

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Haematococcus pluvialis* Flotow MİKROALGININ ÜRETİM TESİSİ
PLANLANMASI VE ENDÜSTRİYEL ASTAKSANTİN ÜRETİMİ**

Serkan TEKER

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ**

**ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

HAZİRAN 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Haematococcus pluvialis* Flotow MİKROALGİNİN ÜRETİM TESİSİ
PLANLANMASI VE ENDÜSTRİYEL ASTAKSANTİN ÜRETİMİ**

Serkan TEKER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

HAZİRAN 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Haematococcus pluvialis* Flotow MİKROALGİNİN ÜRETİM TESİSİ
PLANLANMASI VE ENDÜSTRİYEL ASTAKSANTİN ÜRETİMİ**

Serkan TEKER
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 27/06/2022 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU (Danışman)	[imza]
Prof. Dr. Jale KORUN	[imza]
Prof. Dr. Ayşe Nilsun DEMİR	[imza]
Dr. Öğr. Üyesi Ferhat ÇAĞILTAY	[imza]
Dr. Öğr. Üyesi Levent DOĞANKAYA	[imza]

ÖZET

***Haematococcus pluvialis* Flotow MİKROALGINİN ÜRETİM TESİSİ PLANLANMASI VE ENDÜSTRİYEL ASTAKSANTİN ÜRETİMİ**

Serkan TEKER

Doktora Tezi, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU

Haziran 2022; 64 sayfa

Haematococcus pluvialis Flotow, Chlorophyceae sınıfına dâhil olan, tek hücreli çift kamçılı bir yeşil mikroalgdir. Uygun üreme şartları altında yeşil vejetatif büyüme ve gelişme fazında olan *H. pluvialis*'in hücreleri stres koşulları altında morfolojik olarak bir değişiklik geçirerek hematokistik forma dönüşürler.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, *H. pluvialis* yetiştiriciliği birçok açıdan araştırılmıştır. Ancak, endüstriyel ölçekli bir üretim ve üretim tesisi planlama çalışması yapılmamıştır. Bu çalışmada, *H. pluvialis* yetiştiriciliğinin uygun üretim koşulları araştırılıp, bir üretim tesisi planının yapılması amaçlanmıştır. Böylece ileride yapılacak olan alg yetiştiriciliği işletmelerinin planlanmasına katkı sağlaması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan *H. pluvialis* kültürü “Kültür Koleksiyon Alg ve Protozoa” (CCAP) SAMS Limited şirketinden satın alınmış ve laboratuvar ortamında çoğaltılmıştır. Hacim artırımı yapılarak en son 160 lt yeşil faz üretimi yapılmıştır. Yeşil fazdan elde edilen 160 lt biyokütle kırmızı faz üretimi için 5 x 2m uzunluğunda ve 15 cm derinliğinde havuzlara inoküle edilmiştir. Fototrofik yöntemle ve kesikli kültür sistemi ile endüstriyel mikroalg üretim tesisi planlanıp, üretim yapılmıştır. Farklı üretimler sonucunda, 750-1250 g civarında kuru madde elde edilmiştir. Elde edilen kuru maddenin astaksantin içeriği spektrofotometrik yöntemlerle % 3.28 - 4.58 olarak belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Astaksantin *H. pluvialis*, Mikroalg, Tesis planlaması

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU

Prof. Dr. Jale KORUN

Prof. Dr. Ayşe Nilsun DEMİR

Dr. Öğr. Üyesi Ferhat ÇAĞILTAY

Dr. Öğr. Üyesi Levent DOĞANKAYA

ABSTRACT

PRODUCTION FACILITY PLANNING of *Haematococcus pluvialis* Flotow MICROALGAE AND INDUSTRIAL ASTAXANTINE PRODUCTION

Serkan TEKER

PhD Thesis in Aquaculture Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU

June 2022; 64 pages

Haematococcus pluvialis Flotow is a unicellular bi-flagellate green microalgae belonging to the class Chlorophyceae. The cells of *H. pluvialis*, which are in the green vegetative growth and development phase under appropriate reproductive conditions, undergo a morphological change under stress conditions and turn into red hematocystic form.

In studies conducted to date, many aspects of *H. pluvialis* microalgae cultivation have been investigated. However, an industrial scale production and production facility planning study has not been carried out. In this study, it is aimed to investigate the suitable production conditions of *H. pluvialis* cultivation and to make a production plant plan. Thus, it is aimed to contribute to the planning of algae culture enterprises to be built in the future.

The *H. pluvialis* culture used in this study was purchased from “Culture Collection Algae and Protozoa” (CCAP) SAMS Limited and reproduced in the laboratory environment. By increasing the volume, the last 160 lt green phase was produced. 160 lt of biomass obtained from the green phase was inoculated into 5 x 2 m long and 15 cm deep pools for red phase production. An industrial microalgae production facility was planned and produced with the phototrophic method and batch culture system. As a result of different productions, around 750-1250 g of dry matter was obtained. The astaxanthin content of the obtained dry matter was determined as 3.28 - 4.58 % by spectrophotometric methods.

KEYWORDS: Astaxanthin, Facility Planning, *H. pluvialis*, Microalgae

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU

Prof. Dr. Jale KORUN

Prof. Dr. Ayşe Nilsun DEMİR

Asst. Prof. Dr. Ferhat ÇAĞILTAY

Asst. Prof. Dr. Levent DOĞANKAYA

ÖNSÖZ

Okyanus, deniz gibi tuzlu su ve tatlı sularda birincil üreticiler olan mikroalgler besin zincirinin ilk halkasını oluştururlar. Hücrelerinde protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitaminler, pigmentler gibi önemli metabolitleri üretme özelliği sebebiyle ekonomik değere sahip organizmalardır. Yıl boyunca düzenli kültür yapılabilmesi, suyu, besin tuzlarını ve güneş enerjisini çok verimli kullanabilmeleri ve daha yüksek biyokütle elde edilebilmesinden dolayı mikroalg yetiştiriciliğinin önemi hızla artmaktadır.

H. pluvialis, Chlorophyceae sınıfına dâhil olan, tek hücreli, çift kamçılı bir yeşil mikroalgdir. Uygun üreme şartları altında yeşil vejetatif büyüme ve gelişme fazında olan *H. pluvialis*'in hücreleri stres koşulları altında morfolojik olarak bir değişiklik geçirerek hematokistik forma dönüşürler.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, *H. pluvialis* yetiştiriciliği birçok açıdan araştırılmıştır. Ancak, endüstriyel ölçekli bir üretim ve üretim tesisi planlama çalışması yapılmamıştır. Bu çalışmada, *H. pluvialis* yetiştiriciliğinin uygun üretim koşulları araştırılıp, bir üretim tesisi planının yapılması amaçlanmıştır. Böylece ülkemizde ileride yapılacak olan alg yetiştiriciliği işletmelerinin planlanmasına katkı sağlayacağını ümit etmekteyiz.

Bana bu doktora tez konusunda çalışma olanağı sağlayan ve çalışmalarım boyunca her zaman yardımcı olan tez danışmanım, Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU'na, desteğini her an yanımda hissettiğim sevgili eşim Doç. Menekşe Suzan TEKER'e ve biricik kızım Tuana TEKER'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. <i>H. pluvialis</i> Flotow	4
2.1.1. <i>H. pluvialis</i> 'in sistematikteki yeri.....	4
2.1.2. <i>H. pluvialis</i> 'in genel özellikleri	5
2.1.3. <i>H. pluvialis</i> 'in dağılımı.....	5
2.1.4. <i>H. pluvialis</i> 'in biyolojisi ve yaşam döngüsü	6
2.1.5. <i>H. pluvialis</i> 'in astaksantin birikimi	11
2.1.6. Astaksantin genel özellikleri	14
2.1.7. Astaksantin endüstriyel kullanım alanları	15
2.2. <i>H. pluvialis</i> 'in Bu Çalışmadaki Endüstriyel Biyomas Üretim Yöntemleri.....	18
2.3. <i>H. pluvialis</i> 'in Bu Çalışmadaki Endüstriyel Üretim Tesis Planlaması	20
2.4. <i>H. pluvialis</i> 'e İlişkin Yapılan Çalışmalar	22
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Araştırma süresi ve bölgesi.....	25
3.1.2. Araştırma materyali	25
3.1.3. Sıvı kültür ortamları.....	26
3.1.4. Katı kültür ortamları	27
3.1.5. Kullanılan malzemeler.....	27
3.2. Metot	27
3.2.1. <i>H. pluvialis</i> 'in bu çalışmadaki endüstriyel üretim tesis planlaması	27
3.2.2. <i>H. pluvialis</i> kültürünün ekimi ve stok kültür hazırlanması.....	28
3.2.3. <i>H. pluvialis</i> kültürünün sıvı besi ortama alınması	28

3.2.4. Kültür artırımı yapılması ve yoğun kültür elde edilmesi.....	28
3.2.5. Yoğun kültürden kırmızı faz üretimine geçilmesi.....	28
3.2.6. Hücrelerin parçalanması, kurutma ve depolama	28
3.2.7. Yetiştirme koşullarındaki ölçümlerin yapılması.....	29
3.2.8. Hücre sayımı	29
3.2.9. pH ölçümü	30
3.2.10. Kuru madde ölçümü	30
3.2.11. Astaksantin içeriğinin belirlenmesi	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. <i>H. pluvialis</i> 'in Bu Çalışmadaki Endüstriyel Üretim Tesis Planlaması	31
4.2. <i>H. pluvialis</i> Kültürünün Ekimi ve Stok Kültür.....	38
4.3. <i>H. pluvialis</i> Kültürünün Sıvı Besi Ortamı	38
4.4. Kültür Artırımı Yapılması ve Yoğun Kültür	40
4.5. Yoğun Kültürden Kırmızı Faz Üretimi	43
4.6. Havuzların Hasat Edilmesi	45
4.7. Hücrelerin Parçalanması, Kurutma ve Depolama	47
4.8. İşletme Maliyetlerinin Hesaplanması	47
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR	56
7. KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Haematococcus pluvialis* Flotow Mikroalginin Üretim Tesisi Planlanması ve Endüstriyel Astaksantin Üretimi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

27 / 06 / 2022

Serkan Teker

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

CO ₂	: Karbondioksit
O ₂	: Oksijen
μ	: Mikro
β	: Beta
α	: Alfa
°C	: Santigrad derece
NaCl	: Sodyum klorür
v/v	: Hacim/hacim
μmol foton m ⁻² s ⁻¹	: Metrekareye saniyede düşen mikromol foton
%	: Yüzde

Kısaltmalar

UV	: Ultraviole ışık
ROS	: Reactive oxygene species
M.Ö.	: Milattan önce
SA	: Sodyum asetat
BG-11	: Blue green-11, Mavi yeşil alg besiyeri
BBM	: Bold's Basal Medium, Bold'un besiyeri
C/N	: Karbon/azot
FSII	: Fotosistem 2
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
g	: Gram
Lt	: Litre
ml	: Mililitre
pH	: Potansiyel hidrojen
mg	: Miligram
µm	: Mikrometre
CAS	: Chemical Abstracts Service (Kimyasal Özetler Servisi)
EINECS	: European Inventory of Existing Chemical Substances (Mevcut kimyasal maddelerin Avrupa envanteri)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. <i>H. pluvialis</i> Flotow	4
Şekil 2.2. <i>H. pluvialis</i> 'in doğal tanımlandığı biyocoğrafik bölgelerin haritası.....	6
Şekil 2.3. <i>H. pluvialis</i> 'in yaşam döngüsü ana fazlarının şematik gösterimi	7
Şekil 2.4. Astaksantin kimyasal yapısı	15
Şekil 3.1. CCAP 34/1D <i>H. pluvialis</i> kültürü.....	25
Şekil 3.2. Thoma lamında <i>H. pluvialis</i> hücreleri	29
Şekil 4.1. <i>H. pluvialis</i> biyokütle üretim diyagramı.....	31
Şekil 4.2. <i>H. pluvialis</i> biyokütle üretim tesisi nihai plan örneği.....	33
Şekil 4.3. Üretim tesisi önden görünüş çizimi	34
Şekil 4.4. Üretim tesisi yandan görünüş çizimi	35
Şekil 4.5. Üretim tesisi üstten görünüş çizimi	35
Şekil 4.6. Üretim tesisi görünüş	36
Şekil 4.7. <i>H. pluvialis</i> 'in ekimi yapılmış petri	38
Şekil 4.8. <i>H. pluvialis</i> 'in 250 ml havalandırmasız sıvı ortamı	39
Şekil 4.9. <i>H. pluvialis</i> 'in 250 ml sıvı besi ortamı a) pH değerleri; b) Hücre sayımı.....	39
Şekil 4.10. Hacim artırılmış 1000ml balon jojelerde <i>H. pluvialis</i> kültürü.....	40
Şekil 4.11. <i>H. pluvialis</i> 'in 1000ml sıvı besi ortamı a) pH değerleri; b) Hücre sayımı...41	
Şekil 4.12. <i>H. pluvialis</i> 'in 5000ml sıvı besi ortamı a) pH değerleri; b) Hücre sayımı...42	
Şekil 4.13. Hacim artırılmış 20 lt balon şeffaf plastik bidonlarda <i>H. pluvialis</i> kültürü..42	
Şekil 4.14. <i>H. pluvialis</i> 'in 20 lt sıvı besi ortamı a) pH değerleri; b) Hücre sayımı.....43	
Şekil 4.15. Astaksantin birikimli biyokütle elde etmek için inoküle edilen havuzlar44	
Şekil 4.16. Astaksantin birikimli biyokütle elde etmek için inoküle edilen havuzlar44	
Şekil 4.17. Antalya gün aydınlanma süreleri	45
Şekil 4.18. <i>H. pluvialis</i> 'in stres havuzu a) pH değerleri; b) Hücre sayımı.....45	
Şekil 4.19. Hasat edilmiş astaksantin birikimli ıslak biyokütle	46

Şekil 4.20. Susuzlaştırılmış yoğun aplanospor formdaki biyokütle	46
---	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>H. pluvialis</i> 'in temel besin öğeleri değerleri.....	8
Çizelge 2.2. <i>H. pluvialis</i> 'in aminoasit öğeleri değerleri	9
Çizelge 2.3. <i>H. pluvialis</i> 'in yağ asidi öğeleri değerleri.....	10
Çizelge 3.1. BG-11 sıvı besiyeri	26
Çizelge 4.1. Üretim planı için gerekli su, elektrik, CO ₂ , besin ve personel miktarları ..	32
Çizelge 4.2. Planlanan üretim tesisinin yaklaşık kuruluş maliyeti	37
Çizelge 4.3. <i>H. pluvialis</i> 'in temel besin öğeleri değerleri.....	47
Çizelge 4.4. Aylık karbondioksit maliyeti	47
Çizelge 4.5. Aylık elektrik tüketim maliyeti.....	48
Çizelge 4.6. Aylık su tüketim maliyeti	48
Çizelge 4.7. Aylık birim stok solüsyon maliyeti.....	49
Çizelge 4.8. Aylık toplam işletme gideri maliyeti	50

1. GİRİŞ

Birçok bilim insanının da düzenli bir taksonomik sınıflandırmada güçlük çektiği algler genel olarak, bitkiler gibi fotosentez yapan ancak bitkiler gibi kök, gövde, yaprak, damar yapılanması ve bitkiler gibi üremesi olmayan sucul organizmalardır (Barsanti ve Gualtieri 2014). Prokaryot veya ökaryot olabilen algler genellikle tek hücreli ve mikroskobik boyutlardan ki bunlara mikroalgler diyoruz, 100 metreye kadar büyüeyebilen ve makroalgler olarak tanımladığımız çeşitli boyutlara kadar gelişebilirler.

Genel olarak algler renklerine göre sınıflandırılır. Mikroalglerin sınıflandırılması, pigment çeşitlerine, depolama ürünlerinin kimyasal yapısına ve hücre duvarına dayanmaktadır (Dragone vd. 2010). Sitolojik ve morfolojik dâhil olmak üzere bazı ek kriterler olan kamçılı hücrelerin oluşumu, kamçının yapısı, hücre bölünmesinin şeması ve yolu dikkate alınır (Richmond ve Hu 2013; Alam vd. 2012). Algleri ticari büyüklük ve ana gruplara göre sınıflandırmak istersek; prokaryot algler siyanobakteri Cyanophyceae sınıfına dâhil olan mavi-yeşil algler olarak sadece bir sınıfta, ökaryot algler ise Rhodophyceae (Kırmızı algler), Phaeophyceae (Kahverengi algler), Chlorophyceae (Yeşil algler), Chrysophyceae (Altın algler), Xanthophyceae (Sarı-yeşil algler) olarak altı sınıf altında tanımlanabilir (Borowitzka 2007; Alam vd. 2012).

Algler, geniş bir pH, su sıcaklığı, bulanıklık, çözünmüş O₂ ve CO₂ konsantrasyonu aralığına tolerans göstererek, tatlı sulardan, tuz göllerine kadar neredeyse hemen hemen her yerde bulunur (Barsanti ve Gualtieri 2014). Algabase veritabanından güncel olarak aldığımız bilgilere göre 166.139 türü bulunduğu bildirilmektedir (Guiry ve Guiry 2022).

Alglerin tarihte ilk defa kullanımı, Shen-Nung'un "Materia Medica" adlı kitabına göre M.Ö. 2700'lere kadar uzanmaktadır (Hoppe vd. 1979; Sukatar ve Şenkardeşler 2001; Kaba ve Çağlak 2006). Tıbbi ürün olarak kullanılması bu kadar eski tarihlere dayanan alglerin, yeni farmasötik ajanların üretilmesinde çok değerli biyoaktiviteli ikincil metabolitleri vardır. Algler ile yapılan çalışmalar neticesinde antimikrobiyal, antioksidan, antikanser ve antitümöral aktivitelerin varlığı ortaya konmuştur. Mikroalglerin antioksidan, vitamin ve renk kaynakları olmasıyla beraber zengin çoklu doymamış yağ asitlerine de sahip olmaları (Gökpinar vd. 2001) önemlerini daha da arttırmaktadır (Gökpinar vd. 2006; Aktar ve Cebe 2010).

Günümüzde, Dünya nüfusunun hızla artmasından ve gerekli besin ihtiyacının yetersizliğinden dolayı ileride ortaya çıkması muhtemel kıtlık tehlikesi, bilim insanlarını yeni besin kaynaklarını araştırmaya ve mevcut kaynakları geliştirmeye yönlendirmiştir (Alçay vd. 2017).

Yine aynı şekilde her yıl giderek artan enerji ihtiyacı ve karşılamak için kullanılan fosil kaynakların etkisiyle küresel iklim değişikliği sorunu, yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımını neredeyse zorunlu kılmaya başlamıştır (Say vd. 2010). Fosil yakıtlı enerji santralleri kaynaklı CO₂ azaltımı için biyolojik bir yöntem olarak mikroalg yetiştiriciliği bir çözüm olarak değerlendirilmektedir (Chisti 2007).

Okyanus, deniz gibi tuzlu su ve tatlı sularda birincil organik madde üreticileri olan mikroalgler hücre içindeki protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitaminler, pigmentler ve karotenoidler gibi metabolit ve bileşiklerinin öneminden dolayı ekonomik değere sahip

organizmalardır (Gökpınar vd. 2013). Bu değerli metabolitleri üretebilmeleri ya da biriktirebilmeleri sebebiyle mikroalgler, tıp, eczacılık, gıda takviyesi, kozmetik, yem hammaddesi, gübre, enerji (biyodizel), çevre ve atık teknolojisi gibi birçok alanda kullanılabilen biyoteknolojik organizmalardır (Alam vd. 2012; Duru ve Yılmaz 2013; Gökpınar vd. 2013; Baytaşoğlu ve Başusta 2015; Alçay vd. 2017).

Mikroalglerin yukarıda saydığımız özellikleri dışında, yıl boyunca düzenli olarak kültür yapılabilmesi, suyu ve güneş enerjisini (fotosentez) çok verimli kullanabilmeleri ve daha yüksek biyokütle elde edilebilmesinden dolayı mikroalg yetiştiriciliğinin önemi hızla artmaktadır (Gökpınar vd. 2013).

Endüstriyel boyutlu her işletmenin olduğu gibi mikroalg yetiştiriciliğinin de amacı, en uygun yatırımla, en verimli ürün geliştirilip kar elde edilmesidir. Mikroalg yetiştiriciliği iç/dış veya açık/kapalı sistemler, sürekli/kesikli yöntemler ve fototrofik/heterotrofik veya mikсотrofik dediğimiz iki yöntemin birlikte kullanılması ile yapılmaktadır. Endüstriyel ölçekli kültür sistemlerinde yatırımcı, tesis yerinin suyunun, ışığının, havasının, havadaki CO₂'nin, sıcaklığın etkin kullanımı, mikroalg kültürünün devamlılığını sağlama gibi her mikroalg türünün kendine özgü koşullarının sağlandığı kültür ortamını tercih etmelidir.

Chlorophyta (Yeşil Agler) şubesine, Chlorophyceae sınıfına ait ve Volvaceles takımına dâhil olan *H. pluvialis* tek hücreli, yeşil, çift kamçılı bir tatlı su algidir (Kobayashi vd. 1997; Lorenz 1999; Boussiba 2000). *H. pluvialis*'in Algalbase veribankasında güncel taksonomik sınıflandırmasında takım bilgisi Chlamydomonadales olarak revize edilmiştir (Guiry ve Guiry 2022). Kendi sınıfında yer alan veya diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında uygun yetiştiricilik koşullarında düşük büyüme hızı ve düşük hücre yoğunluğuna sahiptir (Fabregas vd. 2000). *H. pluvialis* uygun üreme şartları altında yeşil vejetatif formdadır, hücreler sıcaklık, tuzluluk vb. stres koşulları altında morfolojik olarak bir değişiklik geçirerek hematokistik forma dönüşürler. *H. pluvialis* bu kistik dönem de hücre içinde bir karotenoid olan astaksantin birikimi sağlar.

Çok güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğundan süper karotenoid (Gökpınar vd. 2006) veya süper antioksidan (Shah vd. 2016) olarak adlandırılan “astaksantin” metaboliti *H. pluvialis*'ten elde edilen biyokütlenin % 5'i (Mascia vd. 2017) civarında elde edilebilmektedir. Gıda takviyesi olarak alınan diyet karotenoidlerinin plazmada taşınması sindirim ve emilimin çeşitli basamakları canlı organizmalarda gözlemlenmiştir. Plazmada, b-karoten, α-karoten veya likopen gibi polar olmayan karotenoidler, çoğunlukla çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL'ler) ve düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL'ler) tarafından taşınır. Astaksantin, zeastaksantin veya lutein gibi polar karotenoidlerin LDL'ler ve yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL'ler) tarafından taşınma olasılığı daha yüksektir (Furr ve Clark 1997). İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, 100 mg'lık tek bir yüksek dozda sağlanan astaksantin biyoyararlanımını ve lipoproteinler tarafından plazmada taşınmasını doğrulanmıştır (Østerlie vd. 2000; Guerin vd. 2003). Bu önemli metabolit de *H. pluvialis* ekonomik değere sahip olan mikroalglerden birisi yapmaktadır.

Her ne tür olursa olsun su ürünleri tesislerinin planlanması, iyi bir sonuç elde etmek için çok bilgi gerektiren karmaşık bir süreçtir. Yatırımcının ileride karşılaşılabileceği sorunları, kurulacak olan tesisin yeterliliklerini karşılaması, tesisin

büyütülmesi ve gerektiğinde taşınması gibi konular göz önünde tutulmalı ve planlama yapılmalıdır (Lekang 2007).

FAO verilerine göre; dünyada makroalg üretimi ve doğadan toplanan toplam 35.762,504 ton, yetiştiricilik kültürü ile yapılan makroalg üretimi 34.679,134 ton, mikroalg yetiştiriciliği üretimi toplam 56.456 tondur. Yetiştiriciliği yapılan mikroalg türlerinde *Spirulina/ Arthrospira* türü 56.208 tonla en çok üretilen türdür. Sırasıyla, *H. pluvialis* 242 ton, *Chlorella vulgaris* 4.77 ton, *Tetraselmis spp.* 1.45 ton, *Dunaliella salina* 0.22 ton olarak üretilen diğer mikroalg türleridir (Cai vd. 2021; FAO 2021c).

Bugüne kadar *H. pluvialis* ile ilgili yapılan çalışmalarda; laboratuvar ortamında katı ve sıvı besiyerlerinde yetiştirilmesi, algal biyokütle elde edilmesi, elde edilen biyokütleden astaksantin ekstraksiyon yöntemleri, mikroalg hücrelerinin ve kuru biyokütlenin astaksantin içeriği, farklı katı ve sıvı besiyerlerinde yetiştiriciliği, farklı ışık ve sıcaklık değerlerinde yetiştiriciliği birçok açıdan araştırılmıştır. Ancak, endüstriyel ölçekli bir üretim ve üretim tesisi planlama çalışması yapılmamıştır. Kesikli üretim yöntemiyle üretilen *H. pluvialis* endüstriyel ölçekte yetiştirildiğinde, laboratuvar ortamındaki şartlardan çok daha farklı özellik göstermekte ve bütün parametrelerin çok daha dikkatli ele alınması gerekmektedir.

Bu çalışmada, *H. pluvialis* yetiştiriciliğinin uygun üretim koşulları araştırılıp, endüstriyel bir üretim tesisi planlaması ve endüstriyel ölçekli üretim yapılması amaçlanmaktadır. Böylece ülkemizde endüstriyel ölçekte yapılacak olan alg yetiştiriciliği tesislerinin düzenlenmesine katkı sağlayacağını ümit etmekteyiz.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. *H. pluvialis* Flotow

2.1.1. *H. pluvialis*'in sistematikteki yeri

H. pluvialis ile ilgili ilk araştırmalar Chantrans (1797)'nin yaptığı çalışmalarla başlamıştır (Flotow 1844). *H. pluvialis*'in ilk tanımı 1844'te Flotow tarafından verilmiş, 1851'de Braun bazı ayrıntılar eklemiş ve önceki gözlemlerin birkaç hatasını düzeltmiştir. Herrick, 1899'da *H. pluvialis*'in yaşam öyküsü hakkında bazı yorumlar yayınlamış ve yaşam döngüsünün dinlenme hücreleri ile hareketli hücreler arasındaki değişimine dikkat çekmiştir (Lorenz 1999; Rather vd. 2020). *H. pluvialis*'in taksonomik sınıflandırılması aşağıda görüldüğü gibidir (Guiry ve Guiry 2022).

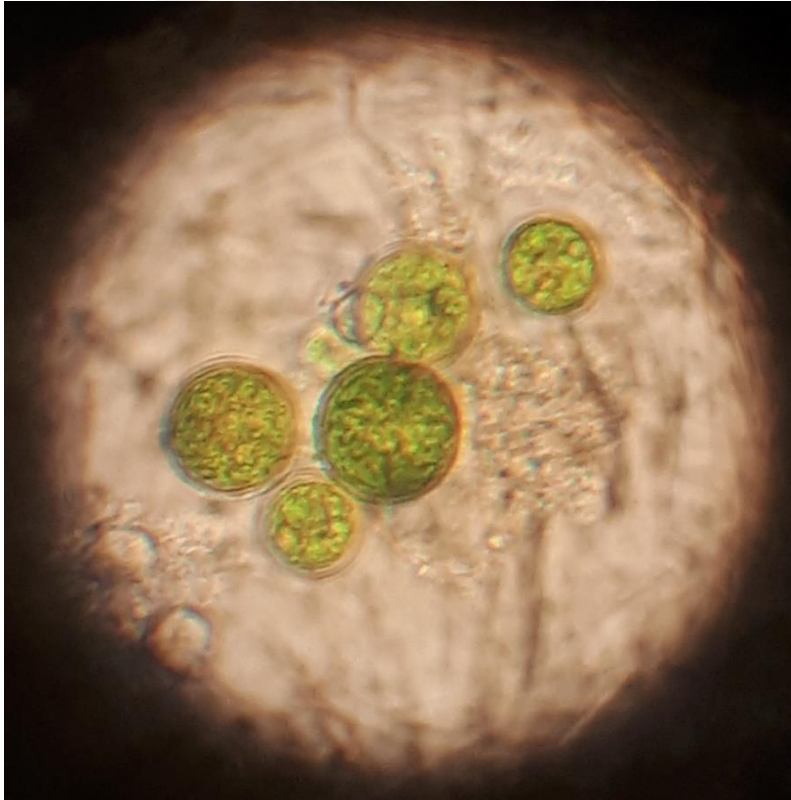
şube : Chlorophyta

Sınıf : Chlorophyceae

Takım : Chlamydomonadales

Aile : Haematococcaceae

Tr : *H. pluvialis* Flotow (şekil 2.1)



şekil 2. 1. *H. pluvialis* Flotow (Orijinal)

2.1.2. *H. pluvialis*'in genel özellikleri

H. pluvialis tatlı sularda bulunan Chlorophyceae sınıfına ait Volvaceales takımının üyesi olan, tek hücreli yeşil mikroalgdır (Kobayashi vd. 1997; Lorenz 1999).

H. pluvialis'in yaşam öyküsünün ilk kapsamlı açıklaması Hazen (1899) tarafından verilmiştir (Rather vd. 2020). Hazen (1899)'a göre alglerin genellikle, okyanusa yakın, periyodik olarak suyla doldurulmuş sığ havuzların kenarlarına yapışık kan kırmızısı bir kabuk olarak bulunduğu gözlemlenmiştir. Alglerin yaşam öyküsünü kırmızı dinlenme aşaması ve yeşil yüzme aşaması ve ardından tekrar kırmızı dinlenme aşaması olarak tanımlamıştır. O zamanlar alg içindeki kırmızı renklendirici maddenin kimyasal yapısı bilinmediğinden "hematokrom" adı verilmiş ancak şimdi ise astaksantin olarak bilinmektedir (Rather vd. 2020).

Yine Hazen (1899) *H. pluvialis* için Flotow (1844)'ün tanımlamasını yeterli bulmayıp, türün *Sphaerella lacustris* olarak tanımladığını ancak birçok bilim insanının da *H. pluvialis* olarak kullandığını bildirmiş ve türün genel özelliklerini aşağıdaki gibi açıklamıştır.

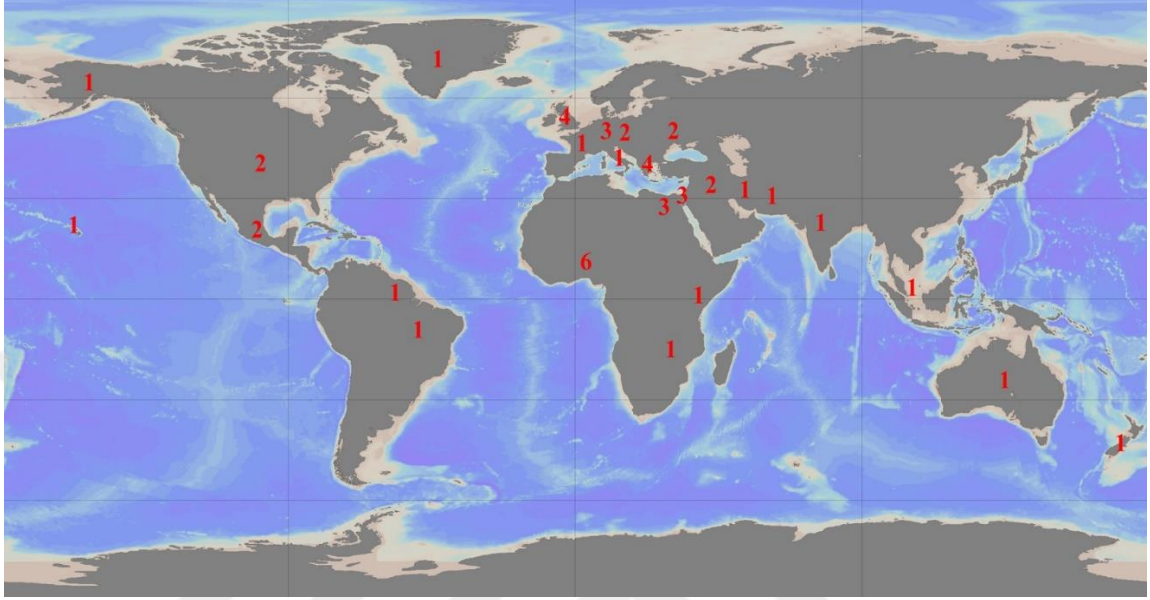
1. *Sphaerella lacustris* megazoidler ve mikrozooidler tarafından üretilen iki tür hareketli hücre vardır.
2. Megazoidler aseksüeldir.
3. Mikrozooidlerin konjugasyonu gözlemlendi, ancak oluşum koşullarından böyle bir süreç bulmayı beklemeliyiz.
4. Bitkisel bölünme, megazoidlerin oluşumundan farklı değildir; olumsuz koşullar hareketli durum varsayımını engeller.
5. *Sphaerella lacustris* amip formuna geçmez.
6. Hem hareketli hem de dinlenme durumunda hücre duvarı selülozdan oluşur.
7. Nişastanın biriktiği birkaç pirenoid, kromatoforda gömülüdür.
8. Kontraktıl vakuölü yoktur.
9. Hematokrom, klorofil ile yakından ilişkili bir maddedir, ancak daha karardır; değeri muhtemelen bu kararlılıkta ve belki de koruyucu ve ısı üreten gücünde yatmaktadır.
10. Zoospor genellikle güçlü bir şekilde ışığa doğru çekilir.
11. Canlılığın korunması için kuruma veya donma gibi bir miktar gelişme kesintisi gereklidir.
12. *Sphaerella lacustris*, selüloz hücre duvarına ve klorofil ve holofitik beslenme biçimine sahip olması nedeniyle bir bitki olarak kabul edilmelidir.
13. "Kırmızı kar" türü *Sphaerella nivalis*, morfolojik fizyolojik farklılıklar temelinde *S. lacustris*'ten farklı kabul edilir şeklinde bildirmiştir.

2.1.3. *H. pluvialis*'in dağılımı

H. pluvialis'in, su birikintilerinde, yağmur veya yapay havuzlarda, doğal ve yapay göletler gibi farklı su kütlelerinde görüldüğü ve Avrupa, Afrika, Kuzey Amerika, Güney Amerika, Avustralya ve Hindistan'ın farklı bölgelerinden izole edildiği bildirilmiştir (Burchardt vd. 2006; Herrero vd. 2012; Rather vd. 2020)(Şekil 2.2).

Ayrıca, Droop (1961) *H. pluvialis*'in tipik olarak, zorunlu olmamakla birlikte, genellikle denizden birkaç metre mesafede kaya havuzlarında bulunduğunu bildirmiştir.

H. pluvialis'in kalıcı su kaynaklarından ziyade geçici ortamlarda yaygın olarak görülmesi, kısmen bu tür havuzların genellikle diğer rakip alglerden arınmış olmasından dolayıdır. *H. pluvialis*'in, ışık, sıcaklık ve tuz konsantrasyonundaki hızlı ve aşırı dalgalanma koşullarına rağmen canlılığını sürdürmesi, hızlı kist yeteneği nedeniyle çoğu algden çok daha uygundur (Proctor 1957).



Şekil 2.2. *H. pluvialis* doğal tanımlandığı biyocoğrafik bölgelerin haritası (Genitsaris vd. 2016) Rakamlar, belirli bir bölgeden yapılan çalışmaların sayısını gösterir

2.1.4. *H. pluvialis*'in biyolojisi ve yaşam döngüsü

Uygun şartlar altında görünüşleri daire şeklinde olmayıp damla/armut şekline daha çok benzer ve büyüklükleri 8-80 µm çapında olan hücreler hücre duvarı ile çevrilidir (Hazen 1899). Kloroplastı fincan şeklinde olup, dağınık ve çok fazla preneoid içermektedir. Kontraktil koful düzensiz bir şekilde protoplastın yüzeyine yakın ve dağınık bulunur. Yapısında bir nukleus, apikal konumda eşit uzunluklu iki kamçı ve geniş porlara sahip selüloz hücre duvarı vardır. Hücre duvarı kalın, jelatinimsi olup protoplast iplikler halinde görünmektedir (Boussiba 2000).

Üremeye uygun koşullar altında yeşil vejetatif fazda olan *H. pluvialis*'in hücreleri sıcaklık, tuzluluk vb. stres koşulları altında yapısında bazı değişiklikler geçirerek kırmızı kistik faza geçerler. Değişen bu şartlar altında kendini devamlı koruyabilen mucizevi bir yaşam döngüsü oluştururlar. *H. pluvialis*'in yaşam döngüsü dört evreden oluşur (Şekil 2.3)(Souza vd. 2020)

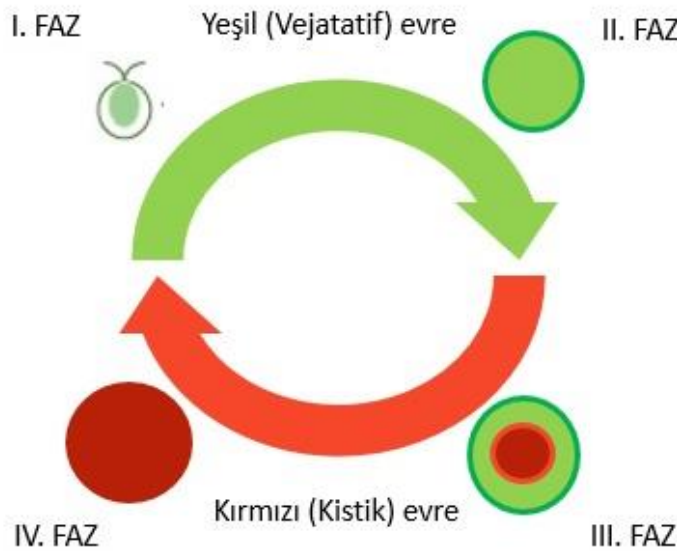
1. Zoosporlar olarak tanımladığımız vejetatif, yeşil, kamçılı, hücreler hareketlidirler. Hücre içerisinde daha yüksek klorofil ve protein görülür ve bölünme hızları yüksektir.

2. Yeşil, kamçısız, durağan, palmelloid hücrelerdir (Palmelloid evre). Bölünme devam eder, yüksek vakuol içeriği vardır.

3. Kamçısız, durağan, palmelloid hücreler artık kistik hücelere dönüşürler ve kahverengine dönüşürler, hücre bölünmesi durmuştur ve hücreler sabit faza geçmiştir. Hücrelerde klorofil ve proteinde azalma olur. Hücrenin zamanla büyüdüğü görülür.

4. Kırmızı hücrelerdir (Aplanosporlar veya Hematokistler).

Kırmızı renge dönmüş olgun kistik hücrelerin dayanıklı hücre duvarı vardır. Hücrelerin astaksantin miktarı ve kuru hücre ağırlığı belirli bir süre daha artmaya devam eder. *H. pluvialis* hücreleri yaşamsal (yeterli besin, su, havalandırma, CO₂) uygun yaşam koşulları altında 1. ve 2. yeşil faz dediğimiz dönemi, stres (sıcaklık, tuzluluk, besin eksikliği, susuzluk) koşullarına maruz kaldıklarında ise 3. ve 4. dönemlerine geçerler. Eğer yaşam koşulları, hematokist formundayken tekrar uygun şartlara dönerse hücreler vejetatif yeşil forma döner ve döngü tamamlanır (Boussiba 2000; Souza vd. 2020).



Şekil 2.3. *H. pluvialis*'in yaşam döngüsü ana fazlarının şematik gösterimi (Orjinal)

Üreme üç yolla gerçekleştirilir:

1. Büyük hareketli yavru hücrelerin veya megazoidlerin oluşumuyla,
2. Hareketsiz yavru hücrelerin oluşumuyla,
3. Daha küçük hareketli hücrelerin veya mikrozoidlerin oluşumuyla (Hazen 1899).

Bazı durumlarda, aplanosporlarda gametogenez meydana gelebilir. Bu tür bir süreç, aşırı olumsuz koşullara (donma, kuruma veya besin açlığı) maruz kalmayı ve

ardından uygun kültür koşullarına geri dönmeyi gerektirir. Gametogenez sırasında, aplanospor hücreleri, mikrozoidler olarak bilinen 64'e kadar gamet üretebilir. Mikrozoidler, zoosporlara (20–50 µm) kıyasla boyut olarak daha küçüktür (<10 µm) ve gametokistlerden serbest bırakıldıktan sonra yüksek hızlı hareketlilik sergilerler. *H. pluvialis*'te eşeyli üreme nadiren görülür ve bunun yerine büyük ölçüde vejetatif üreme görülür (Triki vd. 1997; Shah vd. 2016).

Birincil organik madde üreticileri olan *H. pluvialis*'in hücre içindeki temel besin öğeleri değerleri çizelge 2.1'de, aminoasit öğeleri değerleri çizelge 2.2'de, yağ asidi öğeleri değerleri çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. *H. pluvialis*'in temel besin öğeleri değerleri (Lorenz 1999)

Bileşenler	Minimum	Maksimum	Aritmetik ortalama
Protein	17,30	27,16	23,62
Karbonhidrat	36,9	40,0	38,00
Yağ	7,14	21,22	13,80
Demir (%)	0,14	1,0	0,73
Nem	3,0	9,00	6,0
Magnezyum (%)	0,85	1,4	1,14
Kalsiyum (%)	0,93	3,3	1,58
Biyotin (mg/lb)	0,108	0,665	0,337
L-karnitin (ug/g)	7,0	12	7,5
Folik asit (mg/100 g)	0,936	1,48	1,3
Niasin (mg/lb)	20,2	35,2	29,8
Pantotenik asit (mg/lb)	2,80	10,57	6,14
Vitamin B1 (mg/lb)	0,050	4,81	2,17
Vitamin B2 (mg/lb)	5,17	9,36	7,67
Vitamin B6 (mg/lb)	0,659	4,5	1,63

Çizelge 2.1.'in devamı

Vitamin B12 (mg/lb)	0,381	0,912	0,549
Vitamin C (mg/lb)	6,42	82,7	38,86
Vitamin E (IU/lb)	58,4	333	186,1
Kül	11,07	24,47	17,71

Çizelge 2.2. *H. pluvialis*'in aminoasit ögeleri değerleri (Lorenz 1999)

Amino asit	Minimum	Maksimum	Aritmetik ortalama
Triptofan	0,05	0,56	0,31
Aspartik asit	1,37	2,31	1,89
Treonin	0,78	1,24	1,04
Serin	0,73	1,06	0,94
Glutamik asit	1,70	2,39	2,19
Prolin	0,69	1,00	0,89
Glisin	0,84	1,32	1,17
Alanin	1,30	1,92	1,73
Sistein	0,16	0,21	0,19
Valin	0,83	1,94	1,36
Metionin	0,32	0,43	0,40
İsolösin	0,55	0,97	0,79
Lösin	1,21	1,84	1,67
Tirozin	0,40	0,63	0,52
Fenil alanin	0,61	1,05	0,90
Histidin	0,48	0,76	0,61
Lisin	0,75	1,32	1,13
Arginin	0,81	1,34	1,07

Çizelge 2.3. *H. pluvialis*'in yağ asidi ögeleri değerleri (Lorenz 1999)

Yağ asidi	Kontrol	A-Stres	B-Stres
C6:0	Saptanmadı	1,33	0,25
C8:0	Saptanmadı	0,27	0,13
C10:0	Eser miktar	0,23	Eser miktar
C12:0	0,21	0,30	0,44
C13:0	Saptanmadı	Saptanmadı	0,16
C14:0	1,25	1,35	1,35
C14:1	Eser miktar	Saptanmadı	Saptanmadı
C15:0	0,19	0,27	0,44
C15:1	Saptanmadı	Saptanmadı	Saptanmadı
C16:0	22,49	18,87	21,29
C16:1	0,64	0,58	0,83
C17:0	0,19	0,32	0,32
C17:1	Eser miktar	Eser miktar	Eser miktar
C18:0	3,15	7,07	5,69
C18:1n9t	Eser miktar	0,67	Eser miktar
C18:1n9c	19,36	18,25	18,35
C18:2n6t	6,67	5,37	7,57
C18:2n6c	20,23	22,06	22,9
C20:0	0,2	0,32	0,27
C18:3n6	0,86	1,02	0,95
C20:1	0,13	0,23	0,17
C18:3n3	16,18	12,01	18,69

Çizelge 2.3.'ün devamı

C21:0	Eser miktar	Eser miktar	Eser miktar
C20:2	0,32	1,15	1,59
C22:0	0,18	0,31	0,25
C22:1n9	Eser miktar	0,17	0,16
C20:4n6	0,89	1,21	0,84
C24:0	Eser miktar	0,20	Eser miktar
C20:5n3	0,57	0,48	0,49
C22:5n3	Saptanmadı	Saptanmadı	Saptanmadı
Doymuş yağ asitleri (%)	27,81±0,42	30,36±1,19	29,62±0,73
Tekli doymamış yağ asitleri (%)	20,07±0,06	19,91±0,12	18,96±0,65
Çoklu doymamış yağ asitleri (%)	45,80±0,18	43,15±0,68	47,23±0,56

2.1.5. *H. pluvialis*'in astaksantin birikimi

H. pluvialis'teki pigment, Tischer vd. (1944)' nin ana karotenoidi astaksantin olarak tanımladığı 1944 yılına kadar "hematokrom" olarak adlandırılmıştır (Goodwin ve Jamikorn 1954; Lorenz 1999). Goodwin ve Jamikorn (1954) karotenogenez sırasında *H. pluvialis*'te üretilen diğer pigmentleri tanımlamıştır. Droop (1954) *H. pluvialis*'te astaksantin oluşumunu ve kaybını yöneten koşulları tanımlamıştır. Işık ve karbondioksitin etkisinin birbirine bağlı olduğunu, ancak organik karbonun (asetat gibi) etkisinin ışıktan bağımsız olduğunu göstermiştir. Böylece, enerji organik karbondan türetildiğinde karanlıkta astaksantin oluşumu meydana gelebilmektedir (Droop 1955). Algdeki kabuklanma ve karotenojenez koşulları aynıydı ve iki görüngü genellikle birlikte meydana gelmekteydi. Kistleşme ve astaksantin üretimi, düşük nitrat veya fosfat, yüksek sıcaklık veya ışık veya kültür ortamına sodyum klorür (NaCl) eklenmesiyle başlamaktadır (Boussiba ve Vonshak 1991; Kobayashi vd. 1992; Fan vd. 1994; Lorenz 1999).

H. pluvialis'te astaksantin biriktirmeye başlaması esnasında fizyolojik değişimler oluşur, bu farklılıklar hücre metabolizma işleyişindeki değişiklikler ve hücre içeriğindeki bileşenlerde meydana gelen değişiklikler olarak iki bölümde incelenebilir (Boussiba 2000). En önemli fizyolojik değişiklik ise, fotosentez işlevinin azalmasıyla birlikte hücrenin metabolizmal faaliyetlerinde görülmektedir (Yong ve Lee 1991; Hagen vd. 1992; Zlotnik vd. 1993). Bu süreçte özellikle fotosistem II (FSII) mekanizmasının

etkilendiği görülmektedir. Hücrenin fotosentez faaliyeti ile hücre içindeki astaksantin miktarı arasındaki ilişkinin ters oranlı olduğu bildirilmiştir (Boussiba 2000; Boussiba vd. 1999; Tan vd. 1995). Fotosentez yapan canlılarda O₂'nin fotosentez mekanizmasında elektron aktarım görevinden dolayı reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu neredeyse zorunludur.

Hücre içeriğindeki değişiklikler ise, yeşil hücrelerin, kırmızı hücrelere dönüşümü esnasında hücrenin karbonhidrat içeriğinin de artması olarak görülür. Hücre içindeki bu karbonhidrat artması hücrenin kuru ağırlığının %63'ü seviyelerini bulabilir. Hücrede karbonhidrat biyomolekülünün yapımı, proteine göre daha az enerji harcadığından, bu süreç 3. evrede metabolizmanın yavaşlamaya başladığının bir göstergesidir. Hücrenin lipid bileşeninde görülen fazlalık ise, renk maddelerinin (pigment) birikimi ile alakalıdır. Renk maddeleri olan pigmentlerin tutunmak için lipid kürelerine gereksinim hissettiğini gösterir. Hücre içinde astaksantin oluşumunun yağ asidi senteziyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Boussiba and Vonshak 1991; Boussiba 2000). Karotenoid pigmentleri genelde hidrofobik maddelerdir suda çözünmez, yağda çözünürler. Hücre içinde astaksantin birikiminin artması ve yayılması, yağ asitlerinin bir ağ şeklinde sitoplazmanın her yerine dağılmasıyla oluşmaktadır (Santos ve Mesquita 1984; Boussiba 2000). *H. pluvialis* hücrelerinin 3. ve 4. evrelerini oluşturan stres yaşam koşulları altında hücreler içinde birikmeye başlayan astaksantin, hücre kuru ağırlığının % 4'ü kadarını bulabildiği ve mono/diesterlerinin de neredeyse hücre içindeki toplam karotenoidin % 98'ni oluşturduğu bildirilmiştir (Boussiba vd. 1999; Boussiba 2000).

Daha yüksek bitkiler ve yeşil algler, β - karoten için aynı karotenoid biyosentetik yolunu paylaşır. β -karoten ketolaz ve β -karoten hidroksilaz, *H. pluvialis*'te astaksantine yol açan diğer adımları katalize eder. β -karoten ketolaz, yalnızca astaksantine yol açan ikincil karotenoid yoluna katılan tek enzimdir (Lu vd. 2010).

Astaksantin, β -karotenden iki farklı yolla sentezlenir (Fan vd. 1995; Fraser vd. 1997; Grewe ve Griehl 2008). Bir astaksantin sentez inhibitörü olan difenilamin kullanımıyla, ekinenon, kantaksantin ve adonirubin yoluyla *H. pluvialis* için bir sentez yolu önerilmiştir (Fan vd. 1995).

1.Yol;

β -karoten – ekinenon - kantaksantin – adonirubin - astaksantin

2.Yol

β -karoten - kriptoksantin - zeaksantin - adonixanthin - astaksantin

H. pluvialis hücreleri içinde stereoizomer (3S,3'S) astaksantin biriktirilir (Andrewes vd. 1974).

Ticari üretim için genelde kullanılan iki yöntem vardır. Biri, yüksek biyokütle için uygun yaşam koşulları (yeşil faz) ardından kesikli yöntem ile stres koşulları altında hematokist oluşumu üretimini iki ayrı zamanda, diğeri ise sabit stres koşulları altında sürekli kültüre dayalı bir üretim modelidir (Fabregas vd. 2000; Borowitzka 2007).

Genel olarak *H. pluvialis*'ten astaksantin üretimi, iki aşamalı bir kültürle sağlanır: vejetatif (yeşil) ve aplanospor (kırmızı) aşamalar. Vejetatif aşamada, yavaş büyüme hızı, düşük hücre yoğunluğu ve kontaminasyona yatkınlık başlıca problemlerdir. Bu bağlamda, özellikle kültür ortamının sterilizasyonu, ışık yoğunluğu ve organik karbon beslemesi üzerinde büyümeyi iyileştirmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Sodyum asetatın mikсотrofik koşullar altında organik karbon kaynağı olarak kullanılması, *H. pluvialis*'te hücre yoğunluğunu ve büyüme hızını arttırmanın uygun bir yolu gibi görünse de, kontaminasyon riskini artırdığı unutulmamalıdır. Organik maddeler üzerinde çok hızlı büyüeyebilen özellikle bakteriler ve *Chlorella spp.* gibi mikroalglerin olması nedeniyle *H. pluvialis*'i organik karbon kaynağıyla yetiştirmek büyük risk taşır (Borowitzka 2007; Goksan vd. 2010).

Geleneksel mikсотrofik mikroalg kültürlerinde, aşılamaadan önce ortamda diğer inorganik besinlerle birlikte organik bir karbon kaynağı bulunur. Bununla birlikte, kültürlerin başlangıçta inorganik besinler tarafından fototrofik olarak büyütüldüğü ve daha sonra yavaşlama fazının sonunda farklı ışık yoğunlukları altında sodyum asetat ilavesinin yapıldığı yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu alternatif mikсотrofinin, bir toplu kültür döneminde çok daha yüksek hücre yoğunluğu ve hücrelerin organik karbon kaynaklarına daha kısa süre maruz kalması nedeniyle en aza indirilmiş kontaminasyon riskleri gibi geleneksel mikсотrofiye karşı birçok avantajı olduğu bilinmektedir. İki aşamalı bir büyüme süreci, vejetatif hücre büyümesi ile astaksantin birikimi arasındaki çelişkiyi çözebilir ve *H. pluvialis*'in kapalı bir sistemde kültüre edilmesi kontaminasyon riskini azaltabilir. *H. pluvialis*'in iki aşamalı bir büyüme süreci boyunca kültür çoğaltmak için farklı kapalı biyoreaktörler kullanılmıştır. İki aşamalı üretim sürecini basitleştirmek ve sürekli kültürlerde verimli tek aşamalı üretim sürecini geliştirmek için çaba gösterilmiştir. Ancak göreceli verimlilik açısından, iki aşamalı sistemler, tek aşamalı sistemlerden daha iyi performans gösterir. İki aşamalı sistem, tek aşamalı sistemden daha iyi (2,5-5 kat) performans gösterir ve birincisi verimli bir seri üretim kurulumuna en uygun olanıdır (Aflalo vd. 2007). Tek aşamalı üretim, kararlı durumda sınırlayıcı stres altında sürekli kültüre dayalı bir yaklaşım kullanır, biyokütle üretimi ve astaksantin üretimi aynı anda gerçekleşir. İki aşamalı üretim, zamanla biyokütle (yeşil aşama) ve pigmentlerin (kırmızı aşama) üretimini ayırır. Şimdiye kadar, hem tek aşamalı hem de iki aşamalı astaksantin üretimi, kapalı biyoreaktörler gerektirir (en azından yeşil aşamada). Fotobiyoreaktörlerde kültür, açık kültür sistemlerine kıyasla pahalıdır. Ancak Zhang vd. (2009) açık havuzda *H. pluvialis* ekimi için iki aşamalı büyüme tek adımlı bir süreç geliştirmiş ve kistte 100g⁻¹ ağırlık başına 2.10 g ortalama astaksantin içeriği elde etmiştir.

Yeşil hücrelerin yüksek astaksantin içeriğine sahip kırmızı kistlere dönüştürülmesi için birçok indüksiyon yöntemi geliştirilmiştir. İndüksiyon yöntemleri, astaksantin antioksidan depolama molekülü veya protokoruyucu madde olarak rolüne göre iki sınıfa ayrılabilir. Birinci sınıf, hücre çoğalmasının gecikmesine neden olmak için güçlü ışık dışında çeşitli çevresel stresleri kullanır; örneğin nitrojen açlığı, aşırı asetat ilavesi, tuz stresi veya hücre bölünmesinin çok özel inhibitörlerinin eklenmesi (Borowitzka vd. 1991; Cordero vd. 1996; Harker vd. 1996). Hücresel kistlerin tetiklenmesinde en önemli faktör bir nitrojen eksikliği gibi görünmektedir. Hücre bölünmesinin sona ermesi üzerine sadece karbon kaynakları mevcutsa, hücreler antioksidan işlevi olan bir depolama malzemesi olarak astaksantin biriktirir. Diğer sınıf,

yüksek yoğunluklu ışık altında astaksantin fotokoruyucu rolünü kullanan ışık indüksiyon yöntemidir (Boussiba ve Vonshak 1991).

H. pluvialis hücreleri yüksek yoğunluklu ışığa maruz kaldığında, hücreleri fotohasar ve oksidatif hasara karşı korumak için astaksantin birikimini hızlandırır. Ayrıca, astaksantin birikimini arttırmak için asetat ilavesinin kullanıldığı yüksek yoğunluklu bir ışık indüksiyon yöntemi de uygulanmıştır. Fazla asetat ilavesi, göreceli bir nitrojen eksikliği yaratır, bu da kist oluşumunu ve astaksantin birikimini tetikleyen yüksek bir karbon/azot (C/N) oranı ile sonuçlanır (Orosa vd. 2001; Orosa vd. 2005). Bununla birlikte, yeşil mikroalg tarafından antioksidan astaksantin üretimi için verimli bir fototrofik indüksiyon sistemi kurulmuştur. Uygun bir CO₂ konsantrasyonu ve kontrollü ışık radyasyon hızı, *H. pluvialis*'in üretken bir şekilde saklanmasına ve astaksantin sentezinin artmasına yol açmıştır (Kang vd. 2005). Son zamanlarda, metil jasmonat ve giberellinlerin astaksantin birikimi ağında moleküler sinyaller oluşturduğu bildirilmiştir. Metil jasmonat ve giberellinler uygulaması, *H. pluvialis*'te üç β -karoten ketolaz geninin (bks) transkripsiyonunu artırarak astaksantin sentezini ve birikimini arttırdı. Metil jasmonat ve giberellinler, bitkilerin stres tepkilerinde rol oynar. Astaksantin birikiminin metil jasmonat veya giberellinler tarafından başka herhangi bir uyaran olmaksızın uyarılması, çekici bir uygulama potansiyeli sunar (Lu vd. 2010).

2.1.6. Astaksantin genel özellikleri

Astaksantin, yalnız karbon ve hidrojen değil, bunun yanı sıra oksijen atomu da içerdiği için ksantofil karotenoidler grubuna girer. Astaksantin, bir polien zinciri ile birleştirilen iki terminal halkadan oluşur. Bu molekül, molekülün her iki ucunda hidroksil grubu (-OH) ile β -iyonon halkasının 3, 3' konumlarında bulunan iki asimetrik karbona sahiptir (Şekil 2.4). Birinci durumda, hidroksil grubu bir yağ asidi ile reaksiyona girer, o zaman mono-ester oluşturur, oysa her iki hidroksil grubu da yağ asitleri ile reaksiyona girdiğinde sonuç bir di-ester olarak adlandırılır. Astaksantin, stereoizomerlerde, geometrik izomerlerde, serbest ve esterleşmiş formlarda bulunur (Higuera-Ciapara vd. 2006). Bu formların tümü doğal kaynaklarda bulunur. Stereoizomerler (3S, 3'S) ve (3R, 3'R) doğada en bol bulunanlardır ve *H. pluvialis* hücrelerinde (3S, 3'S) izomerini biyosentezlemektedir (Ambati vd. 2014).

Astaksantin, çok etkili antioksidan aktivite gösterebilir. Antioksidan faaliyetler, hidroksil, peroksil gibi çeşitli serbest radikallere karşı hücreyi koruma etkisidir. Serbest radikaller, bir veya birden fazla çiftleşmemiş elektron içeren moleküllerdir. Bu moleküller çok yüksek reaktiviteye sahiptir ve organizmalarda normal aerobik metabolizma tarafından üretilir. Aşırı oksidatif moleküller, zincir reaksiyonu yoluyla proteinler, lipidler ve DNA ile reaksiyona girerek protein ve lipid oksidasyonuna ve çeşitli bozukluklarla ilişkili DNA hasarına neden olabilir (Ambati vd. 2014). Astaksantin antioksidan aktivitesi, Vitamin-E'den 500 kat, β -karoten'den 10 kat, lutein'den 4 kat daha etkilidir (Chen vd. 2003; Hagen vd. 2001; Hata vd. 2001; Altuğ 2001; Naguib 2000; Miki 1991).

Astaksantin'in özellikleri ve kimyasal yapısı aşağıdaki şekildedir (Lorenz 1999).

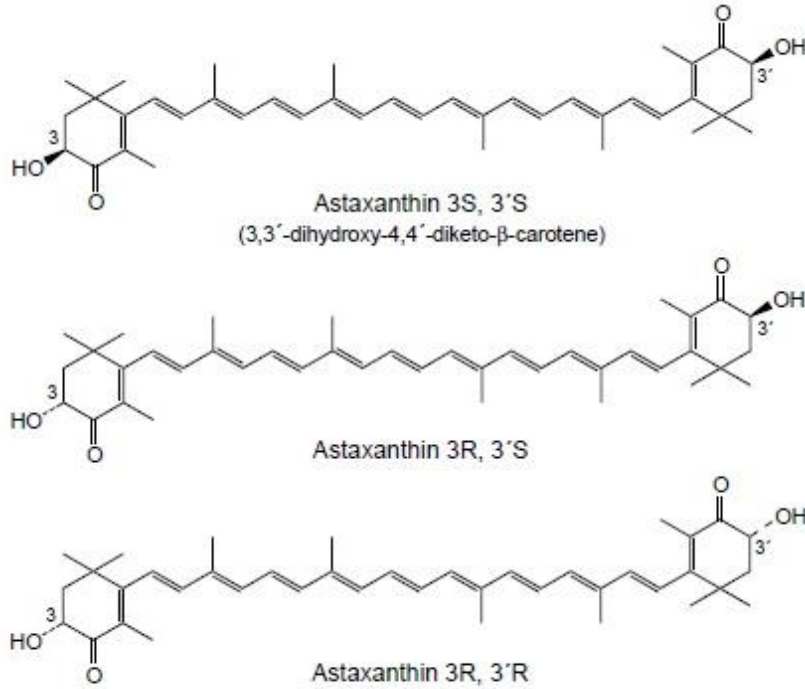
Kimyasal adı : 3,3'-dihidroksi-β, β-karoten-4,4'-dion

Moleküler formülü : C₄₀H₅₂O₄

Moleküler ağırlığı : 596.82

CAS numarası : 472-61-7

EINECS numarası : 207-451-4



Şekil 2.4. Astaksantin kimyasal yapısı (Guerin vd. 2003)

2.1.7. Astaksantin endüstriyel kullanım alanları

Astaksantin, hidroksil ve preoksil vb. serbest radikallere karşı çok güçlü bir antioksidandır. UV ışığına karşı güçlü bir foto koruyucu, göz sağlığı için çok etkili, toksik reaktif oksijen türlerine (ROS) bağlı iltihaplanmaya karşı dengeleyici, cilt sağlığında, güneş yanıkları, cilt iltihabı, yaşlanma karşıtı ve cilt sinogenesisine bile oldukça etkilidir. Kalp sağlığında; insan kanında VLDL, LDL ve HDL tarafından

taşınabildiğinden, yapılan bir in vitro test ve ardışık iki hafta boyunca günde 3.6 mg astaksantin kadar düşük günlük dozlar alan insan deneklerde, astaksantin LDL-kolesterolü indüklenen in vitro oksidasyona karşı koruduğunu göstermiştir (Guerin vd. 2003).

Astaksantin özellikle beslenmeye destek ürünlerde, gıda takviyesi, kozmetik ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar dışında astaksantin; kanser hastalarında, kalp ve deri hastalıklarında da kullanılmaktadır. Güçlü bir antioksidandır. Hormon ve bağışıklık sistemini güçlendirici, provitamin A içermesi, üreme ve büyümede olumlu etkileri, zararlı UV ışınlarına karşı koruması ve güneş yanıklarını azaltma etkisi nedeniyle tercih edilmektedir (Guerin vd. 2003; Shah vd. 2016; Demir vd. 2020).

Astaksantin süper-antioksidan özelliği ile insan sağlığı ve canlılar üzerine farklı pozitif etkileri vardır. Antikor miktarını artırmaya bağlı olarak bağışıklık sistemini güçlendirir (Chen vd. 2003; Kobayashi vd 1997). Kanser hücrelerinin oluşumunu engeller (Fabregas vd. 2000; Tanaka vd. 1995). Enfeksiyonlara karşı engelleyici olduğu düşünülmektedir. Bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir. UV ışınların zararlı etkilerinden cildi ve deriyi koruyucudur (Hagen vd. 2001; O'Connor and O'Brien 1998). Yaşlanmadan kaynaklanan cilt bozunumunu iyileştirir. Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının oluşumunu azaltır. Kolesterol düzeyini düzenler. Retinayı oksidatif zarardan korur. Canlılar üzerinde yapılan deneylerde başarılı olunmuş ve insanlardaki *Helicobacter pylori* enfeksiyon tedavisinde uygulanması önerilmiştir.

Gökpınar vd. (2006)'nin yaptığı çalışmada şöyle söylemektedir:

“... insanlarda yaşlanmanın ve kronik hastalıklar karmaşık biyolojik süreçler sonucu oluşur. Bu karmaşık süreçleri anlamak için çeşitli hipotezler öne sürülmüş ve bunlar deneysel olarak test edilmiştir. Yaşlanma ile ilgili olarak ileri sürülen teoriler son yıllarda moleküler genetik ve deneysel tekniklerde sağlanan ilerlemeler ile açıklanmaya başlanmıştır. ROS'nin hücrede giderek artan bir şekilde oluşturduğu zararlar esas olarak, yaşlı (senescent) hücrelerde telomer erozyonu, genom kararsızlığı, DNA mutasyonları ve gen profillerindeki değişimleri kapsadığını. Yaşlanma ile ilgili öne sürülen teorilerden en çok dikkat çeken “serbest radikaller” teorisidir. Bu teori ilk olarak Harman (1956) tarafından ileri sürülmüştür. Serbest radikal molekülleri eşlenmemiş elektron içeren, çok kararsız, diğer moleküllerle çok hızlı reaksiyona giren ve kimyasal olarak kararlı hale gelebilmek için elektron almaya gereksinim duyan moleküllerdir. Bir moleküle saldırdığında onun elektronunu çalarak okside eder ve bu yeni molekülün kendisi bir serbest radikal haline dönüşür. Bu şekilde başlayan bir zincir reaksiyonlar dizisi canlı hücrenin zarar görmesi ile sonuçlanır. Serbest radikallerin yarattığı en büyük zarar hücre zarları üzerinedir. Bunlar hücre zarlarından elektron çalarak eşlenir, hücre zarı ve sonuç olarak hücre yapısını bozar. Çeşitli mekanizmalar sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı vücutta doğal bir savunma mekanizması vardır. Bu savunma mekanizmasını oluşturan bileşiklere “antioksidanlar” denir. Antioksidanlar doğal antioksidanlar ve ilaçlar olmak üzere iki grupta toplanabilir.

Doğal antioksidanlar arasında enzimler (superoksit dismutaz-SOD, katalaz-CAT, glutathion peroksidaz-GP, glutathion redüktaz, sitokrom-C-oksidad, hidroksiperoksidaz),

makromoleküller (seruloplazmin, transferrin, ferritin, myoglobin, haptoglobilin) ve mikromoleküller (β -karoten, A-vitami, C-vitami, E-vitami, tokoferoller, tiol içerenler, glutation (GSH), N-asetil sistein, metionin, kaptopril, ubiguinon) sayılabilir (Hilmi,1994).

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.”

Karotenoidler insanda ince bağırsağında %5-50 oranında pasif diffüzyon ile emilir. Bu emilim oranı diyetteki yağ miktarıyla ilişkilidir. Karotenoidler hücreyi oksidatif strese; triplet molekülleri ve singlet oksijeni süpürerek, serbest radikalleri inhibe ederek korur (Tee ve Lee 1992).

Demir vd. (2020)'nin de yaptıkları bir çalışmada şöyle demişlerdir:

“... Astaksantin (ASX), çeşitli mikroorganizmalarda ve deniz hayvanlarında bulunan kırmızı renkli bir ksantofil karotenoididir. ASX, mevcut karotenoidler arasında en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğundan "süper antioksidan" olarak da adlandırılmaktadır. ASX'in antioksidan özelliğinin yanında, antimikrobiyal, immünomodülatör, hepatoprotektif, antikanser ve antidiyabetik özellikleri de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bununla birlikte, ASX'in kanser hücreleri üzerindeki seçici sitotoksik etkilerini inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı, ASX'in yaygın kanser türlerini temsil eden hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemektir. Bunun için insan meme (MCF-7), akciğer (A549), karaciğer (HepG2), melanoma (VMM917), kolon (WiDr) kanseri ve normal fibroblast hücreleri 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda ASX ile muamele edildi ve ardından MTT protokolü uygulandı. Cisplatin sitotoksikite deneylerinde pozitif kontrol olarak kullanıldı. Sonuçlar, ASX'in incelenen tüm kanser hücre hatları üzerinde doza bağımlı bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, fibroblast hücreleri ile kıyaslandığından ASX'in en güçlü seçici sitotoksik etkisinin A549 ve WiDr hücrelerinde olduğu belirlendi. Bu çalışma ASX'in seçici sitotoksik etkisinin, özellikle akciğer ve kolon kanseri açısından daha kapsamlı şekilde araştırılması gerektiğini göstermektedir.”

Shah vd. (2016)'nin yaptığı çalışmada *H. pluvialis*'ten elde edilen astaksantin içeren diyet takviyelerinin insanlar için güvenli olduğu kanıtlandığını ve takviyesinin hiçbir olumsuz yan etkisi olmaksızın nutrasötik bir takviye olarak 15 yılı aşkın bir süredir

yaygın olarak kullanıldığını. *H. pluvialis*'ten elde edilen doğal astaksantin, potansiyel sağlık yararları nedeniyle günde 3,8 ila 7,6 mg arasında bir diyet takviyesi olarak piyasada kullanıldığını bildirmiştir.

Astaksantin endüstriyel kullanımında diğer en büyük pazarı ise su ürünleri yetiştiriciliği sanayisi oluşturmaktadır. Alabalık ve süs balığı gibi renklendirme etkili balık yetiştiriciliğinde renk kaynağı (pigment) olarak kullanılır. Su ürünleri yetiştiriciliği endüstrisinde kullanılan astaksantin, sadece renk verici özelliği değil, aynı zamanda canlıların daha hızlı gelişimi, balık hastalıklarıyla mücadele ve canlı yaşama oranının yükseltilmesinde önemli bir yere sahiptir (Torrissen ve Christiansen 1995; Yeşilayer vd. 2008; Duru ve Yılmaz 2013).

Bir diğer endüstriyel kullanım alanı ise kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde yumurta sarısının renklendirilmesidir (Elwinger vd. 1997; Inbarr 1998).

2.2. *H. pluvialis* Endüstriyel Biyomas Üretim Yöntemleri

Algal biyokütle üretiminde temel etkenleri göz önüne alacak olursak; Biyoteknolojik uygulamalarda büyüme kinetiğindeki ana kavram, birim hücre kütlesi başına hücre kütlesinin artış hızı olarak tanımlanan "spesifik büyüme hızı" dır. Maksimum özgül büyüme oranına, alg hücreleri organizmanın ulaşabildiği en hızlı replikasyon için gerekli tüm besin maddelerinin fazla miktarda mevcut olması durumunda ulaşılır. Algal biyokütle üretiminin verimli olabilmesi için gerekli etkenler; su, ışık (şiddeti, dalga boyu, sıcaklığı), CO₂, besin ve istikrarlı çevre koşulları (sıcaklık, pH, sterilizasyon) dır (Barsanti ve Gualtieri 2014).

Algal biyokütle üretim sistemlerine baktığımızda; Mevcut algal yetiştiricilik sistemleri üç grupta değerlendirilebilir: açık sistemler, kapalı sistemler ve hibrit sistemler. Bu sistemleri birbirinden ayıran fark ise doğal ortama maruz kalıp kalmamalarıdır. Açık bir sistem genellikle çevredeki ortama maruz kalan havuzları ifade eder. Kapalı sistemler, reaktör tasarımlarına göre tüp, kolon, düz plaka, membran ve ekli yetiştirme sistemi dâhil olmak üzere çeşitli tiplerde sınıflandırılabilir (Moreno-Garcia vd. 2017; Cai vd. 2013). Hibrit sistemler ise, üretim fazında (kontaminasyona daha açık iken) veya daha sabit üretim özellikleri gerektiren ilk çoğalma sürecinde kapalı reaktörler daha sonra açık sistemlerde üretime devam edilen şeklinde tanımlanabilir.

Üretim tipi ve tesisi seçilirken işletmenin mali gücü, üretilen türün özelliği, üretim tesisinin bulunduğu lokasyon ve üretilen son ürüne göre maksimum üretim sağlayacağı yöntem değerlendirilmelidir (Lekang 2007).

Açık sistemler

Açık sistemler mikroalg yetiştiriciliğinde kullanılan en temel ve doğal ortamda yapılan yetiştiricilik yöntemidir. Tercih edilmesinin en büyük sebebi basit sistemler oluşu ve maliyetlerinin düşük olmasıdır. Doğal ışık kaynağının sağlanması ve malzemelerinin daha ucuz olmasının yanında kontaminasyona en açık ve daha zor kontrol edilen çevre koşullarına (sıcaklık, hava olayları) sahip üretim sistemleridir. Açık üretim sistemlerinin diğer bir dezavantajı da dış çevresel etkilere maruz kalındığından iklim şartları gereği yıl boyu üretim yapılamamasıdır. Kontrol altına alınamayan dış çevresel koşulların etkisiyle

istenilen biyokütlenin sağlanamaması gibi başka bir sorunu daha vardır (Sukatar 2002; Lee 2001). Açık sistemleri temelde; açık havuzlar ve kanallı havuzlar şeklinde sınıflandırabiliriz. Açık üretim sistemlerinin en verimli üretim malzemesi kanallı havuzlardır (Borowitzka 1999; Borowitzka 2007).

Kapalı sistemler

Kapalı sistem üretim yöntemleri ise doğal ortamdan gelebilecek kontrol edilemeyen çevresel etkilerden uzak, kültürün yaşaması için gerekli en uygun ortam koşulları sağlanan sistemlerdir. Kapalı sistemlerin avantajları, kontaminasyon riskini en aza indirmesi, CO₂'in etkin kullanılması ve daha kolay istikrarlı ortam (pH, sıcaklık, CO₂ ve havalandırma) sağlamasından dolayı daha kaliteli ürün elde edilebilmesidir (Vonshak ve Torzillo 2003; Sukatar 2002). Dezavantajları ise; kurulum maliyeti yüksektir, ürün kapasitesini artırmak çok daha maliyetli ve zordur. Kapalı üretim sistemlerinin ana malzemeleri dairesel, panel, tank fotobiyoreaktörlerdir (Borowitzka 1999; Borowitzka 2007).

Hibrit sistemler

Algal biyokütle üreticilerinin, daha kırılgan alg türlerini yetiştirirken özellikle başlangıç kültürlerinin daha kontrollü kapalı sistem reaktörlerde yetiştirip, kültür belli bir büyüme ve çoğalma hızına ulaştıktan sonra açık sistemlere aktarmak suretiyle kullandığı yetiştiricilik sistemleridir. Avantajları türe özel üretim sağlanıp kültürün hem devamlılığı hem de daha fazla biyokütle elde edilmesidir. Ayrıca hibrit sistemler, açık ve kapalı sistemlerin dezavantajlarını en aza indirmek için uygun sistemlerdir (Borowitzka 1999). Bu tez çalışmasında da ilk üretim yeşil fazını kapalı sistemlerde kistik fazında ise sera ortamında açık sistemle yapılan yetiştiricilikte hibrit sistem kullanılmıştır. Sera ortamında, açık sistemlerin dezavantajı olan kontrol edilemeyen çevresel etkilerin zararı çok azalır. Yanı sıra kapalı sistemler için gerekli olan maliyet çok daha azalmış olmaktadır.

Mikroalg üretiminin verimli olabilmesi için alglerin ihtiyacı olan yaşam koşullarının uygun değerlerde olması gerekir. Bu uygun yaşam koşullarına etki eden önemli etkenler; ışık, sıcaklık, besin, karıştırma, havalandırma olarak sıralanabilir.

Işık, en önemli etkenlerin başında gelir. Düşük ışık şiddeti fotosentezi tam değerinde çalıştırmazken, yüksek ışık ise fotosentezi tamamen engelleyebilir. Genelde ışığın şiddeti arttırıldığında fotosentez etkinliği de artarak hücre üreme hızını arttıran bir etkiye sahiptir. Işık şiddeti belirli bir seviyeden sonra, hücrelerde üretilen enerji ısı olarak ortaya çıkar ve yüksek miktarda enerji ürettiklerinde fotoinhibisyona sebep olur. Hücrelerin fotosentez faaliyetinin yavaşlaması sebebiyle artık hücrede karotenoid sentezi başlar. Işık şiddeti seviyeleri, hücre yoğunluğu, aşılama zamanı ve üretim evrelerine göre artırılması veya azaltılması gerekli bir etkidir (Vonshak ve Torzillo 2003; Richmond 2000; Sukatar 2002; Cirik ve Gökpinar 1993).

Bir diğer önemli yaşamsal etken olan sıcaklığın da belirli sınırları vardır. Mikroalg türlerinin çoğu 15-28 °C arasındaki sıcaklık değerlerinde uygun yaşam koşullarına sahiptir. 15 °C'nin altındaki düşük sıcaklıklar üreme hızını yavaşlatmasına rağmen, 34

°C'nin üstündeki yüksek sıcaklıklar genellikle mikroalg türlerini öldürürler (Sukatar 2002).

Mikroalgler besin, ışık ve zamanlama süresine göre farklı yöntemlerle üretilirler. Bu üretim metotları, fototrofik, heterotrofik ve mikсотrofik modellerdir. Türlerine göre mikroalgler kendine özgü besin maddelerine ve yoğunluk seviyelerinde göre farklı miktarlarda besine ihtiyaç duyarlar (Becker 1994).

Havalandırma, üretim ortamında kültürün her yere eşit bir şekilde dağılımını sağlayan en önemli etkenlerden biridir. Karıştırmanın hava ile sağlandığı durumlarda CO₂ kontrol altında verilmelidir (Richmond ve Hu 2013; Sukatar 2002). Üretim ortamına verilen hava kaynaklarının çıkış basıncı da kontrol altında olmalıdır. Üretim ortamındaki O₂ seviyesi, oksijen doygunluğunun %150 seviyesini geçmemelidir (Sukatar 2002). Yüksek fotosentez hızı için CO₂/O₂ dengeli bir şekilde olması sağlanmalıdır.

Mikroalg üretim sistemleri yatırımcının hedeflediği üretim miktarına ve yetiştirilen mikroalg türüne göre farklı boyutlarda yapılabilmektedir. Mikroalg üretim sistemleri seçimi, kullanılan mikroalg türünün biyolojisine, su ve beslenme maliyetlerine, iklime, araziye, laboratuvar imkânına enerji ihtiyacına ve elde edilmek istenen biyokütleye göre değişiklik göstermektedir. Mikroalg üretim sistemlerinin kendine has avantaj ve dezavantajları vardır (Vonshak ve Torzillo 2003; Sukatar 2002).

Kültür sistemleri astaksantin üreten *H. pluvialis*, iç mekânlarda, açık kanal havuzlarında veya kapalı fotobiyoreaktörlerde fototrofik, heterotrofik veya mikсотrofik büyüme koşullarında kesikli, beslemeli kesikli veya sürekli modlarda büyüyebilir (Borowitzka 1999; Borowitzka 2007).

Fotoototrofik büyümede, organizmalar ihtiyaç duydukları tüm elementleri inorganik bileşiklerden ve metabolizmaları için enerjiyi ışıktan alırlar. *H. pluvialis*, fototrofik büyüme koşulları altında BG-11 besiyeri üzerinde büyüyebilir ve astaksantin biriktirebilir (Borowitzka 2007; Goksan vd. 2010).

Heterotrofik büyüme modu, yeşil algler, diatomlar ve belirli kamçılı algler arasında yaygındır. Bu organizmalar enerjilerini aynı zamanda karbon kaynakları olarak da hizmet eden organik bileşiklerin oksidasyonundan alırlar. *H. pluvialis*'in karanlıkta asetat üzerinde heterotrofik olarak büyüebildiği gösterilmiştir (Borowitzka 2007; Goksan vd. 2010).

Bu, hem organik bileşikler hem de karbondioksit gerekli olmasına rağmen fotosentezin organizmalar için ana enerji kaynağı olduğu bir heterotrofik büyüme modudur (Kobayashi vd. 1997). *H. pluvialis*'in, organik karbon kaynağı olarak asetat kullanarak, ışıktaki bazal ortam üzerinde mikсотotropik olarak büyüebildiği varsayılmıştır.

2.3. *H. pluvialis* Endüstriyel Üretim Tesis Planlaması

Endüstriyel alg üretim tesislerinin (alg çiftliği) planlanması süreci başladığında her zaman mevcut durumu değiştirmek için bir girişim vardır. Bir üretim hedefi veya belirli bir üretim planı, planlama sürecinin başlangıç noktası da olabilir. Tamamen yeni bir çiftlik kurulması istenebilir veya sadece var olan bir üretim tesisinin yeniden inşası

istenebilir. Bu gereksinimlere göre uygun bir yer seçilmelidir. Her ikisi de, inşaat başlamadan önce tamamlanmış bir planlama süreci gerektirir. Planlayıcı için, planlama sürecini en iyi şekilde yürütebilmek için başvuru sahibinin ihtiyaçlarını gerçekten anlamalarını sağlamak önemlidir (Lekang 2007).

Planlama süreci, “işlev, biçim, gereklilik, analiz, teknoloji, çevresel etkiler ve maliyet” konularının cevaplarını verimlilik esasına göre cevaplayarak, saha seçiminden tesisin ne zaman yapılacağına kadar aşağıdaki bölümlere ayrılabilir.

- 1) Üretim planı
- 2) Saha değerlendirme
- 3) Oda ve tesis planı
- 4) Nihai tasarım ve gerekli çizimlerin tamamlanması
- 5) Maliyetlerin hesaplanması

1) Üretim Planı: Üretim planında gelecekte olacak bir tahmini üretim verilir. Üretim planı; Ne kadar ürünün ve ne kadar zamanda üretileceği (haftalık veya aylık) yıllık olarak hazırlanır. Bu üretim için gerekli olan su, elektrik, ısıtma, soğutma, ışık, CO₂, besin, çevre, pH, sterilizasyon, personel vb. üretim faktörlerini içermelidir.

2)Saha Değerlendirmesi: İyi bir saha seçmek elbette çok önemlidir. Gelecekteki üretim sonuçlarının verimli olması ve olası en az sorunla karşılaşmak için saha performansı hakkında uygun araştırmalar yapılmalıdır. Üretim planlaması, saha araştırması için gerekli kriterleri verecektir. Elbette seçilen saha; planlanan tesis türü, karada veya denize yakınlığı, mevcut suyun kalitesi, elektriğe erişimin kolay olması, kolay ulaşım imkânı, yerleşim yerlerinden uzaklığı, şehirden uzaklığı, ağır sanayiden uzaklığı, evsel ve sanayi atıklarının bulunmadığı, tarımsal faaliyetlerden uzaklığı, büyük/küçükbaş hayvancılık ve kanatlı hayvan yetiştiriciliği yapılmayan, güneşlenmenin uygun olduğu, ısı farklılıklarının istikrarlı olduğu, doğal ve arkeolojik sit alanı olmayan, belediyelerden ruhsat alınabilecek niteliklere sahip bir yer olması gerekmektedir.

3) Oda Planlaması: Bir tesiste yine üretim planına göre ihtiyaç duyulacak oda ve binalar planlanmalıdır. Temel bir tesiste gerekli olan odalar aşağıda verilmiştir.

- a)Bina girişi
- b)İdari büro
- c)Dinlenme/yemek odası
- ç)Banyo tuvalet/giyinme odası
- d)Su şartlandırma/arıtma sistemi
- e)Laboratuvar

f) Üretim alanı

4) Nihai Tasarım ve Gerekli Çizimlerin Tamamlanması: Analiz ederken yapılması gereken, farklı olası çözümler üzerinde düşünüp, farklı olanların avantajları ve dezavantajları belirlenmelidir. Analiz çalışmasının en etkin yollarından birisi diyagramla gösterimdir. Teknik analiz, biçim ve durum analizi, çevresel etkinin analizi ve mali analiz ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Analiz sonunda nihai tasarım tamamlanıp, tasarıma uygun çizimler tamamlanmalıdır.

5) Maliyetlerin Hesaplanması: Yatırım maliyetleri, herhangi bir iş projesinin uygulanması ile ilişkili toplam maliyetlerdir. Bu maliyetlerin türleri ve bileşimi, belirlenen projenin ihtiyaçlarına göre değişir. Bir üretim tesisinin, bir işyerinin açılabilmesi için gerekli ve sürekli olarak o firmada daimi olarak kalacak olan materyaller, demirbaşlar, işçilik, arazi, mühendislik ve çizim için yapılan harcamalardır.

a. Analizlerdeki diyagram şemasından yararlanarak tüm makine teçhizat ve malzeme belirlenir.

b. Kurulum maliyetleri gerçek işçilik ücretleri göz önüne alınarak saptanır.

c. Arazi masrafları, seyahatler, mühendislik, çizim vb. tüm masraflar göz önüne alınır.

Yukarıda sıralanan bilgiler, yatırımcının endüstriyel alg üretim tesislerinin (alg çiftliği) planlanmasında ticari olarak yapması gereken süreci kapsamaktadır.

Bu sürece paralel olarak, “Su Ürünleri Kanunu” (Sük 2022)’ nin 13 maddesine dayanılarak hazırlanan “Su Ürünleri Yetiştiriciliği Yönetmeliği” (Süyy 2022)’ nin “İKİNCİ BÖLÜM Tesislerin Kurulma Yerleri ve Aranacak Şartlar” bölümündeki maddelerde açıklanan su ürünleri yetiştiriciliği yapılacak tesislerin kurulma yerleri ve aranacak şartları da taşıyacak yer seçimi yapılmalıdır. Aynı yönetmeliğin “ÜÇÜNCÜ BÖLÜM Yetiştiricilik Tesislerinin Kuruluşu, İzin, Onay ve Proje İşlemleri” bölümündeki maddeleri yerine getirecek şekilde başvuru ve takip eden işlem basamaklarını yerine getirmelidir. Su ürünleri yetiştiriciliği yapmak isteyenlerin izlemesi gereken işlem basamakları BSGM’nin “Su Ürünleri Yetiştiriciliği Yapmak İsteyenlerin İzlemleri Gereken Prosedür” başlığı altında verilen maddeleri başvuru ile birlikte başlayıp basamakları takip etmesi gerekmektedir (Bsgm 2022). Kanun ve yönetmelikle ilgili usul ve esaslar Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından ve usul ve esaslarda ilgili il müdürlüğü tarafından yürütülür (Sük 2022; Süyy 2022).

2.4. *H. pluvialis*’e İlişkin Yapılan Çalışmalar

H. pluvialis ile ilgili ilk araştırmalar Chantrans (1797) tarafından başlamıştır (Flotow 1844). *H. pluvialis*’in ilk tanımı Flotow (1844) te yapmıştır. *H. pluvialis*’in yaşam öyküsünün ilk kapsamlı açıklaması Hazen (1899) tarafından verilmiştir (Rather vd. 2020).

H. pluvialis yüksek astaksantin içeriğine sahiptir. Yüksek astaksantin birikim oranı günde 2.7 mg/L iken, toplam astaksantin içeriği 22.7 mg/g kütledir. Astaksantin *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Chlorella zofingiensis* ve *Scenedesmus vacuolatus*’tan sırasıyla 19,2; 14,3; 10,9; 6,8 ve 2,7 mg/g kütle elde edilmiştir (Orosa vd. 2001).

Bu alanda yapılan çalışmalarda yöntem farklılıkları uygulandığı kadar besi ortamı ve ışık şiddetinde de farklı çalışmalar denenmiştir. Bunlara örnek, *Chlorella zofingiensis*'den astaksantin üretimi yapılan bir çalışmada glikoz içeren besiyerinde üreme veriminin oldukça yüksek sonuçlanmasıdır. Maksimum spesifik büyüme oranında astaksantin verimi $0,031 \text{ sa}^{-1}$ ve $10,3 \text{ mg/L}$ iken, glikoz içeren besiyeriyle yapılan çalışmada 20 ve 50 g/L 'ye ulaşılmıştır. Karanlık ortamda ise astaksantin miktarı C/N oranına bağlıdır. Astaksantin miktarındaki artış için yüksek C/N oranı (C/N=180 gibi) istenmektedir. Çalışma *Chlorella zofingiensis*'ten büyük ölçekte astaksantin üretiminin ışığa bağımsız olduğuyla sonuçlanmıştır (Ip ve Chen 2005).

Başka bir çalışmada ise, *H. pluvialis*'in çeşitli stres ortamlarında ve yüksek ışık şiddetinde astaksantin birikimi incelenmiştir. Distile sulu ortamda CO_2 ilavesiyle ve azotsuz ortamda 14 günlük çalışma sonucu $29,62 \text{ mg/g}$ ve $30,07 \text{ mg/g}$ astaksantin miktarlarına ulaşılmıştır. $546 \text{ mmol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanmıştır. CO_2 ilaveli distile suda astaksantin birikiminin daha hızlı olduğu ile çalışma sonuçlanmıştır (Imamoglu vd. 2009).

Luca (2014)'nın yaptığı bir çalışma da ise *H. pluvialis*'in farklı sıcaklıklarda büyüme oranları incelenmiştir: 20°C ; $23,5^\circ\text{C}$; 27°C ve $30,5^\circ\text{C}$. Maksimum hücre konsantrasyonunda $30,5^\circ\text{C}$ 'de çalışma yapıldığında 20°C 'de yapılan çalışmanın ancak %35'ine ulaşabilmiştir. Buna ters olarak ise, biyokütle verimliliğinin sıcaklık artışıyla arttığı gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda kültürlerin yüksek sıcaklıklarda daha iyi hasat edilebildiği ortaya çıkmıştır. Son olarak da, kültürde azot açlığında 20°C ve 27°C 'de deneme yapılmış ve 27°C 'de astaksantin üretkenliğinin 1,4 kat arttığı belirlenmiştir.

Kang vd. (2005)'nin yürüttükleri bir çalışmada CO_2 ve hava karışımı ve yoğun ışık koşullarında *H. pluvialis*'in astaksantin birikimini tetiklemek amacıyla karbon/azot (C/N) oranının etkisini araştırmışlardır. $200 \text{ } \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık altında 24 sa aydınlatma ile stres uygulandığında *H. pluvialis*'in C/N oranı ve astaksantin içeriği arasında doğrusal bir ilişki olduğunu bulmuşlardır. C/N oranı ve astaksantin içeriği hetetrofik olarak teşvik edildiğinde de benzer olduğu saptanmıştır. Daha düşük C/N oranı *H. pluvialis*'in hematokiste dönüşümünü geciktirmemiş, fakat ışık miktarının yetersiz olmasından dolayı kültürdeki biyomas artışı, astaksantin miktarının azalmasıyla sonuçlanmıştır. Ancak, düşük C/N oranları astaksantin üretimini azalttığından, daha kısa sürede astaksantin üretimine teşvik, $200\text{-}300 \text{ } \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ üzerindeki ışık yoğunluğuna yükseltilmesiyle başarılmıştır. Düşük C/N oranları kültürlerdeki hücre yoğunluğunu ve astaksantin pigmenti miktarını artırmasıyla sonuçlanmıştır. Sonuç olarak, fototrofik *H. pluvialis*'in astaksantin üretiminde C/N oranından daha fazla ışık yoğunluğunun tetikleyici olduğunu bulmuşlardır.

Tek hücreli yeşil tatlı su mikroalgi *H. pluvialis* hücresinde içeriğinde % 80'den daha fazla astaksantin içermektedir. Astaksantin üretimi başlıca besin azlığı (N-P), yüksek tuzluluk konsantrasyonları ve yüksek sıcaklık gibi faktörler etkisiyle artış göstermektedir. Dominquez vd. (2004)'nin yaptığı bir çalışmada, *H. pluvialis*'in üreme ve astaksantin birikiminde, ışık şiddeti, havalandırma gibi çevresel faktörlerin ve besin elementlerinin etkisi araştırılmıştır. *H. pluvialis*'in en iyi gelişimi BBM kültüründe, 28°C 'de, sürekli beyaz floresan ışık ($177 \text{ } \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) aydınlatması altında ve sürekli havalandırma 1.5 v.v.m 3.5×10^5 hücre/ml bulunduğu bildirilmiştir. Maksimum astaksantin birikimi ise BAR kültür ortamında 24 sa aydınlatma ($345 \text{ } \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

ile 1 g/L⁻¹ sodyum asetat ve havalandırma ile 98 mg/g⁻¹ biyomas olarak elde edildiğini bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, yeşil alg *H. pluvialis*, yeşil hücrelerinin kiste dönüşümü, yeşil safhada asetat veya asetatla birlikte Fe⁺² ilavesiyle teşvik edilmiştir. Astaksantin oluşumunda asetat ve Fe⁺²'nin birlikte ilavesi sadece asetat ilavesine oranla daha etkili olmuştur. Kistleşmiş alg hücrelerindeki karotenoid sentezi aktinomisin ya da sikloheksemid tarafından durdurulmuştur. Ancak daha sonra kist oluşumu, sadece asetat ilavesiyle teşvik edilmiş ve karotenoid ilavesiyle oluşumu durdurucuların varlığında bile Fe⁺² ilavesiyle artırılabilmiştir. Fe⁺² artırılan karotenoid sentezi potasyum iyod tarafından durdurulmuştur. Bu da, dört aktif oksijen türü olan, saf oksijen, oksit anyon, hidrojen peroksit ve peroksi radikal asetatın kistleşmeyi hızlandırdığı ve karotenoid oluşumunda bunların Fe⁺² ile yer değiştirme işlevine sahip olduğunu bildirmişlerdir (Kobayashi vd. 1997).

Başka bir çalışmada ise *H. pluvialis*'in balon ve kolon tübüler biyoreaktörde aynı hacim ve benzer koşullarda üretim verimliliği incelenmiştir. En yüksek biyokütle üretimi tübüler fotobiyoreaktörde 130 µE/ m⁻²s⁻¹ ışık şiddetinde 0,55 gr/L'ye ulaşılmıştır. Biyokütlenin kuru ağırlığı ise, tübüler fotobiyoreaktörde %2'yken balon kolonda %0,5'tir (López vd. 2006).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma süresi ve bölgesi

Araştırma, Ekim 2018 - Ekim 2020 tarihleri arasında iki yıllık süreci kapsamaktadır. Araştırma bölgesi ise, mikroalg yetiştiriciliği için iklim şartları, coğrafi özellikleri ve ekipman yeterliliği açısından en uygun yerlerden biri olan Antalya ilidir.

3.1.2. Araştırma materyali

Araştırma materyali olan *H. pluviialis* kültürü “Kültür Koleksiyon Alg ve Protozoa” (CCAP) SAMS Limited şirketinden satın alınmış, laboratuvar ortamında alt kültür olarak çoğaltılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. CCAP 34/1D *H. pluviialis* kültürü (Orjinal)

3.1.3. Sıvı kültür ortamları

H. pluvialis suşlarının yeşil faz sıvı besiyer ortamı için BG-11 besi ortamı hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). Kırmızı faz üretimi için farklı bir üretim yöntemi değerlendirilmiştir. Kültür ortamı 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavlanmıştır. pH seviyesi otoklavdan önce 1M NaOH veya HCl ile 7,1'e ayarlanmış, otoklavdan sonra ise pH seviyesi tekrar kontrol edilmiştir (Stanier vd. 1971).

Çizelge 3.1. BG-11 sıvı besiyeri (Stanier vd. 1971)

BG-11 Sıvı besi ortamı	
Stok solüsyonlar	1000 ml için
(1) NaNO ₃	150.0 g
(2) K ₂ HPO ₄	4.0 g
(3) MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g
(4) CaCl ₂ .2H ₂ O	3,60 g
(5) Citric acid	0.60 g
(6) Ammonium ferric citrate green	0.60 g
(7) EDTA Na ₂	0.10 g
(8) Na ₂ CO ₃	2.00 g
(9) İz elementler:	
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.39 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.05 g

*Stok solüsyonları 1 - 8 her biri 10.0 ml ve 9'dan 1.0 ml alınacaktır.

3.1.4. Katı kültür ortamlar

H. pluvialis suşlarının katı kültür ortamı için, hazırlanan sıvı BG-11 besiyerine 15 g/L agar ilave edilmiştir. Kültür ortamı 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavlanmıştır. pH seviyesi otoklavdan önce 1M NaOH veya HCl ile 7,1'e ayarlanmış, otoklavdan sonra ise pH seviyesi tekrar kontrol edilmiştir.

3.1.5. Kullanılan malzemeler

Otoklav	Matilab MT25-D
Manyetik karıştırıcı	Matilab MK02
Santrifüj	Bu çalışmada tasarlanmıştır
Spektrofotometre	SOIF UV 5100H
Etüv	Nüve FN300
Hassas Terazi	Axis ATZ-520
pH metre	AZ 86031
Lüks metre	UNI-T UT 383
Mikroskop	Olympos CH
Timer	Entes zaman rölesi 0,1 sn
Blower	Hailea Aco 6602 4 L/dk
CO2 Tüpü	Habaş çelik tüp 10 lt
CO2 Regülatörü	Yıldız CO2 Regülatörü
Kültür Dolabı	Bu çalışmada tasarlanmıştır.
Klima	Baymak 12000 btu
Işık	Philips Master TL-D 18W/865

3.2. Metot

3.2.1. *H. pluvialis*'in bu çalışmadaki endüstriyel üretim tesis planlaması

Bölüm 2.3. *H. pluvialis* endüstriyel üretim tesis planlaması başlığı altında verilen planlama süreci,

- 1) Üretim planı
- 2) Saha değerlendirmesi
- 3) Oda ve tesis planı
- 4) Nihai tasarım ve gerekli çizimlerin tamamlanması
- 5) Maliyetlerin hesaplanması

basamakları takip edilmiş ve Su Ürünleri Kanunu” (Sük 2022)’ nun 13 maddesine dayanılarak hazırlanan “Su Ürünleri Yetiştiriciliği Yönetmeliği” (Süyy 2022)’ nin “İKİNCİ BÖLÜM Tesislerin Kurulma Yerleri ve Aranacak Şartlar” sağlanıp İl Tarım ve Orman Müdürlüğüne su ürünleri yetiştiriciliği başvurusu yapılmıştır.

3.2.2. *H. pluvialis* kültürünün ekimi ve stok kültür hazırlanması

H. pluvialis suşlarının stok kültürün hazırlanmasında BG-11 katı besiyer ortamı kullanılmıştır. “Kültür Koleksiyon Alg ve Protozoa” (CCAP) SAMS Limited şirketinden satın alınmış suşlar ilk olarak BG-11 katı besiyer ortamı dökülen petri kaplarına çizgi ekim yöntemi ile ekimi yapılarak 15 gün süresince üreme gözlemlenmek üzere inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3. *H. pluvialis* kültürünün sıvı besi ortama alınması

Bir önceki dönemde, ekimi yapılan ve 15 gün boyunca üreme gözlemek üzere inkübasyona bırakılan *H. pluvialis* kültürü kontrol edilmiştir. Üreme gözlemlenen *H. pluvialis* kültürü 250 ml erlenlerde, havalandırmasız, sıvı BG-11 besi ortamına alınması yapılmıştır. Sıvı besi ortamına alınan *H. pluvialis* kültürünün 7 gün boyunca üremesi gözlemlenmiştir.

3.2.4. Kültür artırımı yapılması ve yoğun kültür elde edilmesi

H. pluvialis kültürünün 7 gün boyunca üremesi kontrol edilmiştir. Üreme görülen *H. pluvialis* kültürünün 250 ml erlenlerden hacim artırımı yapılmıştır. 1000 ml cam balonlara 750 ml sıvı besi ortamı koyulup üzerine erlenlerden gelen 250 ml kültür eklenmiştir. 1000 ml cam balonlarda ise devamlı havalandırma ve 15sn/15dk şeklin CO₂ beslemesi yapılmıştır. *H. pluvialis* kültürünün yeterli yoğunluk seviyesi günde 1 g/L⁻¹ olarak kabul edilmiştir.

Yoğunluğu yeterli seviyeye ulaşan kültürler 5 lt. şeffaf plastik bidonlara 4 lt sıvı besi ortamı koyulup üzerine balonlardan gelen 1000 ml kültür eklenerek hacim artırılmıştır. 5 lt. şeffaf plastik bidonlara da devamlı havalandırma ve 15sn/15dk şeklin CO₂ beslemesi yapılmıştır.

Yoğunluğu yeterli seviyeye ulaşan kültürler, 20 lt. şeffaf plastik bidonlara 15 lt. sıvı besi ortamı koyulup üzerine şeffaf plastik bidonlardan gelen 5 lt. kültür eklenerek hacim artırılmıştır. 20 lt. şeffaf plastik bidonlara da devamlı havalandırma ve 15sn/15dk şeklin CO₂ beslemesi yapılmıştır.

3.2.5. Yoğun kültürden kırmızı faz üretimine geçilmesi

Kapalı sistemde üretilen yoğun 8 adet 20 lt toplam 160 lt. *H. pluvialis* kültürü, astaksantin birikimli biyokütle elde etmek için 1500 lt'lik havuzlara alınmıştır. Aşılama yapılan havuzlarda *H. pluvialis* kültürü besin eksikliği, yüksek ışık ve tuz stresini içeren abiyotik faktörlere maruz bırakılmıştır. Stres ortamında yeterli oranda (%80) kırmızı kist hücreleri gözlemlenen havuzlar karıştırma ve havalandırma durdurulmuş ve çöktürme yöntemi uygulanmıştır. Algal biyokütle hasat yöntemlerinden kurduğum pilot ölçekli üretim tesisine en uygun hasat şekli olan çöktürülen biyokütle hasat edilmiştir.

3.2.6. Hücrelerin parçalanması, Kurutma ve Depolama

Biyokütlenin dış çevresel ortamdan en az zararı görmesi için, hasat işleminden sonraki biyokütlenin temizlenmesi, susuzlaştırılması, hücrelerin parçalanması ve kurutulup saklanması işlemleri süratle yapılmıştır. Hasat edilen biyokütle, saflaştırma ve

besi ortamından arınması için tekrar su ile muamele edilmiştir. Elde edilen ıslak biyokütle santrifüj yöntemi ile susuzlaştırılmıştır. Daha sonra elde edilen yarı ıslak ürün hücrelerin parçalanması için otoklavlanmıştır. Otoklava tabi tutulan ürün ardından hücre parçalama etkinliğini artırmak için sonikasyona alınmıştır. Daha sonra elde edilen ürün kurutulmak üzere etüve alınmıştır. Kurutulan kuru ürün havası alınarak paketlenmiştir. Paketlenen ürün uzun süre dayanım için -17°C saklanmıştır.

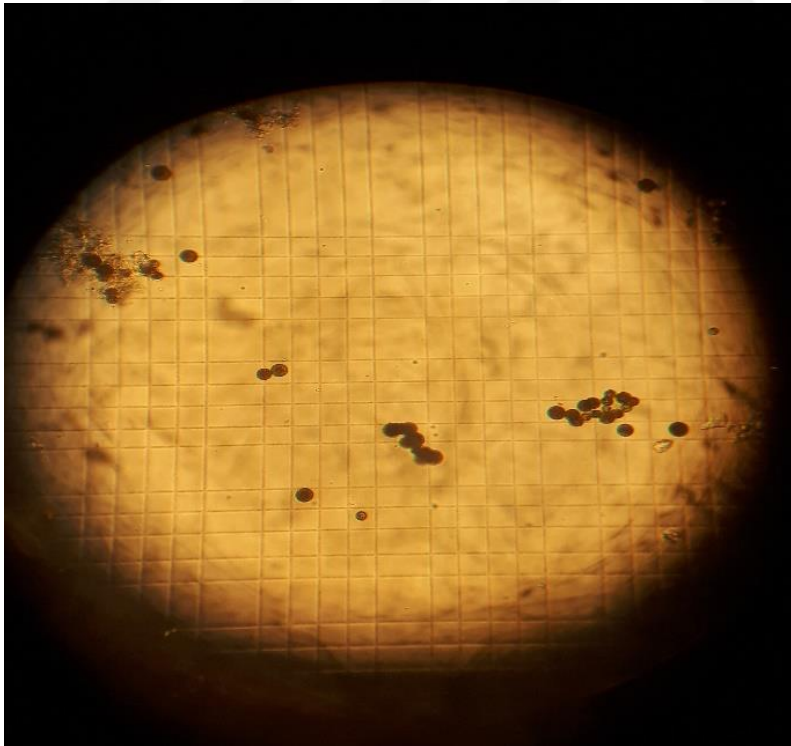
3.2.7. Yetiştirme koşullarındaki ölçümlerin yapılması

Bu çalışmada, *H. pluvialis* yeşil faz yetiştiricilik basamaklarının her bir aşamasında günlük olarak hücre sayısı, pH ölçümü, sıcaklık, ışık kontrolü ve hücre sayısı kontrolü yapılmıştır. *H. pluvialis* kırmızı faz yetiştiriciliği sonunda ise kuru madde ölçümü ve astaksantin içeriğinin belirlenmesi ölçümü yapılmıştır.

3.2.8. Hücre sayısı

Mikroskobik hücre sayısı mikroskop ve thoma lamı kullanılarak yapılmıştır. Thoma lamında hücre sayımında, ana kare 1mm uzunluğu ve 1mm genişliğinde ve 0,1 mm derinliğinde sıvı alır. Bu kare alanın hacmi= $1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3$ eder. $1 \text{ ml} = 1000 \text{ mm}^3$ olduğundan, 1 ml'nin 10.000 de biridir. Sayımı yapılacak hücreler homojen şekilde karıştırılarak pastör pipeti ile 1 ml örnek alınıp thoma lamına damlatılarak aşağıdaki formül üzerinden sayım yapılır (Barsanti ve Gualtieri 2014).

$$\text{Toplam hücre sayısı} = \text{Ana karedeki hücre sayısı} \times 10,000 \times \text{dilüsyon faktörü} \quad (3.1.)$$



Şekil 3.2. Thoma lamında *H. pluvialis* hücreleri (Orjinal)

3.2.9. pH ölçümü

pH ölçümlerinde kullanılan AZ 86031 marka pH metrenin günlük kalibrasyonu pH 4 (pH buffer 4) pH 7 (pH buffer 7) ve pH 10 (pH buffer 10) tamponları ile yapılmıştır.

3.2.10. Kuru madde ölçümü

Kuru madde ölçümü, önceden kurutulmuş ve önceden tartılmış, 0.45 µm Whatman filtrede 10 ml örnek 80°C'de 10 saat fırında tekrar kurutulur. Hassas terazide ölçüm yapılır ve aşağıdaki formül üzerinden sonuç hesaplanır (Boussiba vd. 2004).

$$\text{Kuru Ağırlık (mg/L)} = \frac{[\text{Filtre+Hücre Ağırlığı(mg)}] - [\text{Filtre Ağırlığı(mg)}]}{\text{Örnek Hacmi(mL)}} \times 1000 \quad (3.1)$$

Örnek Hacmi(mL)

3.2.11. Astaksantin içeriğinin belirlenmesi

5 ml örnek 3000 rpm'de 5dk santrifüje koyulur ve süpernatant atılır. Böylece biyokütleyle uygulanan stres besi ortamı ayrılmış olur. 105°C etüvde 1 saat kurutulur. %5 (w/v) KOH içeren %30'luk (v/v) metanol çözeltisinin 5 mL pellete eklenir ve 70°C su banyosunda 10 dk bekletilir. KOH-metanol çözeltisi klorofil pigmentinin uzaklaştırılması için kullanılır. Çözelti 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlenir ve yine süpernatant atılır. Sediment pH'ını ayarlamak için birkaç damla asetik asit eklenir ve 5 mL DMSO eklenmiştir. 70°C'de su banyosunda 10 dk bekletildikten sonra 3000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılır ve bu işlemde süpernatant kullanıma alınır. Toplanan süpernatant 490 ve 750 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapılır. Kör çözelti olarak yıkama yaptığımız DMSO kullanılır ve aşağıdaki gibi hesaplama yapılır (Köksal 2008; Boğoclu vd. 2019).

$$\% \text{Astaksantin} = \frac{(A_{490} - A_{750}) \times 5,6 \times \text{Hacim}}{\text{Örnek miktarı(Ağırlık)}} \quad (3.2)$$

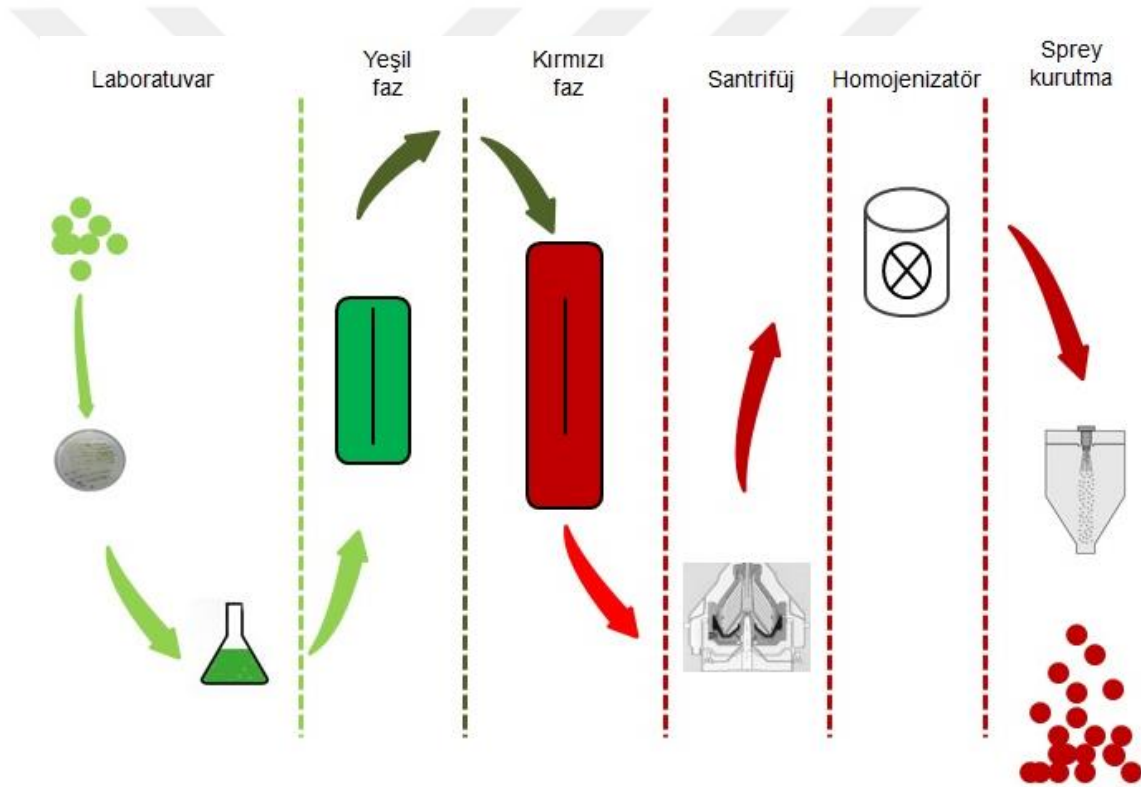
Örnek miktarı(Ağırlık)

4. BULGULAR

4.1. *H. pluvialis*'in Bu Çalışmadaki Endüstriyel Üretim Tesis Planlaması

Kaynak taraması bölüm 2.3. *H. pluvialis*'in bu çalışmadaki endüstriyel üretim tesis planlaması bölümünde verilen basamaklar belirlenmiş ve endüstriyel ölçekte bir üretim tesisi planlanmış ve kurulmuştur.

1) Üretim Planı: Üretimi planlanan alg türü *H. pluvialis* mikroalgidir. Birim üretim dönemi olarak 10 günlük kesikli üretim modelinde ürün elde edilmiştir (Şekil 4.1). 10 günlük üretimde 5000g biyokütle elde edilmesi planlanmıştır. Aylık dönemlerde ise 10 günlük temel üretimden 3 defa ürün alınması planlanmıştır. Yıllık üretim döneminde ise 36 defa temel üretim sağlanması planlanmıştır. Bu üretim planı için gerekli olduğu düşünülen su, elektrik, CO₂, besin ve personel miktarları çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. *H. pluvialis* biyokütle üretim diyagramı (Orijinal)

Çizelge 4.1. Üretim planı için gerekli su, elektrik, CO₂, besin ve personel miktarları

	Su	Elektrik	CO ₂	Besiyeri	Personel
250 ml Erlen x 8 x 3 set	6 lt	6 lamba x 12 sa	-----	6 lt	1 kişi
1000ml Balon joje x 8 x 3 set	24 lt	6 lamba x 12 sa	24 x 15sn/15dk	24 lt	1 kişi
5 lt Plastik bidon x 8 x 3 set	120 lt	12 lamba x 12 sa	24 x 15sn/15dk	120 lt	1 kişi
20 lt Plastik bidon x 8 x 3 set	480 lt	12 lamba x 12 sa	24 x 15sn/15dk	480 lt	2 kişi
1500lt x 3 Havuz	4500 lt	3 çark x 24 sa	3 x 15sn/15dk	4500 lt Stres (Nacl, SA)	2 kişi
TOPLAM	5130 lt	39 lamba x 12 sa	75 x 15sn/15dk	5130 lt	2 kişi

2)Saha Değerlendirmesi: Planlanan tesis için, mevcut suyun kalitesi içme suyu kalitesinde, elektriğe erişimi tesis yanında, yerleşim yerlerinden uzaklığı uygun, şehirden uzaklığı uygun, ağır sanayiden uzak, evsel ve sanayi atıklarının bulunmadığı, büyük/küçükbaş hayvancılık ve kanatlı hayvan yetiştiriciliği yapılmayan, güneşlenmenin uygun olduğu, ısı farklılıklarının istikrarlı olduğu, doğal ve arkeolojik sit alanı olmayan, belediyelerden ruhsat alınmış 500 m² bir üretim yeri seçilmiştir.

3) Oda Planlaması: Bu çalışmada üretim planına göre ihtiyaç duyulacak bir tesiste olması gereken asgari oda ve binalar aşağıdaki 3 ana bölümde planlanmıştır. Ayrıca su şartlandırma/arıtma sistemi ve paketleme ve saklama odalarında laboratuvar kısmı içinde ayrı bir odada yer almaktadır.

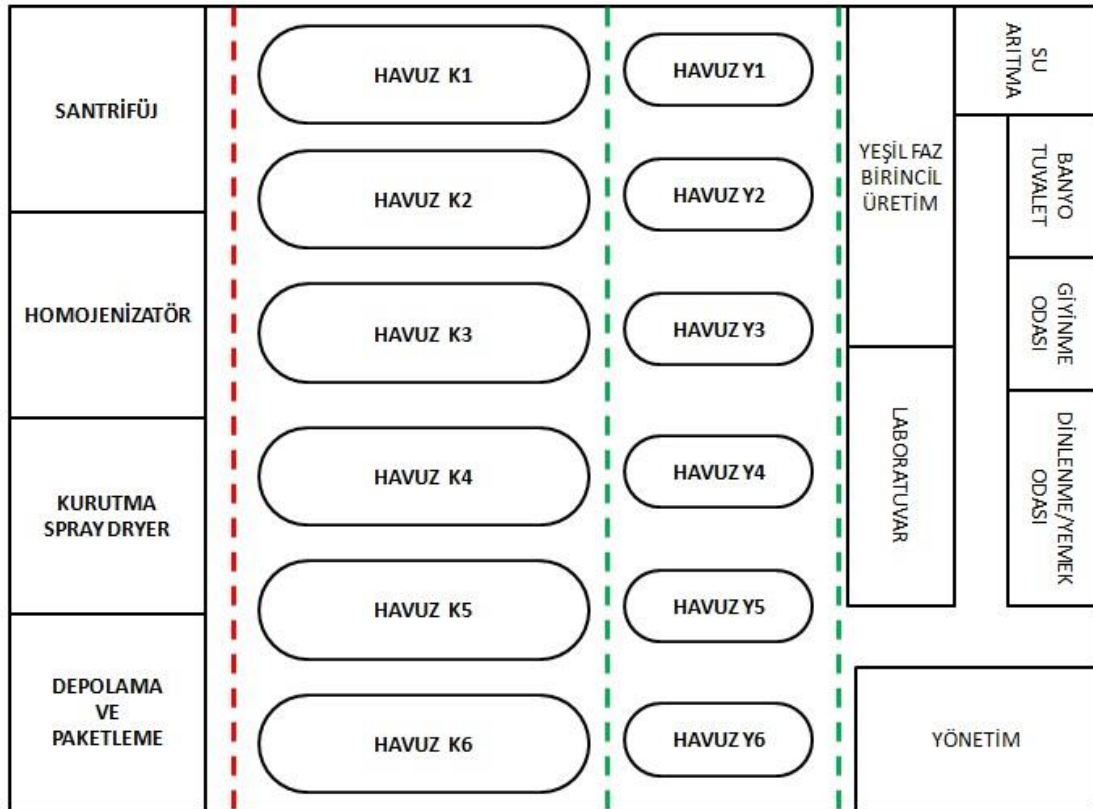
a)İdari büro: Personelin çalışması için uygun, yönetimin ihtiyaçlarını karşılayan havalandırma, mobilya, bilgisayar, gerekli evrakların gösterilebilceği levha bulunan bir idari yönetim ofisiyle birlikte, yöneticinin personel ya da ürün pazarlamasında kullanılan bir toplantı salonu, personel için dinlenme/yemek odası, banyo tuvalet ve giyinme odasının yer aldığı bölümdür.

b)Laboratuvar: Üretim tesisinin en önemli bölümünü teşkil eder. Yetiştiriciliği yapılacak olan türün stok kültürü ve alt kültür çalışması bu bölümde yapılmıştır. Bu çalışmada, laboratuvar bölümü 3 odaya bölünmüştür. Birinci odada su şartlandırma, arıtma ve besiyeri hazırlama işlemleri yapılmaktadır. İkinci odada ana kültür ve alt kültür çalışmaları ve yeşil faz üretimi yapılmıştır. Üçüncü bölümde ise paketleme ve saklama koşulları sağlanmıştır. Laboratuvar odalarında devamlı iklimlendirme ve havalandırma yapılmıştır. Laboratuvar ortamının günlük ve haftalık sterilizasyonu sağlanmıştır. Laboratuvar ortamına yetkili personel haricinde giriş çıkış yapılmamıştır. Laboratuvar

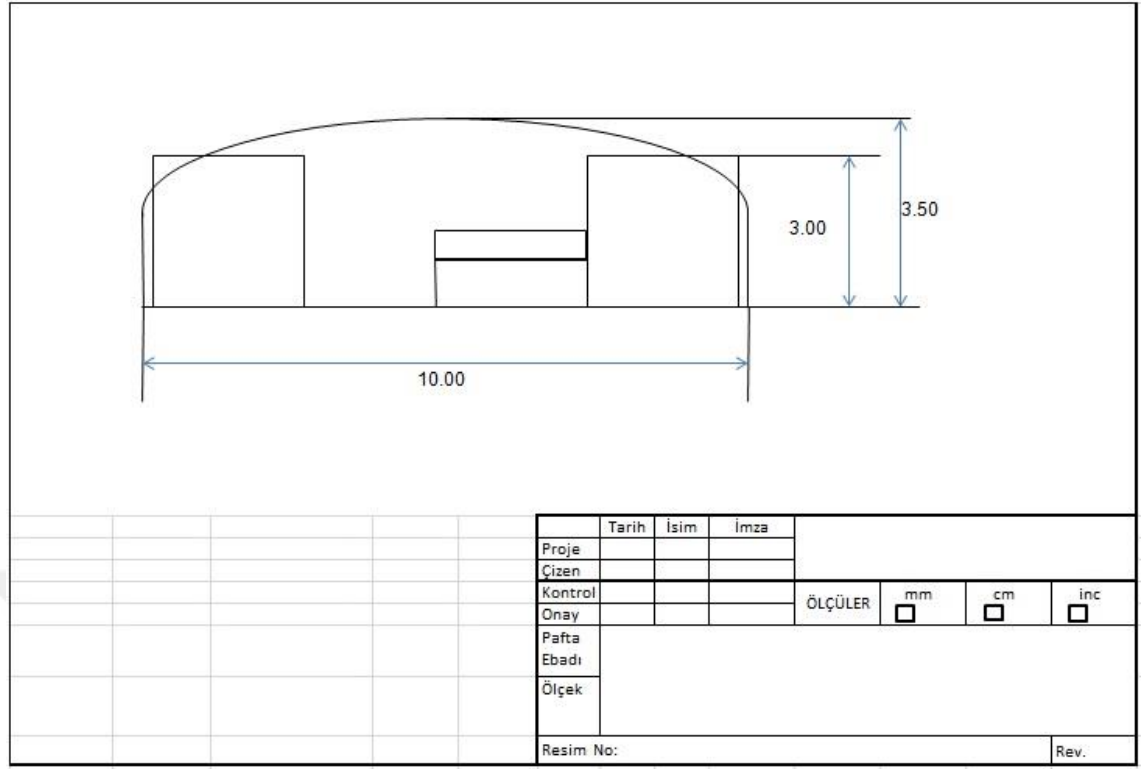
ortamında ışık kaynakları, havalandırma motorları ve CO₂ kontrolleri otomatik ve zaman kontrollü olarak yapılmıştır.

c) Üretim Alanı: Yetiştiricilik tesisinin bir diğer önemli bölümüdür. Elde edilmesi planlanan ürünün dış etkenlere daha açık olduğu ve ürünün kalitesi ve miktarına etkisi vardır. Bu çalışmada, üretim bölümü olarak 90 m² bir alana sera malzemeleriyle 7,5m genişliğinde, 12m uzunluğunda ve 3,5m yüksekliğinde bir sera ortamı yapılmıştır. Ortamın sıcaklığı ve nem kontrolü havalandırma sistemi ile sağlanmıştır. Steril kapalı üretim sisteminden gelen kültürlerin, kırmızı faz üretimi bu bölümde yapılmıştır. Üretimde kontaminasyon riskine karşı, düzenli havalandırma ve düzenli temizlik şartları uygulanmıştır. Ayrıca bu bölümde ürün hasat işlemi yapılmıştır. Hasat sonrası ürünü saflaştırmak için tekrar su ile yıkanması ve tekrar merkezkaç ile susuzlaştırma işlemi de bu bölümde gerçekleştirilmiştir.

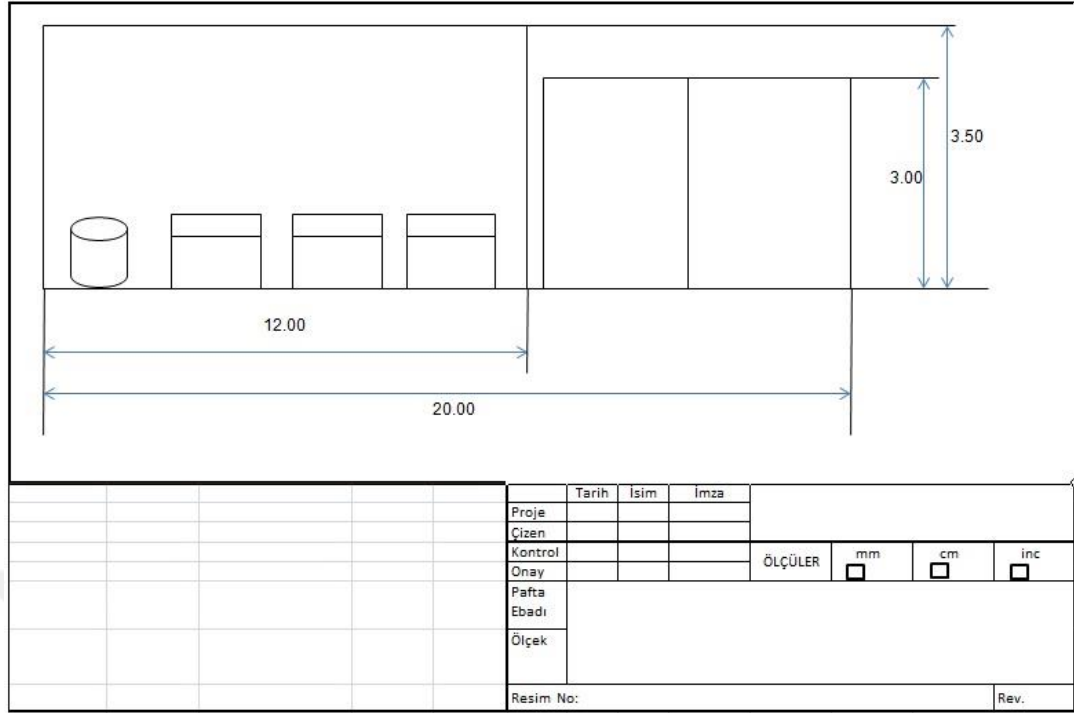
4) Nihai Tasarım ve Gerekli Çizimlerin Tamamlanması: Planlanan tesis için gerekli olan çizimler tamamlanmıştır (Şekil 4.2). Planlanan çizimlerin uygunluğunun tespitinin ardından nihai tasarımlar oluşturulmuştur (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekill 4.5, Şekil 4.6).



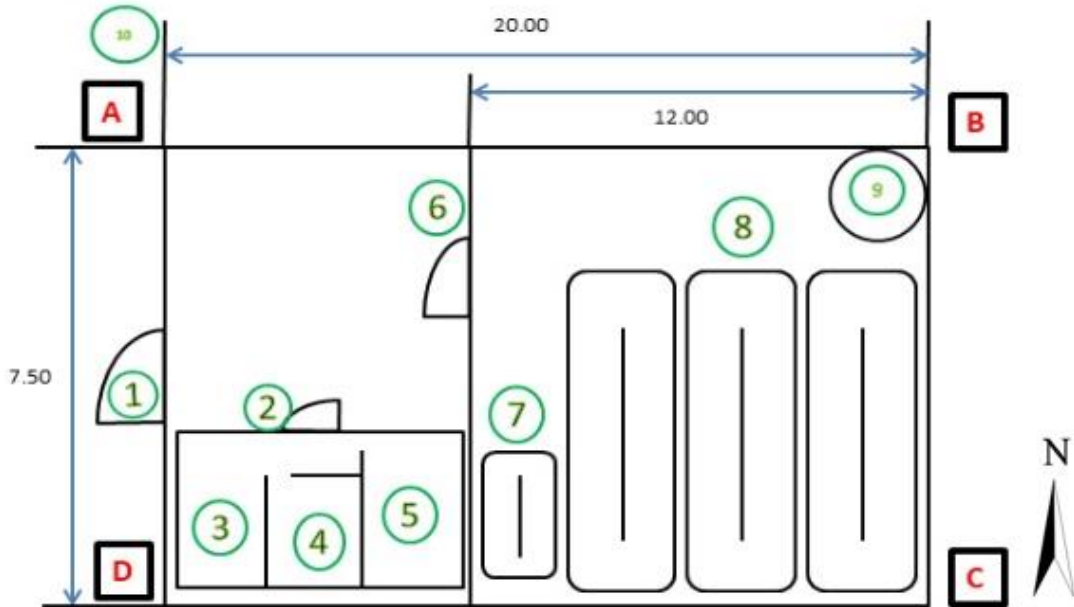
Şekil 4.2. *H. pluvialis* biyokütle üretim tesisi nihai plan örneği (Orijinal)



Şekil 4.3. Üretim tesisi önden görünüş çizimi (Orijinal)



Şekil 4.4. Üretim tesisi yandan görünüş çizimi (Orijinal)



Şekil 4.5. Üretim tesisi üstten görünüş çizimi (Orijinal)

- 1) Tesis girişi
- 2) Laboratuvar girişi (1 adet 3x7m genişliğinde konteyner)
- 3) Laboratuvar ve su arıtma (3 adet uv ve 4 katman giriş + 5 katman arıtma)
- 4) Malzemelik ve giyinme odası
- 5) Yeşil faz yetiştirme odası
- 6) Sera girişi
- 7) Yeşil faz hacim artırma havuzu (1 adet 3x1m 600lt kültür hacim artırım havuzu)
- 8) Kırmızı faz havuzu (3 adet 5x2m 1500lt stres ortamı havuzu)
- 9) Çöktürme silosu (1 adet olgunlaşan dinlendirilip çöktürüldüğü silo)
- 10) Sulama birliğı kuyusu (DSİ sulama birliğı su kuyusu 2hp pompa)



şekil 4.6. Üretim tesisi görünüş (Orijinal)

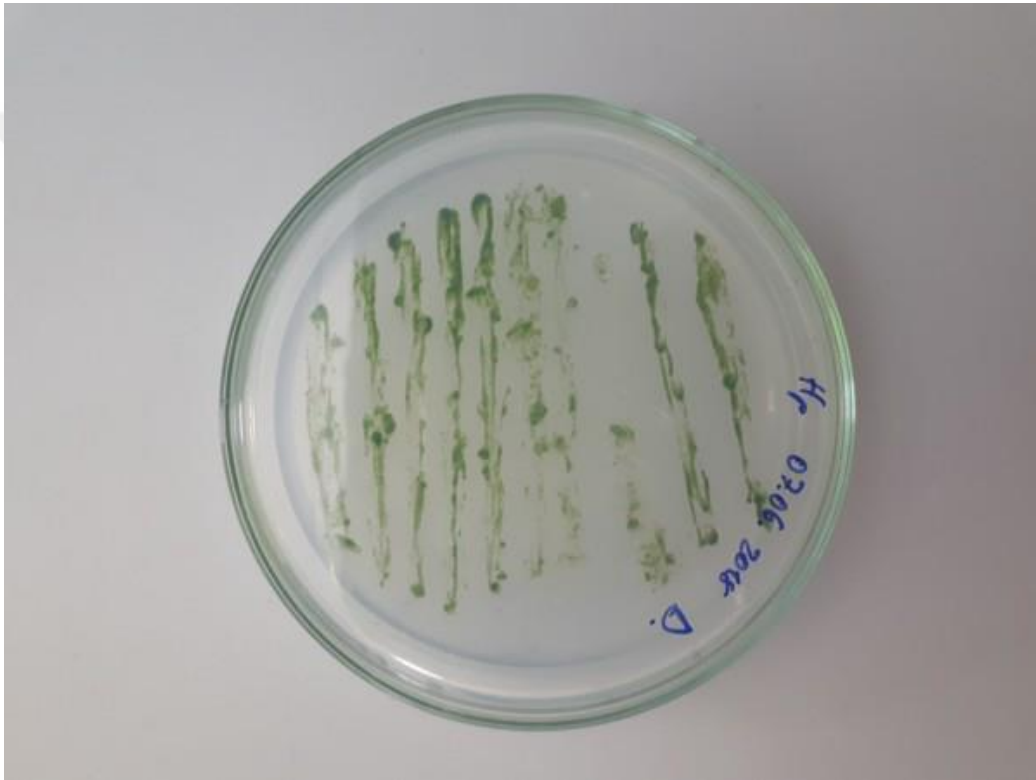
5) Maliyetlerin Hesaplanması: Bu çalışmada, planlanan üretim tesisinin yaklaşık kuruluş maliyeti 2018 yılı sonu itibarıyla 227,150 tl olarak çizelge 4.2’ de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Planlanan üretim tesisinin yaklaşık kuruluş maliyeti

Malzeme/Ekipman	Birim/miktar	Birim fiyat	Toplam
Tesis yeri hazırlığı	1 adet	5000	5,000
Konteyner	1 adet	17,500	17,500
Üretim serası	1 adet	23,000	23,000
Havuzlar	3 adet	13,500	40,500
Otoklav	1 adet	12,000	12,000
Klima	3 adet	5,500	16,500
Arıtma ve su şartlandırma	2 adet	3,500	7,000
Santrifüj	1 adet	7,500	7,500
Etüv	1 adet	12,500	12,500
Hassas terazi	1 adet	2,550	2,550
Manyetik karıştırıcı	2 adet	550	1,100
Petri kapları	128 adet	18	2,304
Erlenler	24 adet	22	528
Balon jojeler	24 adet	82	1,968
CO ₂ tüp ve regülatör	3 adet	2,400	7,200
Elektrik malzemeleri	1 adet	12,000	12,000
Saklama malzemeleri	1 adet	15,000	15,000
pH metre	2 adet	4,500	9,000
Kimyasal malzemeler	1 adet	17,000	17,000
Kırtasiye malzemeleri	1 adet	5,000	5,000
Mobilyalar	1 adet	12,000	12,000
		TOPLAM	227,150

4.2. *H. pluvialis* Kültürünün Ekimi ve Stok Kültür

“Kültür Koleksiyon Alg ve Protozoa” (CCAP) firmasından getirilmiş *H. pluvialis* suşlarına öncelikle BG-11 katı besiyer dökülen petri kabına çizgi ekim yöntemi ile ekimi yapılmıştır. Ekim yapılan petriler bu çalışmada yapılan saklama dolabında $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve 16 sa aydınlık 8 sa karanlık ışık süresi ile 15 gün boyunca üreme gözlemlenmek üzere inkübasyona bırakılmıştır. Ekim sonunda petrilerde üreme görülmüştür. Petrilerden alınan ilk hücre sayısı 7×10^5 olarak belirlenmiştir. Bu işlem sonunda stok kültürümüz oluşturulmuştur ve düzenli olarak aylık alt kültür çalışması yapılarak taze stok kültürün devamlılığı sağlanmıştır.



Şekil 4.7. *H. pluvialis*'in ekimi yapılmış petri (Orijinal)

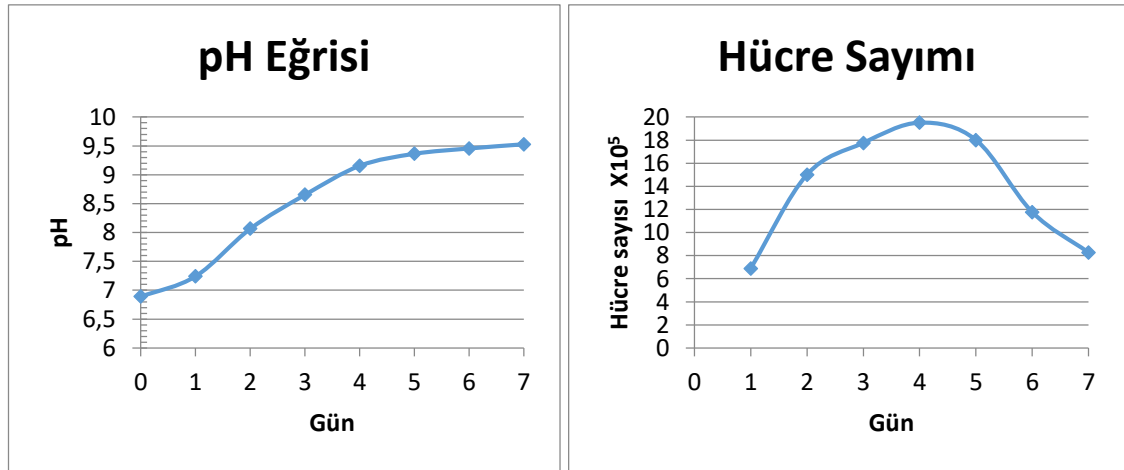
4.3. *H. pluvialis* Kültürünün Sıvı Besi Ortamı

Katı besiyer ortamında üremesi görülen *H. pluvialis* kültürü alıştırma amacıyla sıvı besiyer ortamına alınmıştır (Şekil 4.8). Sıvı besiyer ortamının başlangıç pH değeri 7.1 olarak ayarlanmıştır. Sıvı besiyer ortamına alınan *H. pluvialis* kültürü bu çalışmada yapılan raf sistemi üzerinde $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve 12sa aydınlık 12sa karanlık ışık süresi ile 7 günlük üreme gözlemleri sürecine bırakılmıştır. Günde 3 defa elle çalkalamak suretiyle yetiştirilen kültürün pH eğrisi şekil 4.9a’ da verilmiştir. Aynı şekilde alıştırma ortamında başlangıcında petrilerden alınan ilk hücre sayımı 7×10^5 iken 4.gün sonunda

$19,5 \times 10^5$ olarak sayılmıştır. 4. Günden sonra hücre sayımı giderek azalmış ve 7.gün sonunda $8,2 \times 10^5$ sayılmıştır (Şekil 4.9b).



Şekil 4.8. *H. pluvialis*'in 250 ml havalandırmasız sıvı ortamı (Orijinal)



(a)

(b)

Şekil 4.9. *H. pluvialis*'in 250 ml sıvı besi ortamı **a)** pH değerleri; **b)** Hücre sayımı

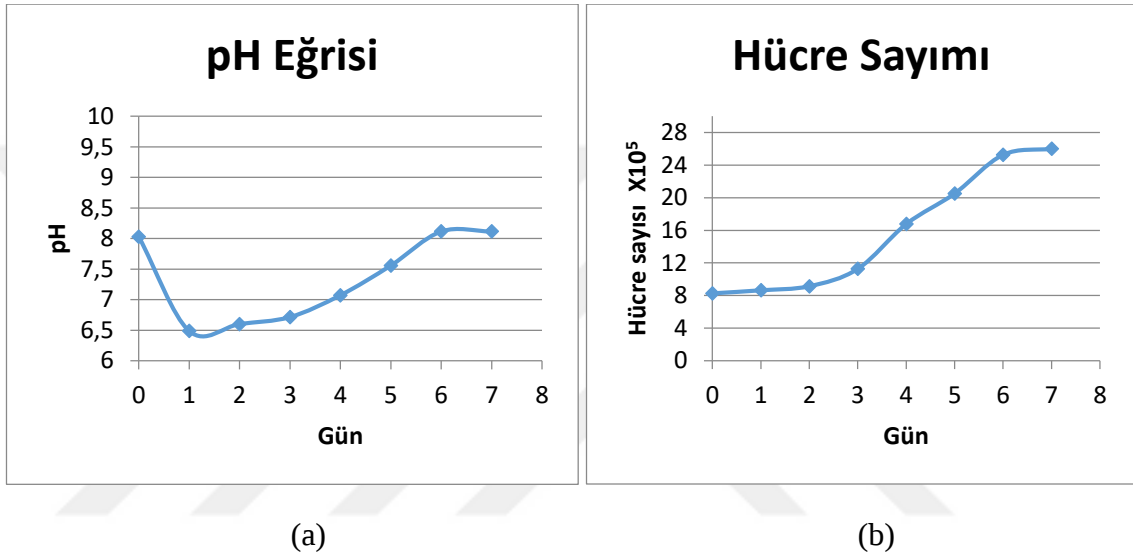
4.4. Kültür Artırımı Yapılması ve Yoğun Kültür

Üreme görülen 250 ml erlen sıvı besi ortamında ki *H. pluvialis* kültüründen hacim artırımı yapılmıştır. 1000 ml cam balonlara 750 ml sıvı besi ortamı koyulup üzerine erlenden gelen 250 ml kültür eklenmiştir. 1000ml cam balon sıvı besi ortamına alınan *H. pluvialis* kültürü raf sistemi üzerinde $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve 12sa aydınlık 12sa karanlık ışık süresi ile devamlı havalandırma ve 15sn/15dk şeklinde CO₂ beslemesi yapılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Hacim artırılmış 1000 ml balon jojelerde *H. pluvialis* kültürü (Orijinal)

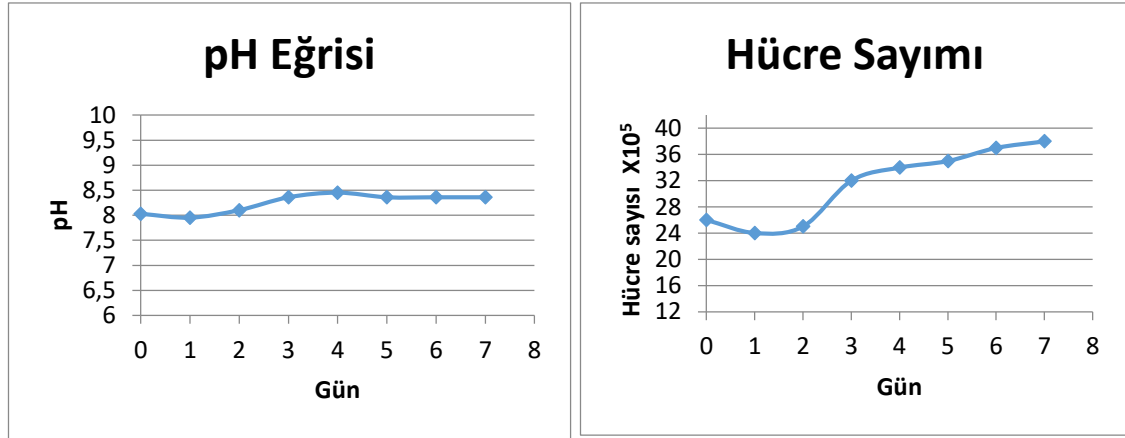
Hacim artırmak amaçlı aktarılan kültürlerin sıvı besi ortamının pH değerleri şekil 4.11a’ da verilmiştir. 1000ml cam balon sıvı besi ortamına alınan *H. pluvialis* kültürünün ilk pH 8 olarak gözlemlenmiştir. 1000ml balon jojelerinde hava + CO₂ verilmesinin etkisiyle pH hızla düşmüş 1.günde pH 6.5 olarak gözlenmiştir. 7 günlük yetiştirme sürecinde hücre sayısı ile birlikte pH’da zamanla artmış ve 6.günden sonra sabit bir seviyede görülmüştür. Aynı şekilde hacim artırma ortamında, başlangıcında 250ml erlenden alınan ilk hücre sayımı $8,2 \times 10^5$ iken 3.gün sonunda 12×10^5 olarak sayılmıştır. 4. Günden sonra hücre sayımı giderek artmış ve 7.gün sonunda 26×10^5 sayılmıştır (Şekil 4.11b).



Şekil 4.11. *H. pluvialis*’in 1000 ml sıvı besi ortamı **a)** pH değerleri; **b)** Hücre sayımı

Üreme sağlanan 1000 ml cam balonlardan *H. pluvialis* kültürüne hacim artırımı yapılmıştır. 5000 ml şeffaf plastik bidonlara 4000 ml sıvı besi ortamı koyulup, üzerine cam balonlardan gelen 1000 ml kültür eklenmiştir. 5000ml şeffaf plastik bidon sıvı besi ortamına alınan *H. pluvialis* kültürü raf sistemi üzerinde $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve 12sa aydınlık 12sa karanlık ışık süresi ile devamlı havalandırma ve 15sn/15dk şeklinde CO₂ beslemesi yapılmıştır.

Hacim artırmak amaçlı inoküle edilen kültürlerin sıvı besi ortamının pH değerleri şekil 4.12a’ da verilmiştir. 5000ml şeffaf plastik bidon sıvı besi ortamına alınan *H. pluvialis* kültürünün ilk pH 8,01 olarak gözlemlenmiştir. Taze besi ortamı etkisiyle pH bir miktar düşmüş 1.günde pH 7,9 olarak gözlenmiştir. 7 günlük yetiştirme sürecinde hücre sayısı ile birlikte pH’da zamanla artmış ve 4.günden sonra sabit bir seviyede kalması için günlük kontrollerde manuel CO₂ verilerek pH’ın daha kontrollü olması sağlanmıştır. Aynı şekilde hacim artırma ortamında, başlangıcında 1000 ml cam balondan alınan ilk hücre sayımı 26×10^5 iken 7. gün sonunda 38×10^5 olarak sayılmıştır (Şekil 4.12b).



(a)

(b)

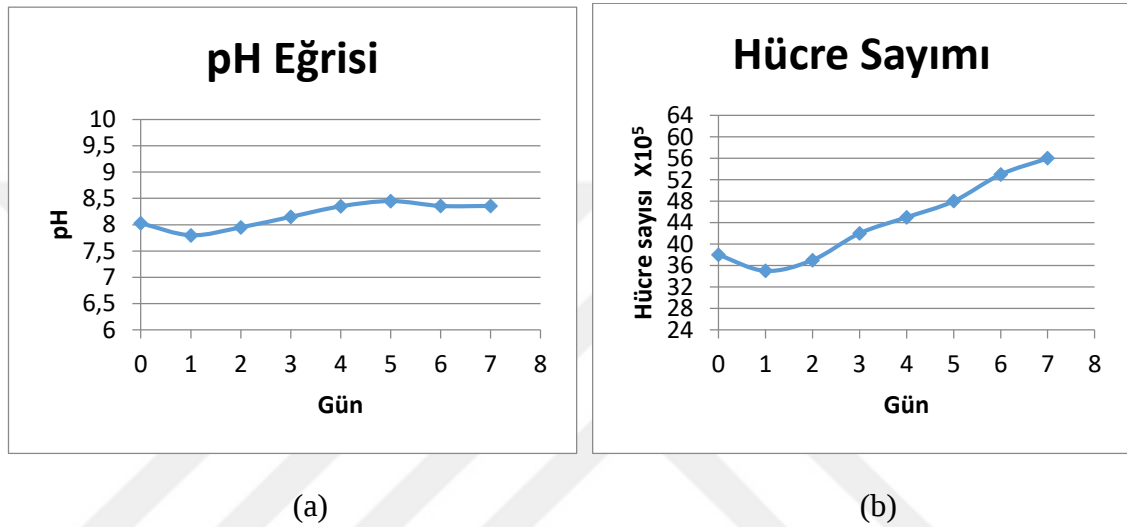
Şekil 4.12. *H. pluvialis*'in 5000 ml sıvı besi ortamı **a)** pH değerleri; **b)** Hücre sayımı

Kırmızı faz üretimine geçmek için son basamak hacim artırımı yapmak amacıyla, üreme görülen 5000 ml şeffaf plastik bidonlardaki *H. pluvialis* kültürüne hacim artırımı yapılmıştır. 20 lt şeffaf plastik bidonlara 15 lt sıvı besi ortamı koyulup, üzerine şeffaf plastik bidonlardan gelen 5000 ml kültür eklenmiştir. 20 lt şeffaf plastik bidon sıvı besi ortamına alınan *H. pluvialis* kültürü raf sistemi üzerinde $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve 12sa aydınlık 12sa karanlık ışık süresi ile devamlı havalandırma ve 15sn/15dk şeklinde CO₂ beslemesi yapılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Hacim artırılmış 20 lt balon şeffaf plastik bidonlarda *H. pluvialis* kültürü (Orijinal)

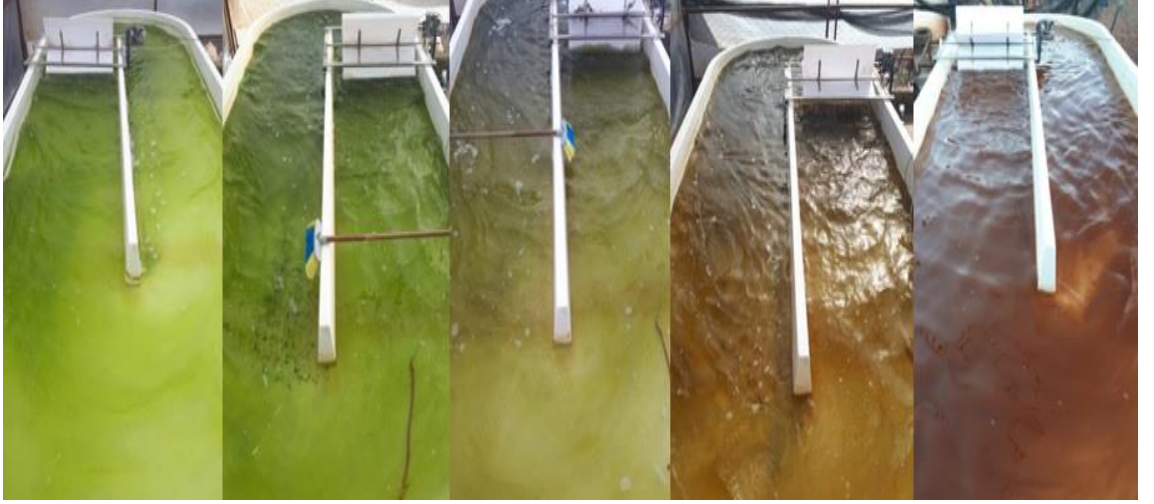
20 lt şeffaf plastik bidonlardaki sıvı besi ortamının pH değerleri şekil 4.14a' da verilmiştir. 5000ml şeffaf plastik bidon sıvı besi ortamına alınan *H. pluvialis* kültürünün ilk pH 8,02 olarak gözlemlenmiş ve 7 günlük yetiştirme sürecinde hücre sayısı ile birlikte pH'da zamanla artmış ve 5. gün pH 8,45 gözlenmiştir. pH değerinin sabit bir seviyede kalması için günlük kontrollerde manuel CO₂ verilerek pH'ın daha kontrollü olması sağlanmıştır. Aynı şekilde hacim artırma ortamında, başlangıcında 5000 ml şeffaf plastik bidondan alınan ilk hücre sayımı 38×10^5 iken 7. gün sonunda 56×10^5 olarak sayılmıştır (Şekil 4.14b).



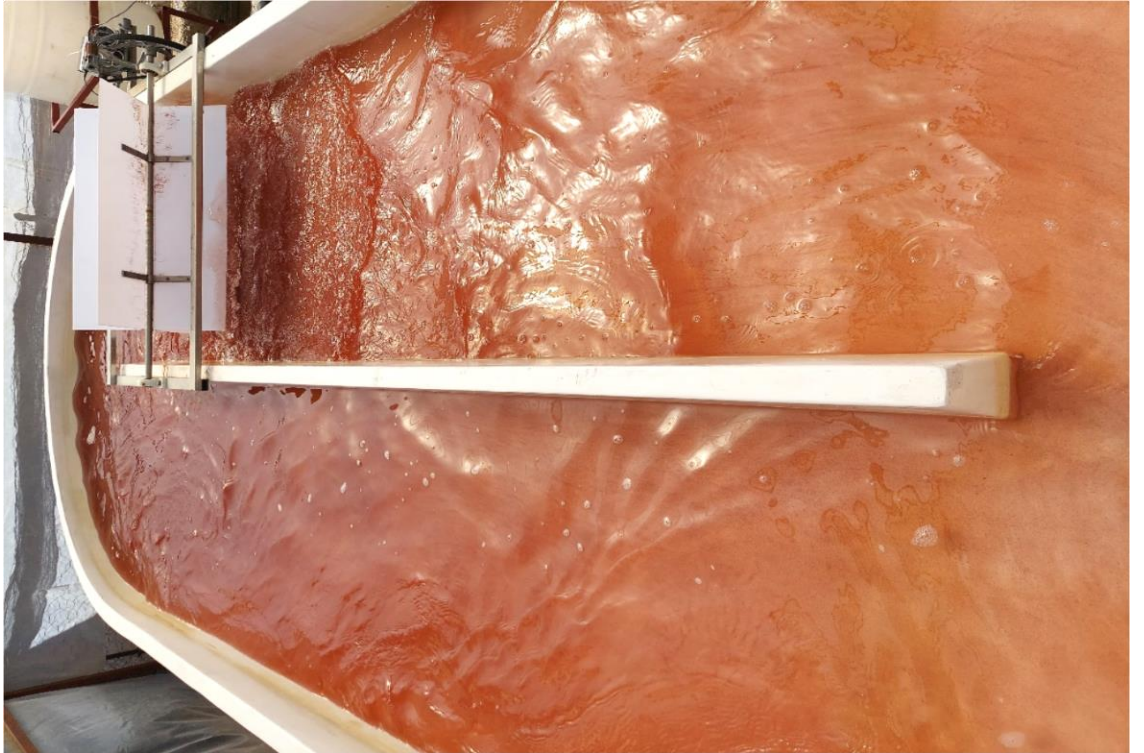
Şekil 4.14. *H. pluvialis*'in 20 lt sıvı besi ortamı a) pH değerleri; b) Hücre sayımı

4.5. Yoğun Kültürden Kırmızı Faz Üretimi

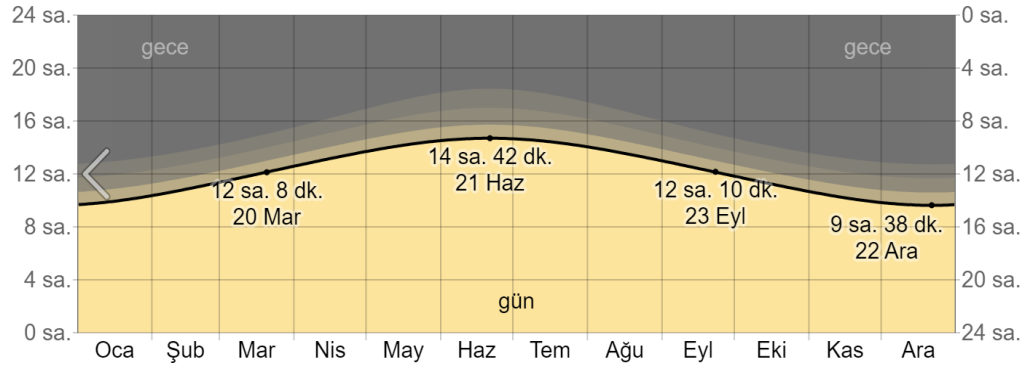
Kapalı sistemde üretilen 8 x 20 lt toplam 160 lt *H. pluvialis* kültürü, astaksantin birikimli biyokütle elde etmek için 1340 lt suyla doldurulan endüstriyel ölçekli alg üretim havuzlarına inoküle edilmiştir. Kapalı üretim sisteminden açık üretim sistemine aktarılan *H. pluvialis* kültürü bu havuzlarda besin eksikliği, yüksek ışık ve tuz stresine maruz bırakılmıştır. Açık sistemlerdeki doğal ışık kaynağı güneşin yaklaşık en düşük 27000 lüks ($500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$) en yüksek 67000 lüks ($1541 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$) ışık şiddeti ve tuzluluk ise % 0,4 olarak uygulanmıştır (Şekil 4.15; 4.16). Antalya doğal gün aydınlanma süreleri ise en düşük 9 saat 32 dakika olarak 22 Aralık tarihinde, en yüksek ise 14 saat 42 dakika olarak 21 Haziran tarihinde ölçülmüştür (Şekil 4.17). Homojen bir karışım ve eşit stres dağılımı gereksinimlerinden dolayı havuzlardaki sirkülasyonu sağlamak için bu çalışmada tasarlanan çarklar kullanılmıştır. Havuzlarda stres ortamına maruz bırakılan kültür ortamının başlangıç pH değeri 8,2 iken 2 gün içinde stres ortamı olmasına rağmen pH yükselmiş 9 olmuştur. Daha sonra ise 6. Gün sonunda pH 7,6 düşmüş ve sabit kalmıştır (Şekil 4.18a). Yine aynı şekilde başlangıç hücre sayısı 56×10^5 iken 3 gün içinde 63×10^5 ulaşmış ve ardından stres ortamına bağlı olduğunu düşündüğümüz 59×10^5 seviyelerine düşmüştür (Şekil 4.18b).



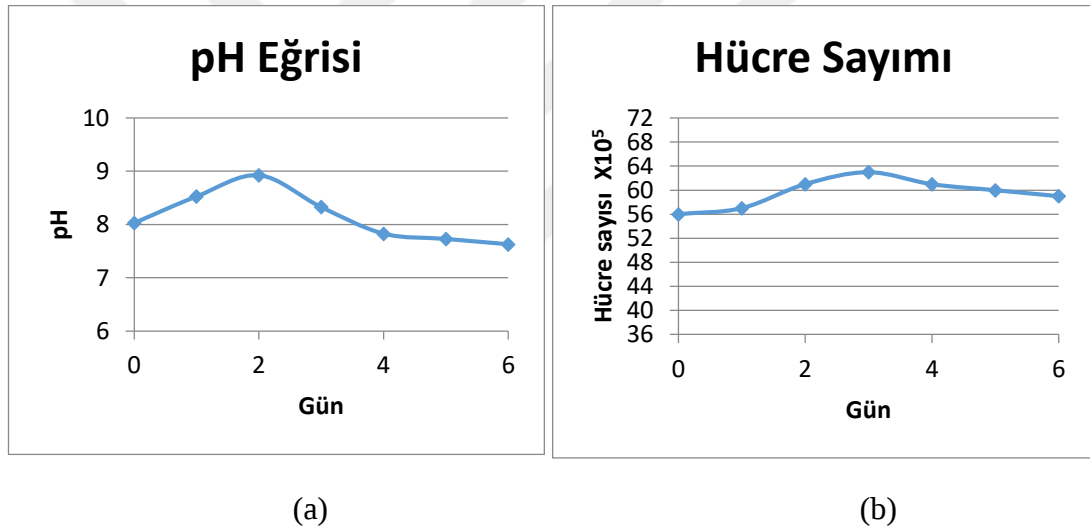
Şekil 4.15. Astaksantin birikimli biyokütle elde etmek için inoküle edilen havuzlar (Orijinal)



Şekil 4.16. Astaksantin birikimli biyokütle elde etmek için inoküle edilen havuzlar (Orijinal)



Şekil 4.17. Antalya gün aydınlanma süreleri (Anonim 1)



Şekil 4.18. *H. pluvialis*'in stres havuzu a) pH değerleri; b) Hücre sayısı

4.6. Havuzların Hasat Edilmesi

Astaksantin birikimli biyokütle elde etmek amacıyla kırmızı faz üretimine geçirilip stres ortamına maruz bırakılan 1500 lt *H. pluvialis* kültürü dolu havuzlar, yapılan günlük kontrollerde hücrelerin % 80'nin kistik aplanospor formuna dönüşmesiyle beraber hasat edilmiştir. Hasat işleminde biyokütlenin dış etkenlerden en az zarar görmesi için süratle hareket edilmiştir. Havuzlarda karışımı sağlayan çarklar durdurulmuş, kistik aplanospor formdaki *H. pluvialis* kültürü çökeltmeye bırakılmıştır. Çökelen havuzlardaki üst besî ve stres ortamı pompalar ile çekilmiştir. Geriye kalan çökelmiş kültür yine

pompalarla dinlenme silolarına aktarılmıştır. Saflaştırma için silolardaki yoğun kistik aplanospor formdaki *H. pluvialis* kültürü suyla tekrar yıkanmıştır (Şekil 4.16). Daha sonra sulandırılmış kültür susuzlaştırma işlemi için pompalar vasıtasıyla santrifüje düşük devirle aktarılmıştır. Stres ve besi ortamının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Hasat işlemi sonunda susuzlaştırılmış yoğun aplanospor formdaki *H. pluvialis* kültürü elde edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.19. Hasat edilmiş astaksantin birikimli ıslak biyokütle (Orijinal)



Şekil 4.20. Susuzlaştırılmış yoğun aplanospor formdaki biyokütle (Orijinal)

4.7. Hücrelerin Parçalanması, Kurutma ve Depolama

Hasat işlemi sonunda elde edilen susuzlaştırılmış yoğun aplanospor formdaki *H. pluvialis* biyokütlesi hücrelerinin parçalanması için, otoklav ayarları 121° C de 1,5 atm basınçla otoklavlanmıştır. Bu işlem ayrıca biyokütlenin sterilizasyonunda da oldukça etkilidir. Daha sonra otoklavın tek başına hücre parçalama işlemi için yeterli olmadığı ve etkinliğinin artırılması amacıyla, biyokütleyle sonikatör ile hücre parçalanması yöntemi uygulanmıştır. Hücreleri kırılmış ancak otoklav ve sonikatörün etkisiyle hala sıvı formdaki biyokütle etüvle kurutma ve sprey kurutma yöntemiyle kurutulmuştur. Hasat işleminden sonra 750 ile 1250g arasında değişen kuru biyokütle elde edilmiştir. Hasat sonunda elde edilen biyokütlenin astaksantin içeriği spektrofotometrik ölçüm yöntemleri ile % 3.28 - 4.58 olarak belirlenmiştir. Kurutulan biyokütle vakum makinası ile havası alınan paketlerde -17°C derecede muhafaza edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen *H. pluvialis* biyokütlesinin temel besin öğeleri değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. *H. pluvialis*'in temel besin öğeleri değerleri

Bileşen	Yeşil faz	Kırmızı faz	Ortalama
Ham protein (%)	22.32	9.45	15.88
Ham katı ve sıvı yağ (%)	8.31	16,94	12.62
Ham selüloz (%)	1.07	3.50	2.28
Kül (%)	7.15	3.82	5.48

4.8. İşletme Maliyetinin Hesaplanması

İşletme aylık maliyeti; aylık elektrik tüketimi, su tüketimi, karbondioksit miktarı, besiyer stok solüsyon miktarı ve personel maliyeti dikkate alınarak hesaplanmıştır. Ani gelişen durumlar için ise % 10 amortisman payı bırakılmıştır.

Yetiştiricilik fazlarının her bölümünde kullanılan toplam 15 adet 10 lt karbondioksit tüpü aylık üç kere gaz dolumu yapılmaktadır. 10 lt karbondioksit tüpünün gaz dolumu 90 TL'ye yapılmıştır. Karbondioksit maliyeti Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Aylık karbondioksit maliyeti

Kullanılan Cihazlar	Adet	Değişim	Birim fiyat	Maliyet
Karbondioksit tüpü	15	3	90 TL	4.050 TL

Laboratuvar ortamı iklimlendirmesi için günlük devamlı klima kullanılmıştır. Yeşil faz üretimi için ve genel aydınlatma için 39 adet 10W led lamba kullanılmıştır. Kırmızı faz üretimi için üç havuzda 12 saat karıştırma çarkı kullanılmıştır. Otoklav, besiyeri hazırlanırken ve hasat yapıldığında kullanılmıştır. Sonikatör, sprey kurutucu ve etüv sadece hasat zamanı kullanılmıştır. Elektrik tüketim bedeli işyeri için kW/saati 1,46 TL'dir. Aylık elektrik tüketim maliyeti Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Aylık elektrik tüketim maliyeti

Kullanılan Cihazlar	Cihaz gücü (kW)	Adet	Süre (saat)	Birim fiyat (TL)	Maliyet (TL)
Klima	0.79	1	720	1,46	830,44
Aydınlatma	0.01	39	360	1,46	204,98
Karıştırma Çarkı	0.1	3	360	1,46	157,68
Otoklav	2	1	12	1,46	35,04
Sonikatör	2.5	1	12	1,46	43,8
Sprey kurutucu/Etüv	22	1	6	1,46	192,72
Genel kullanım	2	1	30	1,46	87,6
TOPLAM					1.552,26 TL

Kırmızı faz üretiminde üç adet havuz olduğu ve herbirini ayrı inoküle eden üç ayrı yeşil faz üretim grubu oluşturulmuştur. İşyeri 1 m³ su tüketim bedeli 19.66 TL'dir. Aylık su tüketim maliyeti Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Aylık su tüketim maliyeti

Kullanılan Alan	Adet	Değişim	Birim fiyat (m ³)	Maliyet (TL)
250 ml Erlen	24	3	19,66	0,35
1000ml Balon joje	24	3	19,66	0,70
5 lt Plastik bidon	24	3	19,66	3,5
20 lt Plastik bidon	24	3	19,66	14
1500lt havuz	3	3	19,66	265,41
			TOPLAM	283,96 TL

1000 ml besiyeri yapmak için, stok solüsyonun 1-8. ögelerinden 10 ml, 9'dan ise 1 ml alınıp, distile suyla 1000 ml tamamlanır. Aylık yeşil faz üretimi için üç defa 630 litre toplamda 1890 litre besiyeri hazırlanır. 1890 litre besiyeri için, stok solüsyonun 1-8. ögelerinden 18,9 litre, 9'dan ise 1.89 litre birim stok solüsyon hazırlanır. 1-8 stok solüsyon toplam maliyeti, $18.9 \times 21,09 = 398,6$ TL dir. 9. Stok solüsyon toplam maliyeti ise, $1.89 \times 1,66 = 3,02$ TL dir. Toplam stok solüsyon maliyeti ise, 401,62 TL dir. Birim stok solüsyon maliyet tablosu Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.7. Aylık birim stok solüsyon maliyeti

Stok solüsyonlar	1000 ml için	Birim fiyat (TL)	Maliyet (TL)
(1) NaNO ₃	150.0 g	115,74	17,36
(2) K ₂ HPO	4.0 g	277,74	1,11
(3) MgSO ₄ .7H ₂ O	7.5 g	62,69	0,46
(4) CaCl ₂ .2H ₂ O	3.60 g	54,92	0,19
(5) Citric acid	0.60 g	195,91	0,11
(6) Ammonium ferric citrate green	0.60 g	145	1,74
(7) EDTA Na ₂	0.10 g	247	0,024
(8) Na ₂ CO ₃	2.00 g	51,98	0,10
		TOPLAM	21,09 TL
(9) İz elementler:			
H ₃ BO ₃	2.86 g	74,28	0,21
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81 g	433,96	0,78
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22 g	100,17	0,022
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.39 g	1.520,36	0,59
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08 g	173,61	0,01
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.05 g	1.155,68	0,05
		TOPLAM	1,66 TL

Asgari ücretin işverene aylık maliyeti 5.879,70 TL dir. Bu çalışmada, iki personel çalışmıştır. Toplam personel gideri 11.758 TL dir.

Elektrik tüketimi, su tüketimi, karbondioksit miktarı, besiyer stok solüsyon miktarı ve personel maliyeti dikkate alınarak hesaplan aylık işletme maliyeti 18.045,84 TL olarak hesaplanmıştır. Bu toplama şirket amortisman payı olarak % 10 gider daha eklenerek aylık toplam işletme gideri 19.850,42 TL olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.8. Aylık toplam işletme gideri maliyeti

Gider Kalemi	Maliyet (TL)
Personel	11.758
Elektrik	1.552,26
Su	283,96
Karbondioksit	4.050
Kimyasal solüsyonlar	401,62
Ara Toplam	18.045,84 TL
Amortisman % 10	1.804,58
TOPLAM	19.850,42 TL

5. TARTIŞMA

H. pluvialis ile ilgili ilk araştırmalar 1797'de Chantrans tarafından başlasa da, Flotow, 1844'e göre, Chantrans çalıştığı türle ilgili kesin bir tarifi ve resmi olmadığını bildirmiştir. Chantrans'ın çalıştığı türün şiddetli güneş ortamında dahi renk değişimi yapmadığını ve *Chlamidomonas*'ın (*Chi. pulvisculus*) sadece bir yeşil türünü tanımladığını bildirmiştir.

Hazen (1899) çalışmasında, *Sphaerella* isimlendirmesi o kadar karışık bir durumdadır ki, yaşam öyküsü açısından ciddi hatalara yol açmıştır. Bu nedenle kısa bir tarihsel taslağa ihtiyaç duyulabilir. Agardh (1828) *H. pluvialis* cinsini ona daha önce *Protococcus nivalis* adını verdiği türü aktardı. Flotow (1844) *H. pluvialis* adını verdi. Birçok bilim insanında kabul ettiği biçimde bu çalışmada da tür ismi *H. pluvialis* olarak kullanılmıştır.

Pirinç (2014) yaptığı çalışmada, alg üremesini belirleyen en önemli faktörlerin; besin miktarı, ışık, pH, türbülans, tuzluluk ve sıcaklık olduğunu bildirmiştir (Utting 1985). Uygun şartlar ve tolerans aralıkları türe özgüdür. Mikroalg kültürlerine verilen besiyeri ve yetiştirme koşulları başka bir mikroalg türü için geçerli olmayabileceğini bildirmiştir (Coutteau 1996). Mikroalg üretimine etki eden faktörlerin bu çalışmada, besi ortamı kalitesi ve miktarı, ışık ve sıcaklığın olduğu gözlemlendi. Ancak, pH'ın etkisinin dış etkiler haricinde de mikroalg kültürünün döngüsünden de kaynaklanan farklılıklar olabileceği kanısındayız. Ayrıca bu çalışmada kullanılan *H. pluvialis* türünün yeşil faz üretiminde tuzluluğun pozitif bir etkisi olmadığı, aksine kırmızı faz üretiminde alg kültürünün ikincil karotenoid olan astaksantin üretimi için uygun olarak kullanıldığını ve yaptığımız çalışmalarda en uygun tuzluluğun 0,4% olarak belirlenmiştir.

Köksal vd. (2012)'de yaptığı çalışmada *H. pluvialis*'in yeşil fazdaki gelişiminde $27 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanmış ve stres fazında ise yüksek sıcaklık 35°C ile yüksek ışığın ($177 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) etkisi araştırılmışlardır. Astaksantin birikimini yükseltmek için oluşturulan stres koşulları altında, kistik safhanın ikinci gününde 35°C gibi yüksek sıcaklıktan dolayı yeşil hücre kültürlerinin kırmızı kistik hücrelere dönüşmeden beyazlaşarak öldüğü gözlemlenmiştir. *H. pluvialis*'i kistletmek için, uygulanan yüksek sıcaklık değeri 35°C 'nin uygun olmadığını belirlediklerini bildirmiştir. Bu çalışmada, yeşil faz üretimi için $45 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde en verimli üreme gözlemlenirken, kırmızı faz üretimi için doğal güneş ışığı $2000 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ve gölgelendirilmiş güneş ışığı $500 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kullanılmıştır. Kırmızı faz üretiminde sıcaklık 35°C kistik hücrelerde ölüm %5 civarında görülmüştür. Oluşan bu farklılıkların yukarıda bahsedilen türe özgü yetiştirme ortamı besiyeri kalite ve miktarı, havalandırma ve türbülans farklılıklarından kaynaklandığını düşünüyoruz.

Akın (2005)'in yaptığı konuyu başından sonuna ele alan yüksek lisans çalışmasında, hücre parçalama yöntemlerinin kıyaslamasını yapmış sıvı homojenizatör, diğer hücre parçalama yöntemleri ile birlikte kullanıldığında tüm yöntemlerden daha yüksek verim elde etmiştir. En başarılı sonuçların ise otoklav ve ardından yapılan homojenizatör ile parçalama yöntemiyle elde edilmiş ve %87,8'lik performansa ulaştığını bildirmiştir. Sonikasyonla hücre parçalama değerinin ise %30 ve otoklav ile hücre parçalama değerlerini %75 olarak belirlemiştir. Bu çalışmada da hücre parçalama yöntemi olarak hem makine teçhizat yanından uygunluğu hem de sterilizasyonun

uygunluğundan dolayı otoklav ve sonikasyon olarak iki aşamada yapılmıştır. Önce otoklav ile hücreler parçalanmış ardından sonikasyano tabi tutulan ıslak hücreler parçalanmış ve 82% hücre parçalanmasına ulaşmıştır.

Çokcan (2015) yaptığı çalışmada; katı besiyer ekimi denemesinde BBM ve % 2,5 agar ilaveli katı kültür ortamında 36W 12/12 aydınlık/karanlık rejiminde 15 günlük süreç sonunda üreme gözlemleyememiştir. Buna karşın BBM ve 2,5% agar ilaveli katı kültür ortamında 36W 24/0 aydınlık/karanlık rejiminde 15 günlük süreç sonunda üreme görebilmiştir. Bizim çalışmamızda ise; katı besiyeri olarak BG-11 ve 15g/L agar ilave edilerek oluşturulmuştur. Işık yönetimi olarak 14/10 aydınlık/karanlık ışık kullanılarak 4. günde üreme başlangıcı 15.günde ise yoğun katı kültür üremesi gözlemlenmiştir.

Lorenz (1999)'in yaptığı çalışmada; *H. pluvialis* yetiştiriciliğinden elde edilen biyokütlenin temel besin değerlerini, mineral değerlerini, aminoasit ve yağ asidi değerlerini araştırmıştır. Temel besin değerleri öğelerinden protein % değerini, en düşük 17,3 en yüksek 27,16 ortalama 23,62 bulmuş, yağ % değerini en düşük 7,14 en yüksek 21,22 ortalama 13,80 bulmuş ve kül % değerini en düşük 11,07 en yüksek 24,47 ortalama 17,71 olarak gözlemlemiştir. Bu çalışmada; AB-0566-T numaralı akredite gıda laboratuvarı olan” Nanolab Gıda Laboratuvar Hizmetleri” firmasından gıda temel besin değerleri testi yaptırılmıştır. Yaptırılan 4367/0/30.07.2019 rapor/yayın/tarihli test sonuçlarına göre; protein % değerini yeşil fazda 9,45 kırmızı fazda 22,32 ortalama 15,88, yağ % değerini yeşil fazda 8,31 kırmızı fazda 16,94 ortalama 12,62 ve kül % değerini yeşil fazda 7,15 kırmızı fazda 3,82 ortalama 5,48 olarak belirlenmiştir. Bu farklılıkların sebebinin yetiştiricilik yöntemi ve yetiştiriciliği etkileyen faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak burada dikkat edilmesi gereken yerin kırmızı faz üretimiyle birlikte protein ve kül değerinin azalıp yağ ve lif değerlerinin arttığını düşünmekteyiz.

Torres-Carvajal vd. (2017)'in yaptığı çalışmada; ışık dalga boylarının ve tuzluluğun *H. pluvialis*'ten astaksantin üretimi üzerindeki etkisi değerlendirmiştir. Bu pigmentin en yüksek miktarını üretmek için en uygun koşulların, maksimum 9.72 µg/mL üretkenlik ile %0.45 v/v'lik mavi dalga boyu ve tuz konsantrasyonda olduğunu bildirmiştir. Buna karşın Cordero, 1996'da yaptığı çalışmada, en yüksek astaksantin üretimini 0,2 % NaCl tuzluluk oranın ve 0,025%-0,05% g/L sodyum asetat ortamında bulmuş ve hatta tuzluluğun 0,4% değerine çıktığında hücrelerde kül miktarının 10% arttığını bildirmiştir. Bu çalışmada ise; *H. pluvialis*'ten astaksantin üretimi üzerindeki faktörlerden Torres-carvajal vd. (2017) yaptığı çalışmaya yakın bir değer olan 0,4% tuzluluğun en uygun koşulları sağladığını düşünüyoruz. Kullanılan 0,4% tuzluluk oranında hücrelerde bozulma ve kül oranının artmasının tersine en iyi verim alınmıştır.

Olaizola (2000)'nın da yaptığı çalışmada; açık sistem havuzların standart tasarıma sahip olduğunu ve bir çark, hücreleri karışık ve süspansiyon halinde tutmak için enerji sağladığını (türbülans > 200000 Re) görmekteyiz. Havuz derinliğinin ortalama 15 cm olduğunu, havuzlardaki sıcaklık, gün boyunca, geceleri yaklaşık 16 °C'den düşük, gündüzleri 34 °C'ye kadar önemli ölçüde değiştiğini bildirmişlerdir. Havuzlardaki ışık şiddetinin öğle saatlerinde 2000 mol foton m⁻² s⁻¹'in üzerine çıkabildiğini belirtmişlerdir. Su Araştırmaları Büyütme Modülü (Aquasearch Growth Module) AGM'lerde üretilen *H. pluvialis* biyokütlesinde astaksantin birikimini indüklemek için stres faktörlerinin tescilli bir birleşimini kullanıldığını ve şu anda çalışan 6 adet gölet ünitesinin olduğunu, her gün bir havuz aşılandığını (0. gün). 5. günde, *H. pluvialis* hücreleri tamamen kırmızı

aplanosporlar haline geldiğini ve havuz hasat edildiğini bildirmiştir. Bu sistemin öngörülebilirliği, günde bir havuz aşılama ve günde bir havuz hasadı olmak üzere 6 havuz ünitesi için düzenli bir programın izlenmesine olanak tanıdığını bildirmişlerdir. Son olarak, bir dönemde üretilen *H. pluvialis* astaksantin içeriğini Nisan ve Eylül 1999 arasında kuru ağırlığın %2.8'inden %3.0'ına hafif bir iyileşme olduğunu bildirmiştir.

Harker vd. (1996)'nin laboratuvar ölçekli *H. pluvialis* kültürlerinin kuru ağırlığın % 5,5'sı kadar astaksantin olarak biriktiğini bildirmiştir. Yayımlanan bu laboratuvar sonuçlarına göre ve kendi yayınlanmamış verilerine göre, açık hava *H. pluvialis* kültürlerinin şimdiye kadar elde edilenden %50-100 daha yüksek astaksantin içeriğine ulaşma potansiyeli olduğu ileri sürülmüştür. Hasat işlemi ise çöktürme yöntemiyle yapılmakta olduğunu, daha fazla konsantrasyon için santrifüj uygulandığını bildirmiştir.

Bu çalışmada da; Olaizola (2000)'nin gözlemlediği ve tavsiye ettiği *H. pluvialis* yetiştiriciliği metotlarına çok yakın yöntemler uygulanmıştır. Bulgular bölümü üretim tesisi taslak diyagramında da verilen yöntem, 6'lı havuz sistemi, her gün bir havuzun hasat edilmesi ve boşalan 1 havuzun inoküle edilmesi sonucu sürekli günlük ürün alınmasına dayanmaktadır. Haftanın 1 günü kullanılan ürünlerin temizliği ve bakımı için ayrılmıştır. Yine aynı şekilde bu çalışmada da kullanılan açık havuzlarda biyokütlenin hasat işlemi çöktürme yöntemi ile yapılmaktadır. Daha yoğun konsantrasyon için ise evaporasyon uygulaması uygulanmıştır. Açık havuzlarda biyokütle üretiminin daha verimli ve astaksantin içeriğinin daha yüksek olması doğal ışık kaynağı kullanımından kaynaklı olduğunu düşünüyoruz. Açık havuz biyokütle üretim sistemlerinin en önemli dezavantajı ise; kontaminasyona açık olmasıdır. Açık havuzlar kontrollü seralarda kurulduğunda ve sera ortamının ısı, ışık, havalandırma ve temizlik kontrolleri dikkatle takip edildiğinde bu sorunun önüne geçilebileceğini düşünüyoruz.

Tripathi vd. (1999)'nin yaptığı bir çalışmada; *H. pluvialis*'in farklı ortamlardaki büyüme paterni 12 günlük bir süre boyunca izlemiştir. Denenen ototrofik ortamlar arasında hücre büyümesi için en iyisinin BBM olduğu, Z8 ve A9 ortamlarında ise yavaş büyüme olduğu bulmuştur. Maksimum hücre sayısı 10. günde BBM (1.5×10^5 hücre ml^{-1}) ve Z8 (0.8×10^5 hücre ml^{-1}) elde edilmiştir. Heterotrofik KM1 ortamındaki büyüme, BBM ortamındaki hücre sayısından 20 kat daha fazla olan 4.35×10^5 hücre ml^{-1} maksimum hücre sayısı ile 5. günde oldukça yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Ototrofik ortamda gözlemlenen uzun vejetatif fazın aksine, KM1 ortamındaki hücreler 5 gün sonra erken donma göstermiş ve ardından büyümenin durağan fazına ulaşmıştır. İncelenen değiştirilmiş ortamdan MM1 ortamı vejetatif fazı uzatırken, MM2 ortamı ve KM2 ortamı, KM1 ortamına göre hücre sayımlarında sırasıyla 1.16 ve 1.5 kat artış göstermiştir. *H. pluvialis*'in büyümesi heterotrofik ortamda (KM1) ve mikсотrofik ortamda (MM2 ve KM2) ototrofik ortamdan daha fazla olduğunu bildirmiştir. Pringsheim (1966) tarafından bildirildiği gibi, bu farkın B vitaminlerinin eklenmesine bağlı olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada, Z8 ortamının slantlarda kültürlerin bakımı için uygun olduğu ve hücrelerin vejetatif büyümesinin sürdürülmesi için MM1'in uygun olduğu bulunmuştur.

Noroozi vd. (2012)'nin yaptıkları çalışmada ise; elde edilen sonuçlar, tüm kültürler, ışık yoğunluğu ve şişe şekli gibi tek tip fiziksel koşullar aldığından, büyüme ortamının etkilerini yansıtmıştır. Karbon kaynağı olarak asetat içeren mikсотrofik ortamın, *H. pluvialis* için en iyi büyümeyi indüklerken, bunu COMBO ve OHM'nin izlediğini, Bold ve NIES ortamı ise en düşük biyokütleyle sonuçlandığını bildirmiştir.

Çalışmada 9 farklı coğrafyadan tür kullanılsa da mikсотrofik kültür ortamı en çok biyokütle elde edilen ortam olduğunu bildirmişlerdir. Imamoglu vd. (2007)'nin yaptıkları farklı ışık ve farklı besi ortamlarının üremeye etkisini araştırmışlardır. *H. pluvialis*'in en fazla üremeyi, 9.50×10^5 hücre ml^{-1} , 12 günlük büyüme periyodu boyunca 25°C 'de sürekli aydınlatma altında ($40 \mu\text{mol}$ fotonlar $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) RM ortamında elde edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada BG-11 kültür ortamında 3. en iyi üremeyi sağlamıştır. Bizim çalışmamızda hem yeşil fazdan en çok üremeyi hem de kırmızı fazdan en iyi astaksantin birikiminin verimi almak için farklı kültürlerde üreme ortamını değerlendirdik. Kesikli (2 fazlı) üretim sisteminde fototrofik üretim modelinde en iyi verimi BG-11 kültür ortamında sağlanmıştır. Bu üç çalışmadaki farklılıkların hem *H. pluvialis* suşlarının hemde yetiştiriciliği yapılan coğrafi konumdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Wang vd. (2013)'nin yaptığı çalışmada; başlangıç biyokütle yoğunluğu (IBD), özellikle fotosentez için güneş ışığı kullanıldığında mikroalglerin canlılığını ve üretkenliğini etkileyen önemli bir faktör olmuştur. Bu makalede, yeşil mikroalg *H. pluvialis*'in astaksantin indüksiyon aşamasında fotosentez, büyüme ve astaksantin üretimi üzerindeki IBD'nin etkisi, farklı mevsimlerde cam kolonlu bir fotobiyoreaktörde incelenmiştir. Test edilen yedi IBD'den, yani 0.1, 0.5, 0.8, 1.5, 2.7, 3.5 ve 5.0, 0.8 g/L^{-1} IBD optimaldi ve 17.1 mg/L^{-1} gün $^{-1}$ ile en yüksek astaksantin üretkenliği ile sonuçlanmıştır. Düşük IBD (örn. 0.1 g L^{-1}) kültürlerinde, özellikle kış aylarında şiddetli fotosentez fotoinhibisyonu meydana gelmiş ve yüksek IBD kültürlerinde ($>2.7 \text{ g/L}^{-1}$) tek tek hücrelerde ciddi ışık sınırlaması sorumlu olduğunu ve *H. pluvialis* dış mekân yetiştiriciliğinde astaksantin üretimi için temel sınırlayıcı faktör olarak IBD'yi nicel olarak değerlendiren ilk rapor olduğunu bildirmişlerdir.

Ancak, Olaizola ve Huntley (2003)'nin yaptığı çalışmada; fototrofik olarak yetiştirilen *H. pluvialis* için bir stres kombinasyonunu gerçekleştirmenin en kolay yolunun, yeşil kültürü herhangi bir ek stres/tetikleme faktörü (asetat, demir, tuz, sıcaklık vb.) ile birlikte tatlı su ile basitçe seyreltmek olduğunu. Seyreltme iki şeyi hızla gerçekleştirdiğini: ortamdaki besin konsantrasyonunu hemen düşürdüğünü ve her hücrenin aldığı ışınım miktarını artırdığını daha önce bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda; başlangıç biyokütle yoğunluğu (IBD) belirleyip bir test yapılmadı. Ancak, algal kültürü yoğun yeşil faz üretiminden stres ortamına inoküle ederken, besin açlığını sağlamak, ışık alımını artırmak ve pH'dengelemek için 1/10 seyreltme işlemini kullanılmıştır.

Souza vd. (2020)'nin yaptıkları çalışmada; *H. pluvialis*'in yaşam döngüsü boyunca, kamçılı vejetatif hücrelerin büyümesi meydana geldiğini ve yeterli besin olduğu sürece baskın olduklarını bildirmiştir. Kobayashi vd. (1997) *H. pluvialis*'in yaşam döngüsünü iki hafta boyunca incelediğini ve yaşam döngüsünü dört aşamaya ayırarak morfolojik değişikliklerin mekanizmalarını araştırdığını: 1- vejetatif hücrelerin büyümesi; 2- keselenme; 3- olgunlaşma; 4- çimlenme. 1. aşamada, başlangıçta vejetatif hücreler büyüdüğünü bildirmiştir. Bu büyüme, diğerleri arasında besin sıcaklığı, ışık, nem gibi çevresel faktörlerle doğrudan bağlantılı olduğunu bildirmiştir. 2. iki kamçı nedeniyle aktif olarak hareket etmenin yanı sıra bu aşamada, vejetatif hücreler elips şeklinde ve sayısının artacağını bildirmiştir. 3. aşamada, hücreler hareketsiz küresel kistler haline geldiğini; bu nedenle, bu aşamaya kistlenme adını vermiştir. Bu aşamada, kist başlangıçta olgunlaşmadığını ve bir dizi fiziksel ve hücre içi içerik değişikliğinden geçtiğini,

Hücrelerin hacmi büyük ölçüde büyüdüğünü ve hücrenin sporopollenin gibi maddelerden oluşan çok dirençli selülozdan bir duvarla sarıldığı bir hareketsizlik aşamasına girdiğini bildirmiştir. Protoplast, geniş astaksantin birikimi nedeniyle kırmızımsı bir renk sunmuştur. Kistlerdeki karotenoidlerin biyosentezi oldukça önemli hale geldiğini ve böylece olgunlaşmamış kistin olgunlaştığı olgunlaşma aşaması gerçekleştiğini, kültür ortamı stres yaratan maddelerden arındırıldığında, hareketli hücreler yeniden ortaya çıkmıştır. Dördüncü aşamaya çimlenme dendiğini bildirmişlerdir.

Ancak; Akın (2005); Shah vd. (2016); Rather ve Singh (2018) ve bu çalışmada, 1. Yeşil, kamçı, vejetatif hücrelerin (Zoosporlar) yeşil renkli yavru hücreler hareketli olup iki kamçıya sahiptir. Sürekli bölündüklerini, yüksek düzeyde klorofil ve protein içerdiklerini. 2. Hareketsiz, yeşil hücreler (Palmelloid evre) yeşil hücreler kamçılarını kaybederek hareketsiz forma dönüşmüştür. Bölünmenin devam ettiğini, yüksek vakuol içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir. 3. Olgunlaşmamış kistik hücreler hücrelerin rengi kahverengine dönüştüğünü, hücre bölünmesi durduğunu ve hücreler durağan faza geçtiği ve klorofil ve protein içeriğinde azalma olduğu bildirilmiştir. Hücre çapında giderek artış gözlenenebileceğini ve 4. Olgun kistik hücreler (Aplanosporlar veya Hematokistler) olarak 4 evrede yaşam döngüsünü tamaladığını düşünülmektedir. Bu açıdan bakıldığında 2. Evre ve 4. Evre de bazı farklılıklar olduğu görülmektedir. Bu farklılıkların sebebinin *H. pluvialis*'in yaşam döngüsünü 4 evre olarak incelemeyen önce, ana yaşam döngüsünün uygun yaşam koşulları altında yeşil faz ismini verdiğimiz evrede ve canlılığını sürdürmek için uygun olmayan yaşam koşulları altında ise kırmızı kistik faz adını verdiğimiz 2 ana yaşam bölümüne sahip olduğunu yeterince anlaşılmadığından kaynaklandığını düşünüyoruz.

Eğer *H. pluvialis*'in in vitro ortamda hep uygun koşullar altında tutulursa, 1. Evredeki kamçı vejetatif hücre ve zamanla 1 evredeki bölünmesi azalan ve palmella dediğimiz, yaşlanan hücrelerin kamçılarını kaybedip hücre çapında büyüterek yaşamına devam ettiği ve tekrar daha uygun bir ortamda da bölünmeye devam ettiği anlaşılmalıdır. Bu süreç uygun koşullar sürdürüldüğü sürece bölünme hızı yavaşlarsa bile 1. evreden 2. evreye ve 2. evreden 2. evreye veya 1 evreye devam edecektir. Yani 2. evrede Souza vd. (2020)'nin bildirdiği gibi sadece kamçı zoosporlar hızla çoğalmayacak yukarıda bahsettiğim şekilde devam edeceği düşünülmektedir. Yine aynı şekilde kırmızı kistik formda yani 4. evrede de aplanospor (hematokist) hücreler eğer uygun olmayan yaşam koşulları sürdürülürse, hamatokist olarak kalacaklardır. Ancak yaşam koşulları uygun forma döndürüldüğünde çok hızlı bir üreme gözlenebileceğini düşünmekteyiz.

İnsan sağlığı kullanımı için yapılan bu önemli çalışmaların yanında, Guerin vd. (2003)'nin günlük güvenli doz alımıyla ilgili yaptığı çalışmada; 33 sağlıklı yetişkin gönüllüye 29 günlük bir süre boyunca doğal astaksantin takviyesi verildi. Her denek günlük olarak ya 3.85 mg astaksantin (düşük doz) ya da 19.25 mg astaksantin (yüksek doz) tüketmiştir. Gönüllüler, çalışmanın öncesinde, sırasında ve sonunda tam bir tıbbi muayeneye tabi tutuldu ve astaksantin takviyesinin yutulmasından kaynaklanan hiçbir yan etki veya toksisite gözlemlenmediğini ve incelenen diğer çalışmalarında *H. pluvialis*'ten elde edilen astaksantin'in test edilen dozlarda herhangi bir sağlık riski taşımadığı sonucunu desteklediğini bildirmişlerdir.

6. SONUÇLAR

Yaptığım bu doktora çalışmasında; birçok yetiştirme tekniği ve sistemi içinden en verimli olanı seçerek, imkânlarım dâhilinde, endüstriyel ölçekli bir *H. pluvialis* mikroalg yetiştirme tesisi (alg çiftliği) planlanması, kurulması, işletilmesi, yeşil faz ve kırmızı faz üretimi yapılmasını ve gıda takviyesi/kozmetik alanında kullanılabilecek endüstriyel ölçekte biyokütle üretmeyi amaçladım. Bu hedeflerim doğrultusunda, *H. pluvialis* mikroalgini endüstriyel ölçekte biyokütle üretimini tamamladım. Çalışma sürecinde Antalya İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'ne su ürünleri yetiştiriciliği başvurumu yaptım ve ön kontrolleri başarıyla tamamladım. Ancak iki kez yer değişikliği nedeniyle su ürünleri yetiştiriciliği başvuru sürecim hala devam etmektedir. Bu üretim sonucunda “astavitin” isimli bir gıda takviyesi ve kozmetik ürün markasını “T.C. Türk Patent ve Marka Kurumundan 2021-080228 marka numarasıyla tescil ettirdim.

Bu çalışmada, *H. pluvialis* yeşil faz üretiminde BG-11 besiyeri kullanılarak daha iyi sonuç alınmıştır. Su sıcaklığı 20 – 28 °C arasında uygun üreme koşullarına ulaşılmıştır. Havalandırmanın üreme hızına pozitif etkisi olduğu görülmüştür. CO₂ gaz karışımının 15sn/15dk uygulanması fotosentezi artıran bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Kültür ortamı pH seviyesinin 6 – 9 arasında üreme gözlemlenmiştir. Işık şiddetinin 2500 – 5500 lüks seviyesinde uygun üreme görülmüştür. Kırmızı faz üretiminde ise, besin eksikliği uygulamanın iyi sonuç verdiği görülmüştür. Abiyotik stres ortamı yaratmak için uygulanan 0,1 – 1,5 % tuzluluk *H. pluvialis* hücrelerini hızla dönüşüm sağlamıştır. Havuzlardaki besin eksikliği stresine ek olarak sodyum asetat ilavesinin hematokistik forma dönüşümü hızlandırmıştır.

H. pluvialis'in üreme hızının yavaşlığı ve diğer mikroorganizmalara karşı kontaminasyona çok açık ve kırılgan olduğu düşünüldüğünde yetiştiriciliğinin zor olduğu, Ancak, astaksantin metabolitinin etkilerinin önemi, ekonomik değeri ve kullanım alanlarının yaygınlığından dolayı da *H. pluvialis* yetiştiriciliğinin verimli bir pazar olduğu görülmüştür.

Bu çalışmanın, ülkemiz ekonomisi ve su ürünleri sektörü açısından ele alındığında hem istihdam hem de ekonomik getirisinin endüstriyel ölçekte yapılacak olan alg yetiştiriciliği tesislerinin düzenlenmesine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

- Aflalo, C., Meshulam, Y., Zarka, A., & Boussiba, S. 2007. On the relative efficiency of two-vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *H. pluvialis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 300-305.
- Agardh, A., C. 1828. *Icon. Alg. Eur.* Nos. 21
- Akın, O. 2005. *H. pluvialis* mikroalginden astaksantin ekstraksiyonu (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Aktar, S. ve Cebe, G. E. 2010. Alglerin genel özellikleri, kullanım alanları ve eczacılıktaki önemi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 39 (3) 237-264,
- Alam, F., Date, A., Rasjedin, R., Mobin, S., Moria, H., & Baqui, A. 2012. Biofuel from algae-Is it a viable alternative?. *Procedia Engineering*, 49, 221-227.
- Alçay, A. Ü., Bostan, K., Dinçel, E., & Varlık, C. 2017. Alglerin insan gıdası olarak kullanımı. *Aydın Gastronomy*, 1(1), 47-59.
- Altuğ, T. 2001. Gıda katkı maddeleri, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 286.
- Ambati, R.R., Mio, P.S., Ravi, S. ve Aswathanarayana, R.G. 2014. "Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications - A Review", *Marine Drugs*, 12(1): 128-152.
- Andrewes, A. G., Borch, G., Liaaen-Jensen, S. and Snatzke, G. 1974. Animal carotenoids. 9. On the absolute configuration of astaxanthin and actinioerythrin. *Acta Chem Scand Ser B* 28:730-736.
- Anonim 1: <https://tr.weatherspark.com> [Son erişim tarihi: 18.07.2022].
- Barsanti, L. & Gualtieri, P. 2014. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press.
- Baytaşoğlu, H. & Başusta, N. 2015. Deniz canlılarının tıp ve eczacılık alanlarında kullanılması. *Aquaculture Studies*, 15(2), 71-80.
- Becker, E. W. 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology* (Vol. 10). Cambridge University Press.
- Bogoçlu, M., Keçecilerb, C., Çokcanb, C., Özelb, C., Tekerekç, B. S., & Yücelb, S. 2019. The accumulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in different stress factors. *J. Indian Chem. Soc.*, 96, 1-6.
- Borowitzka, M. 2007. Topic 8: Algal Culture and Biotechnology. *BIO301*.
- Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of biotechnology*, 70(1-3), 313-321.
- Borowitzka, M. A., Huisman, J. M., & Osborn, A. 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *H. pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *Journal of Applied Phycology*, 3(4), 295-304
- Boussiba, S. & Vonshak, A. (1991). Astaxanthin accumulation in the green alga *H. pluvialis*. *Plant and cell Physiology*, 32(7), 1077-1082.
- Boussiba, S. 2000, Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular

- physiology and stress response, *Physiologia Plantarum*, 108: 111-117.
- Boussiba, S., Bing W., and Zarka, A. 1999. Changes in pigment profiles of *Haeamatococcus pluvialis* during exposure to enviromental stresses, *Biotechnol Letters*, 21: 601-604.
- Boussiba, S., Vonshak, A., Torzillo, G. 2004, Applied course on production and monitoring of microalgal growth, Ebiltem Yayınları, İzmir, 82.
- BSGM, 2022. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Yapmak İsteyenlerin İzlemeleri Gereken Prosedür.
<https://www.tarimorman.gov.tr/BSGM/Belgeler/Icerikler/Su%20ürünleri%20Yetiştiriciliği/Yetiştiricilik%20Müracaat20Prosüdürü.pdf> [Son erişim tarihi: 22.05.2022]
- Burchardt, L., Balcerkiewicz, S., Kokociński, M., Samardakiewicz, S., & Adamski, Z. 2006. Occurrence of *H. pluvialis* Flotow emend. Wille in a small artificial pool on the university campus of the Collegium Biologicum in Poznań (Poland). *Biodiversity: Research and Conservation*, 2006(1-2), 163-166.
- Cai, J., Lovatelli, A., Aguilar-Manjarrez, J., Cornish, L., Dabbadie, L., Desrochers, A., ... & Yuan, X. 2021. Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, (1229).
- Cai, T., Park, S. Y. & Li, Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369.
- Chantrans, J.G. 1797. Bulletin des sciences nat. de la soc. philomat. n. 6. p. 40.
- Chen, Y., Li, D. and Lu, W., 2003. Screening and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of *Haeamatococcus pluvialis*, *Biotechnology Letters*, 25: 527-529.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294–306.
- Cirik, S. ve Gökpinar, Ş. 1993. Plankton bilgisi ve kültürü, Ege Üniversitesi Yayınları, 47, İzmir, 274.
- Cordero, B., Otero, A., Patiño, M., Arredondo, B. O., & Fabregas, J. 1996. Astaxanthin production from the green alga *H. pluvialis* with different stress conditions. *Biotechnology Letters*, 18(2), 213-218.
- Coutteau, P. 1996. Micro-algae. In: Lavens, P. & Sorgeloos, P. (Eds.). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 361. FAO, Rome, 7-48pp.
- Çokcan, C. 2015. *H. pluvialis* Alginden Astaksantin Üretimi. (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Demir, S. Demir, E. A. & Aliyazıcıoğlu, Y. 2020. Selective Cytotoxic Effect of Astaxanthin on Human Lung and Colon Cancer Cells. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(6), 1489-1494.
- Dominguez-Bocanegra, A.R., Guerrero Lagarreta, I., Martinez Jeronimo, F. and Tomasini Compocosio, F. 2004. Influence of environmental and nutiritional

- factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technol.*, 92: 209–214. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.04.001.
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Vicente, A. A. & Teixeira, J. A. (2010). Third generation biofuels from microalgae.
- Droop, M. R. 1954. Conditions governing haematochrome formation and loss in the alga *H. pluvialis* Flotow. *Archiv für Mikrobiologie*, 20(4), 391-397.
- Droop, M. R. (1955). Carotenogenesis in *H. pluvialis*. *Nature*, 175(4444), 42-42.
- Droop, M. R. (1961). *H. pluvialis* and its allies; III: organic nutrition. *Rev. Algologique*, 4, 247-259.
- Duru, M. D. & Yılmaz, H. K. 2013. Mikroalglerin pigment kaynağı olarak balık yemlerinde kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 112-118.
- Elwinger, K., Lignell, A. and Wilhelmson, M. 1997. Astaxanthin rich algal meal (*Haematococcus pluvialis*) as carotenoid source in feed for laying hens, in: Proceedings of the VII European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Poznan, Poland, pp. 52-59.
- Fabregas, J., Dominguez, A., and Regueiro, M. 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*, *Appl. Microbiol Biotechnol*, 53: 530-535.
- Fan, L., Vonshak, A., & Boussiba, S. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *H. pluvialis* (chlorophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 30(5), 829-833.
- Fan, L., Vonshak, A., Gabbay, R., Hirshberg, I., Cohen, Z. and Boussiba, S. 1995. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *H. pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. *Plant Cell Physiol* 36(8): 1519-1524
- FAO. 2021c. Fishery and Aquaculture Statistics. Global Production Statistics 1950–2019. In: FAO Fisheries Division [online]. FishStaJ – Software for Fishery and Aquaculture Statistical Time Series.
<https://www.fao.org/fishery/en/statistics/software/fishstatj/en>
- Flotow, J. V. 1844. Beobachtungen über *H. pluvialis*. Verhandlungen der Kaiserlichen Leopoldinisch-Carolinischen Deutschen Akademie der Naturforscher, 20, 413-606.
- Fraser, P. D., Miura, Y. & Misawa, N. 1997. In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6128-6135.
- Furr, H. C. & Clark, R. M. 1997. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8(7), 364-377.
- Genitsaris, S., STEFANIDOU, N., Katsiapi, M., Vardaka, E., Kormas, K. A., Sommer, U., & Moustaka-Gouni, M. 2016. *H. pluvialis*: a successful air-dispersed colonist in ephemeral waters is rarely found in phytoplankton communities. *Turkish Journal of Botany*, 40(4), 427-438.
- Goksan, T., Ak, İ. & Gokpınar, S. 2010. An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *H. pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(9), 1276-1282.

- Goldman, J.C. 1979. Outdoor algal mass cultures-I. Applications. *Water Res.* 13: 1–18.
- Goodwin, T. W. & Jamikorn, M. 1954. Studies in carotenogenesis. 11. Carotenoid synthesis in the alga *H. pluvialis*. *Biochemical Journal*, 57(3), 376.
- Gökpınar, Ş., Göksan, T. & Durmaz, Y. 2001. PUFA kaynağı olarak mikroalgler, XI. Ulusal Balıkçılık Bilim Sempozyumu, Hatay, Türkiye: Bildiriler Kitabı.
- Gökpınar, Ş., Işık. O., Göksan, T., Durmaz, Y., Uslu. L., Ak. B., Önalın. K.S. & AKDOĞAN, P. 2013. Algal biyoteknoloji çalışmaları. *Aquaculture Studies*, 2013(4).
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., & Durmaz, Y. 2006. Algal Antioksidanlar. *Su Ürünleri Dergisi*, 23(1), 85-89.
- Grewe, C. & Griehl, C. 2008. Time-and media-dependent secondary carotenoid accumulation in *H. pluvialis*. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 3(9-10), 1232-1244.
- Guerin, M., Huntley, M. E. & Olaizola, M. 2003. *H. pluvialis* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *TRENDS in Biotechnology*, 21(5), 210-216.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2022. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 23 Mayıs 2022
- Hagen, C., Bornman, J. F., & Braune, W. 1992. Reversible lowering of modulated chlorophyll fluorescence after saturating flashes in *Haematococcus lacustris* (Volvocales) at room temperature. *Physiologia Plantarum*, 86(4), 593-599.
- Hagen, C., Grünwald, K. ve Rothe, E. 2001. “Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*”, *Journal of Applied Phycology*, 13: 79-87.
- Harker, M., Tsavalos, A. J., & Young, A. J. 1996. Autotrophic growth and carotenoid production of *H. pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(2), 113-118.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J. gerontol*, 11(3), 288-300.
- Hata, N., Ogbonna, J. ve Hasegawa, Y. 2001. “Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture”, *Journal of Applied Phycology*, 13: 395-402.
- Hazen, T. E. 1899. The life history of *Sphaerella lacustris* (*H. pluvialis*). *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, 6(3), 211-246.
- Herrero, C., Orosa García, M., Abalde, J., Rioboo, C. & Cid, Á. 2012. Astaxanthin production in cysts and vegetative cells of the microalga *H. pluvialis* Flotow.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L. & Goycoolea, F. M. 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(2), 185-196.
- Hilmi, Ş. 1994. Oksidanlar ve antioksidanlar. *Türk Hastane Tıp Dergisi*, 48(1-2), 44-9.
- Hoppe, H. A., Levring, T., & Tanaka, Y. (Eds.).(1979. Marine algae in pharmaceutical

- science (Vol. 1, pp. 25-119). Berlin, New York: de Gruyter.
- https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27370
- Imamoglu, E., Dalay, M. C. & Sukan, F. V. 2009. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New biotechnology*, 26(3-4), 199-204.
- Imamoglu, E., Sukan, F. V. & Dalay, M. C. 2007. Effect of different culture media and light intensities on growth of *H. pluvialis*. *International Journal of Natural & Engineering Sciences*, 1(3).
- Inbarr, J. 1998, *Haematococcus*, The poultry pigmentor, *Feed Mix.*, 6: 31-34.
- Ip, P. F. & Chen, F. 2005. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochemistry*, 40(2), 733-738.
- Kaba, N. & Çağlak, E. 2006. Deniz Alglerinin İnsan Beslenmesinde Kullanılması. *Su Ürünleri Dergisi*, 23(2), 243-246.
- Kang, C. D., Lee, J. S., Park, T. H. & Sim, S. J. 2005. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(2), 237-241.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N. & Nagai, S. 1992. Growth and astaxanthin formation of *H. pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *Journal of fermentation and Bioengineering*, 74(1), 17-20.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., and Kakizono, T. 1997. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84: 94-97.
- Köksal, M. 2008. Farklı Ortam Koşullarının (Işık, Sıcaklık, Besin Eksikliği ve Havalandırma) *Haematococcus pluvialis* Flotow'da Büyüme ve Astaksantin Miktarlarına Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Köksal, M., Isik, O., Uslu, L. & Mutlu, Y. 2012. Isık, Sıcaklık, Besin Eksikliği Ve Havalandırmanın *H. pluvialis* Flotow'da Büyüme Ve Astaksantin Miktarına Etkisi. *Journal of FisheriesSciences. com*, 6(4), 297.
- Lee, Y. K. 2001. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *Journal of applied phycology*, 13(4), 307-315.
- Lekang, O. I. 2007. Aquaculture engineering. Blackwell Pub.
- López, M. G. M., Sánchez, E. D. R., López, J. C., Fernández, F. A., Sevilla, J. F., Rivas, J. & Grima, E. M. 2006. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *Journal of biotechnology*, 123(3), 329-342.
- Lorenz, R. T. 1999. A technical review of *H. pluvialis* algae. *NatuRose™ Technical Bulletin*, 60, 1-12.
- Lu, Y., Jiang, P., Liu, S., Gan, Q., Cui, H., & Qin, S. 2010. Methyl jasmonate-or gibberellins A3-induced astaxanthin accumulation is associated with up-regulation of transcription of β -carotene ketolase genes (bkts) in microalga *H.*

- pluvialis*. *Bioresource Technology*, 101(16), 6468-6474.
- Luca, G. 2014. Computational Fluid Dynamics analysis of photobioreactors: a numerical model to assess the effects of light-dark cycles on *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella sorokiniana* cultures (Doctoral dissertation, 神戸大学).
- Mascia, F., Girolomoni, L., Alcocer, M. J., Bargigia, I., Perozeni, F., Cazzaniga, S., ... & Ballottari, M. 2017. Functional analysis of photosynthetic pigment binding complexes in the green alga *H. pluvialis* reveals distribution of astaxanthin in Photosystems. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids, *Pure Appl. Chem.*, 63: 141-146.
- Moreno-Garcia, L., Adjallé, K., Barnabé, S., & Raghavan, G. S. V. 2017. Microalgae biomass production for a biorefinery system: recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 493-506.
- Naguib, Y. 2000, Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids, *J. Agric. Chem.*, 48: 1150-1154.
- Noroozi, M., Omar, H., Napis, S., Hejazi, M. A., & Tan, S. G. 2012. Comparative biodiversity and effect of different media on growth and astaxanthin content of nine geographical strains of *H. pluvialis*. *African Journal of Biotechnology*, 11(84), 15049-15059.
- O'Connor, I. and O'Brien, N. 1998. Modulation of U.V-A light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts, *J. Derm. Sci.*, 16: 226-230.
- Olaizola, M. 2000. Commercial production of astaxanthin from *H. pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 12(3), 499-506.
- Olaizola, M. & Huntley, M. E. 2003. Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. *Biomaterials and bioprocessing*, 9, 143-164.
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. & Abalde, J. 2001. Carotenoid accumulation in *H. pluvialis* in mixotrophic growth. *Biotechnology letters*, 23(5), 373-378.
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. & Abalde, J. J. B. T. 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *H. pluvialis*. *Bioresource technology*, 96(3), 373-378.
- Østerlie, M., Bjerkeng, B. & Liaaen-Jensen, S. 2000. Plasma appearance and distribution of astaxanthin E/Z and R/S isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. *The Journal of nutritional biochemistry*, 11(10), 482-490.
- Pirinç, P. 2014. Bazı Deniz Mikroalglerinin (*Nannochloropsis Oculata*, *Tetraselmis Chuii*, *Chlorella* Sp. ve *Dunaliella Salina*) Kültüründe Işık ve Tuzluluk Konsantrasyonunun Büyüme ve Biyokimyasal Yapısına Etkisinin Araştırılması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İzmir.
- Pringsheim, E.G. 1966. Nutritional requirements of *Haematococcus pluvialis* and related species. *J. Phycol.* 2, 1-7.

- Proctor, V. W. 1957. Some controlling factors in the distribution of *H. pluvialis*. *Ecology*, 38(3), 457-462.
- Rather, A. H. & Singh, S. 2018. Green Alga *Haematococcus Pluvialis* a Potential Source of Pharmaceutical Valuable Astaxanthin. *Open Access Journal of Microbiology & Biotechnology*. ISSN: 2576-7771
- Rather, A. H., Singh, S., Rao, R. & Choudhary, S. 2020. *H. pluvialis* Astaxanthin and Its Applications. *ADVANCES IN*, 23.
- Richmond, A. & Hu, Q. 2013. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. John Wiley & Sons.
- Richmond, A. 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personel view, *Journal of Applied Phycology*, 12: 441-451
- Santos, M.F. and Mesquita J.F. 1984. Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod) Rostafinski (Volvocales). 1. Some aspects of carotenogenesis, *Cytologia*, 49: 215-228.
- Say, A. N., Keriş, Ü. D., Şen, Ü. & Gürol, M. D. 2010. Mikroalglerden biyokütle enerjisi üretimi ve Türkiye, VIII. *Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, UTES*, 10, 1-5.
- Shah, M., M., R., Liang Y, Cheng, J., Jç and Daroch, M. 2016. Astaxanthin-Producing Green Microalga *H. pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Front. Plant Sci.* 7:531. doi: 10.3389/fpls.2016.00531
- Souza, R. L. M., Viana, W. K. R., Moreira, M. S. M., Soares Filho, A. A., Lisboa, V., Vidigal, R. C. D. A. B., ... & Matias, J. F. N. 2020. Technological innovations in the cultivation of *H. pluvialis* microalgae. *Sistemas & Gestão*, 15(3), 223-234.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. C. B. G. & Cohen-Bazire, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological reviews*, 35(2), 171-205.
- Sukatar, A. & Şenkardeşler, A. 2001. Possibilities of Macroalgae Culture in Turkey and the Culture of *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18 (1), Retrieved from <http://www.egejfas.org/tr/pub/issue/5027/68419>.
- Sukatar, A. 2002. Alg kültür yöntemleri, Ege Üniversitesi Yayınları, 184, İzmir, 168.
- SÜK, 2022. Su Ürünleri Kanunu ⁽¹⁾⁽²⁾. <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=1380&MevzuatTur=1&MevzuatTertip=5>. [Son erişim tarihi: 22.05.2022].
- SÜYY, 2022. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Yönetmeliği ⁽¹⁾⁽²⁾. <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=5217&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5>. [Son erişim tarihi: 22.05.2022]
- Tan, S., Cunningham, F.X., and Youmans, M. 1995. Cytochrome f loss in astaxanthin accumulating red cells of *Haematococcus pluvialis*, Comparison of photosynthetic activity and photosynthetic enzymes in red and green cells, *J. Phycol*, 31: 897-905.
- Tanaka, T., Makita, H., and Ohnishi, M. 1995. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and cantaxanthin,

- Cancer Res., 55: 4059-4064.
- Tee, E. S. & Lee, C. Y. 1992. Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 31(1-2), 103-163.
- Tischer, J. 1944. Carotenoids of fresh water algae. 9. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*, 281, 143-155.
- Torres-carvajal, L. K., González-Delgado, Á. D., Barajas-Solano, A. F., Suarez-Gelvez, J. H. & Urbina-Suarez, N. A. 2017. Astaxanthin Production from *H. pluvialis*: Effects of Light Wavelength and Salinity, *Contemporary Engineering Sciences*, 10 (2017), 1739–1746.
- Torrissen, O.J. and Christiansen, R. 1995. Requirements for carotenoids in fish diets, *J. Appl. Ichtiol.*, 11: 225-230.
- Triki, A., Maillard, P. & Gudin, C. 1997. Gametogenesis in *H. pluvialis* Flotow (Volvocales, Chlorophyta). *Phycologia*, 36(3), 190-194.
- Tripathi, U., Sarada, R., Rao, S. R. & Ravishankar, G. A. 1999. Production of astaxanthin in *H. pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*, 68(2), 197-199.
- Utting, S.D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacult. Engin.*, 4: 175-190pp
- Vonshak, A., and Torzillo, G. 2003. International workshop and training course on photobioreactors, Ebiltem Yayınları, İzmir, 66.
- Wang, J., Han, D., Sommerfeld, M. R., Lu, C. & Hu, Q. 2013. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *H. pluvialis* in an outdoor photobioreactor. *Journal of applied phycology*, 25(1), 253-260.
- Yeşilayer, N., Doğan, G., & Erdem, M. 2008. Balık Yemlerinde Doğal Karotenoid Kaynaklarının Kullanımı. *Journal of FisheriesSciences. com*, 2(3), 241-251.
- Yong, Y. Y. R., & Lee, Y. K. 1991. Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)? *Phycologia*, 30(3), 257-261.
- Zhang, B. Y., Geng, Y. H., Li, Z. K., Hu, H. J., & Li, Y. G. (2009). Production of astaxanthin from *H. pluvialis* in open pond by two-stage growth one-step process. *Aquaculture*, 295(3-4), 275-281. [Son erişim tarihi: 22.05.2022].
- Zlotnik, I.S., Sukenik, A., and Dubinsky, Z., 1993, Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in *Haematococcus pluvialis*, *J. Phycol.*, 29: 463-469.

ÖZGEÇMİŞ

SERKAN TEKER

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2016-2022	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği ABD, Antalya
Yüksek Lisans 2013-2016	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği ABD, Antalya
Lisans 2006-2010	Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi, Kamu Yönetimi Bölümü, Eskişehir

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Gökoğlu, M., Teker, S., Julian, D. (2016). “Antik Kent Phaselis’in Bazı Bentik Indo-Pasifik Türleri”. *Phaselis* II 225-233. DOI: 10.18367/Pha.16015.

2- T. Daılanı, O. Akyol, N. Babalı, M. Bariche, F. Crocetta, V. Gerovasileiou, R. Ghanem, M. Gökoğlu, T. Hasıotı, A. Izquierdo-muñoz, D. Julian, S. Katsanevakis, I. Lipej, E. Mancını, Ch. Mytilineou, K. Ounıfı ben Amor, A. Özgöl, M. Ragkousı, E. Rubio-Portillo, G. Servello, M. Sını, C. Stamouli, A. Steriotı, S. Teker, F. Tiralongo and D. Trkov. (2016). "New Mediterranean Biodiversity Records (July 2016). " *Mediterranean Marine Science*” 17.2 / 608-626.

- 3- Gökoğlu, M., Korun, J., Teker, S., Julian, D. (2017). "Phaselis Antik Kenti Egzotik Bivalvia Türleri". *Phaselis III* (2017) 61-71. DOI: 10.18367/pha.17003.
- 4- Teker, S., Gökoğlu, M., Julian, D. (2017). First Record of *Janthina globosa* Swainson, 1822 (Mollusca, Gastropoda) and *Prostheceraeus giesbrechtii* Lang, 1884 (Platyhelminthes) in the Gulf of Antalya. *NEsciences*, 2017, 2 (1): 6-10.
- 5- Gökoğlu, M., Teker, S., Julian D. (2017). First report of thresher sharks (Alopiidae) in the Gulf of Antalya. *IJFS*. 2017; 16 (3) :1108-1113
- 6- Gokoglu, M., Teker, S., Julian, D. (2017). Westward Extension of the Lionfish *Pterois volitans* Linnaeus, 1758 along the Mediterranean Coast of Turkey. *Natural and Engineering Sciences*, 2(2), 67-72.
- 7- Gökoğlu, M., S. Teker, "Phaselis Antik Kenti Kuzey Limanı'nda Bir Boz Camgöz (*Hexanchus griseus* Bonnaterre, 1788)". *Phaselis IV* (2018) 79-83. <http://dx.doi.org/10.18367/Pha.18005>
- 8- Teker, S., Gökoğlu, M., & Korun, J. (2018). Antalya Körfezi'nde Nadir Bir Balon Balığı Türü; Mavi Balon Balığı *Lagocephalus lagocephalus* (Linnaeus, 1758). *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 14(3), 215-219.
- 9- Gökoğlu, M., & Teker, S. (2018). Spread of the arrow bulleye *Priacanthus sagittarius* Starnes, 1988 in the Mediterranean Sea. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 5(1), 1-3.
- 10- Gökoğlu, M., Teker, S., ve Gökoğlu, K. (2018). Phaselis Antik Kenti Kıyılarında Akdeniz'de nadir görülen Kaplumbağa Salyangozu (*Pleurobranchus testudinarius* Cantraine, 1835).
- 11- Gökoglu, M., Teker, S., & Korun, J. (2018). Occurrence of the exotic shell-bearing *Bulla ampulla*, Linnaeus, 1758 (Mollusca, Gastropoda) in the Gulf of Antalya. *Natural and Engineering Sciences*, 3(3), 255-258.
- 12- Gökoğlu, M., Teker, S., Korun, J., & Gökoğlu, K. Phaselis Kenti Kıyısında Leseptsiyan Bir Opisthobranch (*Plocamopherus ocellatus* Rüppell & Leuckart, 1828).
- 13- Gökoğlu, M., Teker, S., & Gökoğlu, K. (2019). The first record of the mole crab (*Albunea carabus* L. 1758, Decapoda, Anomura, Hippidea) in the Gulf of Antalya. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 6(1), 7-8.

14- Kousteni, V., Bakiu, R., Benhmida, A., Crocetta, F., Di Martino, V., Dogrammatzi, A., ... & Trkov, D. (2019). New Mediterranean biodiversity records (April, 2019).

15- Teker, M., Gökoğlu, K., & Gökoğlu, M. Phaselis' in Denizel Biyoçeşitliliğine Leopar Müren'in (Enchelycore anatina Lowe, 1838) İlavesi.

16- Gökoğlu, M., Biçer, E., Korun, J., Gökoğlu, K., & Teker, S. (2020). The occurrence of the Atlantic species *Pisodonophis semicinctus* (Osteichthyes: Ophichthidae) in the Gulf of Antalya, Turkey. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 7(1), 37-39.

17- Gokoglu, M., Teker, S., & Korun, J. (2020). Infestation rate and impacts of *Epipenaeon ingens* on growth and reproduction of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 7(1), 50-53.

18- Korun, J., Altan, E., Teker, S., & Ulutaş, A. (2021). A study on the antimicrobial resistance of *Lactococcus garvieae*. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 8(1), 23-30.

19- Gökoğlu, M., Teker, S., & Korun, J. (2021). Occurrence of the *Histioteuthis reversa* (Verrill 1880), (Cephalopoda/Histioteuthidae) in the Gulf of Mersin/Turkey. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 8(2), 109-111.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Gokoglu M. and Teker S.(2015). Biodiversity: New egzotic fish species in the Gulf of Antalya.VI. International Scientific Agricultural Symposium. Jahorina. 15-18 October 2015. Bosnia & Herzegovina.

2- Gokoglu M. and Teker S.(2016). First Record of *Parupeneus forsskali* and Second Location Records of Knight Rock Shrimp, *Sicyonia lancifer* (Olivier, 1811) (Decapoda: Sicyoniidae) in the Gulf of Antalya. 27th International Scientific-Expert Congress Of Agriculture And Food Industry. 26-28 September 2016, Bursa Turkey.

3- Gökoğlu M., Teker S., Korun J., Julian, D. (2017). Infestation Rate And Impacts Of *Epipenaeon ingens* On Growth And Reproduction Of Brown Shrimp (*Farfantepenaeus aztecus*). The International Symposium On Animal Science (Isas) 2017.05-10.06.2017. Herceg Novi, Montenegro.

4- Teker, M.S., Gökoğlu, M., Teker, S. (2017). Mürekkepbalığı (*Sepia officinalis* Linnaeus, 1758) (Mollusca: Cephalopoda) mürekkebinin boyar madde kaynağı olarak değerlendirilmesi. II.Uluslararası Doğal Boya Sempozyumu.Antalya-Turkey.

5- Teker S. and Gokoglu M. ((2017). Detection of Members of Tetraodontidae and Ostracidae Family in the Gulf Of Antalya. International Symposium of Pufferfish. 13-14 October 2017. Bodrum, Turkey.

6- Teker S. and Gokoglu M. (2017). Antik Phaselis Gölü'nün Dünyü Bugünü ve Akdeniz Ekosistemine Etkileri. II. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliğı Kongresi. 13 - 14 Aralık 2017, Antalya.

7- Gokoglu M. and Teker S. (2017). Turizm Amaçlı Gezi Teknelerinden Gelişigüzel Atılan Çapa ve Zincirlerin Deniz Çayırlarına Olan Etkileri. II. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliğı Kongresi. 13 - 14 Aralık 2017, Antalya.

