatlar 35°C inkübasyonlarında

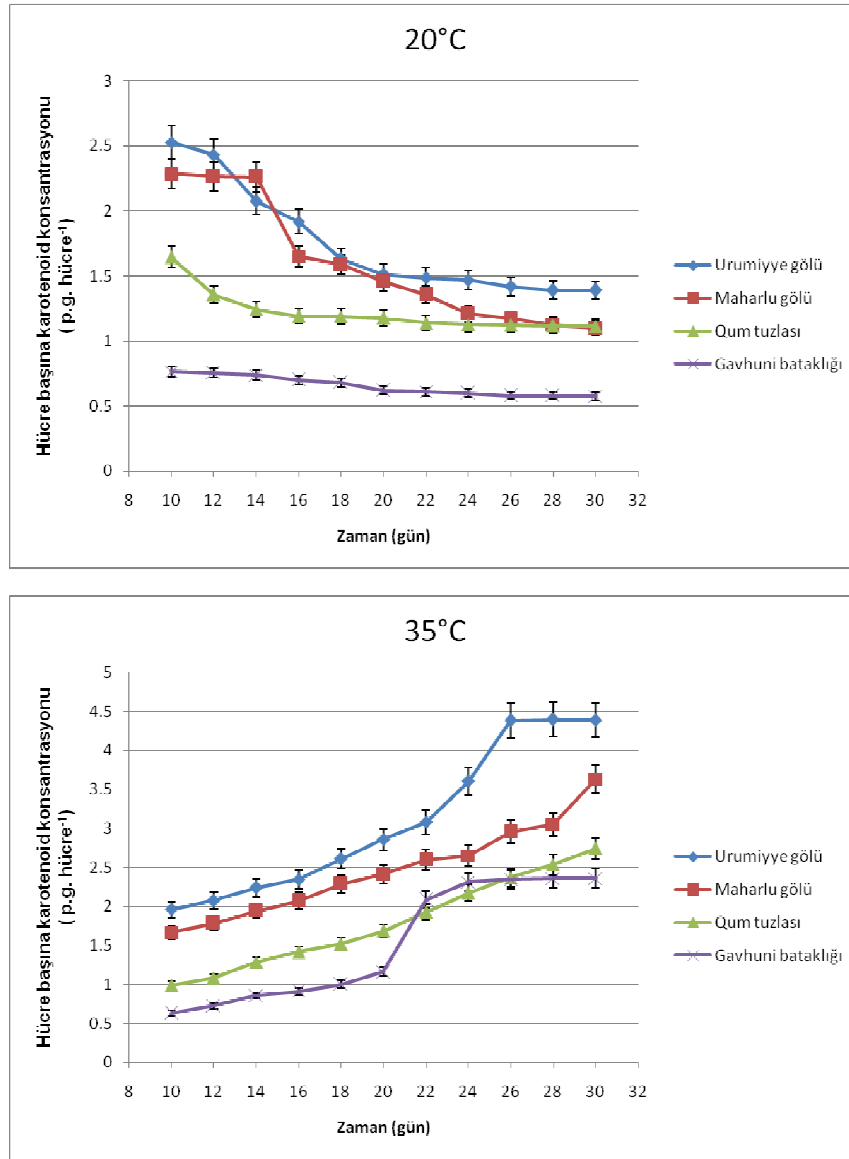
yüksek HBKM vermektedir (Gavhuni bataklığı izolatu için $2.36 \text{ p.g hücre}^{-1}$, Mahurlu gölü izolatu için $3.63 \text{ p.g hücre}^{-1}$, Qum tuzlası izolatu içinse $2.74 \text{ p.g hücre}^{-1}$ olmak üzere) (Şekil 4.20 ve Şekil 21).



Şekil 4.16 ve Şekil 4.17. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin iki farklı sıcaklıkta; 20°C ve 35°C hücre sayılarındaki etkisi, (1M NaCl, pH=7.5, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 30 gün) .



Şekil 4.18 ve 4.19. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin iki farklı sıcaklıkta; 20°C ve 35°C toplam karotenoid konsantrasyonlarına etkisi, (1M NaCl, pH=7.5, 100 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).



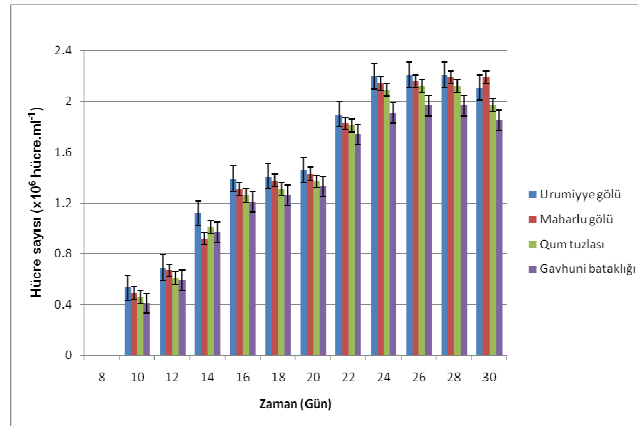
Şekil 4.20 ve 4.21. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin iki farklı sıcaklıklarda; 20°C ve 35°C hücre başına karotenoid üretimindeki etkisi, (1M NaCl, pH=7.5, 100 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).

4.2.4. Karoten üretimi için uygun tuz konsantrasyonunun saptanması sonuçları

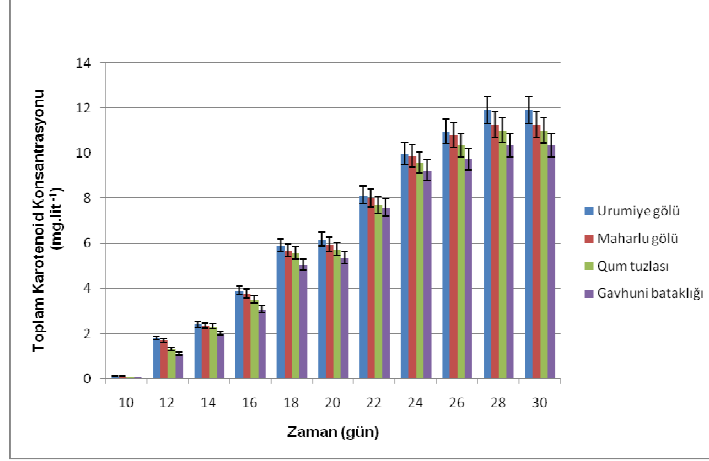
Bu çalışmada 1,2, ve 3M NaCl içerecek şekilde hazırlanan MJ besiyerlerinde üretilen alg örneklerinin üreme, karoten miktarları ve HBKM saptanmıştır. Bu üretimlerde besiyeri pH değeri 7.5 iken kullanılan ışık şiddeti 100 μmol foton $\cdot\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, üretim süresi ise 30 gün olmaktadır.

1M NaCl ilavesi ile hazırlanan ortamlardaki sonuçlar incelendiğinde; üretimin 26. gününde hücre konsantrasyonunun 2.21×10^6 hücre. ml^{-1} olmak üzere Urummiye izolatında en yüksek değerde olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.22) Aynı konsantrasyonda üremenin en iyi görüldüğü ikinci izolat 2.19×10^6 hücre. ml^{-1} olmak üzere Mahurlu gölü izolatı olarak saptanmıştır. Bu değer Qum tuzlası için 2.12×10^6 hücre. ml^{-1} olurken en düşük üreme ise Gavhuni bataklığı örneğinde de 1.97×10^6 hücre. ml^{-1} olarak gerçekleşmiştir.

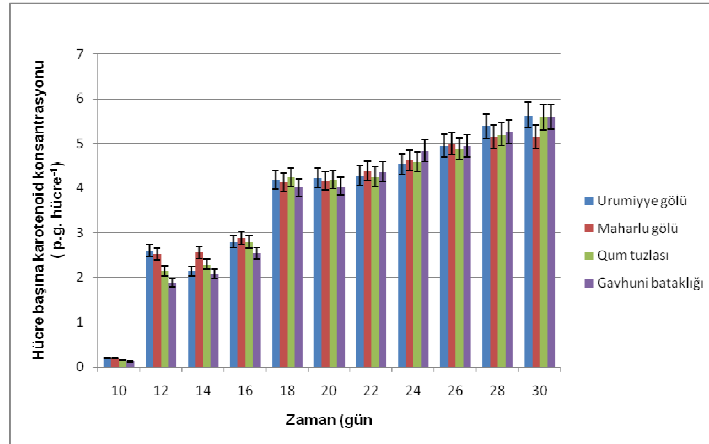
1M NaCl ilavesi ile hazırlanan ortamlarda üretimin 28. gününde karotenoid miktarı Urummiye izolatında olmak üzere en yüksek oranda saptanmıştır (11.9 mg.l^{-1} olmalı). (Şekil 4.23). Bu ortamlarda HBKM saptandığında da yine en yüksek değere üretimin 30. gününde ve Urummiye izolatında rastlandığı gözlemlenmiştir ($5.63 \text{ p.g.hücre}^{-1}$) (Şekil 4.24)



Şekil 4.22. 1 M NaCl MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerini hücre sayılarında zamana bağlı değişimler (1M NaCl, pH=7.5, 100 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).



Şekil 4.23. 1 M NaCl MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerini toplam karotenoid miktarlarındaki zamana bağlı değişimler (1M NaCl, pH=7.5, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).

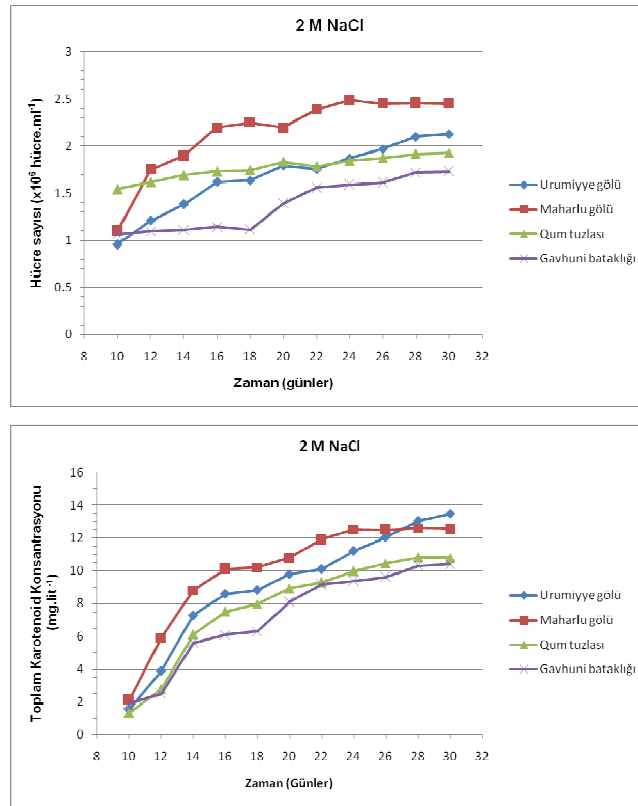


Şekil 4.24. MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimlerin karşılaştırması, (1M NaCl, pH=7.5, 25°C'de, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).

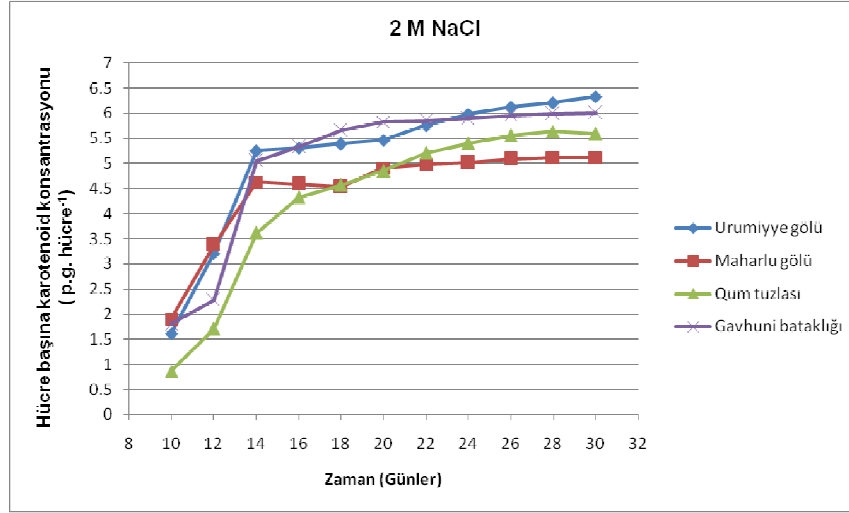
2M NaCl ilavesi ile hazırlanan ortamlardaki sonuçlar incelendiğinde; üretimin 24. gününde hücre konsantrasyonunun 2.49×10^6 hücre.ml⁻¹ olmak üzere Maharlou gölü izolatında en yüksek değerde olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.25) Aynı konsantrasyonda üremenin en iyi görüldüğü ikinci izolat 2.2×10^6 hücre.ml⁻¹ olmak üzere Urumiye izolatı olarak saptanmıştır. Bu değer Qum tuzlası için 1.9×10^6

hücre.ml⁻¹ olurken en düşük üreme ise Gavhuni bataklığı örneğinde ve 1.7x10⁶ hücre.ml⁻¹ olarak gerçekleşmiştir.

2M NaCl ilavesi ile hazırlanan ortamlarda üretimin 30. gününde karotenoid miktarı Urummiye izolatında olmak üzere en yüksek oranda saptanmıştır (13.8 mg.l⁻¹). (Şekil 4.26). Bu ortamlarda HBKM saptandığında da yine en yüksek değere üretimin 30. gününde ve Urummiye izolatında rastlandığı gözlemlenmiştir (6.42 p.g.hücre⁻¹) (Şekil 4.27)



Şekil 4.25 ve 4.26. 2 M NaCl MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerini hücre sayıları ve toplam karotenoid miktarlarındaki zamana bağlı değişimler (2 M NaCl, pH=7.5, 100 µmol foton m⁻² s⁻¹, 30 gün).

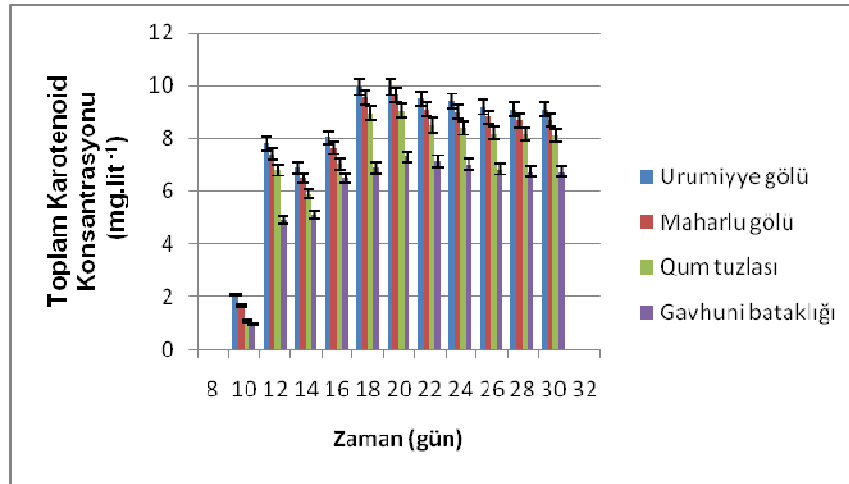
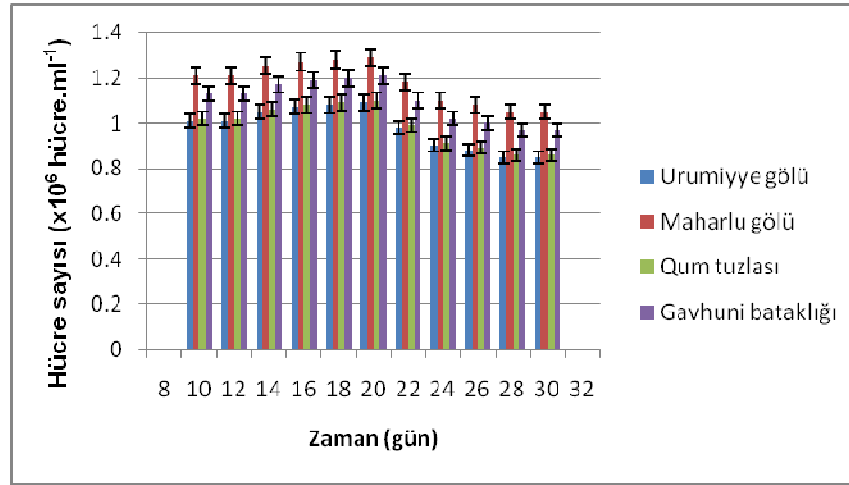


Şekil 4.27. 2 Molar MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimlerin karşılaştırması, (2 M NaCl, pH=7.5, 25°C'de, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).

Bu kıyaslamada *Dunaliella* tarafından en yüksek miktarda üretilen karotenoid 2 M NaCl içeren MJ besiyerinde hücre başına 30. günde 6.42 p.g.hücre⁻¹ Urumiye gölü izolesinde gözlemlendi. (30 gün orantısı; 5.14 p.g.hücre⁻¹)

Ortamlar 3 M NaCl ilavesi ile hazırlandığında bu kere; üremenin 24. gününde hücre konsantrasyonunun 1.29×10^6 hücre.ml⁻¹ olmak üzere Maharlou gölü izolatında en yüksek değerde olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.28). Aynı konsantrasyonda üremenin en iyi görüldüğü ikinci izolat 1.21×10^6 hücre.ml⁻¹ olmak üzere Gavhuni bataklığı izolatı olarak saptanmıştır. Bu değer Qum tuzlası için 1.1×10^6 hücre.ml⁻¹ olurken en düşük üreme ise Urumiye gölü örneğinde ve 0.98×10^6 hücre.ml⁻¹ olarak gerçekleşmiştir.

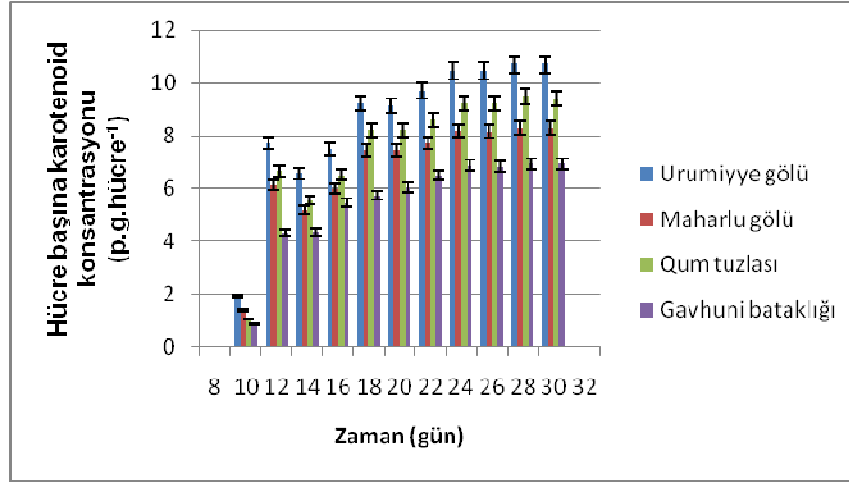
3M NaCl ilavesi ile hazırlanan ortamlarda üretimin 20. gününde karotenoid miktarı Urumiye izolatında 9.95 mg.l⁻¹ olmak üzere ikinci oranda saptanmıştır (Şekil 4.29). Bu ortamlarda HBKM saptandığında da en yüksek değere üretimin 30. gününde ve Urumiye izolatında 10.7 p.g.hücre⁻¹ olarak saptandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.30)



Şekil 4.28 ve 4.29. 3 M NaCl MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerini hücre sayıları ve toplam karotenoid miktarlarındaki zamana bağlı değişimler (3 M NaCl, pH=7.5, 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün).

3 M NaCl içeren MJ besiyerinde en yüksek toplam karotenoid miktarı da, Urumiye gölünden saptandı ve 20. günde 9.95 mg.lit^{-1} 'de ulaştı (Şekil 4.30).

Sonra tüm örneklerin Karotenoid konsantrasyon oranları, hücre sayılarına göre hesaplandı ve hücre başına pikogram olarak ifade edildi.

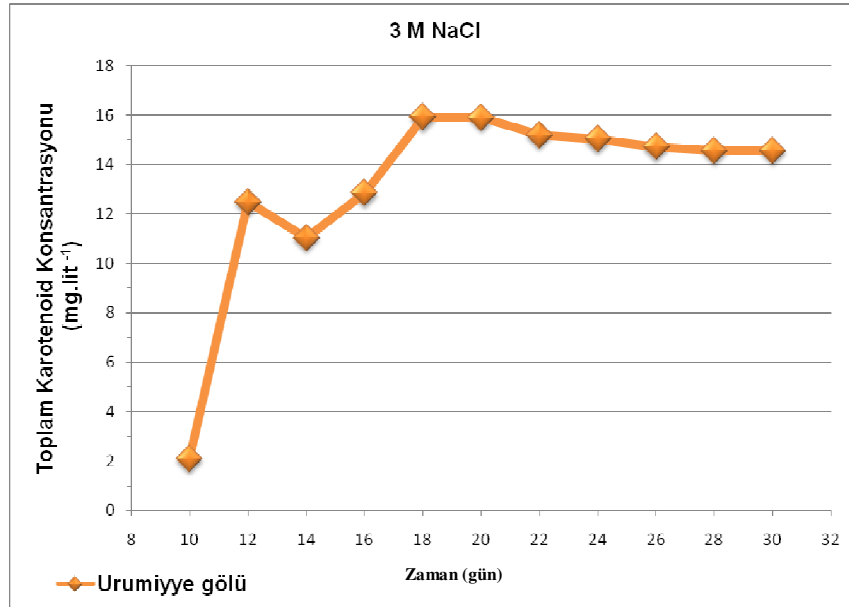
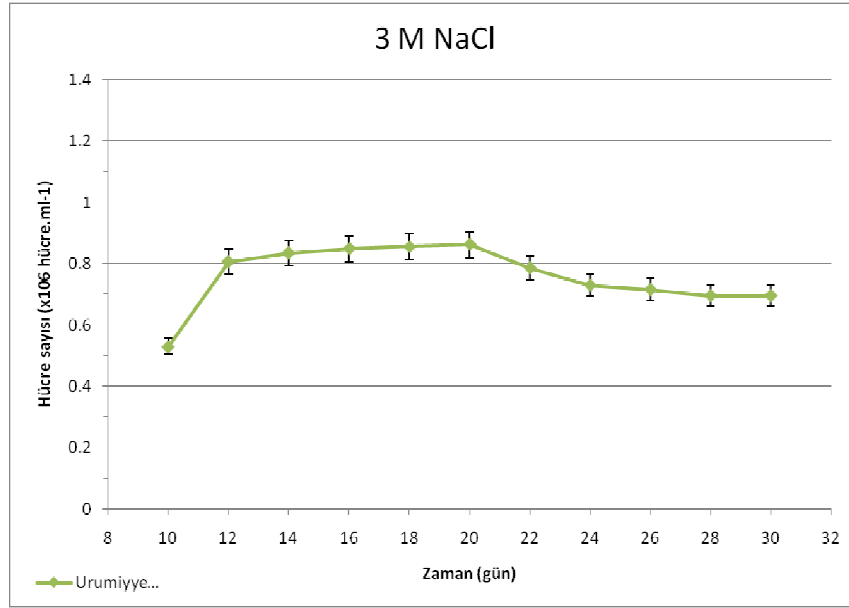


Şekil 4.30. 3 Molar MJ besiyerinde tuzla, göl ve bataklıklardan alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimlerin karşılaştırması, (3 M NaCl, pH=7.5, 25°C'de, 100 $\mu\text{mol fotonm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 30 gün).

Bu kıyaslamada *Dunaliella* tarafından en yüksek miktarda üretilen karotenoid 3 M NaCl içeren MJ besiyerinde hücre başına 30. günde 10.7 p.g.hücre⁻¹ Urumiyye gölü izolesinde gözlemlendi. (30 gün orantısı; 8.56 p.g.hücre⁻¹)

4.2.5. Işık ve tuzluluk stresi bulguları (1. Stres Fazı)

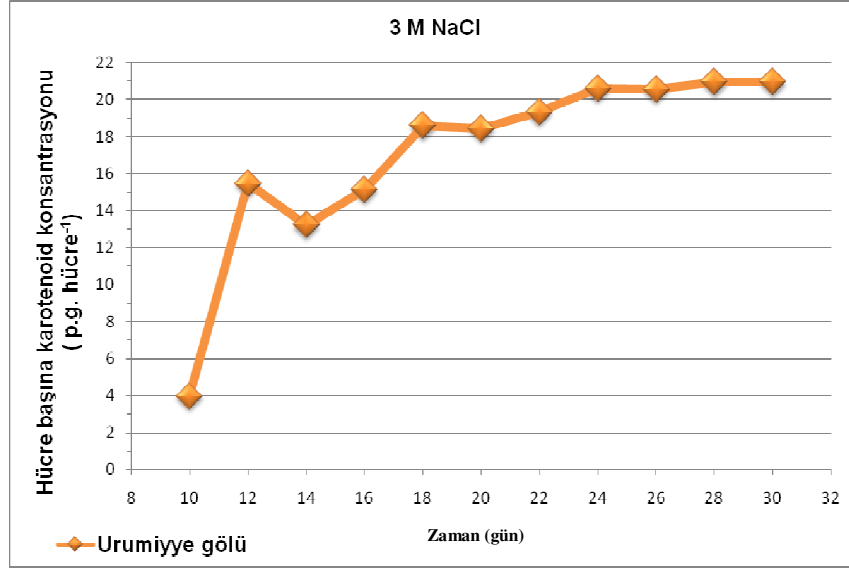
Bölüm 3.6.7.1 de söz edilen şekilde hazırlanan ve inkübe edilen izolatların üreme ve karotenoid üretimlerine ışık stresinin etkisinin araştırıldığı çalışmada en iyi β karoten üreticisi olarak bir önceki çalışmalardaki verilere göre tesbit edilen Urumiyye izolatı kullanılmıştır. pH:7, tuzluluk 3M NaCl olan ortamda 35°C de 400 $\mu\text{mol foton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık içeren ortamlarda 10-30. günler arasındaki 20. gün boyunca yapılan ölçümlere göre en iyi üremenin 0.86×10^6 hücre.ml⁻¹ olarak 20. üretim gününde saptandığı gösterilmiştir (Şekil 4.31). Benzer olarak yine 20. inkübasyon gününde karotenoid üretimi yüksektir ve bu değer 15.92 mg.l⁻¹ olmak üzere saptanmaktadır. (Şekil 4.32).



Şekil 4.31 ve 4.32 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiye gölünden alınan mikroalglerin hücre sayıları ve toplam karotenoid miktarlarındaki zamana bağlı değişimleri (3 M NaCl, pH=7, 100 ve 400 $\mu\text{mol foton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 30 gün, statik ve Çalkalı inkübatör, 35°C'de).

Sonuçlara göre; Urumiye gölünden alınmış örneklerin en yüksek hücre konsantrasyonu 20. günde, 3 M NaCl'de 0.86×10^6 hücre ml^{-1} 'de ulaştı (Şekil 4.31) ve 3 M NaCl içeren MJ besiyerinde en yüksek toplam karotenoid miktarı da, 20. günde $15.92 \text{ mg.lit}^{-1}$ 'de ulaştı (Şekil 4.32).

Birim hücre başına karotenoid miktarları (HBKM) Urummiye izolatında üretimin 30. gününde 20.94 p.g hücre⁻¹ olarak en yüksek miktarda olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.33).



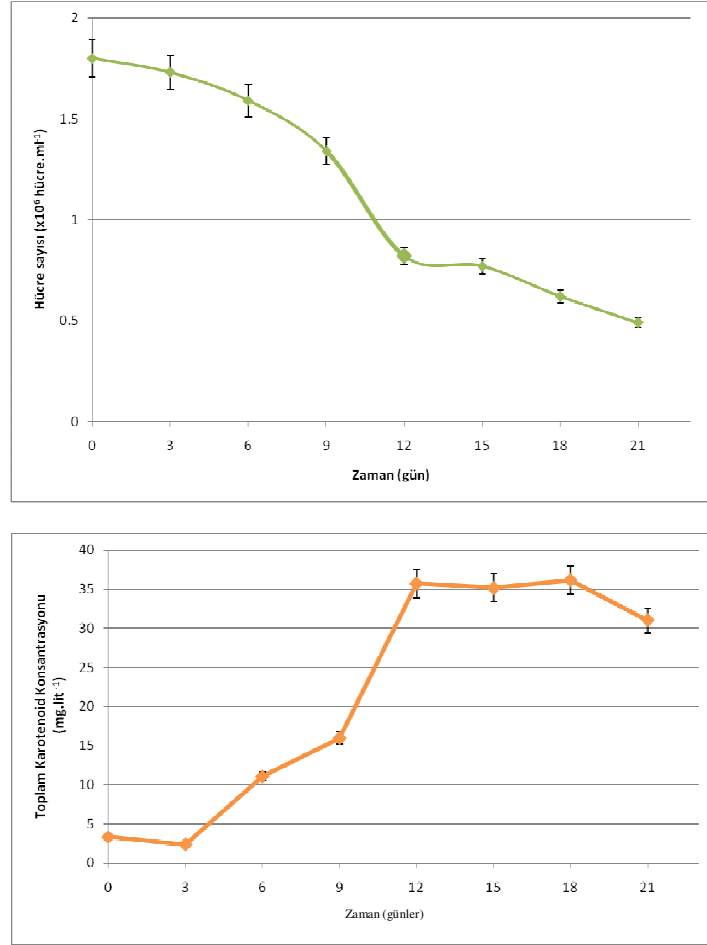
Şekil 4.33. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiye gölünden alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimleri (3 M NaCl, pH=7, 100 ve 400 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 gün, statik ve çalkalamalı inkübatörde, 35°C'de).

Sonuçlara göre *Dunaliella* sp. tarafından en yüksek miktarda üretilen karotenoid 3 M NaCl içeren MJ besiyerinde hücre başına 30. günde Urumiye gölü izolesinde 20.94 p.g.hücre⁻¹ gözlemlendi. (30 gün hücre başına karotenoid üretim ortalaması; 17.01 p.g.hücre⁻¹).

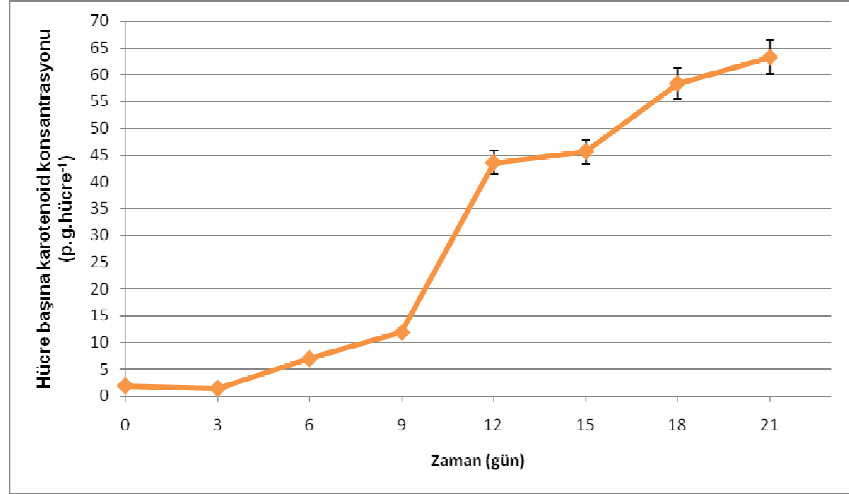
4.2.6. Nitrat ve fosfat stresi bulguları (2. Stresi fazı)

Çalışmada elde edilen verilere göre optimize edilen MJ besiyeri bu çalışma için nitrat ve fosfat kaynakları içermeyecek şekilde hazırlanmış ve ekim sonrası 150 rpm çalkalamalı koşullarda inkübasyon sağlanmıştır (3M NaCl, pH:7, 400 $\mu\text{mol foton.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık, 14/10 saat aydınlık/karanlık rejimi, 35°C, 21 gün). Bu tip bir ortamda örnekler şiddetli ışık altında 21 gün üretildi ve üçer gün aralıklarla yapılan ölçümlerle üreme ve karotenoid miktarları saptandı. En iyi karotenoid miktarının ise 18. günde 36.15 mg.l⁻¹ ye ulaştığı gösterilmiştir (Şekil 4.35). Birim hücre başına

karotenoid miktarları ise 21 günlük inkübasyonda 63.26 p.g. hücre⁻¹ olarak en yüksek miktarda olarak saptanmıştır (Şekil 4.36).



Şekil 4.34 ve 4.35. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiye gölünden alınan mikroalglerin hücre sayıları ve toplam karotenoid konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişimleri (3 M NaCl, pH=7, 400 $\mu\text{mol foton.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 21 gün, statik ve Çalkalamalı inkübatör, 35°C'de, nitrat ve fosfat eklenmeden önce).

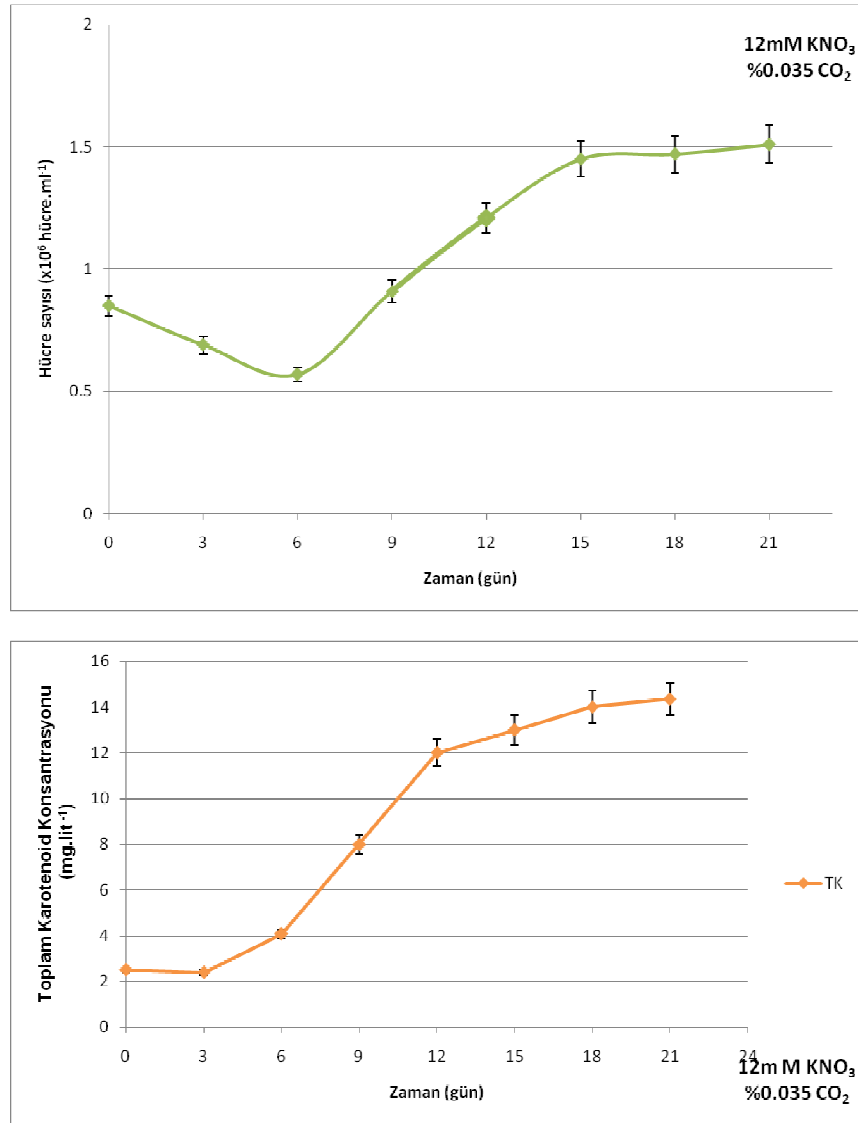


Şekil 4.36. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiye gölünden alınan mikroalglerin hücre başına karotenoid üretimindeki meydana gelen değerlerin zamana bağlı değişimleri (3 M NaCl, pH=7, 400 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 21 gün, çalkalamalı inkübatörde, 35°C'de).

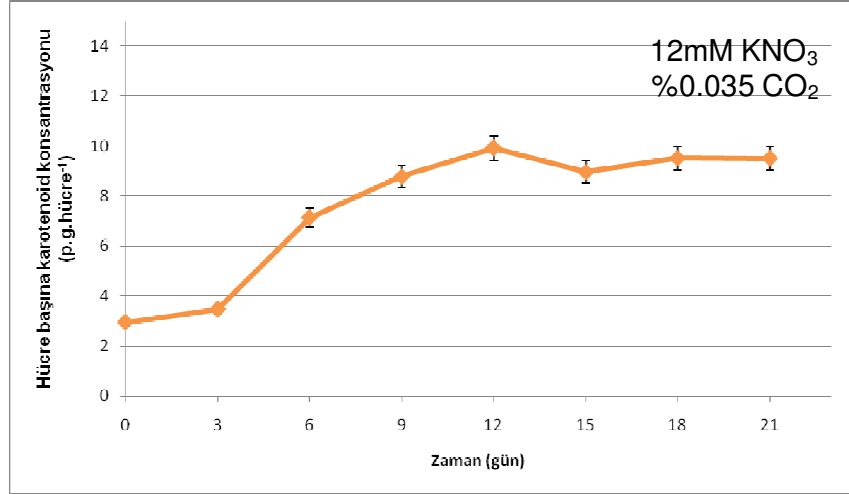
4.2.7. *Dunaliella*'da karoten sentezine etkili KNO_3 oranının saptanması bulguları

Bölüm 3.7.3 de anlatılan şekilde hazırlanan ve 12mM KNO_3 içeren ortamlarda en yüksek üremenin 1.51 hücre.ml⁻¹ değerinde olmak üzere üremenin 21. gününde gerçekleştiği saptanmıştır. En iyi karotenoid üretimi ise yine 21. günde saptanmıştır (14.35 mg.l⁻¹). 12. gün değerlerine göre yapılan hesaplamada HBKM ise 9.91 p.g. hücre⁻¹ olarak görülmektedir (Şekil 4.37-39).

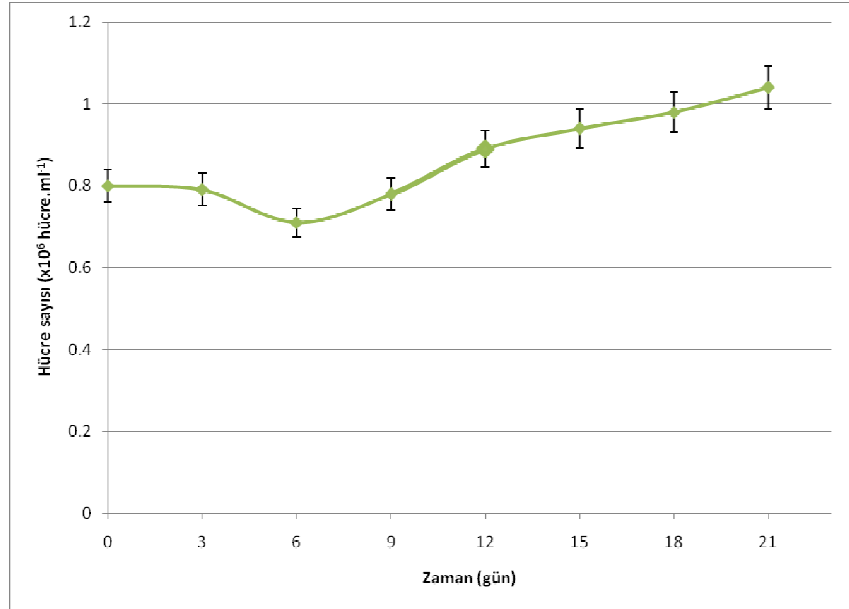
1 M KNO_3 içeren ortamlarda ise en yüksek üremenin 21. günde 1.04 hücre.ml⁻¹ değerinde olmak üzere gerçekleştiği saptanmıştır. En iyi karotenoid üretimi 18. günde ve 6.2 mg.l⁻¹ ve HBKM ise yine 18. günde olmak üzere 6.3 p.g. hücre⁻¹ olarak gösterilmiştir (Şekil 4.40-42)



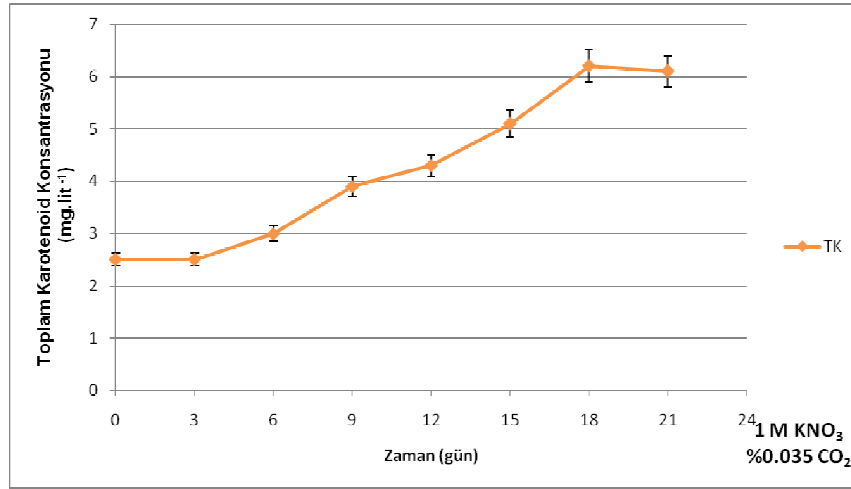
Şekil 4.37 ve 4.38. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiye gölünden alınan mikroalglerin hücre sayıları ve toplam karotenoid konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişimleri (12 mM KNO₃, 3 M NaCl, pH=7, 400 μ mol foton.m⁻²s⁻¹, 21 gün, çalkalamalı inkübatör, 35°C'de,)



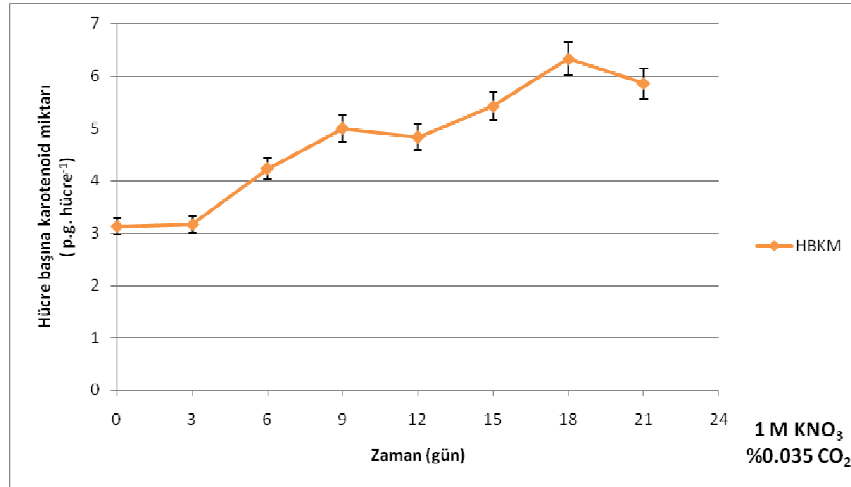
Şekil 4.39. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiyye gölünden alınan mikroalglerin hücre başına karoten miktarının zamana bağlı değişimleri (12 mM KNO₃, 3 M NaCl, pH=7, 400 μ mol foton.m⁻²s⁻¹, 21 gün, çalkalamalı inkübatör, 35°C'de,).



Şekil 4.40. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiyye gölünden alınan mikroalglerin hücre sayılarındaki zamana bağlı değişimleri (1 M KNO₃, 3 M NaCl, pH=7, 400 μ mol foton.m⁻²s⁻¹, 21 gün, çalkalamalı inkübatör, 35 °C'de,).



Şekil 4.41. 3 M NaCl MJ besiyerinde Urumiye gölünden alınan mikroalglerin toplam karotenoid konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişimleri (1 M KNO₃, 3 M NaCl, pH=7, 400 μ mol foton.m⁻²s⁻¹, 21 gün, çalkalamalı inkübatör, 35°C'de,).



Şekil 4.42. 3 M NaCl içeren MJ besiyerinde Urumiye gölünden alınan mikroalglerin hücre başına karoten miktarının zamana bağlı değişimleri (1 M KNO₃, 3 M NaCl, pH=7, 400 μ mol foton.m⁻²s⁻¹, 21 gün, çalkalamalı inkübatör, 35°C'de,).

Milko (1963)'e ve Borowitzka (1989)'e göre çeşitli çevresel faktörler karotenoid üretiminde etkisi olduğu ispatlanmı, özet olarak çizelge 4.2'de sonuçlar verilmiştir. Karotenoid üretiminde ışık çok gerekli faktörlerdendir; ama hücrede karotenoid

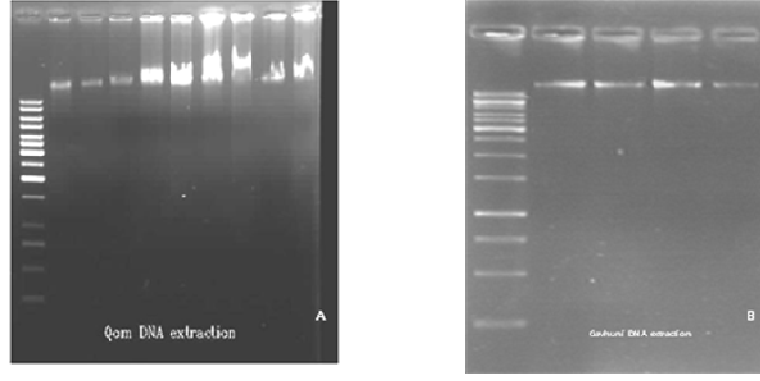
üretim artışı, tuzluluk konsantrasyonu ile paraleldir; yani ortamda tuzluluk konsantrasyonu yükseldiği zaman, karotenoid üretiminde artışı görülür (Loblich, 1982).

Çizelge 4.2. *Dunaliella salina* ortamındaki çeşitli çevresel faktörlerin karotenoid ve biyomas üretiminde etkisi (Milko, 1963. ve Borowitzka, 1989)

Faktör	Biyokütle (biyokütle)	β- Karoten
Tuzluluğun artışı	- -	++++
Tuzluluğun düşüşü	+	-
Azot'un eksikliği	- -	++++
Fosfor'un eksikliği	- -	+
İnorganik Karbon'un yükselişi	++++	-
Işığın artışı	+	++++
Işığın düşüşü	-	- - -
Isının artışı	+	++
Isının düşüşü	-	-
Oksijen'nin artışı	-	-

4.2.8. . *Dunaliella* için yeni bir DNA ekstraksiyon yöntemin önerilmesi

Bölüm 3.9'da anlatılan yeni yöneme göre yapılan DNA ekstraksiyonu sonucunda saf ve bol miktarda DNA eldesinin sağlandığı ileri sürülebilir zira protokol sonucunda elde edilen DNA miktarı 230/260 nm deki ölçümlere göre 340 ng/μl olarak saptanmış ve bunun oldukça yüksek bir değer olduğu literatür taramaları ile anlaşılmıştır (Chen and Ronald, 1999). 260/280 ölçümlerinin ise 1.8 ve 1.9 olarak 2 nin altında bulunması da DNA saflığı için bir kanıt olmaktadır. Ayrıca Olmos protokolün sunucunda elde edilen bantların önerilen protokol kadar saf sonuçlar göstermediği de gözlemlendi (Şekil 4.43) Yeni protokolün *Dunaliella* için özgün olacağı varsayıldı.



Şekil 4.43. İki yöntemden *Dunaliella* DNA ekstraksiyonu karşılaştırması; (A) Olmos, 2002 protokolü ile ekstraksiyon ve (B) bu çalışmada önerilen yöntemi ile DNA ekstraksiyonu.

5. TARTIŞMA

Zorunlu fotoototrof olan *Dunaliella* sp. üyeleri bazı stres koşullarında hücre içinde önemli miktarda β -karoten biriktirebilir ve bu nedenle ekonomik değere sahiptir. Bazı araştırmacılara göre bu mikroalgin β - karoten üretiminde, çevresel koşulların önemli bir rolü vardır ve bu faktörlerin mikroalgin üreme ortamlarında yer alması halinde β -karoten üretimi artmaktadır (Borowitzka, 1989; Milko, 1963; Çelekli ve Dönmez, 2006; Borowitzka, 2007; Ben-Amotz, 1983 ve 1996, Jiménez and Niel, 2003).

Bu çalışmada da geçmişte ve son zamanlarda yapılan araştırmalara dayanarak İran'da dört bölgeden örnekler alınmış, bu örneklerden anlatıldığı şekilde *Dunaliella* mikroalgi üretilmiş ve β - karoten üretimi için özel bir besiyeri hazırlanarak (MJ) üretim koşulları optimize edilmiştir. Bundan sonra, bazı stres koşulları uygulanan ortamlardaki β - karoten üretim kapasitesi belirlenmiştir.

Çalışmamızda Bölüm 3.3'te söz edilen mikroskobik incelemede alınan örneklerde, örnekleme bölgesine bağlı olarak mikroalgin bazı morfolojik değişiklikler gösterdiği saptanmıştır. Örneğin kıyılardan alınan örneklerdeki mikroalgler daha ziyade yuvarlak görülürken, göllerin ortasından alınan örneklerde yer alanlar ise armut şeklinde bir morfoloji göstermektedirler (Şekil 3.3). Bu olay ortamda NaCl'un yükselişine doğal yanıt olarak, Borowitzka ve Siva, 2007' nın çalışmalarında da görülmüştür ve hatta *Dunaliella*'ların morfolojik sınıflandırmasında kullanılmıştır (Şekil 2.19).

Mikroorganizmaların çeşitli stres ya da ekstrem koşullar altında bazı karakter ve morfolojik değişiklikler gösterebildikleri çok uzun yıllardır bilinmektedir. Örneğin Halofilik karakter taşımayan *Salmonella enteritidis* yüksek tuz veya karbonhidrat konsantrasyonu içeren ortamlarda flaman oluşturmaktadır (Baykal, 1976 a,b,c,d; Baykal 1977). Benzer olarak *B. subtilis* 42°C de birkaç kez pasaj edildiğinde spor oluşturabilme yeteneğini kaybederken kırmızı bir pigmenti olan *Serratia marcescens* 30°C nin üzerindeki sıcaklıklarda pigment sentezlememektedir (Aksöz, 2008). Sadece sıcaklık değişikliği değil diğer çevresel etmenlerin de oluşturdukları ekstrem koşullar nedeni ile morfolojik değişmelere yol açtıkları da bildirilmektedir. Örneğin bazı manyetik alanların *Magnetospirillum*

magnetotacticum bakterisinde morfolojik değişikliklere neden olduğu görölmüştür (Sharma, et al. 2007).

Örnek alınan bölgelerde mikroskopik sayım sırasında alg sayılarının değişkenlik gösterdiği de gözlemlenmiştir. Bu durum, Örnekleme bölgesindeki bazı koşulların varlığı ile ilişkili olarak açıklanmıştır. Örneğin bazı örnekleme bölgelerinde lağımlarının ortama deşarj olması söz konusudur ve bu tip yerlerde hücre sayılarındaki artış dilüsyon nedeniyle düşen NaCl konsantrasyonunun bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmamızda örneklerden elde edilen ve MJ besiyerinde, farklı üretim koşullarında yapılan *Dunaliella* kültürasyonları sonrasında üreme miktarı değişiklikler göstermektedir. Bölüm 4.2.1'in sonuçlarına baktığımız zaman 1 M NaCl içeren MJ besiyerindeki kültürlerde inkübasyon süresinin artışına paralel olarak mikroalg sayılarında da artış görölmektedir. Bu artış, örneklerle değişmekle birlikte (en uygun Urummiye izolatıdır) 22-30 günler arasında en yüksek değerinde (28. günde maksimum olmak üzere) ulaşmakta ve adeta sabit kalmaktadır (Şekil 4.10). Bilindiği gibi mikroorganizmaların üreme eğrileri de benzer şekilde bir plato oluşumuna ulaşp daha sonra azalmaktadır (Zwietering et al., 1990). Açıktır ki, bir mikroalg olan *Dunaliella* da benzer modele uygunluk gösterecektir. Benzer olarak Durmaz ve Gökpinar (2006), Çelekli ve Dönmez (2001) ve Evren vd. (2001) Tuz Gölünden *Dunaliella sp.* türünü izole etmişler ve *Dunaliella sp.* hücre sayısının zamana bağlı olarak 1 M NaCl içeren besiyerinde arttığını göstermişlerdir.

İnkübasyon süresine bağlı olarak mikroorganizmanın sentezlediği karoten miktarı hesaplandığında da Urummiye izolatında üremenin yüksek değerde olduğu 28. günde karoten miktarının da yüksek olduğu saptanmaktadır (11.9 mg.lit⁻¹, Şekil 4.11). Bu bulgumuza benzer olarak Gomez et al., 2003 yılında yaptıkları çalışmada üreme ile doğru orantılı olarak β - karoten üretiminin de arttığını göstermişlerdir.

Urummiye izolatının üremenin 30. gününde en yüksek HBKM gösterdiği de şekil 4.12.nin incelenmesi ile görölmektedir (5.6 pg.hücre⁻¹). Benzer çalışmada da

hücre başına β - karoten miktarının üretim süresi ile arttığı gösterilmiştir (Gomez et al., 2003).

Üreme ortamının başlangıç pH değerlerinin üreme, karoten sentezi ve HBKM üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışma sonucunda yine Urummiye izolatının, pH değeri 9.0 (H_s ve T_k) ve 7.0 (HBKM) olarak ayarlanan MJ besiyerinde yüksek miktarda üreme (4.89×10^6 ve karoten sentezi; 17.6 mg.lit^{-1} , HBKM= $6.35 \text{ pg.hücre}^{-1}$) gösterdiği saptanmaktadır (Şekil 4.13-4.15). *Dunaliella*'nın üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde türe ve araştırılmakta olan özelliğe bağlı olarak optimal üremenin pH 1.0- 9.0 arasında değiştiği görülmektedir. (Gimmler, H et. al., 2006; F. Javier et. al. 2004). Bu nedenle araştırmamızda elde edilen sonuç literatür bilgilerine uygunluk göstermektedir. Benzer olarak diğer izolatlarımız da pH 9.0 da iyi üreme ve yüksek karoten miktarı değerleri vermektedirler (Şekil 4.14 ve 4.15). Ancak bu pH değeri çalışmamızda kullanılmamıştır. Bunun nedeni ise yüksek HBKM değerinin pH 7.0 olarak hazırlanan ortamlarda elde edilmesi ve Urummiye izolatı için bu değer $6.35 \text{ p.g.hücre}^{-1}$ olmasıdır. Oysa pH 9.0 olarak ayarlanan ortamda aynı izolat için HBKM ancak $3.59 \text{ p.g.hücre}^{-1}$ olmaktadır (Şekil.4.15). Daha önce de söz edildiği gibi *Dunaliella* türlerinin üretildiği ortamların optimal pH değerleri türe ve elde edilecek ürüne göre değişmektedir. Örneğin Borowitzka and Borowitzka 1988'e göre Wegmann and Metzner (1971)'in yaptığı araştırmada karotenoid üretimi ve üremenin yüksek olduğu pH değerinde genel olarak fotosentez düşüktür. Ayrıca, *D. tertiolecta*'nın optimum olarak çoğalması için gerekli olan pH'ın 6.0, fotosentez için ise gerekli olan pH'ın ise 5.0 olduğu görülmüştür (Borowitzka and Borowitzka, 1988).

Mikroorganizmaların iyi üreme gösterdikleri sıcaklık dereceleri çok farklılıklar gösterir. Örneğin psikrofilik bir mikroorganizma 0-15 dereceler arasında gelişebilirken mezofiller 20-40 dereceler arasında termofiller ise 45-55 derece aralığında iyi gelişirler. (www.goktepe.net/mikrobiyoloji.html). *Dunaliella sp.* üremesine inkübasyon sıcaklığının etkisinin araştırıldığı çalışmada karoten üretimi için öngörülen iki farklı inkübasyon sıcaklığındaki gelişme değerleri kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlara baktığımız inkübasyon sıcaklığının hücre sayısına olan etkisinin her *Dunaliella sp.* için farklılık gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17), ancak Urummiye izolatı 4 farklı bölgeden alınan örneklerden izole edilen

türler arasında 20°C de olmak üzere en yüksek değerde üremektedir (1.51×10^6 hücre.ml⁻¹). Bu durum bu mikroorganizmanın mezofilik sınırdaki olduğuna işaret kabul edilebilir. Doğal bir ortamdan izole edilen bir mikroorganizma için bu sıcaklık değerinde optimal olarak üreme beklenen bir sonuç olmaktadır. *D. viridis* için optimum sıcaklıkların 14°C - 30°C olduğu ve hayatta kalabilmesi için en üst limitin ise 35 °C olduğu tespit edilmiştir (Borowitzka and Borowitzka 1988'a göre Gibor 1956, Borowitzka 1981). *Dunaliella* türleri geniş sıcaklık aralıklarına toleranslıdır. Halofilik bir tür olan *D. salina*'nın -35 °C'den (Borowitzka and Borowitzka 1988'a göre Teodoresko 1906, Massyuk 1966) yaklaşık olarak 40 °C'ye kadar (Borowitzka and Borowitzka 1988'a göre Wegman, Ben-Amotz ve Avron, 1980) canlı kalabildiği rapor edilmiştir. 40 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda ise tuzluluğa toleranslı olan *Dunaliella* türleri ve deniz türü olan *D. tertiolecta* yapılarındaki gliserolü dışarıya sızdırarak kaybetmeye başlarlar. (Borowitzka and Borowitzka 1988'a göre Wegmann et al. 1980).

Karoten üretimi ile inkübasyon sıcaklığı arasındaki ilişkiye bakıldığında ise Urummiye izolatında beklenen aksine 35°C de inkübe edilen ortamlarda yüksek verim alındığı saptanmaktadır (Şekil 4.18 ve 4.19). Bunun bir nedeni de 35°C nin optimalden uzak olması nedeniyle bir nevi stres yaratması olarak düşünülebilir. Zira *Dunaliella* da stres şartları karoten üretimini olumlu etkilemektedir (Sosik and Mitchell, 1994). Stres koşulları altında üremenin azaldığı ancak karoten üretiminin arttığı Borowitzka et al. (Borowitzka and Kessly, 1990) tarafından bildirilmektedir. Inkübasyon sıcaklığı ile ilgili olan HBKM değerlerine baktığımız zaman, 35°C'deki değerlerin zamana bağlı olarak artış gösterdiği saptanmaktadır. (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). 35°C'de üreme düşük karoten sentezi ise stres nedeniyle yüksek olduğundan beklenildiği gibi bu sıcaklıktaki inkübasyon sonucunda yüksek değerde HBKM elde edilmektedir (Şekil 4.20-21).

Bölüm 4.2.4 de görüldüğü gibi NaCl konsantrasyonunun artışı üreme üzerinde kısıtlayıcı sonuç verirken karoten üretimi ise HBKM bazında artırmaktadır (Şekil 4.24-4.27 ve 4.30). Bu sonuçlar da yine stres şartlarının karoten üretimine etkili olduğu savını desteklemektedir (Shaish et al., 1991). Tuz konsantrasyonu ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda *D. bardawil* için en uygun tuz derişiminin 1.71M NaCl olduğu belirtilmektedir (Shaish et al., 1991) . *Dunaliella* spp.'de tuz

konsantrasyonunun karoten üretimi ile olan ilişkisi yapılan bir çalışmada yüksek tuz konsantrasyonunun karotenoid üretimini düşük konsantrasyonlu ortama kıyasla 4-5 günden sonra 10 mg'dan 260 mg'a artmıştır (Borowitzka and Kessly, 1990).

Çalışma kapsamında izole edilen *Dunaliella* türlerinin üretim ortamlarında yüksek tuz konsantrasyonu yanı sıra şiddetli ışığın ve nitrat ve fosfat kısıtlanmasın da ilave birer stres faktörü olarak kullanılması sonucunda karoten üretiminin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil. 4.33 ve Şekil 4.36) Bölüm 3.7'de karotenoid üretimi için optimize edilmiş tüm faktörler ile hazırlanan 3 M NaCl içeren MJ besiyerinde kültürler şiddetli ışığa ($400 \mu\text{mol foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) maruz bırakıldıktan sonra yapılan incelemelerde karoten miktarının arttığı tespit edilmiştir. (Şekil. 4.33 ve Şekil 4.36). Loeblich 1983' göre *Dunaliella* tarafında yüksek miktarda karotenoid üretiminde yüksek NaCl molaritesi yanı sıra şiddetli ışığın uygulanması da gerekmektedir, başka deyişle NaCl molaritesi yükselirken (en uygun 3 M NaCl) karotenoid üretiminde de artış görülmektedir (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33). Işık şiddetindeki yükselişin oluşturacağı zarardan korunmak amacıyla mikroalg karoten üretimini artırmakta bir başka ifade ile stres nedeniyle üründe artış olmaktadır. Nitrat ve fosfat kısıtlanması ile hazırlanan ortamlarda da karoten üretimi artmaktadır (Şekil 4.36). Milko (1963), Borowitzka (1989) ve Marin and et al. (1998)'yaptıkları çalışmalar sonucunda nitrojen ve potasyum kısıtlaması sonucunda *Dunaliella*'daki karotenoid bileşiklerinde artış olduğunu belirtmektedirler. Bu nedenle çalışmamızın bu kısmında alınan sonuçlar da literatür bilgileri ile uyum göstermektedir.

Yapılan çalışmalara göre *Dunaliella* spp. için en iyi azot kaynağı KNO_3 ya da NaNO_3 'dır (Kaçka, 2003, Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'e göre Milko, 1962; Grant,1968), Bu bilgiden hareketle Bölüm 3.8.3. de anlatıldığı gibi ortamda yer alacak KNO_3 konsantrasyonları 12 mM ve 1 M olarak değiştirilmiş ve düşük konsantrasyonda KNO_3 içeren ortamlarda karoten üretiminin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.39).

Çalışmamızın bir bölümünde ayrıca *Dunaliella* için yapılabilecek moleküler biyolojik çalışmalar için gerekecek DNA ekstraksiyonu için bir yöntem de önerilmiş

ve bu protokolün bu güne kadar kullanılan OLMOS protokolüne üstün geldiği gösterilmiştir (Şekil 4.43) (Olmos et al., 2002)

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mikroskobik algler akuatik ekosistemde biyolojik ve ekolojik rollerinin yanı sıra gerek insan sağlığı gerekse akuakültürde yetiştiriciliği yapılan canlıların beslenmesi açısından önemli maddeler içerir. Kontrollü koşullar altında alglerin yoğun üretimi yapılarak, içerdikleri pigmetler, proteinler, vitaminler ve minerallerden ötürü karasal ve sucul canlıların beslenmesinde toz yem ve canlı yem üretiminde, suların arıtılmasında, kozmetik sanayide, tıbbi ve gıda endüstrisinde ve gübre kaynağı olarak faydalanılır (Durmaz ve Gökpınar, 2006). Günümüzde doğal β - karoten'in kilo başına fiyatı 300-3000 \$ olmasına rağmen halen doğal β - karoten üretiminde yatırım yapılmamaktadır (Ben-Amotz, 2004). İç su kaynaklarında mevcut canlı kaynaklarının değerlendirilmesi ve ekonomiye kazandırılması ancak karoten üretimi üzerinde yapılacak araştırmalarla mümkündür. Mikroalgler hücre içinde biriktirdikleri metabolitler bakımından önemli canlı gruplarındandır. Bu bakımdan sucul ortamlarda dağılım gösteren mikroalglerin tanımı, izolasyonu ve yığın (mass) üretimleri yapılması canlı kaynaklarının değerlendirilmesi açısından son derece önemlidir.

Türkiye (Tuz Gölü; Konya'da) ve İran gibi ülkelerde çok sayıda tuzlu göller ve bataklıklar yer almaktadır. Bu nedenle doğal β - karoten üretimi kolay, ucuz maliyetli ve kazançlı bir yatırım olabilir. Bu çalışma ile de elde edilen verilerin karoten üretimi ile ilgili yapılacak biyoteknolojik süreçlerin optimizasyonuna yardımcı olabileceği ileri sürülmektedir. Çalışmamızda elde edilen veriler özetlendiğinde; nitrat ve fosfat kaynağı kısıtlı, pH değeri 7.0 olarak ayarlanan ve 3 M NaCl içeren MJ ortamında, 35°C inkübasyon sıcaklığında, şiddetli ışık altında ($400 \mu\text{mol foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) 21 gün inkübe edilen kültürlerde optimal koşulların sağlanmadığı kültürlerle kıyasla HBKM cinsinden olmak üzere yüksek oranda ürün eldesinin ($5.6 \text{ p.g.hücre}^{-1}$ ya 11.9 mg.l^{-1} 'de yerine $63.26 \text{ p.g.hücre}^{-1}$ ya 36.15 mg.l^{-1}) mümkün olduğu gözlenmektedir.

Bundan ayrı olarak çalışma kapsamında yapılan DNA ekstraksiyon modifikasyonunun da ileri moleküler biyolojik araştırmalar için bir avantaj sağlayabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acien Fernandez, F. G., Garcia Camacho, F., Sanchez Perez, J. A., Fernandez Sevilla, J. M., & Molina Grima, 1998. Modelling of biyokütle productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: Effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 58; 605–616.
- Akbaba, G., Korkmaz, E., Selçuk, G.,  ayırzan, F., ve Ayrım, A., 2003, *Biyoteknolojide Mikroalgler*, A  Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Bilim ve Teknik Dergisi, TUB TAK, 429: 28-30 ss.
- Aksan, E., 2005,  e itli Mayalardan Karotenoidlerin Elde Edilmesi ve Sucukta Renklendirici Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova  niversitesi fen Bilimler Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 15 s.
- Aksöz, N: Mikrobiyoloji Ders notları. 2008
- Altun, T., Usta, F.,  elik, F., Danaba , D., 2006, Su  r nlerinin İnsan Sa lı ına Yararları,  . . Su  r nleri Fakültesi, Balcalı- ADANA, 12 s.
- Astorg, P., 1997. Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. *Trends Food Science & Techonology* 8, 406–413.
- Avron, M., Edelstein, S., Ben-Amotz, A., 1987, Feed supplement. UK Patent Application Number 2189675A.
- Ba datlıo lu, N.; Demirbüker, B., 1999. Gıda işlemede Karotenoidlerde Meydana Gelen Gelişmeler. *Gıda*, 9: 48-51.
- Baykal, M., 1976a, Sodyum klorür etkisi ile *Salmonella enteritidis*'de filaman oluşumun sağlanması. *Mikrobiyoloji bülteni*. 10: 169- 178.
- Baykal, M., 1976b, De i ik tuzların ve bazı karbonhidratların etkisi ile *Salmonella enteritidis*'de filaman oluşumun sağlanması *Mikrobiyoloji bülteni*. 10: 293- 302.
- Baykal, M., 1976c, Sodyum klorür etkisi ile değişik bakterilerde filaman oluşumunun sağlanması III. *Mikrobiyoloji bülteni*. 10: 449- 457.
- Baykal, M., 1976d, Normal S. Enteritidis ve bundan tuz etkisiyle oluşan filamanların değişik yönlerden karşılaştırması IV. *Mikrobiyoloji bülteni*. 10: 459- 471.
- Baykal, M., 1977, Normal S. enteritidis ve bundan tuz etkisiyle olu an filamanların de i ik y nlerden kar ıla tırması. *Mikrobiyoloji b lteni*. 10: 211- 221.
- Baynes, S. M., Emerson, L., Scott, A. P., 1979. Production of algae for use in the rearing of larval fish. *Fisheries Research Technical Report* 53; 13–18.

- Becker, E. W. 1994. Application of algae. In Baddiley, Sir J., Carey, N. H., Higgins, I. J. Potter, W. G. *Cambridge Studies in Biotechnology, Vol. 10, Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, New York , pp. 250–75.
- Belay, A., 1997. Mass culture of *Spirulina* outdoors. The Earthrise Farms experience. In: Vonshak, A. (eds.), *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor and Francis, London; 131–158.
- Ben-Amotz A 1996, Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga, *Dunaliella* bardawil Chlorophyta,. J Phycol 32:272–275.
- Ben-Amotz A., 1995, New mode of *Dunaliella* biotechnology: twophase growth for β -carotene production. J. appl. Phycol. 7: 65–68
- Ben-Amotz A., Avron M 1983, On the factors which determine the massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella* bardawil. Plant Physiol 72:593–597.
- Ben-Amotz A., Avron M, 1990, The biotechnology of cultivating the halotolerant algae *Dunaliella* for industrial products. Trends Biotechnol 8:121–126.
- Ben-Amotz A., Fishler R, 1998, Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis- β -carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel. Food Chem 62:515–520.
- Ben-Amotz A., Gressel J, Avron M, 1987, Massive Accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella* bardawil Chlorophyceae, prevents recovery from photoinhibition. J Phycol 23:176–181.
- Ben-Amotz A., Katz A, Avron M, 1982, Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene rich globules from *Dunaliella* bardawil Chlorophyceae,. J Phycol 18:529–537.
- Ben-Amotz A., Shaish A, Avron M, 1989, Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella* bardawil in protecting the alga against damage by excess irradiation. Plant Physiol 91:1040–1043.
- Ben-Amotz, A, 1999,, “*Dunaliella* β -carotene: From science to commerce” in: Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments, J. Seckbach, ed., Kluwer, Dordrecht 1999,, p. 399.
- Ben-Amotz, A., Avron, M. 1982 "The potential use of *Dunaliella* for the production of glycerol, β -carotene and high-protein feed". In: San Pietro A (ed) "Biosaline research: A look to the future". Plenum, New York. PP.207-214.

- Ben-Amotz, A., M. Avron, 1981. Glycerol and β -carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunaliella*: a model system for biosolar energy conversion. Trends Biochem. Sci.6: 297–9.
- Berg, H. V. D., Faulks, R., Granado, H. F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., Stahl, B., 2000. The Potential For The Improvement Of Carotenoid Levels In Foods and the Likely Systemic Effects. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 880-912.
- Berset, C., 1990, The research situation with regard to natural food colourants. Ind Aliment Agric 107:1163–1166
- Bertram, JS., Bortkiewicz, H., 1995, Dietary carotenoids in habit neoplastic transformation and modulate gene expression in mouse and tumor cells. Am J Clin Nutr 62:13275 –13365
- Borowitzka A. Michael and Borowitzka J. Lesley, 1988, Micro-Algal Biotechnology, Cambridge University Press. pp. 27 - 58
- Borowitzka LJ, Borowitzka MA, Moulton TP, 1984, The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: From laboratory to pilot plant. Hydrobiologia 116/117: 115-121
- Borowitzka LJ., 1981, The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes. Hydrobiologia.;81:33–46.
- Borowitzka M.A. 1992, Comparing carotenogenesis in *Dunaliella* and *Haematococcus*: implications for commercial production strategies. In: Villa T.G. and Abalde J. eds., Profiles on Biotechnology. Servicio de publicaciones. Universidad Santiago de Compostela, pp. 301–310.
- Borowitzka M.A. 1999, Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. J. Biotechnol. 70: 313–321. Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. and Kessly D. 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. J. appl. Phycol. 2: 111–119.
- Borowitzka MA, Siva CJ 2007, The taxonomy of the genus *Dunaliella* Chlorophyta, *Dunaliellales*, with emphasis on the marine and halophilic species. J Appl Phycol 19:567–590.
- Borowitzka MA., 1986, Micro-algae as sources of fine chemicals. Microbiol Sci.;3:372–375.
- Borowitzka, L.J., Borowitzka, M.A. and Moulton, T. 1984 "*Mass culture of Dunaliella: from laboratory to pilot plant*". Hydrobiologia. 116/117:115-121.
- Borowitzka, M. A., L. J. Borowitzka, 1988, *Dunaliella* In Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 27–58.

- Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. and Kessly D., 1990, "Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*". J Appl Phycol. 2:111-119.
- Borowitzka L.J. 1992, Commercial *Dunaliella* production: history of development. In: Villa T.G. and Abalde J. eds., Profiles on Biotechnology. Servicio de publicaciones. Universidad Santiago de Compostela, pp. 233–245.
- Britton, G., Liaaen-jensen, H, Pfander, H., 2008, Carotenoids HandBook, 2p.
- Britton, G., 1992. Carotenoids Natural Food Colorants, Edited by G .A.F. Hendry and J.D.Houghton, Published in USA, by avl. An Imprint of Van Nostrand Reinhold New-York
- Burlew, J.S., 1953, Algae culture, Carnegie Institution of Washington, Washington, DC.
- Butcher, R. W., 1959. An introductory account of the smaller algae of the British coastal waters. I. Introduction and Chlorophyceae. Fishery Investigation Series no. 4, 1-74. London: HMSO.
- Carlos Jiménez and F. X. Niell, 2003, Influence of high salinity and nitrogen limitation on package effect and C/N ratio in *Dunaliella viridis* Volume 492, Numbers 1-3
- Çelekli, A. and Dönmez, G. , 2006,, Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp., World Journal of Microbiology & Biotechnology 222,:183-189
- Çelekli, A., Dönmez, G., 2001, Bir *Dunaliella* türünün gelişimine ve beta karoten üretimine pH ve tuz konsantrasyonlarının etkisi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 1. Alg Teknoloji Sempozyumu p, 79-86.
- Chen, D. H., and Ronald, P. C., 1999, A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. Plant Mol Biol Reprtr 17: 53-57.
- Chidambara, K.N., Vanitha, A., Rajesha, J., Mahadeva Swamy, M., Sowmya, P.R., Ravishankar A., 2005, In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* — a green microalga, Life Sciences 76: 1381–1390.
- Chriemadha, T., Borowitzka, M.A., 1994, Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acids production of *Phaeodactylum tricornutum* grown in a tubular photobioreactor, J. Appl. Phycol. 6, 67-74.
- Cohen, E., Arad, S., 1989. A closed system for outdoor cultivation of *Porphyridium*. Biomass 18; 59–67.

- Craft, N. E., Wise, S. A. & Soares, J. H. (1993) Individual carotenoid content of SRM 1548 total diet and influence of storage temperature, lyophilization, and irradiation on dietary carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* 41: 208-213.
- De Pauw, N. and Persoone, G. 1988. Micro-algae for aquaculture. In: Micro-Algal Biotechnology. Borowitzka, M.A. and Borowitzska, L.J. (Editörler). Cambridge University Press, 197-221, Cambridge.
- Deming, D. M. & Erdman, J. W., Jr., 1999, Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure Appl. Chem.* 71: 2213–2223.
- Dietmar, E. B., & Bamedi, A. 2001. Carotenoid esters in vegetables and fruits: a screening with emphasis on b-cryptoxanthin esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2064e2067.
- Diplock AT. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Clin Nutr* 1991;53:189e93.
- Dönmez, G. Çetinkaya, Aksu, Z., Öztürk, A., Kutsal, T., 1999. A Comparative Study on Heavy Metal Biosorption Characteristics of Some Algae. *Process Biochemistry.*, 34: 885- 892.
- Dufossé, L., & de Echanove, C. 2005. The last step in the biosynthesis of aryl carotenoids in the cheese ripening bacteria *Brevibacterium linens* ATCC 9175 (*Brevibacterium aurantiacum* sp. nov.) involves a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Food Research International*, 38, 967–973.
- Dufosse, L., Galaup P, Yaron A, Arad MS, Blanc P, Chidambara Murthy KN, Ravishankar GA., 2005, Microorganisms and algae as source of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?, *Trends in Food Science and Technology*, 16 (389), 406.
- Durmaz, Y., Gökpınar Ş., 2006, *Dunaliella salina* Dunal, Teodoresco Chlorophyceae, Büyümesi Üzerine Tuz Derişimlerinin Etkileri, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, Cilt 23, Sayı 1-2,: 121–124 ss.
- Durmaz, Y., Işık, O., Bandarar, N., Cirik, S., Turan, G., Gökpınar, Ş., 2002, *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) Yağ Asitleri Kompozisyonuna Kurutma Yöntemlerinin Etkisi, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, Cilt 19, Sayı (1-2): 189 – 195 ss.
- Duthie, G. G., Arthur, J. R., James, W. P. T. & Vint. H. M., 1989, Antioxidant status of smokers and nonsmokers: effects of vitamin E supplementation. *Annals of the New York Academy of Sciences*
- Dyerberg, J., 1986. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutr. Rev.* ; 44:125-34.

- Escamilla, S.E.M., Dendooven, L., Magana, I.P., Parra, S.R., Torre, M.D., 2000. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactor. J. Biotechnol. 76, 147–155.
- Ettl, H., 1983. Chlorophyta I. Phytomonadina. In: Ettl, H., Gerloff, J., Mollenhauer, D. (Eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa Bd. 9. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. xiv-807.
- Evren, D., Çıracı, C., Dönmez, G., 2001,. Tuz Göl,'nden Konya-Türkiye, izole edilen *Dunaliella* türlerinin gliserol üretim kapasitesinin belirlenmesi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 1. Alg Teknoloji Sempozyumu p, 225-232
- Fazeli, M.R., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar H., 2006, Effects of salinity on b-carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. Bioresource Technology 97: 2453–2456.
- Fox, J.M. 1983. Intensive Algal Culture Techniques. In: CRC Handbook of Mariculture. Vol. I. Crustacean Aquaculture, Vey, J.P. and Moore, J.R., (Editörler) CRC Press, Florida.
- Fulks, W., Main, K. L., 1991. The design and operation of commercial-scale live feeds production systems. In: Fulks, W., Main, K. L. (eds.), Rotifer and Microalgae Culture Systems. The Oceanic Institute, Honolulu, H. I.; 3-52.
- Gabel B, Tsoglin L., 2000. The semi-industrial photobioreactor. Abstracts of the 4th European workshop on biotechnology of microalgae. Bergholz-Rehbrücke, Germany
- Gadd, G. M., 1988. Accumulation of Metals by Microorganisms and Algae. In "Biotechnology" 60: 401- 434.
- García-González M., Morena J., 2005, Production of *Dunaliella* salina biyokütle rich in 9-cis- β -carotene carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology 115: 81–90.
- Garcia. F., Freile-Pelegri'n. Y., Robledo D. 2007, Physiological characterization of *Dunaliella* sp. Chlorophyta, Volvocales, from Yucatan, Mexico, Bioresource Technology 98: 1359–1365.
- Gimmler, H., Schieder, M., Kowalski, M., Zimmermann, U., Pick, U., 2006, *Dunaliella acidophila*: an algae with a positive zeta potential at its optimal pH for growth Plant, Cell & Environment Volume 14 Issue 3, Pages 261 – 269
- Go'mez P., A. Gonza'lez M., 2004, Genetic variation among seven strains of *Dunaliella* salina Chlorophyta, with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences. Aquaculture 233: 149–162.

- Go'mez, P., Gonza'lez, M., 2003, Genetic polymorphism in eight Chilean strains of the carotenogenic microalga *Dunaliella salina* Teodoresco Chlorophyta,. Biol. Res. 34, 23– 30.
- Go'mez, P., Gonza'lez, M., Becerra, J., 1999, Quantity and quality of h-carotene produced by two strains of *Dunaliella salina* Teodoresco 1905, from the North of Chile. Bol. Soc. Chil. Qui'm. 44, 463– 468.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006, Algal Antioksidanlar, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, Cilt. 23, Ek. (1/1): 85-89.
- Gökpınar, Ş.; Büyükkışık, B. 1994. Mikroalg kültürleri: II. Kültür yöntemleri. Ege Üniversitesi Su Ürünleri dergisi, 2 (42-43); 95-105.
- Golueke, C. G., and Oswald, W.J., 1961, The mass culture of *Porphyridium cruentum*, University of California Press, Berkeley.
- Gomez Pl, Gonzalez MA 2005, The effect of temperature and irradiances on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* Chlorophyta, cultivated under laboratory conditions. Biol Res 38:151162.
- Gomez, Pl., Gonzalez, MA., 2004. Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences. Aquaculture 233:149–162
- Gordillo, F.J.L., Jimenez, C., Chavarria, J., Niell F.X., 2001. Photosynthetic acclimation to photon irradiance and its relation to chlorophyll fluorescence and carbon assimilation in the halotolerant green alga *Dunaliella viridis* Photosynthesis Research 68: 225–235
- Grant Bruce R, 1970, Nitrite reductase in *Dunaliella tertiolecta*: Isolation and properties, Plant and Cell Physiology, Vol. 11, No. 1 55-64
- Gualtieri, Paolo, Barsanti, Laura, Algae : Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology 2006,, ISBN: 0849314674, 47-61
- Hosseinzadeh, N., 2008, Isolation and molecular identification of different species of microalga *Dunaliella* from Gavkhuni lake, Thesis, *Bu-Ali Sina University* Faculty of Agriculture Department of Biotechnology, 50-62
- Hughes, D.A., Wright, A.J.A., Finglas, P.M., Peerless, A.C.J., Bailey, A.L., Astley, S.B., Pindar, A.C., Southon, S., 1997. The effect of h-carotene supplementation on the immune function of blood monocytes from healthy male non smokers. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 129, 309–317.
- İlgaz, S., 2003, Farklı Tuzluluk Derişimlerinin *Nannochloropsis oculata* ve *Isochrysis galbana* Türlerinin Büyüme Hızlarına Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi.

- Jahnke, L.S., White, A.L., 2003, Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. J. Plant Physiol. 160, 1193–1202.
- Javier, F., Gordillo, L., Carlos Jiménez, Corzo, A., and Xavier Niell, F., 2004, Optimized nitrate reductase assay predicts the rate of nitrate utilization in the halotolerant microalga *Dunaliella viridis*. Journal of Applied Phycology 99-106
- Johnson, . K., Johnson, J., Macelroy, . D., Speer, . L. Bruff, . S. 1968,. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. Journal of Bacteriology 95, 146 1-1468.
- Kaçka, A., 2003, Halofil *Dunaliella* Türlerinin Gliserol Üretim Kapasitesinin Belirlenmesi, Ankara University
- Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N. and Soyer, Y. 2005. Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 29: 297-303.
- Karako, Ş., Aksöz, A., 2005, Some Optimal Cultural Parameters for Gibberellic Acid Biosynthesis by *Pseudomonas* sp., Turk J Biol, 30: 81-85.
- Kargın, H., 2002. Mikroalg- Rotifer Kültür Sistemleri ve Tasarımları, Yardımcı ders kitabı, ME. Ü. Yayınları No. 5, Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No. 3; ISBN 975–6900–08–3; 15–16.
- Kargın, H., 2006, Mikroalg Üretimi İçin Fotobiyoreaktör Tasarımları, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, Cilt/Volume 23, Ek/Suppl. (1/2): 327-332
- Kazi, N., Radvany, R., Oldham, T., Keshavarzian, A., Frommel TO., Libertin, C., Mobarhan, S., 1997, Immunomodulatory effect of β - carotene on T lymphocyte subsets in patients with resected colonic polyps and cancer. Nutr Cancer 28:140–145.
- Koca, N., Burdurlu H.S., Karadeniz F. 2003. Kinetics of nonenzymatic browning reaction in citrus juice concentrates during storage. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 27 (6): 353-360.
- Koray, T., 2002. Denizel fitoplankton (Ders kitabı), Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No 32, p 147-148.
- Kurashige, M.; Okimasu, E.; Inoue, M. and Utsumi, K., 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. Physiol. Chem. Pys. & Med. NMR, 22: 27-38.
- Kuşçu, A., 2002, Sürekli Sistemde Kurutma İşleminin Kırmızıbiberde Kalite Özelliklerine Etkisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 16-20 ss.

- Kuşçu, A., Sağdıç, O., Küçüköner, E., Özçelik, S., 2002. Karotenoidlerin Bazı Özellikleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi. 22-24 Mayıs 2002 Türkiye 7. Gıda Kongresi Bildiriler Kitabı, sayfa: 646-656.
- Larsen W. 1997, *Human Embryology*. Second Edition. Churchill Livingstone, New York, NY,
- Leonardi, P.I. and Caceres, E.J., 1994. "*Comparative analysis of the fine structure of young and adult individuals of Dunaliella salina (Polyblepharidaceae, Chlorophyceae) with emphasis on the flagellar apparatus*". J Phycol. 30:642-653.
- Lerche,W., 1937. Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Archiv für Protistenkunde* 88, 236-268.
- Liu, C., Wang, X-D., Bronson, R.T., Smith, D.E., Krinsky, N.I., Russell, R.M., 2000. Effects of physiological versus pharmacological β -carotene supplementation on cell proliferation and histopathological changes in the lungs of cigarette-exposed ferrets. *Carcinogenesis* 21, 2245–2253.
- Lobanova, A. M. Kerbalaeva, Zh. Zh. Tashpulatov, and T. G. Gulyamova , , 2008,, carotene-forming activity of certain halophilic bacteria from Barsakelmes saline soil, chemistry of natural compounds, Vol. 44, No. 3: 306-307
- Loeblich, L.A. 1982, "Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* Chlorophyta,". J Mar Biol Ass, UK. 62:493- 508
- Macías-Sánchez, C. Mantell a, M. Rodríguez, E. Martínez de la Ossa, L.M. Lubiánb, O. Monterob, 2009,, Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*, *Talanta* 77 948–952
- Malgolith,P.Z.,1992. Pigment Microbiology, Chapman & Hall, London, 152s. MARTIN,A.M.; LU,C.; PATEL,T.R.,1993. Growth Parameters for the Yeast *Rhodotorula rubra* Grown in Peat Extracts., *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(4): 321-325.
- Mallick N., F.H. Mohn, 2000. Reactive Oxygen species: response of algal cells. J. Plant Physiol. 157: 183-193.
- Marin, N., Morales, F., Lodeiros, C. and Tamigneaux, E. 1998, "Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities". *Journal of Applied Phycology*. 10:405- 411.
- Massyuk, N.P., 1973. "*Morphology, Taxonomy, Ecology and Geographic Distribution of the Genus Dunaliella Teod. and Prospects for its Potential Utilization*". Naukova Dumka, Kiev. PP.242.

- Mathews-Roth, MM., 1987, Photoprotection by carotenoids. Fed Proc 46:1890–1893.
- Matsukawa R., E. Dubinsky, E. Kishimoto, Y. Masaki, T. Takeuchi, M. Chihara, Y. Yamamoto, E. Niki, I. Karube, 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. J Appl. Phycol. 9: 29-35.
- Melkonian, M. and Preisig, H.R., 1984. "*An ultrastructural comparison between Spermatopsis and Dunaliella (Chlorophyceae)*". Pl Sys Evol. 164:31-46.
- Milko, E.S., 1963, "*Effect of various environmental factors on pigment production in the alga Dunaliella salina*". Mikrobiologiya. 32:299-307.
- Milko, ES., 1962, Study of the requirements of two *Dunaliella* species in mineral and organic components of the medium. Moscow University, Vestnik. Biologia 6:21–23.
- Molnar, J., Szabo, D., Pusztai, R., Mucsi, I., Berek, L., Ocsovski, I., Kawata, E., Shoyama, Y., 2000. Membrane associated antitumor effects of crocine-, ginsenoside and cannabinoid derivatives. Anticancer Research 20, 861–867.
- Moretti, A., Fernandez-Criado, M.P., Cittolin, G. and Guidastri, R. 1999. Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream. FAO, 194 s., Rome.
- Murthy, K.N.C., A. Vanitha, J. Rajesha, M.M. Swamy, P.R. Sowmya, G.A. Ravishankar, 2005. In vivo Antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* - a green microalga. Life Sci. 76: 1381-1390.
- Nakayama R., 1992, The diverse effects of chlorella, Japan chlorella treatment association, Silpaque, Kyoto, Japan
- Naz, M., Gökçek, K., 2002, Fototropik mikroorganizmalar için alternatif üretim sistemleri, Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Antakya, Hatay
- Nicolai E, Baas-Becking LGM, 1935, Einige Notizen über Salzflagellaten. Arch Protistenk 85:319–328
- Nievesa M., Voltolinab D., Pin P., 2005, Growth and biomass production of *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* in a standard medium added with three products of zeolitic nature. Aquacultural Engineering 32: 403–410.
- Ohshima, K. Yoshida, H. Shimoda, M. Wakatsuchi, T. Endoh, and M. Fukuchi, 1998, Relationship between the upper ocean and sea ice during the Antarctic melting season, Journal of Geophysical Research, 103, 7601-7616 pp.

- Olmos-Soto, J., Paniagua-Michel, J., Contreras, P.R. and Trujillo, L., 2002, "Molecular identification of β -carotene hyper-producing strains of *Dunaliella* from saline environments using species-specific oligonucleotides". *Biotech Lett.* 24:365- 369.
- Oren, A., 2005, A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems.* 1: 2.
- Ötleş S., 1999, *Chlorella* geleceğin besleyici ve sağlıklı gıdası, Ankara, Uzer Matbaacılık, Türkiye
- Özdiş, Ö., 2005, Krom (VI) Birikiminin *Chlorella Vulgaris*'te Hücre Sayısı, Klorofil, Büyüme Hızı, Protein Ve Şeker Miktarlarına Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Türkiye
- Patricia I Gómez, Alejandra Barriga, Ana Silvia Cifuentes and MARIELA A González, 2003,, Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella* salina strain CONC-007, and *Dunaliella* bardawil strain ATCC 30861, *Chlorophyta*, *Biol Res* 36: 185-192
- Peto, R., Doll, R., Buckley, JD., Sporn, MB., 1981, Can dietary β -carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* 290:201–208.
- Poppel, GV., Goldbohm, RA., 1995, Epidemiological evidences for β - carotene and cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 62:1393s-1402s
- Preisig HR., 1992, Morphology and taxonomy. In: Avron M, Ben- Amotz A (eds) *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, pp 1–15
- Pulz, O., 1992, Cultivation techniques for microalgae in open and closed ponds, *Proceedings of the 1st European workshop on microalgal biotechnology*, Postdam, 61.
- Raja R., Hema Iswarya Sh., Balasubramanyam D., Rengasamy R., 2006, PCR-identification of *Dunaliella* salina Volvocales, *Chlorophyta*, and its growth characteristics. *Microbiological Research* 162: 168—176.
- Raja, S. Hemaiswarya, R. Rengasamy 2007,, Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production, *Appl Microbiol Biotechnol*, 74:517–523.
- Ramazanov, Z., Klyachko-Gurvich, G., Ksenofontov, A. Semenenko, V.E. 1988. Effect of suboptimal temperature on content of β -carotene and lipids in the halophilic alga *Dunaliella salina*. *Sov. Plant Physiol.*, 35: 661-665.
- Ramus, J. & Groves, S. T., 1972, Incorporation of sulfate into the capsular polysaccharide of red alga *Porphyridium*. *Journal of Cell Biology*, 54; 399-407.

- Rauscher R, Edenharder R., and Platt KL., 1998, *In vitro* antimutagenic and *in vivo* anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. *Mutation Research* 413:129-142.
- Richard A. Larson; 1997, *Naturally Occuring Antioxidants*, Boca Raton CRC Press, Lewis Publishers, c1997. 195 p.
- Rodriguez-Amaya, D.B. 2002, Effects of processing and storage on food carotenoids. *Sight and Life Newsletter* 3: 25-35.
- Rodriguez-Amaya, D.B., 1997, Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods. *Opportunities for Micronutrient Intervention (OMNI)*, Arlington.
- Salguero A., de la Morena B., Vigara J., M. Vega J., Vilchez C., Leo'n R. 2003, Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomolecular Engineering* 20: 249–253.
- Schiedt, K. and Liaaen-Jensen, S. 1995, Isolation and analysis. In *Carotenoids*, Vol. 1A, Isolation and Analysis, eds G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander, pp. 81-108. Birkhsuser, Basel.
- Semenenko, V.E. and Abdullaev, A.A. Parametric control of β -carotene biosynthesis in *Dunaliella salina* cells under conditions of intensive cultivation. *Soviet Plant Physiology*, 1980, vol. 27, no. 1, p. 22-30.
- Setlik, I., Veladimir, S., Malek, I., 1970, Dual purpose open circulation units for large scale culture of algae in temperate zones, *Algol. Stud.*, 1,11.
- Shaish, A. , Ben-Amotz, A. Avron M., 1991, Production And Selection Of High β -Carotene Mutants Of *Dunaliella bardawil*, Volume 27 Issue 5, Pages 652 - 656
- Sharma, M; Naresh, M; Mittal, A., 2007, Morphological Changes in Magnetotactic Bacteria in Presence of Magnetic Fields, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, Volume 3, Number 1, pp. 75-80(6)
- Shivaji, S. and Ray, M. K. (1995) Survival strategies of psychrotrophic bacteria and yeast of Antarctica. *Ind. J.*
- Sies, H., Krinsky, N. L, eds., 1995, Antioxidant vitamins and β -carotene in disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 62(Suppl): 1299 s.,1540s.
- Sies, H., Stahl, W., 1997, Carotenoid and intracellular communications via gap junction, *Int J Vitam Nutr Res* 67:364–367
- Sing, S., Aiad, S., Richmond, A., 2000, Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp. In flat plate glass reactors. *J. appl. Phycol.* 12;269-275.

- Smidsrød, O., Skjåk-Braek, G., 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Tibtech* 8, 71–78.
- Sommerburg, O., J.E.E. Keunen, A.C. Bird and F.J.G.M. van K., 1998, Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *Br. J. Ophthalmol.* 82: 907–910.
- Soong, P., 1980. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. In: Shelef, G., Soeder, C. J. (Eds.), *Algae Biomass*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam; 97–113.
- Sosik, H. M. and B. G. Mitchell. 1994. Effects of temperature on growth and light absorption in *Dunaliella tertiolecta*. *J. Phycol.* 30: 833-840
- Stahl & Sies 1996, Bioavailability Of Lycopene, *ISHS Acta Horticulturae* 487: VI International Symposium on Processing Tomato & Workshop on Irrigation & Fertigation of Processing Tomato
- Terao, J., 1989. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoid in solution. *Lipids* 24:659–661
- Tomaselli, L, Giovannetti, L., Torzillo, G., 1993. Physiology of stress response in *Spirulina*, *Spirulina*, *Algae of Life*. In: Doumenge, F.; Durand- Chastel, H. & Toulemont, A. (eds). *Spiruline Algue de Vie. Bulletin de L'Institut Océanographique*, Monaco, n.12, p. 65–75, 1993.
- Torrissen, O. J. and Christiansen, R. 1995, Requirements for carotenoids in fish diets. *J. Appl. Ichthyol.*, 11:225-230.
- Tredici M.R., Materassi R., 1992. From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *J. Appl. Phycol.*, 4, 221-231.
- Tredici, M.r., 1999. Bioreactors, photo. In: Flickinger M. C., Drew S.w., (Eds) *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*, vol 1. Wiley, New York; 395-419.
- Tredici. M. R., 2007. Photobioreactors. *Int. Workshop of Microalgal Biotechnology*, 9-10 September 2007, Tabriz (Iran).
- Türkkan, E., 2007, *Rhodotorula glutinis* 'den elde edilen karotenoidlerin bazı gıda patojenleri üzerine antibakteriyal etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Türkiye
- Ürküt, Zümrüt; Dagbaglı, Seval; Göksungur, Yekta, 2007, Optimization of pullulan production using Ca-alginate-immobilized *Aureobasidium pullulans* by response surface methodology, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, Volume 82, Number 9, pp. 837-846(10)

- Veiga-Crespo, P., Blasco, F.; Santos, R.; Poza, M.; Villa, G.; 2005, Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production
- von Elbe, J. H., & Schwartz, S. J. 1996. Colorants. In O. R. Fennema (Ed.), Food chemistry (pp. 651–722). New York: Marcel Dekker.
- Vonshak, a., 1988. *Porphyridium*. In Borowitzka M. A., Borowitzka L.J., (ED.). Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press. Pp: 122-134.
- Watson, A. S., 1979. Aquaculture and Algae Culture. Process and Production. Noyes Data Corporation, N. J.
- Wegman, K., Pristavu, N. 1978, Influence of cycloserine on the photosynthetic ¹⁴C incorporation into amino acids in various algae. Biochem. Physiol. Plant. 173, 86-90
- Wegmann K, Metzner H., 1971, Synchronization of *Dunaliella salina* cultures. Archiv für Mikrobiologie, 78: 360-367
- Williams A, Pryor BS, Wilhelm S, Cheryl L, Rock RD (2000) β - carotene from biochemistry to clinical trials. Nutr Rev 1:39–53.
- Wong, P. T. S., Maguire, R. J., Chau, Y. K., Kramar, O., 1984. Uptake and Accumulation of Inorganic Tin by a Freshwater Alga, *Ankistrodesmus falcatus*. Can. J. Fish. Aquat., Sci. 41: 1570- 1574.
- Zeb, A., and Mahmood, S., 2004, Carotenoids Contents from Various Sources and Their Potential Health Applications, Pakistan Journal of Nutrition 3 (3): 199-204
- Zhang, W. X., Majidi, V., 1994, Monitoring the Cellular Response of *Stichococcus bacillaris* to Exposure of Several Different Metals Using *in vivo* P- 31 NMR and Other Spectroscopic Techniques. Environ. Sci. Technol. 28: 1577- 1581. 199- 223.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts and F. M., VAN 'T Riet K., 1990, Modeling of the Bacterial Growth Curve, Appl Environ Microbiol.; 56(6): 1875-1881.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Faraz Arash Rad

Doğum Yeri : Batı Azerbaycan- Urumiyye - İran

Doğum Yılı: 1975

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 1987-1991

Lisans 1993-1997, MİKROBİYOLOJİ

Yüksek Lisans 1997- 2000, MİKROBİYOLOJİ

Yabancı Dil: İNGİLİZCE ve TÜRKÇE

İş Tecrübesi:

