

***DUNALIELLA TERTIOLECTA* ALGİNDEN FARKLI
EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİYLE KLOROFİL EKSTRAKSİYON
SÜRECİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HALİS ENES ÜNAL

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
BÖLÜMÜ**

**MERSİN
HAZİRAN - 2019**

***DUNALIELLA TERTIOLECTA* ALGİNDEN FARKLI
EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİYLE KLOROFİL
EKSTRAKSİYON SÜRECİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HALİS ENES ÜNAL

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

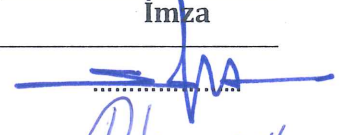
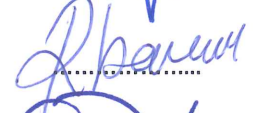
**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
BÖLÜMÜ**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Onur DÖKER**

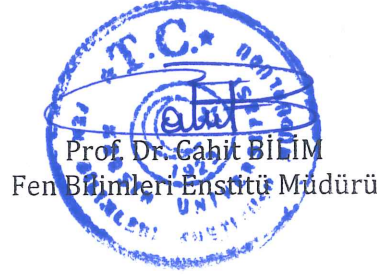
**MERSİN
HAZİRAN - 2019**

ONAY

Halis Enes ÜNAL tarafından Dr. Öğr. Üyesi Onur DÖKER danışmanlığında hazırlanan “*Dunaliella tertiolecta* Alginden Farklı Ekstraksiyon Yöntemiyle Klorofil Ekstraksiyon Sürecinin İncelenmesi” başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 24/06/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Uğur SALGIN	
Üye	Doç. Dr. Rükan GENÇ ALTÜRK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Onur DÖKER	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12/07/2019 tarih ve 2019.28/892 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

12./07/2019//...../.....

İmza / Signature

Halis Enes ÜNAL

ÖZET

***DUNALIELLA TERTIOLECTA* ALGİNDEN FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİYLE KLOROFİL EKSTRAKSİYON SÜRECİNİN İNCELENMESİ**

Klorofil, bitki ve bakteri tarafından fotosentezde kullanılan önemli bir moleküldür. Klorofil, kan moleküllerine benzer bir yapıya sahiptir. Kan molekülüne benzemesi, insan vücuduna girdiğinde kan molekülüyle aynı şekilde çalışmasına neden olur. Klorofil, insan vücuduna bu uyum sayesinde birçok hastalığın tedavisinde kullanılır. Klorofil bu faydalarının yanı sıra çok kolay ekstrakte olan bir maddedir. Akdeniz ikliminde yetişen ve yeşil bir mikroalg türü olan *Dunaliella tertiolecta*, sert polisakkarit duvarlara sahip değildir. Bu da onun kolay ekstrakte edilmesini sağlar. Bu alg türü kolay bulunabilen bir algdir. Yetiştigi iklim koşullarından dolayı yüksek sıcaklıklara dayanabilen bir algdir. Yapısal durumu onun herhangi bir kontaminasyona uğramamasını sağlamaktadır Bu çalışma alg yetiştirme ve klorofil a ekstraksiyonu olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Alg yetiştirme aşamasında; kolay ekstrakte olan *Dunaliella tertiolecta* alginin farklı mevsim koşullarında, gün ışığı olan ortamda ve LED ışıklı ortamda, Fe^{+3} iyonlu besi ortamında ve Fe^{+3} iyonlu besi ortamında üreme hızı incelendi. Alglerin üremesinin sağlandığı en verimli ortam koşullarının Temmuz-Eylül ayları arasında, LED ışıklı ortamda Fe^{+3} iyonu bulunan besi ortamında 11 gün içerisinde olduğu tespit edildi. Klorofil a ekstraksiyonunda ise için hızlı bir ekstraksiyon metodu olan mikrodalga ısıtmalı ekstraksiyon metodu ile diğer geleneksel klorofil ekstraksiyon metodları karşılaştırıldı. Literatürde yaygın olarak kullanılan bu metodlar Soxhlet ekstraksiyonu, santrifüj ekstraksiyonu ve ultrasonik ekstraksiyonu metodlarıdır. Yapılan deneysel çalışmaların sonucunda klorofil a'nın %98 verimle santrifüj yönteminde ekstrakte edildiği tespit edildi. Endüyük klorofil a verim ise %78 verim ile ultrasonik ekstraksiyonunda oldu. Elde edilen bu sonuçlar klorofil a için kullanılan her ekstraksiyon yönteminin geçerli ve verimli bir yöntem olduğunu gösterdi. Ek olarak klorofil a'nın mikrodalga ekstraksiyonundaki optimum koşullarını tespit etmek için RSM (Cevap Yüzey Yöntemi) kullanıldı. Bu yöntem ile ortam parametrelerinin birbiri üzerine etkileri incelendi. Ortam parametreleri olarak sıcaklık, süre ve çözücü miktarı seçildi. RSM modeli bize en iyi ekstraksiyon koşullarının 134°C'de 3 dakika 53 saniye boyunca 25.16 mL etanol ile gerçekleştiğini gösterdi. Ayrıca bu yöntem sisteme en çok etki eden parametrenin sıcaklık olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Yeşil mikro alg, *Dunaliella tertiolecta*, alg yetiştirme, mikrodalga ekstraksiyonu, geleneksel klorofil ekstraksiyon metodları, klorofil.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Onur DÖKER, Mersin Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü,
Mersin.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CHLOROPHYLL EXTRACTION PROCESS WITH DIFFERENT EXTRACTION METHODS FROM *DUNALIELLA TERTIOLECTA* ALGAE

Chlorophyll is an important molecule used in photosynthesis by plants and bacteria. Chlorophyll has a structure similar to blood molecules. When it enters the human body, it resembles a blood molecule. Chlorophyll is used in the treatment of many diseases thanks to this adaptation to the human body. Chlorophyll is a substance that is very easily extracted as well as these benefits. *Dunaliella tertiolecta*, a green microalgae species grown in the Mediterranean climate, does not have hard polysaccharide walls. This makes it easy to extract. This type of algae is an easy to find algae. It is an algae that can withstand high temperatures due to the climatic conditions. Its structural condition ensures that it does not undergo any contamination. This study consists of two stages: algae growing and chlorophyll a extraction. Algae growing stage; we investigated the growth rate of *Dunaliella tertiolecta* algin, which is easily extracted, in different seasons, in daylight and in LED light environment, in Fe⁺³ free medium medium and in Fe⁺³ ion medium. It was determined that the most efficient environment conditions where algae growth was achieved were between 11 days in July-September in the medium with Fe⁺³ ion in 24 hours LED light environment. In the extraction of chlorophyll a, extraction method was compared with other methods of traditional chlorophyll extraction. These methods widely used in the literature are Soxhlet extraction, centrifugal extraction and ultrasonic extraction methods. As a result of the experimental studies, it was determined that chlorophyll a was extracted by centrifugation method in 98% yield. Low chlorophyll yield was 78% in ultrasonic extraction. These results showed that each extraction method used for chlorophyll a was a valid and efficient method. In addition, RSM (Response Surface Method) was used to determine the optimum conditions of chlorophyll a in microwave extraction. The effects of these parameters on each other were investigated. The temperature, duration and amount of solvent were chosen as the media parameters. The RSM model showed us that the best extraction conditions were achieved with 25.16 mL ethanol at 134°C for 3 minutes and 53 seconds. Intercalarily, this method shows the temperature gauge of the parameter that most affects the system.

Keywords: Green micro algae, *Dunaliella tertiolecta*, algae growing, microwave extraction, traditional chlorophyll extraction methods, chlorophyll.

Advisor: Assist. Prof. Dr. Onur DÖKER, Department of Chemical Engineering, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca, manevi desteğinin yanı sıra; her türlü fikir kolaylığı ve malzeme teminini sağlayan ve özellikle sonuçların değerlendirilmesi aşamasında büyük yardımları olan çok değerli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Onur DÖKER'e, alg yetiştiriciliği ile ilgili bana yol gösteren hocam sayın Doç. Dr. Rükan GENÇ ALTÜRK'e ve mikrodalga ekstraksiyonu sürecinde bana hertürlü kolaylığı ve yardımı sağlayan hocam sayın Öğr. Gör. Cihan GEÇGEL'e ve Lisans ve Yüksek Lisans sürecinde bana emeği geçen tüm hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım. Sunduğum bu yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (proje numarası: 2017-2-TP2-2527) tarafından desteklenmiş olup, Dr. Öğr. Üyesi Onur DÖKER danışmanlığında gerçekleştirilmiştir. Teze finansal katkılarından dolayı Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca her zaman olduğu gibi bu çalışmamda da maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Algler	1
1.1.1. Alglerin Genel Özellikleri	1
1.1.2. Alg Türleri	2
1.1.3. <i>Dunaliella</i>	3
1.1.3.1. <i>Dunaliella tertiolecta</i>	3
1.1.4. Alglerin Kullanıldığı Sektörler	3
1.1.5. Mikro Alglerin Gelişimi	4
1.1.6. Mikro Alglerin Yetiştirme Yöntemleri	4
1.1.6.1. Küçük Ölçekli Üretim	4
1.1.6.2. Büyük Hacimlerde Alg Kültürü	5
1.1.6.3. Kitesel Alg Kültürü	5
1.1.7. Alglerin Yetiştirilmesini Etkileyen Faktörler	6
1.1.7.1. Işık	6
1.1.7.2. Sıcaklık	6
1.1.7.3. Oksijen	6
1.1.7.4. Karbondioksit	6
1.1.7.5. pH	7
1.1.7.6. Tuzluluk	7
1.1.7.7. Vitamin	7
1.1.7.8. Karıştırma	7
1.2. Ekstraksiyon ve Mikrodalga Ekstraksiyonu	7
1.3. Klorofil	9
	ix

	Sayfa
1.3.1. Klorofilin Analizi	10
1.3.1.1. HPLC Yöntemi ile Klorofil Analizi	10
1.3.1.2. UV Spektrometre Yöntemi ile Klorofil Analizi	11
1.3.2. Klorofilin Tıbbi Açıdan Önemi	11
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	13
2.1. Alg Üretim Çalışmaları	13
2.2. Mikrodalga Ekstraksiyonu Çalışmaları	15
2.3. Ekstraksiyon Çalışmaları	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29
3.2. Yöntem	29
3.2.1. Alg Üretimi	29
3.2.2. Alg Ekstraksiyonu	30
3.2.2.1. Soxleth Ekstraksiyonu	31
3.2.2.2. Santrifüj Ekstraksiyonu	31
3.2.2.3. Ultrasonik Ekstraksiyonu	32
3.2.2.4. Mikrodalga Ekstraksiyonu Deneyleri	33
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	36
4.1. Alg Üretim Miktarı	36
4.1.1. İklim Koşullarının Etkisi	36
4.1.2. Işığın Etkisi	37
4.1.3. Fe ⁺³ İyonunun Etkisi (Temmuz–Eylül)	38
4.1.4. Fe ⁺³ İyonunun Etkisi (Mart-Nisan)	39
4.1.5. En Verimli Üreme Koşulu	40
4.2. Alglerden Klorofil Eldesi	41
4.2.1. UV Spektrometrede Ölçülmü	41
4.2.2. Ekstraksiyon Süreçlerinin Karşılaştırılması	42
4.2.3. Mikrodalga ekstraksiyon deneyleri ve RSM Modeli	44
4.2.3.1. Sıcaklık ve Çözücü Miktarının Etkisi	45
4.2.3.2. Sıcaklık ve Sürenin Etkisi	46
4.2.3.3. Çözücü Miktarı ve Sürenin Etkisi	47
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	53
EKLER	60

	Sayfa
ÖZGEÇMİŞ	61

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Farklı amonyum-N bileşenleri ile üretilmiş <i>Dunaliella tertiolecta</i> 'nın Protein (p), lipit (l) ve karbonhidrat (c) içeriği [54].	14
Tablo 2.2. Seçilen faktörler ve karşılık gelen seviyeler [56].	16
Tablo 2.3. Ortogonal deney sonuçları [56].	16
Tablo 2.4. Box-Behnken Proses parametresinin çıkış cevabı (% geri kazanılmış lipitler) üzerindeki etkilerini gösteren deneysel tasarım matrisi [57].	17
Tablo 2.5. Ekstraksiyon ve saflaştırma sonuçları [58].	18
Tablo 2.6. Üç ardışık ekstraksiyon sürecinde ekstrakte edilen klorofil miktarı. İlk ekstraksiyonun etkinliği, toplam ekstraksiyonun yüzdesi olarak ifade edilir ve önemli farkların yönü gösterilir (N=6) [60].	20
Tablo 2.7. Çözücü ekstraksiyonu ile klorofil ekstraksiyon çalışmaları.	21
Tablo 2.8. 180 dakikalık bir ekstraksiyon süresi için elde edilen karotenoid ve klorofil verimi [65].	22
Tablo 2.9. mg/g _{kuru ağırlıkta biyokütle} olarak karotenoidler ve klorofil a, klorofil b ve klorofil c ve toplam karotenoidlerin klorofil a'ya oranı [66].	23
Tablo 2.10. Süperkritik karbondioksit (SC-CO ₂) ekstraksiyonu ile klorofil ekstraksiyon çalışmaları.	24
Tablo 2.11. Santrifüj ekstraksiyonu ile klorofil ekstraksiyon çalışmaları.	25
Tablo 2.12. Solventlerin ultrasonik ekstraksiyonu işlemi görmüş kenevir yağındaki klorofilin üzerine etkileri [75].	26
Tablo 2.13. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile klorofil eldesinin karşılaştırıldığı çalışmalar.	27
Tablo 3.1. Mikrodalga ekstraksiyonu deney çalışma sistemi.	34
Tablo 4.1. Sıcaklık ile çözücü miktarının klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (4 min süre için).	45
Tablo 4.2. Sıcaklık ile sürenin klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (20 mL'lik çözücü için).	46
Tablo 4.3. Çözücü miktarı ile sürenin klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (120°C sıcaklıkta).	47
Tablo 4.4. RSM deneyleri ve deneysel sonuçlar.	48

	Sayfa
Tablo 4.5. Yanıt Yüzeyleri için ANOVA ikinci dereceden varyans tablosunun model analizi	49
Tablo Ek-1. 2018 yılı, Mart-Eylül aylarındaki günlük sıcaklık verileri (Gündüz°C/Gece°C).	60



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. a) Klorofilin a'nın kimyasal yapısı, b) klorofilin b'nin kimyasal yapısı [40].	9
Şekil 1.2. Klorofilin a ve klorofil b'nin UV spektrometredeki dalga boyları [40].	10
Şekil 2.1. PO ₄ -3, Co+2, Fe+3, Mo+2, Zn+2, Mn+2 ve azot iyonlarının, <i>Dunaliella tertiolecta</i> 'nın üreme miktarına etkisi [55].	15
Şekil 2.2. <i>Chlorella vulgaris</i> alginden etanol ile ekstrakte edilmiş olan bileşiklerin HPLC kromatogramı: 1 - lutein, 2 - klorofil b, 3 - klorofil a, 4 - tanımlanamayan, 5 ve 6 - diğer karotenoidler [59].	19
Şekil 2.3. <i>Porphyra umbilicalis</i> , <i>Ulva sp.</i> ve <i>Laminaria ochroleuca</i> alglerinden ekstrakte edilen klorofil çeşitleri ve toplam klorofil oranları. Nori (<i>Porphyra umbilicalis</i>), Sea Lettuce (<i>Ulva sp.</i>), Kombu (<i>Laminaria ochroleuca</i>) [72].	25
Şekil 3.1. Alg üretim aşaması. Herhangi bir kontaminasyona karşı kullanılmış 4 ayrı numune (6, 7, 8, 9). (a) yeni ekilmiş <i>Dunaliella tertiolecta</i> , (b) 1000 mL'lik erlenlere ekilmiş <i>Dunaliella tertiolecta</i> , (c) 5000 mL'lik bidonlara ekilmiş <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Her numune iki ayrı bidona aşılanmış ve * olarak ifade edilmiş.), (d) b ve c deki sistemin geniş görüntüsü. (x saf suda denenmiş <i>Dunaliella tertiolecta</i> .)	30
Şekil 3.2. Soxleth Ekstraksiyonunun deney sistemi.	31
Şekil 3.3. Santrifüj ekstraksiyonunun deney sistemi.	32
Şekil 3.4. (a) Ultrasonik ekstraksiyonunun deney sistemi, (b) döner buharlaştırıcı sistemi.	33
Şekil 3.5. (a) Mikrodalga ekstraksiyonunun deney sistemi, (b) Mikrodalga ekstraksiyonu sisteminde kullanılan döner buharlaştırıcı sistemi.	34
Şekil 3.6. Ekstraksiyon deneyleri sonucu elde edilmiş olan klorofil a'nın UV Spektrometredeki analiz sonucu.	35
Şekil 4.1. <i>Dunaliella tertiolecta</i> alginin mikroskop görüntüleri. (a) çalışmada üretilen, (b) literatürden alınan. [81]	36
Şekil 4.2. 24 saat 1000 lux'lük LED ışıktaki Fe+3 iyonu bulunmayan besi ortamında farklı ortam sıcaklıklarında ki alg üreme grafiği.	37
Şekil 4.3. Temmuz-Eylül aylarında, Fe+3 iyonu bulunmayan besi ortamında farklı ışık ortamlarında ki alg üreme grafiği.	38
Şekil 4.4. 24 saat 1000 lux'lük LED ışıktaki, Temmuz-Eylül aylarında, Fe+3 iyonu bulunan ve bulunmayan ortamlarda ki alg üreme grafiği.	39
Şekil 4.5. 24 saat 1000 lux'lük LED ışıktaki, Mart-Nisan aylarında, Fe+3 iyonu bulunan ve bulunmayan ortamlarda ki alg üreme grafiği.	40

	Sayfa
Şekil 4.6. Farklı ortam koşullarındaki alg üreme grafiği.	41
Şekil 4.7. UV Spektrometrede elde edilen kalibrasyon doğrusu.	42
Şekil 4.8. Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen klorofil a konsatrasyonlarının karşılaştırılma grafiği.	43
Şekil 4.9. Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi için UV spektrometrede klorofil konsantrasyonunun zamanla değişim grafiği.	44
Şekil 4.10. Sıcaklık ve çözücü miktarının klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (4 min süre için).	45
Şekil 4.11. Sıcaklık ve sürenin klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (20 mL'lik çözücü için).	46
Şekil 4.12. Çözücü miktarı ve sürenin klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (120°C sıcaklıkta).	47

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
E	Absorbans katsayısı
A	Absorbans
λ	Dalgaboyu
Cl _a	Klorofil a
Cl _b	Klorofil b
Cl _c	Klorofil c
Car	Karotenoid

1.GİRİŞ

1.1. Algler

Algler; Latince’de “deniz otu” anlamına gelmektedir. Su yosunları olarak bilinen bu canlılar birçok su canlısının besin kaynağıdır. Algler dünyadaki canlılığın devamı için önemli bir role sahiptir. Bunun nedeni fotosentez yapmalarıdır. Canlıların oksijen ihtiyacının büyük bölümü alglerin çevreye verdiği oksijen ile karşılanmaktadır [1].

Algler yüksek besin değerine sahiptir. Çünkü yapısında; karbonhidrat, protein, lipid, yağ asitleri, gliserol, β -karoten, astaksantin, ksantofil, fikobilin, mineral, vitamin, polisakkarit ve polifenol barındırmaktadırlar. Ayrıca amino asitlerce çok zengindirler [1].

Algler, gıdalarda kullanılan biyo aktif moleküllerin üretilmesinde kullanılmaktadır. Son yirmi yıl içerisindeki araştırmalar bize gösterdi ki mikroalglerin ve makroalglerin antibiyotik, antiviral, antikanser, antifungal, antibakteriyal, antinflamatuar etkileri bulunmaktadır. Algler yalnız ilaç olarak kullanılmamaktadır. Aynı zamanda sentetik moleküllerin oluşturulmasında önemli bir yere sahiptir [1].

Kemoterapide kullanılan ilaçlara karşı kanser mikropları dirençli hale gelmiştir. Bununla birlikte giderak artan patojenler farklı bir ilaç kaynağına insanları itmektedir. Bu ilaç kaynaklarından en uygunu alglerdir. Çünkü kanser ilaçlarının ana bileşenlerini yapısında barındırmakta ve daha az toksik maddeye sahip olmaktadır [1].

Alglerin tıbbi amaçlarda kullanımı çok eskiye dayanmaktadır. 1980’lerden sonra mikroalglerle ilgili yapılan çalışmalar artış göstermektedir. Özellikle geçtiğimiz son on yılda çalışmalar daha kapsamlı hale gelmiştir. Bunun nedeni; daha az miktarda metaryal ve malzeme kullanılarak daha fazla ekstrakt elde edilmesidir. [1].

Alglerin kullanım alanı çok geniş olmaktadır. Bunun nedeni, antibiyotikler, algisitler, toksinler, farmosötik olarak aktif bileşikler ve bitki gelişim düzenleyicisi birçok bileşime sahip olmasıdır [1].

1970’den beri yapılan çalışmalar bize gösterdi ki algler antineoplastik, antimikrobiyal ve antiviral aktiviteye sahip çok önemli mikroorganizmalardır [1].

1.1.1. Alglerin Genel Özellikleri

Alglerin genel özelliklerini aşağıdaki gibi değerlendirebiliriz [2].

- Ökaryot ve prokaryot olmak üzere iki farklı hücresel yapıda cinsleri bulunmaktadır.

- Mavi yeşil algler prokaryotik hücre yapısına sahiptir. Hücre çekirdeği belirgin değildir. Pigmentleri çok basit yapıdadır. Bu pigmentlerin hücre içerisindeki dağılımı prokaryot hücrelerdeki gibi olduğu için mavi yeşil algleri diğer alglerden farklı kılmaktadır.
- Eşeyli, eşeysiz ve vejatatif olmak üzere üç farklı üreme şekline sahiptir.
- Alglerin %30'u buzul ve karlı alanlarda da bulunabilmektedir. Ancak geri kalan %70'i sıcak suları tercih etmektedir.
- Karbonhidratlı bileşiklerin üretiminde doğada birinci sıradadır.
- Su ortamında algler besin zincirinin ilk kısmında bulunan üretici canlıdır. Yapılarında bulundurdıkları pigmentler ile karbondioksit ve suyu fotosentez yaparak karbonhidratlara çevirebilmektedirler. Bu sayede sudaki besin değerinin artmasına ve çözünmüş oksijen oranının yükselmesine sebep olmaktadır.
- Çevresel faktörler alglerin üremesini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu çevresel faktörler besin, sıcaklık ve ışıktır. Alglerin üremesini sınırlayan bu faktörler iyileştirilirse, alglerin üreme oranı artabilmektedir. Üreme oranının belli bir seviyeyi aşması ve ötrofikasyon olayının gerçekleşmesine neden olmaktadır. Ötrofikasyonun gerçekleştiği ortamdaki azotlu bileşiklerin ve fosfatlı bileşikler artması sonucu ortam bulanıklığı artmakta ve ışık suyun alt kısmına geçmemektedir. Suyun alt kısımlarındaki algler ise ışık alamadığından dolayı çökebilmektedirler. Çökmenin temel sebebi ise ortamda yeterli oksijenin bulunmamasıdır.

1.1.2. Alg Türleri

Bir milyon civarında türü bulunan mikroalgler yedi ana sınıfa ayrılır. Bunlar;

- Chlorophyta (yeşil algler)
- Cyanobacteria (mavi-yeşil algler)
- Oscillatorialimosa
- Oscillatorialimnetica
- Phormidiumtenue
- Chlorellavulgaris
- Spirulinamajor [3].

1.1.3. *Dunaliella*

Dunaliella, tek hücreli Chlorophyta cinsi algdir. Cins ilk kez *Dunaliella salina* tür tipiyle tanımlanılmıştır. Günümüzde 29 çeşit *Dunaliella* türü vardır. Hücre duvarı yoktur. Eşit uzunluktaki iki kamçısı ve bir kloroplastı bulunmaktadır [4].

Deniz ve tuzlu göllerde yaşarlar. Ilıman ve tropik iklim türünü severler ancak kutup bölgelerinde de görülebilmektedirler. Tuzlu göllerde yaşayan türleri genelde suya turuncu veya kırmızı bir renk kazandırır. *Dunaliella* cinsi algler, pH 1'den (*Dunaliella asidofila*) pH 11'e (*Dunaliella salina*) kadar değişen çok geniş bir pH toleransına sahiptir [4].

1.1.3.1. *Dunaliella tertiolecta*

Dunaliella tertiolecta, hücre boyutları 7-12 µm olan yeşil bir deniz algidir. Çok hızlı bir şekilde ürerler. *Dunaliella tertiolecta* diğer *Dunaliella* türlerine kıyasla daha yüksek lipid içeriğine sahiptir. Yaklaşık %37 yağ içeriğine sahiptir. *Dunaliella tertiolecta* Chlorophyta cinsi alglerden olduğu için yüksek miktarda klorofil içermektedir. Buda onun önemli bir klorofil hammaddesi olmasını sağlamaktadır [4].

1.1.4. Alglerin Kullanıldığı Sektörler

Tüm dünyada algler 5 ana sektörde kullanılmaktadır. Bunlar:

- Gıda endüstrisi
- Yem endüstrisi
 - Alg unu
 - Karides yemi
 - Balık yemi
- Farmasötik ve biyoteknoloji endüstrisi
 - Peptidler
 - Antibakteriyeller
 - Biyoaktif bileşikler
 - Antikorlar
- Enerji endüstrisi
 - Biyodizel

- Ethanol
- Uzun zincirli yağ asitleri
- Kimya ve nanoteknoloji endüstrisi
 - Agar
 - Anilin
 - Karragenan
 - Alg bazlı silikon çipler [5]

1.1.5. Mikro Alglerin Gelişimi

Mikro alglerin gelişmesi 5 evrede gerçekleşir. Bunlar;

- Uyum evresi; ekimi yapılan mikro alg hücrelerinin gelişimi bu evrede oldukça yavaştır.
- Hızlı gelişme evresi; mikro alg hücreleri artık düzenli ve seri bir üreme evresindedir. Bu evrede gelişme oranı diğer evrelere nispeten en yüksek düzeydedir.
- Yavaşlama evresi; bu evrede mikro alg hücrelerinin üreme ve gelişme hızı yavaşlamıştır. Farklı kültür tanklarına ekim işlemi ise genelde bu evrede yapılır.
- Duraklama evresi; mikro alg hücrelerinin üreme ve ölüm oranları bu evrede eşit seviyededir.
- Çökme evresi; bu evrede ise mikro alg hücrelerindeki ölüm oranı artmıştır. Artık çökme işlemi gerçekleşmektedir [6].

1.1.6. Mikro Alglerin Yetiştirme Yöntemleri

1.1.6.1. Küçük Ölçekli Üretim

Küçük ölçekli üretimde 200 mL'lik erlenler veya 5 L'lik erlenler kullanılır. Kültür odasının sıcaklığı 18°C ile 22°C arasında tutulur. Minimum aydınlatma süresi 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde 2000-3000 lux'lük floresan lambalar kullanılarak gerçekleştirilir [6]. Küçük ölçekli üretim 200 mL hacimlerde ve 5 L de olmak üzere genel olarak iki şekilde yapılmaktadır.

200 mL'lik erlen kültüründe havalandırma sistemi kullanılmaz. Bunun sebebi ise buharlaştırmayı arttırarak ortamda su miktarının hızlıca azalmasıdır [6].

Daha önceden 200 mL'lik erlene otoklavda sterile edilmiş 150 mL'lik deniz suyu konulur. İçerisine ise 0.15 mL f/2 besi ortamı ilave edilir. Hazırlanan çözeltiye alg ekimi yapılır. Kültürün gelişim süresi genel olarak 7 gün sürmektedir. Ancak bazı kültürlerin 4 veya 5 gün

içirişinde de geliştiği gözlemlenmiştir. Havalandırma sistemi olmadığı için en az 24 saatte bir erlenin çalkalanması gerekmektedir [6].

5 L'lik kültür ortamı havalandırmaya gereksinim duymaktadır. Erlene hava pompası ve boru ile hava beslenmektedir. Buradaki amaç mikro alg hücrelerinin dibe çökmesini önlemek ve ortam sirkülasyonunu sağlamaktır. Kültür ortamının sirkülasyonu için 6 L/min hızla ortama hava pompalanır. Beslenen hava vasıtası ile sistemde meydana gelebilecek herhangi bir kontaminasyonu riskini minimum orana düşürmek için gelen havayı pamuk ile filtre edilir [6].

5 L'lik erlen içerisine otoklavda sterile edilmiş 5 L'lik deniz suyu konulur. İçerisine 5 mL f/2 besi ortamı ilave edilir. Hazırlanan 5 L'lik çözeltiye 200 mL'lik erlen içerisinde geliştirilen kültür aşılır [6].

1.1.6.2. Büyük hacimlerde alg kültürü

Sera içerisindeki tanklar polikarbondan üretilmiş şeffaf malzemeler olmalıdır. Besi ortamı, 100-1000 L polikarbon tanklara filtre edilmiş deniz suyu konularak oluşturulur. Doldurulan deniz suyunu sterilize etmek için tanka 300 ppm konsantrasyonunda NaClO eklenerek klor ile 12 saat boyunca sterilizasyona tabi tutulur. 12 saat sonra, tanktaki suya birkaç dakika boyunca $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ çözeltisi ile muamele edilir. Bu şekilde çözeltideki klor nötralize edilmiş olur. Sterilizasyon süresi boyunca tank orta derecede havalandırılır. Tanklara besi ortamı olarak zirai gübre kullanılarak hazırlanır. Alg ekim işlemi ise 100 L'lik deniz suyuna 5 L'lik erlenden mikro alg ekimi yapılarak gerçekleştirilir. 100 L'lik tanktaki mikro algin tamamı 1 m³'lük tanka ekilir [6].

1.1.6.3. Kitlesel alg kültürü

Yoğun alg üretimi için 5-30 m³ hacme sahip fiberglas tanklar kullanılır. Mikroalg gelişiminin daha hızlı gerçekleşmesi için tanklar güneş ışınlarını direkt almalıdır. Bunun için tankların doğrultusu ise doğu-batı yönlü olarak ayarlanır [6].

Tanklar homejen dağılma olacak şekilde karıştırılır. Bunun için ortama kuvvetli bir havalandırma sistemi kurulur. Havalandırma işlemi tankın tabanına tank cidarından 30 cm uzaklıkta olacak şekilde 1.5 cm çapındaki bir hortum monte edilerek gerçekleştirilir. Hortum üzerine havalandırma delikleri açılır. Bu havalandırma delikleri arasında 10 cm bulunmalı ve her birinin çapı 1 mm olmalıdır. Ayrıca, tankın tabanına havalandırma taşı konularak daha etkili bir havalandırma sağlanabilmektedir [6].

Bu tankların dezenfeksiyonu için ise büyük hacimlerde alg kültüründe belirtilen esaslara göre sterilizasyon yapılır. 1 m³ ve 5 m³'lük tanklarda yetiştirilen kültür sırasıyla 5 m³ ve 30 m³'lük tanklara aşılır [6].

1.1.7. Alglerin Yetiştirilmesini Etkileyen Faktörler

1.1.7.1. Işık

Işığın yoğunluğu ve dalga boyu alglerin gelişimi için önemlidir. Sistemde alglerin yoğunluğu arttıkça suyun geçirgenliği azalır ve altta kalan alglere ışık yeterli miktarda ulaşamaz. Bu durumu en aza indirgeyebilmek için mor veya mavi ışık kullanılabilirler. Çünkü mor ve mavi kültür sisteminin derinlerine kadar ulaşabilmektedirler [7-9]. Ancak her alg türü ışığı sevmemektedirler. Işığı seven alglere fotofil, karanlığı seven alglere ise siyafil denilmektedir [10].

1.1.7.2. Sıcaklık

Sıcaklık faktörü alglerin üreme hızlarını sınırlayan bir faktördür. Genel olarak algler 15°C ve 35°C arasında üreyebilmektedirler. Sıcaklık değişimleri alglere zarar verebilmektedir. Özellikle Akdeniz algleri sıcaklık değişimine daha fazla hassastır [7, 11, 12].

1.1.7.3. Oksijen

Alglerin üremesi için gerekli olan en önemli faktörlerdendir. Fotosentez yaparak oksijen üretimi yapabilmektedirler. Ancak yüzeyin atmosfere açık olması veya havalandırılması gerekmektedir. [7, 9, 10, 13]. Oksijenin olmadığı ortamlarda alg bulunmaz [8, 9].

1.1.7.4. Karbondioksit

Atmosferde çok yoğun olmadığı için sisteme CO₂ beslemek gerekebilmektedir. Çünkü alglerin fotosentez yapabilmeleri için CO₂ gereklidir [7, 14, 15].

1.1.7.5. pH

Alglerin genelde yetiştiği pH aralığı 8.1-8.3 arasındadır. Bunun için kullanılan besi ortamının pH aralığının yetiştirilecek olan alge uymasına dikkat edilmelidir [16, 17]. Ortamdaki CO₂ yetersizliği yüzünden HCO₃ iyonları CO₃ iyonlarına dönüşür. Bu yüzden ortamın pH'ı 10'a yükselir. Çoğu alg pH 10'a tolerans göstermesine rağmen kırmızı algler tolerans gösteremezler [7, 8, 18].

1.1.7.6. Tuzluluk

Denizde yaşayan algler için çok önemli bir parametredir. [7, 19] Algin ozmotik basıncının dengelenmesi bu tuzluluk oranına bağlıdır [7, 20].

1.1.7.7. Vitamin

Birçok algin gelişimi için vitamin gerekli bir parametredir. İhtiyaç duydukları başlıca vitaminlere örnek olarak B12, biyotin ve tiyamin gösterilebilmektedir [21, 22].

1.1.7.8. Karıştırma

Sistemin karıştırılması daha önce bahsedilmiş olan faktörlerin homojen olarak dağılmasını sağlamaktadır. Karıştırma işlemi algin solunum ve fotosentez yapmasını arttırmaktadır [7, 23].

1.2. Ekstraksiyon ve Mikrodalga Ekstraksiyonu

Mikro algler, bitkiler için kullanılan ekstraksiyon yöntemleri ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmaktadırlar [24]. Bu bileşikler birçok farklı sanayi de kullanılmaktadırlar [25, 26].

Ekstraksiyon teknolojisinin biyokimyasal seçimindeki temel parametreler aşağıda verilmiştir:

- Ekstrakte edilmiş moleküllerin özellikleri,
- Hız,
- Kullanılan çözücü,
- Ekstraksiyon verimi,
- Seçicilik,
- Ekstrakt moleküllerinin kimyasal değişime karşı korunması,

- Ebat,
- Maliyet,
- Uygunluk [27].

Maserasyon (bazı bitkilerin içindeki özü elde etmek için suda bekletme yöntemi), filtrasyon, karşı akım ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu ve Soxhlet ekstraksiyonu lipitleri ve pigmentleri çıkarmak için kullanılan yaygın teknolojilerdir. Bununla birlikte, büyük miktarlarda çözücü, moleküllerin termal denatürasyona (protein veya nükleik asitlerin yapısındaki sekonder, tersiyer ve kuaterner yapılarının bozularak primer yapılara dönüşmesi) uğramasına neden olmaktadır [27].

Pigmentlerin kimyasal dönüşümünü engellemek için birçok teknik kullanılmaktadır. Örneğin oksidasyon ve termal denatürasyondan kaçınmak için algler dondurulabilmektedir, dondurularak sadece kurutulabilmektedir veya su buharı ile doymuş atmosferlerde saklanabilmektedirler [28].

Farklı bileşikler için farklı ekstraksiyon yöntemleri vardır. Örneğin, fikosiyanın bileşiğinin ekstraksiyonu ele alınacak olursa; siyanobakteriler sıvı azotta maserasyon işlemine tabi tutulduktan sonra %50 amonyum sülfatta pigment ekstraksiyonu işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu şekilde fikosiyanın elde edilmektedir [29].

Ekstraksiyonun pH'ı çözelti içinde sıkıca kontrol edilmelidir. Çünkü birçok porfirin pigmenti asidik veya alkali koşullarda reaksiyona girebilmektedir. Hejazi ve arkadaşları biyoyumlu bir yöntem önermişlerdir. Bu yöntemle göre, *Dunaliella salina* hücrelerinden karotenoid çıkarmak için çözücü pH'ını Log P (octanol)> 6 olması gerektiği belirtilmiştir [30].

Biyoteknoloji alanında genellikle yeşil algler kullanılmaktadır. Çünkü bu algler karbonhidratça zengindir [24, 31, 32]. Mesela *Spirulina platensis* algini incelediğimizde %55-70 protein, %15-25 karbonhidrat ve %18 lipit bulunmaktadır. Ayrıca içeriğinde vitamin, mineral, klorofil, karotenoid ve fikosiyanın gibi bileşiklerde bulundurmaktadır [33, 34].

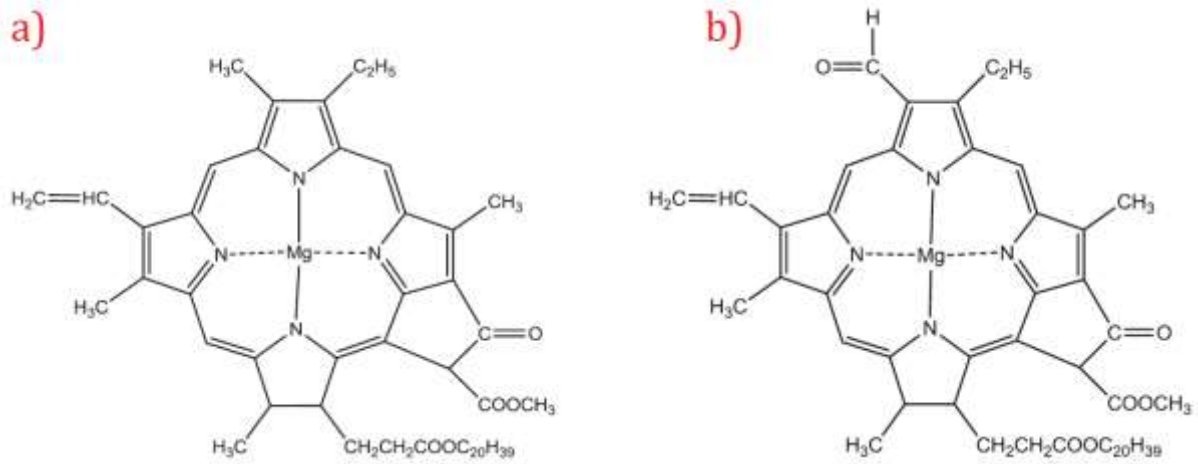
Alglerinde ekstrakte edilmesi zor bileşenler de vardır. Bu bileşenler genellikle karbonhidrat içerikli bileşenlerdir. Bu bileşenler yüksek ekstraksiyon ısısı, uzun süre ve çözücü olarak toksik madde kullanımını gerektirmektedir. Bu koşullar ekstraktın bozulmasına, çevre kirliliğine ve insan sağlığının bozulmasına yol açmaktadır. Bu koşulların iyileştirilmesi düşüncesi mikrodalga ekstraksiyon sistemi, süperkritik ekstraksiyon sistemi, yüksek basınçlı homojenizatör ekstraksiyon sistemi, hidrotermal ekstraksiyon ve ultrasonik ekstraksiyon sistemini ön plana çıkarmaktadır [35, 36].

Mikrodalga ekstraksiyonunun birçok avantajları vardır. Bunlardan en önemlileri ekstraksiyon süresinin minimize edilmesi, çözücü tasarrufu, yüksek kalitede ekstrakt ve yüksek

oranda verim elde edilmesidir. Bu avantajları mikrodalga ekstraksiyonunu geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden daha avantajlı olmasını sağlamaktadır [37-39].

1.3. Klorofil

Klorofil bitkilerin yeşil gözükmesini sağlayan pigmentdir. Bu pigment bitki hücreesindeki kloroplast organellerinde bulunur.

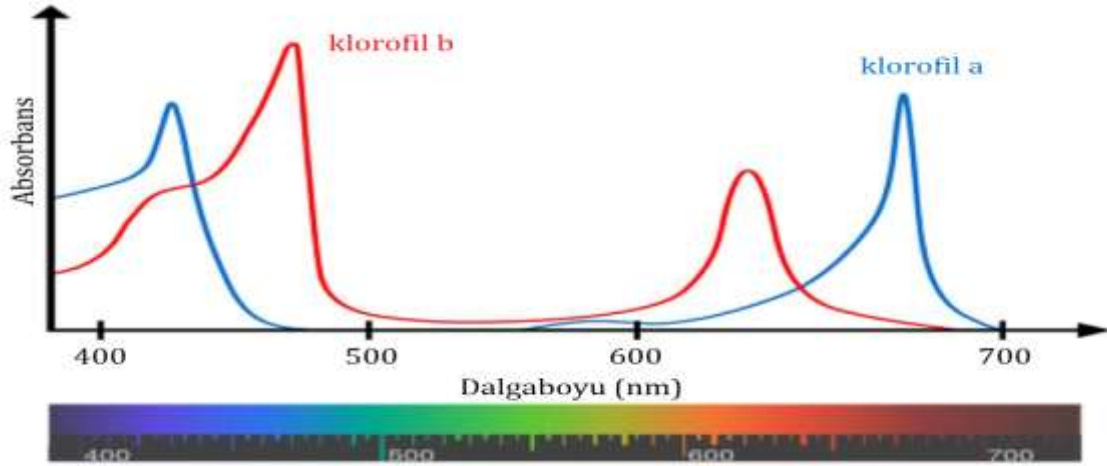


Şekil 1.1. (a) Klorofilin a'nın kimyasal yapısı, (b) klorofilin b'nin kimyasal yapısı [40].

Klorofilin yeşil gözükmesini sağlayan yapısında bulunan magnezyum elementidir. Bu element güneşten aldığı ışığın yeşil rengini yansıtır. Fotosentez yapmak için ise mor ve kırmızı renkleri kullanır.

Fotosentez canlılığın devamı için önemli bir yere sahiptir. Fotosentezin gerçekleşmesi için ise klorofil gereklidir.

Yeşil bitkiler de klorofil a ve klorofil b olmak üzere 2 farklı klorofil cinsi bulunmaktadır (Şekil 1.1). Birbirinden farklı olmasının sebebi klorofil a'nın metil grubu içerirken klorofil b'nin formil grubu içermesidir. Bu farklılık güneş ışınlarını yansıtmaalarında küçük farklılıklara sebep olur [41].



Şekil 1.2. Klorofilin a ve klorofil b'nin UV spektrometredeki dalga boyları [40].

Klorofilin a ve klorofil b yeşil bitkilerde bulunan toplam pigmentlerin %25'ini oluşturmaktadır [41]. Şekil 1.2.'de klorofil a ve klorofil b'nin UV spektrometre deki spektrum taraması verilmiştir. Klorofil a'nın dalga boyu 662 nm iken, klorofil b'nin dalga boyu ise 654 nm'dir.

1.3.1. Klorofilin Analizi

Klorofilin HPLC ve UV spektrometre olmak üzere iki yöntem ile analiz edilir.

1.3.1.1. HPLC Yöntemi ile Klorofil Analizi

HPLC sisteminde solvent içerisinde çözünmüş klorofil bileşenleri kolon içindeki katı bir sabit faza tutunarak sisteme girerler. Kolonu terk ettikleri süre klorofilin cinsini tespit etmemizi sağlar [42, 43].

Kolondan ayrılan bileşiğin klorofil olup olmadığını tespit etmek için, kolon çıkışına bir dedektör monte edilmiştir. HPLC temel prensip, durgun faz ve hareketli faz arasında meydana gelen kütle transferidir. Yani hareketli fazın durgun faz içerisindeki kat ettiği yol bize maddenin cinsini verir. Çünkü her maddenin farklı çözücülerdeki kütle transferi süresi farklıdır. Bu süreye alıkonma süresi olarak ifade edilir [42]. Literatürde klorofil a'nın alıkonma süresi 27 dakika iken klorofil b'nin alıkonma süresi 16 dakika olarak tespit edilmiştir [43].

1.3.1.2. UV Spektrometre Yöntemi ile Klorofil Analizi

UV spektrometre yöntemi ile elde edilen sonuçlardan klorofil konsantrasyonunu hesaplamak için genel olarak iki yaygın yöntem kullanılmaktadır. Bunlar:

- Kalibrasyon doğrusu yöntemi
- Kantitatif yöntem

Kalibrasyon doğrusu yönteminde; numuneden farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak UV spektrometrede okunan dalga boyu absorbans değerleri grafiğe geçirilerek çizilir.

Kantitatif yöntemde ise klorofilin cinsine uygun dalga boylarının absorbans değerleri eşitlik 1'de yerine yazılarak istenilen klorofil cinsinin konsantrasyonu bulunur.

$$\text{Chl}(\mu\text{g/mL}) = E_{\lambda 1} \times A_{\lambda 1} + E_{\lambda 2} \times A_{\lambda 2} + E_{\lambda 3} \times A_{\lambda 3} + \dots + E_{\lambda n} \times A_{\lambda n} \quad (1)$$

Chl = Klorofil miktarı

$E_{\lambda n}$ = λn dalga boyundaki absorbans katsayısı

$A_{\lambda n}$ = λn dalga boyundaki pigment ekstraktının absorbansı

Eşitlik 1'de gösterilen n ise klorofilin türüne göre dalga boyunu ifade etmektedir.

Absorbans katsayısı farklı çözücüler ve farklı pigmentler için değişkenlik göstermektedir. Bu sabitler önceden hesaplanmış değerlerdir [44].

1.3.2. Klorofilin Tıbbi Açısından Önemi

Klorofil tıbbi açıdan önemli bir yere sahiptir.

- Cilt hastalıklarında, hemoglobinin eksikliği bozukluklarında,
- Deodorant olarak kötü kokuların gideriminde,
- Yara ve enfeksiyon tedavileri,
- Kanseri tedavilerinde,

kullanılmaktadır.

Klorofil pigmentinin doğada yaklaşık 109 tonu vardır. Ve hepsi biyosentez reaksiyonlarında yer almaktadır. Klorofil yeşil sebze ve meyvelerde çokça bulunmaktadır [45]. Her gün insan vücudu yaklaşık olarak 26-86 mg klorofil yeşil sebze ve meyvelerden almaktadır [46]. Her gün vücudumuza giren klorofil kanserojen ve mutajen maddelere kenetlenir ve onları degrade etmektedir [47-49]. Serbest halde bulunan kanser hücrelerini yok ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca ultrason cihazlarında kullanılan misellerde bulunan klorofil

görüntülemeye önemli bir yere sahiptir [50]. Klorofilin sağlık alanında kullanıldığı yerlere daha pek çok örnek verilebilir.

Klorofil insan vücuduna yalnızca besin yolu ile değil serum yolu ile de aktarılabilir. Bunu için klorofilin suda çözünür bir karışımı olan bakır klorofil kullanmışlardır. Bu klorofil karışımı insan vücudundaki organlara kolaylıkla girebilmektedir [51]. Farelerin vücudunda yapılan deneylere aflatoksin ve diğerler kanserojen maddelerin vücuttan uzaklaştırılmasında olumlu sonuçlar alınmıştır. Fareler üzerinde yapılan bu deney klorofilin kanserojen maddeleri vücuttan uzaklaştırdığını göstermektedir [52, 53].

Yukarıda ifade edilen bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında *Dunaliella tertiolecta* alginin farklı koşullarda yetiştirmesi ve çeşitli ekstraksiyon metodları ile elde edilen klorofil a'nın ekstrakt veriminin birbiri ile karşılaştırılması yapıldı. Alg yetiştirme süreçlerinde; alg üremesine etki edecek üç ayrı parametre belirlendi. Bu parametreler farklı mevsim koşulları, farklı ışık kaynakları ve demir iyonunun etkisi olarak seçildi. Klorofil a ekstraksiyon sürecinde mikrodalga ısıtmalı ekstraksiyonu, Soxhlet ekstraksiyonu, santrifüj ekstraksiyonu ve ultrasonik ekstraksiyonu yöntemlerinin birbiri ile karşılaştırılması yapıldı. Ayrıca mikrodalga ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen klorofil a ekstraktının Cevap Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology - RSM) ile optimum verim koşulları incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

Klorofil canlı hayatı için çok önemli bir maddedir. Son yıllarda sağlığa faydaları keşfedildiği için üzerine de birçok çalışma yapılmaktadır. Klorofil ile ilgili yapılan bu çalışmaların verdiği olumlu sonuçlar bilim insanlarını oldukça mutlu etmektedir. Bu çalışmaların bazıları ilerideki bölümlerde yer alacak olan Tablo 2.7., 2.10., 2.11., 2.13.'de verilmiştir.

2.1. Alg Üretim Çalışmaları

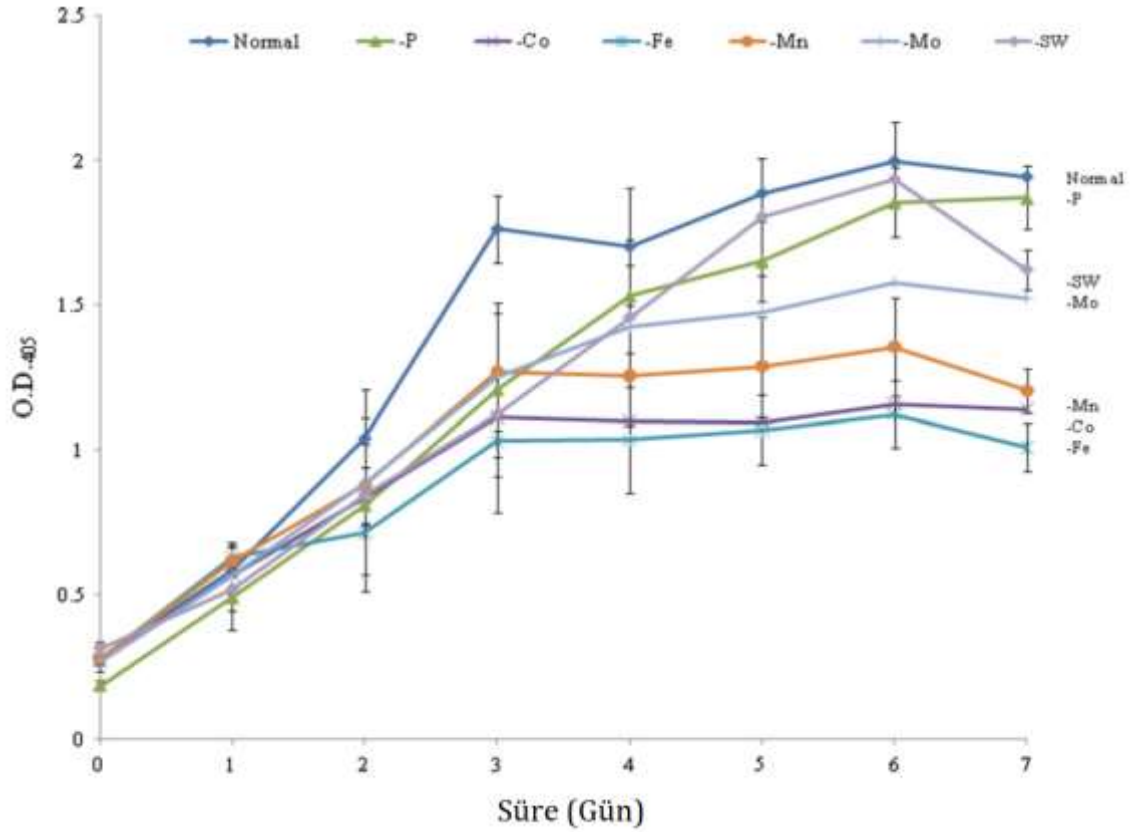
Jaime Fábregas ve arkadaşları *Dunaliella tertiolecta*'nın amonyumlu ortamda ve azotlu ortamda büyüme oranındaki artışı incelemişlerdir. Hazırlanan ortamlarda konsantrasyon oranı 0.25 ile 16 mg atom N/L arasında değişen amonyum klorür, amonyum sülfat, amonyum nitrat ve amonyum karbonat çözeltilerini sisteme ayrı ayrı eklenerek büyüme koşullarını gözlemlenmiştir. *Dunaliella tertiolecta* alginin üreme hızı durağan faza geçtiğinde üretim aşaması sonlandırılmıştır. Alg üretim miktarında ortamdaki amonyum-N konsantrasyonu arttıkça artış gözlemlenmiştir. Maksimum hücre yoğunluğunu elde etmek için optimal büyüme koşullarının, 1.86×10^6 hücre/ml ve 2.81×10^6 hücre/mL arasında, olduğunu ifade edilmiştir. Tablo 2.1'de gösterildiği gibi sistemlerde kullanılan tüm amonyum-N bileşiklerin protein, karbonhidrat, lipit ve klorofil oranında artışa sebep olduğunu tespit edilmiştir. En çok artış gösteren hücresel bileşiğin protein olduğu gözlemlenmiştir.

En yüksek protein miktarının amonyum klorürlü (NH_4Cl) ortamda 8 mg atom N/L konsantrasyonda, amonyum sülfatlı ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ortamda 32 mg atom N/L konsantrasyonda, amonyum nitratlı (NH_4NO_3) ortamda 32 mg atom N/L konsantrasyonda, amonyum karbonatlı (NH_4CO_3) ortamda ise 32 mg atom N/L konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir [54].

Tablo 2.1. Farklı amonyum-N bileşenleri ile üretilmiş *Dunaliella tertiolecta*'nın Protein (p), lipit (l) ve karbonhidrat (c) içeriği [54].

NH ₄ -N (mg atom N/L)	Amonyum kaynağı											
	Klorid			Sülfat			Nitrat			Karbonat		
	p	l	c	p	l	c	p	l	c	p	l	c
0.25	19.9	60.1	19.9	34.6	49.5	15.8	17.5	64.2	18.1	36.9	51.6	11.3
0.50	41.5	39.7	18.7	39.2	46.1	23.4	35.4	42.6	21.8	43.4	44.6	11.9
1	41.4	36.1	22.3	36.4	35.5	28.0	33.0	37.8	29.1	44.3	34.5	21.1
2	42.7	32.1	25.1	44.8	29.4	25.7	40.6	27.5	31.8	44.9	31.0	23.9
4	50.4	28.0	21.5	43.7	29.3	26.8	49.5	26.3	24.0	55.9	21.9	22.0
8	57.7	23.0	19.2	45.8	31.0	23.1	57.0	24.0	18.8	58.8	22.7	18.4
16	55.2	20.9	23.7	52.3	27.7	19.8	58.4	20.0	20.7	66.0	19.0	14.9
32	57.5	22.0	20.3	60.3	24.8	14.7	63.3	17.0	19.5	72.5	16.1	11.3

Meng Chen ve arkadaşları, *Dunaliella tertiolecta* alginin besin gereksinimlerinin belirlenmesi üzerine bir profili geliştirmişlerdir. PO₄⁻³, Co⁺², Fe⁺³, Mo⁺², Zn⁺², Mn⁺² ve azot iyonlarının maksimum alg üretimi için gereken oranı tespit edilmiştir. Şekil 2.1.'deki verilere göre maksimum alg üretimi için gereken azot iyonunu NH₄⁺ yerine NO₃ bileşiğinden temin etmenin daha verimli olduğu tespit edilmiştir. En yüksek hücre artışı normal besi ortamında elde edilmiştir. Ancak eklenen iyonlardan alg üremesini en çok arttıran iyonun PO₄⁻³ iyonu olduğu anlaşılmıştır. Hücrelerdeki lipit oranının da maksimum artışın azot iyonu varlığında gerçekleştiğini gözlemlenmiştir. Ancak azotlu ortamda hücre ölümleri meydana geldiğinden dolayı 7 gün sonra en çok lipit miktarının normal besi ortamında oluştuğu tespit edilmiştir [55].



Şekil 2.1. PO_4^{3-} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mo^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ve azot iyonlarının, *Dunaliella tertiolecta*'nın üreme miktarına etkisi [55].

2.2. Mikrodalga Ekstraksiyonu Çalışmaları

Xu Zhou ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada lipit oranı yüksek olan *Scenedesmus* mikroalginden mikrodalga ekstraksiyon yöntemi ile lipit elde edilmiştir. Bu çalışmada mikrodalga ekstraksiyon sisteminde çözücü olarak 3:2 (V:V) oranında n-heksan/izopropanol kullanılmıştır. Optimum ekstraksiyon parametreleri 130°C, 15 dakika, çözücü/alg oranını faz oranı 50:1(mL:g) olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışma sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, N-heksan / izopropanolün çözücü oranları, faz oranları ve ekstraksiyon tekrarları faktörlerinin optimum aralığı bulunması için lipit geri kazanım oranları kullanılmıştır. Bu sayede FAME oranı tespit edilmiştir. Deneyleri tasarlamak için L8 (44×2) dikey tablo kullanılmıştır. Seçilen faktörlerden A çalışma sıcaklığını, B ekstraksiyon süresini, C solvent oranlarını, D faz oranlarını, E ekstraksiyon tekrarlarını göstermektedir. İşlem sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, solvent oranları ve faz oranları için 4 seviye ve ekstraksiyon süreleri için 2 seviye seçilmiştir. Seçilen faktörlere karşılık gelen seviyeler Tablo 2.2.'de ve deneylerden elde edilen sonuçlar Tablo 2.3.'de gösterilmiştir. Sonuç olarak optimum koşullarda mikrodalga ekstraksiyon sisteminin geleneksel su banyosu ısıtma

ekstraksiyon sistemine göre %88.25 daha fazla lipit ve %95.58 yağ asidi metil esterleri elde edildiğini tespit edilmiştir. [56].

Tablo 2.2. Seçilen faktörler ve karşılık gelen seviyeler [56].

No.	Sıcaklık	Faktor			
		Ekstraksiyon Süresi (min)	Çözücü Oranı	Faz Oranı	Tekrar
1	60	5	3:2	50	1
2	80	10	1:1	100	
3	100	15	2:3	200	2
4	120	20	1:2	300	

Tablo 2.3. Ortogonal deney sonuçları [56].

Deney	Faktör					Lipit Geri Kazanım Oranı (%)	FAME Verim Oranı (%)
	A	B	C	D	E		
1	100	20	3:2	100	2	19.62	8.91
2	120	10	3:2	200	1	19.68	11.15
3	100	5	2:3	300	1	15.55	2.99
4	120	15	2:3	50	2	21.20	8.31
5	60	5	1:2	200	2	11.70	2.06
6	80	15	1:2	100	1	12.80	10.90
7	60	20	1:1	50	1	9.43	3.43
8	80	10	1:1	300	2	18.03	3.94

C. Onumaegbu ve arkadaşları mikrodalga ekstraksiyonu yöntemi ile *Scenedesmus quadricauda* microalginden lipit ekstrakte etmişlerdir. *Scenedesmus quadricauda* algi 500 cm³ metanol ve 10 mL sülfürik asit karışımı kullanılarak ekstrakte edilmiştir [57].

Tablo 2.4. Box-Behnken Proses parametresinin çıkış cevabı (% geri kazanılmış lipitler) üzerindeki etkilerini gösteren deneysel tasarım matrisi [57].

	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Sonuç
	Güç (W)	Isıtma Süresi (min)	Ekstraksiyon Süresi (h)	% Lipit Geri Kazanımı
1	180	5	3	14.01
2	180	2	3.5	14.44
3	180	8	3.5	10.83
4	180	5	4	18.86
5	390	2	3	18.87
6	390	8	3	18.87
7	390	5	3.5	32.43
8	390	5	3.5	11.68
9	390	5	3.5	25.46
10	390	2	4	14.44
11	390	8	4	37.84
12	600	5	3	32.43
13	600	2	3.5	18.69
14	600	8	3.5	48.65
15	600	5	4	25.45

Tablo 2.4.'deki on beş adet deneysel sonuçla *Scenedesmus quadricauda*'nın geri kazanılan lipit yüzdelerinin % 14.01 ile % 48.65 arasında değiştiği gösterilmiştir. Tablo 2.4'den yola çıkarak mikrodalga ekstraksiyon metodu ile yüksek oranlarda lipit elde etmek için mikroalg optimum koşulların; 600 W gücü, 8 dakikalık ısıtma süresi ve 3.5 saatlik ekstraksiyon süresi olduğunu tespit edilmiştir [57].

Xiao-Hua Xiao ve arkadaşları *Undaria pinnatifida* ve *Spergo fusiforme* alglerinden fitosterollerin mikrodalga ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmesi üzerine çalışmışlardır. Yapılan çalışmada ekstraksiyon parametreleri, mikrodalga gücü, çözücü/alg oranı, aydınlatma süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Mikrodalga ekstraksiyon sisteminin parametrelerinin optimum koşulları 500 W güç, 20:1 mL/g çözücü/alg oranı, 130°C sıcaklık ve 20 dakika olarak tespit edilmiştir. Mikrodalga ekstraksiyon yöntemi için kullanılacak çözücü karışımı n-hekzan/asetonitril/metanol 5:5:3 (v:v:v) olarak seçilmiştir. Tablo 2.5.'deki sonuçlara göre ekstraksiyon için kullanılan 15 g *Undaria pinnatifida* alginden toplamda 13 mg fukosterol, 1.5 mg 24-metilenkolesterol ve 10.7 mg fitol çıkartılmıştır. 15 g *Spergo fusiforme* alginden ise ekstraksiyon sonucu 4.6 mg fukosterol, 0.3 mg 24-metilenkolesterol ve 3.5 mg fitol ekstrakte

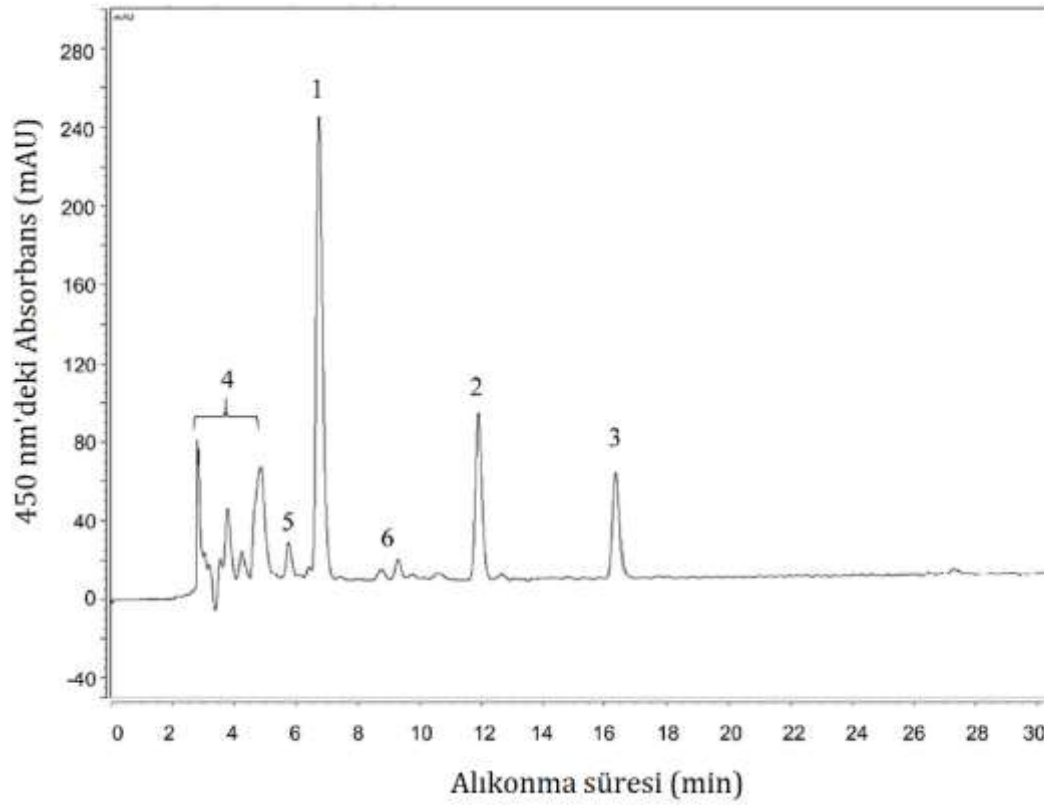
edilmiştir. Elde edilen 24-metilenkolesterol, fitol, fukosterol bileşenleri Yüksek Hızlı Karşı Akım Kromatografisi'nde (High-Speed Counter-Current Chromatography - HSCCC) saflaştırılmıştır [58].

Tablo 2.5. Ekstraksiyon ve saflaştırma sonuçları [58].

Numune	Numune	Fukosterol		Fitol		24-Metilenkolesterol	
	Miktarı (g)	Miktarı (mg)	Safılık (%)	Miktarı (mg)	Safılık (%)	Miktarı (mg)	Safılık (%)
<i>Undaria pinnatifida</i>	15.0	13.0	982	10.7	97.3	1.5	97.0
<i>Spergo fusiforme</i>	15.0	4.6	97.6	3.5	97.4	0.3	97.4

2.3. Ekstraksiyon Çalışmaları

Sayali Kulkarni ve Zivko Nikolov, donmuş *Chlorella vulgaris* alginin etanol ile çözücü ekstraksiyonuna tabi tutularak karotenoidlerin ve klorofillerin elde edilmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Etanol ile edilen ekstraktın içeriği lutein, klorofil a ve klorofil b olarak tespit edilmiş ve toplamda 5.4 mg/g klorofil a ve 15.4 mg/g klorofil b ekstrakte edilmiştir. Şekil 2.2.'de tespit edilen bileşenlerin HPLC'deki analiz sonuçları gösterilmektedir. Elde edilen bu pigmentlerin etanol ile ekstraksiyonu sırasında, protein çözünürlüğünün de etkilendiği kanatine varılmıştır. Bu etkilenme, pigment ekstraksiyonundan önce protein ekstraksiyonu yapıldığında algden proteinlerin tamamen ayrıştırıldığını göstermektedir. Proteinlerin parçalanması, iki aşamalı bir membran filtrasyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin %78-80'i sistemden bu sayede ayrılmıştır. Protein ekstraksiyonu yöntemi olarak boncuklu öğütme yöntemi kullanılmıştır. Protein ekstraksiyon sistemi 15000 psi de 6 dakika homojenizasyona tabi tutularak gerçekleştirilmiştir. Alg biyo kütesinden her iki yöntem ile ayırdıkları protein ekstraktının gıda endüstrisinde kullanılabilir olduğunu tespit edilmiştir [59].



Şekil 2.2. *Chlorella vulgaris* alginden etanol ile ekstrakte edilmiş olan bileşiklerin HPLC kromatogramı: 1 - lutein, 2 - klorofil b, 3 - klorofil a, 4 - tanımlanamayan, 5 ve 6 - diğer karotenoidler [59].

R.C. Thompson ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada mikroorganizma karışımından klorofil a'nın ekstrakte olması için metanol ile çözücü ekstraksiyonu yapılmıştır [60].

Tablo 2.6. Üç ardışık ekstraksiyon sürecinde ekstrakte edilen klorofil miktarı. İlk ekstraksiyonun etkinliği, toplam ekstraksiyonun yüzdesi olarak ifade edilir ve önemli farkların yönü gösterilir (N=6) [60].

Çözücü	Toplam Ekstraksiyon/ μg cm^{-2}	İlk Ekstraksiyonun Verimliliği	Önemli Farkların Yönü Tükiye'nin İkili Karşılaştırmalar Testi
Oda sıcaklığı metanol 100% (om 100)	5.65 $\pm$ 0.29	96	om 100 > se 90, > sa 90
Sıcak methanol 100% (sm 100)	6.33 $\pm$ 0.72	97	sm 100 > se 90, > sa 90
Sıcak methanol 95% (sm 95)	5.34 $\pm$ 0.32	98	sm 95 > se 90, > sa 90
Sıcak ethanol 90% (se 90)	5.64 $\pm$ 0.38	88	om 100, sm 100, sm 95, < se 90 > sa 90
Soğuk acetone 90% (sa 90:	5.72 $\pm$ 1.41	42	om 100, sm 100, sm 95, < sa 90
Cochran'ın test kriteri, 0.05=0.507			K=0.298

Metanolun tek ekstraksiyon basamağında klorofil a'nın %96'ini ekstrakte eden verimli bir çözücü olduğun tespit edilmiştir. Etanolün ise klorofil a'nın %88'ini ekstrakte ettiği ve asetonunda %50'den daha az klorofil a'yı ekstrakte ettiği saptanmıştır. %100'lük metanolden klorofil a elde etmek için oda sıcaklığında, 15 saat boyunca ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan bu yöntem ile ısıtma ve santrifüjleme ile gerçekleştirilen ekstraksiyon deneylerinden % 25 daha az deney kontrolü gerektiren bir sistem oluşturulmuştur [60].

Çözücü ekstraksiyonu ile yapılan diğer çalışmalar Tablo 2.7.'de verilmiştir.

Tablo 2.7. Çözücü ekstraksiyonu ile klorofil ekstraksiyon çalışmaları.

Kaynak	Ekstraksiyon	Numune	Çözücü	Numune	Ekstrakt
--------	--------------	--------	--------	--------	----------

	Türü	Türü	Miktarı	Miktarı-Verim (Klorofil a'ya göre)
[61]	Soxleth ekstraksiyonu	<i>Chlorella vulgaris (alg)</i>	metanol	0.164 g
			etanol	1.329 g
			aseton	3.206 g
		Bezelye yaprağı	aseton	2.6 mg/g
[62]	Çözücü ekstraksiyonu		dimetil sulfoksit	2.6 mg/g (15min)
		Kemer	aseton	2.2 mg/g
		Sardunyası yaprağı	dimetil sulfoksit	2.2 mg/g (30 min)
			aseton	2.3 mg/g
		Limon yaprağı	dimetil sulfoksit	2.2 mg/g (120 min)
			aseton	1.4 mg/g
		Sarıçam yaprağı	dimetil sulfoksit	1.4 mg/g (360 min)
		Beyaz çiçekli yalancı akasya yaprağı		%1.625
[63]	Çözücü ekstraksiyonu	Sarıçam yaprağı	metanol ve etanol 1:1(v/v)	%0.379
		Eşek Marulu		%1.475
		<i>Chlorella sp.</i>		%4.460
[64]	Çözücü ekstraksiyonu	<i>Grimmia laevigata</i>	aseton	4.00 mg/g
			dimetil sulfoksit	3.78 mg/g

M. D. Macías-Sánchez ve arkadaşları *Nannochloropsis gaditana* algisi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, *Nannochloropsis gaditana* dondurulması ile elde edilen bir kuru alg tozundan karotenoid ve klorofili ekstrakte etmek için süperkritik CO₂ ekstraksiyonu sürecini kullanılmıştır. Bu çalışmada sistem üzerinde basıncın ve sıcaklığın etkisi tespit edilmiştir.

Çalışma koşullu olarak; 100, 200, 300, 400 ve 500 bar basınç ve 40, 50 ve 60°C sıcaklık seçilmiştir. Ekstraktların analiz için UV spektrometre kullanılmış ve 665 ve 480 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Tablo 2.8.'de gösterildiği gibi pigmentlerin ekstrakte edilmesinde maksimum verim 400 bar ve 60°C'de sağlanmıştır. Tablo 2.8.'deki sonuçlar karotenoidlerin ve klorofilin ekstraksiyonunda optimum sıcaklığın 60°C olduğunu ve en yüksek karotenoid/klorofil oranının 200 bar ve 60°C'de olduğunu göstermiştir. CO₂'in düşük polariteye sahip olması nedeni ile süperkritik CO₂ ekstraksiyonunun, karotenoidlerin ve klorofillerin ekstrakte edilmesinde etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır [65].

Tablo 2.8. 180 dakikalık bir ekstraksiyon süresi için elde edilen karotenoid ve klorofil verimi [65].

Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Karotenoid verimi (µg karotenoid/mg kuru ağırlıkta mikroalg)	Klorofil verimi (µg klorofil a/mg kuru ağırlıkta mikroalg)	karotenoid/klorofil
40	100	0.00	0.00	-
50	100	0.00	0.00	-
60	100	0.00	0.00	-
40	200	0.152	0.290	0.524
50	200	0.152	0.371	0.410
60	200	0.125	0.090	1.389
40	300	0.208	0.807	0.258
50	300	0.248	1.076	0.230
60	300	0.250	1.399	0.179
40	400	0.125	1.088	0.115
50	400	-	1.000	-
60	400	0.343	2.238	0.153
40	500	0.104	0.809	0.129
50	500	0.180	1.390	0.129
60	500	0.252	2.097	0.120
Metanol Ekstraksiyonu		0.8	18.5	0.043

A. Catarina Guedes ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada *Scenedesmus obliquus* alginden karotenoid ve klorofil elde edilmesi için süperkritik akışkan ekstraksiyonunu kullanılmıştır. Bu çalışmada basıncın, sıcaklığın, CO₂ akış hızının ve polar yardımcı çözücünün; karotenoidlerin ve klorofillerin ekstraksiyon verimleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Tablo

2.9'de ifade edildiği üzere en yüksek klorofil ekstraktı verimi 250 bar ve 40°C'de elde edilmişken, en yüksek karotenoid ekstraktı oranı ise 250 bar ve 60°C'de ortaya çıkmıştır. CO₂ yalnız kullanıldığında basıncın artması ile klorofill ekstraktı veriminin de zamanla arttığını saptanmıştır. Ancak sıcaklık ve CO₂ akış hızı arttığı zaman, klorofil ekstraktı veriminde azalma olduğunu tespit edilmiştir. Çözücü konsantrasyonunun olduğu durumlarda en yüksek klorofil ekstraktı verimi, CO₂ akış hızı dakikada 4.3 g olarak ayarladığında ortaya çıkmıştır. CO₂ akış hızının artması klorofil ekstraktı verimini arttırmasına karşın karotenoid ekstraktı verimine olumlu veya olumsuz bir etkisi olmamıştır. Sistemede yardımcı çözücü olarak etanol kullanıldığında ise hem karotenoid ekstraktında hem de klorofil ekstraktında yalnız CO₂ olan sisteme göre daha fazla verim elde edilmiştir. Tüm ekstrakt verimini arttıran optimum etanol miktarının %7.7 (v/v) oranında olduğu sonucuna varılmıştır [66].

Tablo 2.9. mg/g_{kuru} ağırlıkta biyokütle olarak karotenoidler ve klorofil a, klorofil b ve klorofil c ve toplam karotenoidlerin klorofil a'ya oranı [66].

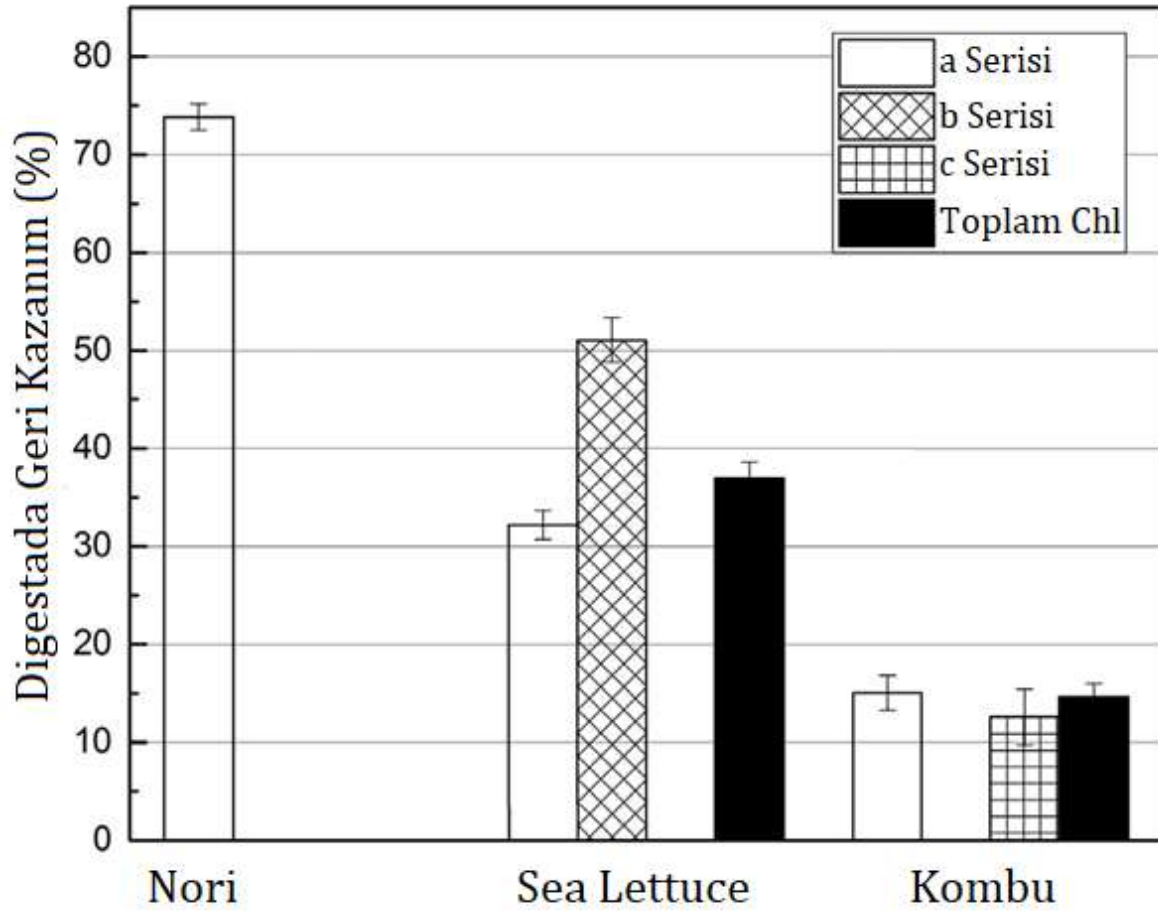
Çalışma koşulları				Verim			Oran	
Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	CO ₂ (g/min)	Çözücü Konsantrasyonu (%)	Cl _a	Cl _b	Cl _c	Car	Car/Cl _a
40	150	2	0	0.004	0.003	0.003	0.020	5.164
40	200	2	0	0.018	0.005	0.003	0.058	3.266
40	250	2	0	0.027	0.023	0.031	0.044	1.596
50	250	2	0	0.023	0.019	0.021	0.038	1.648
60	250	2	0	0.016	0.016	0.011	0.182	11.582
40	250	4.3	0	0.033	0.013	0.014	0.044	1.311
40	250	2	7.7	0.848	0.356	0.018	0.303	0.358
40	250	2	9.5	0.443	0.111	0.027	0.087	0.196
Reference extraction process				24.00	19.04	18.90	17.78	0.741

Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon metodu ile ilgili diğer çalışmalar Tablo 2.10.'da verilmiştir.

Tablo 2.10. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile klorofil ekstraksiyon çalışmaları.

Kaynak	Numune Türü	Çözücü	Numune Miktarı	Ekstrakt Miktarı-Verim (Klorofil a'ya göre)
[67]	Yeşil çay	CO ₂	10 g	2.96 g
[68]	<i>Synechococcus sp.</i>	CO ₂	0.1 g	0.715 mg
	<i>N. gaditana</i>		0.2 g	(60°C, 500 bar) 0.369 mg
[69]	<i>Synechococcus sp.</i>	CO ₂ -etanol	0.1 g	(60°C, 300 bar) 2.218 mg
	<i>Dunaliella salina</i>		0.105 g	(60°C, 400bar) 0.700 mg
[70]	Ispanak	CO ₂	25 g	(50°C, 50MPa, 3h) %44.2
[71]	<i>Chlorella sp.</i>	CO ₂	0.2 g - 1.6 g	%12

Kewei Chen ve María Roca *Porphyra umbilicalis*, *Ulva sp.* ve *Laminaria ochroleuca* alglerinden klorofil elde etme için yaptıkları bu çalışmada santrifüj ekstraksiyon sistemi kullanılmıştır. 0.2 g toz haline getirilmiş her üç alg numunesi ayrı ayrı 30 mL dimetilformamid-su 9:1 (v/v) çözücüsü ile 10 saniye boyunca vorteks işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra 3 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstrakt HPLC'de analiz edilmiştir. Şekil 2.3.'de, alg deki klorofil a, klorofil b ve klorofil c'nin geri kazanım oranı gösterilmektedir. *Porphyra umbilicalis*'in klorofil içeriğinde yalnız %74 oranında klorofil a tespit edilmiştir. Diğer klorofil çeşitleri elde edilememiştir. *Ulva sp.*'de klorofilin a ve b çeşitleri bulunmuştur ve toplam klorofilin geri kazanım oranı %37 olduğu gözlemlenmiştir. Klorofil b'nin ise klorofil a'dan %20 oranında daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *Laminaria ochroleuca*'da ise klorofil b bulunmamaktadır. Klorofil a'nın ise klorofil c'den %3 daha fazla bulunduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak elde edilen en çok klorofil miktarı *Porphyra umbilicalis*'de bulunmaktadır [72].



Şekil 2.3. *Porphyra umbilicalis*, *Ulva sp.* ve *Laminaria ochroleuca* alglerinden ekstrakte edilen klorofil çeşitleri ve toplam klorofil oranları. Nori (*Porphyra umbilicalis*), Sea Lettuce (*Ulva sp.*), Kombu (*Laminaria ochroleuca*) [72].

Literatürdeki diğer santrifüj ekstraksiyonu Tablo 2.11.'de verilmiştir.

Tablo 2.11. Santrifüj ekstraksiyonu ile klorofil ekstraksiyon çalışmaları.

Kaynak	Numune Türü	Çözücü	Numune Miktarı	Ekstrakt Miktarı (Klorofil a'ya göre)
[73]	<i>Palmaria palmata</i>	su	1 g	97.5 µg
[74]	Ispanak	metanol	100 g	0.19 g

Ayyappan Appukuttan Aachary ve arkadaşları kenevir yağıdaki klorofili ekstrakte etmek için ultrasonik ekstraksiyon metodunu kullanmışlardır. Yapılan bu çalışmada kenevir yağı farklı çözücüler ile 20 dakika boyunca %20, %40 ve %60 güçte ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sisteminde dietil eter (960 mL/L), dietil eter, metanol (960 mL/L), metanol, olmak üzere 4 farklı çözücü kullanılmıştır. Tablo 2.12.'deki sonuçlara göre Dietil eter (960

mL/L) çözücüsünde ve %20 güçte en yüksek klorofil a verimi elde edilmiştir. Tüm kullanılan çözücülerde klorofil b'den daha çok klorofil a ekstrakte edildiği gözlemlenmiştir. Ultrasonik sistem de klorofil ekstraksiyonu için gereken optimum çalışma gücünün %20 olduğu sonucuna varılmıştır [75].

Tablo 2.12. Solventlerin ultrasonik ekstraksiyonu işlemi görmüş kenevir yağındaki klorofilin üzerine etkileri. [75].

Çözücü	Ultrasonik Güç (%)	Klorofil a (µg/g)	Klorofil b (µg/g)	Toplam Klorofil (µg/g)
Metanol	0	31.0 ± 0.88	11.6 ± 0.12	42.6 ± 0.99
	20	29.6 ± 0.44	10.8 ± 0.10	40.4 ± 0.41
	40	26.3 ± 0.54	10.2 ± 0.30	36.6 ± 0.78
	60	20.2 ± 0.47	8.1 ± 0.15	28.2 ± 0.46
Metanol (960 mL/L)	0	22.3 ± 0.75	11.2 ± 0.38	33.5 ± 1.09
	20	20.2 ± 0.15	9.9 ± 0.22	30.1 ± 0.37
	40	17.5 ± 0.07	9.1 ± 0.18	26.6 ± 0.21
	60	13.0 ± 0.05	7.3 ± 0.10	20.3 ± 0.06
Dietil eter	0	48.6 ± 0.34	18.3 ± 0.41	67.4 ± 0.72
	20	47.8 ± 0.49	17.5 ± 0.20	65.3 ± 0.61
	40	45.6 ± 0.59	16.9 ± 0.28	62.4 ± 0.85
	60	39.6 ± 0.49	13.7 ± 0.20	53.3 ± 0.61
Dietil eter (960 mL/L)	0	54.0 ± 0.62	17.0 ± 0.40	67.8 ± 1.11
	20	52.1 ± 0.41	15.9 ± 0.56	67.3 ± 0.17
	40	49.5 ± 0.30	15.2 ± 0.10	64.7 ± 0.33
	60	42.3 ± 0.14	13.3 ± 0.47	55.6 ± 0.50

Literatürde yapılan incelemeler sonucunda alglerden klorofil eldesi üzerine farklı ek yöntemlerinin kullanıldığı belirlenmiştir. Bu çalışmalar Tablo 2.13.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.13. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile klorofil eldesinin karşılaştırıldığı çalışmalar.

Kaynak	Numune Türü	Ekstraksiyon Yöntemleri	Çözücü	Numune Miktarı	Ekstrakt Miktarı (Klorofil a'ya göre)
[76]	Domates	Elektroplazmoliz ekstraksiyonu	-	200 g	5.79 g
		Subanyosu ile ekstraksiyon			7.06 g
	Ispanak	Elektroplazmoliz ekstraksiyonu		150 g	11.37 g
		Subanyosu ile ekstraksiyon			10.54 g
[77]	<i>Dunaliella salina</i>	Süperkritik karbondioksit (SC-CO ₂)	CO ₂	0.1 g	0.376 µg
		Ultrasonik ekstraksiyonu	metanol	0.105 g	2.5 µg
		Ultrasonik ekstraksiyonu	DMFA	0.105 g	3.1 µg
		Sonikasyon	ethanol		0.375 mg
[78]	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Sonikasyon	ethanol %95		0.854 mg
		Su banyolu Sonikasyon	dimetil sülfoksit, aseton 2:1(v/v)	-	0.241mg
			etanol %90		0.326mg

Tablo 2.13 (devamı). Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile klorofil eldesinin karşılaştırıldığı çalışmalar.

Kaynak	Numune Türü	Ekstraksiyon Yöntemleri	Çözücü	Numune Miktarı	Ekstrakt Miktarı (Klorofil a'ya göre)
[79]	<i>Selenastrum obliquus</i>	Sonikasyon	metanol	-	1.70 µg
			aseton		0.57 µg
		Su banyolu	metanol		1.50 µg
		Sonikasyon	aseton		0.76 µg
		Doku parçalama	metanol		1.41 µg
			aseton		1.1 µg
		Havanla dövme	metanol		1.44 µg
			aseton		1.44 µg
		Çözücü ekstraksiyonu	metanol		0.44 µg
			aseton		-
[80]	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Mikrodalga			7.48 µg/mg
		Vakumlu			
		Mikrodalga	aseton	-	4.88 µg/mg
		Ultrasonik			4.95 µg/mg

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Dunaliella tertiolecta ODTÜ Deniz Bilimleri Enstitüsünden temin edilmiştir. Deniz suyunda üremesi için gerekli olan f/2 besi ortamı içeriği;

- 9.9 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma 230391)
- 8 mM KCl (Fisher P 217)
- 11.8 mM NaNO_3 (Fisher BP360-500)
- 2.04 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma C-3881)
- 0.37 mM KH_2PO_4 (Sigma P 0662)
- 0.5 mM NH_4Cl (Fisher A 649-500)
- 1 mL/L oranında metal çözeltisinden oluşmaktadır.

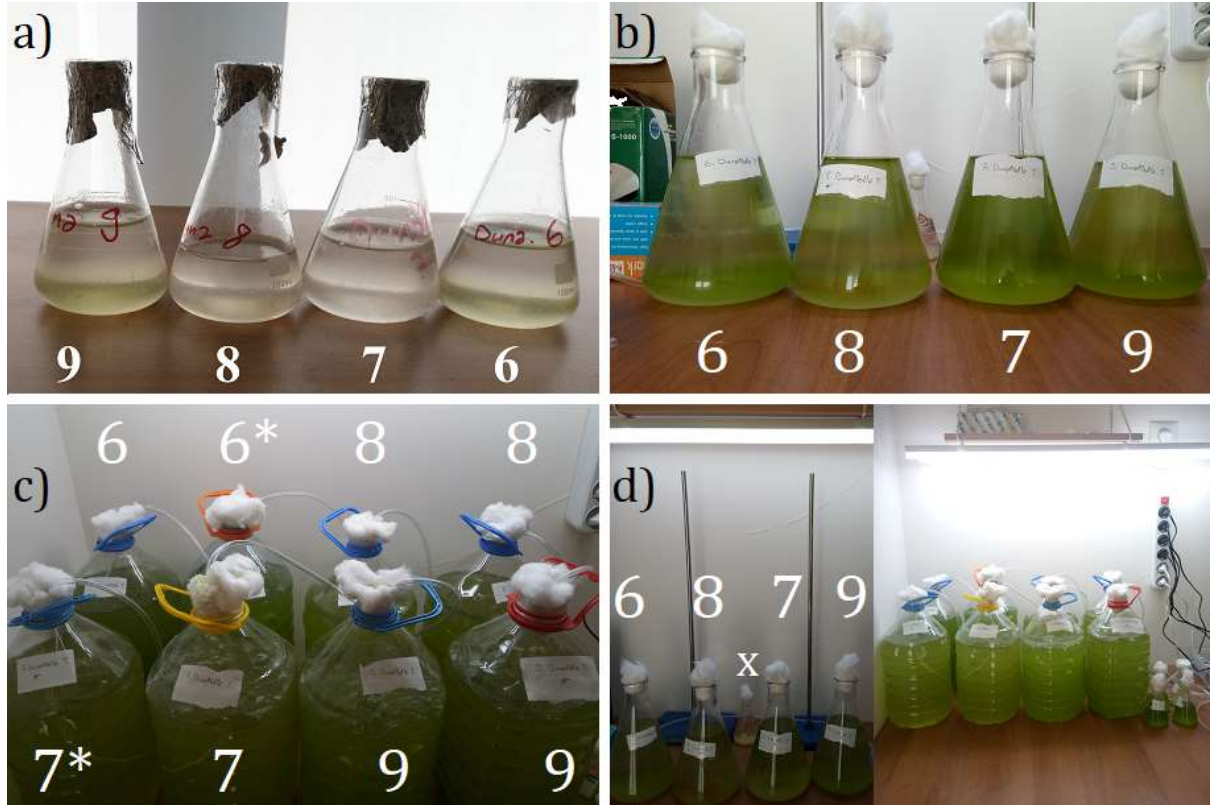
f/2 besi ortamında kullanılan metal çözeltisi içeriği;

- 2 Mm $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma ED255)
- 0.36 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma F-1513)
- 0.21 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Baker 2540)
- 1 mL/L B12 Vitamini'nden oluşmaktadır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Alg Üretimi

Dunaliella tertiolecta algini 100 mL'lik erlenlere aşılıyarak yetiştirme işlemine başlanmıştır. 1000 lux'lük LED ışığı altında 100 mL'lik erlenlerde bulunan *Dunaliella tertiolecta*'lar daha sonra 1000 mL erlenlere ekilmiştir. Yaklaşık iki haftalık bir süreç içerisinde toplamda 4 L *Dunaliella tertiolecta* algı elde edilmiştir. 4 L'ye çoğaltılan *Dunaliella tertiolecta*'lar 2 hafta sonra 5000 mL'lik plastik bidonlara aşılacaktır. (Aşılama işlemi her 5000 mL'lik bidona 500 mL alg aşıl原因arak gerçekleştirilmiştir.) Sisteme, homojenizasyonu sağlamak ve ortamda hava bulunması için 3 L/min akış hızında hava pompalanmıştır (Şekil 3.1.). Üretilen algerden aşılama yapmak üzere 30 L alg ayrılmıştır. Geri kalan alg çözeltileri santrifüjleme ve çöktürme yöntemleri ile sıvısından ayrılmıştır.



Şekil 3.1. Alg üretim aşaması. Herhangi bir kontaminasyona karşı kullanılmış 4 ayrı numune (6, 7, 8, 9). (a) yeni ekilmiş *Dunaliella tertiolecta*, (b) 1000 mL'lik erlenlere ekilmiş *Dunaliella tertiolecta*, (c) 5000 mL'lik bidonlara ekilmiş *Dunaliella tertiolecta* (Her numune iki ayrı bidona aşılanmış ve * olarak ifade edilmiş.), (d) b ve c deki sistemin geniş görüntüsü. (x saf suda denenmiş *Dunaliella tertiolecta*.)

Alg miktarını ölçmek için 5 L'lik bidonlardan her iki günde bir (cumartesi ve pazar hariç) 10 mL alg alınıp önceden tartılmış beyaz bantlı süzgeç kâğıdı ile süzölmüştür. Süzgeç kâğıdı ve alg kuruduktan sonra tartılmıştır. Elde edilen alg miktarı kaydedilmiştir. Bu sistemlerde ortam sıcaklığının, ışık (güneş ve 1000 lux'lük LED) ve demir iyonu miktarının etkisi incelenmiştir. Yüksek sıcaklıkta geçen sistemlerde deney süresi 14 gün sürmüştür. Normal sıcaklıklarda süren sistemlerde ise deney süresi 28 gün sürmüştür.

Çalışmada alg üreme sürecine ışık, ortam sıcaklığı ve demir iyonunun etkisi incelenmiştir.

3.2.2. Alg Ekstraksiyonu

Dunaliella tertiolecta alginden klorofil a ekstrakte etmek için Soxhlet, ultrasonik, mikrodalga ve santrifüj ile çözücü ekstraksiyonu gibi yöntemleri incelenmiştir. Çalışmalarda çözücü olarak etanol kullanılmıştır.

3.2.2.1. Soxleth Ekstraksiyonu

Behr Labor Technik KEX 100 F marka Soxhlet ekstraksiyon cihazında 3 g alg 150 mL etanol ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi 6 saat sürmüştür. Elde edilen BUCHI Rotavapor R II marka döner buharlaştırıcı yardımıyla etanol uzaklaştırılmıştır. Ekstrakt vialere konulmuş ve karanlıkta saklanmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Soxleth ekstraksiyonu deney sistemi.

3.2.2.2. Santrifüj Ekstraksiyonu

0.075 g numune üzerlerine 1.5 mL etanol ilave edilmesiyle elde edilen karışım 2 mL'lik santrifüj tüplerinde 10 dakika boyunca 1000 rpm'de Centurion Scientific ESD92A marka mikro santrifüj ile santrifüjlenmiştir. Elde edilen her numune viallere konularak karanlıkta muhafaza edilmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Santrifüj ekstraksiyonunun deney sistemi.

3.2.2.3. Ultrasonik Ekstraksiyonu

3 g alg üzerlerine 100 mL etanol eklenerek 55°C'de sıcaklıkta 20 dakika boyunca Mikrotest marka ultrasonik banyo ile ultrasonik etkiye tabi tutulmuştur. Elde edilen ekstrakt çözücü karışımından BUCHI Rotavapor R II marka döner buharlaştırıcı yardımıyla etanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra numune vialde karanlıkta saklamak üzere alınmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. (a) Ultrasonik ekstraksiyonunun deney sistemi, (b) döner buharlaştırıcı sistemi.

3.2.2.4. Mikrodalga Ekstraksiyonu Deneyleri

Mikrodalga ekstraksiyon deneylerinde çözücü miktarı (10-30 mL), sıcaklık (100-140°C) ve ekstraksiyon süresinin (2-6 dakika) etkisi incelenmiştir. Deneyler CEM Corporation MARS Microwave Reactor System marka mikrodalga cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Deneysel aşama Cevap Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology - RSM) ile gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları Design-Expert ® Version 7.0 programı ile Box-Behnken dizyn yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Önerilen çalışma programı Tablo 3.1.'de verilmiştir. Her deneyde 3 g alg kullanılmıştır. Elde edilen ekstrakt çözücü karışımı BUCHI Rotavapor R II marka döner buharlaştırıcıya alınarak etanol uzaklaştırılmıştır. Deney sonucunda elde edilen numuneler viallere alınarak karanlıkta saklanmıştır (Şekil 3.5.).



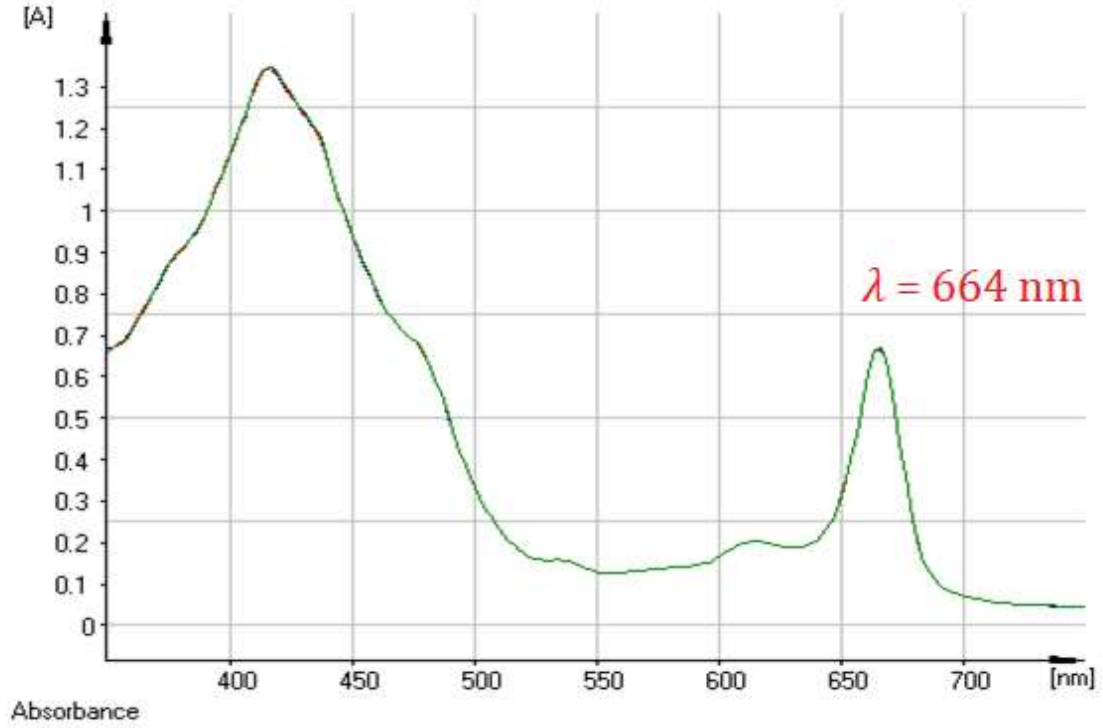
Şekil 3.5. (a) Mikrodalga ekstraksiyonunun deney sistemi, (b) Mikrodalga ekstraksiyonu sisteminde kullanılan döner buharlaştırıcı sistemi.

Tablo 3.1. Mikrodalga ekstraksiyonu deney çalışma sistemi.

	Sıcaklık (°C)	Çözücü Miktarı (mL)	Süre (min)
1	100.00	30.00	4.00
2	140.00	20.00	2.00
3	120.00	20.00	4.00
4	120.00	20.00	4.00
5	120.00	10.00	2.00
6	100.00	20.00	2.00
7	100.00	20.00	6.00
8	140.00	30.00	4.00
9	120.00	20.00	4.00
10	120.00	30.00	6.00
11	140.00	10.00	4.00
12	140.00	20.00	6.00
13	120.00	10.00	6.00
14	120.00	20.00	4.00
15	100.00	10.00	4.00
16	120.00	20.00	4.00
17	120.00	30.00	2.00

Tablo 3.1.'de belirtilen tüm deneysel çalışma üç tekrar olarak yapılmıştır.

Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen klorofil örnekleri UV spektrometrede analiz edilmiştir (Şekil 3.6.).

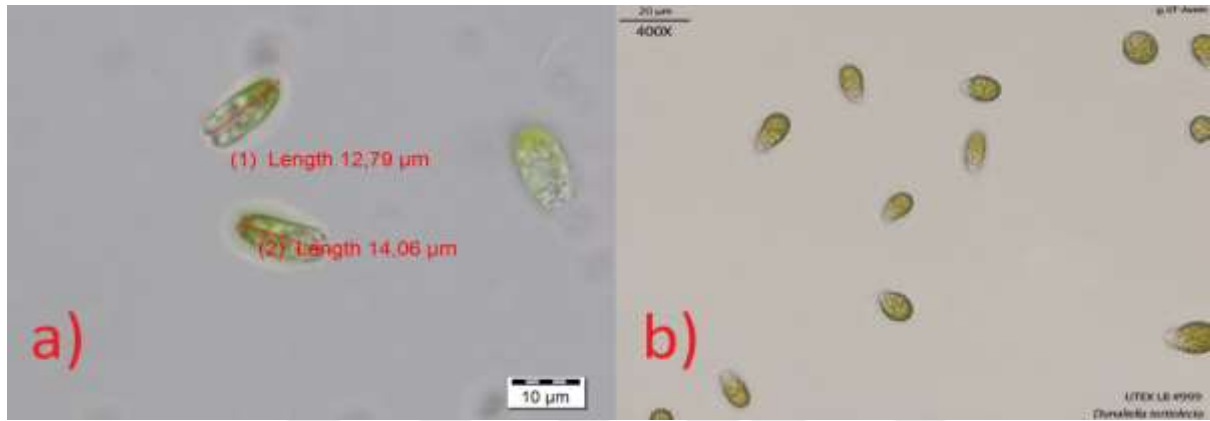


Şekil 3.6. Ekstraksiyon deneyleri sonucu elde edilmiş olan klorofil a'nın UV spektrometrede spektrum taraması analiz sonucu.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Üretilen alglerin herhangi bir kontaminasyona uğrayıp uğramadığını tespiti Zeiss Axio Scope A1 marka polarize ışık mikroskobu kullanılarak mikroskop görüntüleri alınmış ve literatürdeki mikroskop görüntüsü ile karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.1. elde edilen sonuçlar üretimi yapılmış olan *Dunaliella tertiolecta* alginin herhangi bir kontaminasyona uğramadığını göstermektedir.



Şekil 4.1. *Dunaliella tertiolecta* alginin mikroskop görüntüleri. (a) çalışmada üretilen, (b) literatürden alınan. [81]

4.1. Alg Üretim Miktarı

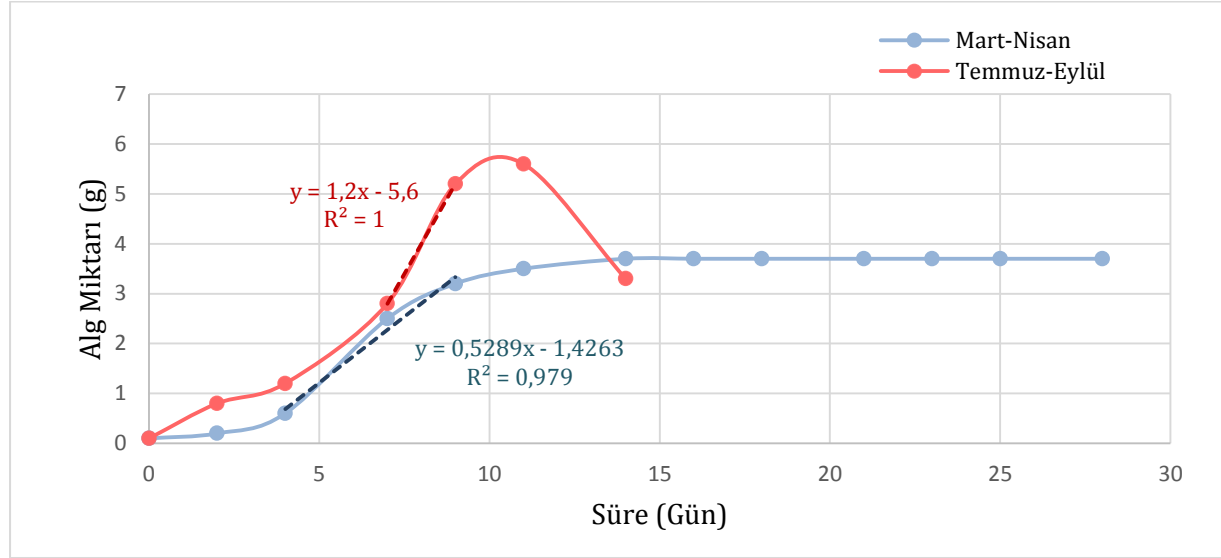
Alg yetiştirme sürecinde sıcaklığın, ışığın ve Fe^{+3} miktarının alg üretimine etkisi araştırılmıştır.

4.1.1. İklim Koşullarının Etkisi

Çalışma, Bölüm 3.2.1.'de açıklandığı gibi yapılmış olup ortam sıcaklığının etkisi bahar ve yaz aylarında tekrar incelenmiştir. (Şekil 4.2.) Mart-Nisan ayları arasında ortam sıcaklığı ortalama 27°C/14°C (Gündüz°C/Gece°C) arasında değişirken Temmuz-Eylül ayları arasındaki ortam sıcaklığının ortalama 35°C/22°C (Gündüz°C/Gece°C) arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Tablo Ek-1.'de Mart-Nisan aylarında ve Temmuz-Eylül aylarında yapılan deneylerin sıcaklık tablosu verilmiştir.

Şekil 4.2.'de açıkça görülmektedir ki mikro alglerin tüm gelişme evreleri en hızlı olduğu dönem Temmuz-Eylül ayları arasındaki dönemdir. Çökme evresine kadar olan bütün evrelerde en fazla alg miktarı Temmuz-Eylül ayları arasında gözlemlenmiştir. Mart-Nisan ayları arasında

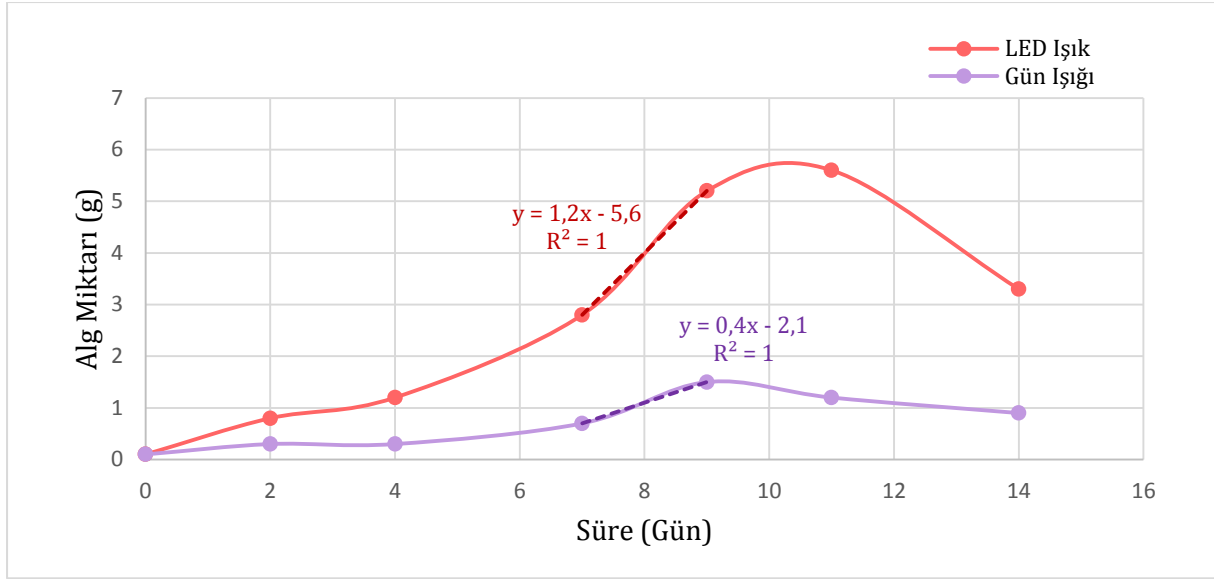
gerçekleştirilen alg üretiminin Temmuz-Eylül ayları arasında gerçekleştirilen üretimden tek üstün tarafı çökme evresinin görülmemesi ve duraklama evresinde sabit kalmasıdır. Duraklama evresinin sabit olması sistemde sürekli üretimi sağlamaktadır.



Şekil 4.2. 24 saat 1000 lux'lük LED ışıktaki, Fe^{+3} iyonu bulunmayan besi ortamında farklı ortam sıcaklıklarında ki alg üreme grafiği.

4.1.2. Işığın Etkisi

Şekil 4.3.'de Temmuz-Eylül ayları arasında sisteme ışığın etkisinin incelendiği grafik görülmektedir. Gün ışığı olan ortam ve 1000 lux'lük LED ışığı olan ortamın her ikisinde de mikro algler uyum evresini yaklaşık olarak aynı süre zarfında geçirmişlerdir. Hızlı gelişme evresi ise gün ışıklı ortam da 9. günde tamamlanırken 1000 lux'lük LED ışıklı ortam da ise 10. günde tamamlanmıştır. Her iki sistemde de yavaşlama evresi ile duraklama evresi birlikte 1-2 gün sürmüştür. Çökme evresinde 14. günün sonunda en çok hücre ölümünün 1000 lux'lük LED ışıklı ortamda gerçekleştiği buna karşın yine de gün ışıklı ortamdaki 3,5 kat daha fazla alg bulunmaktadır. Bu sonuçlar ışık ortamının mikro alglerin gelişim evrelerinin tamamlandıkları süreye bir etkisi olmadığını ancak üreyen alg miktarına etkili olduğunu göstermektedir. En fazla alg üretmesi 1000 lux'lük LED ışıklı ortamda görülmüştür. Tablo Ek-1.'de Temmuz-Eylül aylarında 24 saat 1000 lux'lük LED ışıktaki ve gün ışığında yapılan deneylerin sıcaklık tablosu verilmiştir.



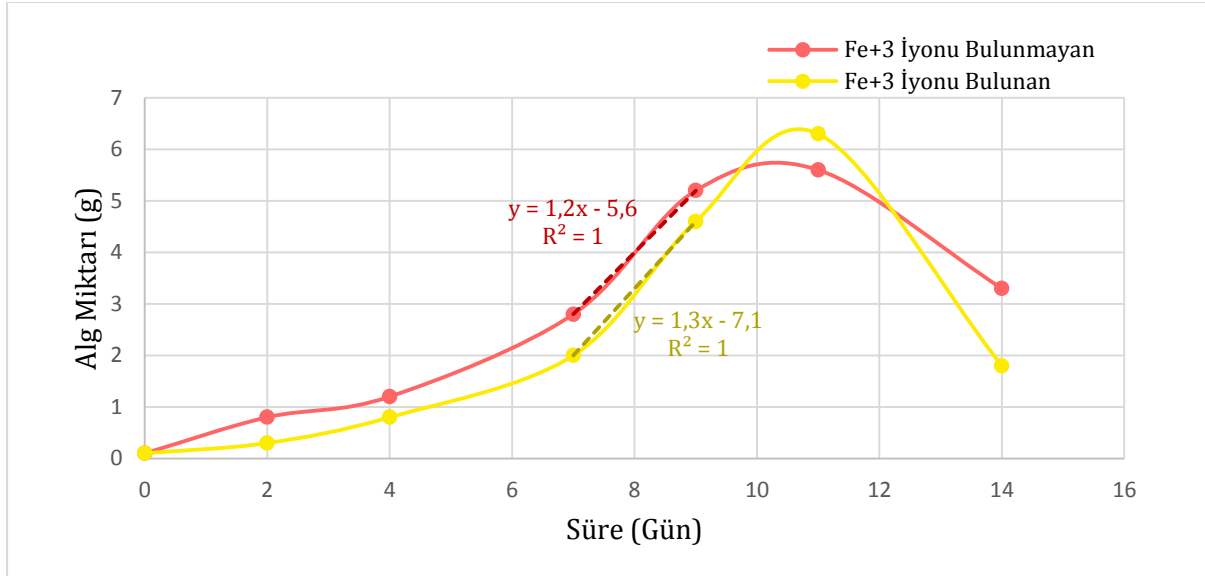
Şekil 4.3. Temmuz-Eylül aylarında, Fe^{+3} iyonu bulunmayan besi ortamında farklı ışık ortamlarında ki alg üreme grafiği.

4.1.3. Fe^{+3} İyonunun Etkisi (Temmuz–Eylül)

Şekil 4.4.’deki grafikte Temmuz–Eylül aylarında yapılan alg üretiminde Fe^{+3} iyonunun alg üreme miktarına etkisi gösterilmektedir. Fe^{+3} iyonu bulunan ortamda Fe^{+3} iyonunun molar derişimi 0.36 mM’dır.

İki ortamda da uyum evresi ve hızlı gelişme evresi aynı anda başlamıştır. Ancak hızlı gelişme evresi Fe^{+3} iyonu bulunan ortamda daha uzun sürmüştür. Yavaşlama evresi ise Fe^{+3} iyonu bulunmayan ortamda yaklaşık 1 gün daha fazla sürmüştür. Duraklama evresine geçildiğinde Fe^{+3} iyonu bulunan ortamın bu evreyi neredeyse hiç yaşamadığı gözlemlenmiştir. İki sistemde aynı anda çökme evresine geçmişlerdir ve 14. günün sonunda en az çökme miktarı ve en çok canlı hücre sayısı Fe^{+3} iyonu bulunmayan ortamda gözlemlenmiştir.

Farklı kültür ortamlarına ekim işlemi genelde yavaşlama evresinde gerçekleşmektedir. Yavaşlama evresinde ise alg hücresi sayısı en fazla Fe^{+3} iyonu bulunan ortamda görülmüştür. Bu durum Fe^{+3} iyonu bulunan ortamın daha verimli olmasına yol açmaktadır. Tablo Ek-1.’de Temmuz-Eylül aylarında Fe^{+3} iyonu bulunmayan besi ortamında yapılan ve Fe^{+3} iyonu bulunan besi ortamında yapılan deneylerin sıcaklık tablosu verilmiştir.



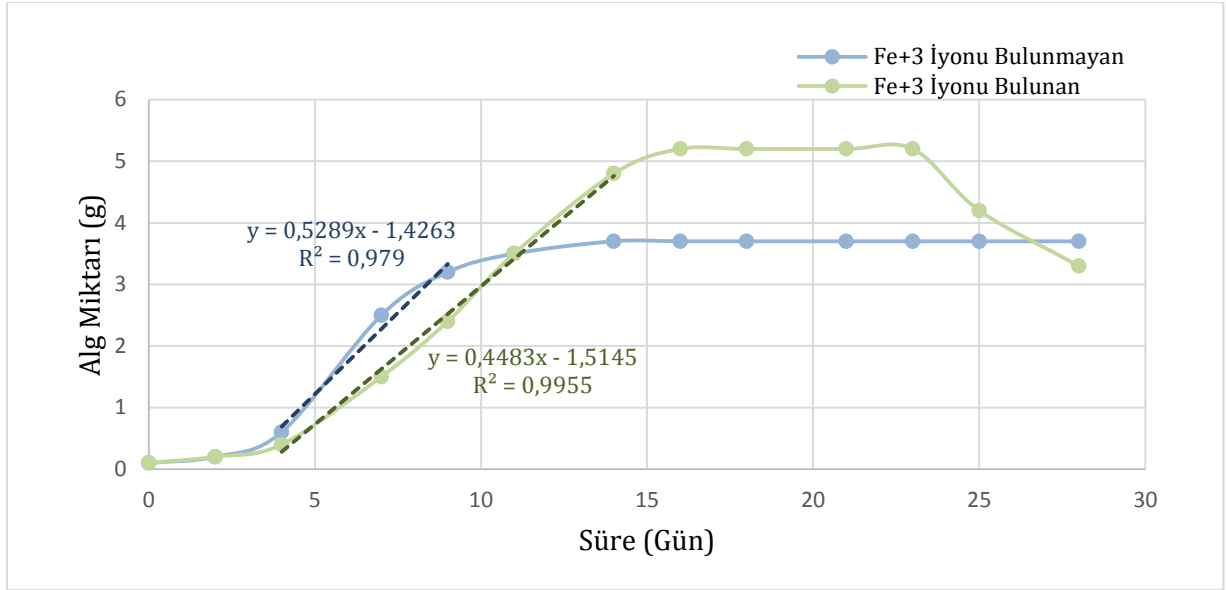
Şekil 4.4. 24 saat 1000 lux'lük LED ışıktaki Temmuz-Eylül aylarında, Fe⁺³ iyonu bulunan ve bulunmayan ortamlarda ki alg üreme grafiği.

4.1.4. Fe⁺³ İyonunun Etkisi (Mart-Nisan)

Şekil 4.5.'de Mart-Nisan aylarında Fe⁺³ iyonunun alg üreme miktarına etkisi gösterilmektedir. Temmuz-Eylül aylarında yapılan alg üretiminde olduğu gibi Mart-Nisan aylarında yapılan alg üretiminde de Fe⁺³ iyonu bulunan ortamda Fe⁺³ iyonunun molar derişimi 0.36 mM'dır.

Fe⁺³ iyonu bulunmayan ortamda hızlı gelişime evresi daha erken sonlanırken Fe⁺³ iyonu bulunan ortamda hızlı gelişime evresi devam etmiştir. Yavaşlama evresinde Fe⁺³ iyonu bulunan ortamda Fe⁺³ iyonu bulunmayan ortama göre daha fazla alg bulunmaktadır. Duraklama evresine geçildiğinde Fe⁺³ iyonu bulunan ortam bu evreyi tamamlayıp çökme evresine geçmiştir ancak Fe⁺³ iyonu bulunmayan ortam çökme evresine hiç geçmemiştir. 28. günün sonunda en çok alg miktarı Fe⁺³ iyonu bulunmayan ortamda gözlemlenmiştir.

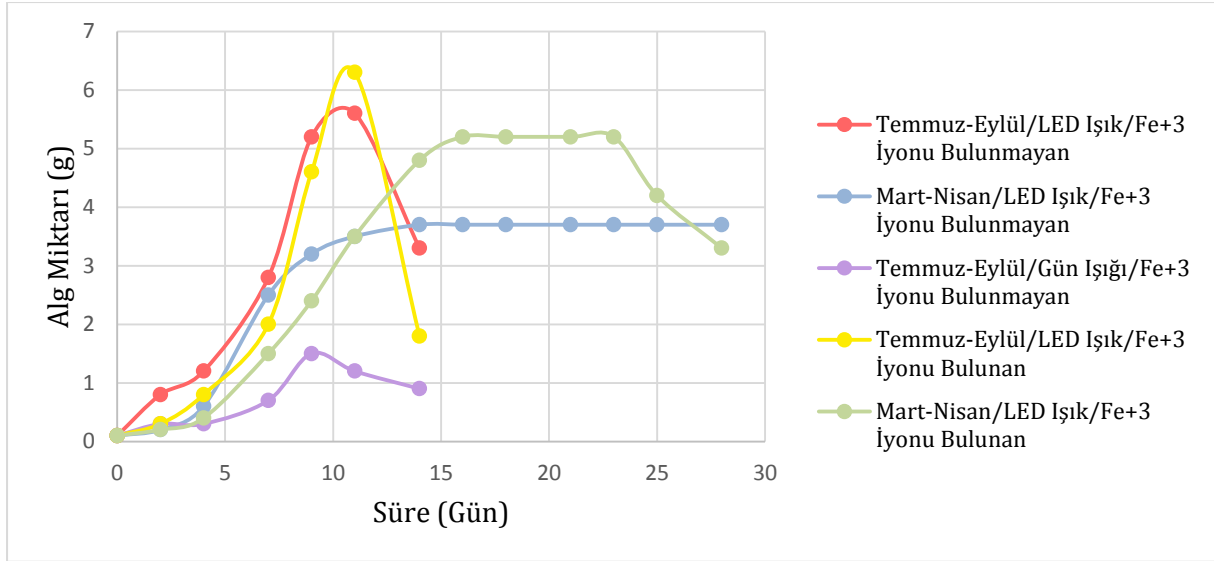
Tablo Ek-1.'de Mart-Nisan aylarında Fe⁺³ iyonu bulunmayan besi ortamında yapılan ve Fe⁺³ iyonu bulunan besi ortamında yapılan deneylerin sıcaklık tablosu verilmiştir.



Şekil 4.5. 24 saat 1000 lux'lük LED ışıkta, Mart-Nisan aylarında, Fe⁺³ iyonu bulunan ve bulunmayan ortamlarda ki alg üreme grafiği.

4.1.5. En Verimli Üreme Koşulu

Tüm ortam koşulları ortak değerlendirildiğinde (Şekil 4.6.) sonuç olarak en yüksek alg üreme veriminin Temmuz-Eylül ayları arasında, 1000 lux'lük LED ışık'lı, ortamda Fe⁺³ iyonu bulunan besi ortamında gerçekleştiği tespit edilmiştir. İkinci en verimli ortam koşullarının ise Temmuz-Eylül ayları arasında, 1000 lux'lük LED ışık'lı, besi ortamında Fe⁺³ iyonu bulunmayan ortamda olacağı saptanmıştır. Eğer sistemde çökme olayının gerçekleşmesi istenmiyorsa yani sürekli bir sistem oluşturulacaksa Mart-Nisan ayları arasında, 1000 lux'lük LED ışık'lı, besi ortamında Fe⁺³ iyonu bulunmayan ortam tercih edilmelidir.

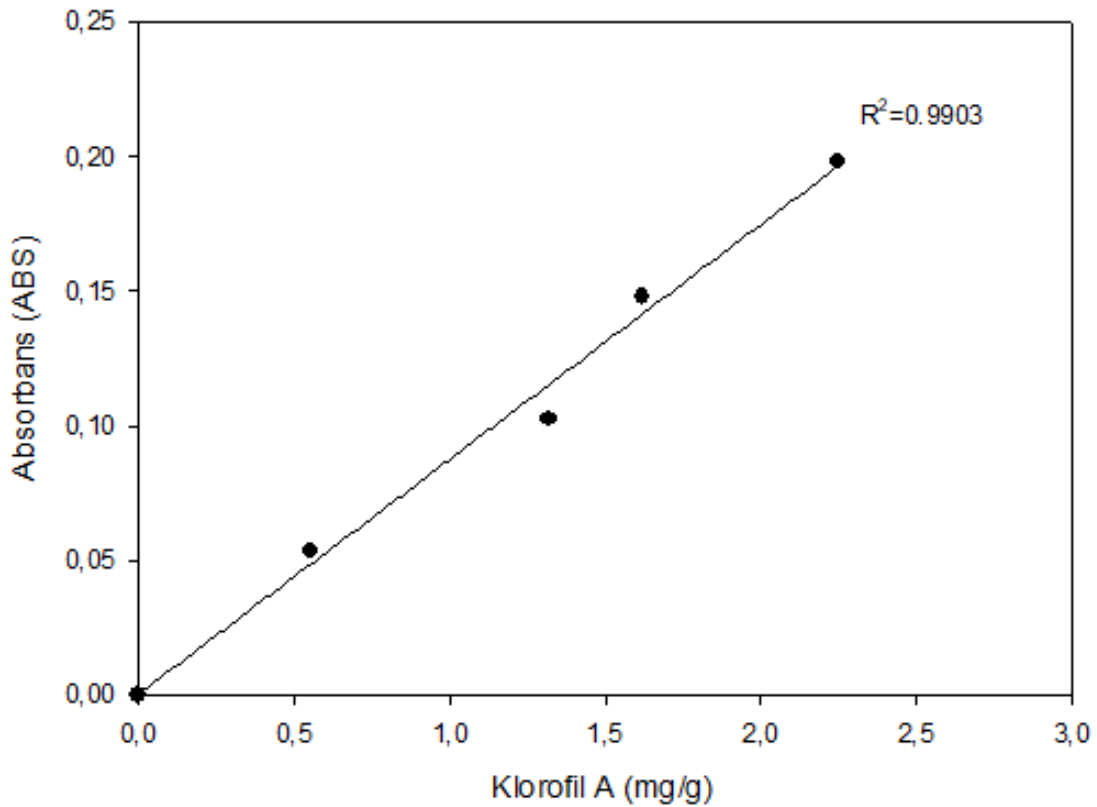


Şekil 4.6. Farklı ortam koşullarındaki alg üreme grafiği.

4.2. Alglerden Klorofil Eldesi

4.2.1. UV Spektrometrede Ölçülmü

UV Spektrometrede yapılan ölçümler sonucu elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.7.'da verilmiştir.



Şekil 4.7. UV Spektrometrede elde edilen kalibrasyon doğrusu.

Eşitlik 1’de tanımlanan eşitlik aşağıdaki gibi düzenlenerek kullanılmıştır. Elde edilmiş olan Eşitlik 2 klorofil a elde etmek için kullanılan tüm ekstraksiyon yöntemlerinde klorofil a konsantrasyonunu hesaplamada kullanılmıştır.

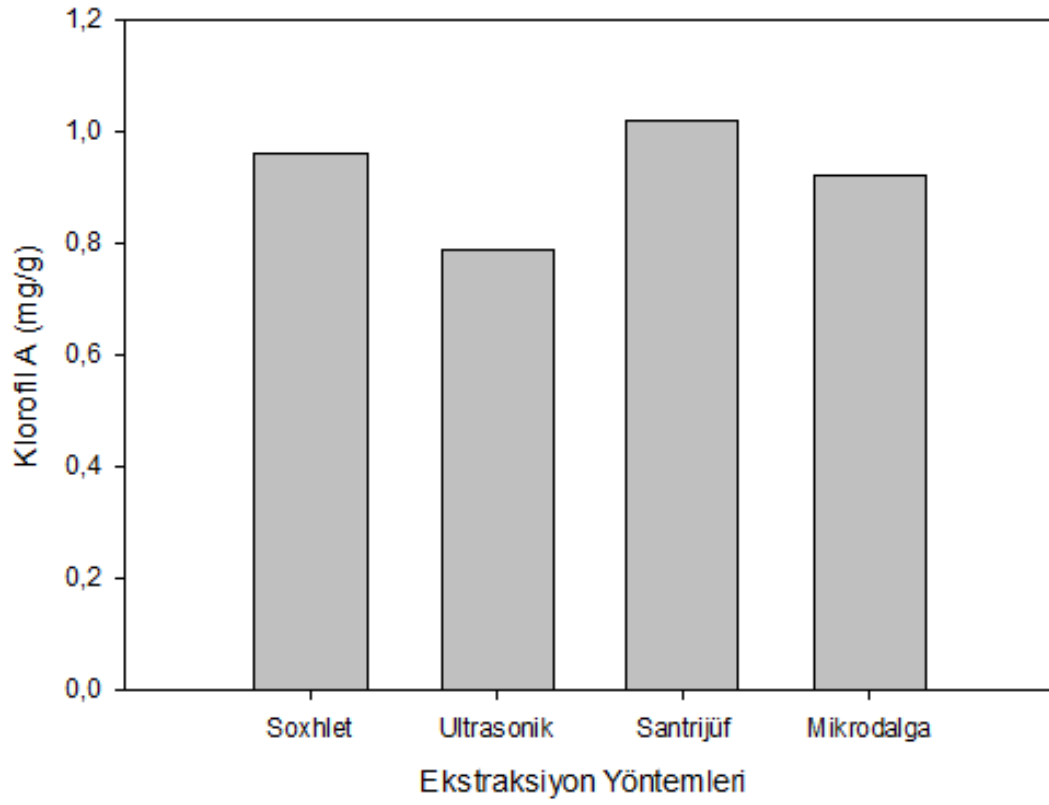
$$\text{Chla}(\mu\text{g/mL}) = - 1.7858 \times A_{647} + 11.8668 \times A_{664} \quad [78] \quad (2)$$

4.2.2. Ekstraksiyon Süreçlerinin Karşılaştırılması

Şekil 4.8.’deki grafik incelediğinde sırası ile Soxleth ekstraksiyonunda 0.9625 mg/g, ultrasonik ekstraksiyonunda 0.7885 mg/g, santrifüj ekstraksiyonunda 1.0215 mg/g, mikrodalga ekstraksiyonunda 0.9225 mg/g klorofil a elde edilmiştir.

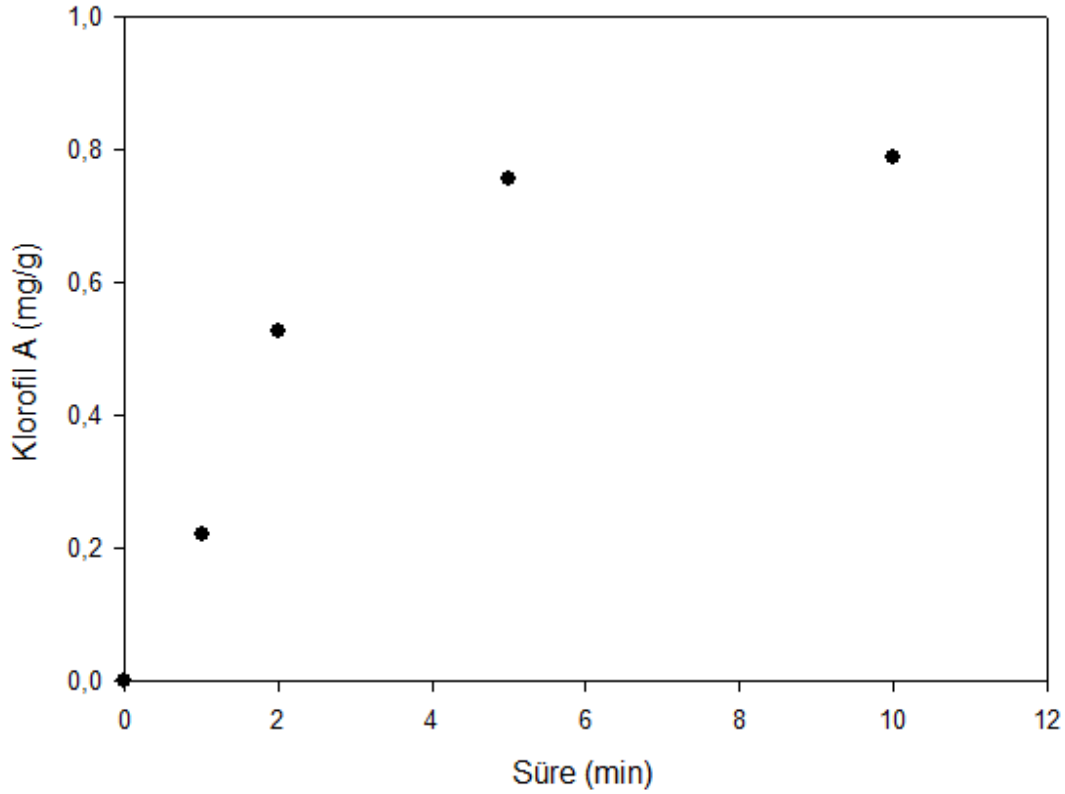
Şekil 4.8.’deki grafik en yüksek verim santrifüj ekstraksiyon yönteminde olduğunu göstermektedir. Mikrodalga ekstraksiyon yöntemi ve Soxleth ekstraksiyon yöntemindeki verimler birbirine çok yakındır. En az verim ise ultrasonik ekstraksiyon yönteminde olmuştur.

Mikrodalga ekstraksiyonu ve Soxleth ekstraksiyon yöntemlerinde hücre parçalanması gerçekleşmiştir. Ancak ultrasonik ekstraksiyonunda hücre parçalanması gerçekleşmediği sadece hücre geçirgenliğinin arttırdığı tespit edilmiştir [80]. Hücre geçirgenliğinin artması için hücre zarının yapısında bulunan proteinlerin pıhtılaşması gerekmektedir. Böylece hücre zarındaki gözenekler aynı anda sabitlenir ve genişler [82]. Bu sayede algin yapısında bulunan klorofil ve diğer maddeler (karbonhidrat, protein, lipit, yağ asitleri, gliserol, β -karoten, astaksantin, ksantofil, fikobilin, mineral, vitamin, polisakkarit, polifenol, klorofil) rahatlıkla hücre dışına çıkabilmekte ve çözücü ile etkileşime girebilmektedirler. Bu nedenden dolayı çözücünün bağıl olarak daha az klorofil ekstrakte ettiği düşünülmektedir. Santrifüj ekstraksiyonunun diğer ekstraksiyon yöntemlerinden daha verimli olmasının nedeni hücrenin içinde yüksek sıcaklıkla ekstrakte olan büyük moleküllü bileşiklerin ekstrakte olmamasıdır. Bu durum santrifüj ekstraksiyonunda elde edilen ekstrakttaki klorofil konsantrasyonunun yüksek olmasına sebep olur.



Şekil 4.8. Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen klorofil a konsantrasyonlarının karşılaştırılma grafiği.

Şekil 4.9.'deki grafiği incelendiğinde, süre ilerledikçe ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen klorofil a'nın miktar değerinde artış meydana gelmiştir.



Şekil 4.9. Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi için UV spektrometrede klorofil konsantrasyonunun süreyle değişim grafiği.

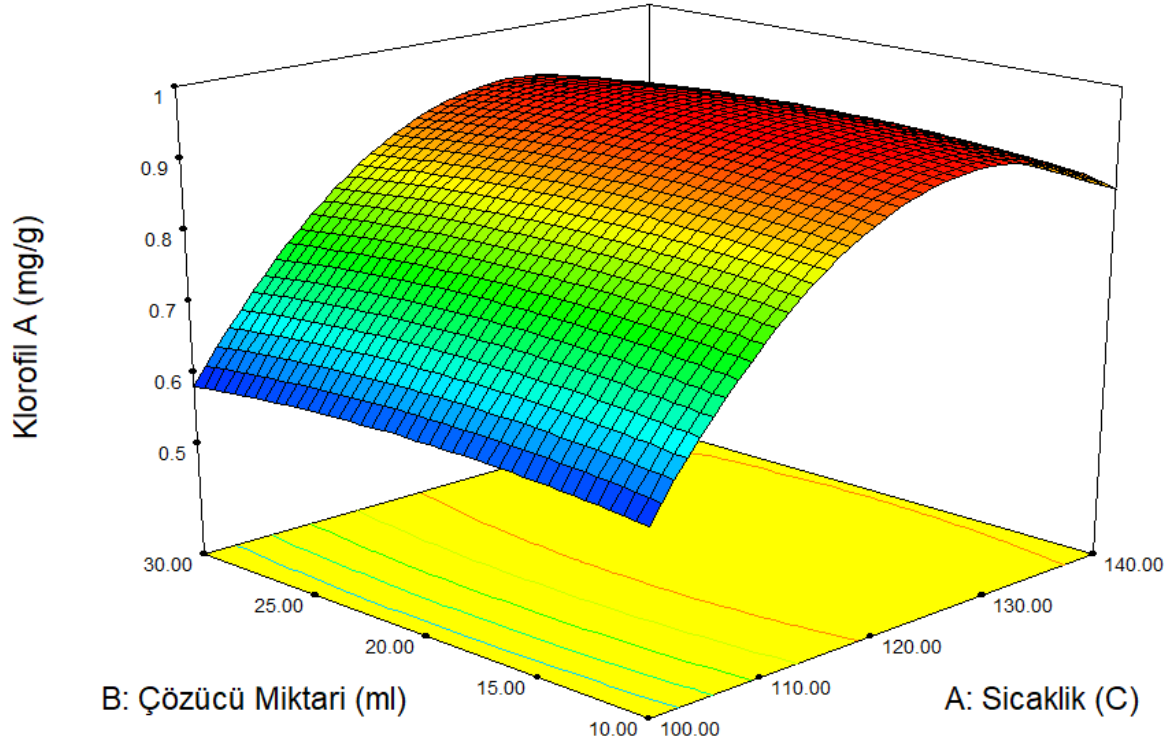
4.2.3. Mikrodalga Ekstraksiyon Deneyleri ve RSM Modeli

Sıcaklık, çözücü miktarı ve sürenin ekstraksiyon süreci üzerine etkisini incelemek ve optimum koşulları belirlemek için RSM modeli kullanılmıştır. Deney programı Tablo 3.1.'de verilmiştir.

4.2.3.1. Sıcaklık ve Çözücü Miktarının Etkisi

Şekil 4.10. ve Tablo 4.1.'de gösterildiği gibi, sıcaklık sabit tutulduğunda, klorofil a miktarı, çözücü miktarı arttıkça az miktarda bir artış meydana gelmiştir. Çözücü miktarı sabit

tuttuğunda ise sıcaklık artışı ekstrakte edilen klorofil a miktarında artışa sebep olmuştur. Ancak sıcaklık 134°C'den sonra düşüşe geçmiştir. Genel olarak sistemde sıcaklığın etkisinin çözücünün etkisinden daha fazla olduğu açıkça tespit edilmiştir. Ekstraksiyon sistemi için en uygun sıcaklığın 134°C ve en uygun çözücü miktarının 25.16 mL etanol olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. Sıcaklık ve çözücü miktarının klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (4 min süre için).

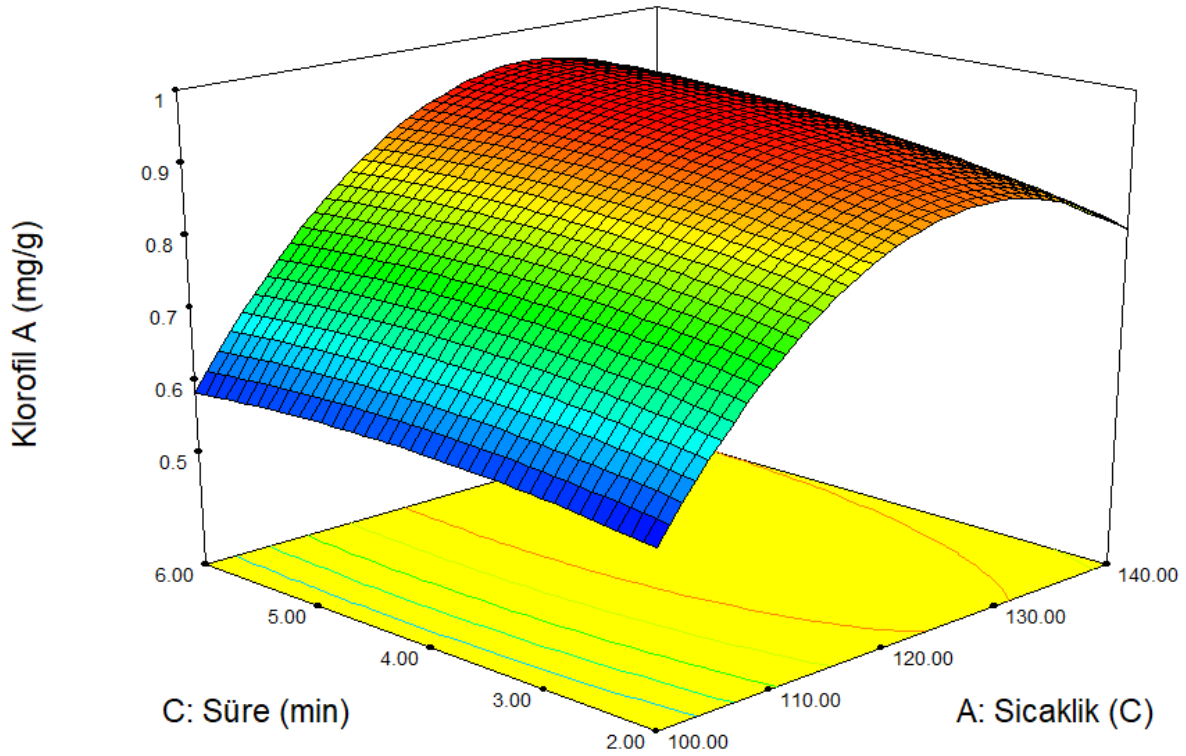
Tablo 4.1. Sıcaklık ile çözücü miktarının klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (4 min süre için).

	10 ml	20 ml	30 ml
100°C	0.5884 mg/g	0.6053 mg/g	0.5836 mg/g
120°C	0.9095 mg/g	0.9261 mg/g	0.9042 mg/g
140°C	0.8617 mg/g	0.8781 mg/g	0.8559 mg/g

4.2.3.2. Sıcaklık ve Sürenin Etkisi

Şekil 4.11. ve Tablo 4.2. klorofil a'nın ekstraksiyon miktarının, süre sabit tutulduğunda, sıcaklık arttıkça arttığı ve optimum noktaya ulaştıktan sonra düşüşe geçtiği gözlemlenmiştir. Sıcaklık sabit tutulduğunda süre ilerledikçe, klorofil a miktarında az miktarda bir artış meydana

gelmiştir. Bu durum sıcaklığın sabit tutulduğunda sürenin etkisinin sistem üzerinde çok etkisinin olmadığını ancak az da olsa arttırdığını göstermektedir.



Şekil 4.11. Sıcaklık ve sürenin klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (20 mL'lik çözücü için).

Tablo 4.2. Sıcaklık ile sürenin klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (20 mL'lik çözücü için).

	2 min	4 min	6 min
100°C	0.5863 mg/g	0.6053 mg/g	0.5846 mg/g
120°C	0.8902 mg/g	0.9261 mg/g	0.9224 mg/g
140°C	0.8252 mg/g	0.8781 mg/g	0.8913 mg/g

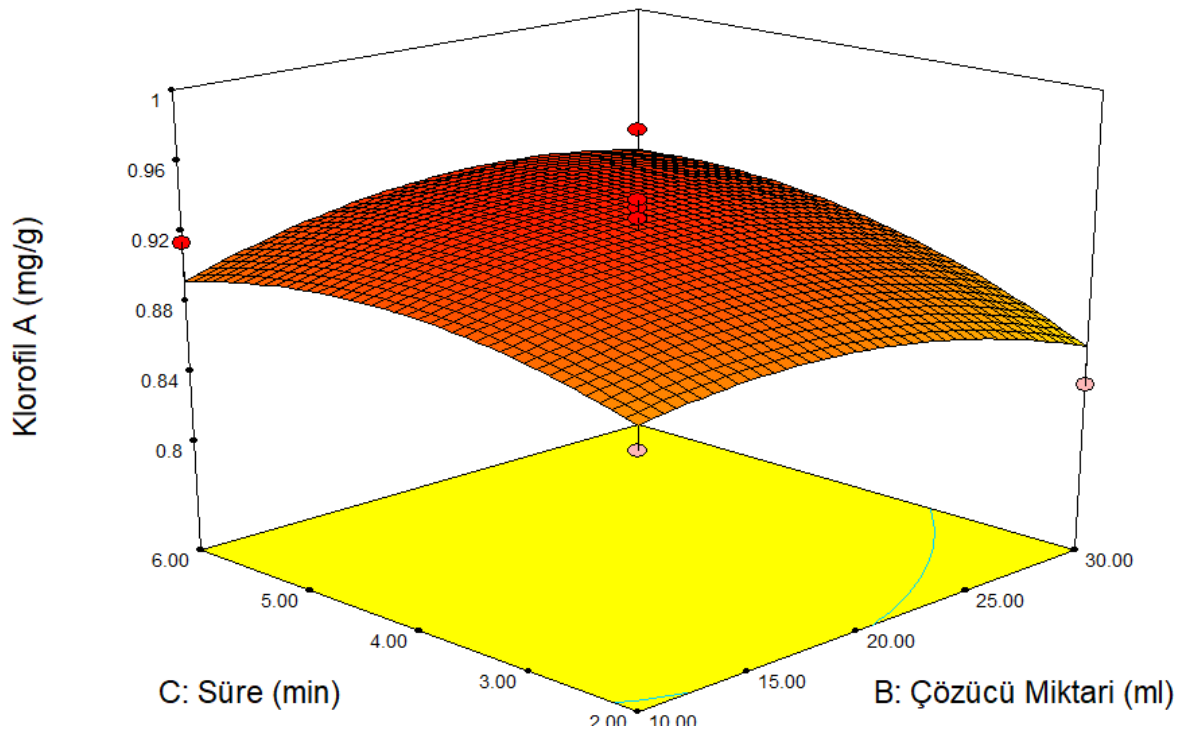
4.2.3.3. Çözücü Miktarı ve Sürenin Etkisi

Şekil 4.12. ve Tablo 4.3.'de sürenin ve çözücü miktarının ekstrakte olan klorofil a miktarındaki etkilerini göstermektedir. Grafikte süre belirli bir değerde sabit tutulduğunda çözücü miktarı arttıkça klorofil a miktarında azda olsa bir artış gözlemlenmiştir. Çözücü miktarı

sabitlendiğinde ise sürenin artmasının klorofil a miktarının artmasına az oranda etkili olduğu söylenebilir.

ANOVA programına göre RSM modeli verileri ve ele edilen sonuçlar çözümlendiğinde ve bu koşullarda yapılan deneyler sonuçlandığında mikrodalga ekstraksiyonu için en uygun koşulların 25.16 mL çözücü miktarında, 134°C sıcaklıkta, 3 dakika 53 saniyede olduğu belirlenmiştir.

Süreci ifade eden matematiksel eşitlik ve çözümle ilgili veriler Tablo 4.5. ve eşitlik 3 ve eşitlik 4’de, sonuçları ve optimum koşulları ise Tablo 4.4.’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Çözücü miktarı ve sürenin klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (120°C sıcaklıkta).

Tablo 4.3. Çözücü miktarı ile sürenin klorofil a miktarı üzerindeki etkisi (120°C sıcaklıkta).

	2 min	4 min	6 min
10 mL	0.8861 mg/g	0.9095 mg/g	0.8933 mg/g
20 mL	0.8902 mg/g	0.9261 mg/g	0.9224 mg/g
30 mL	0.8558 mg/g	0.9042 mg/g	0.9130 mg/g

Tablo 4.4. RSM deneyleri ve deneysel sonuçlar.

	Sıcaklık (°C)	Çözücü Miktarı (mL)	Süre (min)	Klorofil miktarı (mg/g)
1	100	30	4	0.5872
2	140	20	2	0.8413
3	120	20	4	0.9389

4	120	20	4	0.9349
5	120	10	2	0.8731
6	100	20	2	0.6044
7	100	20	6	0.5678
8	140	30	4	0.8612
9	120	20	4	0.9159
10	120	30	6	0.9252
11	140	10	4	0.8574
12	140	20	6	0.8725
13	120	10	6	0.9152
14	120	20	4	0.9099
15	100	10	4	0.5823
16	120	20	4	0.9289
17	120	30	2	0.8331
Optimum	134	3'53"	25.16	0.9225

Tablo 4.5. Yanıt Yüzeyleri için ANOVA ikinci dereceden varyans tablosunun model analizi

Source	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F Değer	p-değer Olasılık > F
Model	0.30	9	0.034	72.73	< 0.0001 önemli

A-Sıcaklık (°C)	0.15	1	0.15	320.77	<0.0001
B-Çözücü Miktarı (mL)	5.671E-005	1	5.671 E-005	0.12	0.7368
C-Süre (min)	2.074E-003	1	2.074E-003	4.47	0.0723
AB	3.025E-007	1	3.025E-007	6.525E-004	0.9803
AC	1.149E-003	1	1.149E-003	2.48	0.1594
BC	6.250E-004	1	6.250E-004	1.35	0.2837
A ²	0.14	1	0.14	308.88	<0.0001
B ²	1.562E-003	1	1.562E-003	3.37	0.1090
C ²	1.649E-003	1	1.649E-003	3.56	0.1013
Kalan	3.245E-003	7	4.636E-004		
Uyum Eksikliği	2.630E-003	3	8.768E-004	5.70	0.0629
Safılık Hatası	6.148E-004	4	1.537E-004		
Toplam Kor	0.31	16			
R ²	0.9894				

Tablo 4.5.'deki verilere göre aşağıdaki denklemler düzenlenmiştir.

İndirgenmiş değerlere göre RSM Model Eşitliği;

$$\begin{aligned}
 R1 &= 0.93 \\
 &+ 0.14 \times A - 2.662 \times 10^{-3} \times B + 0.016 \times C \\
 &- 2.75 \times 10^{-4} \times A \times B + 0.017 \times A \times C + 0.013 \times B \times C \\
 &- 0.18 \times A^2 - 0.019 \times B^2 - 0.02 \times C^2
 \end{aligned} \quad (3)$$

Gerçek değerlere göre RSM Model Eşitliği;

$$\begin{aligned}
 R1 &= - 6.464 \\
 &+ 0.116 \times \text{Sıcaklık} + 5.104 \times 10^{-3} \times \text{Çözücü Miktarı} - 0.016 \times \text{Süre} \\
 &- 1.375 \times 10^{-6} \times \text{Sıcaklık} \times \text{Çözücü Miktarı} + 4.238 \times 10^{-4} \times \text{Sıcaklık} \times \text{Süre} + 6.250 \times 10^{-4} \times \text{Çözücü} \\
 &\text{Miktarı} \times \text{Süre} \\
 &- 4.610 \times 10^{-4} \times \text{Sıcaklık}^2 - 1.926 \times 10^{-4} \times \text{Çözücü Miktarı}^2 - 4.947 \times 10^{-4} \times \text{Süre}^2
 \end{aligned} \quad (4)$$

RSM model yöntemi ile sıcaklık, çözücü miktarı ve süre için en uygun koşulların tespit edilebilmesi için yukarıdaki eşitlikler kullanılmıştır.

RSM modeli ile elde edilen sonuçlara göre (Tablo 4.4.) en uygun koşullar 134°C sıcaklık 3 dakika 53 saniye süre ve 25.16 mL etanol olduğu tespit edilmiştir. Bu koşullarda deneysel

olarak elde edilen klorofil a miktarı'nın 0.9225 mg/g olduğu ve RSM modeli ile elde edilen klorofil a miktarı'nın 0.9678 mg/g olduğu tespit edilmiştir. RSM modeli ile elde edilen sonucun deneysel sonuca yakın olaması deneysel verilerin doğru olduğunu göstermektedir.



5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Dunaliella tertiolecta yetiştiriciliği sürecinde alg üretimi verimine sıcaklık, ışık ve Fe^{+3} iyonunun etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek alg üreme miktarı Temmuz-Eylül ayları arasında, 1000 lux'lük LED ışıklı, ortamda Fe^{+3} iyonu bulunan besi ortamında 11 gün içerisinde elde edilmiştir. Ancak sistemin alg üremesi için sürekli bir sistem kullanılacaksa çökme evresinin gerçekleşmediği Mart-Nisan ayları arasında, 1000 lux'lük LED ışıklı, besi ortamında Fe^{+3} iyonu bulunmayan ortam tercih edilmelidir. Bu ortam maksimum üreme düzeyine 14 gün içerisinde ulaşmaktadır ve ortam koşulları değişmediği aynı süre boyunca seviyede kalmaktadır. Sürekli ortamda mevsim değişikliğinde sıcaklığı sabit tutmak için iklimlendirme dolabı kullanılmalı ve sıcaklık 18-22°C arasında tutulmalıdır. Temmuz-Eylül ayları arasında, ortamda Fe^{+3} iyonu bulunan besi ortamında, 1000 lux'lük LED ışıklı ortamda 11 gün içerisinde gerçekleşen üreme miktarı, Mart-Nisan ayları arasında, 1000 lux'lük LED ışıklı, besi ortamında Fe^{+3} iyonu bulunmayan ortamda gerçekleşen üreme miktarından %60.65 daha fazladır. Ek olarak Bu iki üreme koşulundan Temmuz-Eylül ayları arasında, 1000 lux'lük LED ışıklı, ortamda Fe^{+3} iyonu bulunan besi ortamında gerçekleşende hızlı gelişme evresinde 9. güne kadar Mart-Nisan ayları arasında, 1000 lux'lük LED ışıklı, besi ortamında Fe^{+3} iyonu bulunmayan ortamda gerçekleşene göre daha yavaş bir üreme gözlemlenmiş ve 9. gün de dahil olmak üzere yavaşlama evresine kadar Mart-Nisan ayları arasında, 1000 lux'lük LED ışıklı, besi ortamında Fe^{+3} iyonu bulunmayan ortamda gerçekleşenden daha hızlı bir üreme gözlemlenmiştir.

Bir yeşil mikroalg türü olan *Dunaliella tertiolecta* yüksek miktarda klorofil içeriğine sahip olduğu için bu çalışmada klorofil ekstraksiyonu sürecinde Soxhlet ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyonu, santrifüj ekstraksiyonu ve mikrodalga ekstraksiyonu yöntemlerinin birbirine göre karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen veriler bize en yüksek klorofil a miktarının santrifüj ekstraksiyonunda (1.5 ml etanol ile 0.075 g alg, 10 dakika boyunca 1000 rpm'de) elde edildiğini göstermiştir. En düşük klorofil a miktarının ise ultrasonik ekstraksiyonunda elde edildiğini göstermektedir. Ultrasonik ekstraksiyonu yönteminde daha az klorofil a miktarı elde edilmesinin sebebi, mikrodalga ekstraksiyonu ve Soxhlet ekstraksiyonunda hücre parçalanması gerçekleşirken ultrasonik ekstraksiyonunda hücre parçalanması gerçekleşmeyip sadece hücre geçirgenliğinin arttığı tespit edilmiştir [80]. Santrifüj ekstraksiyonunda en yüksek miktarın elde edilmesi yüksek sıcaklıkla hücre içinden ekstrakte olabilen maddelerin sistem sıcaklığı düşük olduğu için ekstrakte olmamasıdır.

Dunaliella Tertiolecta alginden mikrodalga ekstraksiyonunda elde edilen klorofil a'n optimum koşullarını tespit etmek için RSM metod'u kullanılmıştır. Parametre olarak seçilen

sıcaklık, çözücü miktarı ve süreden sisteme en çok etki edeninin sıcaklık olduğu tespit edilmiştir. En az etki edenin ise süre olduğu tespit edilmiştir. RSM modeli ile en iyi ekstraksiyon koşullarının 134°C'de 3 dakika 53 saniye boyunca 25.16 mL etanol ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu koşullarda deneysel olarak 0.9612 mg/g klorofil a elde edilirken ve RSM modeli ile de 0.9678 mg/g klorofil a elde edilmiştir. Deneysel sonucun RSM modeli sonucuna bu kadar yakın olması deneysel verilerin doğruluğunu kanıtlamaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] Arasaki, S., Arasaki, T., Low calorie, high nutrition vegetables from the sea to help you look and feel better. 1th ed; Institutional Press: Tokyo, 1983; p 50
- [2] Kumar, C. S., Ganesan, P., Suresh, P. V., Bhaskar, N., Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds - a review. *Journal of Food Science Technology* **2008**, 45,(1), 1-13.
- [3] Akman, Y., Bitki Biyolojisine Giriş (Botanik). 1th ed; Institutional Press: Ankara, 1993; p 15
- [4] Altuner, Z.,Pabuçcu, K. ve Türkekul, İ. Tohumuz Bitkiler Sistematiği. II cilt. 1th ed; Institutional Press: Ankara, 2002; p 7
- [5] Chisti Y., Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* **2007**, 25, (3), 294-306
- [6] Atilla Albaz., Su ürünleri yetiştiriciliği. 1th ed; Institutional Press: İzmir, 2009; p 3
- [7] Cirik Ş, Cirik S., Su bitkileri I-Deniz Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi ve Yetiştirme Teknikleri. 1th ed; Institutional Press: İzmir, 2011; p 135
- [8] Hoppe Heinz A, Levring T, Tanoka Y., Marine Algae in Pharmaceutical Science, de Gruyter. 1th ed; Institutional Press: Berlin, 1979; p 25
- [9] Zeybek N, Zeybek U, Saygıner B. 1th ed; Institutional Press: İzmir, 2003; p. 102-103
- [10] Gümüş G., Deniz Marulunun Kimyasal Kompozisyonunun Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2006.
- [11] Guner H, Aysel V., A taxonomic study on some species *Ulva* (Chlorophyta) in Izmir Bay, Ege University Journal of Faculty of Science **1977**, B1, (2) 241-251
- [12] Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M., Farmasötik Botanik, 1th ed; Institutional Press: Ankara, 2004; p. 34-48
- [13] Kaneda T, Ando H., Component lipids of purple laver and their antioxygenic activity, *Proceedings of the VII. International Seaweed Symposium* **2007**, 7,(1), 553-557
- [14] Karawita R, Siriwardhana N, Lee K W, Heo M S, Yeo I K, Lee Y D, Sean Y J., Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid peroxidation from *Hizikia fusiformis*. *Food Research Technology* **2005**, 220, (1), 363-371
- [15] Senevirathne M, Kim S K, Siriwardhana N, Ha J H, Lee K W, Jean Y J., Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Science and Technology International* **2006**, 12, (1), 27-38
- [16] Casal Garcia M N, Ramirez I, Leets I, Pereira A C, Quiroga M F. Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva* sp., *Sargassum* sp. And *Porphyra* sp.) in human subjects. *British Journal of Nutrition* **2009**, 101, (1), 79-85

- [17] Guner H, Aysel V, Sukatar A, Ozturk M., Check list of İzmir Bay marine algae: II. Phaeophyceae, Chlorophyceae and Cyanophyceae" Aegean University Journal of Faculty of Science **1984**, 7 (1), 57-65
- [18] Guner H, Aysel V., Some qualitative and quantitative studies on algal communities in Aegean and Marmara sea. 1. *Ulva lactuca* L. (Chlorophyta). Aegean University Journal of Faculty of Science **1978**, 2 (1), 55-71
- [19] Dural B., Taxonomic investigation of the order Ulvales in Çandarlı Bay II. Ulvaceae A *Ulva* L. species, Doğa Turkish Journal of Botany **1989**, 13, (1), 474-486
- [20] Oza R M, Sreenivasa Rao P., Effects of different media on growth and sporulation of laboratory raised germlings of *Ulva fasciata* Delile. Botanica Marina XX **1977**, 7, (1), 427-431
- [21] Hassan S M, Ghareib H R., Bioactivity of *Ulva lactuca* L. acetone extract on germination and growth lettuce and tomato plants. African Journal of Biotechnology **2009**, 8, (16), 3832-3838
- [22] Lahaye M., Gelling properties of water soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* sp.). Carbohydrate Polymers **1993**, 22, (4), 261-265
- [23] Dural, B., The taxonomy and the ecology of the algae between Eski Foça and Çeşme Doktora Tezi, E.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Bornova-İzmir, 1990.
- [24] I. Priyadarshani, B. Rath., Commercial and industrial applications of micro algae – a review, J. Algal Biomass Util **2012**, 3, (4), 89–100.
- [25] A. Parmar, N.K. Singh, A. Pandey, E. Gnansounou, D. Madamwar., Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels, Bioresour. Technol **2011**, 102, (22), 10163–10172
- [26] H. Im, H. Lee, M.S. Park, J.W. Yang, J.W. Lee., Concurrent extraction and reaction for the production of biodiesel from wet microalgae, Bioresour. Technol **2014**, 152, (0), 534–537
- [27] Raquel Esteban, Luis Balaguer, Esteban Manrique, Rafael Rubio de Casas, Raúl Ochoa, Isabel Fleck, Marta Pinto-Marijuan, Isidre Casals, Domingo Morales, María Soledad Jiménez, Roberto Lorenzo, Unai Artetxe, José María Becerril, José Ignacio García-Plazaola., Alternative Methods for Sampling and Preservation of Photosynthetic Pigments and Tocopherols in Plant Material from Remote Locations. Emerging Techniques **2009**, 101, (1), 77–88
- [28] Anna Carolina C. M. Manzan, Fabio S. Toniolo, Eliane Bredow, And Nanci P. Povh., Extraction of Essential Oil and Pigments from *Curcuma longa* by Steam Distillation and Extraction with Volatile Solvents. Journal of Agricultural and Food Chemistry **2003**, 51, (23), 6802–6807
- [29] N.M. Sachindra, N. Bhaskar, N.S. Mahendrakar., Carotenoids in Crabs from Marine and Fresh Waters of India. LWT **2005**, 38, (3), 221–225
- [30] Hejazi M.A., de Lamarliere C., Rocha J.M., Vermuë M., Tramper J., Wijffels RH., Selective Extraction of Carotenoids from the Microalga *Dunaliella Salina* with Retention of Viability. Biotechnol Bioeng **2002**, 79, (1), 29–36

- [31] B. Zhao, J. Zhang, X. Guo, J. Wang., Microwave-assisted extraction, chemical characterization of polysaccharides from *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb and its antioxidant activities evaluation, *Food Hydrocoll* **2013**, 31, (1), 346–356
- [32] R. Slade, A. Bauen. (2013). Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects, *Biomass Bioenergy* 53, 29–38
- [33] R.D.P. Rodrigues, F.C. de Castro, R.S. de Santiago-Aguiar, M.V.P. Rocha., Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* using protic ionic liquids as solvent, *Algal Res* **2018**, 31, (1), 454–462
- [34] A. de S. e Silva, L.M. Moreira, W.T. De Magalhães, W.R.L. Farias, M.V.P. Rocha, A.K.P. Bastos, Extraction of biomolecules from *Spirulina platensis* using non-conventional processes and harmless solvents, *J. Environ. Chem. Enginneing* **2017**, 24 (4), 743-753
- [35] X. Yin, Q. You, Z. Jiang., Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology, *Carbohydr. Polym* **2011**, 86, (3), 1358–1364,
- [36] C. Jiang, X. Li, Y. Jiao, D. Jiang, L. Zhang, B. Fan, Q. Zhang., Optimization for ultrasound-assisted extraction of polysaccharides with antioxidant activity in vitro from the aerial root of *Ficus microcarpa*, *Carbohydr. Polym* **2014**, 110, (1), 10–17
- [37] Routray, W., Orsat, V., Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology* **2012**, 5, (2), 409-424.
- [38] Routray, W., Orsat, V. MAE of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods. *Industrial Crops and Products* **2014**, 58, (1), 36-45.
- [39] Routray, W., Orsat, V., Variation of dielectric properties of aqueous solutions of ethanol and acids at various temperatures with low acid concentration levels. *Physics and Chemistry of Liquids* **2014**, 52, (2), 209-232.
- [40] Mahmoud A.M. Al-Alwani, Abu Bakar Mohamad, Norasikin A. Ludin, Abd. Amir H. Kadhum, Kamaruzzaman Sopian., Dye-sensitised solar cells: Development, structure, operation principles, electron kinetics, characterisation, synthesis materials and natural photosensitisers. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2016**, 65, (31), 183–213
- [41] A. A. SHnx., Biosynthesis Of Chlorophyll b1. *Annual Reviels* **1971**, 22, (1), 169-184
- [42] Douglas A. Skoog, F.James Holler, T. Nieman. *Enstrümantal Analiz İlkeleri*. 5th ed; Institutional Press: Ankara, 1998; p 302
- [43] Hande Selen ERGE, Feryal KARADENİZ, Nuray KOCA, Yeşim SOYER., Effect of Heat Treatment on Chlorophyll Degradation and Color Loss in Green Peas. *Gıda/The Journal of Food* **2008**, 33 (5), 225-233
- [44] Raymond J. Ritchie., Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research* **2006**, 89, (1), 27–41

- [45] Hendry, G. A. F., Houghton, J. D., & Brown, S. B., The degradation of chlorophyll – A biological enigma. *New Phytologist* **1987**, 107, (1), 255–302.
- [46] Helena F. Balder, Johande Vogel, Margje C.J.F. Jansen, Matty P. Weijenberg, Piet A. van den Brandt, Susanne Westenbrink, Roelof van der Meer and R. Alexandra Goldbohm., Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2006**, 15, (4), 717–725.
- [47] Ferruzzi, M. G., & Blakeslee, J., Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research* **2007**, 27, (1), 1–12.
- [48] Breinholt, V., Schimerlik, M., Dashwood, R., & Bailey, G., Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin b1: complex formation with the carcinogen. *Chemical Research in Toxicology* **1995**, 8, (4), 506–514.
- [49] Cervantes-Paz, B., Yahia, E. M., De, J. O. J., Victoria-Campos, C. I., Ibarra-Junquera, V., Pérez-Martínez, J. D., & Escalante-Minakata, P., Antioxidant activity and content of chlorophylls and carotenoids in raw and heat-processed Jalapeno peppers at intermediate stages of ripening. *Food Chemistry* **2014**, 146, (1), 188–196.
- [50] Yumiao Zhang, Depeng Wang Shreya Goel Boyang Sun Upendra Chitgupi Jumin Geng Haiyan Sun Todd E. Barnhart Weibo Cai Jun Xia Jonathan F. Lovell, Surfactant-stripped frozen pheophytin micelles for multimodal gut imaging. *Advanced Materials* **2016**, 28, (38), 8524–8530.
- [51] Egner, P. A., Stansbury, K. H., Snyder, E. P., Rogers, M. E., Hintz, P. A., & Kensler, T. W., Identification and characterization of chlorin e4 ethyl ester in sera of individuals participating in the chlorophyllin chemoprevention trial. *Chemical Research in Toxicology* **2000**, 13, (9), 900–906.
- [52] De Vogel, J., Jonker-Termont, D. S. M. L., Katan, M. B., & Van der Meer, R., Natural chlorophyll but not chlorophyllin prevents heme-induced cytotoxic and hyperproliferative effects in rat colon. *Journal of Nutrition* **2005**, 135, (8), 1995–2000.
- [53] Carmen A. Blum, Meirong Xu, Gayle A. Orner, G. Dar'io D'iaz, Qingjie Li, Wan Mohaiza Dashwood, George S. Bailey, Roderick H. Dashwood, Promotion versus suppression of rat colon carcinogenesis by chlorophyllin and chlorophyll: modulation of apoptosis, cell proliferation, and β -catenin/Tcf signaling. *Mutation Research* **2003**, 523-524, (1), 217–223.
- [54] Jaime Fábregas, Julio Abalde, Concepción Herrero, Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture* **1989**, 83, (1), 3-4.
- [55] Meng Chen, Haiying Tang, Hongzhi Ma, Thomas C. Holland, K.Y. Simon Ng, Steven O. Salley, Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* **2011**, 102, (2), 1649–1655.

- [56] Xu Zhou, Wenbiao Jin, Renjie Tu, Qiongjie Guo, Song-fang Han, Chuan Chen, Qing Wang, Wentao Liu, Paul D. Jensen, Qilin Wang., Optimization of microwave assisted lipid extraction from microalga *Scenedesmus obliquus* grown on municipal wastewater. Accepted Manuscript **2019**, 221, (1), 502–508
- [57] C. Onumaegbu, A. Alaswad, C. Rodriguez, A. Olabi., Modelling and optimization of wet microalgae *Scenedesmus quadricauda* lipid extraction using microwave pre-treatment method and response surface methodology. Renewable Energy **2019**, 132, (9), 1323–1331
- [58] Xiao-Hua Xiao, Zhi-Quan Yuan, Gong-Ke Li., Preparation of phytosterols and phytol from edible marine algae by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. Separation and Purification Technology **2013**, 104, (1), 284–289
- [59] Sayali Kulkarni, Zivko Nikolov., Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. Algal Research **2018**, 35, (1), 185–193
- [60] R.C. ThompsonP, M.L. Tobin, S.J. Hawkins, T.A. Norton. Problems in extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll from epilithic microbial biofilms: towards a standard method. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **1999**, 79, (3), 551–558
- [61] Éva Molnár, Dóra Rippel-Pethő, Róbert Bocsi, Solid-Liquid Extraction Of Chlorophyll From Microalgae From Photoautotroph Open-Air Cultivation. Hungarian Journal of Industry And Chemistry Veszprém **2013**, 41, (2), 119–122
- [62] J. D. Hiscox, G. F. Israelstam, A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Canadian Journal of Botany **1978**, 57, (12), 1332–1334
- [63] Krystian Miazek, Stanislaw Ledakowicz, Chlorophyll extraction from leaves, needles and microalgae: A kinetic approach. International Journal of Agricultural and Biological Engineering **2013**, 6, (2), 107–115
- [64] Peter Alpert, Analysis of Chlorophyll Content in Mosses through Extraction in DMSO. JSTOR **1984**, 87, (4), 363–365
- [65] M.D. Macias-Sanchez, C. Mantell, M. Rodriguez, E. Martinez de la Ossa, L.M. Lubian, O. Montero, Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. Journal of Food Engineering **2005**, 66, (1), 245–251
- [66] A. Catarina Guedes, Maria S. Gião, Ana A. Matias, Ana V.M. Nunes, Manuela E. Pintado, Catarina M.M. Duarte, F. Xavier Malcata, Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing modulation of apoptosis, cell proliferation, and β -catenin/Tcf signaling. Journal of Food Engineering **2013**, 116, (2), 478–482.

- [67] Hyong Seok Park, Nam Gyu Im, Kyoung Heon Kim, Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves. *LWT - Food Science and Technology* **2012**, 45, (1), 73–78.
- [68] M.D. Macias-Sanchez, C. Mantell, M. Rodriguez, E. Martinez de la Ossa, L.M. Lubian, O. Montero, Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp. *Journal of Food Engineering* **2007**, 39, (3), 323–329.
- [69] M.D. Macias-Sanchez, C. Mantell, M. Rodriguez, E. Martinez de la Ossa, L.M. Lubian, O. Montero, Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as solvent. *Journal of Systems and Software* **2008**, 31, (8), 1352 – 1362.
- [70] Maëlle Derrien, Milad Aghabarannejad, André Gosselin, Yves Desjardins, Paul Angers, Yacine Boumghar, Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of lutein and chlorophyll from spinach by-products using response surface methodology. *LWT* **2018**, 93, (1), 79–87
- [71] Victor Abrahamsson, Larissa P. Cunico, Niklas Andersson, Bernt Nilsson, Charlotta Turner, Multicomponent inverse modeling of supercritical fluid extraction of carotenoids, chlorophyll A, ergosterol and lipids from microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids* **2018**, 139, (1), 53–61
- [72] Kewei Chen, María Roca, In vitro digestion of chlorophyll pigments from edible seaweeds. *Journal of Functional Foods* **2018**, 40, (1), 400–407
- [73] Daeyoung Lee, Mizuho Nishizawa, Yutaka Shimizu, Hiroki Saeki, Anti-inflammatory effects of dulse (*Palmaria palmata*) resulting from the simultaneous water-extraction of phycobiliproteins and chlorophyll a. *Food Research International* **2017**, 100, (1), 514–521
- [74] Keiji Iriyama, Nagao Ogura, Atusi Takamiya, A Simple Method for Extraction and Partial Purification of Chlorophyll from Plant Material, Using Dioxane. *Journal of Biochemistry* **1974**, 76, (4), 901–904
- [75] Ayyappan Appukuttan Aachary, Jingbang Liang, Arnold Hydamaka, N.A. Michael Eskin, Usha Thiyam-Hollander, A new ultrasound-assisted bleaching technique for impacting chlorophyll content of cold-pressed hempseed oil. *LWT - Food Science and Technology* **2016**, 72, (1), 439–446
- [76] Eda Toprak Aktas a, Hasan Yildiz, Effects of electroporation treatment on chlorophyll and carotenoid extraction yield from spinach and tomato. *Journal of Food Engineering* **2011**, 106, (4), 339–346
- [77] M.D. Macias-Sanchez, C. Mantell, M. Rodriguez, E. Martinez de la Ossa, L.M. Lubian, O. Montero, Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta* **2009**, 77, (3), 948–952
- [78] D. P. Sartory, J. U. Grobbelaar, Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia* **1984**, 114, (3), 177–187

- [79] David Simon, Stuart Helliwell, Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. *Water Research* **1998**, 32, (7), 2220–2223
- [80] Virginie Pasquet, Jean-René Chérouvrier, Firas Farhat, Valérie Thiéry, Jean-Marie Piot, Jean-Baptiste Bérard, Raymond Kaas, Benoît Serive, Thierry Patrice, Jean-Paul Cadoret, Laurent Picot, Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of Microwave Assisted Extraction. *Process Biochemistry* **2011**, 46, (1), 59–67
- [81] UTEXAS Online, <https://www.utexas.edu/search/results?query=dunaliella+tertiolecta-70> (22.05.2019).
- [82] Maria Célia Jamur and Constance Oliver. 3th ed.; Institutional Press: New York, 2010; p 64.



EKLER**Tablo Ek-1.** 2018 yılı, Mart-Eylül aylarındaki günlük sıcaklık verileri (Gündüz°C/Gece°C).

Gün	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül
1	18°/10°	26°/10°	33°/17°	29°/18°	32°/19°	34°/25°	38°/23°
2	18°/9°	23°/11°	32°/20°	28°/17°	32°/20°	35°/26°	36°/22°
3	21°/9°	24°/10°	34°/18°	30°/19°	32°/22°	35°/25°	35°/23°
4	21°/8°	26°/9°	35°/18°	31°/20°	35°/24°	34°/26°	35°/22°
5	23°/10°	29°/7°	29°/19°	30°/21°	35°/24°	35°/25°	34°/24°
6	24°/13°	31°/7°	27°/17°	33°/21°	35°/23°	34°/26°	33°/24°
7	21°/13°	31°/8°	24°/16°	37°/21°	35°/25°	34°/25°	31°/22°
8	25°/13°	25°/14°	23°/14°	40°/21°	34°/24°	35°/26°	33°/20°
9	23°/9°	21°/1°	23°/15°	36°/22°	34°/25°	38°/24°	32°/22°
10	21°/8°	17°/12°	24°/15°	32°/23°	34°/22°	37°/24°	30°/19°
11	21°/8°	23°/12°	28°/13°	30°/23°	33°/24°	36°/22°	34°/18°
12	21°/13°	23°/13°	26°/14°	31°/22°	33°/25°	37°/24°	38°/19°
13	21°/13°	25°/14°	26°/14°	31°/19°	34°/26°	36°/22°	32°/23°
14	21°/12°	27°/13°	27°/15°	30°/18°	35°/25°	35°/22°	32°/20°
15	20°/11°	29°/15°	28°/15°	33°/21°	35°/26°	34°/21°	32°/19°
16	21°/10°	29°/11°	32°/16°	31°/20°	35°/24°	34°/23°	34°/19°
17	23°/9°	29°/10°	36°/17°	30°/21°	35°/25°	33°/24°	37°/20°
18	25°/10°	31°/10°	36°/18°	28°/20°	34°/25°	34°/24°	38°/21°
19	27°/12°	29°/10°	37°/20°	31°/19°	33°/25°	35°/24°	36°/22°
20	21°/14°	23°/14°	34°/13°	31°/20°	34°/25°	35°/24°	34°/21°
21	23°/11°	22°/11°	34°/18°	31°/21°	34°/25°	35°/24°	34°/21°
22	24°/10°	26°/10°	32°/20°	32°/20°	35°/23°	34°/24°	35°/21°
23	30°/12°	26°/10°	36°/18°	32°/22°	34°/24°	36°/24°	34°/22°
24	20°/13°	30°/12°	31°/22°	32°/22°	34°/25°	35°/24°	36°/19°
25	22°/9°	32°/16°	30°/19°	32°/23°	33°/25°	35°/24°	34°/18°
26	24°/11°	31°/17°	31°/18°	32°/22°	34°/25°	34°/23°	33°/21°
27	27°/10°	27°/15°	35°/17°	33°/22°	33°/23°	33°/23°	34°/18°
28	28°/10°	27°/15°	34°/21°	34°/21°	33°/24°	34°/24°	33°/19°
29	20°/12°	30°/15°	32°/20°	31°/20°	33°/25°	35°/23°	33°/19°
30	22°/9°	31°/15°	28°/18°	31°/20°	33°/25°	37°/22°	30°/21°
31	24°/10°		29°/18°		32°/26°	35°/21°	

Ort.	22°/10°	27°/14°	30°/18°	33°/21°	35°/24°	35°/22°	32°/19°
------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Halis Enes ÜNAL

Doğum Tarihi : 26.07.1993

E-mail : ns-u@outlook.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya Mühendisliği	Mersin Üniversitesi	2015-2016
Yüksek Lisans	Kimya Mühendisliği	Mersin Üniversitesi	