



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**ALTERNATİF BİR ASTAKSANTİN ÜRETİCİSİ
OLARAK
Chlamydomonas nivalis' in ÜRETİM SÜRECİ
VE
ASTAKSANTİN POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Şerife Dilara ÇETMİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**ALTERNATİF BİR ASTAKSANTİN ÜRETİCİSİ
OLARAK
Chlamydomonas nivalis'in ÜRETİM SÜRECİ
VE
ASTAKSANTİN POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

Şerife Dilara ÇETMİ

Danışman : Doç.Dr. Suphi Ş.ÖNCEL

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

Şerife Dilara ÇETMİ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Alternatif bir astaksantin üreticisi olarak *Chlamydomonas nivalis*’in üretim süreci ve astaksantin potansiyelinin incelenmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’ nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 26.08.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

Raportör Üye : Doç. Dr. Sayıt SARGIN

Üye : Doç. Dr. Ali Oğuz BÜYÜKKİLECI

İmza


.....

.....

.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Alternatif bir astaksantin üreticisi olarak *Chlamydomonas nivalis*'in üretim süreci ve astaksantin potansiyelinin incelenmesi ” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26/08/2019

İmzası



Şerife Dilara ÇETMİ

ÖZET**ALTERNATİF BİR ASTAKSANTİN ÜRETİCİSİ OLARAK*****Chlamydomonas nivalis*'in ÜRETİM SÜRECİ****VE****ASTAKSANTİN POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

ÇETMİ, Şerife Dilara

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

Ağustos 2019, 74 sayfa

Endüstriyel alanda en çok üretimi yapılan karotenoit çeşitlerinden biri olan doğal astaksantin birincil üreticisi konumundaki mikroalgler, içerdiği diğer pek çok metabolit sayesinde enerji, farmasötik, kozmesötik, nutrasötik, atık su arıtımı gibi alanlarda sıklıkla kullanılan mikroorganizmalardır. Bu tezde ılıman iklim kuşağında yaygın kullanılan türler dışında düşük sıcaklıkta yaşayabilen *Chlamydomonas nivalis*'in farklı stres koşullarında ve fotobiyoreaktörlerde kültivasyonu ile astaksantin alternatif üreticisi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Aksenik olarak UTEX kültür koleksiyonundan alınan ekstremofilik yeşil mikroalg *Chlamydomonas nivalis*'in üretimindeki stres faktörlerinin belirlenmesi amacıyla kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde farklı sıcaklık, besin ortamı ve ışık şiddetleri kullanılarak hücre sayısı ve yoğunluğu, kuru ağırlık, pH, sıcaklık, fotosentetik aktivite, klorofil ve karotenoit miktarları takip edilmiş ve astaksantin içeriğinin belirlenmesi için HPLC analizi yapılmıştır. Petri ve laboratuvar tüplerinde küçük ölçekteki kültivasyonundan 5L'lik panel, tübüler ve karıştırılmalı tank fotobiyoreaktörlerdeki üretimine kadar ölçek büyütmesi yapılarak üretimde fotobiyoreaktör çeşidinin etkisi araştırılmıştır. *Chlamydomonas nivalis*'in 28°C'ye kadar sıcaklığı tolere edebildiği ve kırmızı kistik form gözlenmesi de HPLC sonuçlarına göre astaksantin üretimi en fazla BBM besin ortamı içeren kabarcık kolon fotobiyoreaktörde 0.137 mg/g olarak elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Chlamydomonas nivalis*, astaksantin, fotobiyoreaktör, mikroalg, ekstremofilik.



ABSTRACT**PRODUCTION PROCESS OF AN ALTERNATIVE ASTAXANTHIN PRODUCER *Chlamydomonas nivalis* AND INVESTIGATION OF ITS ASTAXANTHIN POTENTIAL**

CETMI, Serife Dilara

MSc. in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Suphi S. ONCEL

August 2019, 74 pages

Microalgae, which is the primary producer of natural astaxanthin, which is one of the most produced carotenoids in the industrial field, is a microorganism frequently used in energy, pharmaceutical, cosmeceutical, nutraceutical and waste water treatment fields thanks to its many other metabolites. In this thesis, it has been investigated that *Chlamydomonas nivalis*, which can live at low temperatures except cultivated species in temperate climate zone, can be used as an alternative producer of astaxanthin by cultivation in different stress conditions and photobioreactors. In order to determine the stress factors in the production of extremophilic green microalgae *Chlamydomonas nivalis*, which was purchased from UTEX culture collection as axenic, the cell number and density, dry weight, pH, temperature, photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid amounts in bubble column photobioreactors had analyze with using different temperature, nutrient media and light intensities, and HPLC analysis was performed to determine the astaxanthin content. Effect of photobioreactor type to biomass production was investigated by scaled-up from small scale cultivation by petri and laboratory tubes to 5L of panel, tubular and stirred tank photobioreactors. Although no red cystic form was observed *Chlamydomonas nivalis* was able to tolerate temperatures up to 28°C and, astaxanthin production was determined highest as 0.137 mg/g in bubble column photobioreactor with content BBM nutrient medium.

Keywords: *Chlamydomonas nivalis*, astaxanthin, photobioreactor, microalgae, extremophilic.

ÖNSÖZ

Biyomühendislikteki ilk laboratuvar deneyimimde tanıştığım ve bitirme tezime de konu olan mikroalgler, yüksek lisans eğitimimde de üzerine ayrıntılı çalışmak istediğim bir konu olmuştur. Astaksantin gibi çok güçlü bir antioksidanı ürettiği bilinen *Chlamydomonas nivalis*'in kriyofilik bir mikroalg türü olması nedeniyle ılıman iklimde ticari anlamda yetiştirilen diğer türlere soğuk iklimdeki alternatifi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Hakkında biyoproses üretimi üzerine araştırma bulunmaması bu türe olan ilgimi arttırmıştır. Kültür koleksiyonundan tedarik edilmesinde ve sonrasında sıcaklık kaynaklı adaptasyon sorunları, çalışmanın başlarında uzun zaman gerektirmiştir. Ancak petriden fotobiyoreaktörlere kadar artan hacimde üretimin yapılabilmiş olması çalışmanın istenilen sonuca vardığının bir işaretidir. HPLC analizleri ile nicel olarak astaksantin üretiminin sağlandığının gösterilmesi yeterli olsa da asıl beklenen diğer astaksantin üreticilerinde olduğu gibi nitel olarak kırmızı kistik formlu hücrelerin oluşmasıydı. Tez kapsamındaki tüm parametreler, ilerleyen çalışmalarda bu sonuca ulaşılabilmesi için öncül bir çalışma olarak gösterilebilir ve ileriki çalışmalara da fikir verebilir.

İZMİR

26/08/2019

Şerife Dilara ÇETMİ



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
TABLolar DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Mikroalgler	3
2.1.1.Mikroalglerden elde edilen metabolitler.....	3
2.2.Ekstremofilikler	4
2.2.1.Ekstremofilik mikroalgler.....	6
2.2.2.Karda yaşam	7
2.2.3. <i>Chlamydomonas nivalis</i> 'in genel özellikleri	8
2.3.Mikroalglerin Medikal Alanda Kullanımı	12
2.3.1.Doğal antioksidanlar	12
2.3.2.Astaksantin	13
2.4.Mikroalg Üretim Sistemleri	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1.Mikroalg Kültürü	22
3.2.Kimyasal Malzemeler	22
3.3.Besin Ortamları.....	23
3.3.1.Bold's Basal ortamı	23
3.3.2.Bold 1NV ortamı	23
3.3.3.Bold 3N ortamı	24
3.3.4.Modifiye Bold 3N ortamı	24
3.3.5.Besi ortamlarında kullanılan diğer çözeltiler.....	25
3.4.Kullanılan Cihazlar	27
3.5.Stok Kültürlerin Hazırlanması	27
3.6.Erlenmayerde <i>C. nivalis</i> Üretimi	28
3.7.Kabarcık Kolon Fotobiyoreaktörlerde <i>C. nivalis</i> Üretimi	28

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.7.1.Farklı sıcaklıklarda <i>C.nivalis</i> 'in üretimi	29
3.7.2. Farklı besin ortamlarında <i>C. nivalis</i> 'in üretimi	29
3.7.3.Farklı ışık şiddetlerinde <i>C.nivalis</i> 'in üretimi	30
3.8.Farklı Fotobiyoreaktörlerde <i>C. nivalis</i> 'in Üretimi	31
3.9.Küçük Ölçekte Stres Denemeleri	32
3.9.1.Petride ışık ve soğuk stresi denemesi	32
3.9.2.Deney tüpünde besin stresi denemesi	33
3.9.3.Spot ışıkta stres denemesi	34
3.10.Analizler	35
3.10.1.Fotosentetik aktivite (Floresans ölçümleri)	35
3.10.2.Hücre yoğunluğunun spektrofotometrik olarak belirlenmesi	35
3.10.3.Kuru biyokütle tayini	35
3.10.4.Hücre sayısı	35
3.10.5.pH ve sıcaklık	35
3.10.6.Toplam klorofil ve karotenoit tayini	36
3.10.7.HPLC analizi	36
4. BULGULAR	39
4.1.Erlenmayerde <i>C. nivalis</i> Üretimi Analizi	39
4.2.Kabarcık Kolon Fotobiyoreaktörlerde <i>C. nivalis</i> Üretimi Analizi	42
4.2.1.Farklı sıcaklıkların <i>C. nivalis</i> 'in üretimine etkisi	45
4.2.2.Farklı besin ortamlarının <i>C. nivalis</i> 'in üretimine etkisi	48
4.2.3.Farklı ışık şiddetlerinin <i>C. nivalis</i> 'in üretimine etkisi	51
4.3.Farklı Fotobiyoreaktörlerin <i>C. nivalis</i> 'in üretimine etkisi	53
4.4.Küçük Ölçekte Yapılan Stres Denemelerinin <i>C. nivalis</i> Üretimine Etkisi	56
4.4.1.Petride ışık ve soğuk stresi denemesi sonuçları	56
4.4.2.Deney tüpünde besin stresi denemesi	57
4.4.3.Spot ışıkta stres denemesi sonuçları	58
4.5.Üretimlerin Karotenoit İçeriklerinin HPLC'deki Sonuçları	59
5.TARTIŞMA	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR DİZİNİ	65
TEŞEKKÜR	73

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ..... 74





ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1	UTEX LB 2824 <i>Chlamydomonas nivalis</i> vejetatif formunun mikroskopik görünümü.....10
2.2	Kistik haldeki <i>C. nivalis</i> 'in mikroskopik görünümüleri. a) hücre duvarı müsilaj tabaka ile çevrili, b) hücre duvarı düzgün, c) inorganik materyaller ile çevrili. bar: 10 µm11
2.3	β-karoten ve astaksantin moleküler gösterimi.....14
2.4	Mikroalgal astaksantin sentezi16
2.5	Astaksantin çeşitli organizmalarda üretim şekli.....17
2.6	Işık şiddetine göre violaksantin-zeaksantin dönüşümü18
2.7	Başlıca fotobiyoreaktör tasarımları a) Panel, b) Tübüler, c) KT FBR19
3.1	<i>C. nivalis</i> UTEX 2824 stok agar kültürü27
3.2	<i>C. nivalis</i> sıvı tüpteki stok kültürü.....28
3.3	<i>C. nivalis</i> erlendeki sıcaklık denemesi a) 5°C, b) 10°C ve c) 20°C28
3.4	KK FBR'de <i>C. nivalis</i> a) 5°C ve 10°C, b) 20°C29
3.5	KK FBR'de <i>C. nivalis</i> besin ortamı denemesi30
3.6	KK FBR'de <i>C. nivalis</i> ışık şiddeti denemesi.....31
3.7	Farklı fotobiyoreaktörlerde <i>C. nivalis</i> 'in üretimi. Soldan sağa doğru: Panel, Tübüler, KT FBR.....32
3.8	Petride ışık ve soğuk stresi denemesi32
3.9	Sıvı tüpte besin stresi 1. denemenin fotoğrafı t0 anı33
3.10	Deney tüplerinde besin stresi 2. deneme (t0 anı): 1. tüp kontrol Bold 1NV, 2. tüp vitaminsiz Bold 1NV, 3. tüp %50 su %50 Bold 1NV, 4. tüp %90 su %10 Bold 1NV, 5. tüp %1 NaCl içeren Bold 1NV, 6. tüp %0.5 NaCl içeren Bold 1NV, 7. tüp %1 NaCl içeren vitaminsiz Bold 1NV, 8. tüp %0.5 NaCl içeren vitaminsiz Bold 1NV34
3.11	Spot ışıkta stres denemesi: a) yüksek ışık, b) 15°C, c) spot ışıktan 1 m uzaklıktaki 16:8 a:k döngüde.....34
4.1	Farklı sıcaklıklarda <i>C. nivalis</i> erlen kültürü pH grafiği.....39
4.2	Farklı sıcaklıklarda <i>C. nivalis</i> erlen kültürü hücre yoğunluğu grafiği.....39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.3	Farklı sıcaklıklarda <i>C. nivalis</i> erlen kültürü hücre sayısı grafiği 40
4.4	Farklı sıcaklıklarda <i>C. nivalis</i> erlen kültürü fotosentetik aktivite grafiği..... 40
4.5	Farklı sıcaklıklarda <i>C. nivalis</i> erlen kültürü toplam klorofil miktar grafiği 41
4.6	Farklı sıcaklıklarda <i>C. nivalis</i> erlen kültürü toplam karotenoit miktar grafiği..... 41
4.7	KK FBR’de <i>C. nivalis</i> üretimi pH grafiği..... 42
4.8	KK FBR’de <i>C. nivalis</i> üretimi hücre sayısı grafiği 43
4.9	KK FBR’de <i>C. nivalis</i> üretimi hücre yoğunluğu grafiği 43
4.10	KK FBR’de <i>C. nivalis</i> üretimi fotosentetik aktivite grafiği..... 44
4.11	KK FBR’de <i>C. nivalis</i> üretimi toplam klorofil miktar grafiği 44
4.12	KK FBR’de <i>C. nivalis</i> üretimi toplam karotenoit miktar grafiği..... 45
4.13	KK FBR’de sıcaklık denemesi pH grafiği 45
4.14	KK FBR’de sıcaklık denemesi hücre yoğunluğu grafiği..... 46
4.15	KK FBR’de sıcaklık denemesi hücre sayısı grafiği..... 46
4.16	KK FBR’de sıcaklık denemesi fotosentetik aktivite grafiği 47
4.17	KK FBR’de sıcaklık denemesi toplam klorofil miktar grafiği 47
4.18	KK FBR’de sıcaklık denemesi toplam karotenoit miktar grafiği 48
4.19	KK FBR’de besin ortamı denemesi pH grafiği 48
4.20	KK FBR’de besin ortamı denemesi hücre sayısı grafiği 49
4.21	KK FBR’de besin ortamı denemesi hücre yoğunluğu grafiği 49
4.22	KK FBR’de besin ortamı denemesi fotosentetik aktivite grafiği 50
4.23	KK FBR’de besin ortamı denemesi toplam klorofil miktar grafiği..... 50
4.24	KK FBR’de besin ortamı denemesi toplam karotenoit miktar grafiği... 50
4.25	KK FBR’de ışık şiddeti denemesi pH grafiği 51
4.26	KK FBR’de ışık şiddeti denemesi hücre sayısı grafiği..... 51
4.27	KK FBR’de ışık şiddeti denemesi hücre yoğunluğu grafiği..... 52
4.28	KK FBR’de ışık şiddeti denemesi fotosentetik aktivite grafiği 52
4.29	KK FBR’de ışık şiddeti denemesi toplam klorofil miktar grafiği 53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.30	KK FBR’de ışık şiddeti denemesi toplam karotenoit miktar grafiği.....53
4.31	<i>C. nivalis</i> FBR denemesi pH grafiği.....54
4.32	<i>C. nivalis</i> FBR denemesi hücre sayısı grafiği54
4.33	<i>C. nivalis</i> FBR denemesi hücre yoğunluğu grafiği54
4.34	<i>C. nivalis</i> FBR denemesi fotosentetik aktivite grafiği.....55
4.35	<i>C. nivalis</i> FBR denemesi toplam klorofil miktar grafiği.....55
4.36	<i>C. nivalis</i> FBR denemesi toplam karotenoit miktar grafiği.....56
4.37	<i>C. nivalis</i> ’in Panel, Tübüler, KT fotobiyoreaktörlerdeki üretimi.....56
4.38	Petride ışık ve soğuk stresi denemesi. a)+4°C buzdolabı, çalkalayıcı, ışık; b)24 saat sonraki hali; c) 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü; d) Buz üzeri, UV ışık; e) Buz üzeri, yoğun led ışık57
4.39	4 hafta sonra tüplerde besin stresi denemesi58
4.40	Spot ışık denemesi a)Kontrol, 15°C ve yoğun spot ışık altındaki kültürler, b)aralıklı spot ışık, c)hasat sonrası58



TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
3.1	Kullanılan kimyasallar ve tedarikçi firmaları.....	22
3.2	Bold's Basal Ortamı (BBM)' nın Kompozisyonu.....	23
3.3	Bold 1NV Ortamının Kompozisyonu	23
3.4	Bold 3N Ortamının Kompozisyonu	24
3.5	Modifiye Bold 3N Ortamının Kompozisyonu	24
3.6	P-IV Metal Çözeltisi İçeriği	25
3.7	B12 Vitamin Çözeltisi	25
3.8	Biotin Vitamin Çözeltisi	26
3.9	Thiamine Vitamin Çözeltisi	26
3.10	Toprak Suyu: GR+ Kompozisyonu	26
3.11	Kullanılan Cihazlar.....	27
3.12	Fotobiyoreaktör ebatları ve ışıklandırma yüzey alanları	31
3.13	Sıvı tüpte besin stresi denemesinin ortam içerikleri.....	33
4.1	<i>C. nivalis</i> üretimlerinde HPLC analiz sonuçları.....	59



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
t0	Başlangıç anı
vvm	Hacim/hacim/dk
L	Litre
ml	Mililitre
g	Gram
mg	Miligram
m	Metre
µm	Mikrometre
°C	Derece Santigrat
M	Molar
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
FBR	Fotobiyoreaktör
KT FBR	Karıştırmalı Tank Reaktör
KK FBR	Kabarcık Kolon Fotobiyoreaktör
Kl-a	Klorofil-a
Kl-b	Klorofil-b
MAA	Mikrosporin amino asit
PSY	Fitoen sentaz
ZDS	ζ-karoten desatüraz
PDS	Fitoen desatüraz
IPI	İzopentenil pirofosfat izomeraz
PTOX	Plastit terminal oksidaz
PQ	Plastokuinon
DOXP	1-deoksi-D-ksilüloz-5-fosfat
IPP	İzopentenil pirofosfat
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
FDA	U.S.Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
UV	Ultraviyole
UVR	Ultraviyole radyasyonu
PAR	Fotosentetik aktif radyasyon
SFA	Doymuş yağ asiti
MUFA	Tekli doymamış yağ asiti
PUFA	Çoklu doymamış yağ asiti
BPA	Bisfenol-a
BBM	Bold's Basal besin ortamı
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

1.GİRİŞ

Doğa, birbirinden farklı eşsiz ortamları ve ev sahipliği yaptığı türler ile organik pek çok ürünün temel kaynağıdır. Zamanla bilimsel araştırmaların hız kazanması, moleküler düzeyde araştırmalar yapılabilmesi sayesinde var olan kaynaklar daha verimli ve etkili şekilde pek çok alanda kullanılmaya başlanmıştır.

Enerji kaynağı olarak kullanılan birincil kaynakların bilinçsizce kullanımı, artan nüfus, hava kirliliği ve ekosistemin küresel ölçüde sorunlarının meydana gelmesi bilim dünyasını yeni kaynaklara yöneltmiştir. Küresel ısınmanın bir sorun olarak ele alındığı ilk yıllardan itibaren kalan kaynakların beşeri sistemler için yeterli gelmeyeceğinin farkına varılması ile birlikte sentetik üretimde petrokimyasal atıkların artması ekosisteme zarar vermiştir.

Bitki ve mikroalgler CO₂ salımındaki artışın birincil çözümleridir. Ancak evrimsel süreçte mikroalglerin endosimbiyotik teori ile atmosfer için önemi çok daha ayrı bir noktadadır. Atmosferdeki oksijenin ana kaynağı olarak mikroalglerin gösterilmesi, bugünkü sahip olduğu 10 binlerce tür çeşitliliği ile potansiyel pek çok ürün için de kaynak oluştururlar.

Mikroalglerin moleküler incelemeleri ile daha yakından öğrenilen metabolitleri; gıdadan farmasötiğe, kozmetikten besiciliğe, tarımdan arıtıma, mimariden enerjiye ve medikal kullanımına kadar endüstriyel amaçla çok büyük hacimlerde üretilmekte ve ticari arenada geniş bir pazara sahiptir. Açık ve kapalı alanlarda maliyet ve hedef ürünün kalitesine bağlı olarak üretimleri yapılan mikroalglerin, kontrollü üretiminin fotobiyoreaktör sistemlerinde sağlanması katma değeri yüksek ürünün medikal alandaki kullanımının önünü açar. Başta karotenoidler, flavonoidler, vitaminler olmak üzere antioksidan, antikanser, antimikrobiyal, antiinflamatuvar özellikleri sayesinde mikroalgler; ilaç ve besin takviyesi ile düzenleyici ve tedavi edici ajan olarak kullanılabilirlerdir.

Tez çalışması ile birlikte doğal astaksantin birincil üreticisi mikroalg türlerine alternatif olarak soğuk iklim şartlarında da yaşayabilen *Chlamydomonas nivalis*'in kullanımı değerlendirilmiştir. Türün ileriki çalışmalarda kozmesotik ve farmasötik alanlara yönelik kullanım potansiyeli düşünülerek fotobiyoreaktörlerdeki üretimi araştırılmak istenmiştir. Bu çalışma kapsamında *Chlamydomonas nivalis* mikroalginin laboratuvar şartlarında kültivasyonu yapılarak çeşitli stres parametrelerinin ve fotobiyoreaktör üretimlerinin astaksantin

üretimine etkisi araştırılmıştır. Genellikle doğadan tür izolasyonu ve laboratuvarında hücrel çalışmaların yapıldığı bir tür olarak *C. nivalis*'in farklı fotobiyoreaktör çeşitlerinde üretimlerinin karşılaştırılması ve astaksantin içeriğinin HPLC analizi ile belirlenmesi, bu çalışmanın özgünlüğünü göstermekle birlikte ileriki çalışmalara da kaynak niteliğindedir.



2.GENEL BİLGİLER

2.1.Mikroalgler

Doğal habitatlarında yaşayan pek çok mikroalgin içerdiği biyoaktif moleküller, zaman içerisinde gelişen teknolojiyle birlikte keşfedilerek bugün sağlıktan tarıma, biyoyakıttan gıdaya, kozmetikten çevreye kadar farklı alanlarda kullanılmaktadır. İlk olarak birçok türün habitatlarından izole edilmesi ile başlayan süreçte, tür tayini yapılarak sınıflandırılan mikroalglerin derinlemesine araştırılması sayesinde, mikroalglerin bugünkü endüstriyel amaçla kullanımı mümkün olmuştur. Evrimsel süreçte fotoototrof canlıların öncüllerinden kabul edilen mikroalgler, dünyadaki oksijenin de kaynağı olarak önemli bir görevi üstlenmişlerdir.

Fosil yakıtların enerji üretiminde uzun yıllardır birincil kaynak olarak kullanılması bugünkü sera gazı etkisini ve beraberindeki pek çok sorunu getirmiştir. Tam da bu sebepten dolayı araştırmacılar yenilenebilir, aynı zamanda da karbon salımının önüne geçecek alternatif enerji kaynakları arayışına girmişlerdir (Schenk et al., 2008).

Temelini sucul canlılardan alan birçok yeni ürün, denizel biyoteknolojinin gelişiminde önemli rol oynamıştır (Wijffels, 2008). Son zamanlarda pek çok araştırmaya konu olan mikroalgler, artan enerji ihtiyacının sürdürülebilir temiz bir kaynağı olarak gösterilmektedir. Bu enerji kaynaklarının başındaki biyoyakıtlara örnek olarak mikroalglerden karbon emisyonundan bağımsız üretilen biyohidrojen hakkında pek çok araştırma bulunmaktadır (Oncel and Sabankay, 2012). Biyoyakıt üretiminde mikroalglerin kullanımı ile uygun maliyetli enerji kaynağı sağlamanın yanı sıra; yüksek fotosentetik etkinliğe sahip, biyokütlesi hızla artabilen bu organizmalar (Hemaiswarya et al., 2012) aynı zamanda da içerdikleri pek çok biyoaktif bileşikler sayesinde medikal alanda insan sağlığına doğrudan fayda sağlarken gıda ve besicilik gibi diğer endüstri kollarında da geniş kullanım olanağı bulmaktadır (Wijffels, 2008).

2.1.1.Mikroalglerden elde edilen metabolitler

Mikroalglerin, başta karotenoitler ve yağ asitleri olmak üzere, genellikle stres altında daha yüksek oranda ürettikleri sekonder metabolitler sayesinde sağlık alanında kullanılmasına yönelik büyük çapta biyokütle üretimleri yapılmaktadır

(Wijffels, 2008). Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ve karotenoitlerin yanı sıra fikobiliproteinler, polisakkaritler ve fiktoksinler gibi çok farklı değerli ürünlerin gıda, akuakültür ve nutrasötik amaçla kullanımı mikroalgal biyokütle üretimi ile sağlanmaktadır (Del-Cambo et al., 2007; Sathasivam et al.'dan, 2017).

Karotenoitler, tüm fotosentetik organizmalar tarafından geranilgeranil difosfattan sentezlenir ve biyosentetik yolizinde, likopenin, β -karoten'e dönüştürüldüğü ve bunun da astaksantine kadar metabolize edildiği bildirilmiştir. Fotosentetik bitkiler, likopen ve β -karoten sentezleyebilirken, astaksantin ise bitkiler hariç diğer fotosentetiklerce sentezlenen bir karotenoittir (Giuliano et al., 2000; Niu et al.'dan, 2014). Astaksantin, β -karotene göre, hücrenin büyüme ve çevresel strese karşı savunma mekanizmasının geliştirilmesinde daha iyi olmasından dolayı akuakültür yetiştiriciliğinde tercih edilmektedir (Niu et al., 2014). Mikroalgin başta UV ışınlarından korunmasında önemli rol oynayan astaksantin, serbest radikallerden, lipid peroksidasyonundan ve oksidatif hasardan hücreyi koruyarak medikal alanda da başta kanser olmak üzere pek çok enflamatuvar ve nörodejeneratif hastalıktan korumaktadır (Yuan et al., 2011; Sathasivam et al.'dan, 2017).

Spirulina, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Botryococcus*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Chaetoceros*, *Cryptocodinium*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nitzschia*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis* ve *Skeletonema*'ya ait türler ticari olarak en çok bilinenler olsa da zengin mikroalg çeşitleri sayesinde halen yeni türler tanımlanarak ticari kullanım için potansiyelleri araştırılmaktadır (Sathasivam et al., 2017).

2.2.Ekstremofilikler

Dünya üzerindeki yaşamı etkileyen en önemli parametrelerden biri, sıcaklıktır. Biyosferdeki -89°C 'taki Antarktika'dan 400°C 'taki derin deniz tabanındaki hidrotermal sulara kadar olan bu sıcaklık farkı sayesinde canlılar çeşitlenmiştir (Siddiqui, 2015). Antropolojide "ekstremofil"i, insan yaşamı için uygun olmayan durumlar olarak tanımlanırken, gerçek "ekstremofiller" ekstrem yani uç şartları seven anlamında kullanılmaktadır. Bu tanıma göre ekstremofiller, ekstrem koşullar altında kolaylıkla yaşayan hatta bu şartlarda en uygun büyüme ve gelişmeyi gösteren canlılar için kullanılırken bu sıcaklıklara sadece tahammül edebilen ancak optimum büyümeyi sağlayamayan canlılar için bu terim kullanılmamaktadır (Weber et al., 2007). Genelde optimum yaşadıkları yere göre

gruplandırılan ekstremofiller pH 10'unun üzerindeyse *alkalofiller*; pH 4'ün altındaysa *asidofiller*; yüksek hidrostatik basınçtaysa *barofiller* ya da *piezofilik*; kaya içindeyse *endolitsler*; 0.2 M'in üzerindeki yüksek iyonik ortamdaysa *halofiller*; yüksek sıcaklıktaysa *termofiller*; düşük sıcaklıktaysa *psikrofiller* olarak adlandırılmaktadır. Bunun yanı sıra, örneğin termoasidofilikler gibi, düşük pH'ya sahip yüksek sıcaklıklarda yaşayan birden fazla duruma adapte olmuş ekstremofilikler de vardır (Cavicchioli, 2002; Rothschild and Mancinelli, 2001; Weber et al.'dan, 2007).

Canlılar ekstrem şartlarda yaşayabilmek adına pek çok metabolik yol geliştirmiştir. Bu metabolik yollar genellikle daha yüksek sıcaklığa toleranslı ve aşırı pH değerlerinde çalışabilen enzimler tarafından katalize edilir ve ekstremofiller genellikle çevresel uç şartlardan hücreyi koruyan fonksiyonlara sahip makromoleküller üretir (Morozkina et al., 2010; Mikulic and Beardall'dan, 2014). Örneğin bazı hücrel bileşenlerin termostabilitesi 250°C'a kadar çıkabilmektedir (White, 1984; Fushida et al., 2014; Siddiqui'den, 2015). Ekstreofiliklerin farklı sıcaklıklarda ürettiği enzimler özellikle gıda endüstrisinde önemli yer tutmaktadır. 45 – 100°C veya daha yüksek bir sıcaklık aralığında çalışabilen termofilik enzimler, doğal tatlandırıcıların üretiminde kullanılırken; 5 ila 20°C arasında değişen sıcaklıklarda çalışan psikrofilik enzimler ise yüksek aktiviteleri nedeniyle kullanılır, ısı ile kolayca inaktive edilir, bakteriyel kontaminasyon düşük sıcaklık nedeniyle azalır (Herbert, 1992; Gerday et.al., 2000; Rasmussen and Morrissey' den, 2007). Soğuk bölgelerde pahalı ısıtma giderlerini düşürerek reaksiyonların yüksek verimle, özgüllükleri ile istenmeyen yan reaksiyonları elimine ederek kararsız ara bileşiklerin oluşumunu önleyerek gıda ve farmasötik endüstrisinde stabil ve yüksek kalitede son ürüne ulaşılmasında önemli yer tutarlar (Siddiqui, 2015). Psikrofilik enzimler, bira ve şarap fermentasyonu ve peynir üretiminin yanında, mayalanma süresini azaltmak için hamur endüstrisinde de kullanılabilirler. Süt endüstrisinde laktozun glikoz ve galaktoza düşük sıcaklıklarda dönüşmesine imkan vererek bakteriyel aktiviteyi düşürür ve verimi hızlandırır. Alkalifilikler ise ürettikleri enzimler ile düşük maliyetli emülsifiye, köpük ve stabilize ajanı olarak kullanılarak gıdada kıvamın belirlenmesinde de rol alırlar (Herbert, 1992; Gerday et.al., 2000; Rasmussen and Morrissey'den, 2007).

Endüstride geniş bir yelpazede enzimleriyle görev alan ekstremofilikler, ürettikleri diğer makromoleküllerle de pek çok araştırmaya konu olmaktadır.

2.2.1. Ekstreofilik mikroalgler

Son yıllarda ekstreofilik mikroorganizmaların yetiştirilmesine duyulan ilgi ürettikleri çeşitli metabolit, enzim ve yüzey aktifleri gibi değerli bileşikler nedeniyle artmıştır (Escudero et al., 2014). Büyük ölçekte üretilerek özellikle gıdada geniş kullanım imkanı bulan mikroalglerden *Nostoc* türleri, sıcak kaynak sularından çöllere hatta kutup bölgelerine kadar pek çok uç şartta bulunabilmektedir. Fotoototrofik siyanobakteri olan *Spirulina*, çok yüksek pH değerindeki hafif tuzlu göllerde yaşamaktadır. Tuz tolerans aralığının en çok olduğu bilinen *Dunaliella* türleri ise halofiliklere en güzel örnektir (Rasmussen and Morrissey, 2007). *Dunaliella* ve *Spirulina* gibi türlerin sahip olduğu bu özellikleri dolayısıyla ticari üretimleri karmaşık olmayan açık havuz sistemlerinde başarıya ulaşmıştır. Tüm mikroalg türlerinin bu şekilde üretilme şansı olmadığı gibi yaşayabilmeleri için özel koşulların sağlandığı pahalı kapalı fotobiyoreaktör sistemlerine de ihtiyaç duyulmaktadır (Parmar et al., 2011). Kontrollü üretimin sağlanabildiği fotobiyoreaktörler sayesinde mikroalglerin çeşitli metabolitleri yüksek saflıkta ve kalitede verimli bir şekilde üretimleri yapılarak özellikle farmasötikte kullanılmaktadır. Örneğin *Dunaliella salina* gibi ekstreofiller gümüş nanopartiküller ile birlikte yan etkileri minimuma indirerek güçlü antikanser özellik gösterebilirler (Singh et al., 2017).

Heterotrofik üretilen *Chlorella* türleri ise kontaminasyona uğramadan yüksek kalitede medikal ürün geliştirilmesinde önemlidir. *Haematococcus pluvialis*, azot kıtlığında üretimini arttırdığı astaksantin ile endüstriyel alanda büyük ölçekli üretimlerde en çok kullanılan türler arasında yer almaktadır (Rasmussen and Morrissey, 2007).

Ekstreofilik mikroalglerin normal yaşam koşullarında yaşayan mikroalg türlerine oranla daha verimli olduğunu söyleyen çok çalışma olmasa da bu durum asitli şartlarda yaşayan ekstreofilik mikroalglerin büyüme hızı için doğru değildir (Vaquero et al., 2014). Asidofilik *Chlamydomonas* türleri çok yüksek Cd içeriğinde bile yaşayabilirken doğal sulardaki ağır metal toksisitesine karşı koruyucu etki göstermektedir (Aguilera and Amils, 2005). Ayrıca yüksek metal konsantrasyonunun yanında düşük pH ve yüksek sıcaklığı tolere edebilen bir ekstreofilik mikroalg türü olan *Cyanidium caldarium*, üzerinde çok çalışılan ve nötr pH'da ılıman sıcaklıklarda iyi yetişen *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg türü ile karşılaştırıldığında yüksek Zn konsantrasyonunda daha iyi gelişerek fotosentez yapmaktadır (Mikulic and Beardall, 2014). Termotolerant ve

halotolerant bir tür olarak *Nannochloris* izolatları ile yapılan çalışmalar içerdikleri palmitoleik ve oleik asitler ile biyodizel üretiminin yanı sıra sinir hücrelerinin miyelin biyosentezinde görevli nervonik asit ile de farmasötik endüstrisi için önemli bir potansiyeli içermektedir (Saadaoui et al., 2016).

Mikroalglerin biyoremediasyondaki kullanımını uzun yıllardır pek çok çalışmaya konu olmuştur. İnsan kaynaklı plastik atıklar ise bugünün en büyük çevre sorunlarından birini oluşturmaktadır. Birçok organizmaya toksik zarar vererek çevresel felakete dönüşen bisfenol-a (BPA) polikarbonat plastikler ve epoksi reçinelerin üretiminde kullanılan organik bir bileşiktir. İnsanların ve hayvanların endokrin sistemine etkiyerek üreme, sinir ve immün sisteminde bozukluklara yol açan BPA'nın su kaynaklarındaki miktarı akuakültürdeki canlıların da tolere edebileceği sınırın çok üzerindedir. Bu durum öncelikle sudaki hayatı olumsuz etkilese de zamanla tüm canlılar için küresel bir sorun haline gelmiştir. Sucul hayatın üreticisi konumundaki mikroalglerin de kirletici ajanlardan etkilendiği bilinmektedir. Ancak alkalifilik bir mikroalg türü olan *Picocystis sp.*'nin yüksek orandaki BPA'yı tolere edebildiği hatta antioksidan enzimleri yardımıyla parçalayarak uzaklaştırdığı kanıtlanmıştır (Ben Ouada et al., 2018). Bu da temiz su kaynaklarına en çok ihtiyaç duyulacak önümüzdeki yıllarda umut verici bir gelişmedir.

İyi bir doğal antioksidan olan luteini yüksek oranda sentezleyen asidofilik yeşil mikroalg *Chlamydomonas acidophila*'nın farklı karbon kaynaklarını kullanarak lutein, zeaksantin, α -karoten, β -karoten gibi çeşitli karotenoidleri sentezlediği bilinmektedir (Cuaresma et al., 2011).

Tatlı su mikroalglerinden olan kar algleri kutup ve dağlık bölgelerin kalıcı kar ve buzullarında yaşamaktadır. Metabolizmalarını 0°C'in altındaki düşük sıcaklıklara, kuruluğa (desikasyon), osmotik strese ve yüksek solar radyasyona karşı adapte etmişlerdir (Leya et al., 2006). Örneğin filamentöz yapıdaki *Xanthonema sp.*'nin yüksek NaCl konsantrasyonunu tolere edebildiği, loş ışıpta 6°C'in altındaki sıcaklıklarda maksimum büyüme gösterirken 16°C'in üzerindeki sıcaklıklarda yaşayamadığı bilinmektedir (Tartari and Forlani, 2008).

2.2.2.Karda yaşam

Buzul ablasyonu atmosferik, ekolojik ve hidrolojik nedenlerden dolayı gelen ışınların yansıma oranındaki değişime duyarlıdır. Taze kar görünür radyasyonun

%90' indan fazlasını yansıtırken erime süresince tane büyüklüğü ve su içeriği arttıkça yansıma oranı düşerek kar erimesi hızlanır. Organik ve inorganik safsızlıklar da bu süreçte önemli rol oynar (Ganey et al., 2017). Kar algleri ise atmosferik karbon döngüsünde önemli bir rol oynamaktadır (Williams et al., 2003; Remias et al.'dan, 2005). Ototrofik kar ve buz algleri buzul üzerinde, erimiş buz üzerinde ve buz oyuklarında yaşayarak heterotrofik hayvan ve bakteri popülasyonlarının yaşamlarına da katkı sağlayarak karbon döngüsünde yer alırlar (Takeuchi, 2013). Kar alglerinin neden olduğu “bioalbedo” ya da “biyoyansıma” sayesinde metabolik kullanılabilirliği olmayan kar suya dönüşür ve fotosentetik mikroalgler yeniden canlanarak aktifleşir (Ganey et al., 2017). Yaz sezonunda *Chlamydomonas nivalis* baskın türdür, ancak karın derinliklere doğru değişen mineral ve suya göre alg dağılımı da değişmektedir (Takeuchi, 2013). Genellikle kırmızı kar, *C. nivalis*'in neden olduğu bir olay olarak karşımıza çıkar; ancak küresel, kalın duvarlı, kistik formda görülen bu hücre gibi başka türlerin de benzer özellikler gösterdiği araştırılmıştır (Hardy and Curl, 1968). Tür çeşitliliğini etkileyen buzulun su içeriği, yüzey koşulları, rüzgar, toz, besin, yağış ve solar radyasyon gibi parametreler aynı zamanda da buzuldaki tür dağılımları ve yoğunluklarını, ürettikleri metabolitleri etkilemektedir (Takeuchi, 2013). Fotosentetik ve karotenoit pigment olan bu metabolitleri içeren kırmızı hücreleri ile kar algleri, radyasyondan korunurken karın yüzey yansımasını düşürür ve buzulların erimesi hızlanır. Besin sıkıntısı kistik (non-motile) hücrelerin karotenoit üretimini tetikler ve kış boyu kistik formda kar altında kalırlar. Baharla birlikte değişen ortam şartları ile yeniden aktifleşerek bu döngüyü oluştururlar (Ganey et al., 2017).

2.2.3.Chlamydomonas nivalis'in genel özellikleri

2.2.3.1.Chlamydomonas nivalis'in yaşam alanı

Chlamydomonas dünya çapında tatlı su göleti, göl, yosun gölleri, tuzlu ve acı sular, kar, bahçe ve tarımsal toprak, orman, çöl, turbalık, nemli duvarlar, volkanik alanlar gibi çok çeşitli yerlerden izole edilebilen geniş tür çeşitliliğine sahip bir genustur (Harris, 1988). Büyük kar alanları ise Painter ve diğ. (2001)'nin kullanmış olduğu gibi hava kaynaklı bir görüntüleme spektrometresi sayesinde kar alglerinin dağılımı ve miktarı karakterize edilerek karşılaştırılabilmektedir. Çoğu zaman Alplerde ve Kuzey Kutbu'ndaki kalıcı kar ekosistemlerinde görülen kar algleri, Avrupa Alplerinde ise, Mayıs ayından itibaren genellikle 1800 m'den daha yüksek alanlarda erimiş kar yüzeyinde biriktiklerinde kırmızı kar alanlarına neden olurlar.

Bu kriyofilik alg patlamaları (algal bloom), kutup bölgelerinde olduğu kadar, dünya çapında birçok yüksek kesimde ve kıyı bölgelerinde kuş kolonilerinin yanında dahi yoğun alg oluşumu gözlemlenmiştir (Remias et al., 2005). *Chlamydomonas nivalis* 1969-1970 yılları arasındaki karlı dönemde Sierra Nevada'nın 3000 m'nin üzerinde kırmızı, büyük ve küresel hücreler halinde kar yüzeyinin 30 cm derinliğine kadarki kısımda gözlenmiştir (Thomas, 1972). Afrika (Fas'ın Atlas dağları)'da da kar algleri tanımlanmıştır (Duval et al., 1999; Remias et al.'dan, 2005).

2.2.3.2.Sınıflandırma ve adlandırmadaki karışıklık

Kar ve buzullarda yapılan araştırmalar ılıman ve tropikal iklimlere nazaran daha azdır. Alp ve kutuplardaki 2000 yıldır bilinen kırmızı kar olayı ancak 19.yy'da mikroskopinin gelişimi ile tek hücreli kırmızı renkli alglerin çok faza üremesi sonucu olduğu öğrenilebilmiştir. 20.yy itibariyle sistematik alandaki çalışmalar sayesinde kırmızı, yeşil, turuncu hatta gri karlara neden olan türler tanımlanmaya başlanmıştır. Genellikle çeşitli renklerdeki karların nedeni olan organizmaların yeşil alg olduğu kanıtlanırsa da yine de tam taksonomik kimlik belirsizdir ve elektron mikroskobu ile moleküler yöntemler kullanılarak detaylı araştırma yapılması gerekmektedir (Remias et al., 2005). 1967'nin Eylül ayında İngiltere'deki bir çalışmada Cairngorm Dağları (İskoçya)'nın 1140 m'deki kar yüzeyinden alınan numuneler araştırılmış ve içerisinde kırmızı renkte görülen *C. nivalis* 1846'da 1070 m kar yüzeyinde *Protococcus nivalis* olarak, 1885'te ise *Spharella nivalis* olarak literatüre geçmiştir (Light and Belcher, 1968). Ancak eski kaynaklarda geçen bu tür isimleri için genetik haritalama yapılmamıştır. Çoğu kaynakta sinonim olarak geçen türler sonraki çalışmalarda ayrı bir tür olarak ele alınmıştır. Bu da pek çok tür gibi *C. nivalis*'in de taksonomisinde karışıklıklara neden olmuştur.

Çoğu kar algi *Chlamydomonas* ve *Chloromonas* cinslerine aittir. Fizyolojik ölçümler yaparken habitatlarına dikkat etmek gerekir. *Chloromonas* ve *Chlamydomonas cf. nivalis* benzer özellik gösterebilir de *Chlamydomonas nivalis* daha yüksek bölgelerdeki kırmızı karda yaygındır, daha fazla astaksantin ve türevi içermektedir. Ayrıca yüksek-düşük ışık stresine karşı daha dayanıklı ve uyum sağlamış bir türdür (Remias et al., 2010). Diğer bir fark da *Chlamydomonas nivalis*'in kriokonit denilen yapısı sayesinde yüksek ışınlarla karşı gölgelenerek korunabilir. Ancak, *Chloromonas nivalis* gibi türlerin hipnoblasterlarında ise böyle bir yapı gözlenmez. *Chlamydomonas cf. nivalis* neredeyse tüm Arktik ve Alpin bölgelerinde görüldüğü için kozmopolit kriyofilik bir tür olarak kabul edilebilir (Remias et al., 2005). Mikroskobik araştırmalar sadece belirli türler ve yaşam

döngüsü aşamaları için bu tür bir tanımlama ve sınıflandırma sağlayabilirken edinilen bilgiler ilerde yeni bir *Chlamydomonas* türüne aktarılabilir.

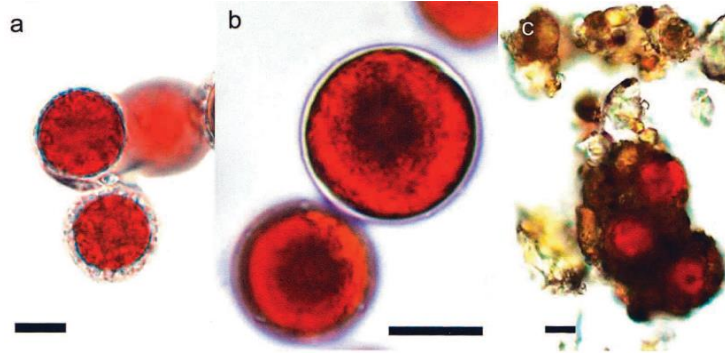
2.2.3.3. *Chlamydomonas nivalis*'in hücresel yapısı

Karlı yüksek alanlarda yaz dönemi boyunca ekstrem sıcaklıklara, yüksek radyasyona ve düşük besin miktarına adapte olduğu eşsiz bir mikrohabitat içerisinde yaşayan *C. nivalis* (Şekil 2.1) mikroalg türü hücresel yapı itibariyle ekstrem koşullara karşı mekanizma geliştirir. Hücrelerin fizyolojik olarak aktif olması için, kar yeni yağın karlarda olduğu gibi ne soğuk ne de çok kuru olmalıdır. Flagel kazandıkları aşamada ise flageller; ışık ve sıcaklık ihtiyaçlarına göre kar içindeki en uygun derinliğe ulaşmalarını sağlar. Yaşam döngüsünün çoğu, günlük donma-çözülme döngülerine en dayanıklı formları immobil hipnoblast aşamasıdır.



Şekil 2.1 UTEX LB 2824 *Chlamydomonas nivalis* vejetatif formunun mikroskopik görünümü

C. nivalis düzgün bir hücre duvarına sahip halinin çapı $14,9 \mu\text{m} \pm 5,7 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür (Şekil 2.2.b), bazen bir müsilaj tabakası ile çevrelenmiş veya organik ve inorganik parçacıklar ile kaplı bir hücre duvarı yüzeyine sahip olabilirken (Şekil 2.2.a) yaz dönemi sonunda genelde kaya ve toprak üzerinden alınmış örneklerde ise diğer materyallerle birlikte karışık halde bulunur (Şekil 2.2.c). Hücre duvarının etrafına tutunan tozlarla birlikte, fungus ve bakterilerinde olduğu biyota simbiyotik ya da parazit bir yaşam formunda yaşayabildiğini gösterir. *C. nivalis*'in hücre duvarı bu ekstrem çevreye karşı dış sınır oluşturduğu için mekanik açıdan yok etmenin zor olduğu çok sert bir katmandır (Remias et al., 2005).



Şekil 2.2 Kistik haldeki *C. nivalis*'in mikroskopik görünüşleri. a) hücre duvarı müsülaj tabaka ile çevrili, b) hücre duvarı düzgün, c) inorganik materyaller ile çevrili. bar:10 µm (Remias et al., 2005)

Kar algleri, genellikle farklı büyüklüklerdeki sitoplazmik lipit damlacıkları ile kaplandığı için ekstraplastidik karotenoit birikimi gösterir. Bu karotenoit birikimi hücrenin yaşına bağlıdır. Hücrenin merkezinde zarla çevrili halde konumlanan kloroplast, tilakoid membranların 3-7 tilakoid şeklinde paketlenmiş grana yığınlarından oluşur. Plastidler çok sayıda plastoglobül içerebilmektedir (Remias et al., 2005). *C. nivalis*'in sitoplazmik granüllerinde Viala (1966) tarafından astaksantin esterleri olduğu söylendiği karotenoitlerin birikimi dolayısıyla kırmızı renkli, kamçılarını kaybetmiş kistik formu (zigospor) durağan hücreleri düşük sıcaklıklara uzun süre dayanabilmektedir. Klorofil miktarındaki düşmeye takiben azot eksikliğinin görüldüğü şartlarda karotenoit birikimi artmaktadır. Bu durum yüksek ışığa karşı dayanım sağlamanın yanı sıra lipit üretimiyle de düşük sıcaklıklarda yaşayabilmenin bir gereğidir. *Chlamydomonas*'ın "Yeşil kar" türü olarak geçen *C. nivalis*, düşük ışık yoğunluğuna sahip donmuş habitatlarda da yaşamını sürdürebilmektedir (Weiss, 1983b; Czygan, 1970; Harris'ten, 1988). Donmaya karşı toleranslı türlerin hassas türlere göre hücresel yapı olarak fark gösterdiği bulunmuştur (Clarke and Leeson, 1985; Harris'ten, 1988). Farklılıklardan en önemlisi de donmaya toleranslı türlerin vejetatif hücre zarında rastgele dağılmış halde çukur biçimli alanlarda hücre duvarı materyaliyle doldurulmuş gibi görünümün katlanmalar olmasıdır. Benzer yapılar donmaya dayanıklı maya hücrelerinde ve halotolerant alg türlerinde de görülmektedir. Donmaya toleranslı yeşil algler, sitoplazmaya gömülü mitokondrilere ve nişasta tanecikleri üreten pirenoidlere sahiptir (Harris, 1988).

Kırmızı karın klorofil miktarı ve primer karotenoit miktarı sekonder karotenoit miktarına göre çok azdır. Yeşil karda ise bu tam tersidir, hatta sekonder karotenoit bulunmamaktadır. Yağ asit profili karşılaştırıldığında yeşil karda sırasıyla doymuş yağ asiti (SFA) ve tekli-doymamış yağ asiti (MUFA) miktarı daha fazlayken çoklu doymamış yağ asit miktarı azdır. Kırmızı karda ise çoklu doymamış yağ asiti, toplam yağ asitinin %49'unu oluşturur (Lutz, et al., 2015).

2.2.3.4. *C. nivalis* yaşamında ışık etkisi

Kar, düşük sıcaklıklar, donma-çözülme döngüleri, yüksek PAR (fotosentetik aktif radyasyon) ve UVR (ultraviyole radyasyonu), düşük besin konsantrasyonu ile karakterize olan koşulların birkaç gün içerisinde değişebildiği dinamik ortamdır. Karın sıcaklığı sabit kalsa da, birkaç saat içinde PAR ve UVR değerleri fırtına sırasında tam güneş ışığından loş ışığa kadar değişebilir. Kar kimyası, olası fosfor sınırlamasını gösterir ve yoğun alg popülasyonlarının bitki örtüsünün kaynağı olmasıyla sonuçlanır. Bu çevrede yaşayacak türler ekstrem koşullara uyum sağlamalıdır (Elster 1999; Kvíderová'dan, 2010). *C. nivalis*'te yüksek UV ışığa maruz kaldığı sırada hala fotosentez ve diğer metabolik işlemler devam ettiğinden ürettikleri fenilpropanoid, karotenoit ve mikrosporin amino asit (MAA) sekonder metabolitleri ile UV kaynaklı oksidatif strese iyi adapte olmuşlardır (Duval et al., 2000).

Kar algleriyle ilgili olarak laboratuvar ortamında kistik kırmızı formdan bir tam algal hayat döngüsü geçirerek tekrar kistik forma dönüşüm başarılammıştır. Işığın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise UV radyasyon yeşil kar alginin fotosentezini %85 baskımlarken, bu oranın kırmızı kar algi *C. nivalis*'te %25 olduğu bulunmuştur (Lutz et al., 2015).

2.2.3.5. Kültür Koleksiyonlarında Stoklanabilirliği

Hücreler belli genetik özelliklerinden dolayı kısa ya da uzun süreli stoklanarak kültür koleksiyonu ve araştırmalar için dondurularak saklanmaktadır. *Chlamydomonas nivalis*'in bu süreçte dondurma çözdürme işlemine karşı hassas olduğu, kriyoprotektan olarak metanolün önerilmediği, -196°C'tan 2.4°C min⁻¹ soğutma hızı ile en yüksek sağ kalımı raporlanmıştır. 1.2 M NaCl konsantrasyonu bu tür için letal dozdur (Morris et al., 1979).

2.3. Mikroalglerin Medikal Alanda Kullanımı

2.3.1. Doğal antioksidanlar

Kanser, yaşlanma ve koroner kalp hastalığı gibi pek çok kronik hastalıklar; reaktif oksijenlerin neden olduğu oksidatif hasarla meydana gelmektedir. Çok sayıda çalışma bu hastalıkların önlenmesinde antioksidanların faydalı olduğunu göstermektedir. Sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen özellikte olması

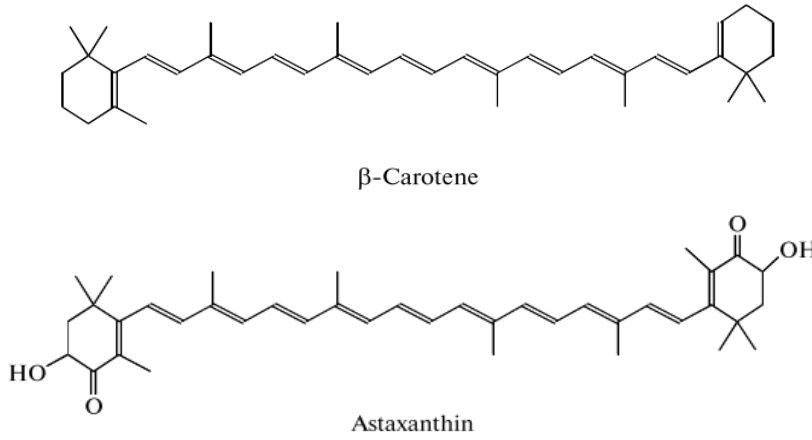
nedeniyle sürekli üretilebilen, uygun maliyetli, doğal antioksidanların üretimi için yeni kaynaklara ihtiyaç duyulmaktadır (Li et al., 2007). Pek çok çalışma fitofenoliklerin oksidatif strese karşı etkili olduğu ve serbest radikallere karşı biyolojik sistemleri koruduğu bilinmektedir. Mikroalglerin sekonder metabolitleri de antikanser özellikleriyle bilinen doğal antioksidanlar olarak dikkat çekmektedir (Duval et al., 2000). Mikroalglerin biyoçeşitliliği sayesinde yüksek bitkilerden çok daha geniş bir doğal antioksidan kaynağa sahiptir. Bununla birlikte, mikroalglerin tüm grupları, geniş ölçüde çeşitli hedef ürünler, büyüme oranı veya verimleri, ekim kolaylığı veya diğer faktörler nedeniyle doğal antioksidan kaynakları olarak kullanılamaz. Mikroalglerin antioksidan aktivitesi ile ilgili raporlar, özellikle fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi arasındaki ilişki ile sınırlıdır. Bu nedenle, mikroalg kaynaklı bazı zengin antioksidan kaynaklarının belirlenmesi ve bu iki parametre arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi önem taşımaktadır (Li et al., 2007).

İnsan sağlığında ve beslenmesinde sucul kaynaklı ürünlerin kullanımı bu zamana kadar pek çok çalışmaya konu olmuştur. Çağımızın en önemli hastalığı olarak gösterilen kanserin tedavisine yönelik kullanılan en popüler yöntemlerden biri doğal antikanser ilaçların, kimyasalların zararlı etkilerini önleyici ajan olarak kullanılması çok popülerdir. Sucul kaynaklı pigmentlerin de serbest radikalleri uzaklaştırmasıyla antioksidan ve antikanser özellik göstermesi sebebiyle en çok astaksantin'in umut vaat etmesi de doğal olarak çalışmaların çok yönlü ilerlemesini sağlamıştır. Bu yüzden de marin kaynaklı bileşiklerin; beslenme, farmasötik ve kozmesötik açıdan etkilerinin in vivo ve in vitro incelenmesiyle ticari pazarda biyotabanlı ürünlerin yer bulmasında katkı sağlamıştır (Ngo et al., 2011).

2.3.2. Astaksantin

Kimyasal adı *3,3'-dihydroxy-β,β-carotene-4,4'-dione* olan astaksantin'in doğal kaynakları alg, maya, somon, alabalık, krill, karides ve kerevittir (Ambati et al., 2014). Diğer karotenoitler gibi astaksantin de düşük su çekme kapasitesine sahip, biyoyararlanımı olan ve suda çözünmeyen bir maddedir (Park et al., 2014). Astaksantin diğer karotenoit türleri lutein, kantaksantin, β-karotenden 10 kat, α-tokoferolden ise 100 kat fazla yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Diğer karotenoitlerden farklı olarak her halkada iki oksijenlenmiş grup içermesi, antioksidan aktivitesini artırır (Campoio et al., 2011). Bu ketonik ve hidroksilik

fonksiyonel gruplar, serbest radikallere ve singlet oksijenleri süpürerek antioksidan özellik gösterir (Park et al., 2014).



Şekil 2.3 β -karoten ve astaksantin moleküler gösterimi

Astaksantin özellikle balıklarda A-vitamini prekürsörü olarak üremeye ve embriyo gelişimine katkı sağlar, hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Tropikal süs balıklarının renklerinin korunmasında, kümes hayvanlarının yumurta sarılarının renklendirilmesinde yaygın olarak kullanılan astaksantin (Çelikel vd., 2006), FDA'in gıda onayıyla birlikte son zamanlarda insan metabolizmasında hastalıkları önleme ve tedavi etme etkisi nedeniyle besin takviyesi ve antioksidan olarak kullanımı yaygınlaşmıştır (Yuan et al., 2013). Bunun yanında yapısındaki trans konfigürasyona sahip 11 tane C-C çift bağlarının yüksek ışık, oksijen, sıcaklıkla kolayca cis forma izomerize olarak biyolojik aktivitesini kaybetmesi nedeniyle astaksantin gıda olarak kullanımında kısıtlamalar olabilmektedir. Astaksantin biyopolimerler ile enkapsülasyonu sayesinde çözünürlüğü ve biyoyararlanımı artırılarak aynı zamanda yüksek sıcaklık, ışık ve oksitlenmeden korunmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (Park et al., 2014).

Astaksantin kan-beyin bariyerinden geçebildiğinden hayvanlarda nöro-koruyucu etkisi sayesinde başta epilepsi, Alzheimer ve Parkinson olmak üzere nöro-dejeneratif hastalıkların tedavisinde umut vaat eder. Oksidatif hasarı azaltarak ve mitokondri ilişkili apoptoz yolağını inhibe ederek anti-apoptotik etkinin yanında, kardiyovasküler hastalıklarda da antienflamatuvar özellikleri ile de koruyucu etki göstermektedir (Lu et al., 2015).

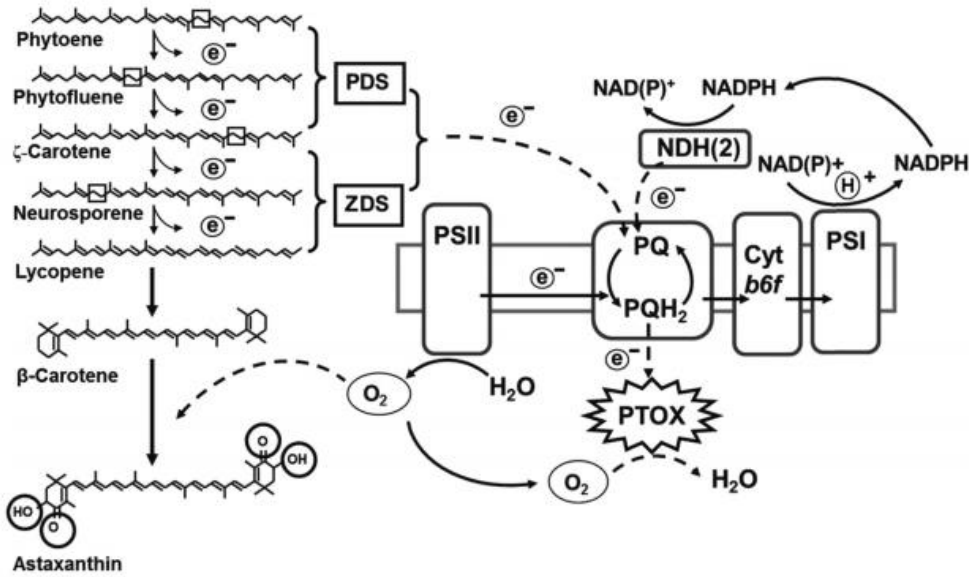
Astaksantin, NF- κ B (Nükleer faktör-kappa B) aktivasyonunun baskılanmasının bir sonucu olarak pro-enflamatuvar genlerin ve kaspaz-3

ekspresyonunu bloke ederek enflamatuar süreçleri ve hücre apoptosisini önlediği açıklanmıştır (Kumar and Singh, 2019). Benzer şekilde mezenşimal kök hücrelerinde kronik yağ asidine maruz kalmanın neden olduğu inflamasyonu önlemesi astaksantin kök hücre terapisindeki önemini gösteren diğer bir bulgudur (Yaghooti et al., 2019). Spinal kord yaralanmalarında kompresyon modeli ile duyu-motor fonksiyonu üzerinde olumlu etkisi vardır (Fakhri et al., 2019). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, alkolik karaciğer hastalıklarından astaksantin ile beslenerek korunabileceği öne sürülmüştür (Liu et al., 2019). “Molecular docking” yöntemi ile bilgisayar modellemesi yapılan astaksantin, karaciğer ve böbrek kanserlerinde aktif kemoterapi ilacı Sorafenib'e göre güçlü bir antikanser olarak (Suganya and Anuradha, 2019); karaciğer (Zhu et al., 2019) ve böbrek fibrozisini de hafifletmede alternatif bir ajan olabileceği gösterilmiştir (Zhao et al., 2019). Kardiyomiyositlerde oksidatif stresi ve apoptozu azaltarak koroner mikroembolizasyon nedeniyle kalp yetmezliği ve miyokardiyal apoptozunu iyileştirmede potansiyel tedavi olabileceği öne sürülmüştür (Xue et al., 2019).

Astaksantin sentezinin metabolik yolizi; yağ asiti sentezi, fotosentetik elektron taşıma ve reaktif oksijen sentezi gibi pek çok metabolik yolla ilişkilidir. Genom sekanslama gibi genetik alandaki gelişmeler bu metabolik yolların belirlenmesini ve anlaşılmasını mümkün kılmaktadır (Han et al., 2013). Ancak *C. nivalis*'in astaksantin sentezlediği pek çok çalışma (Gorton et al., 2001; Remias et al., 2005, 2016; Řezanka et al., 2008, 2013) tarafından kanıtlanmış olsa da astaksantin hücre metabolik yolizini tam olarak gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Bu da astaksantin biyosentezinin diğer sekonder metabolitlerin üretimleriyle benzer olduğu model mikroorganizma *Chlamydomonas* cinsine ait akümülyasyon basamakları ile ortak açıklanabilmektedir.

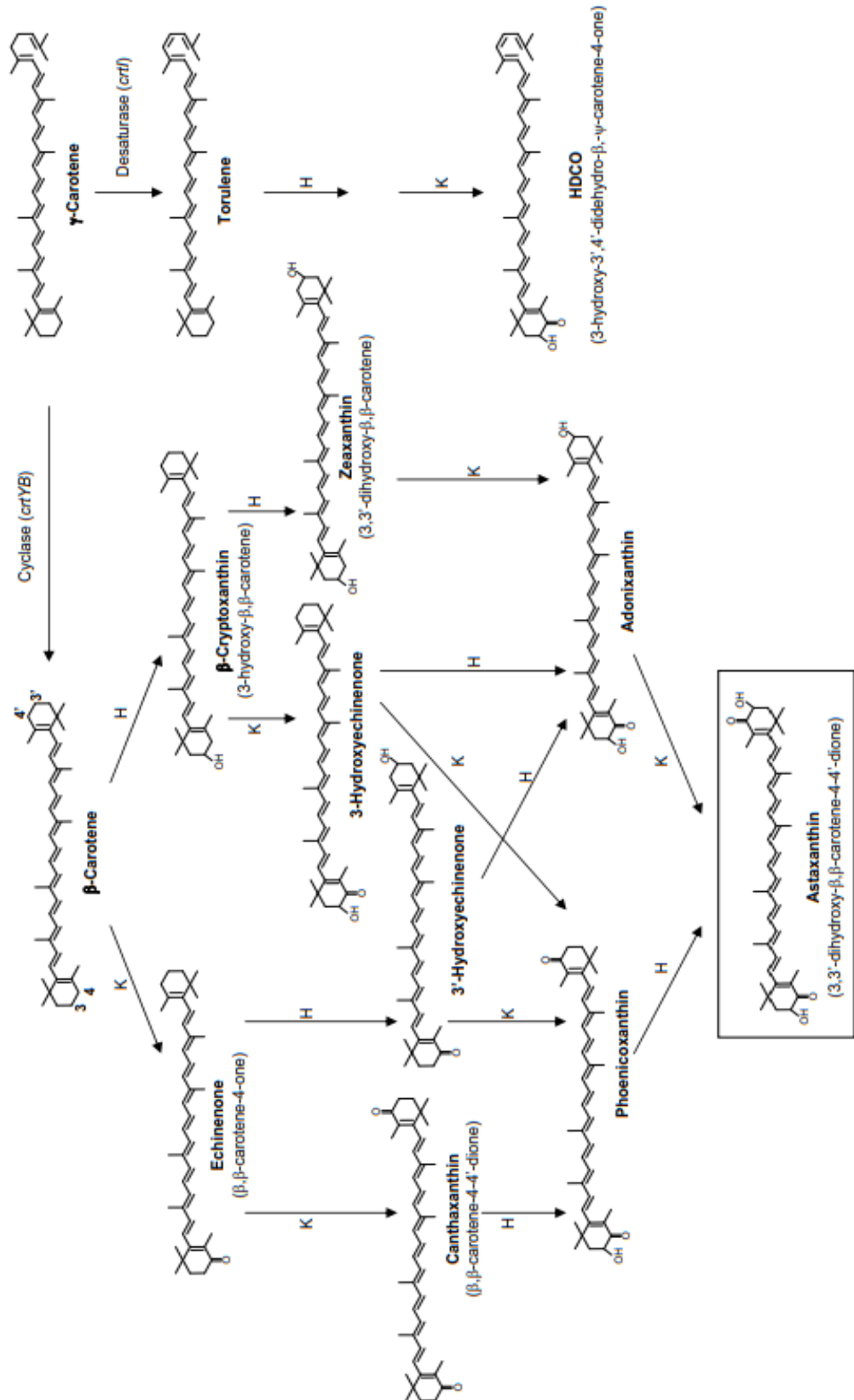
İzopentenil pirofosfat (IPP) karotenoit sentezinin öncülüdür. Yüksek bitkilerde IPP biyosentezi mevalonat ve mevalonat olmayan iki ayrı yolizinden yürürken *H. pluvialis* ve *C. reinhardtii*'de sadece mevalonat olmayan DOXP (1-deoksi-D-ksilüloz-5-fosfat) yolizinden ilerlediği düşünülmektedir. *H. pluvialis*'in vejetatif formundan kistik formuna geçişte PSI aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Han et al., 2013). Astaksantin hücre metabolizmasında oksidatif strese karşı koruyucu etkisi genel olarak Şekil 2.4'te şematize edilmiştir. Karotenoit biyosentezinde IPI geni oksidatif strese karşı cevap olarak artar, IPI1 proteini birincil karotenoit sentezinde bulunurken, IPI2 proteininin de sadece astaksantin sentezleyen kırmızı kistik hücrelerde bulunduğu tespit edilmiştir (Sun et al. 1998; Han et al.'dan, 2013). *C. reinhardtii*'de sadece bir çeşit bulunan fitoen sentaz (PSY)

karotenoit sentezinde 20-C'lu geranilgeranil difosfatın tüm karotenoitlerin prekürsörü 40-C'lu fitoene dönüştürülmesinde rol alan önemli bir enzimdir. Fitoen desatüraz (PDS) ve ζ -karoten desatüraz (ZDS) renksiz fitoeni kırmızı likopene dönüştüren enzimler olarak görev yaparlar. PDS ve ZDS ile katalize edilen sıralı desatürasyon reaksiyonlarında üretilen elektronlar, sırasıyla plastid terminal oksidaz (PTOX) tarafından oksitlenen plastokuinon (PQ) havuzuna iletilir. Çeşitli çevresel stres koşullarında *H. pluvialis*'te bulunan PTOX1'in karotenoit biyosentez genleriyle düzenlendiği (Wang et al. 2009; Han et al.'dan, 2013) ve *Chlamydomonas*'ta da PTOX1'in fitoen desaturasyonu için okside PQ'nun yenilenmesinden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Houille-Vernes et al. 2011; Han et al.'dan, 2013).



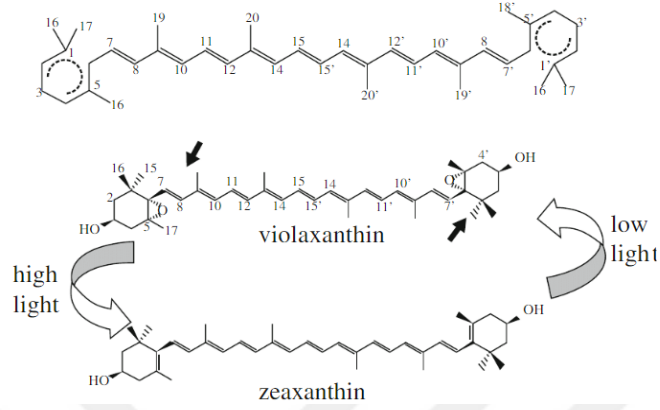
Şekil 2.4 Mikroalgal astaksantin sentezi (Han et al., 2013)

Astaksantin çeşitli organizmalarda farklı enzimlerin görev almasıyla birlikte farklı yol iziyle üretilir (Şekil 2.5). *H. pluvialis*'te BKT geninin kodladığı β -karoten ketolaz enzimi ile echinenone ve kantaksantin üzerinden üretilirken (Martin et al., 2008) *C. zoofingensis*'te zeaksantin üzerinden yol izlenir (Han et al., 2013).



Şekil 2.5 Astaksantin'in çeşitli organizmalarda üretim şekli (Martin et al.'dan, 2008)

Astaksantin yol izinde değişen ortam şartları ara bileşiklerin oluşmasına neden olarak bazen astaksantin üretiminden önce ara bileşiklerin daha fazla üretilmesine neden olur. Şekil 2.6’da değişen ışık şiddetine göre violaksantin-zeaksantin dönüşümü gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Işık şiddetine göre violaksantin-zeaksantin dönüşümü

Son zamanlarda astaksantin ticari üretiminde bilinen ve kullanılan en zengin mikrobiyal kaynak *H. pluvialis* mikroalg türüdür. Doğal astaksantin alglere oranla daha düşük düzeyde de olsa *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) adı verilen bir maya tarafından da üretilmektedir (Çelikel vd., 2006). Kabuklulardan elde edilen yağlarda ve mayalarda nispeten daha düşük miktarda (%0.15-0.40) astaksantin bulunmasından dolayı ticari olarak kuru ağırlıklarının %3’ü astaksantin olan mikroalgler daha caziptir (Dore and Cysewski, 2003).

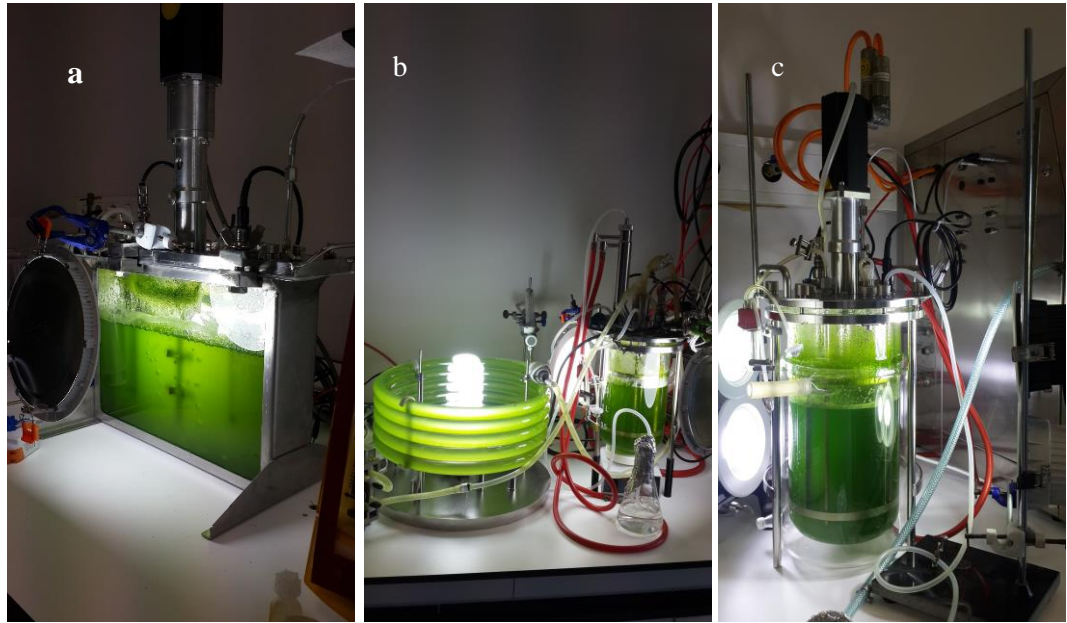
Mikroalgal antioksidanlar hakkında 2000’ler öncesinde sınırlı sayıda çalışma olsa da ilerleyen teknoloji ve gelişen teknikler ile bugün geniş bir mikroalg dünyasını görmekteyiz. 1990’lardaki pek çok çalışmada *Chlamydomonas* içeren *Chlorophyta* üyelerinin, mekanizma tabanlı antikanser taramasında en yüksek aktivite oranına sahip olduğu bulunmuştur (Duval et al., 2000). *C. nivalis*’in neden olduğu kırmızı karın gıda olarak tüketilmesinin laksatif (müshil) etkisinin olduğu bazı eski kaynaklarca kabul görülse de (Whitney, 1972; Fiore et al.’dan, 1997), daha sonraki bir çalışma göstermiştir ki diareye neden olmadığı ancak dağcılarının çok daha fazla miktarda (500 gr üzeri) kırmızı kar tüketmesinin araştırılması gerektiği belirtilmiştir (Fiore et al., 1997). Aynı türde ultraviyole ışığın fenolik bileşik üretimine etkisinin araştırıldığı çalışmaya göre ise UV-C’de UV-A’ya göre daha fazla fenolik bileşik artarken antioksidan korumada genel olarak UV’ya bağlı bir artış olduğu raporlanmıştır (Duval et al., 200). *C. nivalis*, 23 mikroalg türünün antioksidan kapasitesinin ve fenolik oranlarının araştırıldığı bir çalışmada en yüksek değerlere sahip 3 mikroalginden biri olarak bulunmuş ve doğal

antioksidanların zengin bir kaynağı olarak kullanılabilceğini göstermiştir (Li et al., 2007).

2.4. Mikroalgal Üretim Sistemleri

Mikroalglerin büyük miktarda üretimlerinde karşılaşılan en büyük sorun ışığın biyokütle dönüşümü için mikroalg kültürasyonunun enerjiye bağımlı oluşudur. Biyokütle dönüşümü için birçok çalışmada fotobiyoreaktör dizaynının temel rol oynadığı belirtilmiştir. Bu nedenle son çalışmalar yüksek dönüşüm verimliliği için fotobiyoreaktör geliştirilmesi hakkındadır (Liao et al., 2014).

Fotobiyoreaktörde biyokütle üretimi fotosentetik ışık tutma ve atenüasyonu, besin alımı, fotobiyoreaktör hidrodinamikleri ve gaz-sıvı kütle transferi gibi pek çok parametreye bağlı karmaşık prostedir (Fernandes et al., 2015). En yaygın üretimi yapılan üç fotobiyoreaktör tasarımı ortaya çıkmıştır. Bunlar düz-panel, tübüler ve karıştırmalı tank (KT FBR) sistemlerdir (Şekil 2.7). Bu tasarımların temel prensipleri ışık yolunu azaltmak ve böylece gerekli ışığın tüm algelere ulaşmasını sağlamak, iyi karıştırma sağlayarak ışığın dağılımını ve gaz transferini en uygun koşullarda sağlayabilmektir.



Şekil 2.7 Başlıca fotobiyoreaktör tasarımları a)Panel, b)Tübüler, c)KT FBR

Panel fotobiyoreaktörler geniş ışıklandırma yüzey alanına sahiptir. Bu da yüksek fotosentetik verimlilik sağlar. Genellikle tabandan havalandırma verilir.

Yapay ışıklandırma altında dikey konumlandırılırken, açık alanda belli açı ile yerleştirilirler. Mikroalgal biyokütle kültürleri ve dış alan kültür üretimleri için çok uygundur. İyi ışık yoluna sahip, temizlenmesi kolay ve karıştırmalı tank fotobiyoreaktörlere kıyasla daha ucuz olmaları avantajken; ölçek büyütme, hidrodinamik basınç, reaktör çeperinde tutunma ve sıcaklık kontrolünde kısıtlamaları bulunur (Wang et al., 2012).

Tübüler fotobiyoreaktörler açık havadaki biyokütle üretimleri için en uygun fotobiyoreaktör çeşitleridir. Farklı şekillerde konumlandırılabilir, farklı malzemelerden oluşturulabilirler. Havalandırma ve kültürün karışması genellikle hava kaldırma sistemleri ile yapılmaktadır. Geniş yüzey alanı, görece düşük maliyet ve biyokütle üretkenliklerinin yüksek olması yönünden avantajlı sistemlerdir. Ancak ölçek büyütmede biyokütle veriminin düşmesi, fotoinhibisyon, sıcaklık kontrolündeki zorluk ve maliyeti, pH gradienti, reaktör içinde O^2 ve CO^2 çözünmesi, geniş alan gereksinimi, reaktör çeperinde tutunma dezavantajlarıdır (Vasumathi et al., 2012). Endüstriyel mikroalgal biyokütle üretiminde panel ve tübüler FBR'ler yüzey/hacim oranını arttırmaya yönelik geliştirilen fotobiyoreaktör türlerindedir (Wang et al., 2012).

Karıştırmalı tank fotobiyoreaktörler çeşitli çalışmalar için tasarlanarak ölçeklendirilmektedir. Yüksek biyokütle verimi, karıştırmadaki kolaylık, düşük enerji gereksinimi, immobilizasyon için uygun, sterilizasyonu ve işletimi kolay, fotoinhibisyonu ve fotooksidasyonu düşük olması tercih edilmesinde önemli rol oynar. Ancak ölçek büyütmede yüzey alanının azalması, özel malzeme ve tasarım gerektirmesi, maliyetinin yüksek olması ise dezavantajlarıdır (Singh and Sharma, 2012).

Üretim modlarına göre kültürler kesikli, kesikli-beslemeli ve sürekli kültürler olarak adlandırılırlar. Kesikli üretim modundaki kültürler uygun besin ortamına inokülasyonun ardından hasat ile sonlandırılmasına kadar kültüre müdahale edilmeden üretilirler. Düşük verimlilik ve hücre konsantrasyonu, ürün stabilitesinde zorluk, güvenilirliğindeki belirsizliklerden dolayı her üretim için uygun değildir (Fernandes et al., 2015). Kesikli-beslemeli ya da yarı sürekli sistemler periyodik kısmi hasat ile aynı miktarda taze besin ortamının eklendiği, kesikli üretime göre daha fazla verim alınan ancak kontaminasyon riski, rekabet ve yeni ara ürün oluşumu gibi dezavantajlarından dolayı kültürün zamanla veriminde düşüklüklere sebebiyet verebilir. Sürekli sistemlerde ise devamlı olarak taze ortamın verildiği ve eski ortamın sistemden uzaklaştırıldığı dinamik üretim modudur. Yüksek maliyet

ve karmaşık yapısından dolayı dezavantajlı olsa da kültürün logaritmik büyüme evresinde tutulduğu kaliteli hücre ve ürün üretiminin sağlanabildiği sistemlerdir (Sukatar, A., 2004).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez kapsamında kullanılan mikroalg kültürleri, kimyasal malzemeler, cihazlar ve yöntemler bu kısımda açıklanmıştır.

3.1.Mikroalg Kültürü

Tez çalışmasında kullanılan *Chlamydomonas nivalis* mikroalg UTEX kültür koleksiyonundan UTEX 2824 kodu ile aksenik olarak tedarik edilmiştir.

3.2.Kimyasal Malzemeler

Çalışma boyunca kullanılan malzemeler ve tedarikçi firmaları Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan kimyasallar ve tedarikçi firmaları

Kimyasallar	Firmalar
NaNO ₃	Merck
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck
NaCl	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Merck
MnCl ₂ .4H ₂ O	Merck
MoO ₃	Merck
CuSO ₄ .5H ₂ O	Merck
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	Merck
H ₃ BO ₃	Merck
EDTA	Sigma
KOH	Merck
FeSO ₄ .7H ₂ O	Merck
H ₂ SO ₄	Merck
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	Merck
FeCl ₃ .6H ₂ O	Merck
ZnCl ₂	Merck
CoCl ₂ .6H ₂ O	Merck
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Merck
HEPES	Merck
B ₁₂ Vitamini	Sigma
Biotin	Sigma
Thiamine	Sigma
Pyrogallol (C ₆ H ₆ O ₃)	Sigma
CaCO ₃	Merck
Aseton	Merck
Metanol	Merck

3.3.Besin Ortamları

Chlamydomonas nivalis'in üretiminde Bold ortamının varyasyonları kullanıldı. Çalışma boyunca kullanılan Bold 1NV, Bold's Basal (BBM), Bold 3N ve Modifiye Bold 3N ortamlarının içerikleri aşağıda listelendi.

3.3.1. Bold's Basal ortamı

BBM ortamının 1 L hazırlanması için 900 ml distile su içerisine devamlı karıştırılarak Tablo 3.2'deki tüm komponentler sırasıyla eklendi. Toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak pH 6,5'e ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 20 dk boyunca steril edildi.

Tablo 3.2 Bold's Basal Ortamı (BBM)'nin Kompozisyonu

	Komponent	Miktar (ml/L)	Stok Konsantrasyonu	Çözelti
1	NaNO ₃	10	10 g/400 ml dH ₂ O	
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	10	3 g/400 ml dH ₂ O	
3	NaCl	10	1 g/400 ml dH ₂ O	
4	K ₂ HPO ₄	10	3 g/400 ml dH ₂ O	
5	KH ₂ PO ₄	10	7 g/400 ml dH ₂ O	
6	CaCl ₂ .2H ₂ O	10	1 g/400 ml dH ₂ O	
7	İz Element Çözeltisi ZnSO ₄ .7H ₂ O MnCl ₂ .4H ₂ O MoO ₃ CuSO ₄ .5H ₂ O Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1	8,82g/1L dH ₂ O 1,44 g/1L dH ₂ O 0,71 g/1L dH ₂ O 1,57 g/1L dH ₂ O 0,49 g/1L dH ₂ O	
8	H ₃ BO ₃	1	1,14g/100 ml dH ₂ O	
9	EDTA-KOH Çözeltisi EDTA KOH	1	5g/100 ml dH ₂ O 31g/100 ml dH ₂ O	
10	FeSO ₄ .7H ₂ O H ₂ SO ₄	1	4,98g/1L dH ₂ O 1 g/1L dH ₂ O	

3.3.2. Bold 1NV ortamı

Bold 1N ortamının 1 L hazırlanması için 900 ml distile su içerisine devamlı karıştırılarak vitaminler hariç Tablo 3.3'teki tüm komponentler sırasıyla eklendi. Toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak otoklavda 121°C'de 20 dk boyunca steril edildi. Ortamın soğuması sonrasında aseptik şartlar altında vitaminler eklendi.

Tablo 3.3 Bold 1NV Ortamının Kompozisyonu (<https://utex.org/products/bold-1nv-medium>)

	Komponent	Miktar (ml/L)	Stok Konsantrasyonu	Çözelti
1	NaNO ₃	10	10 g/400 ml dH ₂ O	
2	CaCl ₂ .2H ₂ O	10	1 g/400 ml dH ₂ O	
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	10	3 g/400 ml dH ₂ O	

4	K ₂ HPO ₄	10	3 g/400 ml dH ₂ O
5	KH ₂ PO ₄	10	7 g/400 ml dH ₂ O
6	NaCl	10	1 g/400 ml dH ₂ O
7	P-IV Metal Çözeltisi	6	
8	B ₁₂ Vitamin Çözeltisi	1	
9	Biotin Vitamin Çözeltisi	1	
10	Thiamine Vitamin Çözeltisi	1	

3.3.3. Bold 3N ortamı

Bold 3N ortamının 1L hazırlanması için 850 ml distile su içerisine devamlı karıştırılarak vitaminler hariç Tablo 3.4'teki tüm komponentler sırasıyla eklendi. Toplam hacim 1L'ye tamamlanarak otoklavda 121°C'de 20 dk boyunca steril edildi. Ortamın soğuması sonrasında aseptik şartlar altında vitaminler eklendi.

Tablo 3.4 Bold 3N Ortamının Kompozisyonu (<https://utex.org/products/bold-3n-medium>)

	Komponent	Miktar (ml/L)	Stok Çözelti Konsantrasyonu
1	NaNO ₃	30	10 g/400 ml dH ₂ O
2	CaCl ₂ .2H ₂ O	10	1 g/400 ml dH ₂ O
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	10	3 g/400 ml dH ₂ O
4	K ₂ HPO ₄	10	3 g/400 ml dH ₂ O
5	KH ₂ PO ₄	10	7 g/400 ml dH ₂ O
6	NaCl	10	1 g/400 ml dH ₂ O
7	P-IV Metal Çözeltisi	6	
8	Soilwater: GR+ Medium	40	
9	B ₁₂ Vitamin Çözeltisi	1	

3.3.4. Modifiye Bold 3N ortamı

Modifiye Bold 3N ortamının 1 L hazırlanması için 850 ml distile su içerisine devamlı karıştırılarak vitaminler hariç Tablo 3.5'teki tüm komponentler sırasıyla eklendi. Toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak pH 6,2'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 20 dk boyunca steril edildi. Ortamın soğuması sonrasında aseptik şartlar altında vitaminler eklendi.

Tablo 3.5 Modifiye Bold 3N Ortamının Kompozisyonu (<https://utex.org/products/modified-bold-3n-medium>)

	Komponent	Miktar (ml/L)	Stok Çözelti Konsantrasyonu
1	NaNO ₃	30	10 g/400 ml dH ₂ O
2	CaCl ₂ .2H ₂ O	10	1 g/400 ml dH ₂ O
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	10	3 g/400 ml dH ₂ O
4	K ₂ HPO ₄	10	3 g/400 ml dH ₂ O
5	KH ₂ PO ₄	10	7 g/400 ml dH ₂ O
6	NaCl	10	1 g/400 ml dH ₂ O
7	P-IV Metal Solüsyonu	6	
8	Soilwater: GR+ Medium	40	

9	B ₁₂ Vitamin Çözeltisi	1	
10	Biotin Vitamin Çözeltisi	1	
11	Thiamine Vitamin Çözeltisi	1	

3.3.5. Besin ortamlarında kullanılan diğer çözeltiler

3.3.5.1. Nutrient agar ortamı

Agar ortamı hazırlanırken ise 15 g/L olacak şekilde agar agar eklemesi yapıldı. Ortam otoklavda 121°C’de 20 dk boyunca steril edildi. Agar katılmasından hemen önce aseptik şartlar altında vitaminler eklenerek tek kullanımlık petrilere aktarıldı ve katılmaya bırakıldı. Agar ortamı sadece Bold 1NV ortamı için stok kültürlerin oluşturulması ve hücre aktive edilmesi aşamasında çalışmanın erken dönemlerinde kullanıldı. Daha sonra ise kültürün devamlılığını sağlamak ve kontaminasyon kontrolünde kullanıldı.

3.3.5.2. P-IV metal çözeltisi

Tablo 3.6’da listelenen P-IV metal çözeltisi içeriği 950 ml distile su içerisinde sürekli karıştırılarak sırayla eklendi. Toplam hacim 1L’ye tamamlanarak buzdolabında +4°C’de saklandı.

Tablo 3.6 P-IV Metal Çözeltisi İçeriği (<https://utex.org/products/p-iv-metal-solution-recipe>)

Komponent	Miktar (g/1L dH ₂ O)
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,75
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,097
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,041
ZnCl ₂	0,005
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,004

3.3.5.3. B₁₂ vitamin çözeltisi

B₁₂ vitamin çözeltisi için Tablo 3.7’de belirtilen miktarda 200 ml HEPES tamponu (50 mM) hazırlanarak pH 7,8’e ayarlandı. B₁₂ vitamini (0,1 mM) eklenerek tamamen çözünene kadar beklendi. 0,45 µm Millipore filtreden bir şırınga yardımıyla geçirilerek steril edildi. Karanlıkta buzdolabında saklandı.

Tablo 3.7 B₁₂ Vitamin Çözeltisi (<https://utex.org/products/vitamin-b12-recipe>)

Komponent	Miktar
HEPES buffer pH 7,8	2,4 g/200 ml dH ₂ O
B ₁₂ Vitamini	0,027 g/200ml dH ₂ O

3.3.5.4. Biotin vitamin çözeltisi

Biotin vitamin çözeltisi için Tablo 3.8’de belirtilen miktarda 200 ml HEPES tamponu (50 mM) hazırlanarak pH 7,8’e ayarlandı. Biotin vitamini (0,1 mM)

eklenerek tamamen çözünene kadar beklendi. 0,45 µm Millipore filtreden bir şırınga yardımıyla geçirilerek steril edildi. Karanlıkta buzdolabında saklandı.

Tablo 3.8 Biotin Vitamin Çözeltisi (<https://utex.org/products/biotin-vitamin-solution-recipe>)

Komponent	Miktar
HEPES buffer pH 7,8	2,4 g/200 ml dH ₂ O
Biotin	0,005 g/200ml dH ₂ O

3.3.5.5.Thiamine vitamin çözeltisi

Thiamine vitamin çözeltisi için Tablo 3.9’da belirtilen miktarda 50 ml HEPES tamponu (50 mM) hazırlanarak pH 7,8’e ayarlandı. Thiamine vitamini (0,1 mM) eklenerek tamamen çözünene kadar beklendi. 0,45 µm Millipore filtreden bir şırınga yardımıyla geçirilerek steril edilmiştir. Karanlıkta buzdolabında saklandı.

Tablo 3.9 Thiamine Vitamin Çözeltisi (<https://utex.org/products/thiamine-vitamin-solution-recipe>)

Komponent	Miktar
HEPES buffer pH 7,8	2,4 g/200 ml dH ₂ O
Thiamine	0,067 g/200ml dH ₂ O

3.3.5.6.Toprak suyu: GR+ (Soilwater GR+ Medium) ortamı

Toprak suyu ortamı için atık ve kimyasallardan korunmuş olan toprak seçilerek elendi ve büyük partiküller uzaklaştırıldı. İnce bir tabaka halinde alüminyum folyo üzerine serilerek 150°C etüvde 2 saat boyunca bekletildi. Soğutulmuş ortam hazırlığına kadar karanlıkta oda sıcaklığında depo edildi. Tablo 3.10’da belirtilen miktarlardaki toprak ve CaCO₃ tartılarak takip eden 2 gün boyunca günde 3 saat olmak üzere pastörizasyon işlemine tabii tutuldu. Pastörizasyon işlemi 15 dk boyunca yaklaşık 95°C’ye kademeli çıkartılan ortamın 3 saat boyunca 98°C’de tutulup tekrar oda sıcaklığına soğutulması işlemidir. Buzdolabında 24 saat ya da daha fazla süreyle depolanarak kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.

Tablo 3.10 Toprak Suyu:GR+ Kompozisyonu (<https://utex.org/collections/algal-culture-media/products/soilwater-gr-plus-medium>)

Komponent	Miktar
Toprak	1 çay kaşığı/200 ml dH ₂ O
CaCO ₃ (opsiyonel)	1 mg/200 ml dH ₂ O

3.4.Kullanılan Cihazlar

Çalışma boyunca kullanılan cihazlar Tablo 3.11’de gösterildi.

Tablo 3.11 Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Firma-Model
Otoklav	HV-50L, Hirayama , Japonya
Terazi	Explorer Pro, OHAUS, A.B.D
Laminar akışlı steril kabin	HFSafe 1200, Heal Force, Çin
Spektrofotometre	Optizen POP, MECASYS, Kore
Liyofilizatör	Christ, Alpha 1-2 L-D plus, Almanya
Santrifüj	NF400, Nüve, Türkiye
Sonikatör	Bandelin, Almanya
Çalkalamalı inkübatör	Certomat R, B. Braun, Almanya
Sirkülatör	WiseCircu, Wisd, İrlanda
Vortex karıştırıcı	VM-10, ViseMix, Portekiz
Mikroskop	Micros, Avusturya
pH probu	Hamilton Easyferm K8 200, Bonaduz, İsviçre
pHmetre	HI2211 pH/ORPmeter, HANNA Instruments, İngiltere
Oksijen probu	Hamilton Oxyferm FDA 225, Bonaduz, İsviçre
Panel Biyoreaktör (5L)	Biostat APlus, Sartorius Stedim, Almanya
CSTR Biyoreaktör (5L)	Biostat BPlus, Sartorius Stedim, Almanya
Tübüler Biyoreaktör- Vessel (2L)	Biostat PBR 2S, Sartorius Stedim, Almanya
Işıkkölçer	LI-250A, Licor, Lincoln, A.B.D
Manyetik karıştırıcı	MSH-20A, Wise Stir, Portekiz
Etüv	WiseVen, Portekiz
Floresans Aktivite Ölçüm Cihazı	Hansatech, İngiltere
HPLC DAD Thermo Accela U-HPLC,	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, A.B.D

3.5.Stok Kültürlerin Hazırlanması

UTEX’ten 2824 koduyla alınan aksenik *Chlamydomonas nivalis* ortama adapte olarak kültürün aktifleşmesi amacıyla kültür koleksiyonunca önerilen 20°C sıcaklıkta kültür yüzeyine gelen ışık şiddeti ışıkölçer yardımıyla (Licor, LI-192SA LI-250A (Licor, Lincoln, A.B.D)’ya bağlanarak) ~45 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetine ayarlandı, inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *C. nivalis* UTEX 2824 stok agar kültürü

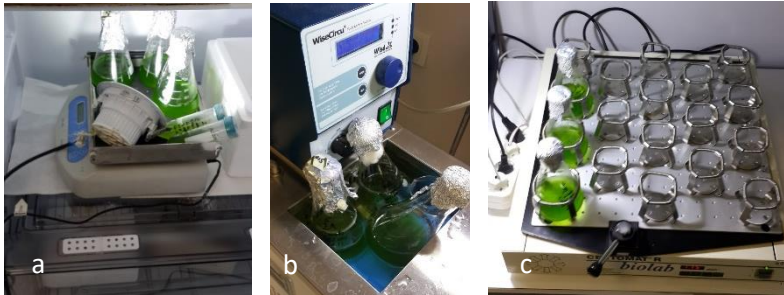
Altı hafta boyunca kültürde üremenin yavaş olması ve kültürün stabil kalması üzerine hücrelerin flagelli yapısı düşünülerek sıvı ortama ekildi. Bunun için kültür, ana stoktan kabin içerisinde alev başında öze yardımıyla 5 ml Bold 1NV içeren sıvı tüplere (Şekil 3.2) ve UTEX'ten kültür yanında ek satın alınan Bold 1NV yatkı agar tüplere ekimi yapılarak inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.2 *C. nivalis* sıvı tüpteki stok kültürü

3.6.Erlenmayerde *C. nivalis* Üretimi

C. nivalis'in hücresel metabolizması ve üremesine sıcaklık etkisinin araştırılması amacıyla türün habitat özellikleri düşünülerek sıcaklık denemesinin 0 ile 20°C aralığında olması belirlendi. 250 ml'lik erlenmayerlere 150 ml çalışma hacminde 1×10^5 hücre/ml başlangıç konsantrasyonu ile Bold 1NV besin ortamında 5, 10 ve 20°C'lerde inkübe edildi (Şekil 3.3). Yaklaşık $90 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sürekli ışık altında yürütülen üretim aşamasında 5 ve 20°C ortamlarda 120 rpm'de çalkalayıcılar sayesinde karıştırma sağlanabilirken 10°C'nin sirkülatör içinde sabit durması dolayısıyla çalışmanın kontrollü deney şartlarının sağlanması amacıyla sıcaklık denemesi dahil tüm denemeler kabarcık kolon fotobiyoreaktörde yapıldı. Erlenmayerdeki üretim 21 gün takip edilerek KK FBR için aşısı olarak kullanıldı.



Şekil 3.3 *C. nivalis* erlendeki sıcaklık denemesi a) 5°C, b) 10°C ve c) 20°C

3.7.Kabarcık Kolon Fotobiyoreaktörlerde *C. nivalis* Üretimi

Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde üretim için gereken aşının hazırlanması amacıyla Bold 1NV ortamı içeren sıvı tüplerden, 50 ml Bold 1NV içeren 100 ml'lik

erlenmayerlere inokulasyon yapıldı. İki hafta boyunca 20°C sıcaklıkta $\sim 45 \mu\text{mol}$ foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sürekli aydınlatmada inkübe edildi.

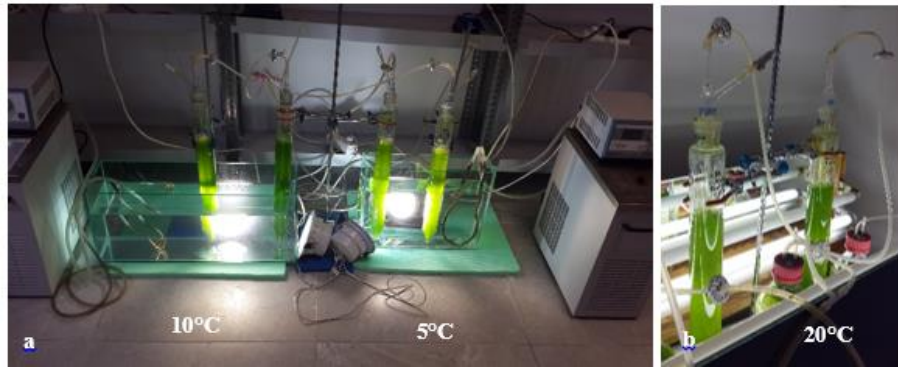
İki adet kabarcık kolon fotobiyoreaktör ve 1 L Bold 1NV ortamı otoklavda 121°C’de 20 dk boyunca steril edilerek üretime hazırlandı. Ortamın ve reaktörlerin soğuması beklendikten sonra inokulasyon yapıldı.

Her bir reaktörde toplam çalışma hacmi 500 ml olacak şekilde %10 inokulum oranı belirlenerek reaktörlere kabin içerisinde aseptik şartlar altında 450 ml Bold 1NV ortamı ve 50 ml aşı eklendi. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörler 1 vvm/L olacak şekilde akvaryum pompasıyla havalandırılarak $\sim 90 \mu\text{mol}$ foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sürekli ışık altında inkübasyona bırakılarak üretim takip edildi. Bu iki kabarcık kolon fotobiyoreaktördeki kültür, çalışmanın devamı için stok kültür olarak kullanıldı.

3.7.1. Farklı sıcaklıklarda *C. nivalis*'in üretimi

Erlenmayer kültüründe yapılan sıcaklık denemesi tekrar edildi ve aynı sıcaklıkta devam eden erlenler seçilerek KK FBR’lerde aşı olarak kullanıldı.

500 ml toplam çalışma hacmine sahip KK FBR’lerde Bold 1NV besin ortamına 1×10^5 hücre/ml başlangıç konsantrasyonuyla inokulasyon yapıldı. Bu aralıkta 5, 10 ve 20°C’deki koşullarda $\sim 90 \mu\text{mol}$ foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sürekli aydınlatma ortamında 1 vvm/L havalandırma sağlanarak inkübe edildi (Şekil 3.4). İnkübasyon boyunca örnekler alınarak analizler ve gözlemler yapıldı.



Şekil 3.4 KK FBR’de *C. nivalis* sıcaklık denemesi a) 5°C ve 10°C, b) 20°C

3.7.2. Farklı besin ortamlarında *C. nivalis*'in üretimi

Azot ve vitamin içeriklerinin farklı olduğu dört adet besin ortamının *C. nivalis* üretimine etkisi araştırıldı. Deneme için kullanılacak ortamlar Bold 1NV, Bold’s

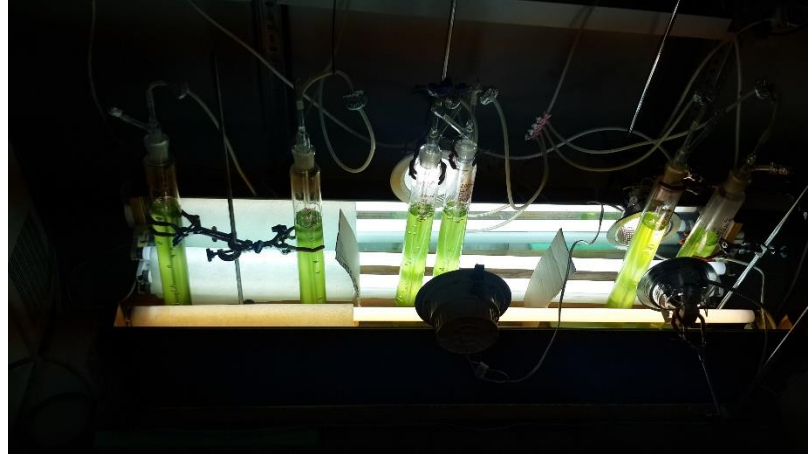
Basal (BBM), Bold 3N ve Modifiye Bold 3N olarak belirlendi. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde ayrı ayrı hazırlanarak steril edilen ortamlara çalışma hacmi 500 ml'ye 1×10^5 hücre/ml başlangıç konsantrasyonuyla inokulum yapılarak üretim başlatıldı. Fotobiyoreaktörler $\sim 90 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sürekli aydınlatma ortamında 1 vvm/L havalandırma sağlanarak 20°C 'da inkübe edildi (Şekil 3.5). İnkübasyon boyunca örnekler alınarak analizler ve gözlemler yapıldı.



Şekil 3.5 KK FBR'de *C. nivalis* besin ortamı denemesi

3.7.3. Farklı ışık şiddetlerinde *C. nivalis*'in üretimi

Farklı ışık şiddetlerinin *C. nivalis* üretimine ve hücre yapısındaki değişikliklerine etkisinin araştırılması amacıyla Bold 1NV ortamında 90, 250 ve $500 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetlerinde sürekli aydınlatılan kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde üretim yapıldı (Şekil 3.6). Fotobiyoreaktörlerin başlangıç şartlarının aynı olması amacıyla inokulasyon 5 L'lik schott şişede çalışma hacmi 3,5 L olarak Bold 1NV ortamında çoğaltıldı. Otoklavda sterilizasyonu yapılan fotobiyoreaktörlere aseptik şartlar altında reaktör başına 500 ml olarak paylaştırıldı. Kültürler 1 vvm/L havalandırma sağlanarak 20°C 'da inkübe edildi. İnkübasyon boyunca örnekler alınarak analizler ve gözlemler yapıldı.



Şekil 3.6 KK FBR'de *C. nivalis* ışık şiddeti denemesi

3.8.Farklı Fotobiyoreaktörlerde *C. nivalis*'in Üretimi

Chlamydomonas nivalis'in 5 L hacme sahip camdan yapılmış Panel, Tübüler ve Karıştırılmalı Tank FBR'lerdeki üretimi Biostat A, A plus ve B plus Sartorius reaktör sistemleri kullanılarak takip edildi. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde yapılan denemeler sonucunda ölçek büyütülerek 5 L hacmindeki reaktör denemesi için Modifiye Bold 3N besin ortamı seçildi. Besin ortamı, Tübüler FBR'nin yedek vesseli ve KT FBR' nin sterilizasyonu 121°C'da 30 dk süreyle otoklavda sterilize edildi. Ancak Panel ve Tübüler FBR'lerin otoklava sığmaması sebebiyle *in situ* sterilizasyon tekniği ile kaynar su kullanılarak ardışık ve kombine bir düzende yapıldı. Her reaktör için toplam çalışma hacmi 4L olacak şekilde %10 inokulum oranı sabit tutularak mikroalg üretim sistemi başlatıldı. Üretim parametreleri olarak oda sıcaklığındaki fotobiyoreaktörler, thermocouple yardımıyla reaktör içi sıcaklık değeri takip edildi. Çözünmüş oksijen yüzdesi ve pH proplar yardımıyla sürekli olarak ölçüldü. Panel ve karıştırılmalı tank fotobiyoreaktörlerde marin tip bıçaklı 100 rpm'de sürekli karıştırma uygulandı. Tübüler FBR'da ise karıştırma pompa yardımıyla 2 L'lik yedek reaktör vesseli içinden Tübüler FBR'e sirkülasyon ile sağlandı. İnokulasyonları yapılan ve üretime başlatılan FBR'ler Şekil 3.7'de gösterildi.

Tablo 3.12 Fotobiyoreaktör ebatları ve ışıklandırma yüzey alanları

FBR tipi	Boyut (m)	Yüzey alanı (m ²)	Çalışma hacmi (m ³)
Panel	w: 0.07, l: 0.325, h: 0.16	0.104	0.004
Tübüler (5 tüp)	r _{tüp} : 0.01, r _{iç} : 0.31	0.375	0.004
Yedek Vessel (2L)	r: 0.065, h: 0.17		
Karıştırılmalı Tank	r: 0.08, h: 0.21	0.106	0.004



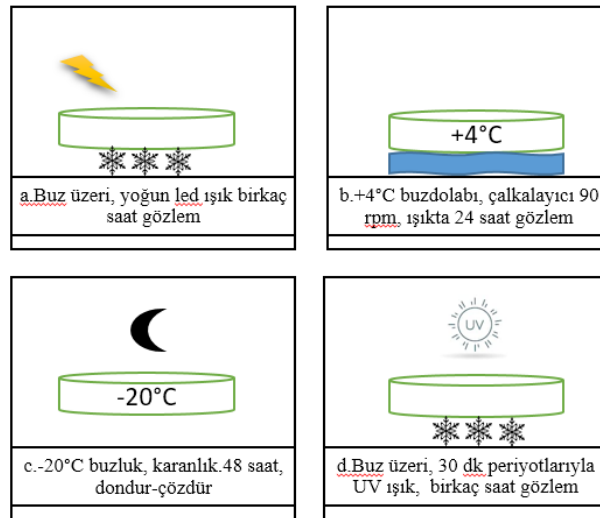
Şekil 3.7 Farklı fotobiyoreaktörlerde *C. nivalis*'in üretimi. Soldan sağa doğru: Panel, Tübüler, KT FBR

3.9.Küçük Ölçekte Stres Denemeleri

C. nivalis'in farklı stres faktörleriyle kistik formunun uyarılarak kısa sürede veri toplanabilmesi amacıyla küçük ölçekte deneme setleri kuruldu.

3.9.1.Petride ışık ve soğuk stresi denemesi

Sıvı kültürlerden steril küçük petrilere yüzeyini örtecek kadar örnek konuldu. +4°C'a çalkalayıcı üzerine ışık varlığında, -20°C'a karanlıkta, buz üzerine oturtularak UV lamba önüne, buz üzerine oturtularak yoğun ışığa bırakılan petrilere (Şekil 3.8) kistik faza dönüşüm için gözlem yapıldı.

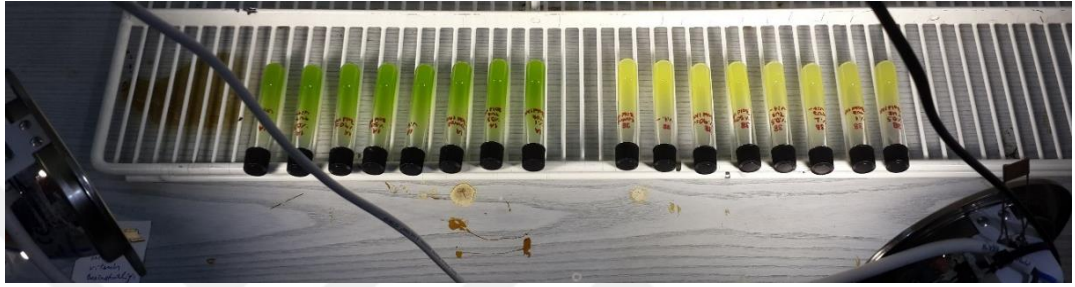


Şekil 3.8 Petride ışık ve soğuk stresi denemesi

3.9.2. Deney tüpünde besin stresi denemesi

3.9.2.1. Deney tüpünde besin stresi 1. deneme

Besin stresinin denendiği deney tüpleriyle yapılan sette daha önceden Bold 1NV ortamlarında 90 ve 500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetindeki kabarcık kolon FBR'lerden her tüp için 5 ml alındı. Kontrol olarak Bold 1NV besin ortamına karşılık, vitamin eksik, %50 besi ortamı seyreltme, %90 besin ortamı seyreltme, %1 NaCl içeren, %0.5 NaCl içeren, %1 NaCl içeren vitamin eksik, %0.5 NaCl içeren vitamin eksik olarak toplamda 16 tüpte deney seti oluşturuldu (Tablo 3.13). 40 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde kültürdeki değişim gözlemlendi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Sıvı tüpte besin stresi 1. denemenin fotoğrafı t0 anı

Tablo 3.13 Sıvı tüpte besin stresi denemesinin ortam içerikleri

	90 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$	500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Kontrol Bold 1NV	1a	1b
Vitaminsiz Bold 1NV	2a	2b
%50 su %50 Bold 1NV	3a	3b
%90 su %10 Bold 1NV	4a	4b
%1 NaCl Bold 1NV	5a	5b
%0.5 NaCl Bold 1NV	6a	6b
%1 NaCl Vitaminsiz Bold 1NV	7a	7b
%0.5 NaCl Vitaminsiz Bold 1NV	8a	8b

3.9.2.2. Deney tüpünde besin stresi 2. deneme:

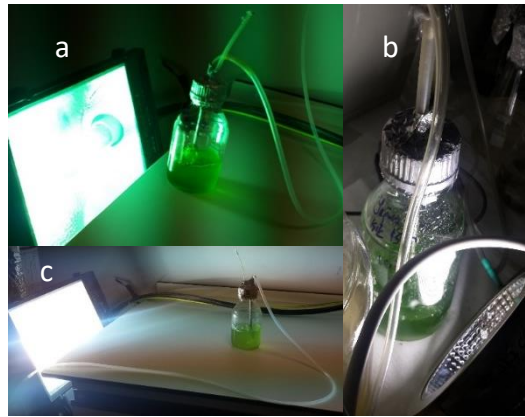
Besin stresinin denendiği deney tüpleriyle yapılan 2. sette daha önceden besin ortamı denemesi yapılan Bold 1NV 90 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetindeki kabarcık kolon FBR'den her tüp için 10 ml alındı. Santrifüj yapılarak besin ortamı uzaklaştırıldı ve her tüpe belirlenen miktarlarda farklı komponentler içeren ortamlar eklendi. Kontrol olarak Bold 1NV besin ortamına karşılık, vitamin eksik, %50 besin ortamı seyreltme, %90 besin ortamı seyreltme, %1 NaCl içeren, %0.5 NaCl içeren, %1 NaCl içeren vitamin eksik, %0.5 NaCl içeren vitamin eksik olarak toplamda 8 tüpte deney seti oluşturuldu (Şekil 3.10). 90 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde kültürdeki değişim 2 hafta gözlemlendi. Daha sonra ışık şiddeti tekrar arttırılarak 2 hafta daha gözlem yapıldı.



Şekil 3.10 Deney tüplerinde besin stresi 2.deneme (t₀ anı): 1.tüp kontrol Bold INV, 2.tüp vitaminsiz Bold INV, 3.tüp %50 su %50 Bold INV, 4.tüp %90 su %10 Bold INV, 5.tüp %1 NaCl içeren Bold INV, 6.tüp %0.5 NaCl içeren Bold INV, 7.tüp %1 NaCl içeren vitaminsiz Bold INV, 8.tüp %0.5 NaCl içeren vitaminsiz Bold INV.

3.9.3.Spot ışıkta stres denemesi

Hücrelerin strese kısa sürede girebilmeleri için stasyoner fazdaki yoğun bir erlen kültürü seçildi, steril su ile yıkanarak 500 ml Schott şişeye alındı. Kültürlerden biri projektör önüne yüksek ışığa havalandırma sağlanarak konulurken (yoğun ışık denemesi Şekil 3.11.a) paraleli de 15°C'ye akvaryum pompasıyla havalandırılma sağlanarak konuldu (Şekil 3.11.b). 24 saat gözlem yapıldı. Kültürdeki beyaza dönen renk değişimi nedeniyle paraleli olan 15°C'deki kültürün yanına alınarak tekrar üreme-canlanma olup olmayacağı gözlemlendi. Birbirini takip eden 3 gün boyunca 1, 2 ve 4 saat olarak yoğun projektör ışığına maruz bırakılan 15°C'deki kültürde (yüksek aralıklı deneme) beyazlama görülmedi. Yoğun ve stasyoner fazdaki 250 ml erlenmayer kültürü santrifügasyonla ortamı uzaklaştırıldıktan sonra steril su ile 300 ml steril distile su buluan 500 ml'lik Schott şişeye havalandırma ile kültüre edildi. Sıcaklık artışını önlemek için projektörden 1m uzağa 16:8 saat aydınlık:karanlık periyoduyla yerleştirildi (ışık denemesi Şekil 3.11.c).



Şekil 3.11 Spot ışıkta stres denemesi: a) yüksek ışık, b)15°C, c) spot ışıktan 1 m uzaklıktaki 16:8h aydınlık:karanlık döngüde

3.10.Analizler

3.10.1.Fotosentetik aktivite (Floresans ölçümleri)

Tüm üretimlerde hüresel klorofilin fotosentetik aktivitesinin belirlenebilmesi için Hansatech FMS sinyal modülasyonuna uğramış klorofil florimetre (Norfolk-England) cihazı ile birlikte *in situ* koşullarda ölçülmüştür. Ölçüm florimetrenin optik fiber ucunun aydınlatılan fotobiyoreaktör yüzeyine doğrudan tutularak yapılmıştır.

3.10.2.Hücre yoğunluğunun spektrofotometrik olarak belirlenmesi

Üretimde hücre büyümesinin takibi için fotobiyoreaktörlerden alınan örnekler 2 ml' lik küvetlere konularak spektrofotometrede (Optizen POP, MECASYS, Kore) kör olarak distile suya karşı 560 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.10.3.Kuru biyokütle tayini

Fotobiyoreaktörlerde artan hücre konsantrasyonları kuru biyokütle tayini ile takip edilmiştir. Bu tayin bir gün öncesinden 60°C'de etüvde bekletilerek kurutulmuş GF/C cam fiber filtrelerinin tayin için etüvden çıkartılarak desikatör içerisinde 15 dk bekletilmiştir. Hassas terazi yardımıyla daraları alınan filtre kağıtları filtrasyon sisteminde 1 ml distile su ile ıslatıldıktan sonra 1 ml örnek geçirilmiştir. Besin ortamından gelen tuzları uzaklaştırmak için tekrar 1 ml distile su geçirilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Filtrelerin kurutulması için 60°C'de etüve konularak 24 saat sonrasında çıkartılmış, desikatörde bekletilerek soğutulmuş ve son tartımları yapılarak hücre konsantrasyonu mg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

3.10.4.Hücre sayısı

Mikroalglerin fotobiyoreaktörlerdeki üretimlerinin canlı ve cansız hücre bakımından tespit edilerek morfolojik değişimlerinin de takibi amacıyla mikroskopta Thoma lamı kullanılarak hücre sayısı hücre/ml cinsinden ifade edilmiştir.

3.10.5.pH ve sıcaklık

Tüm üretimler boyunca pH ve sıcaklık değerleri takip edilmiştir. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde alınan örnekler analiz sırasında pH metre yardımıyla ölçülmüştür. Sıcaklık ise kültür odasında 20°C'de sabit olarak tutulmuştur. Tübüler, panel ve karıştırılmalı tank fotobiyoreaktörlerde ise sıcaklık thermocouple ile pH ise pH probu yardımıyla ölçülmüştür.

3.10.6. Toplam klorofil ve karotenoit tayini

Mikroalg üretiminin artan biyokütleyle bağlı olarak klorofil miktarındaki değişimi ve hücrelerin stres koşullarına gösterdikleri tepki ile karotenoit dönüşümlerinin takibi için toplam klorofil ve karotenoit tayini yapılmıştır. Analiz için alınan örnekler belirli miktarlarda alınarak 4000 rpm'de 5 dk çöktürülerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Dipteki hücre pelleti üzerine belirli miktarda %90'lık aseton çözeltisi eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından karanlık ortamda 1.5 saat boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda buz kütlesi içerisine oturtularak 3 dk boyunca 9 döngü %65 güçte sonikasyon ile hücre parçalama işlemi tamamlanmıştır. Sonikasyon ucuna tutunan örnekleri toplamak için %90'lık aseton çözeltisi kullanılmıştır. Toplamda her bir örnek için 5 ml %90'lık aseton kullanılmıştır. Hücre parçalarını çöktürerek süpernatanta geçen klorofil ve karotenoiti elde edebilmek amacıyla 4000 rpm'de 5 dk süreyle santrifügasyon yapılmıştır. Süpernatantlar kuartz küvetlere konularak %90 asetona karşılık 450, 630, 645, 663 ve 750 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçülmüştür (Oncel and Vardar-Sukan, 2009).

3.10.7. HPLC analizi

3.10.7.1. Kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

Kalibrasyon eğrilerinin doğrusal (lineer) olması, yani cihaz sinyali (yanıt) ile hemen hemen orantılı olması istenir. Kalibrasyon eğrisi kullanabilmek için analitin konsantrasyon aralığı tahmin edilebilmelidir. Bu kapsamda yapılan literatür araştırmalarının ardından, farklı derişimlerde (0,010-20,0 mg/L) lutein, β -karoten, α -karoten, violaksantin, astaksantin, klorofil a ve klorofil b çözeltileri HPLC ile ölçüldü.

3.10.7.2. *C. nivalis* üretimlerinden HPLC'de analizi için karotenoit ekstraksiyonu

Chlamydomonas nivalis'ten karotenoit ve klorofil ekstraksiyonu için HPLC'ye verilecek örnekler hazırlandı. Aşağıdaki denemelerden elde edilen biyokütleler astaksantin konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla HPLC analizi için seçildi.

- Spot ışık stres denemesi liyofilize örnekleri
- Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde

➤ 90, 250 ve 500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetlerinde Bold 1NV ortamında 20°C üretilen *C. nivalis* ışık denemesi liyofilize örnekleri

➤ Bold 1NV, BBM, Bold 3N ve Modifiye 3N ortamlarında 90 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ve 20°C'de üretilen *C. nivalis* besin ortamı denemesi liyofilize örnekleri

➤ 5°C, 10°C ve 20°C sıcaklıklarında 90 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ve Bold 1NV ortamında üretilen *C. nivalis* sıcaklık denemesi liyofilize örnekleri

- Panel, Tübüler ve KT FBR denemesi örnekleri HPLC öncesi ekstraksiyonu yapıldı.

Spot ışık stresindeki kültürlerden alınan örnekler HPLC analizi için 0,03-0,06 g aralığında tartılarak örnek 15 ml'lik falkon tüplere tartılarak 1:1(w/w) oranda olacak şekilde CaCO_3 eklendi. Üzerlerine 1'er spatul 1 mm çapında cam boncuklar eklendi. HPLC metanol solüsyonu (%0,01 w/v pyrogallol) her bir örneğe 5 ml olacak şekilde eklenerek 5 dk boyunca vortekslendi. Falkon tüpler 30°C'de 10 dk sonik banyoda tutulduktan sonra 5500 rpm'de 5 dk+5 dk olarak santrifüj edildi. Hücrelerin dipte beyaz çökelti verdiğinin gözlenmesiyle birlikte üstteki sıvı süpernatant fazı enjektör yardımıyla alındı; 1:3 oranında seyreltilerek hazırlanan 1,5 ml örnek 0,45 μm PTFE filtreden geçirilerek HPLC vialine aktarıldı. Etiketlenen vialler HPLC-DAD cihazına yerleştirilerek analiz sonuçları her örnek için yaklaşık 1 saat sonunda alındı.

HPLC analizi için 0,02 g kadar liyofilize örnek 15 ml'lik falkon tüplere tartılarak 1:1(w/w) oranda olacak şekilde CaCO_3 eklendi. Üzerlerine 1'er spatul 1 mm çapında cam boncuklar eklendi. HPLC metanol solüsyonu (%0,01 w/v pyrogallol) her bir örneğe 10 ml olacak şekilde eklenerek 5 dk boyunca vortekslendi. Falkon tüpler 30°C'de 10 dk sonik banyoda tutulduktan sonra 5500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Hücrelerin dipte beyaz çökelti verdiğinin gözlenmesiyle birlikte üstteki sıvı süpernatant fazı enjektör yardımıyla alındı; seyreltilmeden 1,5 ml örnek 0,45 μm PTFE filtreden geçirilerek HPLC vialine aktarıldı. Etiketlenen vialler HPLC-DAD cihazına yerleştirilerek analiz sonuçları her örnek için yaklaşık 1 saat sonunda alındı.

3.10.7.3.HPLC yöntemi ve analizi

Ekstraksiyon sonrası hazırlanan örnekler Thermo Accela U-HPLC otomatik örnekli sistemde, diode array detektör (DAD) ve quaternary pompa ile (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) analiz edildi. Ekstrakt içinde bulunan karotenoitlerin sıvı kromatografi ile ayrılması ve tayini için YMC karotenoit kolon (250 x 4,6 mm) tercih edildi (Erdogan, et al., 2015). DAD dedektörü sayesinde ayırma sırasında karotenoitlere ait absorbans spektrumu 300-600 nm aralığında elde edildi.

Thermo Scientific HPLC ile 250×4,6 mm C18 (YMC) kolonu kullanılarak karotenoit içeriği analiz edildi. Kullanılan mobil faz Solvent A: diklorometan (DCM) : metanol (MeOH) : asetonitril (ACN) : su (5:85:5,5:4,5) ve Solvent B: diklorometan (DCM) : metanol (MeOH) : asetonitril (ACN) : su (22:28:45,5:4,5) şeklindedir. Akış hızı 1 mL/dak olup, akış gradienti; % 0 Solvent B → 8 dakika, %0 - % 100 Solvent B → 12 dakika, % 100 Solvent B → 50 dakika olarak belirlendi (Erdogan, et al., 2015). Klorofil-a 400 nm, klorofil-b 450 nm, violaksantin 450 nm ve astaksantin 480 nm değerlerinde analiz edildi. Çıkan sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

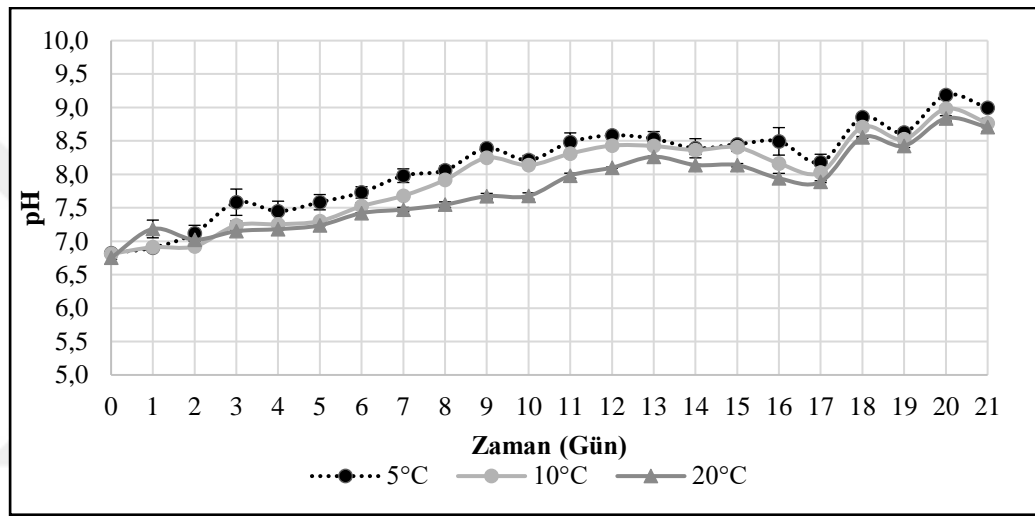
$$\text{HPLC karotenoit miktarı (mg/g)} = \frac{\text{HPLC değeri(ppm)} \times \text{Çözelti hacmi(L)}}{\text{Örnek kuru kütlesi (g)}} \times \text{Seyreltme faktörü}$$

4.BULGULAR

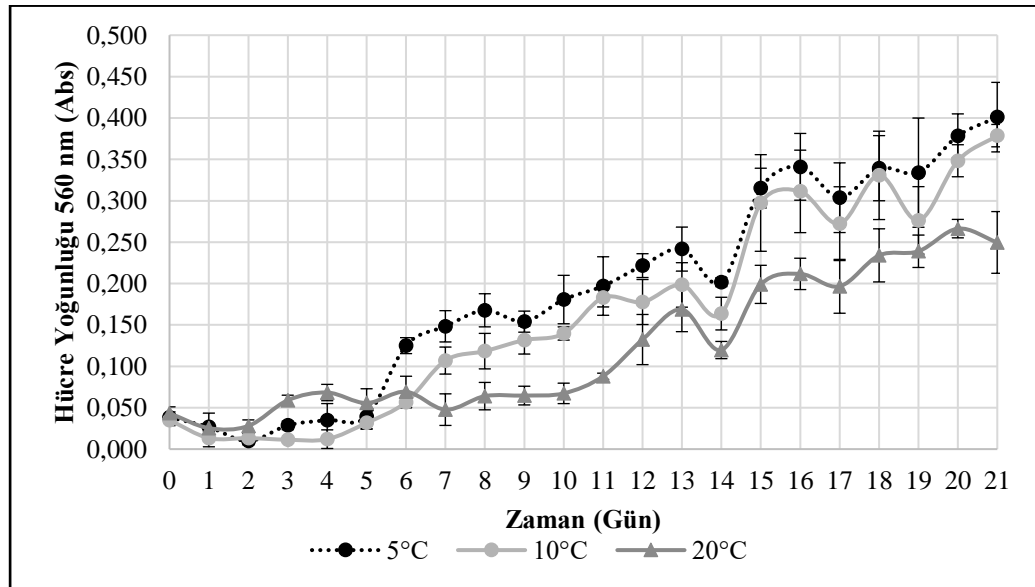
4.1.Erlenmayerde *C. nivalis* Üretimi Analizi

Erlenmayerlerde yapılan *C. nivalis* üretimine sıcaklık etkisinin incelendiği denemede hücreler 21 gün boyunca analizler ile takip edildi.

Erlenlerdeki günlük pH ölçümlerine göre 6.8-9 pH aralığında seyrettiği (Şekil 4.1) ve kültürün başından sonuna doğru arttığı; 14, 17 ve 19. günlerde hücre yoğunluğu (Şekil 4.2) ve hücre sayımı (Şekil 4.3) değerlerindeki düşüşlerle paralel şekilde azalış gösterdiği görüldü.

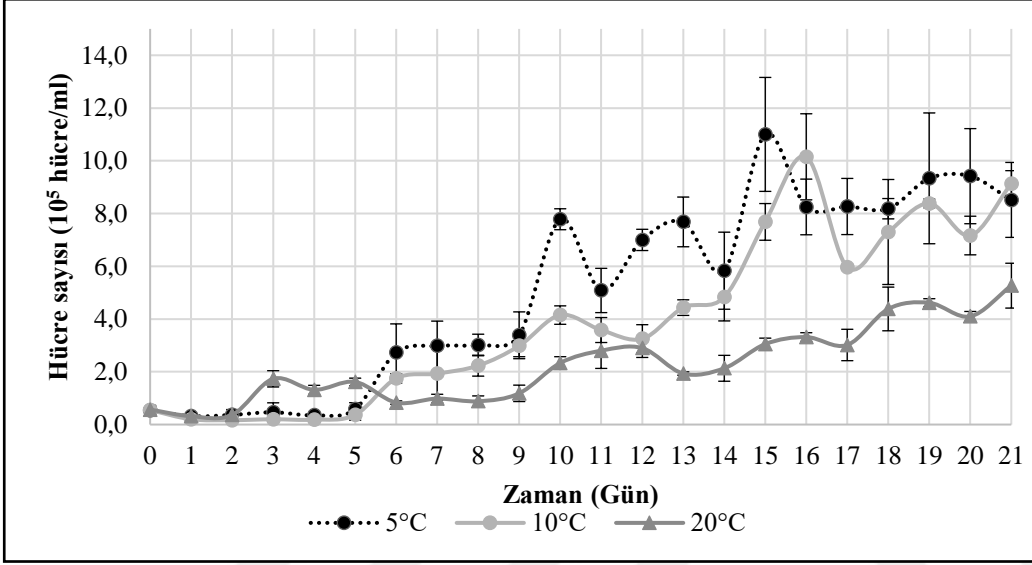


Şekil 4.1 Farklı sıcaklıklarda *C.nivalis* erlen kültürü pH grafiği



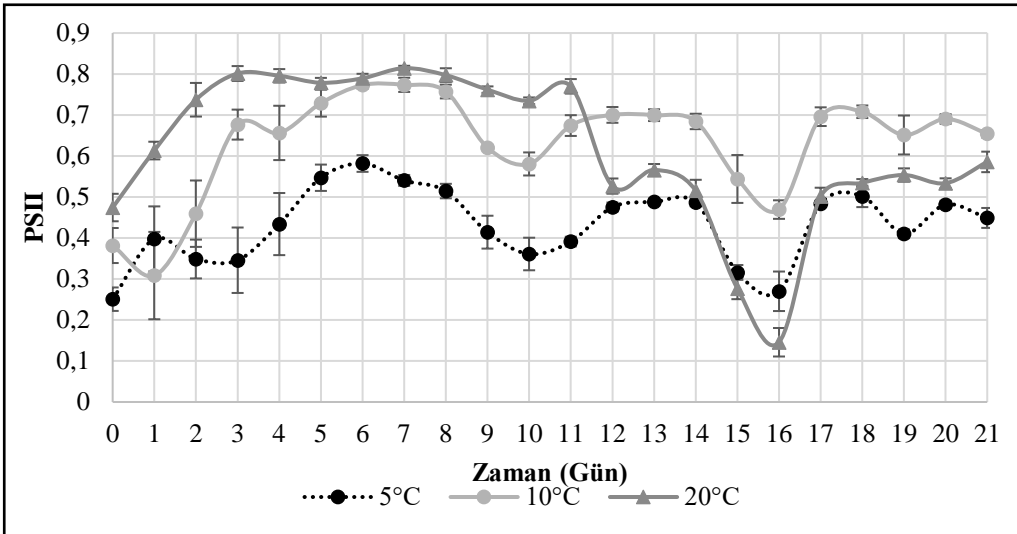
Şekil 4.2 Farklı sıcaklıklarda *C.nivalis* erlen kültürü hücre yoğunluğu grafiği

Hücre yoğunluğunun 560 nm'deki absorbans ölçümlerine göre 14. günde ani bir azalış görüldü. Hücreler inokulasyondan sonra ortama alışmaya çalıştığı ve ilk log fazına geçerek artış gösteren kültürün 20°C'daki erlen olsa da 6. günden itibaren 5°C'daki kültür, örneğin en son alındığı 21. güne kadar da en fazla hücre yoğunluğuna sahip olduğu görüldü (Şekil 4.2). Hücre sayısı grafiğinde de benzer şekilde görülse de örneğin alındığı son 21. günde 10°C'daki kültürdeki hücre sayısının daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.3).

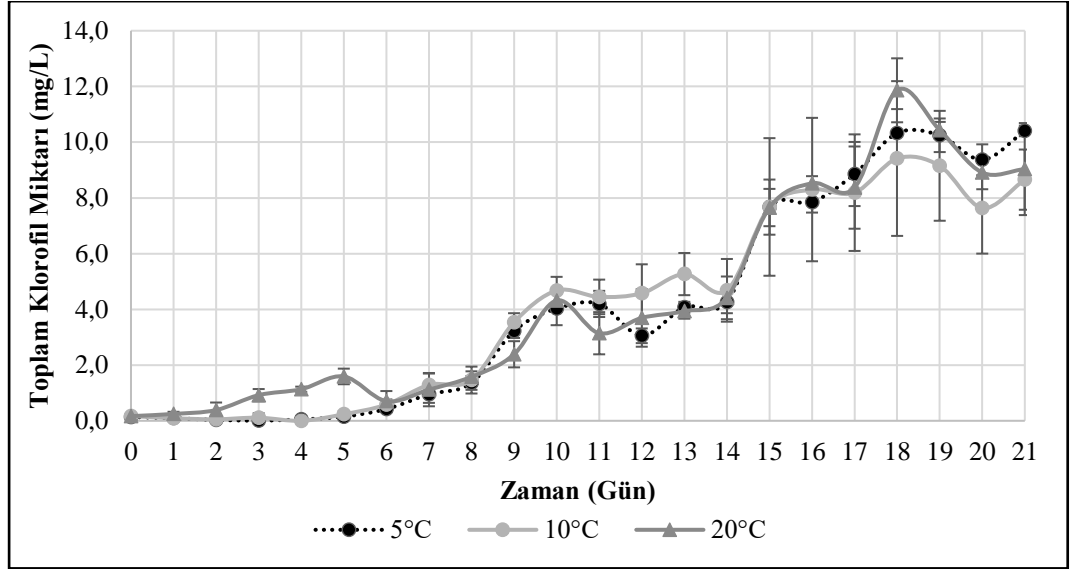


Şekil 4.3 Farklı sıcaklıklarda *C. nivalis* erlen kültürü hücre sayısı grafiği

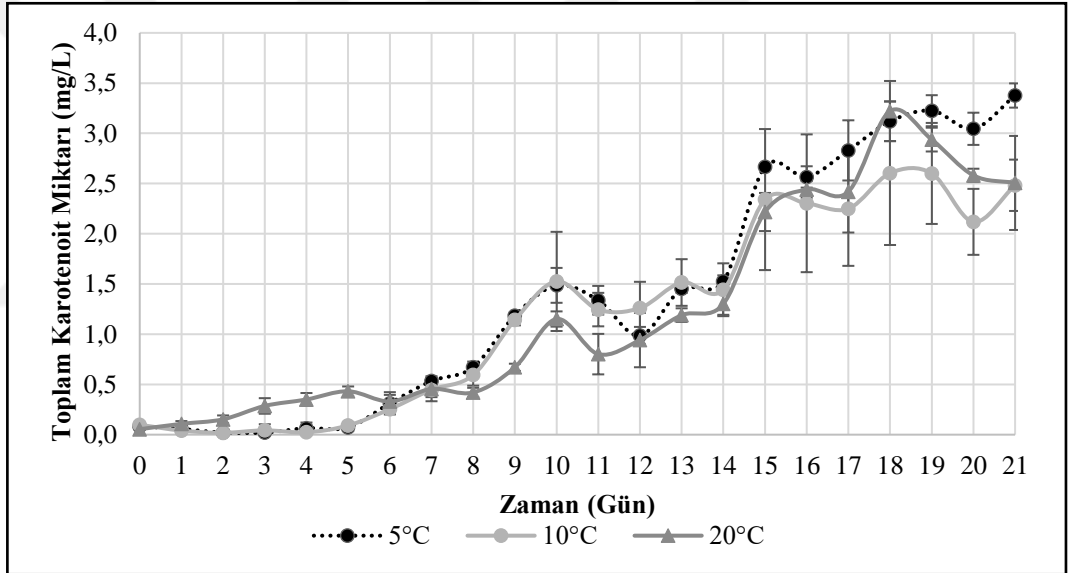
Erlendeki sıcaklık denemesinde kültürlerin fotosentetik aktivitesi 6. güne kadar genelde arttığı ancak bu günden sonra azaldığı görüldü (Şekil 4.4). Son 5 günde fotosentetik aktivitesi en yüksek kültür 10°C iken en düşük 5°C'daki kültürdür (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Farklı sıcaklıklarda *C. nivalis* erlen kültürü fotosentetik aktivite grafiği



Şekil 4.5 Farklı sıcaklıklarda *C. nivalis* erlen kültürü toplam klorofil miktar grafiği



Şekil 4.6 Farklı sıcaklıklarda *C. nivalis* erlen kültürü toplam karotenoit miktar grafiği

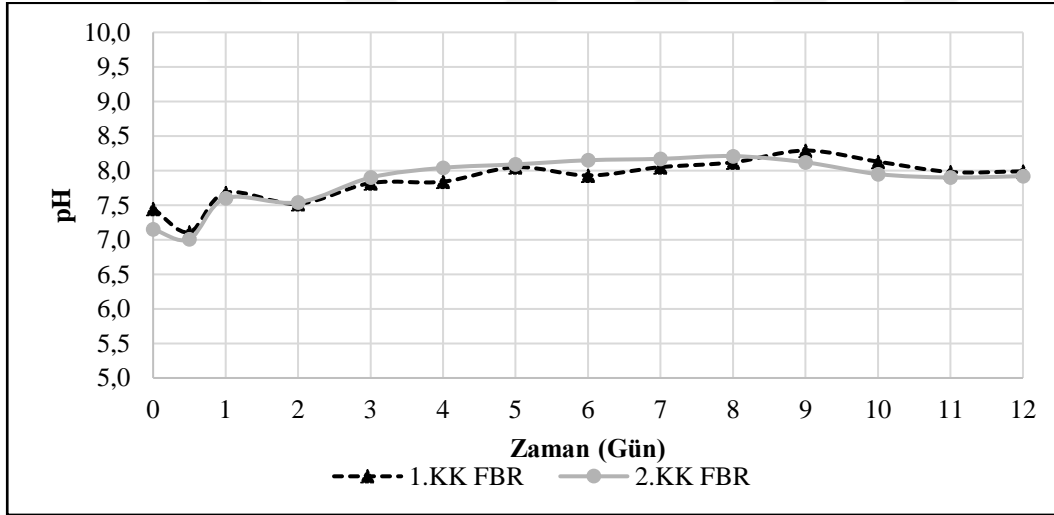
Toplam klorofil ve karotenoit analizinde farklı sıcaklıklardaki üretimlerden 20°C'deki kültürde 11,86 mg/L olarak en fazla toplam klorofil üretimi 18. günde sağlanmışken, 5°C'deki erlenmayeherlerin toplam klorofili 18 ve 19. günde en fazla değerlerine ulaşmış ardından tekrar artarak 21.günde 10,40 mg/L olarak elde edildi. 10°C'deki üretimde ise 9,41 mg/L olarak 18. günde en fazla değere ulaşıldı (Şekil 4.5). Toplam karotenoit karşılaştırıldığında ise en fazla üretim sırasıyla 5°C'da 3,38 mg/L 21. günde; 20°C'da 3,22 mg/L 18. günde ve 10°C'da 2,60 mg/L olarak 18. günde elde edildi (Şekil 4.6). Bu sonuçlara göre farklı sıcaklıklardaki erlenmayeherlerde yürütülen denemede en düşük (5°C) ve en yüksek (20°C) sıcaklıklarda toplam karotenoit miktarı fazladır. 10°C'da karıştırma sağlanamadığından dolayı üretim diğer iki sıcaklığa göre daha düşük kalmıştır.

PSII'deki azalmaya bağlı olarak toplam karotenoit miktarında artış beklenmektedir. 21. gündeki düşüş 5°C'daki maksimum karotenoit eldesiyle uyumlu bir sonuçtur.

4.2.Kabarcık Kolon Fotobiyoreaktörlerde *C. nivalis* Üretimi Analizi

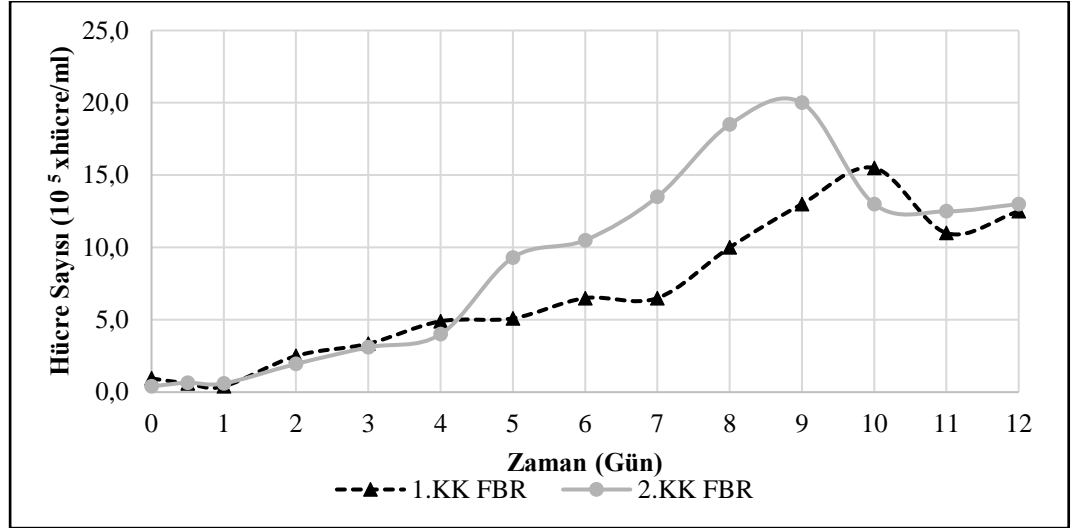
C. nivalis'in 500 ml hacimde kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerdeki ilk üretimi boyunca kültürün analizleri takip edildi. Hücre sayısı, spektrofotometrik hücre yoğunluğu ve kuru ağırlık analizleri arasında birbirini destekler bir uyum görülemedi. Özellikle kuru ağırlık tayininde birbirini takip eden azalış ve artışlar yeterli bilgiyi sunmamıştır. Bunun nedeni filtreden örnek kaybı, terazide hata ya da etüvdeyken örneklerin aşırı ısınması gibi sorunlar olabilir.

KK FBR'de 12 gün boyunca yapılan pH takibinde pH değerinin iki reaktörde de paralel şekilde genelde 7-8 aralığında seyrettiği görüldü (Şekil 4.7).



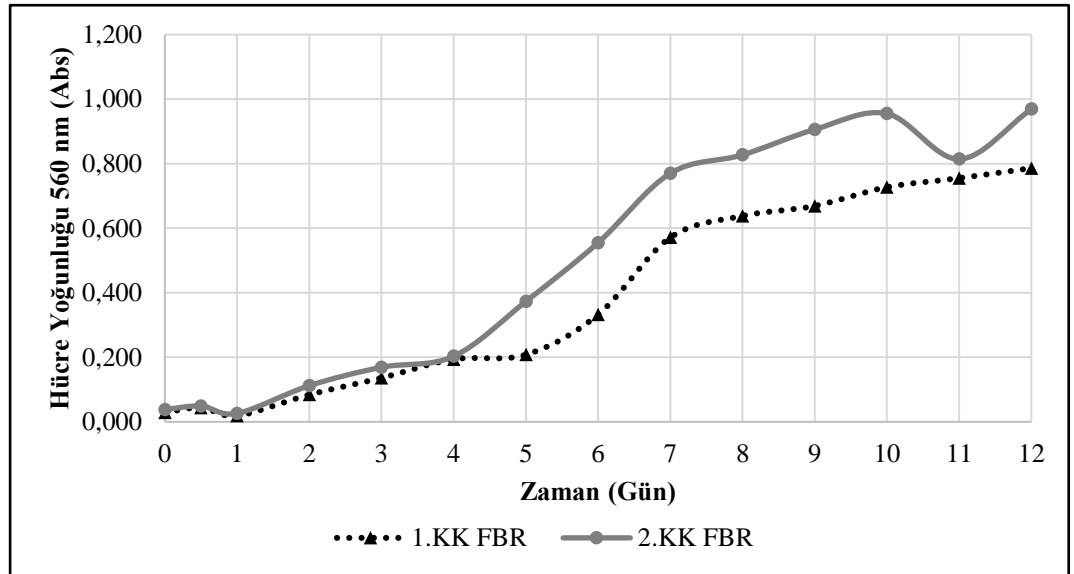
Şekil 4.7 KK FBR'de *C.nivalis* üretimi pH grafiği

Mikroskopta Thoma lamıyla yapılan hücre sayımında 1. Kabarcık Kolon FBR'nin en fazla hücre sayısına 10. günde $1,6 \times 10^6$ hücre/ml; 2. KK FBR'de ise 9. günde $2,0 \times 10^6$ hücre/ml olarak elde edildi. Üretimlerdeki hücre sayısı bu günlerden sonra hızla düşmüştür, net bir stasyonere faz görülemedi (Şekil 4.8).



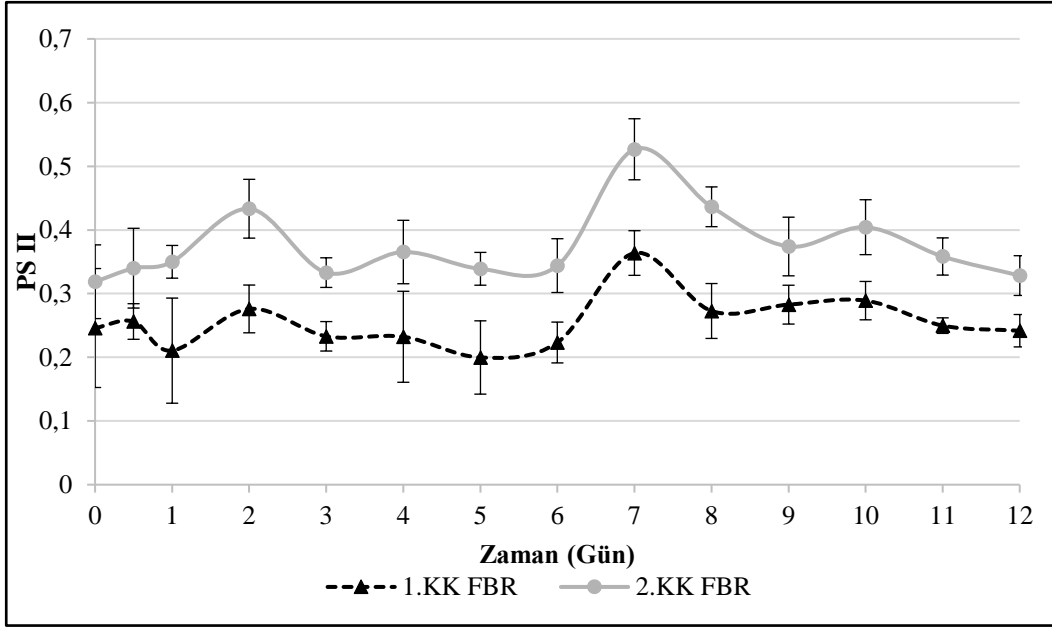
Şekil 4.8 KK FBR'de *C. nivalis* üretimi hücre sayısı grafiği

Spektrofotometrede 560 nm'de ölçülen hücre yoğunluğu absorbans değerleri Thoma lamıyla yapılan hücre sayımında da olduğu üzere hücreler 1 gün lag fazında adaptasyon geçirmişlerdir, 1. günden sonra absorbans değerleri artmaya başlamıştır. Hücre sayımından farklı olarak 2. reaktör 4. günde üreme hızı 1. reaktöre göre daha fazladır ve üretimler 7. günde artış oranı azalsa da 10. güne kadar devam etmiştir. 7. günden sonra üretimlerin stasyoner fazda olduğu söylenebilir. En fazla dansiteye 10. güne ulaştıktan sonra hücre yoğunluğu ani şekilde azalmış sonra tekrar artmıştır (Şekil 4.9).

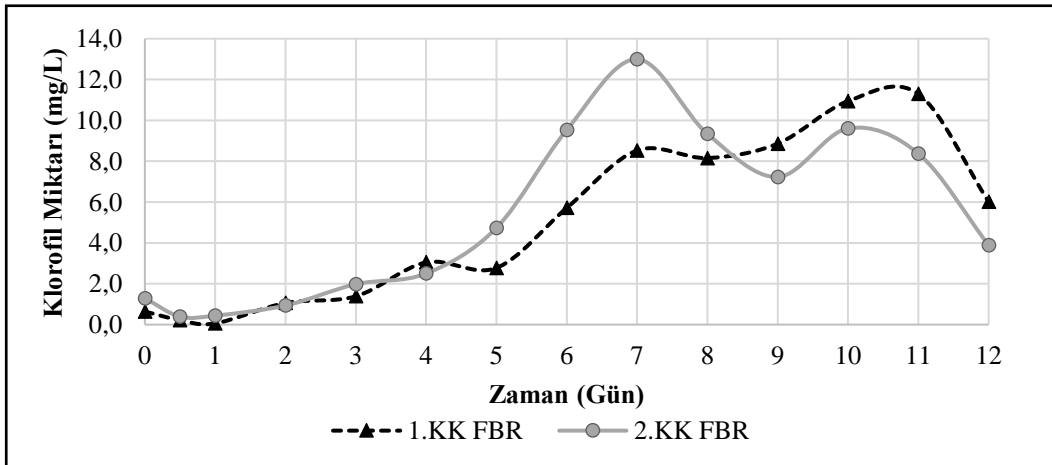


Şekil 4.9 KK FBR'de *C. nivalis* üretimi hücre yoğunluğu grafiği

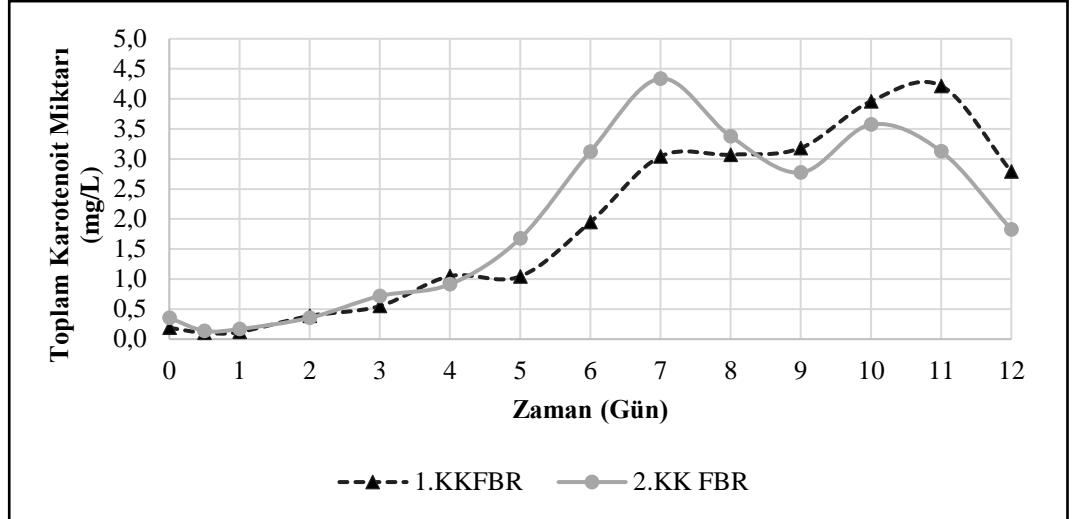
Fotosentetik aktivite grafiğine göre 2. KK FBR üretim boyunca daha yüksek fotosentetik aktivite göstermiştir (Şekil 4.10). Birim hacim (L) başına 1. reaktörde klorofil ve karotenoit miktarı 11. güne kadar artmış olsa da en hızlı artış 5-7. günler arasında olmuştur. Toplam klorofil ve karotenoit grafikleri benzer şekilde görülmüştür (Şekil 4.11 ve 4.12). Fotosentetik aktivitedeki 7. güne kadarki artış ile klorofil miktarındaki artış uyusmaktadır. Ancak bu günlerde karotenoit değişim grafiğinin ters orantıyla azalması beklenmekteydi. Bu durum sadece 1.KK FBR’de 7. günden sonra azalan fotosentetik aktiviteye bağlı olarak toplam karotenoit artışının gözlenmesiyle elde edilmiştir.



Şekil 4.10 KK FBR’de *C. nivalis* üretimi fotosentetik aktivite grafiği



Şekil 4.11 KK FBR’de *C. nivalis* üretimi toplam klorofil miktar grafiği

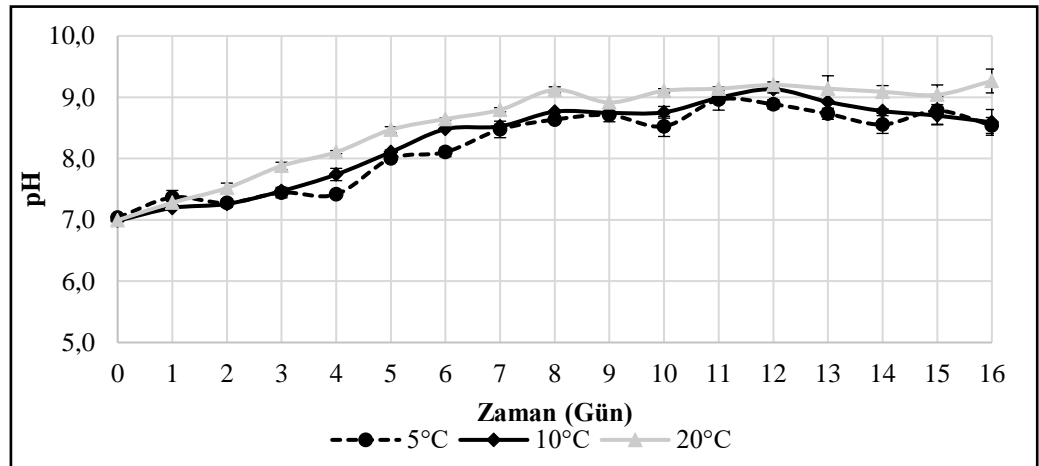


Şekil 4.12 KK FBR’de *C. nivalis* üretimi toplam karotenoit miktar grafiği

4.2.1.Farklı sıcaklıkların *C. nivalis*’in üretimine etkisi

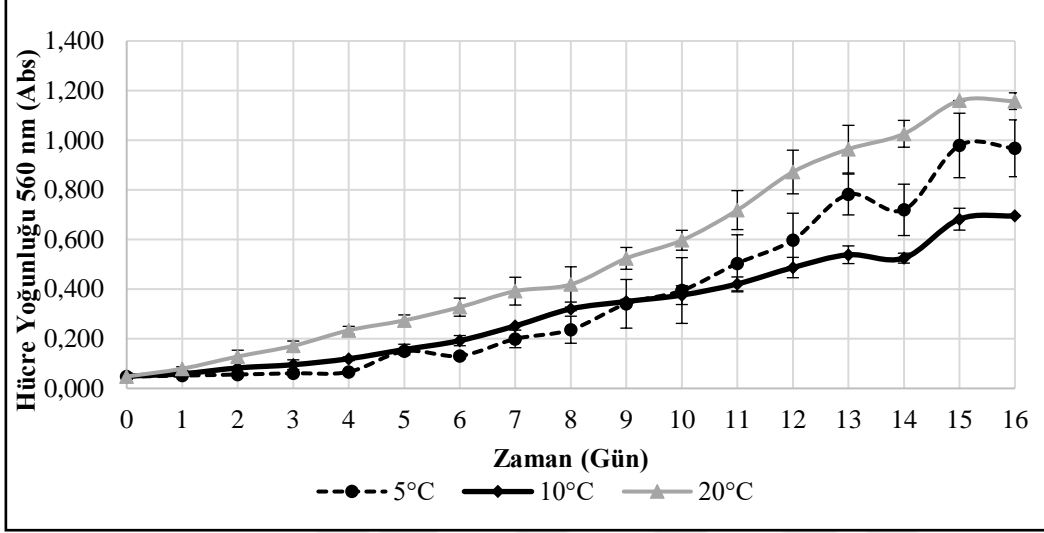
Üretimlerin birbirleriyle paralel bir şekilde yürütülerek kontrollü deney şartlarının sağlanabilmesi amacıyla erlendeki sıcaklık denemesi KK FBR’lerde tekrar edilmiştir. Buna göre karıştırma ve homojenizasyonun havalandırma ile sağlandığı sistemde sıcaklıklar 5, 10 ve 20°C’da yapılmak istenmiştir. Ancak sirkülatörler yardımıyla sıcaklıklar bu değerlere indirilememiştir. 8 ± 0.7 , 12 ± 0.7 ve 20 ± 0.3 °C olarak kültür şartları ayarlanabilmiştir.

16 günlük üretim boyunca pH 7-9 aralığında seyretmiş ve özellikle 7. güne kadar artış görülmüştür (Şekil 4.13).



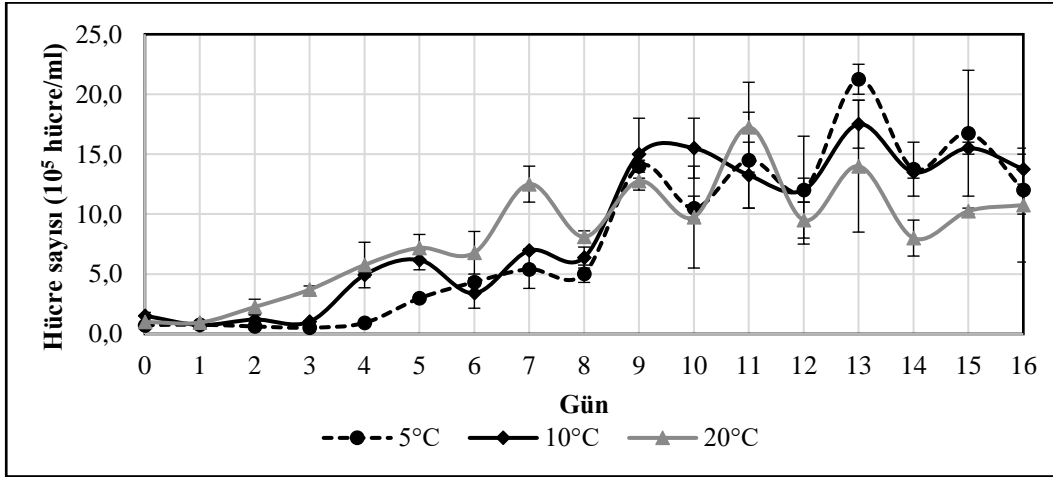
Şekil 4.13 KK FBR’de sıcaklık denemesi pH grafiği

Hücre yoğunluğunun 560 nm'deki absorbans ölçümlerine göre hücreler 5°C'daki kültürde 4. güne kadar adaptasyon için lag fazında kalmıştır. Lag fazını en hızlı geçen 20°C'daki kültürdür, daha sonra onu 10°C'daki kültür takip etmektedir. 15. günde log fazın sonuna gelerek stasyoner faza girmişlerdir (Şekil 4.14).



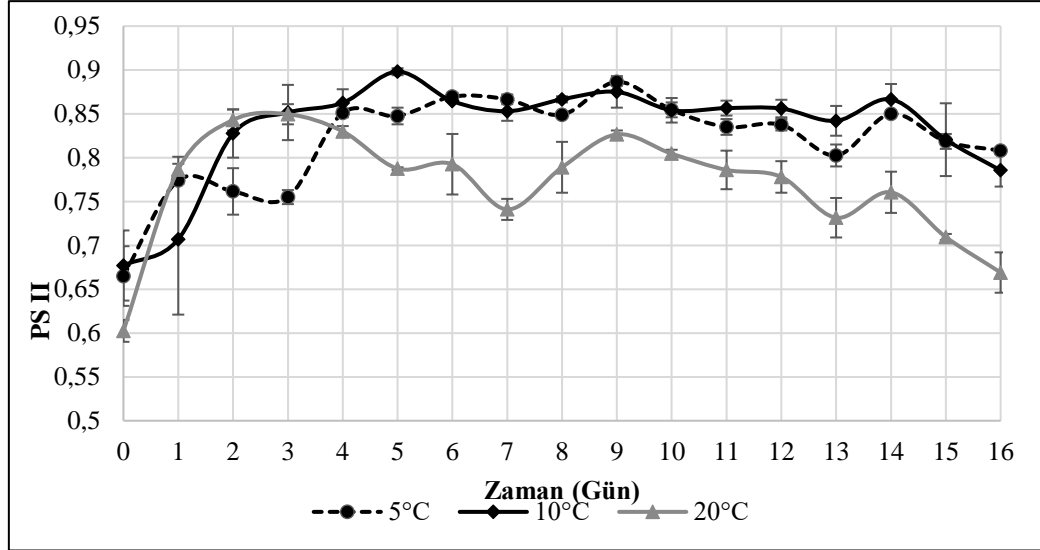
Şekil 4.14 KK FBR'de sıcaklık denemesi hücre yoğunluğu grafiği

Thoma lamında yapılan hücre sayısı grafiğine göre ise günlük dalgalanmalar fazladır (Şekil 4.15), bu yüzden hücre yoğunluğu grafiği dikkate alınmıştır.



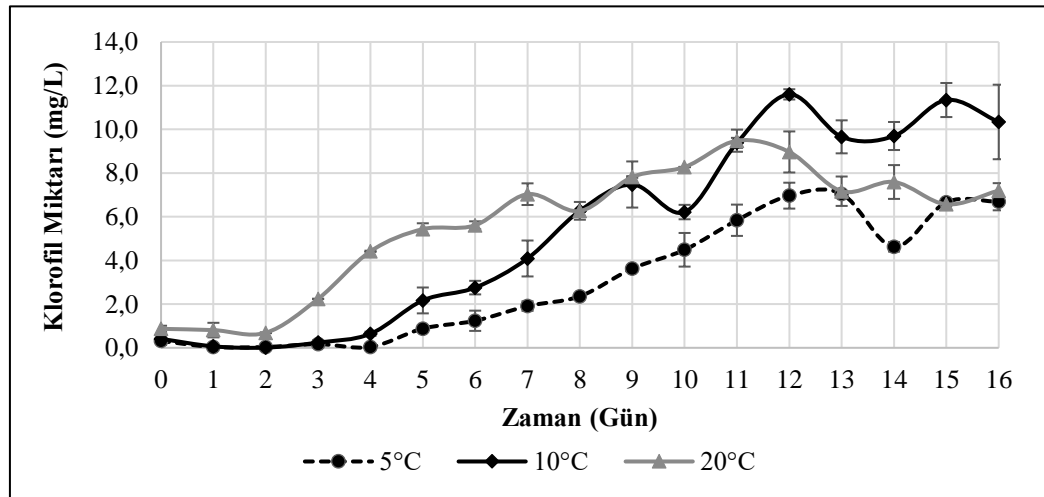
Şekil 4.15 KK FBR'de sıcaklık denemesi hücre sayısı grafiği

Fotosentetik aktivitenin 20°C'daki üretimin 13. gününde düştüğü sırada karotenoit miktarı en fazla değere ulaşmıştır (Şekil 4.16).

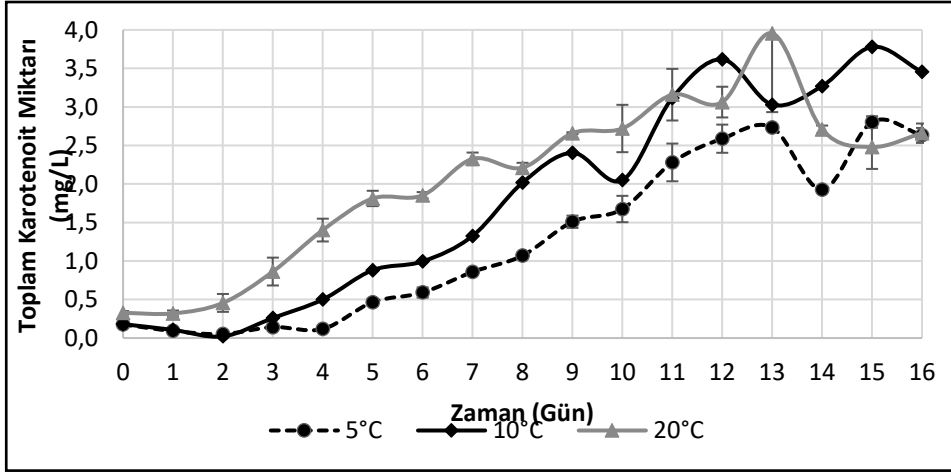


Şekil 4.16 KK FBR'de sıcaklık denemesi fotosentetik aktivite grafiği

Toplam klorofil ve karotenoit miktarları 16 gün boyunca takip edilen kültürlerin toplam klorofil miktarları sırasıyla en fazla 10°C'da kültürün 12. gününde 11,60 mg/L; 20°C'da kültürün 11. gününde 9,48 mg/L; 5°C'da kültürün 13. gününde 7,05 mg/L olarak bulunmuştur (Şekil 4.17). Toplam karotenoit miktarları ise sırasıyla en fazla 20°C'da kültürün 13. gününde 3,96 mg/L; 10°C'da kültürün 15. gününde 3,78 mg/L ve 5°C'da kültürün 15. gününde 2,81 mg/L olarak üretilmiştir (Şekil 4.18). Bu sonuç bize beklenildiği gibi klorofil miktarında düşüş sonrası karotenoit artışını gösterir (Weiss, 1983b; Czygan, 1970; Harris'ten, 1988; Lutz, et al., 2015).



Şekil 4.17 KK FBR'de sıcaklık denemesi toplam klorofil miktar grafiği

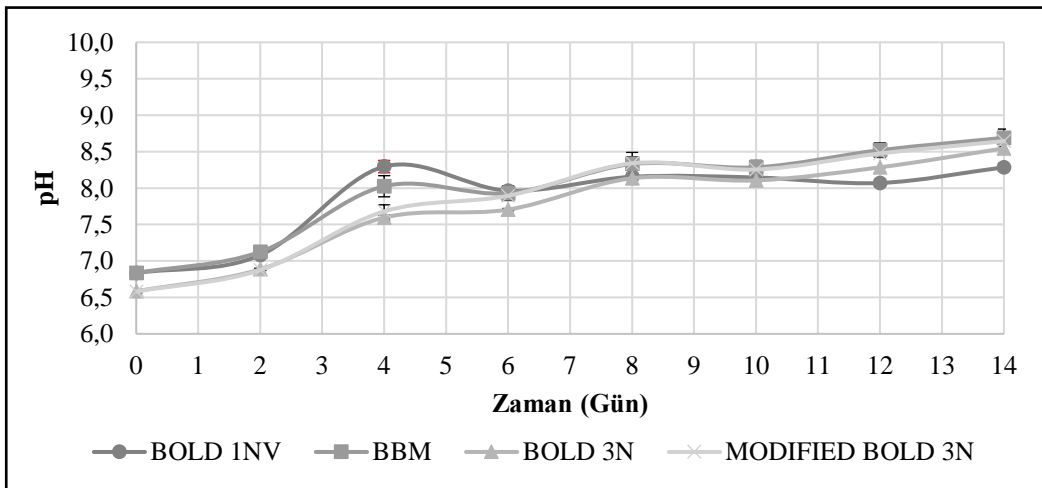


Şekil 4.18 KK FBR'de sıcaklık denemesi toplam karotenoit miktar grafiği

4.2.2. Farklı besin ortamlarının *C. nivalis*'in üretimine etkisi

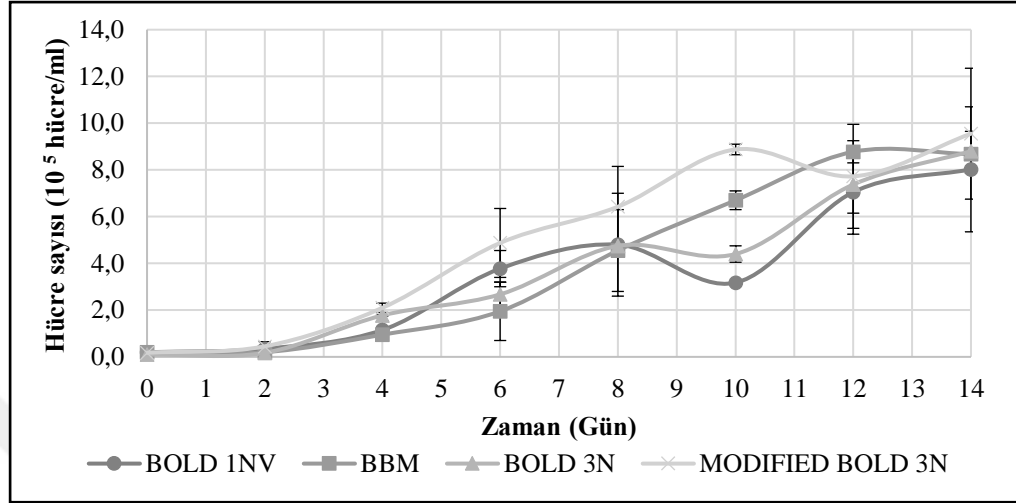
Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde yapılan farklı vitamin içerikleri olan 4 adet ortamda yapılan denemede *C. nivalis* üretimi günlük takip edilmiştir.

KK FBR'de farklı içerik ve pH değerlerine sahip besin ortamlarının *C. nivalis* üretime etkisinin araştırıldığı denemede 14 gün boyunca alınan örneklerde zamanla pH değerinde artış olduğu ve çoğunlukla değerlerin 6.5-8.5 aralığında kaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.19).



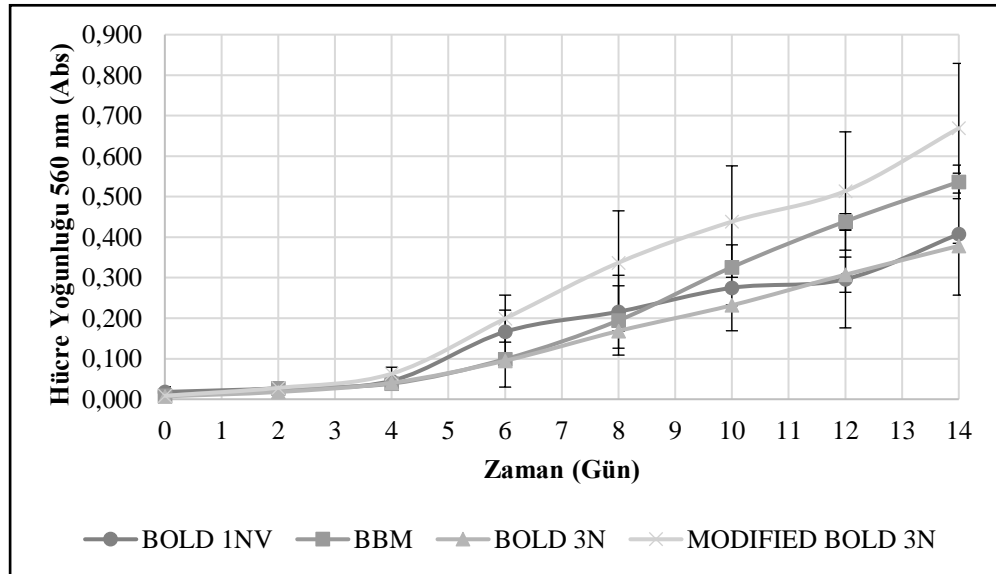
Şekil 1.19 KK FBR'de besin ortamı denemesi pH grafiği

Hücre sayısı üretim boyunca genellikle artsa da BBM ortamı için en yüksek değerine 12. günde ulaşarak stasyoner faza girmiş, ancak diğer ortamlar için bu kadar net bir sonuca varılamamıştır. Modifiye Bold 3N ortamı bu denemede 14. günde en yüksek hücre sayısı değerine ulaşan besin ortamı türüdür (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 KK FBR'de besin ortamı denemesi hücre sayısı grafiği

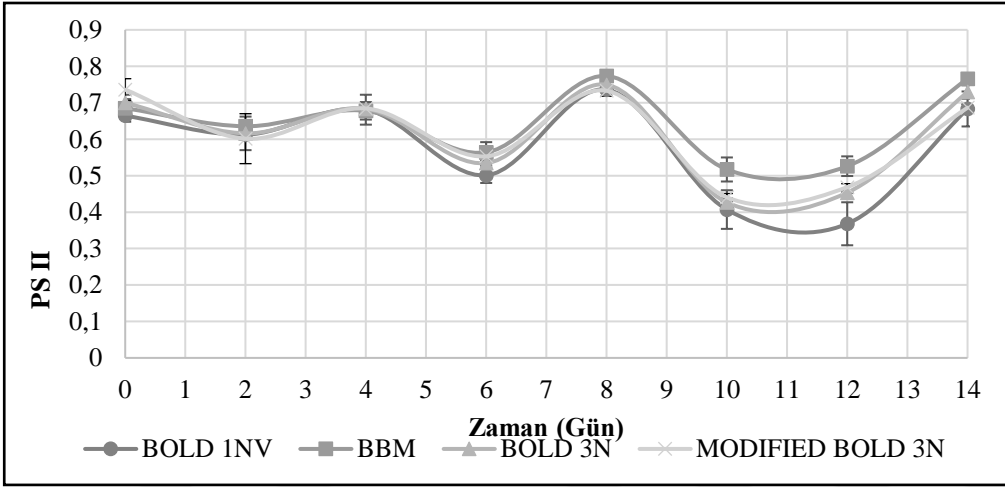
560 nm'de ölçülen hücre yoğunluğu absorbans değerlerine göre hücreler 4 farklı ortam için de ilk 4 gün lag fazında kalmış, ardından logaritmik faza geçmiştir. En yüksek hücre yoğunluğu sırasıyla Modifiye Bold 3N, BBM, Bold 1NV ve Bold 3N olarak bulunmuştur (Şekil 4.21).



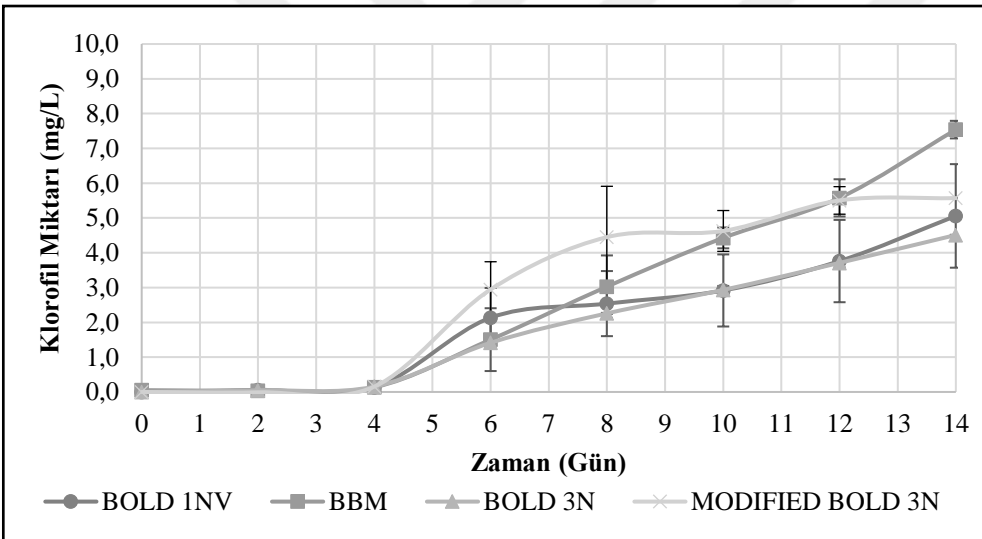
Şekil 4.21 KK FBR'de besin ortamı denemesi hücre yoğunluğu grafiği

Hücrelerin fotosentetik aktivitesi zamanla birlikte yer yer artıp azalmıştır. Klorofil ve karotenoit miktar grafikleriyle örtüşmese de 4 farklı ortam birbirine benzer eğriler çizmiştir (Şekil 4.22). En yüksek klorofil miktarı 7.5 mg/L (Şekil

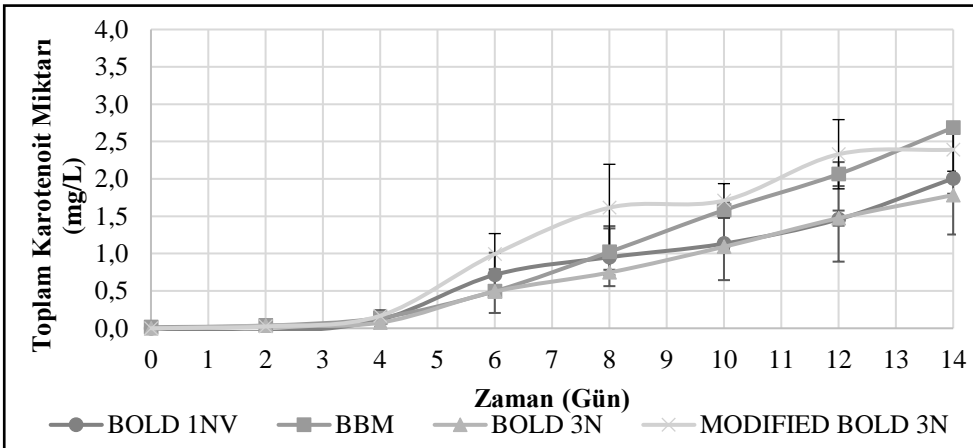
4.23) ve karotenoit miktarı BBM'de 2,69 mg/L olarak 14.günde elde edilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.22 KK FBR'de farklı besin ortamları denemesi fotosentetik aktivite grafiği



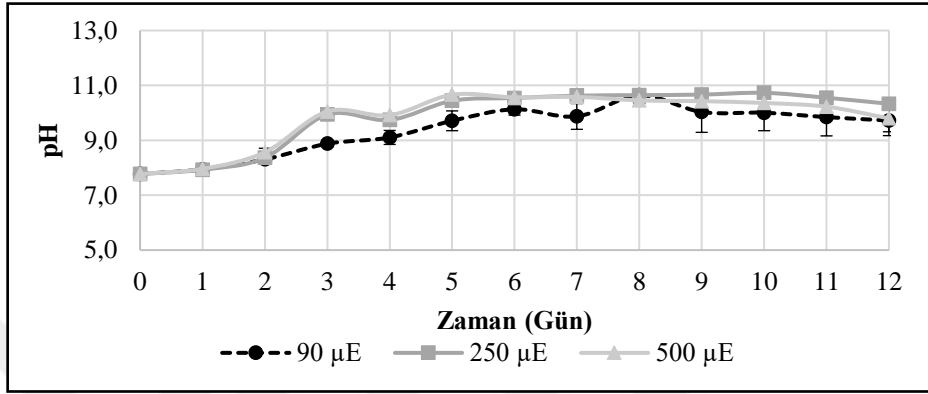
Şekil 4.23 KK FBR besin ortamı denemesi toplam klorofil miktar grafiği



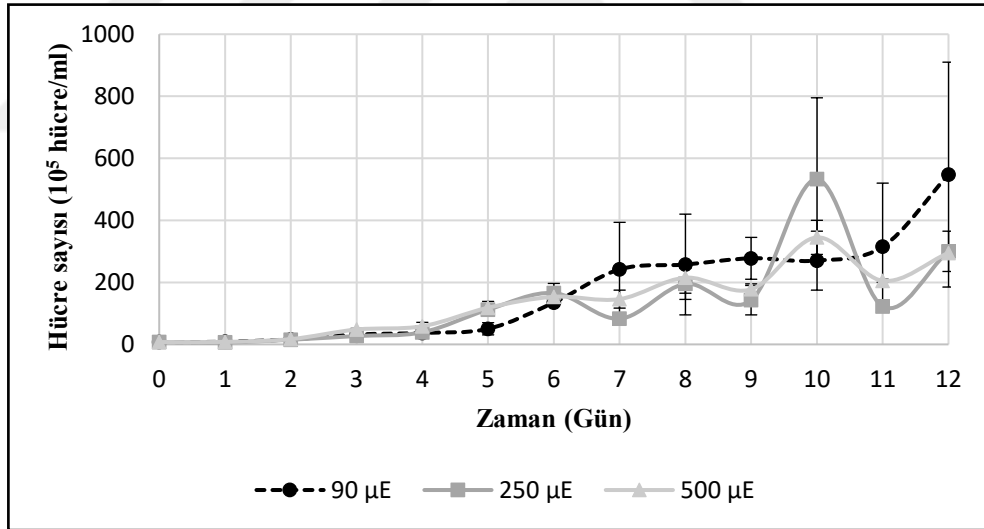
Şekil 4.24 KK FBR besin ortamı denemesi toplam karotenoit miktar grafiği

4.2.3.Farklı ışık şiddetlerinin *C. nivalis*'in üretimine etkisi

Bold 1NV besin ortamında 90, 250 ve 500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde yapılan denemede pH değeri 7.8-11 aralığında bazik bir ortamda seyretmiştir (Şekil 4.25). Hücre sayımında ise 12. günde 90 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetindeki ortamda en fazla hücre sayısına (5.5×10^7 hücre/ml) ulaşılmıştır (Şekil 4.26).

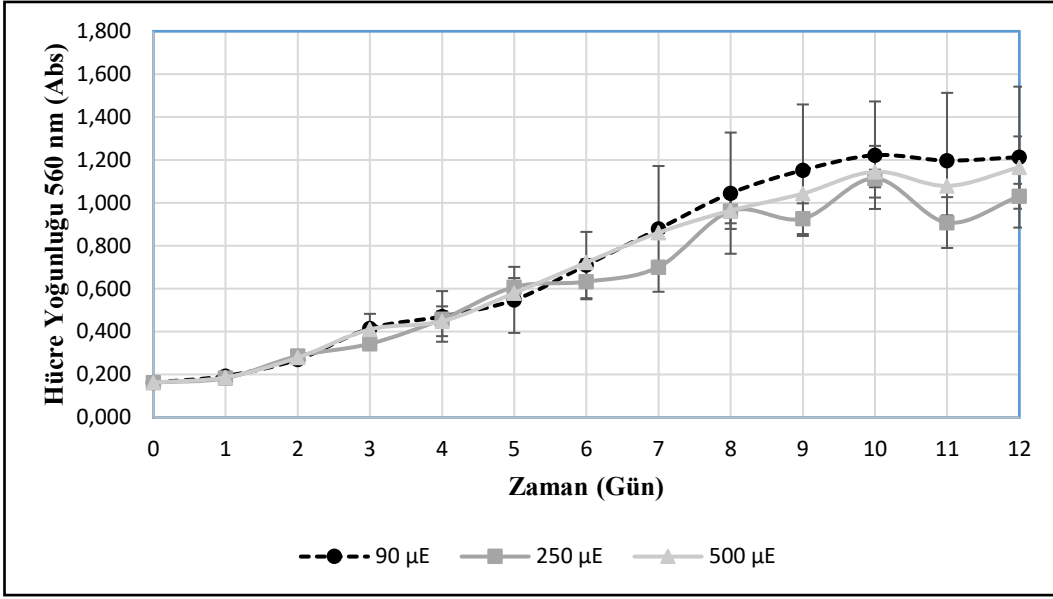


Şekil 4.25 KK FBR'de ışık şiddeti denemesi pH grafiği



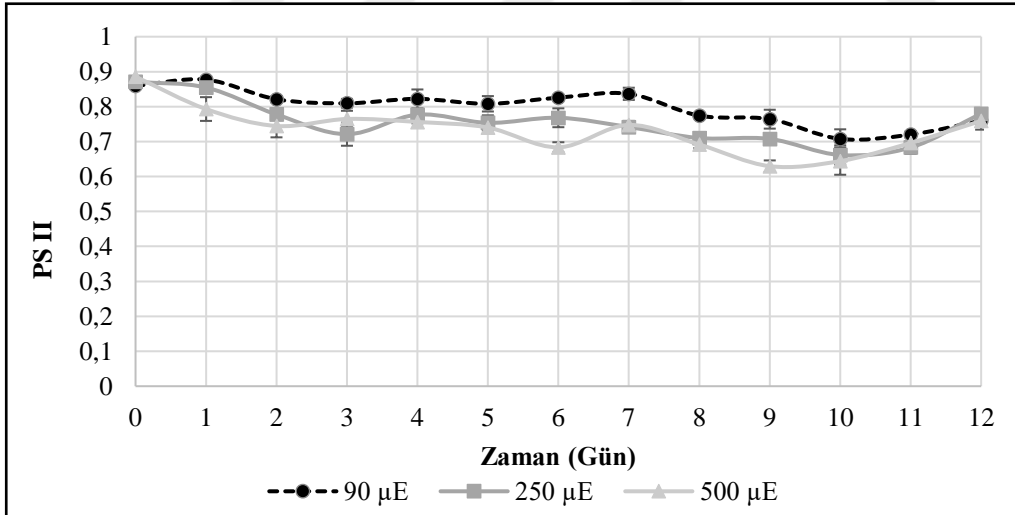
Şekil 4.26 KK FBR'de ışık şiddeti denemesi hücre sayısı grafiği

Hücre yoğunluğu ölçümlerinde 1 gün boyunca lag fazında kalan hücrelerin daha sonra arttığı, 90 ve 500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetindeki kültürlerin 10. günde stasyoner faza girdikleri ancak 250 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetindeki kültürün grafiğinde dalgalanmalar olduğu görüldü (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 KK FBR'de ışık şiddeti denemesi hücre yoğunluğu grafiği

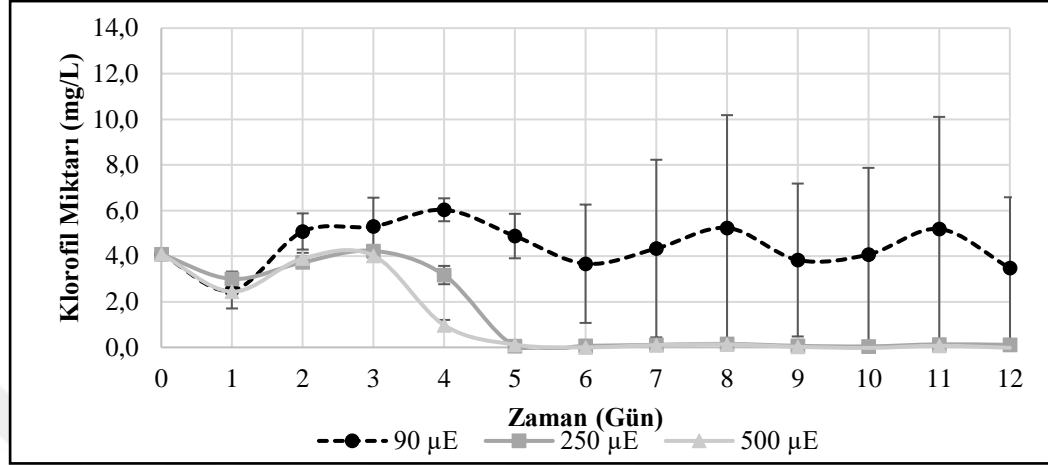
Kültürlerin ilk günden itibaren fotosentetik aktivitelerinde genel olarak azalış görülmüştür, ancak 90 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'teki kültürün daha yüksek bir aktivitede seyrettiği söylenebilir de son gün olan 12. günde tüm kültürler için yakın değerlerde bitmiştir (Şekil 4.28).



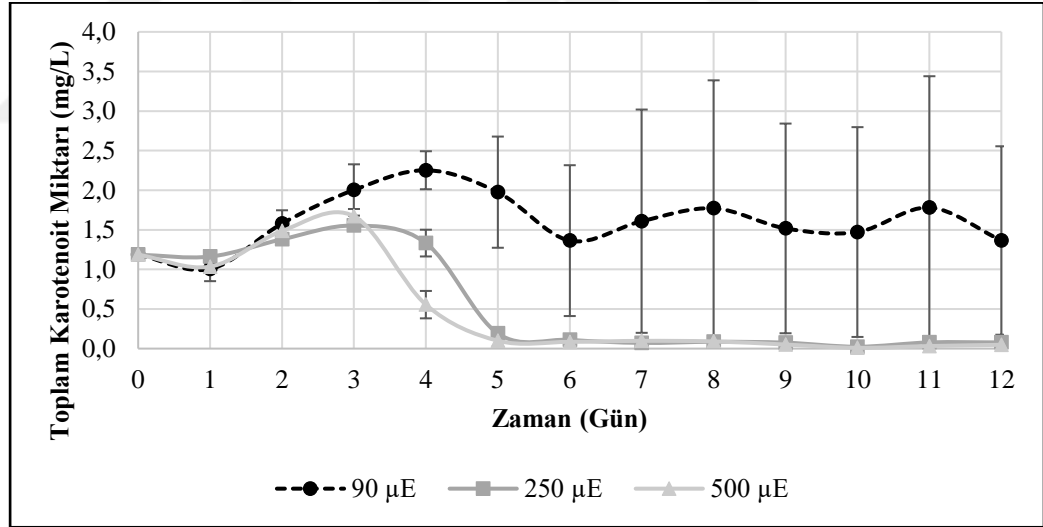
Şekil 4.28 KK FBR'de ışık şiddeti denemesi fotosentetik aktivite grafiği

250 ve 500 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'teki kültürlerin 3. gününde toplam klorofil ve karotenoid miktarları en yüksek değere ulaştıktan sonra azalarak 5. günde 0 değerine yaklaşmıştır (Şekil 4.29 ve 4.30). Toplam klorofil ve karotenoid miktarlarının karşılaştırılması ile 90 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 6,03 mg/L toplam klorofil ve 2,25 mg/L toplam karotenoid en fazla elde edilmiştir. Buna göre daha düşük ışık

şiddeti klorofil ve karotenoit üretiminde artışa neden olarak beklenenin aksine sonuç elde edilmiştir. Hücre yoğunluğu karşılaştırılan üretimlerde klorofil ve toplam karotenoit miktarı ile paralel şekilde 90 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde en iyi sonuç elde edilmiştir.



Şekil 4.29 KK FBR'de ışık şiddeti denemesi toplam klorofil miktar grafiği

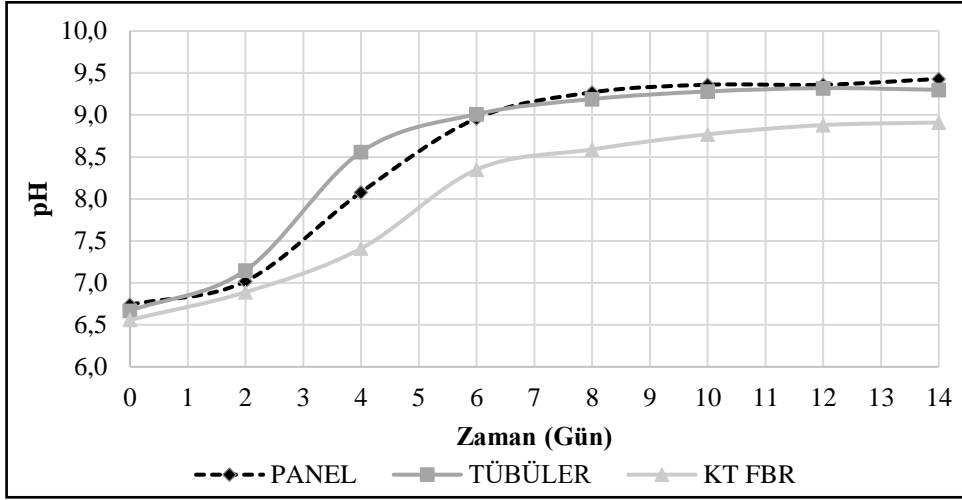


Şekil 4.30 KK FBR'de ışık şiddeti denemesi toplam karotenoit miktar grafiği

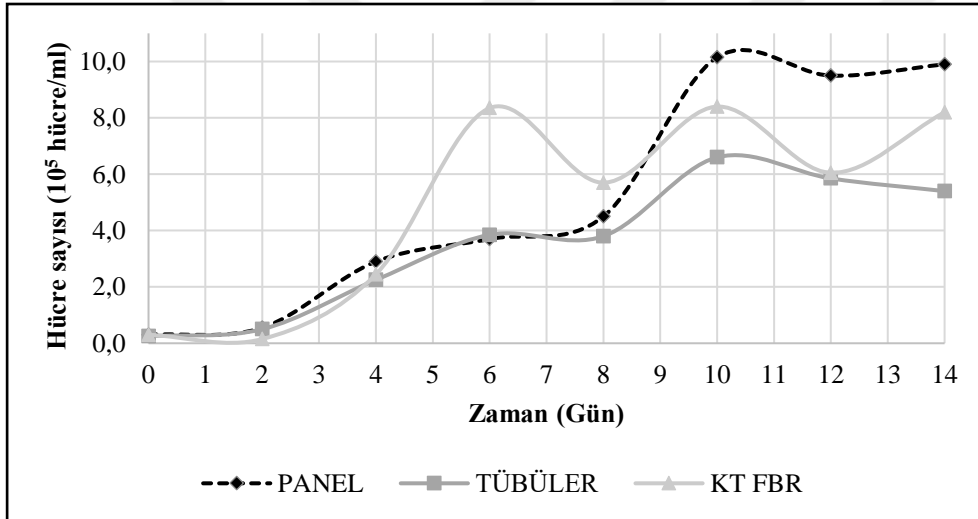
4.3.Farklı Fotobiyoreaktörlerin *C. nivalis*'in Üretimine Etkisi

Farklı fotobiyoreaktörlerde yapılan denemede hücrelerin üremeleri ve pigment analizleri 14 gün boyunca takip edilmiş, Panel FBR'nin sıcaklığı $24\pm 0.4^\circ\text{C}$ 'da seyrederken KT FBR ve Tübüler FBR'ler $25\pm 0.4^\circ\text{C}$ 'a çıkmıştır. Hücrelerin 28°C üzerinde yaşayamadığı tespit edilmiştir. Üretimlerin pH değerleri benzer şekilde elde edilmiştir (Şekil 4.31). Panel FBR'de hücrelerin diğer iki FBR'ye göre daha hızlı lag fazını atlattığı görülmüştür (Şekil 4.33). Hücre sayısı ve

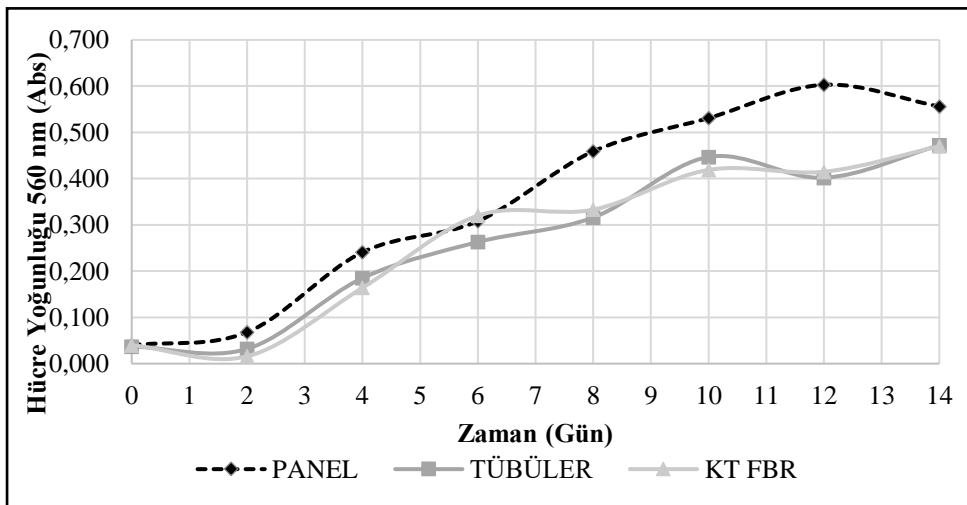
yoğunluğuna göre Panel FBR'de en fazla hücre artışı görülmüştür (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33).



Şekil 4.31 *C. nivalis* FBR denemesi pH grafiği

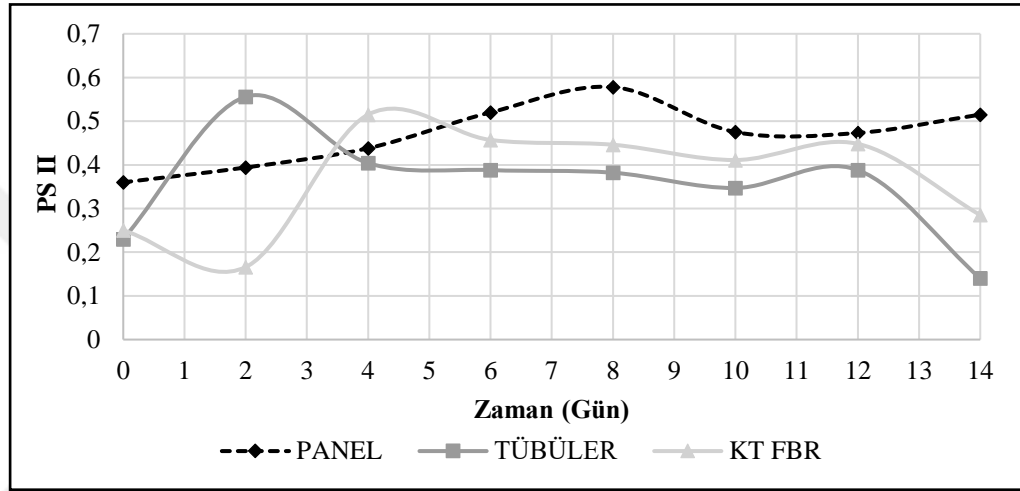


Şekil 4.32 *C. nivalis* FBR denemesi hücre sayısı grafiği

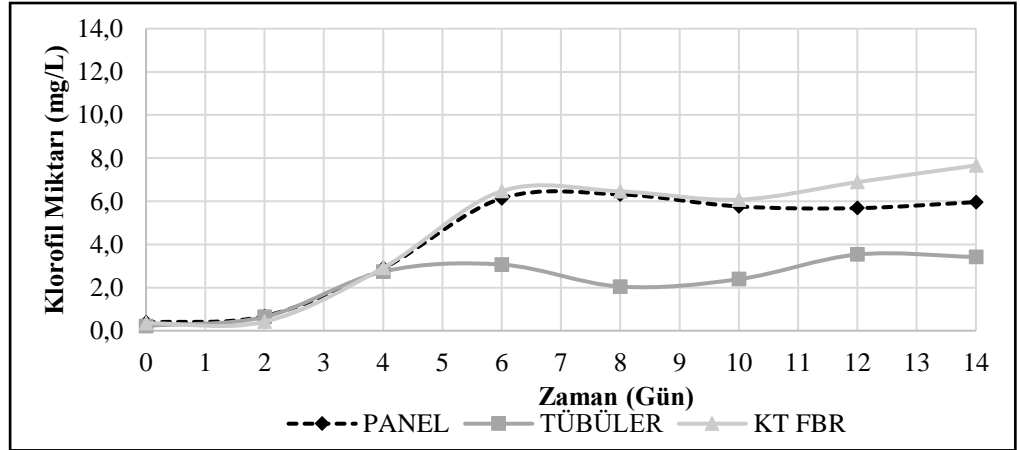


Şekil 4.33 *C. nivalis* FBR denemesi hücre yoğunluğu grafiği

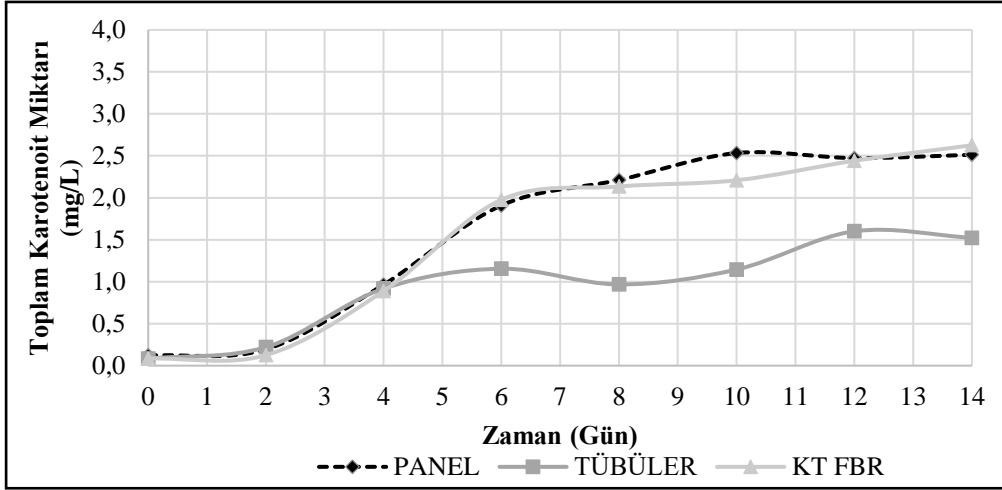
Toplam klorofil ve karotenoit miktarları karşılaştırıldığında en yüksek klorofil ve karotenoit üretimi KT FBR' de üretimin 14. gününde 7,66 mg/L ve 2,63 mg/L olarak bulunmuştur (Şekil 4.35 ve 4.36). Daha sonra en yüksek değer Panel FBR' de 8. günde 6,32 mg/L klorofil; 10. günde 2,53 mg/L karotenoit elde edilmiştir. En az üretim Tübüler FBR'de 3,53 mg/L klorofil; 1,6 mg/L karotenoit olarak üretimin 12. gününde üretilmiştir. Buna göre yüzey alanı en fazla olan Tübüler FBR'de hücrelerin karotenoit üretimi uyarılamamış, üretim fotoinhibisyona uğradığı görülmüştür (Vasumathi et al., 2012).



Şekil 4.34 *C. nivalis* FBR denemesi fotosentetik aktivite grafiği



Şekil 4.35 *C. nivalis* FBR denemesi toplam klorofil miktar grafiği



Şekil 4.36 *C. nivalis* FBR denemesi toplam karotenoit miktar grafiği

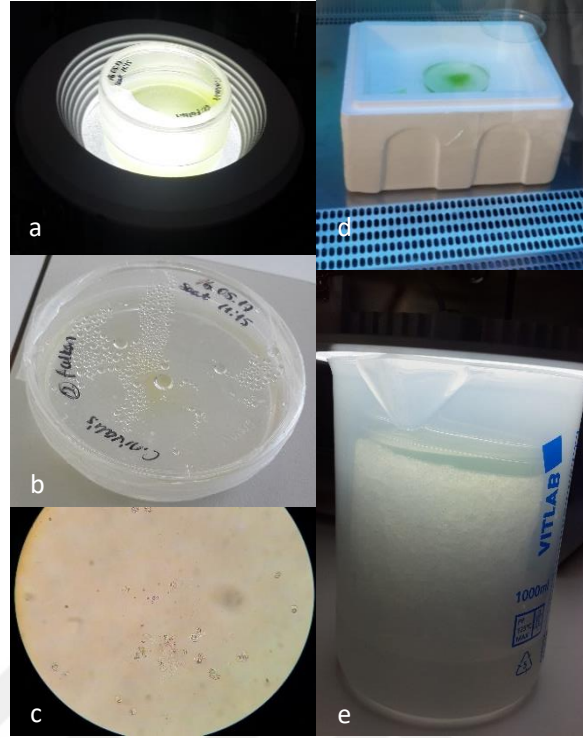


Şekil 4.37 *C. nivalis*'in Panel, Tübüler, KT fotobiyoreaktörlerdeki üretimi

4.4. Küçük Ölçekte Yapılan Stres Denemelerinin *C. nivalis* Üretimine Etkisi

4.4.1. Petride ışık ve soğuk stresi denemesi sonuçları

Petride yapılan ışık ve soğuk denemelerinde kistik faza geçiş uyarılamamış, gözlem ve mikroskopik incelemeler sonucunda +4°C ve -20°C'daki hücrelerin yapısal bütünlüğünü koruyamadığı ve öldüğü belirlenmiştir. Buz üzerindeki led ve UV örneklerinde hücresel kümelenme görülmüş, ancak kırmızı kistik faz görülmemiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38 Petride ışık ve soğuk stresi denemesi. a)+4°C buzdolabı, çalkalayıcı, ışık; b)24 saat sonraki hali; c) 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü ;d) Buz üzeri, UV ışık; e) Buz üzeri, yoğun led ışık

4.4.2.Deney tüpünde besin stresi denemesi

4.4.2.1.Sıvı tüpte besin stresi için 1.deneme

Besin ortamı kompozisyonunda vitamin ve tuz farklılıklarının farklı iki ışık şiddetinden alınan kültürler üzerinde etkisinin araştırıldığı denemede hiçbir değişiklik gözlenmemiştir. 500 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinden alınan sarı renkteki tüpler besin stresinden ve tuzluluktan daha çabuk etkilenecek astaksantin üretiminin uyarılacağı düşünülmüştü. Ancak sonuç beklenildiği gibi olmadı. Hücrelerde klorofil ya da karotenoid artışı görülmedi. 90 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinden alınan kültürde de bir farklılık oluşmadı. Deneme yeniden kurularak ışık şiddetinin artırılması ile tekrarlanırsa da kistik formdaki hücre oluşumu gözlenmedi.

4.3.2.2.Sıvı tüpte besin stresi için 2.deneme

Besin ortamı kompozisyonunda vitamin ve tuz farklılıklarının stres faktörü olarak denendiği 5 ml'lik tüplerde yapılan sette 2 hafta boyunca hiçbir değişiklik gözlenmemiştir. Set yoğun ışık altında bırakılarak denemeye devam edilmesine rağmen toplamda 4 hafta sonrasında kültürde renk değişimi, kistik faza geçiş ya da

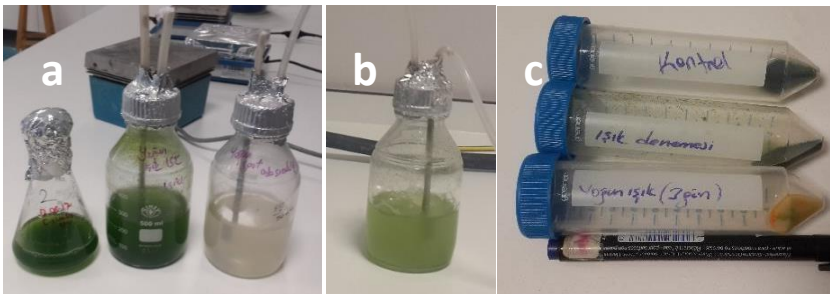
ölüm görülmedi (Şekil 4.39). Ancak tüpler kendi aralarında hücresel yapı bakımından mikroskobik olarak karşılaştırıldığında sadece 1 nolu kontrol tüpünde flagelli, hareketli, armut şekilli vejetatif hücre formu daha yaygındır. Vitaminsiz 2 ve %50 seyreltilen 3 nolu tüpler benzer olarak az flagelli, az hareketli, armut-daire şekilli küçük-büyük hücreler yaygındır. %1 tuzlu 5 nolu tüp, %0,5 tuzlu 6 nolu tüp ve %0,5 vitaminsiz 8 nolu tüpte benzer şekilde flagelsiz, hareketsiz, küçük-büyük, armut-daire şeklinde hücreler karışık bulunmaktadır. %90 seyreltilen 4 nolu tüp ve %1 tuzlu ve vitaminsiz 7 nolu tüp birbirine benzer olarak büyük, flagelsiz, hareketsiz, daire şekilli hücreler çoğunluktadır. Besin ortamının yüksek oranda seyreltilmesi ve vitamin eksik ortamda tuzla stres uygulanması hücrelerin kistik faza geçişini uyarabilse de (Bidigare et al., 1993; Lu et al., 2012; Ganey et al., 2017) denemedeki bütün tüplerde kırmızı kistik form görülmemiştir.



Şekil 4.39 4 hafta sonra tüplerde besin stresi denemesi

4.4.3. Spot ışıkta stres denemesi sonuçları

500 ml'lik Schott şişelere alınarak projektör spot ışığında yapılan stres denemesinde *C. nivalis* kültürlerinin büyümesi takip edildi ve HPLC sonuçları karşılaştırıldı. Yüksek ışıktaki kültür 24 saat içinde tamamen beyazladığı görüldü (Şekil 4.40). Ardından 15°C'deki paralelinin yanına alınarak kültürde yeniden canlanma olup olmayacağına bakıldı. Hiçbir değişiklik gözlenmemesinin ardından mikroskopta hücrelerin klorofilini kaybettiği, ancak hücre şeklinin genellikle korunduğu görüldü.



Şekil 4.40 Spot ışık denemesi a) Kontrol, 15°C ve yoğun spot ışık altındaki kültürler, b) aralıkli spot ışık, c) hasat sonrası

4.5. Üretimlerin Karotenoit İçeriklerinin HPLC'deki Sonuçları

Kabarcık kolondaki ve fotobiyoreaktörlerde kültivasyonu yapılan *C. nivalis*'in klorofil ve karotenoit üretimi aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Klorofil ve karotenoit miktarları mg/g cinsinden tabloda gösterildi.

$$\text{HPLC karotenoit miktarı (mg/g)} = \frac{\text{HPLC Amount(ppm)} \times \text{Çözelti hacmi(L)}}{\text{Örnek kuru kütlesi (g)}} \times \text{X Seyreltme faktörü}$$

Tablo 4.1 *C. nivalis* üretimlerinde HPLC analiz sonuçları

	Kl-a (mg/g)	Violaksantin (mg/g)	Kl-b (mg/g)	Astaksantin (mg/g)
Dalga boyları	400 nm	450 nm	450 nm	480 nm
Spot Işık Stres Denemesi				
Kontrol	0,351	0,345	1,105	0,022
Yoğun Işık	0,089	0,362	0	0
Yüksek Aralıklı	1,216	0,104	0,071	0,049
Spot Işık	1,538	0,149	0,772	0,102
Besin Ortamı				
Bold 1NV	16,403	0,541	0,707	0,056
BBM	24,068	0,081	0,991	0,137
Bold 3N	19,183	0,208	0,800	0,079
Mod.3N	18,183	0,120	0,887	0,058
Işık (µE)				
90 µE	1,435	0	0	0
250 µE	0,801	0,384	0	0
500 µE	5,728	0	0,218	0,012
Sıcaklık (°C)				
5°C	8,270	0,284	0,414	0
10°C	13,883	0,278	0,608	0,030
20°C	15,529	0,252	0,465	0,009
FBR Çeşidi				
Panel	23,513	0,078	0,671	0,070
Tübüler	13,235	0,223	0,472	0,032
KT FBR	28,639	0,233	0,737	0,121

Tablo 4.1'e göre spot ışığın stres faktörü olarak denendiği stres setinde 24 saat boyunca yoğun spot ışık altında kalan kültürün nitel gözlemiyle uyduğu, klorofilini kaybederek beyazlayan kültürün Kl-a değerinin 0,089 mg/g'a düşerek en az miktarda tespit edilmiştir. Kl-b ve astaksantin ise hiç bulunamamıştır. Bunun nedeni biyokütledeki karotenoitlerin astaksantine kadar ulaşmadan daha önceki yolizlerinde kaldığı violaksantinde sonlandığı görülmektedir. Violaksantin ise tüm bunlara ters olarak en fazla yoğun spot ışıkta 0,362 mg/g elde edilmiştir. 20°C'de bulunan kontrol grubuna kıyasla 15°C'daki ışık denemesi Kl-a miktarını

arttırmıştır. Bu da vejetatif hücrelerin 15°C’da 20°C’a göre daha optimum bir sıcaklık olduğunu göstermiştir ve birim g kütle başına en fazla astaksantin üretimi de 0,102 mg/g olarak elde edilmiştir. Aralıklarla spot ışığa maruz kalan kültürde ise kontrole göre Kl-a ve astaksantin artışı olmuştur.

Tablo 4.1’e göre besin ortamı denemesinde en fazla astaksantin üretimi BBM ortamında 0,137 mg/g, en düşük astaksantin üretimi ise Bold 1NV ortamında 0,056 mg/g olarak elde edilmiştir. Farklı besin ortamlarındaki astaksantin üretimi çoktan aza doğru BBM, Bold 3N, Modifiye 3N ve Bold 1NV olarak görülmüştür. Violaksantin üretimi ise 0,541 mg/g ile Bold 1NV ortamında üretilmiştir. Violaksantin üretim miktarı çoktan aza doğru Bold 1NV, Bold 3N, Modifiye Bold 3N ve BBM ortamlarında üretilmiştir. Klorofil-a ve b miktarı astaksantin üretimiyle paralel olarak en çok BBM ortamında en az ise Bold 1NV ortamında elde edilmiştir.

Bold 1NV besin ortamında 20°C’daki kültivasyon şartlarında yürütülen ışık denemesinde astaksantin sadece 500 µE ışık şiddetindeki kabarcık kolon fotobiyoreaktörde yaklaşık 0,012 mg/g üretilmiştir. Violaksantin ise sadece 250 µE ışık şiddetinde 0,384 mg/g tespit edilmiştir, bu da astaksantin üretimine ulaşmadan karotenoit biyosentezinin önceki basamaklarında violaksantin tespitini mümkün kılmıştır. Işık şiddeti *C. nivalis* üretiminde klorofil ve karotenoit üretiminde oldukça sınırlandırıcı-baskılayıcı bir faktör olduğu görülmüştür. HPLC sonuçlarında değerlerin sıfır çıkmasının nedeni hücre parçalamada ve ekstraksiyonda yetersizlik olarak açıklanabilir.

Sıcaklık denemesinde en fazla astaksantin 10°C’da 0,608 mg/g üretilirken 5°C’da ise astaksantin tespit edilememiştir. Farklı sıcaklıklarda violaksantin üretimi ise 5°C’da daha fazla olsa da 10 ve 20°C’de birbirine yakın miktarda üretilmiştir. Klorofil-a en fazla 20°C’da ve sonrasında 10°C’de üretilmiştir. 5°C’de ise diğer üretimlerin neredeyse yarısı kadar bir Kl-a üretilmiştir. Kl-b miktarı 10°C’de en fazla iken sırasıyla 20°C ve 5°C’da daha az üretilmiştir.

Fotobiyoreaktördeki biyokütle üretiminde eşit hacimde farklı reaktör tipiyle sağlanan ışık alan yüzey alanı farklılığına bağlı olarak klorofil ve karotenoit miktarlarında da değişiklik görülmüştür. HPLC analizine göre Kl-a, Kl-b, violaksantin ve astaksantin miktarlarının tamamı en fazla KT FBR’de üretilmiştir. Fotobiyoreaktör tipine göre *C. nivalis* mikroalgi ile ilgili olarak karşılaştırma yapılan çalışmaların bulunmaması sebebiyle bu elde edilen veriler ilk olma özelliği taşımaktadır. Biyokütle üretimi ile bağlantılı olacak şekilde astaksantin üretimi sürekli karıştırılmalı tank fotobiyoreaktöründe en fazla 0,121 mg/g olarak elde edilmiştir. En yüksek yüzey alanına sahip Tübüler FBR (0,375 m²) violaksantin üretiminde KT FBR (0,106 m²) ile yakın sonuç elde edilse de klorofil (%46’sı) ve

astaksantin (%27'si) üretiminde KT FBR'nin çok gerisinde kalmıştır. Tübüler FBR'de karotenoit üretimi astaksantinden daha önce ara bileşiklerde kalarak violaksantin birikmesine neden olmuştur. Panel FBR (0,104 m²) ise yine Tübüler FBR'ye göre 2,19 kat daha fazla astaksantin üretmiştir. Buna rağmen violaksantin miktarı diğer FBR'ye göre çok düşüktür. Buna göre KI-a ve b, violaksantin, astaksantin üretimleri için en iyi fotobiyoreaktör tipi KT FBR olarak elde edilmiştir.

En yüksek yüzey alanına (0,375 m²) sahip Tübüler FBR'de hücreler fotoinhibisyon dolayısıyla baskılanmış, astaksantin akümüasyonu azalmıştır. Yüksek ışık karotenoit sentezini uyarsa da violaksantinde kalarak astaksantine geçememiştir. Bu da Tübüler FBR'de düşük astaksantin eldesine neden olmuştur. Sonraki en yüksek alan olan 0,106 m²'lik KT FBR'de ise en yüksek astaksantin üretimi gerçekleşmiştir. Panel FBR'de en düşük miktarda astaksantin üretiminin görülmesi, FBR'lerle yapılan pek çok mikrobiyal kaynaklı astaksantin üretimi çalışmalarıyla paralel ve destekleyecek şekilde sonuçlanmıştır (Boussiba et al., 200). Havalandırma, karıştırma, homojenizasyon ve daha kontrollü ve kontaminasyon riski düşük olan KT FBR bu çalışma ile en optimum üretimin sağlandığı FBR tipi olmuştur. Yüzey alanları birbirine yakın olan Panel ve KT FBR'deki üretimlerde HPLC sonuçlarına göre astaksantin ve violaksantin miktarları KT FBR'da daha fazla elde edilmiştir.

HPLC analizine göre yapılan tüm üretimlere göre en fazla astaksantin üretimi birim gram kütle başına BBM ortamında 20°C'da 500 ml kabarcık kolon üretiminde 0,137 mg/g elde edilmiştir. İkinci sırada ise 20°C'daki Modifiye Bold 3N ortamındaki KT FBR'ninde 0,121 mg/g üretilmiştir.

5.TARTIŞMA

Tez kapsamında *Chlamydomonas nivalis*'in erlenmayer, KK FBR, Panel FBR, Tübüler FBR ve KT FBR'de kültivasyonu sağlanabilmiştir. Daha önce çeşitli biyoreaktörlerin kullanılarak kültivasyona etkiyen parametrelerin biyokütle üretimine ve astaksantin akümülyasyonuna etkisinin incelendiği ortak ve kapsamlı bir çalışma olmaması, çalışmanın yenilikçi yönünü oluşturmaktadır.

Bu tezde kullanılan *Chlamydomonas nivalis*'in çalışmanın henüz başlangıcında UTEX Kültür Koleksiyonu'ndan yaz aylarında tedarik edilmesi nedeniyle kültürün zayıf olması, taşınması sırasında yüksek sıcaklık farklılığına maruz kalması, kültüre alınmadan önce adaptasyonunun uzun zaman alması gibi sorunlar görülmesi ana stok kültivasyonuna geçişi ertelemiştir. Bu süreçte kültür koleksiyonunca önerilen tüm basamaklara hassasiyetle dikkat edilmiş ve uygulanmıştır.

C. nivalis'in stok kültürünün Bold 1NV besin ortamında olması nedeniyle ilk üretim aşamaları da benzer seçilmiştir. Ancak devam eden denemeler bir deneme deseni oluşturularak daha küçük hacimde çalışılmak istense de denemelerin paralel kurulmasındaki malzeme ve koşulların tam olarak sağlanamamasından dolayı birbirini takip eder sırada yapılmasına neden olmuştur.

C. nivalis hakkında üretim parametrelerince az sayıda literatür bulunması, çalışmanın bilinen diğer mikroalg türlerine göre sıfırdan planlanmasına neden olmuştur. Literatürdeki bu durum hem çalışmaya önem yüklerken hem de sonuçların tartışılmasında zorluğa neden olmuştur.

Habitatında kırmızı kistik formunun görüldüğü *C. nivalis*'in çalışma kapsamında hiçbir aşamada gözle görülür kırmızı renk dönüşümü olmaması beklenen bir durum değildi. Ancak yapılan HPLC sonuçları üretimlerde astaksantin sentezinin tetiklendiğini, elde edilen farklı astaksantin miktarlarının da deneme setlerindeki değişkenler sayesinde olduğu kanıtlanmıştır. *C. nivalis*'in üzerine yapılan yeni çalışmalar ile birlikte bu çalışmada elde edilen veriler ilerde farklı yorumlara açıktır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Organik üretimin ve doğal kaynakların öneminin yeniden revaçta olduğu bu dönemde mikroalglerin yeri biyo-tabanlı ürün üretiminde üst sıralardadır. Ancak kalıplaşmış ve rutin üretime yenilikçi bir bakış açısı kazandırmak adına, farklı hammadde ve ürünlerin potansiyelleri denenmelidir. Başta astaksantin olmak üzere *Haematococcus pluvialis* ve *Chlorella zofingiensis* mikroalglerinden elde edilen karotenoitlerin ticari üretiminin çoğunlukla ılıman-okyanusal iklimlerdeki firmaların tekelinde bulunması, şüphesiz ki ortam şartlarının uygunluğuna paralel olarak açık alanlarda düşük maliyet avantajıyla üretimlerinin gerçekleşmesidir.

Chlamydomonas nivalis, yüksek dağ ve buzullarda yaşayan, ekstremofilik bir tür olarak uzun senelerdir bilinmesine rağmen hakkında literatür çalışması az sayıdadır. Genellikle tür izolasyonu alanında çalışılması, “kırmızı kar” tanımıyla bilinen ve bilim dünyasında bir dönem oldukça da merak uyandıran olayın sorumlusu olarak daha fazla çalışılması muhtemel bir mikroalg türü olarak karşımıza çıkmaktadır. Arktik ve Antarktik bölgelerde yapılan çalışmalarda UV ışığa karşı ürettiği karotenoitleri sayesinde kar yüzeyindeki alg patlamasının (algal bloom) renklerindeki payı büyüktür.

İçeriğinde çok sayıda koruyucu metabolit bulunması, ticari üretimi de düşünülerek, *C. nivalis*'in nu tez kapsamında araştırılmasında önemli bir noktadır. Agar ortamından sıvı tüplere, erlenmayerlerden 5 L'lik fotobiyoreaktörlere kadarki üretim periyodunda aşama aşama kaydedilen bilgiler göstermiştir ki yıllık en yüksek sıcaklığı 20°C civarında olan bir bölgede *C. nivalis*'in astaksantin ve diğer karotenoitlerin sağlayıcısı olması ticari üretiminin mümkünliğini göstermiştir. Bu sıcaklık aralığı daha soğuk iklimlerin yaz dönemlerinde astaksantin alternatif üreticisi olarak kullanımının önünü açmaktadır. Çalışmada kullanılan fotobiyoreaktör çeşitliliği ve 5 L' lik reaktörlerin kullanımına kadarki süreçlerde sıcaklık, besi ortamı, ışık şiddeti gibi stres faktörlerinin denenmesi, küçük ölçekte stres denemeleri ile birbirini takip eden kapsamlı bir çalışma olduğunu göstermektedir. Her ne kadar çeşitli parametre ile üretimler karşılaştırılsa da yeni parametrelerin eklenmesi ile benzer çalışmalar yapılabilir. HPLC analizi daha küçük hacimdeki üretimler ile basamak basamak her bir parametrenin denenmesi ardından sonuçları değerlendirilerek yeni setlerin kurulmasında fikir verebilir.

Daha önceki çalışmalar doğal habitatlarından izole edilen türün, çoğunlukla tür tayini için filogenetik ve hüresel formunun görüntülenmesi amacıyla mikroskobik incelemelerin yapıldığı araştırmalardır. Bu araştırmalar saha örneklerinden alınan anlık sonuçlar olduğu için farklı ortam koşulları kontrollü

deneyle yardımcıyla açıklanmalıdır. Sonraki çalışmalarda ise ancak laboratuvar şartlarında *C. nivalis*'in üretimi yapılmıştır. Ticari olarak bazı kozmetik ürünlerin içerisinde bulunduğu ve üretiminin fotobiyoreaktörler aracılığı ile sağlandığını gösteren kitapçıklar olsa da tam olarak üretim parametrelerini içeren ayrıntılı içeriklere ulaşım sağlanamamaktadır. Bu üretimlerdeki gizlilik, türün endüstriyel çaptaki üretiminin daha da önemli bir hal alarak ileride tüm dünyada yankı bulabilecek araştırma sonuçlarına da olasılık vermektedir.

C.nivalis'in habitat koşullarında pek çok madde ve canlı ile bulunması laboratuvar ve büyük ölçekte bakteri türleri ile ko-kültür halinde üretimi gelecek çalışmalarda uygulanabilecek bir öneridir. Ayrıca genetik çalışmalarda fotosistem II'deki D1 proteininin foto-koruyucu etkisinin araştırılması da bu türün gelecek araştırmalarından bazıları olabilir. *H. pluvialis*'te karotenogenezisin metal iyonları ile uyarıldığı çalışmalara benzer olarak *C. nivalis* için de benzer şekilde çeşitli metal iyonları (Fe^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} gibi) ve konsantrasyonlarının etkisinin araştırıldığı çalışmalar gelecekte yapılabilir.

Kısıtlı miktarda literatür bilgisine ulaşılabilen bu mikroalg türü için çok daha fazla sayıda araştırmaya ihtiyaç vardır. Özellikle da farklı koşullarda üretimi yapılan kültürlerinin genomik, proteomik araştırmalar ile potansiyelleri değerlendirilirken metabolomik araştırmaları ile de gerçekte ne ürettiği hakkında çok daha fazla bilgi elde edilebilir. Buradan çıkacak sonuçlar da üretim parametrelerinin optimizasyonunun sağlanabilmesi için hedeflenen metabolite gidişte en iyi yolu gösterecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aguilera, A. and Amils, R.**, 2005, Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas sp.* (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain), *Aquatic Toxicology*, 75(4):316–329pp.
- Ambati, R. R., Moi, P. S., Ravi, S. and Aswathanarayana, R. G.**, 2014, Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - a review, *Marine Drugs*, 12(1):128–152pp.
- Ben Ouada, S., Ben Ali, R., Leboulanger, C., Ben Ouada, H. and Sayadi, S.**, 2018, Effect of bisphenol A on the extremophilic microalgal strain *Picocystis sp.* (Chlorophyta) and its high BPA removal ability, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158(October 2017):1–8pp.
- Bidigare, R. R., Ondrusek, M. E., Kennicutt, M. C., Iturriaga, R., Harvey, H. R., Hoham, R. W. and Macko S. A.**, 1993, Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae, *Journal of Phycology*, 29(4):427-434pp.
- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., and Richmond, A.**2000, Procedure for large-scale production of astaxanthin from *Haematococcus*, *United States Patent*, patent no:6,022,701.
- Campoio, T. R., Oliveira, F. A. and Otton, R.**, 2011, Oxidative stress in human lymphocytes treated with fatty acid mixture: role of carotenoid astaxanthin, *Toxicology in Vitro*, 25(7):1448–1456pp.
- Çelikel, N., Kınık, Ö., Gönç, S. ve Kavas, G.**, 2006, Mikroalglerin gıdalarda renk verici madde (pigment) kaynağı olarak kullanımı, Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu, 447–450s.
- Cuaresma, M., Casal, C., Forján, E. and Vilchez, C.**, 2011, Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38:167–177pp.
- Dore, J. E. and Cysewski, G. R.**, 2003, *Haematococcus* algae meal as a source of natural astaxanthin for aquaculture feeds, *Cyanotech Corporation*, 1–5pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Duval, B., Shetty, K. and Thomas, W. H.**, 2000, Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light, *Journal of Applied Phycology*, 11(6):559–566pp.
- Erdogan, A., Çağır, A., Dalay, M. C. and Eroglu, A. E.**, 2015, Composition of Carotenoids in *Scenedesmus protuberans*: application of chromatographic and spectroscopic Methods, *Food Analytical Methods*, 8(8):1970-1978pp.
- Escudero, A., Blanco, F., Lacalle, A. and Pinto, M.**, 2014, Ammonium removal from anaerobically treated effluent by *Chlamydomonas acidophila*, *Bioresource Technology*, 153:62-68pp.
- Fakhri, S., Dargahi, L., Abbaszadeh, F. and Jorjani, M.**, 2019, Effects of astaxanthin on sensory-motor function in a compression model of spinal cord injury: involvement of ERK and AKT signalling pathway, *European Journal of Pain (United Kingdom)*, 23(4):750–764pp.
- Fernandes, B. D., Mota, A., Teixeira, J. A. and Vicente, A. A.**, 2015, Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: approaches, applications and future trends, *Biotechnology Advances*, 33(6):1228–1245pp.
- Fiore, D C, McKee, D. D. and Janiga, M. A.**, 1997, Red snow: is it safe to eat? A pilot study, *Wilderness & Environmental Medicine*, 8(2):94–95pp.
- Ganey, G. Q., Loso, M. G., Burgess, A. B. and Dial, R. J.**, 2017, The role of microbes in snowmelt and radiative forcing on an Alaskan icefield, *Nature Geoscience*, 10(10):754–759pp.
- Gorton, H. L., Williams, W. E. and Vogelmann, T. C.**, 2001, The light environment and cellular optics of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille, *Photochemistry and Photobiology*, 73(6):611–620pp.
- Guadagno, C.R., Greca, M.D., Santo, A.V and D'Ambrosio, N.**, 2013, NMR (¹H) analysis of crude extracts detects light stress in *Beta vulgaris* and *Spinacia oleracea* leaves, *Photosynthesis Research*, 115(2-3), 115-122pp.
- Han, D., Li, Y. and Hu, Q.**, 2013, Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications, *Algae*, 28(2):131–147pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hardy, J. T. and Curl, H.**, 1968, Red snow caused by a new species of *Trachelomonas*, *Journal of Phycology*, 4(1):9–12pp.
- Harris, E. H.**, 1988, *Chlamydomonas* Sourcebook A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. (H. B. Jovanovich, Ed.), Academic Press, Durham, North Carolina, 780p.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Carvalho, I. S., Ravikumar, R., Zambare, V. and Barh, D.**, 2012, An Indian scenario on renewable and sustainable energy sources with emphasis on algae, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5):1125–1135pp.
- Kumar, S. and Singh, S. V.**, 2019, Inhibition of NF- κ B signaling pathway by astaxanthin supplementation for prevention of heat stress–induced inflammatory changes and apoptosis in Karan Fries heifers, *Tropical Animal Health and Production*, 1125–1134pp.
- Kvíderová, J.**, 2010, Characterization of the community of snow algae and their photochemical performance in situ in the Giant Mountains, Czech Republic, *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 42(2):210–218pp.
- Leya, T., Bley, U. S. and Thomas, Z.**, 2006, Adaptation strategies of psychrophilic snow algae to their cold environment, *Cryobiology*, 53(2006):37073p.
- Li, H.-B., Cheng, K.-W., Wong, C.-C., Fan, K.-W., Chen, F. and Jiang, Y.**, 2007, Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae, *Food Chemistry*, 102(3):771–776pp.
- Liao, Q., Li, L., Chen, R. and Zhu, X.**, 2014, A novel photobioreactor generating the light / dark cycle to improve microalgae cultivation, *Bioresource Technology*, 161:186–191pp.
- Light, J. J., and Belcher, J. H.**, 1968, A snow microflora in the Cairngorm Mountains, Scotland, *British Phycological Bulletin*, 3(3):471–473pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, H., Liu, H., Zhu, L., Zhang, Z., Zheng, X., Liu, J. and Fu, X.,** 2019, Comparative transcriptome analyses provide potential insights into the molecular mechanisms of astaxanthin in the protection against alcoholic liver disease in mice, *Marine Drugs*, 17(3):181p.
- Lu, N., Weil, D., Chen, F. and Yang, S.T.,** 2012, Lipidomic profiling and discovery of lipid biomarkers in snow alga *Chlamydomonas nivalis* under salt stress, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(3):253–265pp.
- Lutz, S., Anesio, A. M., Field, K. and Benning, L. G.,** 2015, Integrated “Omics”, targeted metabolite and single-cell analyses of arctic snow algae functionality and adaptability, *Frontiers in Microbiology*, 6:1-17pp.
- Martin, J.F., Gudina, E. and Barredo, J.I.,** 2008, Conversion of β -carotene into astaxanthin: two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein?, *Microbial Cell Factories*, 7(3):1-10pp.
- Mikulic, P. and Beardall, J.,** 2014, Contrasting ecotoxicity effects of zinc on growth and photosynthesis in a neutrophilic alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) and an extremophilic alga (*Cyanidium caldarium*), *Chemosphere*, 112:402–411pp.
- Morris, G. J., Coulson, G. and Clarke, A.,** 1979, The cryopreservation of *Chlamydomonas*, *Cryobiology*, 16(4):401–410pp.
- Ngo, D. H., Wijesekara, I., Vo, T. S., Van Ta, Q. and Kim, S. K.,** 2011, Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: an overview, *Food Research International*, 44:523–529pp.
- Niu, J., Wen, H., Li, C. H., Liu, Y. J., Tian, L. X., Chen, X. And Lin, H. Z.,** 2014, Comparison effect of dietary astaxanthin and β -carotene in the presence and absence of cholesterol supplementation on growth performance, antioxidant capacity and gene expression of *Penaeus monodon* under normoxia and hypoxia condition, *Aquaculture*, 422-423:8-17pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Oncel, S. and Sabankay, M.**, 2012, Microalgal biohydrogen production considering light energy and mixing time as the two key features for scale-up, *Bioresource Technology*, 121:228-234pp.
- Oncel, S. and Vardar-Sukan, F.**, 2009, Photo-bioproduction of hydrogen by *Chlamydomonas reinhardtii* using a semi-continuous process regime, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(18):7592–7602pp.
- Park, S. A., Ahn, J. B., Choi, S. H., Lee, J. S. and Lee, H. G.**, 2014, The effects of particle size on the physicochemical properties of optimized astaxanthin-rich *Xanthophyllomyces dendrorhous*-loaded microparticles, *LWT - Food Science and Technology*, 55(2):638–644pp.
- Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E. and Madamwar, D.**, 2011, Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels, *Bioresource Technology*, 102(22):10163–10172pp.
- Rasmussen, R. S., and Morrissey, M. T.**, 2007, Marine biotechnology for production of food ingredients, *Advances in Food and Nutrition Research*, 52(06):237–292pp.
- Remias, D, Lutz-Meindl, U. and Lutz, C.**, 2005, Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*, *European Journal of Phycology*, 40(3):259–268pp.
- Remias, Daniel, Karsten, U., Lütz, C. and Leya, T.**, 2010, Physiological and morphological processes in the Alpine snow alga *Chloromonas nivalis* (Chlorophyceae) during cyst formation, *Protoplasma*, 243(1):73–86pp.
- Remias, Daniel, Pichrtová, M., Pangratz, M., Lütz, C. and Holzinger, A.**, 2016, Ecophysiology, secondary pigments and ultrastructure of *Chlamydomonas sp.* (Chlorophyta) from the European Alps compared with *Chlamydomonas nivalis* forming red snow, *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4):1-11pp.
- Řezanka, T., Nedbalová, L., Kolouchová, I. and Sigler, K.**, 2013, LC-MS/APCI identification of glucoside esters and diesters of astaxanthin from the snow alga *Chlamydomonas nivalis* including their optical stereoisomers, *Phytochemistry*, 88:34–42pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Řezanka, T., Nedbalová, L., Sigler, K. and Cepák, V.**, 2008, Identification of astaxanthin diglucoside diesters from snow alga *Chlamydomonas nivalis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Phytochemistry*, 69(2):479–490pp.
- Saadaoui, I., Al Ghazal, G., Bounnit, T., Al Khulaifi, F., Al Jabri, H. and Potts, M.**, 2016, Evidence of thermo and halotolerant *Nannochloris* isolate suitable for biodiesel production in Qatar Culture Collection of Cyanobacteria and Microalgae, *Algal Research*, 14:39-47pp.
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A. and Abd_Allah, E. F.**, 2017, Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26:709-722pp.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussnug, J. H., Posten, C. and Hankamer, B.**, 2008, Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production, *BioEnergy Research*, 1(1):20-43pp.
- Siddiqui, K. S.**, 2015, Some like it hot, some like it cold: temperature dependent biotechnological applications and improvements in extremophilic enzymes, *Biotechnology Advances*, 33:1912–1922pp.
- Singh, A. K., Tiwari, R., Kumar, V., Singh, P., Riyazat Khadim, S. K., Tiwari, A. and Asthana, R. K.**, 2017, Photo-induced biosynthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *Dunaliella salina* and their anticancer potential, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 166:202–211pp.
- Singh, R. N. and Sharma, S.**, 2012, Development of suitable photobioreactor for algae production - a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16:2347-2353pp.
- Suganya, V. and Anuradha, V.**, 2019, In silico molecular docking of astaxanthin and sorafenib with different apoptotic proteins involved in hepatocellular carcinoma, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19(November 2018):101076p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sukatar, A.**, 2004, Alg Kültür Yöntemleri, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No 184, Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir, 168s.
- Takeuchi, N.**, 2013, Seasonal and altitudinal variations in snow algal communities on an Alaskan glacier (Gulkana glacier in the Alaska range), *Environmental Research Letters*, 8:035002p.
- Tartari, A. and Forlani, G.**, 2008, Osmotic adjustments in a psychrophilic alga, *Xanthonema* . (*Xanthophyceae*). *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3):342–350pp.
- Thomas, W. H.**, 1972, Observations on snow alga in California. *Journal of Phycology*, 8(1):1-9pp.
- Vaquero, I., Mogedas, B., Ruiz-Domínguez, M. C., Vega, J. M. and Vilchez, C.**, 2014, Light-mediated lutein enrichment of an acid environment microalga. *Algal Research*, 6:70–77pp.
- Vasumathi, K. K., Premalatha, M. and Subramanian, P.**, 2012, Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16:5443–5450pp.
- Wang, B., Lan, C. Q. and Horsman, M.**, 2012, Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, 30: 904–912pp.
- Weber, A. P. M., Horst, R. J., Barbier, G. G. and Oesterhelt, C.**, 2007, Metabolism and metabolomics of eukaryotes living under extreme conditions. *International Review of Cytology*, 256(07):1-34pp.
- Wijffels, R. H.**, 2008, Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 26(1):26–31pp.
- Xue, Y., Sun, C., Hao, Q. and Cheng, J.**, 2019, Astaxanthin ameliorates cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization by inhibiting oxidative stress via Nrf2/HO-1 pathway in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(3):341–348pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yaghooti, H., Mohammadtaghvaei, N. and Mahboobnia, K.,** 2019, Effects of palmitate and astaxanthin on cell viability and proinflammatory characteristics of mesenchymal stem cells. *International Immunopharmacology*, 68:164-170pp.
- Yuan, C., Du, L., Jin, Z. and Xu, X.,** 2013, Storage stability and antioxidant activity of complex of astaxanthin with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, *Carbohydrate Polymers*, 91(1):385-389pp.
- Zhao, J., Meng, M., Zhang, J., Li, L., Zhu, X., Zhang, L. and Gao, M.,** 2019, Astaxanthin ameliorates renal interstitial fibrosis and peritubular capillary rarefaction in unilateral ureteral obstruction, *Molecular Medicine Reports*, 19(4):3168–3178pp.
- Zhu, S., Wang, T., Luo, F., Li, H., Jia, Q., He, T. and Zou, T.,** 2019, Astaxanthin inhibits proliferation and induces apoptosis of LX-2 cells by regulating the miR-29b/Bcl-2 pathway, *Molecular Medicine Reports*, 49(5):3537–3547pp.

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans tez çalışmalarım kapsamında bana önderlik ve akıl hocalığı yapan değerli danışmanım Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL başta olmak üzere Prof. Dr. Murat ELİBOL ve diğer tüm Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü hocalarına, bilime olan merakımı öğreterek geliştirmemin yanında yeni ufuklar açtıkları için tüm saygılarımla teşekkür ederim.

Bana bu yolculukta inanıp güvenen ve desteklerini asla esirgemeyen, birlikte çok daha güçlü hissettiğim aileme ise sonsuz teşekkür ederim.

26 / 08 / 2019

İmzası



Şerife Dilara ÇETMİ

ÖZGEÇMİŞ

Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı Şerife Dilara ÇETMİ, 1992 yılında Antalya'da doğmuştur. Lise eğitimini Metin Nuran Çakallıklı Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nün 2015 yılında, Biyomühendis ünvanını alarak onur derecesi ile mezun olmuştur. 2015 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde Yüksek Lisans öğrenimine başlamıştır. 2017-2018 yılları arasında 1 yıl süreyle TÜBİTAK Projesi kapsamında yüksek lisans bursiyeri olarak görev almıştır. Söz konusu tez çalışmasını hazırlarken klinik araştırma alanında Atlas CRO bünyesinde öncü ilaç firmalarının sponsorluğunda saha koordinatörü olarak çalışma hayatına başlamıştır.

