

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FULVİK VE HUMİK ASİDİN *Chlorella vulgaris* ve *Spirulina platensis*
GELİŞİMİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Şebnem KURHAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2012**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FULVİK VE HUMİK ASİDİN *Chlorella vulgaris* ve *Spirulina platensis* GELİŞİMİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Şebnem KURHAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI

Bu çalışmada, kömür kökenli hümik ve fulvik asidin *Chlorella vulgaris* ve *Spirulina platensis* mikroalglerinin gelişimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmada, farklı konsantrasyonlarda hümik ve fulvik asit içeren BG-11 ve Zarrouk besi ortamlarında *Chlorella vulgaris* ve *Spirulina platensis* mikroalglerinin gelişme sürecinde; pH, hücre konsantrasyonu, protein miktarı ve ortak pigmentler olan klorofil-*a* ile karotenoid miktarı belirlenmiştir. Ayrıca *Spirulina platensis*'in sahip olduğu fikosiyenin miktarı da takip edilmiştir.

Zarrouk besi ortamında hümik ve fulvik asidin EDTA yerine kullanıldığı iki ayrı deneme kurulmuştur. *Spirulina platensis* hümik asit denemesinde en yüksek protein konsantrasyonuna 21.günde, EDTA içeren kontrol grubunda ulaşılmıştır. Diğer gelişme parametreleri olan klorofil-*a*, toplam karotenoid ve fikosiyenin miktarları protein miktarına paralel olarak aynı günde kontrol grubunda en yüksek değerlerine ulaşmışlardır. Fulvik asit içeren besi ortamında hümik asit denemesine benzer şekilde en yüksek gelişme değerleri 21. günde 250mg/L fulvik asit konsantrasyonunda elde edilmiştir. Her iki denemeden elde edilen sonuçlara göre fulvik asidin *Spirulina platensis* hücreleri tarafından hümik aside göre daha etkin bir şekilde kullanıldığı belirlenmiştir.

BG-11 besi ortamında da benzer şekilde EDTA yerine hümik ve fulvik asitler farklı konsantrasyonlarda eklenerek iki ayrı deneme kurulmuştur. *Chlorella vulgaris* 30 mg/L fulvik asit içeren ortamda, kontrol grubuna eş miktarda protein ve pigment konsantrasyonuna ulaşmıştır. *Chlorella vulgaris* fulvik asit denemesinde hücre bileşenlerinin en yüksek değerlerine ulaştığı gün 14.gün olarak belirlenmiştir. Hümik asit denemesinde de *Chlorella vulgaris* hücre kompozisyonu en yüksek değerlerine 14. günde ulaşmıştır. Bu denemede 20 mg/L hümik asit konsantrasyonunda *Chlorella vulgaris* protein ve klorofil-*a* miktarı kontrol grubuna göre önemli artış sağlamıştır. *Chlorella vulgaris* gelişiminin en yüksek olduğu 14.günde hümik asidin fulvik aside göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Temmuz 2012, 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, hümik asit, fulvik asit

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETERMINATION OF FULVIC AND HUMIC ACID ON *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* GROWTH

Şebnem KURHAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof.Dr. M. Lütfü Çakmakçı

The aim of this study is to determine the effect of humic and fulvic acids derived from coal on the growth of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* growth.

In this study, the pH changes, cell concentrations by optical density, protein and common pigment content were determined at different concentrations of humic and fulvic acid containing BG-11 and Zarrouk media during the *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* growth. Besides, phycocyanin content of *Spirulina platensis* was studied.

In two different experiments, humic and fulvic acid were used instead of EDTA in Zarrouk media. In the humic acid experiment of *Spirulina platensis*, the highest protein content was reached to 21st day of the incubation in the control group which contains EDTA. Likewise protein content, the other growth parameters chlorophyll-*a*, total carotenoids and phycocyanin content was reached the maximum level at the same day. The media with fulvic acid gave the highest yield of the cell content at 250mg/L fulvic acid concentration in the 21st day of the incubation. Results of both experiments showed that fulvic acid was used by *Spirulina platensis* more effective than humic acid.

In two different experiments, humic and fulvic acid were used instead of EDTA in BG-11 media. *Chlorella vulgaris*, in the media which contains 30 mg/L fulvic acid, has reached equivalent protein and pigment concentration which the control group has. In the fulvic acid experiment *Chlorella vulgaris* cell composition was attained the highest level at 14th day of the incubation. Also, in the humic acid trial *Chlorella vulgaris* reached the top value in the aspect of cell composition at 14th day. In the media which contains 20 mg/L humic acid, protein and chlorophyll-*a* amount of *Chlorella vulgaris* has significant increase when it's compared to the control group. Furthermore, the peak value of the progress of *Chlorella vulgaris* at the 14th day, it is observed that humic acid is more efficient than fulvic acid.

July 2012, 78 pages

Key Words: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, humic acid, fulvic acid

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca benden ilgi ve desteğini esirgemeyen, ihtiyaç duyduğum her an bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği A.B.D.), çalışmamın büyük bir kısmında laboratuvar imkânlarından yararlanmama olanak tanıyan değerli hocam Prof. Dr. Ertan ANLI'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği A.B.D.), çalışmamın liyofilizasyon aşamasındaki yardımlarından dolayı değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü), Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji laboratuvarı olanaklarından faydalanmamı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü),

Her ihtiyaç duyduğumda yanımda olduğunu hissettiren, laboratuvar deneyim ve birikimlerinden yararlandığım, çok şey öğrendiğim sevgili hocam Dr. Aylin AKOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen sevgili meslektaşım Gülşah GÖKTAŞ'a, en içten teşekkürlerimi sunarım.

benim bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi her türlü imkanı sunan, her daim yanımda duran ve bana güç veren canım ailem. İyi ki varsınız. Her şey için çok teşekkürler.

Şebnem KURHAN

Ankara, Temmuz 2012

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | vii |
| ÇİZELGE DİZİNİ..... | ix |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ..... | 3 |
| 2.1 Mikroalgler..... | 3 |
| 2.1.1 Siyanobakteriler..... | 3 |
| 2.1.2 Yeşil algler..... | 5 |
| 2.2 Mikroalglerin Hücre Bileşimi..... | 6 |
| 2.2.1 Protein..... | 6 |
| 2.2.2 Yağ asitleri..... | 7 |
| 2.2.3 Polisakkaritler..... | 8 |
| 2.2.4 Pigmentler..... | 8 |
| 2.2.4.1 Klorofil..... | 9 |
| 2.2.4.2 Karotenoidler..... | 12 |
| 2.2.4.3 Fikobiliproteinler..... | 15 |
| 2.2.5 Tokoferol ve streoller..... | 16 |
| 2.2.6 Vitaminler..... | 16 |
| 2.2.7 Antioksidan maddeler..... | 17 |
| 2.3 Metal Bağlama Özelliğine Sahip Maddeler..... | 17 |
| 2.3.1 Sentetik metal bağlayıcılar..... | 17 |
| 2.3.2 Ligno sülfonatlar..... | 18 |
| 2.3.3 Organik asitler..... | 18 |
| 2.3.4 Proteinler (Aminoasitler)..... | 19 |
| 2.3.5 Hümik maddeler..... | 19 |
| 2.3.5.1 Hümik ve fulvik asitlerin hücrede kullanılması..... | 22 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM..... | 27 |
| 3.1 Materyal..... | 27 |
| 3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroalgler..... | 27 |
| 3.1.2 Kültür ortamları..... | 27 |
| 3.1.3 Efektif doz denemesi..... | 27 |
| 3.1.4 Işık kaynağı..... | 28 |
| 3.1.5 Ekipman..... | 28 |
| 3.1.6 Hümik asit çözeltisi..... | 28 |
| 3.1.7 Fulvik asit çözeltisi..... | 28 |
| 3.2 Yöntem..... | 28 |
| 3.2.1 Gelişme koşulları..... | 28 |
| 3.2.2 Fulvik asit eldesi..... | 29 |
| 3.2.3 Aşı kültürü hazırlanması..... | 29 |
| 3.2.4 Hasat..... | 29 |
| 3.2.5 Ekstraksiyon..... | 30 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 3.2.6 | Günlük yapılan analizler..... | 30 |
| 3.2.7 | Haftalık analizler..... | 31 |
| 3.2.7.1 | Kurumadde analizi..... | 31 |
| 3.2.7.2 | Protein analizleri..... | 31 |
| 3.2.7.2.1 | Biüret yöntemiyle protein tayini..... | 31 |
| 3.2.7.2.2 | Lowry yöntemiyle protein tayini..... | 32 |
| 3.2.7.3 | Klorofil- <i>a</i> ve toplam karotenoid miktarının belirlenmesi..... | 34 |
| 3.2.7.4 | Fikosiyenin miktarının belirlenmesi..... | 36 |
| 3.2.8 | İstatistiksel değerlendirme..... | 37 |
| 4. | ARAŞTIRMA BULGULARI..... | 38 |
| 4.1 | Deneme Süresince pH'da Meydana Gelen Değişimin İncelenmesi..... | 38 |
| 4.2 | Optik Yoğunluk Ölçümleri..... | 41 |
| 4.3 | Hücre Bileşiminin Zamana Göre Değişimi..... | 46 |
| 4.3.1 | Kurumadde miktarı..... | 46 |
| 4.3.2 | Protein miktarı..... | 49 |
| 4.3.2.1 | Lowry metodu ile toplam protein miktarı..... | 49 |
| 4.3.2.2 | Biüret metodu toplam protein miktarı..... | 53 |
| 4.3.3 | Klorofil- <i>a</i> miktarı..... | 55 |
| 4.3.4 | Karotenoid miktarı..... | 59 |
| 4.3.5 | Fikosiyenin miktarı..... | 60 |
| 5. | SONUÇ..... | 64 |
| | KAYNAKLAR..... | 67 |
| | EKLER..... | 73 |
| | EK 1 Deneme boyunca kullanılan kültür ortamlarının bileşimleri..... | 74 |
| | EK 2 Deneme süresince kullanılan ekipman listesi | 76 |
| | EK 3 Protein analizleri için kullanılan standart eğriler | 77 |
| | ÖZGEÇMİŞ..... | 78 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|----------------|---------------------------------|
| AA | Araşidonik asit |
| BSA | Bovin serum albumin |
| BHT | Bütil hidroksi tolüen |
| C-PC | Fikosiyanin konsantrasyonu |
| DHA | Dokosaheksaenoik asit |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| EDTA | Etilen diamin tetra asetik asit |
| ETS | Elektron taşıma sistemi |
| EPA | Eikosapentaenoik asit |
| FTS | Serum fizyolojik tuzlu su |
| GLA | Gama-linolenik asit |
| g | Gram |
| Kl- <i>a</i> | Klorofil- <i>a</i> |
| L | Litre |
| M | Molar |
| mg | Miligram |
| nm | Nanometre |
| PC | Fikosiyanin |
| rRNA | Ribozomal ribonükleik asit |
| s | Saniye |
| THP | Tek hücre proteini |
| TKİ | Türkiye Kömür İşletmeleri |
| W | Watt |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| e^- | Elektron |
| γ | Gama |
| m ² | Metrekare |
| μ | Mikro |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | | |
|------------|--|----|
| Şekil 4.1 | Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamının pH değişimi (<i>Spirulina platensis</i>)..... | 44 |
| Şekil 4.2 | Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren Zarrouk besi ortamının pH değişimi (<i>Spirulina platensis</i>)..... | 44 |
| Şekil 4.3 | Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren BG-11 besi ortamının pH değişimi (<i>Chlorella vulgaris</i>)..... | 45 |
| Şekil 4.4 | Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren BG-11 besi ortamının pH değişimi (<i>Chlorella vulgaris</i>) | 46 |
| Şekil 4.5 | Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> hücrelerinin gelişimi (680,5 nm)..... | 49 |
| Şekil 4.6 | Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> hücrelerinin gelişimi (443,5 nm)..... | 49 |
| Şekil 4.7 | Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> hücrelerinin gelişimi (680,5 nm)..... | 50 |
| Şekil 4.8 | Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> hücrelerinin gelişimi (443,5 nm)..... | 51 |
| Şekil 4.9 | Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> hücrelerinin gelişimi (693 nm)..... | 51 |
| Şekil 4.10 | 1Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> hücrelerinin gelişimi (739 nm)..... | 52 |
| Şekil 4.11 | Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> hücrelerinin gelişimi (693 nm)..... | 53 |
| Şekil 4.12 | Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> hücrelerinin gelişimi (739 nm)..... | 53 |
| Şekil 4.13 | Fulvik asit içeren besi ortamında gelişen <i>Spirulina platensis</i> 'in kuru madde miktarı (mg/100mL)..... | 54 |
| Şekil 4.14 | Hümik asit içeren besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in kuru madde miktarı (mg/100mL)..... | 55 |
| Şekil 4.15 | Fulvik asit içeren besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in kuru madde miktarı (mg/100mL)..... | 56 |
| Şekil 4.16 | Hümik asit içeren besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in kuru madde miktarı (mg/100mL)..... | 57 |
| Şekil 4.17 | Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in protein konsantrasyonu (mg/mL)..... | 58 |
| Şekil 4.18 | Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in protein konsantrasyonu (mg/mL)..... | 58 |
| Şekil 4.19 | Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in protein konsantrasyonu (mg/mL)..... | 59 |
| Şekil 4.20 | Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in protein konsantrasyonu (mg/mL)..... | 59 |
| Şekil 4.21 | Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in protein verimi (mg/g)..... | 60 |
| Şekil 4.22 | Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in protein verimi (mg/g)..... | 61 |

| | | |
|------------|---|----|
| Şekil 4.23 | Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in protein verimi (mg/g)..... | 62 |
| Şekil 4.24 | Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in protein verimi (mg/g)..... | 62 |
| Şekil 4.25 | Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in protein konsantrasyonu (mg/mL)..... | 63 |
| Şekil 4.26 | Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in protein konsantrasyonu (mg/mL)..... | 63 |
| Şekil 4.27 | Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in protein konsantrasyonu (mg/mL)..... | 64 |
| Şekil 4.28 | Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in protein konsantrasyonu (mg/mL)..... | 64 |
| Şekil 4.29 | Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in klorofil-a konsantrasyonu (mg/mL)..... | 65 |
| Şekil 4.30 | Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in klorofil-a konsantrasyonu (mg/mL)..... | 66 |
| Şekil 4.31 | Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in klorofil-a konsantrasyonu (mg/mL)..... | 67 |
| Şekil 4.32 | Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in klorofil-a konsantrasyonu (mg/mL)..... | 67 |
| Şekil 4.33 | Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in klorofil-a verimi (mg/g)..... | 68 |
| Şekil 4.34 | Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in klorofil-a verimi (mg/g)..... | 68 |
| Şekil 4.35 | Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in klorofil-a verimi (mg/g)..... | 69 |
| Şekil 4.36 | Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in klorofil-a verimi (mg/g)..... | 69 |
| Şekil 4.37 | Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in karotenoid konsantrasyonu (mg/mL)..... | 70 |
| Şekil 4.38 | Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in karotenoid konsantrasyonu (mg/mL)..... | 70 |
| Şekil 4.39 | Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında <i>Chlorella vulgaris</i> 'in karotenoid verimi (mg/g)..... | 71 |
| Şekil 4.40 | Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in fikosiyenin konsantrasyonu (mg/mL)..... | 72 |
| Şekil 4.41 | Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in fikosiyenin konsantrasyonu (mg/mL)..... | 72 |
| Şekil 4.42 | Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in fikosiyenin verimi (mg/g)..... | 73 |
| Şekil 4.43 | Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'in fikosiyenin verimi (mg/g)..... | 74 |
| Şekil 4.44 | Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'ten elde edilen fikosiyenin saflık değerleri (A620/A280)..... | 75 |
| Şekil 4.45 | Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında <i>Spirulina platensis</i> 'ten elde edilen fikosiyenin saflık değerleri (A620/A280)..... | 75 |

ÇİZELGE DİZİNİ

| | |
|---|---|
| Çizelge 2.1 Alglerin genel kompozisyonu ve diğler besinlerle karşılaştırılması..... | 6 |
|---|---|

1. GİRİŞ

Günümüzde mümkün olduğunca az işlem görmüş, besleyici değeri yüksek besin maddelerine rağbet artarak devam etmektedir. Bu amaçla dünyanın pek çok yerinde aslında yüzyıllardır yerli halk arasında devam eden gelenekler, bugün biraz şekil değiştirerek hızla küreselleşen dünyada daha fazla kişiye ulaşmaktadır.

Dünyanın pek çok yerinde mikroalgler uzun yıllardır insanların temel besin ve de geçim kaynaklarından biri olmuştur. Çad'da *Spirulina platensis*, Meksika'da *Spirulina maxima*, Güney Amerika ve Asya'nın pek çok bölgesinde *Nostoc* türleri yerli halk tarafından temel besin maddesi olarak tüketilmektedir.

Kuru ağırlığının %50-60'ı kadar protein içeren mikroalgler, doğadaki pek çok kaynaktan daha fazla esansiyel yağ asiti ve esansiyel amino asit bunun yanı sıra endüstride oldukça yaygın kullanım alanı bulan yoğun pigment (klorofil, kartenoidler, fikosiyenin, vb.) içermektedirler. Bu özellikleri ile mikroalgler tek hücre proteini olarak kullanılabilmesi gibi, sahip oldukları fonksiyonel bileşenleri ayrı birer ürün olarak da elde edilmesi mümkündür. Bu özellikleriyle bilinen en zengin bitkisel protein kaynağı olan soyadan üstün özelliklere sahiptirler.

Hasat süresi normal bir bitkiye göre kısa olan mikroalgler ile fosil yakıtların biyoyakıtlarla değişimi konusunda oldukça fazla çalışma yapılmaktadır. Özellikle bazı mikroalg türleri içerdikleri yüksek miktardaki yağ sayesinde bu değişimi mümkün kılmaktadır. Böylelikle besin kaynağı olan mısırdan etanol üretimi yerine alglerden etanol üretimi olanaklı hale gelecektir.

Toprağın hammaddesi olan humusun işlenmesiyle elde edilen hümik ve fulvik asitler tarımda verimsiz toprakların işlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek metal bağlama kapasiteleri, bitkinin metali kullanabilmesini kolaylaştırdığı gibi özellikle endüstriyel kirlenmenin yoğun olduğu bölgelerde toprağa karışan ağır metallerin uzaklaştırılmasında da önemli rol oynamaktadır.

Mikroalglerin besin olarak kullanılmalarının yanı sıra yoğun su kirliliğinin görüldüğü bölgelerde, ağır metalleri bünyelerinde tutabilme özellikleri nedeniyle su kirliliğinin azaltılması çalışmalarında da kullanım alanı bulmaktadırlar. Bunun yanı sıra mikroalglerin azot bağlama özellikleri sayesinde özellikle pirinç tarımı yapılan bölgelerde verimi arttırmak amacıyla doğal verim arttırıcı olarak da kullanılmaktadırlar.

Mikroalglerin gelişiminde sentetik metal bağlayıcılar yerine toprak bileşeni hümik ve fulvik asitlerin kullanılması, ortak özelliklerinin kombinasyonu ve toprak kalitesine olumlu etkileri nedeniyle inorganik gübreler için de iyi bir alternatif oluşturmaktadırlar.

Bu çalışmada ökaryot mikroalg olan *Chlorella vulgaris* ile prokaryot bir siyanobakteri olan *Spirulina platensis*'in farklı konsantrasyonlarda hümik ve fulvik asit varlığında gelişimleri ve hücre kompozisyonları, kontrol grubu olan sentetik bir metal bağlayıcı EDTA içeren besi ortamında gelişen hücreler ve hücre kompozisyonlarıyla karşılaştırılmıştır. Buna paralel olarak herhangi bir metal bağlayıcı madde içermeyen besi ortamında hücre davranışı irdelenmiştir. İnkübasyon süresi boyunca birer hafta aralıklarla hücrelerin sahip oldukları toplam protein, klorofil, karotenoid ve *Spirulina platensis*'in sahip olduğu fikosiyanın konsantrasyonları ile birim kuru maddelerindeki miktarları da belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Mikroalgler

Mikroalgler, fotosentetik prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmaları temsil eder. Önceleri mavi-yeşil algler olarak bilinen siyanobakteriler, diğer algal gruplar gibi ökaryot değil, prokaryottur. Fotosentetik olmaları nedeni ile üretim sistemleri mikroalglerle aynıdır (Dalay vd. 2008). *Chlorophyta* ise yeşil algler olarak da bilinen tek hücreli fotosentetik ökaryot algleri temsil etmektedir.

2.1.1 Siyanobakteriler

Cyanophyceae, bundan yaklaşık 3,5 milyar yıl önce, Pre-kambriyen çağda oluşan, içerisinde oldukça çeşitli prokaryotik organizmaları barındıran bir gruptur. Fosillerden elde edilen kayıtlara göre, ortaya çıkışlarından 1 milyar yıl sonra, yeryüzü atmosferinde biriken oksijenden sorumlu oldukları düşünülmektedir. Siyanobakterilerin yüksek sıcaklıklarda, yoğun ışık ve düşük CO₂ konsantrasyonlarında yaşamını devam ettirebilme yeteneğinde olması, sıcak su kaynaklarından buzlu Antarktik göllerine ve topraklarına, buradan aşırı tuzlu bölgelere kadar geniş habitatlara yayılmalarını sağlamıştır. Siyanobakterilerin çok azı açık okyanuslarda bulunmakta olup, geri kalan türler nehir ağızlarındaki balçık üstlerinde, sığıklarda, ötropik tatlı su gölleri ve nehirlerde yer almaktadır (Gouveia vd. 2008).

Siyanobakterilerin çoğunluğu aerobik fotootoroflardır. Yaşamlarını devam ettirebilmek için sadece su, karbondioksit, inorganik maddeler ve ışığa ihtiyaç duyarlar. Fotosentez, enerji metabolizmalarının temel kaynağıdır. Fotosentetik yapılar içerisinde fotosistem-I ve fotosistem-II reaksiyon merkezleri bulunur. Yardımcı pigmentlerle birlikte klorofil-*a* ve karotenoidler farklı dalga boylarındaki ışığın etkin bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır (Anonymus 1999).

Siyanobakteriler, Gram-negatif bakterilerdeki 3 katlı membran yapısına benzer şekilde, bir dış membran, Gram-negatif bakterilerle karşılaştırıldığında daha kalın bir

peptidoglukan katman ve sitoplazmik membran içerirler (Colyer vd. 2005). Öbakterilerde olduğu gibi hücre duvarının belirgin, destek sağlayan peptidoglukan katmanı murein yapısındadır. Murein katmanı sitoplazma uzantılarını içeren küçük porlar içerir. Siyanobakteriyel hücre duvarları da öbakterilerdeki gibi lizozime karşı duyarlı olup, Gram-negatif bakterilerde olduğu gibi penisilin, murein tabakasının bütünlüğünü bozarak gelişimi inhibe etmektedir. Murein tabakası üzerinde çoğunluğu lipopolisakkaritlerden oluşmuş müsilaj kılıf yer almaktadır (Van den Hoek vd. 1995).

Siyanobakterilerde diğer bakterilerde olduğu gibi DNA protoplastın merkezinde yer alır. Bu bölge nükleozma olarak adlandırılır. Birçok mavi-yeşil alg küçük DNA parçaları olan plazmit de içerirler (Van den Hoek vd. 1995). 16S rRNA taşımaları ve moleküler biyolojisi nedeniyle bakteri özelliği gösterirler. Sirküler yapıda süper sarmal gene sahip olan en basit organizmalardır (Ishiura vd. 1998, Graham vd. 2004).

Karakteristik hücre içi membran yapıları olan tilakoidler hem fotosentez hem de solunum yapma yeteneğindedirler (Colyer vd. 2005). Bu yapıların üzerinde fikobilizomlar olarak adlandırılan, suda çözünebilir çok moleküllü proteinler, klorofil-*a* - protein kompleksleri, karotenoidler, fotosentetik tepkime merkezleri ve elektron taşıma sistemi (ETS) yer alır. Elektron taşınımında reaksiyonlar tilakoid zarlarında gerçekleşir. Yüksek bitkilerden farklı olarak, bu zarlar siyanobakterilerde organize bölgeler değildir. Bu reaksiyonlar yüksek bitkilerde kloroplast içinde gerçekleşirken siyanobakterilerde sitoplazma içinde oluşmaktadır. Tilakoidler klorofil-*a* içerirlerken klorofil-*b* ve -*c* bulundurmaz (Oğuz 2008). Siyanobakterilerde depo polisakkarit, glikojene benzer siyanofisin nişastasıdır. Siyanofisin nişastası, tilakoidler arasında bulunan küçük tanecikler olarak görülür (Van den Hoek vd. 1995).

Siyanobakteriler, fotosentez faaliyetleri sırasında, tıpkı bitkiler gibi hem organik karbon hem de oksijen üreten tek prokaryot grubudur. Fotosentez için gerek duydukları elektronları, alglerin ve bitkilerin yaptığı gibi, su molekülünü parçalayarak elde ederler (Graham vd. 2004). Gerçekleşen oksijenik fotosentez aşağıdaki eşitlikle özetlenebilir (Van den Hoek vd. 1995):



Fotosentez kapasitelerinin yanında biyosferdeki diğer önemli işlevleri, atmosferik azotu asimile ederek diğer organizmaların kullanabileceği mineral azota dönüştürebilmeleridir. Azot kullanabilme yeteneğindeki siyanobakteri türleri genelde iplik biçimindedir ve “heterosist” adı verilen az sayıda özelleşmiş hücre ile azot fiksasyonu yaparlar (Graham vd. 2004, Çakmakçı vd. 2008).

2.1.2 Yeşil algler

Chlorophyta (yeşil algler) dört grupta sınıflandırılırlar (Lee 1999):

- *Micromonadophyceae*
- *Charophyceae*
- *Ulvophyceae*
- *Chlorophyceae*

Chlorella vulgaris, *Chlorophyta* şubesinin dört sınıfından biri olan *Chlorophyceae* sınıfının, *Chlorococcales* takımında *Oocytaceae* familyasında yer almaktadır.

Chlorella, çapı 5-10 mikron olan küre görünümünde hücre yapısına sahiptir (Becker, 2007). Hücre duvarlarında bulunan temel polisakkarit selülozdur. Hücre duvarının bu yapısı nedeniyle hücre yapısı oldukça serttir.

Kloroplastlar ise kadehsi görünümündedirler. Kloroplast pigmentleri yüksek bitkilerde bulunan pigmentlerle benzerlik göstermektedir. Yüksek bitkilerde olduğu gibi yeşil algler de klorofil-*a* ve -*b* içermektedir. Azot yetersizliğinde karotenoidler kloroplast yüzeyinde birikerek alge turuncu-kırmızı renk verirler.

Chlorella hücreleri logaritmik büyüme evresinde yaklaşık %50 protein, %5 klorofil ve yüksek miktarda vitamin içermektedirler. Tek çoğalma şekilleri, ana hücreye bire bir benzeyen yavru hücrelerin oluştuğu eşeysiz üremedir.

Tek hücreli yeşil alglerden *Chlorella*, artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılayabilmek için üzerinde en çok araştırma yapılan alglerden biridir (Lee 1999) .

2.2 Mikroalglerin Hücre Bileşimi

Çizelge 2.1 Alglerin genel bileşimi ve diğer gıdalarla karşılaştırılması
(Becker 2007, Gouveia vd. 2008)

| ALG | % Protein | % Karbonhidrat | % Lipit |
|----------------------------------|-----------|----------------|---------|
| <i>Anabaena cylindrica</i> | 43-56 | 25-30 | 2-7 |
| <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> | 62 | 23 | 3 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 48 | 17 | 21 |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | 57 | 26 | 2 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 51-58 | 12-17 | 14-22 |
| <i>Dunaliella salina</i> | 57 | 32 | 6 |
| <i>Euglena gracilis</i> | 39-61 | 14-18 | 14-20 |
| <i>Porphyridium cruentum</i> | 28-39 | 40-57 | 9-14 |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | 50-56 | 10-17 | 12-14 |
| <i>Spirogyra</i> sp. | 6-20 | 33-64 | 11-21 |
| <i>Arthrospira maxima</i> | 60-71 | 13-16 | 6-7 |
| <i>Spirulina platensis</i> | 46-63 | 8-14 | 4-9 |
| <i>Synechococcus</i> sp. | 63 | 15 | 11 |
| Ekmek mayası | 39 | 38 | 1 |
| Et | 43 | 1 | 34 |
| Yumurta | 47 | 4 | 41 |
| Pirinç | 8 | 77 | 2 |
| Soya | 37 | 30 | 20 |

2.2.1 Protein

Mikroalglerin bileşiminde bulunan ana madde ham proteindir (Brown vd. 1997). Alg biyokütlesinin protein içeriği ise bulunduğu ortamdaki potasyum ve azot gibi besin kaynaklarının kullanılabilmesine bağlıdır. Bununla birlikte büyüme fazında alınan ışığın miktarı ve kalitesi de bu içerik üzerinde etkilidir (Gantar ve Svirčev 2008).

Spirulina platensis ile yapılan çalışmalar hasat zamanına göre protein miktarının değiştiğini göstermiştir. En yüksek protein sabah erken saatlerde elde edilmektedir. *Spirulina platensis*'in toplam protein ağırlığının %47'si esansiyel amino asitlerden

oluşmaktadır. Ancak kükürt içeren amino asitler (metiyonin ve sistein) bakımından yetersizdir. Diğer mikroorganizmaların tersine selüloz hücre duvarı içermediğinden proteinler yüksek sindirilebilirliğe sahiptir (Falquet 2006).

Gıda yetersizliği çeken toplumlarda *Spirulina* sp.'nin protein tamamlayıcı olarak kullanımını önemli avantajlar sunmaktadır. Aynı bölgede yetişen diğer tarım ürünleriyle karşılaştırıldığında, soyadan 20 kat daha fazla protein içeriğine sahiptir (Godoy Danesi vd. 2010).

Tek hücre proteini (THP) eldesinde mantarlar, mayalar ve bakterilerin yanında algler de önemli bir yere sahiptir. THP, tek hücreli canlıların oldukça yüksek protein içermesi, esansiyel amino asitler bakımından zengin, hızlı ve kolay üretilibilmeleri nedeniyle dikkatleri üzerine toplamaktadır (Katırcıoğlu ve Aksöz 2003). Ancak hücre duvarlarının parçalama ve sindirime dayanıklı olması, bunun yanında nükleik asitlerin varlığı THP'nin yaygın olarak kullanımını kısıtlamaktadır (Vananuvat ve Kinsella 1975). Diğer hücrelerde olduğu gibi THP'nin algal biyokütlenin tamamını içermesi hücre içerisindeki protein olmayan azot kaynaklarının da; nükleik asitler, aminler, glikozaminler ve hücre duvarı materyalleri ile birlikte tüketilmesine neden olmaktadır. Büyük ölçekli üretilen mikroalglerden *Scenedesmus obliquus* %12, *Spirulina* sp. %11,5 ve *Dunaliella* %6 protein olmayan azot içermektedir (Becker 2007).

2.2.2 Yağ Asitleri

Siyanobakteri olan *Spirulina* γ -linolenik asit (GLA, 18:3 ω 6), *Porphyridium* araşidonik asit (AA, 20:4 ω 6), *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Isochrysis*, *Diacronema* eikosapentaenoik asit (EPA, 20:5 ω 3) ve *Cryptocodinium*, *Schizochytrium* dokosaheksaenoik asit (DHA, 22:6 ω 3) sentezlemektedir. Bu çoklu doymamış yağ asitleri, yüksek bitkiler ve hayvanlar tarafından sentezlenemez (Gouveia vd. 2008). Esansiyel yağ asitlerinin önemli bir kaynağı olan mikroalgler, su ürünleri yetiştiriciliğinde yem olarak kullanılarak su ürünlerinin besleyici değerini de arttırmaları. Bitkisel yağdan biyoyakıt üretimi ekstra enerji ve büyük alanlara ihtiyaç duymaktadır. Eğer biodizel üretiminde bitkisel yağ kullanılırsa, toplam maliyetin %70-85'i

hammadde maliyetinden oluşacaktır. Bunun yanında mikroalgler tarımsal ve hayvansal yağlara alternatif oluşturabilecek kapasitededirler. Ayrıca mikroalg kültürlerinin verimliliği, bilinen en iyi yağlık tohumlardan elde edilen yağ veriminin çok üzerindedir. Açık havuzlarda üretilen mikroalgler ile kolza tohumundan elde edilen biyodizel verimleri sırasıyla 12 000 Litre/hektar ve 1190 Litre/hektar olarak belirtilmektedir (Chader vd. 2011).

2.2.3 Polisakkaritler

Polisakkaritler endüstride jelleştirici ve katılaştırma etmeni olarak kullanılmaktadır. Agar, aljinat ve karragenan gibi birçok ticari polisakkarit makroalglerden elde edilmektedir. Bunun yanında pek çok mikroalg de polisakkarit üretmekte, hızlı gelişme göstermeleri ve gelişmeleri sırasında çevre koşulları kontrol edilebildiği için bir kısmı endüstriyel ve ticari alanlarda kullanılmaktadır. Ticari anlamda en çok kullanılan kırmızı mikroalg *Porphyridium cruentum*'dur (Gouveia vd. 2008).

2.3.4 Pigmentler

Bütün fotosentetik organizmalar ışık enerjisini kullanabilmek için organik pigmentler içerirler. Siyanobakterilerde, klorofiller, karotenoidler ve fikobilinler olmak üzere temel olarak üç ana pigment sınıfı bulunmaktadır (Lorenz, 1998, Silveira vd. 2006,). Klorofiller (yeşil pigmentler) ve karotenoidler (sarı ve turuncu pigmentler) lipofilik olup alkol, dietil eter, benzen ve aseton içinde çözünürken, fikobilinler hidrofilitirler ve suda çözünürler (Oğuz 2008).

Mavi-yeşil alglerde pigmentler protoplastın dış kısmında yoğunlaşmıştır. Kromatoplazma olarak adlandırılan bu bölgede yer alan tilakoidlerin, elektron mikroskop çalışmalarında hücre zarına paralel uzanan serbest sitoplazmik bileşenler olduğu görülmüştür. Tilakoid membranlar yağda çözünen klorofil-*a* ve karotenoidleri içerir. Suda çözünen fikobiliproteinler ise tilakoidlerin dış yüzeylerine tutunmuş küçük bölmelerde yer alırlar (Van den Hoek vd. 1995). Ayrıca tilakoid boşluklar içerisinde

silindirik şeklindeki gaz vezikülleri bulunur. Bunlar *Spirulina*'ya yüzebilme özelliğini verir. Bunun dışında vezikül içermezler (Tomaselli, 1997).

2.2.4.1 Klorofil

Fotosentetik organizmalar buldukları sınıflara göre farklı yardımcı (aksesuar) pigmentler içermektedirler (Tomitani vd. 1999). Klorofil-*a* tüm alglerde temel fotosentetik pigmenttir. Siyanobakteriler ve kırmızı algler (*Rhodophyta*) yalnızca klorofil-*a* bulundururken, yüksek bitkilerde olduğu gibi yeşil algler (*Chlorophyta*) ve öglena (*Euglenophyta*) klorofil-*a* yanında klorofil-*b* içerirler. Diğer deniz algleri ve tatlı su diyatomları ise klorofil-*a* ve -*b*'nin yanında klorofil-*c*, klorofil-*d* ve klorofil-*e* pigmentlerine de sahiptirler (Tunail 2009).

Klorofiller hücre kuru ağırlığının % 0.5-1.5'ünü oluşturur (Gouveia vd. 2008).

Oksijenik fotosentez yapan organizmaların sahip oldukları klorofil-*a* miktarı, önemli bir gelişim parametresidir. Fitoplankton biyokütlesi, tüm fitoplankton hücrelerinin sahip olduğu fotosentetik pigment olan klorofil-*a* ile ölçülebilir (Newton, 2002). Klorofil-*a* veya toplam klorofil miktarı, fotosentez ve solunum oranlarını (mol O₂.mg/ Kl-*a*. saat) ve metabolik olarak aktif biyokütle ile karasal ve su ekosistemlerinin verimliliğini (gC./mg Kl-*a*. gün) hesaplamak için standart olarak kullanılır (Ritchie 2006).

Klorofil-*a*, fotosistem II'de yer alan klorofil-*a*₂ ve fotosistem I'de görev yapan klorofil-*a*₁'den oluşmaktadır (Govindjee 1966). Klorofil-*a* molekülleri absorbe ettiği mavi ve kırmızı ışığın enerjisini fotosistem I'in reaksiyon merkezindeki bu klorofil-*a* çiftine aktarır (Tunail 2009).

Klorofil-*a*, biri 432 diğeri 664 nm olmak üzere iki maksimum absorbans değerine sahiptir. Ancak ksantofiller, karotenoidler gibi pek çok yardımcı pigmentin de 400 nm'lerde ışığı absorblaması ve yalnızca klorofiller ile feo-pigmentlerin 600 nm dalga boylarında absorbans vermesi nedeniyle klorofillere ait optik yoğunluk (O.D)

okumaları ve bunların hesaplamaları 600 nm'deki absorbands değerleri ile yapılmaktadır (Newton 2002).

Kyler (2003), kırmızı ve yeşil alglerde bulunan fotosentetik pigmentler üzerine yaptığı çalışmada, spektrum tarama sonuçlarına göre %90'lık aseton kullanarak hidrofobik pigmentler olan klorofil-*a*'nın 430 ve 663 nm'de, klorofil-*b*'nin 458 ve 654 nm'de, klorofil-*c*'nin 466, 584 ve 620 nm'de en yüksek absorbands oluşturduğunu göstermiştir. Hem hidrofobik hem de hidrofilik özellik gösteren ve bu nedenle çözücü olarak DMSO kullanılarak elde edilen ksantofillerin ise 450 nm'de en yüksek absorbands değeri verdiğini saptamıştır.

Siyanobakterilerdeki klorofil-*a* ve fikobiliprotein konsantrasyonları kültürün bulunduğu ortam koşullarına bağlıdır. Yüksek ışık yoğunluğunda yetişen kültürler ile düşük ışık yoğunluğunda yetişen kültürler karşılaştırıldığında, yüksek ışık yoğunluğunda hücre sayısı daha az, gelişim hızı normale göre 10 kat daha yavaş olup hücreler daha geniş kofullara (vakuollere) sahiptir. Bununla birlikte bu hücreler normalin 1/3'i kadar pigment içerirler. Yoğun beyaz ışıkta gelişen hücrelerde fotosentez oranı, düşük ışıkta gelişen hücrelere göre 1/2 oranında az iken, bu hücreler yine düşük yoğunlukta gelişen hücrelere göre 2 kat daha fazla solunum yaparlar.

Hücrelerin geliştiği ışık rengi fikosiyenin (PC)/klorofil-*a* (Kl-*a*) oranının saptanmasında önemlidir. Govindjee (1966), siyanobakteri olan *Anacystis nidulans*'ın farklı ışık rejimlerinde (farklı ışık yoğunluğu ve farklı ışık renklerinde) pigment miktarı ve pigmentler arası enerji aktarımı üzerine yaptıkları çalışmada algin yetiştiği ışık yoğunluğunun, fikosiyaninden klorofil-*a*'ya enerji aktarımında önemli olduğunu ortaya koymuştur. Denemelerinde yoğun beyaz ışıkta yetiştirilen kültürlerde (PC)/(Kl-*a*) oranı 0,74 olurken düşük yoğunluktaki beyaz ışıkta (PC)/(Kl-*a*) oranı 1,05 olmuştur.

Schagerl ve Müller (2006) ise, parlak ışık altında gelişen siyanobakterilerde zeakstantin/klorofil-*a* oranının arttığını belirtmişlerdir.

Ekstraksiyon yöntemi olarak genellikle sonikasyon, öğütme ve dondurma-çözdürme yöntemlerinden biri tercih edilir (Akoğlu 2012). Burada amaç, kloroplastın parçalanarak pigment kaybı olmadan renk maddelerinin çözücüye geçmesidir. Çözücü olarak ise genellikle pigment yapısına zarar vermeyen %90'lık aseton kullanılır. Hücreler parçalandıktan sonra tam ekstraksiyonun sağlanması ve yabancı maddelerin uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulanır. Santrifüjün ardından üstte kalan süpernatant çözünmüş saf pigment ekstraktı olarak kullanılır. Bu ekstrakt gerek florümetre (klorofil floresanının belirlenmesi için), gerek spektrofotometre (klorofil absorbansının saptanması için), gerekse diğer fitoplankton pigmentlerinden klorofilin ayrılması için kromatografide kullanılabilir (Newton 2002).

Ekstraksiyon yönteminde kullanılan derişik HCl çözeltisi klorofil pigmentinin degradasyonuna yol açmaktadır. Yıkıma uğramış bu klorofil molekülleri (feo-pigmentler), hücrelerin asit ile hidrolizinin ardından spektrofotometrede 664.5, 606 ve 534 nm dalga boylarında en yüksek absorbans değerleri elde edilmektedir. Bu dalga boyları feofitinlere özgü dalga boylarıdır (Shan 1998, Newton 2002).

Klorofil-*a* ölçümlerinde yapılan hatanın temel kaynağı ortamda klorofil-*a* dışında klorofil pigmentlerinin olmasıdır. Özellikle klorofil-*b* bu hatanın asıl nedeni olarak gösterilmektedir. Klorofil-*b*, klorofil-*a*'nın olduğundan daha az ölçülmesine ve feo-pigmentlerin ise olduğundan daha yüksek ölçülmesine neden olmaktadır (Newton 2002)

Kırmızı spektrum bölgesinde klorofil-*a* absorpsiyonu, klorofil-*b*, -*c*₂ ve (*c*₂+*c*₁) ile kuvvetli bir etkileşim göstermektedir (Ritchie 2006). Bu nedenle tüm hesaplamalarda 664 nm'deki optik yoğunluk bir sönümlenme katsayısı ile çarpıldıktan sonra diğer pigmentlerin etkileşimini düzeltmek için klorofil-*b*'nin 647 nm'deki absorbans değeri ve klorofil-*c*'nin 630 nm'deki absorbans değeri çıkarılır. Spektrofotometrede ölçüm yapıldıktan sonra klorofil konsantrasyonunun saptanması için pek çok eşitlik bulunmaktadır. Ancak her eşitliğin her organizma ve her çözücü için kullanımı doğru değildir. Örneğin, siyanobakteriler klorofil pigmentleri içerisinde yalnızca klorofil-*a* içerir. Bu nedenle siyanobakterilerde %90'lık metanol içerisindeki klorofil-*a* miktarı:

$$\text{Klorofil-}a \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 13.9 * A_{665}$$

eşitliği ile hesaplanır (Macias-Sanchez vd. 2005).

Yüksek bitki ve yeşil algler klorofil-*a* ve klorofil-*b* pigmentlerini içermektedirler. Bitki ve yeşil alglerdeki %90'lık aseton içerisinde çözünen klorofil-*a* ve -*b* miktarları:

$$\text{Klorofil-}a \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Klorofil-}b \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664}$$

ile hesaplanır (Mitchell ve Kiefer 1984).

2.2.4.2 Karotenoidler

Karotenoid maddeler 640'tan fazla tanımlanmış üyeye sahip olup, organizmalarda en yaygın bulunan pigmentlerdir (Schagerl ve Müller 2006). Kimyasal yapısı 40-karbon polien zincirinden türemiş olup, bu zincir molekülün temelini oluşturur. Polien sistem, karotenoid maddelere kimyasal ve ışık soğurma özelliklerini kazandırır. Bu zincir, halkasal yapılar ile sonlandırılabilir ya da oksijen içeren fonksiyonel gruplar ile tamamlanabilir. Hidrokarbon yapısındaki karotenoidler karoten olarak adlandırılırken, oksijenlenmiş türevleri ksantofiller olarak bilinir. Oksijen, -OH grubu olarak (lutein), -oksi grubu olarak (kantaksantin) ya da her ikisinin kombinasyonu olarak (astaksantin) yer alabilir (Higuera- Ciapara vd. 2006).

Karoten maddeler hücre içerisinde birçok görev üstlenmektedirler. Temel fonksiyonları hücreyi yoğun ışıktan korumaktır. Yeterli miktarda görünür ışığı alan ve ancak uzun süre doğrudan görünür ışığa maruz kalan hücreler ışıktan olumsuz etkilenirler. Fotoreaksiyonlar nedeniyle gerçekleşen bu olay, ışığı absorbe eden pigmentlerin uyarılması ve enerjiyi oksijen üzerine transfer etmesinden kaynaklanır. Oksijenin tek değerlikli O₂⁻ haline dönüşmesi ile son derece reaktif oksitleyici etken ortaya çıkar. İşte bu durumda karotenoidler devreye girerek oksijenin enerjisini absorblar. Bu

antioksidan özelliği sayesinde reaktif oksijenin zararlarını azaltarak, membran bütünlüğünün korunmasına yardımcı olurlar. Bu görevlerin yanında ışık toplama özelliği ile fotosistem-I ve -II'de fotokimyasal olaylara katılma ve fotosentez için kullanılan ışık dalga boylarının sınırlarını genişletme, tilakoid membran yapısını güçlendirme ile aşırı uyarılmış klorofil molekülünün enerjisini düşürme sayılabilir (Higuera-Ciapara vd. 2006, Schagerl ve Müller 2006, Bulda vd. 2008, Tunail 2009).

Fotosentez yapan dokularda karotenler, klorofil içeren pigment-protein kompleksleri olan tilakoid membranların tamamlayıcı (integral) bileşenleridir (Bulda vd., 2008). *Chlorophycean* familyasında temel karotenoidler kloroplast katmanları içerisinde, tilakoid membranların stromaya dönük kısımlarına yerleşmişlerdir (Gouveia 1996, Tunail 2009).

Mikroalglerin karotenoidleri sentezi türlere bağlı olup, algin yaşı da önemli bir etkendir. Bunun yanında çevresel koşulların değişmesi, örneğin normal tuz değerlerinden sapmalar, sıcaklık, ağır metal konsantrasyonu, ortamdaki azotun kullanılabilirliği ve ışık yoğunluğunda artışlar, hücreler üzerinde stres yaratarak karotenoid sentezinin artmasına neden olurlar (Gouveia 1996). Siyanobakterilerdeki karotenoid miktarı, baskın pigmentlerin miktarı sabit kalırken gelişme koşullarına göre değişkenlik gösterir (Schagerl ve Müller 2006). Elverişsiz kültür koşullarında, birçok mikroalg türünün yüksek miktarda astaksantin, kantaksantin ve ekinenon gibi sekonder karotenoidleri sentezlediği ortaya konmuştur (Orosa vd. 2000).

β - karoten, zeaksantin, ketokarotenoidler (ekinenon ve kantaksantin) ve glikozidli karotenoid miksoksantofil siyanobakterilerde bulunan karotenoid maddelerdir. Miksoksantofiller yalnızca siyanobakterilere özgü olup diğer alg gruplarında tespit edilememiştir (Schagerl ve Müller 2006).

Chlorophycean familyası ise, β -karoten, α -karoten, lutein, violaksantin, neoksantin, anteraksantin ve zeaksantin gibi yüksek bitkilerle aynı temel karotenoidleri içermektedir (Gouveia vd. 1996, Orosa vd. 2000). Bunların aksine, ekinenon, hidroksiekinenon, kantaksantin ve astaksantin gibi ikincil karotenoidler kendiliğinden

buldukları gibi, temel karotenoidlerin farklı derecelerde esterleşmesiyle de oluşabilirler (Gouveia vd. 1996).

Goodwin (1957), 7 farklı mavi-yeşil alg ile yaptığı çalışmada, mavi-yeşil algler tarafından β -karoten, ekinenon ve miksoksantofil olmak üzere 3 temel karotenoid sentezlendiğini tespit etmiştir. Zeaxantin ise çok az miktarda bulunmakta olup, toplam karotenoidlerin %30-60'ını β - karotenin oluşturduğunu bildirmiştir.

Orosa vd. (2000), 5 farklı mikroalg türü ile yaptığı çalışmada, azot yetersizliği ve yoğun ışığın *Haematococcus plusvalis*'te astaksantin sentezinin tetikleyicisi olduğunu belirlemişlerdir.

Siyanobakterilerin sahip olduğu toplam karotenoid miktarı %90'lık metanol içerisinde çözümlenerek,

$$\text{Toplam karoten}(\mu\text{g/mL})= 4,5 * A_{475}$$

formülü ile hesaplanır (Zou and Richmond, 2000). Burada A %90'lık metanol içerisinde çözümlenmiş karotenoidlerin 475 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değeridir.

Yeşil mikroalglerde %90'lık aseton içerisinde çözümlenmiş toplam karoten miktarı ise,

$$\text{Toplam karoten}(\mu\text{g/g})= \frac{A * V * D}{0,16 * KM}$$

formülü ile hesaplanır (Gu vd. 2008). Bu eşitlikte A %90'lık aseton içerisinde çözümlenmiş pigmentin 475nm dalga boyunda elde edilen absorbans değeri, V aseton hacmi (mL), D, seyreltme kat sayısı, KM ise gram cinsinden kurumadde ağırlığıdır.

2.2.4.3 Fikobiliproteinler

Siyanobakteri ve kırmızı alglerde tilakoid membranının sitoplazmaya dönük kısmına yerleşik özel yapılar olan fikobilizomlar, içinde fikobiliproteinleri bulunduran yardımcı pigmentlerdir. Fikobilinler fikoeritrobin, fikosiyanobin gibi protein olmayan bileşiklerin, proteinlerle birleşmesi ile meydana gelirler. Proteinin prostetik grubu olan fikobilinler, kovalent bağlı, dört pirol halka yapısının oluşturduğu doğrusal tetrapireol yapısında, parlak renkli suda çözünen proteinler arasında yer almaktadır (Abalde vd. 1998, Tunail 2009).

Fikobiliproteinlerin %75'ini fikosiyaninler, %12'sini allofikosiyaninler, %12'sini de fikoeritrinler ile pigmentersiz polipeptidler oluştururlar (Tunail 2009). Fikobilizomlar merkezinde allofikosiyanin bulunan, fikosiyaninle çevrilmiş olup ve (eğer varsa) en dış katmanda fikoeritrinden oluşurlar. Fikosiyanin temel bileşen olup, allofikosiyanin ise fikobilizomlar ve fotosentetik lameller arasında bağlayıcı pigment görevindedir (Sarada vd. 1999). Fikobiliproteinleri fikobilizoma ve fikobilizomları tilakoid membrana bağlama görevini renksiz polipeptidler üstlenirler (Abalde vd. 1998). Fikosiyaninler klorofillerin tersine, absorbladığı ışığı fotosistem I yerine fotosistem II'ye aktarırlar. Pigment-protein kompleksleri genellikle 550-650 nm dalga boyları arasındaki ışığı absorblar. Bu pigmentlerin amacı görünür ışığın daha geniş sınırlar arasında kullanılmasını sağlamaktır (Tunail 2009).

Fikobiliproteinler suda çözünen protein-pigment kompleksleri halinde kolaylıkla izole edilebilirler (Abalde vd. 1998). *Spirulina platensis*'te fikosiyanin miktarı hücre kuru ağırlığının %20'sini oluşturmaktadır (Chaiklahan vd. 2011).

Fikosiyanin özellikle Uzakdoğu'da gıda ve kozmetik sanayiinde geniş kullanım alanı bulmaktadır. Ancak fikosiyaninin ışığa ve sıcaklığa karşı duyarlı olması yaygın olarak kullanılmasını kısıtlamaktadır. Fikosiyanin kullanım alanını daraltan termal stabilitesinin düşük olması, ortama çeşitli karbonhidratların eklenmesi ile giderilebilmektedir (Furuki vd. 2003). Şekerler gibi polihidrik kosolventler protein

yapısını denatürasyona karşı korumakta ve hidrofobik etkileşimleri güçlendirmektedir (Chronakis 2001).

Bir siyanobakteri veya kırmızı algin sahip olduğu fikosiyanın konsantrasyonu,

$$C-PC \text{ (mg/mL)} = (A_{620} - 0,47A_{652})/5,34$$

eşitliği ile hesaplanır (Moraes vd. 2011). Birim gramdan elde edilen fikosiyanın miktarını belirlemek amacıyla verim hesaplaması da;

$$\text{Verim (mg/g)} = (C-PC * V) / KM$$

formülü ile yapılır (Moraes vd. 2011) .

Fikosiyanın kullanım alanını belirleyen saflık derecesi önemli bir parametredir. Saflık oranının belirlenmesi amacıyla fikosiyanine ait dalga boyu 620 nm’de elde edilen aborbans değerinin, 280 nm’de elde edilen toplam proteine ait absorbans değerine oranıdır (Moraes vd. 2011).

$$\text{Saflık} = A_{620} / A_{280}$$

2.2.5 Tokoferol ve steroller

Tokoferoller, fotosentetik (yapraklar vs.) ve fotosentetik olmayan (tohumlar vb.) bitkisel dokularda ve alglerde yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak maya, küf ve alg cinsleri arasında en yüksek tokoferol miktarına sahip olan bir mikroalg olan *Euglena*’dır (Gouveia vd. 2008).

2.2.6 Vitaminler

Mikroalg biyokütlesi esansiyel vitaminleri içeren değerli bir kaynaktır. B₁₂ vitamini ve demirin yüksek miktarda bulunması mikroalgleri özellikle vejeteryan bireyler için

oldukça değerli kılmaktadır. Alglerin vitamin içerikleri genotiplerine, gelişme evreleri, algin besleyici durumu ve ışık yoğunluğuna bağlıdır. Ancak hücre içindeki vitamin içeriği çevresel faktörler, hasat yöntemi ve biyokütleyi kurutma metoduna göre dalgalanmalar gösterir (Gouveia vd. 2008).

2.2.7 Antioksidan maddeler

Fotootrof organizmalar olan mikroalgler yüksek oksijen ve radikal stresine maruz kalmaları nedeniyle, reaktif oksijen ve serbest radikallere karşı etkin koruyucu sistemlere sahiptirler. Bu nedenle mikroalglerden elde edilen doğal antioksidanlar kozmetikte (güneş kremi) ve fonksiyonel gıdalarda kullanım alanı bulmaktadır. Doğal bir antioksidan olan α - tokoferol ve yapay bir antioksidan olan BHT ile karşılaştırıldığında metanol ile ekstrakte edilmiş mikroalgal ham ekstraktlar daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (Gouveia vd. 2008).

2.3 Metal Bağlama Özelliğine Sahip Maddeler

Tarımda minerallerin bitkiler tarafından kullanılabilmesi için minerallerle karıştırılarak kullanılan 5 grup madde bulunmaktadır (Anonymus 2011):

- Sentetik metal bağlayıcılar
- Ligno sülfonatlar
- Hümik ve/veya fulvik asit
- Organik asitler
- Protein (Amino asitler)

2.3.1 Sentetik metal bağlayıcılar

Zirai mineral bileşimlerinde en sık kullanılanı EDTA'nın disodyum tuzudur. Sentetik şelat maddeleri arasında en yüksek metal bağlama kapasitesine sahiptir.

EDTA'nın oluşturduğu şelatlar oldukça kararlı yapıdadırlar. Mikrobiyal degradasyona karşı oldukça dayanıklı olduklarından toprakta bozunmadan uzun süre kalırlar. Ancak yaprak üzerine püskürtülerek uygulanan suni gübrelerde bitki ile minerali kullanmak için rekabete girerler. EDTA'nın özellikle kalsiyum iyonu ile yoğun birleşme eğiliminde olması bitkinin bu metali kullanmasını azaltır (Anonymus 2011).

2.3.2 Ligno sülfonatlar

Lignin yüksek bitkilerin odunsu bölgelerindeki temel polimerdir. Tekrarlanan fenil propan gruplarından oluşan lignin, odun kuru ağırlığının %20-30'unu oluşturur.

Ligno sülfonat, molekül yapısındaki uygun yalnızca 2-3 bölge ile gerçek anlamda şelat oluşturabilir. Molekül yapısının büyüklüğü düşünüldüğünde, yalnızca 2-3 bölge ile reaksiyon vermesi etkin bir şekilde şelat yapıcı madde olarak kullanılmasını sınırlandırmaktadır.

Lignin bazlı mineral karışımların en önemli avantajı maliyetlerinin çok düşük olmasıdır. Biyolojik olarak geri dönüştürülebilen polimer olması sayesinde toprak mikroorganizmaları tarafından kullanılabilir. Ayrıca ligno sülfonat toprak uygulamalarında yüzey gerilimini azaltır (Anonymus 2011).

Ligno sülfonatin kullanılmasını sınırlandıran en önemli dezavantajı ise yaprak yüzeyine gübre uygulamalarında molekülün büyük olması nedeniyle, yaprak tarafından kullanılamamasıdır. Ancak uygun sülfonatlama yöntemleriyle düşük molekül ağırlıklı lignin sülfonatlar oluşturulabilir.

2.3.3 Organik asitler

Organik asitler bitkilerde (+2) yüklü metallerin taşınmasında ve çözünmesinde rol alırlar. Negatif yüklü oldukları için anyonik organik asitler olarak bilinirler. Zirai uygulamalarda en çok bilineni ve kullanılanı sitrik asittir.

Yaprak üzerine uygulandıklarında bu anyonik organik asitler pozitif yüklü mineralleri nötralize ederek yaprakta tutunmalarını ve bitki metabolizmasına katılmalarını kolaylaştırırlar.

Sentetik ve bazı amino asit metal bağlayıcılarla karşılaştırıldığında, organik asitler minerallerle özellikle yüksek pH seviyelerinde zayıf bağ yaparlar (Anonymus 2011).

2.3.4 Proteinler (Aminoasitler)

Aminoasitler bitkilerin üretebildikleri, metallerin taşınması ile çözünebilirliğini sağlayan ikinci grup doğal maddelerdir. Bitkilerin dış yüzeyinde bulunan kutikula tabakasının geçirgenliğini arttırarak bitki dokusuna mineral taşınmasını sağlarlar.

Ancak enzimatik protein hidrolizi pahalı bir yöntem olduğundan zirai verim arttırıcılarda kullanılması yaygın değildir (Anonymus 2011).

2.3.5 Hümik maddeler

Topraktaki organik maddelerin ana içeriği humustur. Hümik asit, fulvik asit ve hümin temel hümik madde türevleri olup çoğu topraklarda hümik maddelerin yaklaşık olarak %50 hümin, %40 hümik asit ve %10 fulvik asit şeklinde dağıldığı tahmin edilmektedir (Chiou 1989).

Bitki ve hayvan kalıntılarının ayrışmasıyla meydana gelen hümik maddeler, proteinler, polisakkaritler ve polinükleotitler gibi bileşiklere dönüşmeyen polikondanse bileşiklerdir. Hümik maddeler, kolloidal yapıdaki heterojen makromoleküller olup topraktaki organik moleküllerin %60-70'lik kısmını teşkil etmektedirler (Prakash ve Rashid 1968). Hümik maddeler bir takım fizikokimyasal (sorpsiyon, koagülasyon, asit-baz etkileşimleri ve kompleksleşme reaksiyonları) ve kimyasal tepkimeler (redoks, hidroliz, ve fotokimyasal reaksiyonlar) ile çevresel kirleticilerin etkilerinin azaltılmasına yardımcı olur. Su sistemlerinde organik veya inorganik kirleticilerin

hümik maddeler tarafından bağlanması kirleticilerin hareketliliğini ve biyolojik kullanılabilirliğini değiştirebilir.

Hümik maddeler topraktaki minerallerin bitkiler tarafından alınmasını düzenler ve bitkinin vitamin değerini arttırmaları. Toprağın su tutma kapasitesini arttırarak kuraklığı önlemede yardımcı olur ve erozyonu azaltır. Pestisitlerin zararlı etkilerini azaltırlar (Kutluca 2007).

Hümik maddeler çözünürlüklerine göre dört gruba ayrılırlar (Prakash ve Rashid 1968),

- Hümin ve ulminler
- Hümik asitler
- Fulvik asitler
- Hematomelonik asitler

Hümin ve ulminler, herhangi bir pH değerinde çözünmezler. Kolloidal yapıdaki bu hümik maddelerin alger tarafından kullanılmaları imkânsızdır (Prakash ve Rashid 1968).

Hümik asit ise humusun en aktif maddesidir. Hümik asitler kararlı kümeler oluşturan doğal fenolik biyopolimerlerdir. Fenoller, kinonlar ve amino bileşenlerin kondensasyon ürünleridir. pH'sı 2'den küçük olan asidik özellikteki sularda çözünmezler. Moleküler ağırlığı fazla olup uzun zincir molekül yapısındadır. Rengi koyu kahverengi ile siyah arasındadır. Fulvik asitlere göre daha fazla azot, hidrojen, karbon ve kükürt içerirken daha az oksijen bulundurlar. Yapılarında önemli miktarda hidroksil (-OH) ve karboksil (-COOH) grupları bulunur (Anonim 2006, Karakaya 2007, Kutluca 2007, Anonim 2012).

Hümik asitin yapısında bulunan en önemli fonksiyonel grup -COOH gruplarıdır. Bu gruplar hümik asit molekülüne metallerle şelat yapabilme özelliği kazandırır. Şelat oluşturma özelliği ile metallerin çökmesi önlenir, metal iyonlarının canlılar tarafından metabolizmalarında kullanımı kolaylaşır ve ağır metallerin zehirleyici

etkileri azaltılabilir ve hatta yok edilebilir. Bu etkilerinin yanı sıra hümik asitler ultraviyole ve görünür bölge ışınlarının iletiminde de görev almaktadır (Kutluca 2007).

Hümik asitlerin yapılarında çok sayıda fonksiyonel grup bulunmaktadır. Sahip oldukları $-COOH$ ve kısmen $-OH$ grupları sayesinde iyon değişimi yaparak, $-COOH$, $-OH$, $-NR_2$, SH ve heterosiklik yapılar sayesinde kompleks oluşturarak, polar ve apolar kısımlar yardımıyla adsorbsiyon yaparak ve son olarak da kinon ve hidrokinon yapıları sayesinde redoks tepkimeleri vererek çevresinde bulunan maddelerle sürekli etkileşim halindedir (Karakaya 2007).

Fulvik asitler sarı-açık kahverengi renkte, hümik maddelerin herhangi bir pH değerinde suda çözünebilen bileşenidir. Hümik asitlerden daha polar karakterlidirler ve daha fazla $-COOH$ ve $-OCH_3$ grubu içerirler. Molekül ağırlığı, hümik asitlere göre daha düşük olup, sahip oldukları fonksiyonel gruplar nedeniyle hümin ve hümik asitlere göre hidrofil karakterlidirler. Fulvik asitlerin toplam asitliği (900-1400meq/100g) hümik asitlerden (100-870 meq/100g) daha yüksektir (Karakaya 2007).

Fulvik asitler, hümik asitlere göre daha düşük molekül ağırlığına sahiptirler. Ancak hümik asitlere göre daha yüksek miktarda karboksil grubu içermeleri hidrofilik özelliklerini arttırmaktadır. Bu nedenle de hümik asitlerin çözünmediği düşük pH değerlerinde de çözünebilmektedir. Bu sayede metallere iyi kompleks oluşturabilirken, hidrofob bileşenlere bağlanma kapasitesi düşüktür. Öte yandan yüksek molekül ağırlıklı, hidrofobik çekirdek ve hidrofil gruplardan oluşan uzun zincir (misel) yapısındaki hümik asit, bu farklı gruplar yardımıyla organik hidrofob kirleticilerin adsorbe edilerek yüzeyde tutulmalarını sağlarken, adsorbsiyonunu da yapabilmektedir (De Paolis ve Kukkonen 1997).

Fulvik asit hümik aside göre daha küçük bir moleküler yapıya sahip olduğundan kalıcılığı daha azdır ve daha kolay parçalanır. Ancak yaprak uygulamalarında bitkiye giriş hızı daha yüksektir. Hümik asit ise toprakta uzun süre kalır ve zaman içerisinde yavaş parçalanır. Genel olarak toprak organik madde miktarını arttırmada uzun süreli etkilerinden dolayı hümik asitlerden faydalanılır. Çevre koşullarına bağlı olarak fulvik

asitlerin yarı ömrü 10-50 yıl arasında değişirken, hümik asitlerin yarı ömrü ise yüzyıl olarak ölçülür (Anonim 2006).

Hümik asitler, toprağın katyon değişim kapasitesini en yüksek seviyeye çıkartırlar. Kimyasal olarak aktif bir karaktere sahip olduklarından topraktaki çeşitli metaller ve mineraller ile çözünebilir veya çözünemez kompleksler oluşturma yeteneği vardır. Bu şelatlama özelliği bitkinin besinleri kolay ve sürekli almasını sağlar. Demir eksikliğini gidermeye yardımcı olurlar. Topraktaki kireç içerisindeki karbondioksiti serbest duruma getirerek, fotosentezde kullanılmasını sağlar. Topraktaki azot, fosfor, potasyum, demir, çinko ve iz elementler gibi gerekli besinlerin bitki tarafından daha etkin bir şekilde kullanılmasını sağlar (Anonim 2006).

Hümik asit biyokimyasal özelliği ile toprakta mevcut olan kurşun, cıva, kadmiyum ve diğer zararlı ve radyoaktif elementlerin, endüstriyel atıkların, zehirlerin ve çevre için zararlı kimyasal maddelerin çözünebilir durumdan, çözünemez duruma geçmelerini sağlar. Böylece, bunların bitki tarafından emilmelerini önler. Bunların zamanla dibe çökmesi sonucu toprak temizlenir (Anonim 2006).

2.3.5.1 Hümik ve fulvik asitlerin hücrede kullanılması

Hümik ve fulvik asitler, mineral katkılı zirai gübrelere eklendiklerinde maliyeti düşürürler. Eğer bitkide taşınma katılabilecek kadar küçük partiküller halinde ise bitki kimyasallarının öncül formlarını oluştururlar. Fulvik asit, minerallerin bitki dokularında kullanılmasında veya hareketinde doğrudan görev almaz. Daha çok bitki gelişimini teşvik edici ve bitki hormonlarının öncüllerinin sentezlenmesinde rol oynar İz metal çözeltilerinde hümik moleküller, molekül büyüklükleri ve düşük pH'da zayıf çözünmeleri nedeniyle çökelme eğilimindedirler. Ayrıca büyük moleküller halinde olması nedeniyle verimsiz topraklarda mikrobesein elementlerinin bitkiye püskürtülerek verildiği durumlarda bu besin elementlerinin kullanılma miktarını düşürürler (Anonymus 2011).

Fulvik asit, mineral ve metallerin sudaki çözünürlüklerini arttırarak biyokimyasal aktifliklerini sağlar. Fulvik asit kompleksleri ve şelatları hücre duvarı gibi yarı geçirgen membranlardan geçerek besin maddelerinin iletilmesine yardımcı olur. Fulvik asit hücre gereksinimine göre hem elektron (e⁻) alıcısı hem de elektron vericisi olarak davranır. Fulvik asit çözeltisi içerisinde bulunan iz metaller de fulvik asidin bu redoks tepkimelerinde elektrot görevi üstlenirler (Anonymus 2006).

Prakash ve Rashid (1968), hümik asidin demir ile kompleks oluşturduğunu ve algin hücre içine demiri almasını teşvik ettiği ve gelişimini desteklediğini bildirmiştir.

Lange (1970), Zhender-Graham besi ortamında EDTA ve sitratın yerine fulvik asit ekleyerek *A.circinalis*, *Gloeotrichia echinulata*, *Microcystis aeruginosa* ve *Nostoc muscorum* hücre sayılarında önemli artış tespit etmiştir. Fulvik asidin bu etkisinin demiri ve diğer iz elementleri bağlayarak bunların kullanılabilirliğini arttırmasından ileri geldiğini belirtmiştir (Lange 1970).

Birçok mavi-yeşil alg, yapay metal bağlayıcı maddelerin yokluğunda, yüksek pH değerlerinde yaşamlarını devam ettirmelerini sağlayan kendi doğal şelat maddelerini oluşturabilir. Siyanobakterilerle yapılan çalışmada yapay şelat maddesi içermeyen ortamdaki gelişmelerinin algden alge değişme gösterdiği tespit edilmiştir (Lange 1974). Çok düşük hümik asit konsantrasyonlarında *Chlorella vulgaris* ortamda metal bağlayıcı madde yokmuş gibi davranmakta ve gelişimi geç safhalarda hızlanmaya başlamaktadır. Bu da algin, şelat yapıcı madde içermeyen ortamda gelişebilmesi için kendi şelat maddesini sentezlemekte olduğu düşüncesini desteklemektedir (Hoeffner ve Manahan 1980)

Hoeffner ve Manahan (1980), kömürden elde ettikleri hümik asidin *Chlorella vulgaris* gelişimine etkisini araştırmışlardır. Değişen miktarlarda, ayrı ayrı EDTA ve hümik asit içeren besi ortamlarında gelişen *Chlorella vulgaris* için düşük hümik asit derişimleri alg gelişimini teşvik ettiği ancak düşük dozlarda EDTA içeren besi ortamlarının değişken sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Derişimin yavaş yavaş arttırılarak algin ortama alıştırıldığı durumda optimum hümik asit konsantrasyonu 75 mg/L, algin hümik

asite alıştırılmadan doğrudan hümik asit içeren besi ortamında gelişime bırakıldığı durumda ise optimum hümik asit konsantrasyonu 55 mg/L olarak belirlenmiştir.

Ohkubo vd. (1998), Kasumigaura gölünden (Japonya) izole ettikleri hümik ve fulvik asitler ile yaptıkları çalışmada, 1 mg/L hümik asitin kontrol grubuna göre *Microcystis aeruginosa* hücre konsantrasyonunu arttırdığını ve 51mg/L ile en yüksek hücre konsantrasyonuna 20mg/L hümik asit içeren besi ortamında ulaştığını ifade etmiştir. Fulvik asit içeren besi ortamında ise 10 mg/L ve daha az fulvik asit konsantrasyonlarında fulvik asidin etkisi gözlenmemiştir. Bu konsantrasyonlarda hücre gelişimi benzerlik göstermiş ve asıl artış, 20 mg/L fulvik asit içeren besi ortamında 20 mg/L hücre konsantrasyonuna ulaşılmasıyla gerçekleşmiştir. Bu sonuçlara göre her iki asidin de alg gelişimini teşvik ettiği ancak hümik asidin fulvik aside göre şelat oluşturma yeteneğinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Bakırın, EDTA ve fulvik asit içeren besi ortamlarında *Scenedesmus suspicatus* 86.81 SAG mikroalginde birikimi ve alg gelişiminin inhibisyon miktarı incelenmiştir. Hem EDTA hem fulvik asit, bakırın alg hücre duvarı tarafından adsorbe edilmesini önleyerek bakırın toksik etkisinin azaldığı belirlenmiştir (Ma vd. 2003).

Pouneva (2005), Biomin (düşük kaliteli linyit kömürünün işlenmesiyle elde edilmiş, organik maddesinin %90'ı hümik asitlerden oluşan bitki büyüme düzenleyicisi) ilave edilmiş besiyerlerinde iki ökaryotik mikroalg (*Scenedesmus* ve *Chlorella*) ve iki siyanobakterinin (*Nostoc* ve *Anabaena*) gelişmelerini karşılaştırmıştır. 1-10 mg/L düzeyinde eklenen Biomin, protein ve klorofil-*a* sentezini hızlandırarak biyokütle artışı sağlamıştır. Etkisinin siyanobakterilerden daha çok yeşil alglerde yüksek olduğu görülmüştür. Pouneva bu etkininin, hümik maddelerin bitkilerde sentezlenen giberellin ve sitokin gibi büyüme hormonlarına benzer öncül yapıların, alglerdeki sentezini arttırmasıyla gerçekleştiğini öne sürmektedir.

Sun vd. (2005), farklı konsantrasyonlarda demir ve hümik asit içeren kesikli kültür ortamlarında, alg patlamasına neden olan *Anabaena circinalis* siyanobakterisi ile çalışmışlardır. Bu çalışmada *A.circinalis* gelişimi için gereken demir konsantrasyonu

eşik değeri 10^{-8} - 10^{-7} M olarak belirlenmiştir. Hümik asit ise toksik etki göstermiştir. Hümik asit, demirin metabolizmada kullanımını azalttığı için hücre çoğalmasını yavaşlatmış ve hücre sayısının en yüksek değere ulaşmasını engellemiştir.

Besi ortamı içerisinde Lantan ve EDTA'nın *Microcystis aeruginosa* ve *Scenedesmus quadricauda*'nın hem gelişimi hem de birbirleriyle olan rekabeti üzerine etkisi araştırılmıştır. Lantan eklenmemiş, yüksek miktarda EDTA ($>13,4$ $\mu\text{mol/L}$) içeren besi ortamının *M.aeruginosa* gelişimini inhibe ettiği, bu nedenle de *S.quadricauda*'nın baskın hale geldiği görülmüştür. Lantan ile birlikte orta miktarda ($2,69$ - $13,4$ $\mu\text{mol/L}$) EDTA içeren besi ortamında, lantanın *M.aeruginosa*'ya inhibisyon etkisinin azaldığı ve böylelikle ortamdaki baskın türün *M.aeruginosa* olduğu belirtilmiştir (Jin vd. 2009).

Mostafa ve Ali (2010) pirinç samanından elde edilmiş hümik ve fulvik asit çözeltilerini sentetik Zarrouk besi ortamına ekleyerek *Spirulina platensis* gelişimine etkisini araştırmışlardır. 80 - 100 mL/L hümik asitin pigment miktarı ve gelişimi arttırdığını, fulvik asitin tüm konsantrasyonlarında gelişimin kontrol grubunun altında kaldığı, ancak fulvik asit içeren kültürlerin hümin içeren kültürlere göre daha iyi gelişme gösterdiğini belirlemişlerdir.

Prakash vd. (2011), *Spirulina platensis* üretiminde hümik asidin etkisini gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri bulgular, $\%0,2$ hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında, hümik asit içermeyen kontrol grubuna göre kuru madde, protein, klorofil ve yağ asitleri miktarının daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Hümik maddelerin fotosentetik sistemler üzerindeki etkilerini araştırmak için iki ökaryot yeşil alg (*Pseudokirchneriella subcapitata* Hindák ve *Monoraphidium braunii*) ve iki siyanobakteri (*Synechocystis* sp. ve *Microcystis aeruginosa*) farklı konsantrasyonlarda hümik madde içeren sentetik besi ortamlarında geliştirilmişlerdir. Yeterli ışık alan kültürlerin tamamında hümik maddeler alg gelişimini desteklemiştir. Ancak her iki ökaryot algde de artan hümik madde konsantrasyonunda hücre boyutlarını küçültmüştür. Hücre boyutlarının küçülmesi nedeniyle, hücre sayısı artmasına rağmen toplam kuru madde miktarı da azalmıştır. Aynı sonucun

siyanobakterilerde gözlenmediği görülmüştür. *Synechocystis* sp.'te bu durumun aksine (kuru madde):(hücre sayısı) oranı artış göstermiştir. Absorbe edilen ışığın hücrede kullanım etkinliği hümik madde konsantrasyonu arttıkça artış göstermiştir (Bährs ve Steinberg 2012) .

Daha önce yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda yüksek miktarda hümik asit içeren kültürlerde gelişimin yavaşladığı veya durduğu rapor edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki hümik asitin bu toksik etkisi, ortamdaki metallerin büyük çoğunluğunu bağlayarak algin metabolizmasında kullanacağı iyonları etkisiz hale getirmesinden kaynaklanmaktadır. Şelat oluşturma tepkimeleri dışında, yüksek miktarda hümik asit ve ışık, hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumu için uygun koşullar yaratır. H_2O_2 , alg metabolizmasında CO_2 kullanımını inhibe ederek gelişimin durmasına neden olur (Mostafa ve Ali 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroalgler

Bu çalışmada kullanılan *Spirulina platensis* strain Pacifica, Cyanotech (Hawaii) Şirketinin Türkiye satış sorumlusu Alg-Biotek firmasından ücretsiz olarak temin edilmiştir. Tezde kullanılan diğer bir alg olan *Chlorella vulgaris* ise Gazi Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nden sağlanmıştır.

3.1.2 Kültür ortamları

Spirulina platensis strain Pacifica için *Spirulina* (Zarrouk) besiyeri, *Chlorella vulgaris* için BG-11 besiyeri kullanılmıştır. 900 mL olarak hazırlanan besiyerleri 121°C'de 20 dk sterilize edilmiştir.

Besiyerlerinin bileşimleri Ek 1'de verilmiştir.

3.1.3 Efektif Doz Denemesi

Hümkik asitin *Spirulina platensis* ve *Chlorella vulgaris*'in gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, EDTA içermeyen *Spirulina* (Zarrouk) ve BG-11 besiyerine sırasıyla 20, 40 ile 60 mg/L hümkik asit ve 20, 40, 60 ile 80 mg/L hümkik asit çözeltisi ilave edilmiştir.

Fulvik asitin *Spirulina platensis* ve *Chlorella vulgaris*'in gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla da EDTA içermeyen *Spirulina* (Zarrouk) ve BG-11 besiyerine sırasıyla 25, 50, 150 ile 250 mg/L ve 30, 60, 120 ile 180 mg/L fulvik asit çözeltisi ilave edilmiştir.

Efektif doz denemesinde kullanılan değerler yapılan ön denemeler sonucunda belirlenmişlerdir.

3.1.4 Işık Kaynağı

Deneme süresince ışık kaynağı olarak Philips marka 36 W/530 gün ışığı lambalar kullanılmıştır.

3.1.5 Ekipman

Denemeler süresince kullanılan alet ve ekipmanlar Ek 2’de verilmiştir.

3.1.6 Hümik asit çözeltisi

Her bir besiyerine eklenecek olan hümik asit (Sigma-Aldrich, İsviçre), istenen miktarda tartılarak 3mL 0,1 M NaOH içerisinde çözüldükten sonra besiyerine ilave edilmiştir. Böylelikle, hümik asidin besi ortamı içerisinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır.

3.1.7 Fulvik asit çözeltisi

Denemeler süresince kullanılan fulvik asit, TKİ Hümas’ın (TKİ, Türkiye) işlenmesiyle elde edilmiştir. Liyofilize fulvik asit, istenen miktarda tartılıp ardından 3 mL 0,1 N HCl çözeltisinde çözülerek besi ortamına ilave edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Gelişme koşulları

Kültürler 24°C±2’de, 60 $\mu\text{mol foton/m}^2\cdot\text{s}$ ışık yoğunluğunda (3245 lüks), 18:6 (aydınlık:karanlık) ışık çevriminde, *Chlorella vulgaris* sabit, *Spirulina platensis* ise 100 devir/dakika’da çalışan çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. *Chlorella vulgaris* kültürünün çökmesini önlemek amacıyla günde bir kez elle çalkalanmıştır. Hacim küçük olduğu için ayrıca havalandırma yapılmamıştır.

3.2.2 Fulvik asit eldesi

50 g Hümas beher içerisine tartıldıktan sonra üzerine 500 mL 0,5 M NaOH eklenmiştir. 24 saat süreyle karıştırıcıda karıştırılarak, Hümas'ın alkali içerisinde tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Ardından 850xg'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda süpernatant toplanarak 6N HCl ile süpernatant pH'ı 2'ye ayarlanmıştır. Asitte çözünmeyen hümik asit ağırlıklı kısım 850xg'de 30 dakika santrifüj edilerek ayrılmış ve ham fulvik asit içeren süpernatant liyofilize edilip, sonra tuzların uzaklaştırılması amacıyla diyaliz edilip kurutulmuş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir (Ohkubo vd., 1998). Bu çalışmanın liyofilizasyon aşaması Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Aşı kültürü hazırlanması

Çalışmada kullanılacak kültürlerin aynı özellikte olması deneylerin güvenilirliği bakımından önem taşımaktadır. Bu nedenle deneylerde kullanılan aşı kültürlerin sabit koşullarda hazırlanmıştır.

Deneme kurulmasından 1 hafta önce %10 oranında alg aşılınmış besiyerleri denemenin yürütüleceği koşullarda gelişmeye bırakılmış ve süre sonunda hazırlanmış besiyerlerine başlangıç optik yoğunlukları eşit olacak şekilde aşılama yapılmıştır.

3.2.4 Hasat

Ökaryotik mikroalg olan *Chlorella vulgaris*'in hasadı 20000xg'de 20 dakika santrifüj edilip süpernatantın uzaklaştırılması ile yapılmıştır.

Spirulina platensis hasadı ise sahip olduğu hava vezikülleri (Becker,1994) nedeniyle santrifüj işleminin yetersiz kalması, pelet oluşturmaması nedeniyle 1,6 µm gözenek açıklığına sahip filtre kağıdından (FilterLab, 47 mm, İspanya) vakum pompası yardımıyla süzülerek yapılmıştır. Ardından filtrat, alınan örnek hacmi kadar (1:1) 0.1

M sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile filtre kağıdının üzerinde hiç hücre kalmayınca kadar yıkanmış ve ekstraksiyona hazır hale getirilmiştir.

3.2.5 Ekstraksiyon

Hemiselüloz ve sakkaritlerden oluşan hücre duvarına sahip ökaryotik bir mikroalg olan *Chlorella vulgaris* hücrelerini parçalamak amacıyla hasat edilmiş örnek, 4 M HCl çözeltisi ile alüminyum folyo ile kaplanmış falcon tübünde 30 dakika süresince hidrolize edilmiş, ardından asit çözeltisi santrifüj yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Zheng vd. 2011, Gu vd. 2008). Yapılan ön denemeler neticesinde HCl uygulanmış hücrelerde pigment izolasyonu yapılabildiği ancak toplam protein miktarının dondurma çözme metodu ile daha yüksek oranda elde edilebildiği görülmüş olup, bu nedenle toplam protein tayini ve toplam klorofil ile karotenoid miktarlarının belirlenmesinde farklı yöntemler tercih edilmiştir. Dondurma-çözme metoduyla parçalanmış hücreler aseton içerisinde çözüldükten sonra yapılan spektrum taramasında karotenoidlere özgü spesifik dalga boyu saptanamamıştır. Bu nedenle *Chlorella vulgaris* hücrelerinden protein elde etmek için, santrifüj yardımıyla hasat edilmiş ve 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile sulandırılmış örnekler -21°C’de dondurma, ardından, 95°C’deki su banyosunda 2 dakika süreyle çözme işlemi arka arkaya 5 kez tekrarlanarak hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır.

Prokaryot bir siyanobakteri olan *Spirulina platensis*’in peptidoglukan yapısındaki hücre duvarının parçalanması için yukarıda belirtilen, 5 tekrarlı dondurma (-21°C), çözme (95 °C’de 2 dakika) işlemi uygulanmıştır.

3.2.6 Günlük yapılan analizler

Deneme süresince gün aşırı pH, optik yoğunluk, sıcaklık ve ışık şiddeti ölçülmüş ve ölçümlerin aynı saatlerde olmasına dikkat edilmiştir.

Optik yoğunluk ölçümü her bir mikroorganizma için deneme başında spektrum taraması yapılarak elde edilmiş dalga boylarında yapılmıştır. Deneme süresince

Chlorella vulgaris gelişimi 693 nm ve 739 nm'de, *Spirulina platensis* gelişimi ise 680,5 ve 443,5 nm'de takip edilmiştir.

3.2.7 Haftalık analizler

Hücre bileşimindeki değişiminin takibi için her iki mikroalgde kuru madde, protein, klorofil-*a* ve karoten analizleri yapılmış, bunun yanında *Spirulina platensis*'te fikosiyenin miktarı da belirlenmiştir.

3.2.7.1 Kurumadde analizi

Örneklerin kuru biyokütle ağırlığını belirlemek amacıyla, 25 mL örnek alındıktan sonra, önceden kurutulup darası alınan filtre kağıdından (FilterLab, 47 mm, İspanya) süzölmüş ve 80°C'de 24 saat kurutulduktan sonra, kurutulmuş biyokütleden filtre kağıdının darası çıkarılarak kuru madde miktarı belirlenmiştir (Madhyastha ve Vatsala 2007).

3.2.7.2 Protein analizleri

Falcon tüpleri içinde hücre duvarı parçalanmış örnekler parçalama işlemi bittikten sonra 1 gece +4 derecede bekletilmiş ve hücre bileşenlerinin tampona geçmesi sağlanmıştır. Bu difüzyon işlemi sona erdikten sonra örnekler vorteks yardımıyla beşer dakika karıştırılmış ve dibe çökmüş hücre lizatlarının tampon içerisinde homojen olarak dağılması sağlandıktan sonra protein analizleri için örnek alınmıştır.

3.2.7.2.1 Biüret yöntemiyle protein tayini

1-20 mg/ml hassasiyetle çalışan bu yöntemin prensibi, alkali koşullar altında iki değerlikli bakır iyonlarının amonyum, aminoasitler, peptidler ve proteinler gibi amonyumlu bileşiklerle mavi-mor renkli bileşik oluşturması esasına dayanır (Anonim 2011).

Çözeltiler:

%10'luk Na-deoksikolat

%0,9'luk Serum Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Biüret Çözeltisi

Biüret Çözeltisi Hazırlanışı

1. 0,15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0,6 g Na-K tartarat } 50mL saf suda çözülür
2. 30 mL %10'luk NaOH çözeltisi hazırlanır.
3. 100 mL'lik balon jofede 1 ve 2 no'lu çözeltiler birleştirilip saf su ile hacme tamamlanır.

Oluşan rengin sabitlenmesi için, tercihen karanlıkta, 30 dakika beklenir. 540 nm'ye ayarlı spektrofotometrede 1 no'lu kör tüpe karşı absorbans değeri okunur (Anonim, 2011).

$$y = 0,0913x + 0,0033 \quad (R^2 = 0,9967)$$

Formülü ile örneğin protein miktarı (mg/ml) hesaplanmıştır.

Burada kullanılan serum fizyolojik tuzlu suda tuzun iyonlarına ayrışmasıyla ortaya çıkan Na^+ ve Cl^- iyonları, protein molekülünün dış yüzeyinde bulunan ve dış etkilere açık hidrofilik kısımların stabilizasyonunda görev alırlar (Anonim 2011) .

3.2.7.2.2 Lowry yöntemi ile protein tayini

Alkali koşullarda iki değerlikli bakır iyonu, proteinlerdeki peptid bağları ile bileşik oluşturur ve tek değerlikli bakır iyonuna indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan tirozin, triftofan ve sistein aminoasitleri Folin reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Yöntemin ilkesi proteinlerin alkali ortamda bir fenol ayırıcı ve bakır ile interaksyonu sonucu oluşan mavi rengin 700-750 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanır (Cemeroğlu 2007).

Çözeltiler:

Çözelti 1: CuSO₄.5H₂O çözeltisi, %1

Çözelti 2: Na-K-tartarat çözeltisi, %1

Çözelti 3: Na₂CO₃ çözeltisi, %2 (0.1 M NaOH çözeltisinde çözündürülerek hazırlanır.)

Çözelti 4: Folin-Ciocaltau, 1N.

Çözelti 1 ve 2'den 1'er mL alınarak 100 mL'lik balon jöjeye aktarılır ve Çözelti 3 ile hacme tamamlanır (**Çözelti A**)

Folin ayırıcı genellikle 2N olarak hazır bulunduğundan, 1:1 oranında seyreltilerek **Çözelti B** hazırlanır.

Konsantrasyonu bilinmeyen protein çözeltisinden 0,2 mL alınır üzerine 2,1 mL Çözelti A ilave edilir. 10 dakika kendi haline bırakılan karışım üzerine 0,2 mL Çözelti B ilave edilir ve hızla karıştırılır. Bu aşamadan sonra örnekler oluşan rengin sabitlenmesi amacıyla karanlıkta 1 saat bekletilir. Süre sonunda şahit örneğe karşı 750 nm'deki absorbansı okunur. BSA ile hazırlanmış standart eğriden elde edilen formülde yerine koyularak protein miktarı µg/mL olarak hesaplanır. Bu çalışmada toplam protein konsantrasyonunun hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$y=0,0021x-0,015 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

Protein konsantrasyonunun hesaplanmasının sonrasında birim gramdan elde edilen protein miktarını belirlemek amacıyla,

$$\text{Verim (mg/g)} = \frac{x * V}{K.M * 1000}$$

eşitliği kullanılmıştır. Burada x, ilk eşitlikten hesaplanan protein konsantrasyonu, V tampon hacmi (mL), K.M kuru madde ağırlığı (g) ve 1000 “x” protein konsantrasyonunu mg/mL’ye çevirmek için kullanılmıştır.

Lowry protein tayin metodunun çalışma hassasiyeti, biüret protein tayin metoduna göre 50-100 kat daha fazladır. Lowry protein tayininde, reaksiyonun iki basamaktan oluşması (1.aşama, bakırın amid bağları tarafından indirgenmesi, 2. Aşama Folin ayırıcının tirozin ve triptofan amino asitleri ile tepkimeye girerek indirgenmesi) analizin hassasiyetini artırmıştır.

3.2.7.3 Klorofil-a ve toplam karotenoid miktarının belirlenmesi

Besi ortamlarında aktif biyokütleinin ölçülmesi için haftalık klorofil-a miktarları takip edilmiştir.

Chlorella vulgaris hücresinin sahip olduğu pigment miktarının belirlenmesi amacıyla, 25 mL örnek hasat edildikten sonra ışık geçirmez kaplarda 115 devir/dakika’daki çalkalayıcıya konularak HCl ile parçalanmış, santrifüj işlemi ile asit uzaklaştırılmış ve pelet örnek ile aynı hacimde %90’lık aseton içerisinde çözülmüştür. Işık geçirmez kaplarda 30-45 dakika süreyle 115 devir/dakika’da çalışan çalkalayıcıda pigmentlerin asetona geçmeleri sağlanmış ve süre sonunda örnekler tekrar 20000xg’de 20 dakika süreyle +4°C’de santrifüj edilerek renksiz hale gelen hücreler ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Spektrofotometrede her ölçüm öncesinde, kontrol grubu örnekler spektrum taraması yapılarak pigmentlerin en yüksek absorbans oluşturduğu dalga boyları belirlenmiş, böylelikle formülde verilen dalga boyları doğrulanmıştır. Klorofil ve karotenlere özgü dalga boylarında elde edilen absorbans değerlerinden 750 nm’de elde edilen absorbans değeri çıkarılarak bulanıklık düzeltilmesi yapılmıştır.

Chlorella vulgaris’in sahip olduğu klorofil-a ve toplam karoten miktarını belirlemek amacıyla aşağıdaki formül kullanılmıştır (Mitchell ve Kiefer, 1984, Gu vd. 2008):

$$\text{Klorofil-}a \text{ (}\mu\text{g/mL)} = (11,93 * A_{664}) - (1,93 * A_{647})$$

Bu formülde belirtilen A664, klorofil-*a*, A647 ise klorofil-*b*'ye ait spesifik dalga boyu olup, her iki dalga boyunda okunan absorbans değerlerinden 750 nm'deki absorbans değeri çıkarılmıştır.

$$\text{Toplam karoten (mg/g)} = (A * D * V) / (0,16 * W)$$

Formülde verilen A karotene ait 475 nm'deki absorbans değeri, D dilüsyon oranı, V kullanılan asetonun hacmi (L), W ise gram cinsinden kurumada ağırlığıdır.

Spirulina platensis hücrelerinin sahip olduğu klorofil-*a* ve toplam karoten miktarının belirlenmesi amacıyla dondurma çözündürme metodu ile parçalanmış, santrifüj yardımıyla fikosiyenin içeren süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet, alınan örnek hacmi ile aynı miktarda %90'lık metanol ile çözülmüştür. 70°C'ye ayarlanmış su banyosunda 7-10 dakika bekletildikten sonra örnekler hızla soğutulmuş, ve 20000xg'de santrifüj edilerek hücreler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Elde edilen berrak süpernatantın spektrofotometrede 665 nm ve 480 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür.

Siyanobakterilerin sahip olduğu temel pigmentler fikosiyenin, klorofil ve karotenlerdir. *Spirulina platensis*'in klorofil pigmentleri içerisinde yalnızca klorofil-*a* içerir (Lorenz, 1998). Klorofil-*a* miktarının doğru bir şekilde hesaplanabilmesi için fikosiyenin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir (Becker 1994). Santrifüj sonrasında, yeterli parçalanmamış hücrelerde kalan fikosiyenin pelet oluşturularak ortamda ayrılmaktadır.

Spirulina platensis'in sahip olduğu klorofil-*a* ve karoten miktarları aşağıdaki eşitlikler ile hesaplanmıştır (Macias-Sanchez vd., 2005).

$$\text{Klorofil-}a \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 13,9 * A_{665}$$

$$\text{Karoten (}\mu\text{g/mL)} = (4,5 * A_{480})$$

3.2.7.4 Fikosiyanin miktarının belirlenmesi

Spirulina platensis yaş biyokütlesinin (25 mL) hasat edilmesinin ardından, ardı ardına 5 kez -21°C’de dondurma ve 95°C’deki su banyosunda çözdürme işleminden sonra fikosiyaninin 0,1 M sodyum fosfat (pH 7) tamponunda çözünmesi amacıyla +4°C’ de 18-20 saat süreyle bekletilen örnekler santrifüj edilmiş ve berrak, mavi süpernatantın fikosiyanin içeriği spektrofotometrede ölçülmüştür. Bu amaçla yapılan spektrum taramasında fikosiyanine ait en yüksek absorbandsın saptandığı dalga boyu 620 nm olarak belirlenmiştir.

Fikosiyanin konsantrasyonu (C-PC) (mg/mL) 652 ve 620 nm’deki optik yoğunluk değerlerini kullanarak aşağıdaki eşitlikle hesaplanır (Moraes vd. 2011)

$$C-PC \text{ (mg/mL)} = (A_{620} - 0,47A_{652})/5,34$$

Bu denklemde A_{620} fikosiyanine özgü dalga boyundaki absorbands değerini, A_{652} ise fikoeritrine ait spesifik dalga boyunda oluşturduğu absorbands değerini ifade etmektedir. Saflık faktörü, fikosiyaninin 620 ve 280 nm’deki absorbands değerlerinin birbirine oranı (A_{620}/A_{280}) ile belirlenmiştir (Abalde vd. 1998). Faktörün hesaplanmasında, 620 nm fikosiyanin konsantrasyonunu gösterirken, 280nm çözeltideki toplam protein konsantrasyonunu ifade etmektedir.

Birim gram *Spirulina platensis* kuru maddesinin sahip olduğu fikosiyanin miktarının mg/g cinsinden belirlemek için,

$$\text{Verim (mg/g)} = (C-PC * V) / KM$$

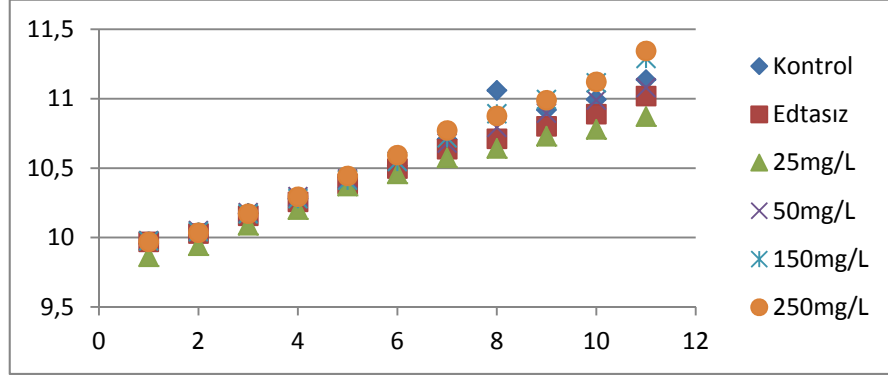
eşitliği kullanılmıştır (Moraes vd. 2011). Bu eşitlikte C-PC fikosiyanin konsantrasyonunun mg/mL olarak değerini, V kullanılan tampon hacmini (mL) ve KM gram olarak kuru madde ağırlığını belirtmektedir.

3.2.8 İstatistiksel değerlendirme

Çalışma süresince elde edilen veriler Mini-Tab (Versiyon 15.1, ABD) paket programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir.

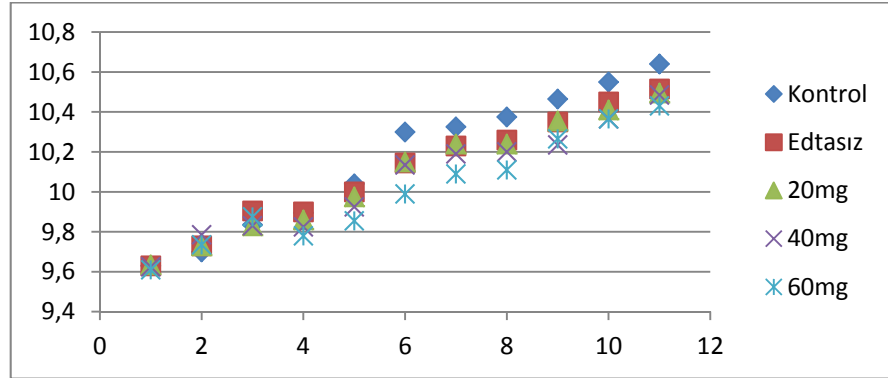
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Deneme Süresince pH'da Meydana Gelen Değişimin İncelenmesi



Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamının pH değişimi (*Spirulina platensis*)

Fulvik asit kullanılan deneme süresince en yüksek pH değerine 21.günde 250 mg/L fulvik asit konsantrasyonunda ulaşılmıştır (pH 11.34).

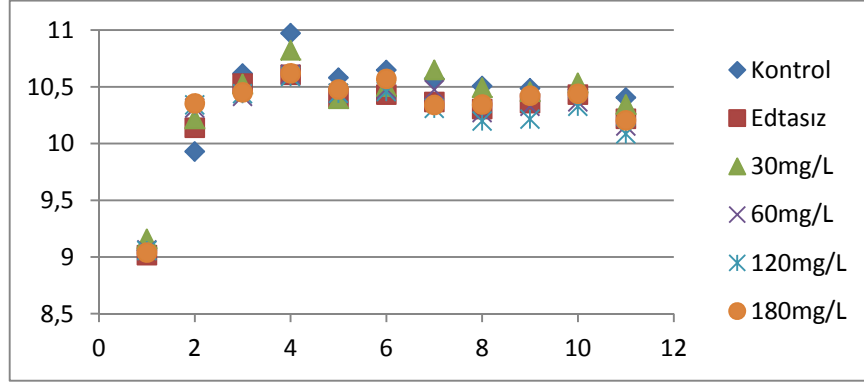


Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren Zarrouk besi ortamının pH değişimi (*Spirulina platensis*)

Hümik asit içeren denemede ise pH değerleri fulvik asitte olduğu gibi aşırı yükselmemiştir. En yüksek pH değeri 10.64 olarak belirlenmiştir.

Sabit koşullarda yetiştirilen *Chlorella vulgaris* ve 100 devir/dakika hızda çalışan çalkalamalı inkübatörde *Spirulina platensis*'in pH değerleri karşılaştırıldığında,

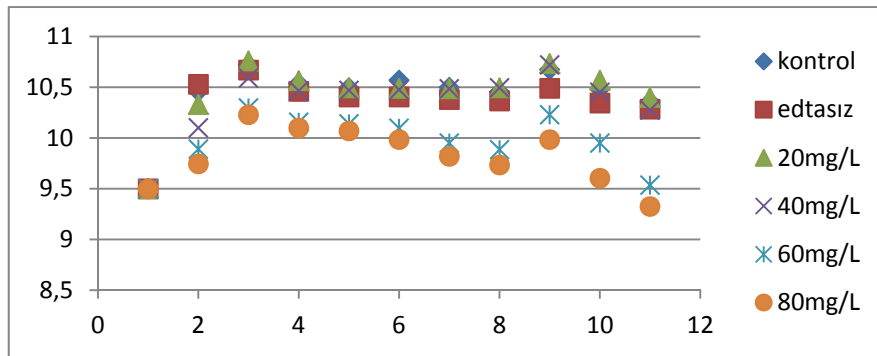
çalkalama ile hava girişi sağlanan *Spirulina platensis* kültüründe pH değerlerinin daha kararlı ve artışlarının doğrusal olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren BG-11 besi ortamının pH değişimi (*Chlorella vulgaris*)

Ancak sabit kültürde gelişen *Chlorella vulgaris*'in hem hümik hem de fulvik asit denemesinde pH değerlerinin değişken ve değerlerde, günler arasında dalgalanmalar olduğu görülmektedir.

Spirulina platensis ve *Chlorella vulgaris* kültürlerinin ikisinde de yüksek pH değerlerinde, kültürün sahip olduğu canlı hücre sayısının da yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren BG-11 besi ortamının pH değişimi (*Chlorella vulgaris*)

Spirulina platensis alkali koşullarda daha iyi gelişim gösteren bir mikroalg olduğu için gelişmesi için en uygun pH aralığı 9-10 arasındadır (Belkin ve Boussiba 1991, Rodrigues vd. 2010). Zheng ve arkadaşları (2012), *Spirulina platensis* için, pH 7-11 aralığında 5 farklı pH değerinde besi ortamının, *Spirulina platensis* gelişimine etkisini araştırmışlar ve en yüksek gelişmenin 3,1g/L ile pH 9 olan kontrol grubu örnekte olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yeh vd. (2010), *Chlorella vulgaris*'in farklı ışık ve karbon kaynaklarında gelişimini incelemişlerdir. Burada NaHCO₃'ün, Na₂CO₃'e göre biyokütle verimini daha fazla arttırdığı ve pH 5 ile 10 arasında biyokütle artışları arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir.

Gelişim sürecinde pH yükselmesinin nedenlerinden biri, azot kaynağı olarak kullanılan NO₃⁻'in amonyağa dönüştürölme sürecidir. *Spirulina platensis* hücrelerinin NO₃⁻'ı kullanabilmeleri için öncelikle amonyağa indirgemeleri gerekmektedir. Çünkü amonyak alg hücresi tarafından, enerji harcanmadan (difüzyon) hücre içine alınarak metabolizma faaliyetlerinde doğrudan kullanabilmektedir (Rodrigues vd. 2010, Zheng vd. 2012).

pH yükselmesinin bir diğer nedeni de HCO₃⁻ iyonunun hücre içerisine taşınmasıyla CO₂ ve CO₃⁻ iyonuna dönüşmesidir. Bu dönüşüm sonucu oluşan ürünler fotosentezde karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. CO₂ beslemesi yapılan kültürlerde pH değerleri, CO₂ beslemesi yapılmayan kontrol grubuna göre daha düşük seviyede olup pH profili daha stabildir. Ayrıca CO₂'in besi ortamında karbonik asit olarak çözünmesi mikroalg gelişimi ile pH yükselişini kontrol etmektedir (Zheng vd. 2012).

Alava vd. (1997), toplam karbon konsantrasyonu 0,1 ve 0,2 M olan NaOH ile pH'sı yükseltilmiş iki farklı Zarrouk besi ortamında, CO₂ tutulma miktarını araştırmışlardır. Düşük pH'da CO₂'in besi yerinde tutulması azalırken, yüksek pH'da atmosfer CO₂'inin besi ortamı içerisinde daha iyi çözündüğünü göstermişlerdir.

Gelişme ortamlarından BG-11'in başlangıç pH değerleri 8 civarındadır. Hümik asit denemesinde bu pH değeri, sterilizasyon sonunda çöken hümik asitin yeniden çözünmesi için yeterli değildir. Ancak alg faaliyeti sonucunda (solunum+fotosentez) yükselen pH değeri ve algin hümik asiti kullanmaya başlaması ilerleyen günlerde çöken hümik asit yeniden çözünür duruma geçmesi sağlanmıştır. Sterilizasyon sonrası çöken hümik asit, 0. gün analizlerinde karotenoid miktarının doğru bir şekilde saptanmasını önlemiştir.

Başlangıç pH değeri 9 olan Zarrouk besiyerinde ise hümik asit çökmemiş, ayrıca kültürün çalkalamalı inkübatörde gelişmesi nedeniyle de herhangi bir sorun teşkil etmemiştir.

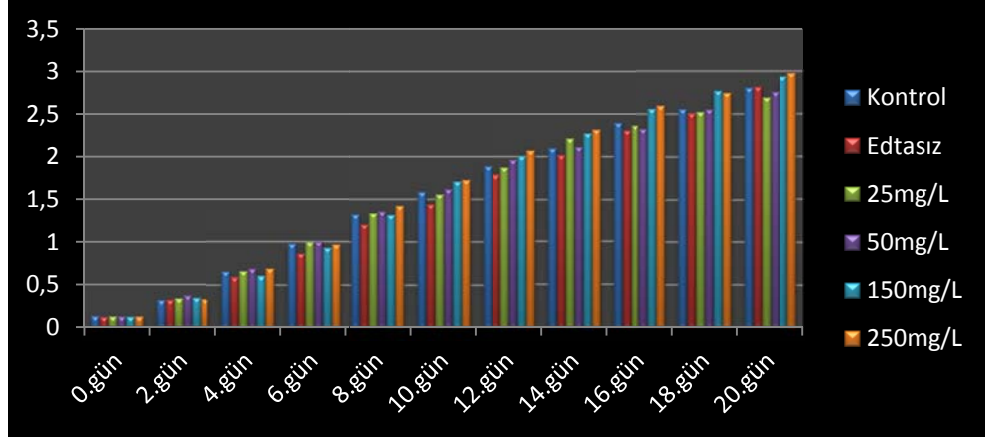
4.2 Optik Yoğunluk Ölçümleri

Deneme başlangıcında örnek gelişimlerinin takip edilebilmesi için, *Chlorella vulgaris* ve *Spirulina platensis* örneklerinin kontrol gruplarında spektrum taraması yapılmış ve *Chlorella vulgaris* için 693 ile 739 nm, *Spirulina platensis* için 680,5 ve 443.5 nm dalga boyunda en yüksek absorbans değerleri elde edilmiştir. Bundan sonraki her denemede bu dalga boyları kullanılmıştır. Optik yoğunluk okumaları, denemede kullanılan her örneğe ait, aşılama yapılmadan ayrılmış boş besiyerleri kontrol olarak kullanılmıştır.

Farklı derişimlerde fulvik ve hümik asit içeren Zarrouk ve BG-11 besi ortamında *Spirulina platensis* ve *Chlorella vulgaris*'in kültürdeki yoğunlukları zamana bağlı olarak artış göstermiştir.

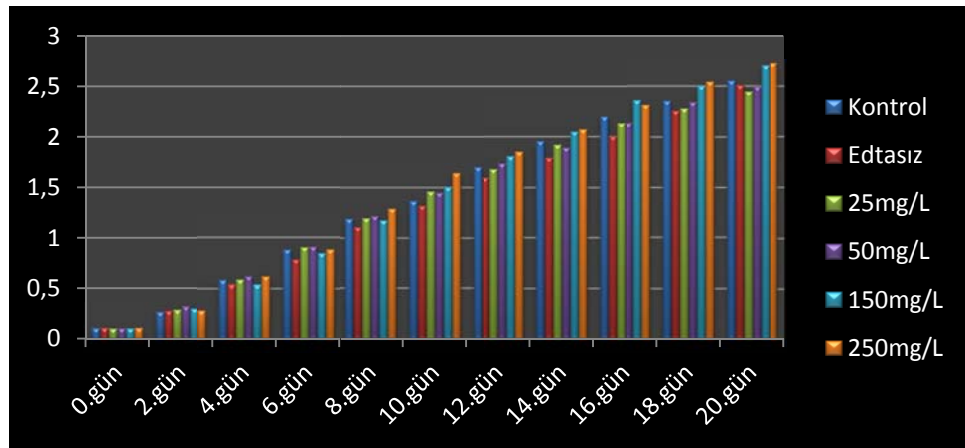
Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis* hücre yoğunluğu, ölçümlerin devam ettiği süre içerisinde artmaya devam etmiştir. Hücre bölünmesinin yavaşladığı, iki ölçüm arasındaki farkın azaldığı saptandığından, ölçümler 21.günde, durağan faza ulaşılması nedeniyle inkübasyona ve haftalık analizlere son verilmiştir. Ancak BG-11 besiyerinde *Chlorella vulgaris* hücre yoğunluğu ortam pH'sına bağlı olarak dalgalanmalar göstermiştir. Besi ortamı içindeki koşulların değişmeye başlaması, besin yetersizliği,

pH dalgalanmaları ve eklenen maddenin (hümik veya fulvik asit) organizma için uygun veya yeterli miktarda olmaması nedeniyle, hücreler ortamdan çökerek ayrılmışlardır. İşte bu nedenle ortam hücre yoğunluğundaki düşüşlerin artması nedeniyle ölçümlere 21.günde son verilmiştir.



Şekil 4.5 Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis* hücrelerinin gelişimi (680,5 nm)

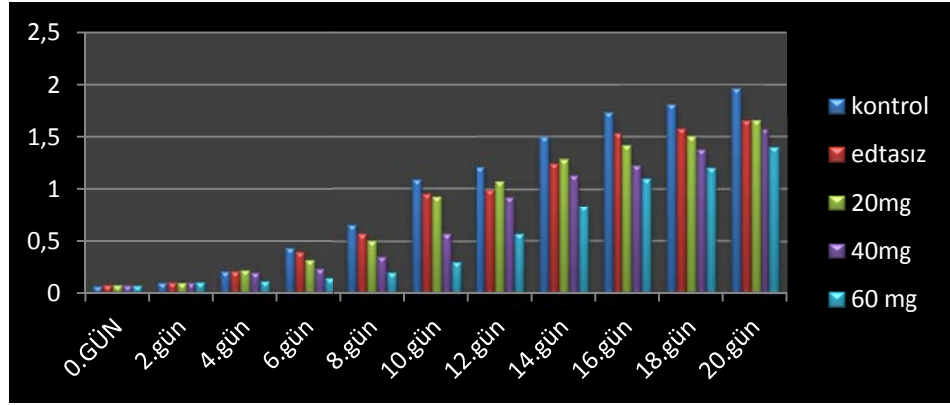
Farklı miktarda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis* gelişimi, kontrol gruplarına göre artış göstermiştir.



Şekil 4.6 Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis* hücrelerinin gelişimi (443,5 nm)

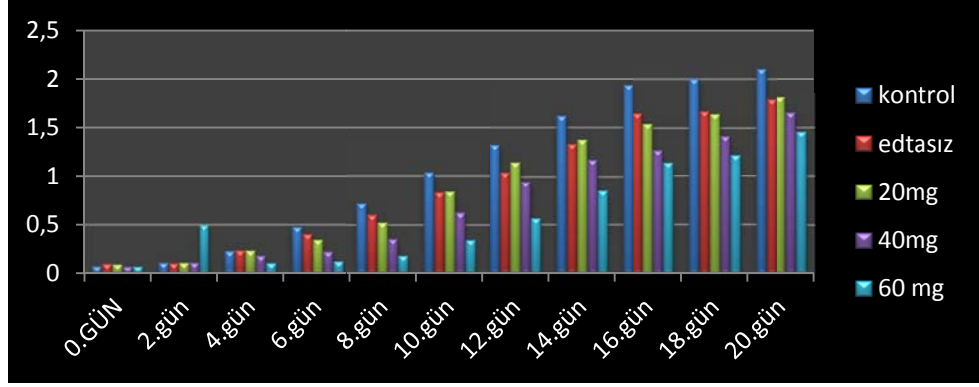
Yalnızca 25 mg/L fulvik asit içeren besi ortamında kontrol gruplarına göre gelişme zayıf olmuş bununla birlikte 50 mg/L fulvik asit içeren besi ortamındaki gelişim ise

kontrol grubuna eş seviyede gerçekleşmiştir. 150 mg/L ve 250 mg/L konsantrasyonlarında da elde edilen değerler ile kontrol grubundan elde edilen değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir ($p>0,05$). Ancak 150 mg/L fulvik asit konsantrasyonunun, kontrol grubuna göre hücre gelişimini 443 nm dalga boyundaki ölçümler %5, 680.5 nm dalga boyundaki ölçümler ise %6 arttırdığını göstermektedir. 250 mg/L fulvik asit konsantrasyonlarındaki besi ortamı ise kontrol grubuna göre hücre gelişimini 443,5 nm dalga boyuna göre %6, 680.5 nm dalga boyunda elde edilen sonuçlara göre %7 artmıştır. En yüksek absorbans değeri 21.günde 250 mg/L fulvik asit içeren örnekte 443.5 nm dalga boyunda 2,98 ve 680.5 nm dalga boyunda 2,73 olarak belirlenmiştir.



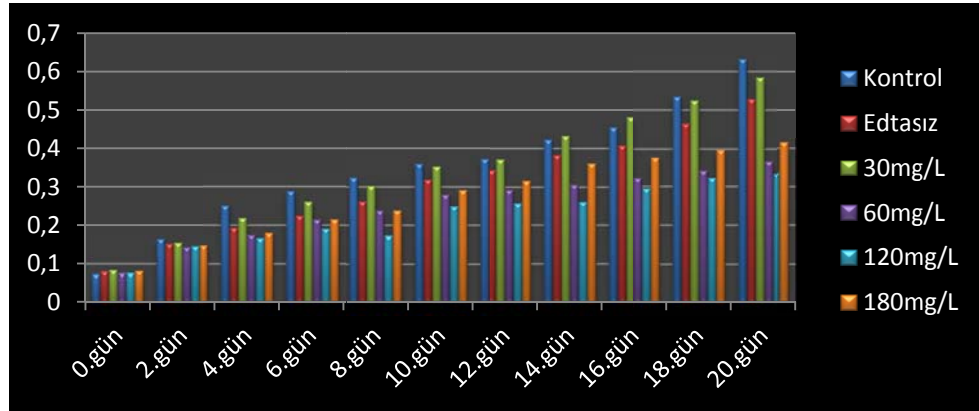
Şekil 4.7 Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis* hücrelerinin gelişimi (680,5 nm)

Ancak fulvik asitin gelişmeyi teşvik edici etkisi hümik asitte görülmemektedir. Artan konsantrasyonlarda ilave edilen hümik asit çözeltileri, ters orantılı olarak *Spirulina platensis* hücre gelişimini azaltmıştır. Bu nedenle gelişim, EDTA içeren kontrol grubunda hümik asit içeren gruplara göre daha yüksek olmuştur. 443.5 ve 680.5 nm dalga boylarında elde edilen absorbans değerleri kontrol grubuna en yakın gelişimin görüldüğü 20 mg/L hümik asit içeren besi ortamında sırasıyla %14 ve %16 oranında azaldığı görülmüştür. En yüksek absorbans değeri 21.günde kontrol grubu örnekte 443.5 nm ve 680.5 nm dalga boylarında sırasıyla 2,1 ve 1,96 olarak ölçülmüştür.

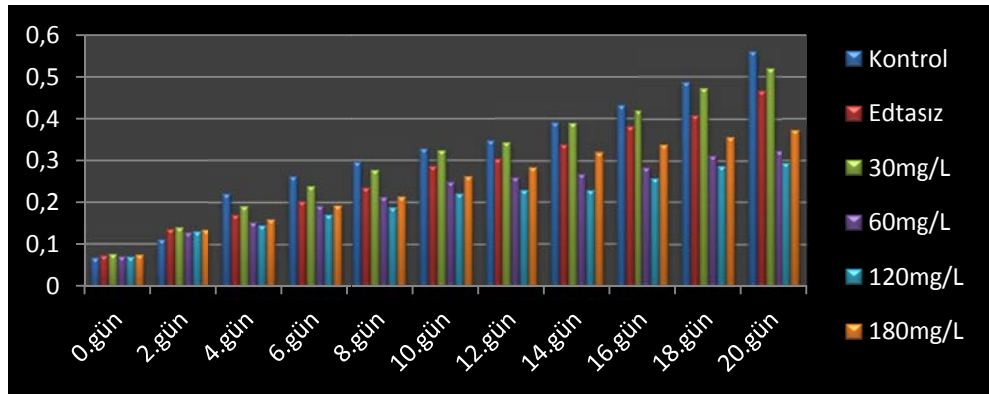


Şekil 4.8 Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis* hücrelerinin gelişimi (443,5 nm)

BG-11 besi ortamında ise *Spirulina platensis*'in aksine *Chlorella vulgaris*'te hücre gelişimi hümik asit eklendiğinde artmış, ancak fulvik asit eklendiğinde azalmıştır.

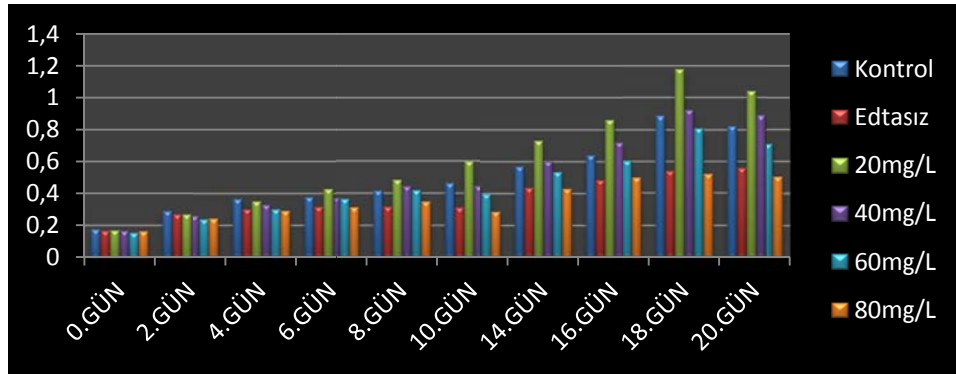


Şekil 4.9 Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris* hücrelerinin gelişimi (693 nm)

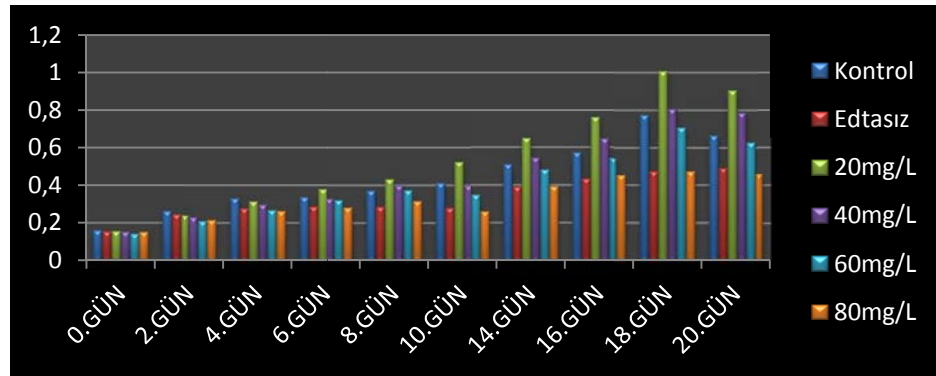


Şekil 4.10 Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris* hücrelerinin gelişimi (739 nm)

Fulvik asit içeren ortamda *Chlorella vulgaris* hücreleri genel olarak zayıf gelişim göstermiştir. EDTA içeren kontrol grubunda gelişmenin, fulvik asit içeren ortamlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 30 mg/L fulvik asit içeren örnekteki gelişmenin kontrol grubu ile benzer özellik gösterdiği ve aralarındaki farkın tesadüften ileri geldiği tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonda fulvik asit, kontrol grubunun içerdiği EDTA yerine ikame ürün olarak kullanılabilir. Aradaki fark istatistik olarak önemsiz olmasına rağmen ($p>0,05$) 739 nm dalga boyunda elde edilen sonuçlara göre sentetik metal bağlayıcı EDTA içeren kültür, kendine yakın gelişmenin olduğu 30 mg/L fulvik asit içeren kültüre göre %3, 693 nm dalga boyunda elde edilen sonuçlara göre %8 oranında hücre gelişimini teşvik ederek daha yüksek verim elde edilmesini sağlamıştır. En yüksek absorbans değeri ise 693 nm ve 739 nm dalga boyunda sırasıyla 0,56 ve 0,632 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.11 Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris* hücrelerinin gelişimi (693 nm)



Şekil 4.12 Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris* hücrelerinin gelişimi (739 nm)

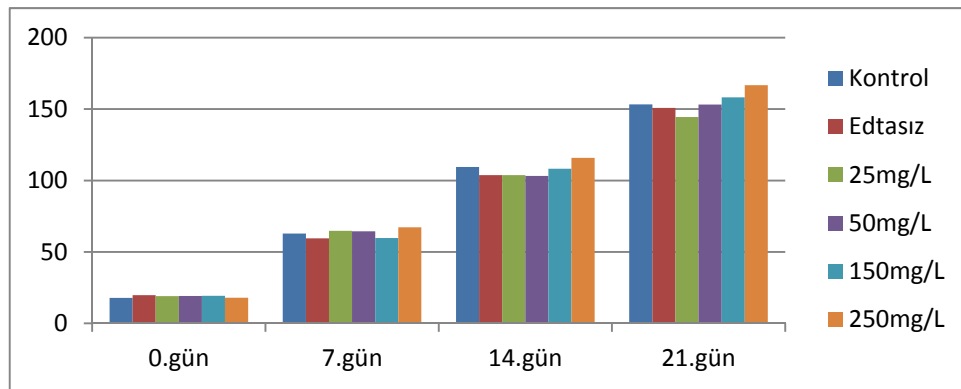
20 mg/L ve artan konsantrasyonlarda hümik asit içeren BG-11 besi ortamında en yüksek gelişme değerlerine 20 ve 40 mg/L hümik asit konsantrasyonlarında ulaşılmıştır. Bu derişimlerde, diğer derişimlerin aksine hücre çökmesi olmamıştır. BG-11 besi ortamına 20 mg/L hümik asit eklenmesi, alg gelişimini arttırmış ve kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistik olarak önemli olduğu ($p<0,05$) görülmüştür. Buna göre hümik asit 739 nm ve 693 nm dalga boylarında elde edilen sonuçlara göre sırasıyla %36 ve %26 oranında kontrol grubuna göre hücre gelişimini arttırmıştır. En yüksek absorbans değeri ise 693 nm ve 739 nm dalga boyunda sırasıyla 1,04 ve 0,91 olarak ölçülmüştür.

Optik yoğunluk sonuçlarından ortamın hücre yoğunluğunun ölçülmesi diğer analiz sonuçlarının da tahmin edilmesini olanaklı kılmıştır. Bu nedenle protein, klorofil-*a* ve karotenoid ile *Spirulina platensis*'te fikosiyanın miktarlarının gruplara göre değişiminin sağlanması niteliğindedir.

4.3 Hücre Bileşiminin Zamana Göre Değişimi

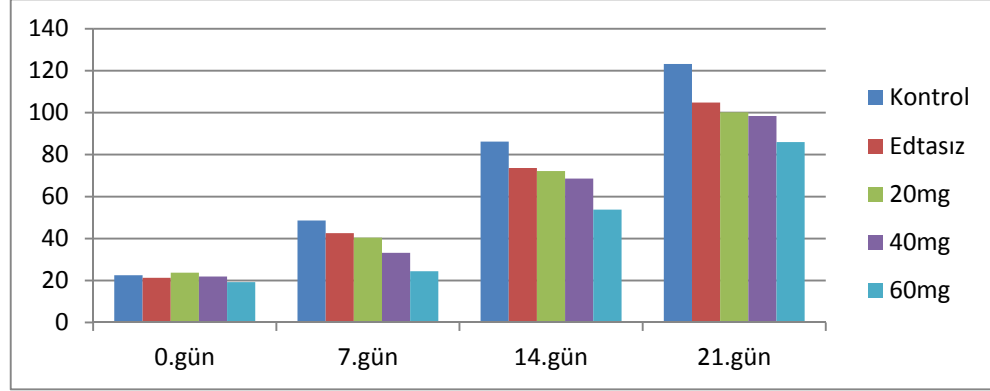
4.3.1 Kuru madde miktarı

Hücrelerin protein ve pigment konsantrasyonlarının, birim gramdaki miktarlarını ve haftalık biyokütle artışını takip amacıyla 25 mL örnek alınarak kuru madde ağırlığı belirlenmiştir. Grafiklerde verilen değerler mg/100mL cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 4.13 Fulvik asit içeren besi ortamında gelişen *Spirulina platensis*'in kurumadde miktarı (mg/100mL)

Homojen gelişme koşullarına sahip ortamda, en yüksek kuru madde $166,77 \pm 9,86$ mg/100mL ile 250mg/L fulvik asit içeren örnekten elde edilmiştir.

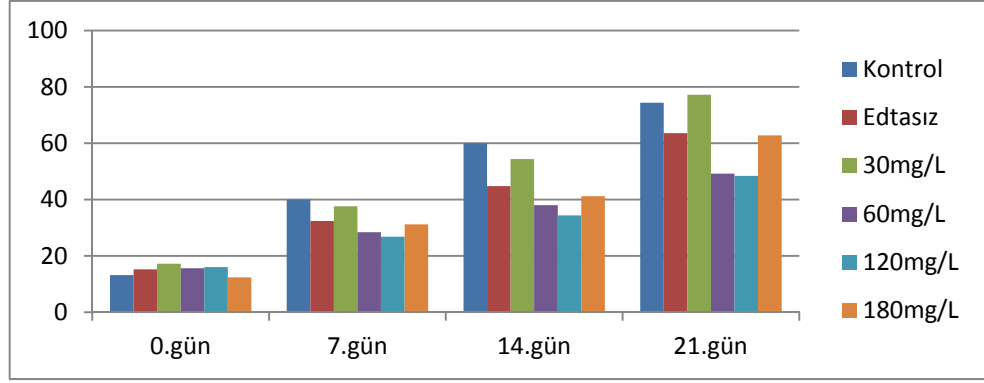


Şekil 4.14 Hümik asit içeren besi ortamında *Spirulina platensis*'in kurumadde miktarı (mg/100mL)

Fulvik asidin tersine hümik asit eklenmiş besi ortamlarında *Spirulina platensis* gelişiminin zayıf olduğu görülmektedir. Aynı koşullarda gelişen kültürlerde en yüksek kuru madde miktarına kontrol grubunda ulaşılmıştır ($123,2 \pm 2,83$ mg/100mL), *Spirulina platensis*'in herhangi bir şelat yapan maddenin bulunmadığı ortamda dahi, hümik asitli örneklerden daha iyi geliştiği görülmektedir.

Lange (1974) yaptığı çalışmasında, *Anabaena cylindrica*, *Anacystis nidulans*, *Lyngbya* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Nostoc muscorum* ve *Phormidium foveolarum*'un kendi şelat maddelerini oluşturduğu ve tıpkı sentetik şelat maddelerini içeren kontrol grubunda olduğu gibi iyi gelişme gösterdiği ancak *Anabaena circinalis*, *Gloeotrichia echinulata*, *Oscillatoria rubescens* ve *Aphanizomenon flos-aquae*'nin aynı özellikte olmadığı ve yapay şelat içeren kontrol grubuna göre gelişmenin bu ortamda oldukça zayıf olduğunu belirtmiştir.

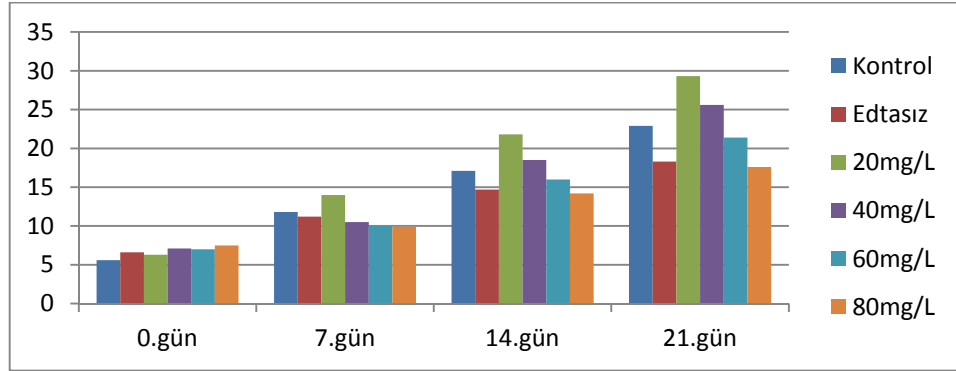
Spirulina platensis'in hümik asit denemesinde kontrol grubu dışındaki gruplar arası farklılık önemsiz olup, kontrol grubu kuru madde miktarları ile karşılaştırıldığında, ortamda şelat yapan maddenin bulunmaması veya hümik asidin EDTA'nın yerine kullanılması hücre kuru maddesinin önemli miktarda azalmasına neden olmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.15 Fulvik asit içeren besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in kurumadde miktarı (mg/100mL)

En yüksek kuru madde miktarına 19,3 mg/100 mL ile 21.günde 30 mg/L fulvik asit konsantrasyonunda ulaşılmıştır.

Optik yoğunluk sonuçlarının aksine, 21.günde 30 mg/L fulvik asit içeren örnek grubunun kuru madde miktarı ($19,3 \pm 8,06$ mg/100 mL), kontrol grubuna ($18,6 \pm 4,53$ mg/mL) göre daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar fulvik asit ile EDTA'nın etkilerinin kuru madde bakımından farksız olduğu, birbirleri yerine ikame madde olarak kullanılabilirliklerini göstermektedir ($p>0,05$).

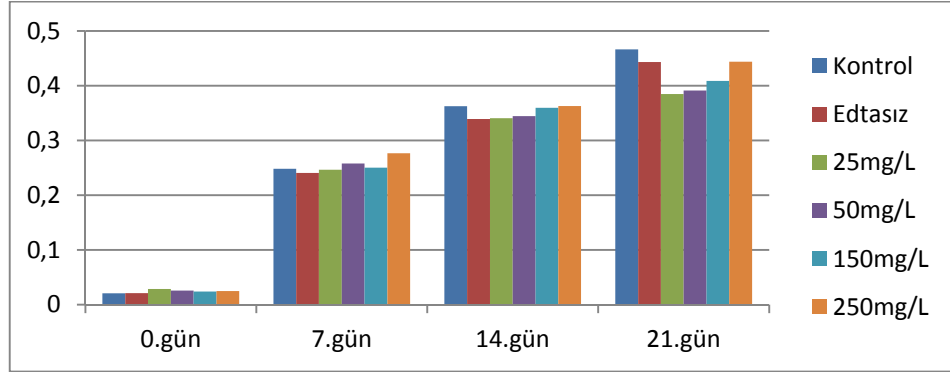


Şekil 4.16 Hümik asit içeren besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in kuru madde miktarı (mg/100mL)

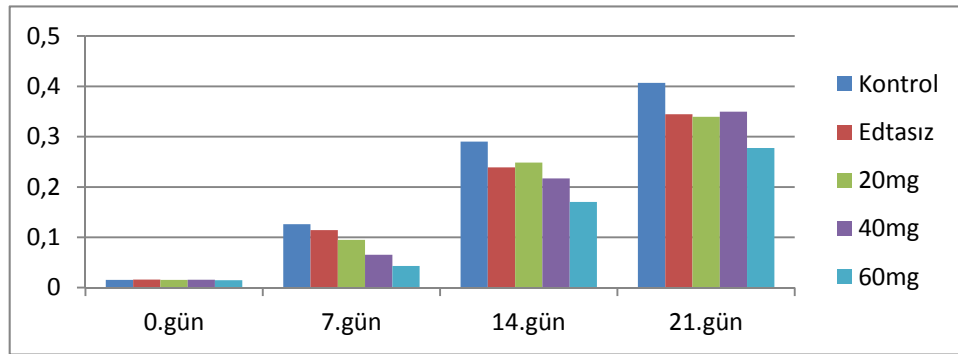
BG-11 besi ortamına hümik asit ilavesinin ise 20 mg/L hümik asit konsantrasyonunda *Chlorella vulgaris* biyokütlesini, kontrol grubuna göre önemli derecede arttırdığı, ancak 80 mg/L konsantrasyonunda hümik asit içeren besi ortamının ise algin gelişimini, dolayısıyla kurumadde miktarını önemli miktarda azalttığı görülmektedir ($p<0,05$).

4.3.2 Protein miktarı

4.3.2.1 Lowry metodu ile toplam protein miktarı

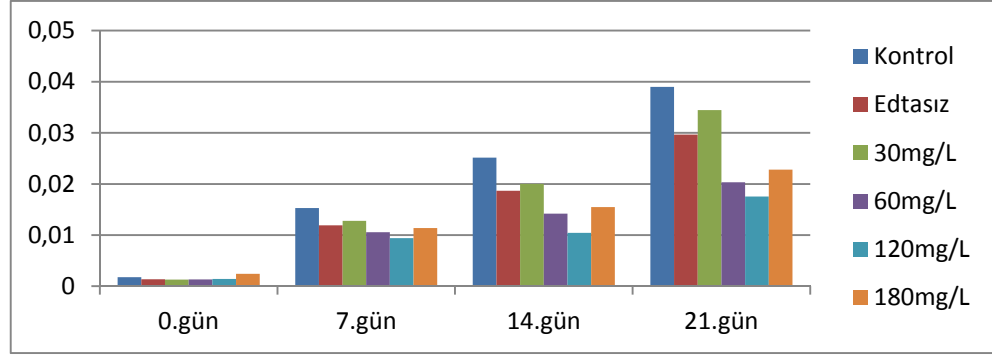


Şekil 4.17 Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)

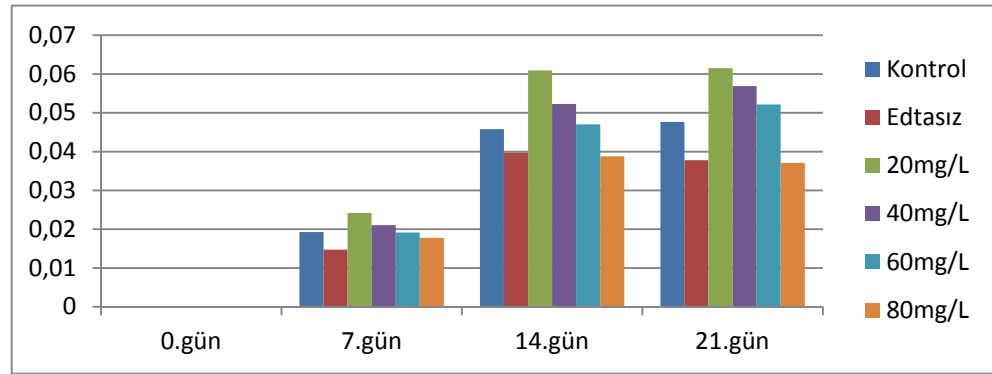


Şekil 4.18 Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)

Kullanılan madde ve alg türüne göre en yüksek protein konsantrasyonuna ulaşılan günler değişiklik göstermektedir. Fulvik asitin eklendiği Zarrouk ile BG-11 ve hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında en yüksek konsantrasyona 21.günde ulaşılrken (sırasıyla $0,45 \pm 0,013$ mg/mL, $0,039 \pm 0,011$ mg/mL ve $0,41 \pm 0,001$ mg/mL) hümik asit içeren BG-11 besi ortamı en yüksek protein konsantrasyonuna ($0,075 \pm 0,009$ mg/mL) 14.günde ulaşmıştır.



Şekil 4.19 Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)

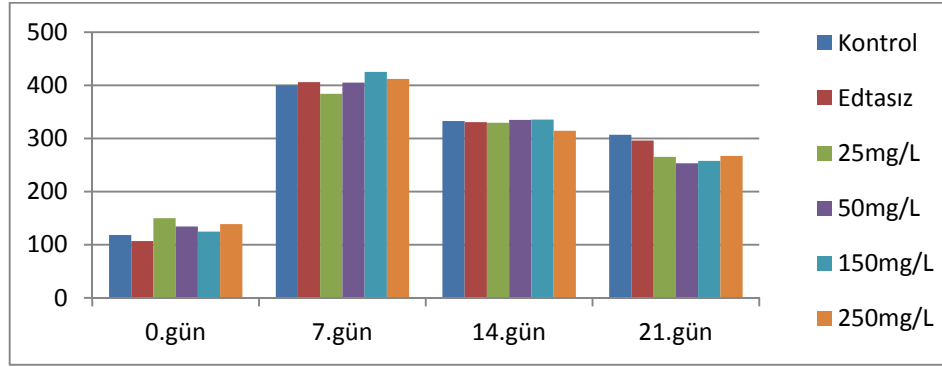


Şekil 4.20 Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)

Sonuçlara göre besi ortamında artan hümik asit derişimi hem *Spirulina platensis* hem de *Chlorella vulgaris* protein konsantrasyonunu azalttığı belirlenmiştir.

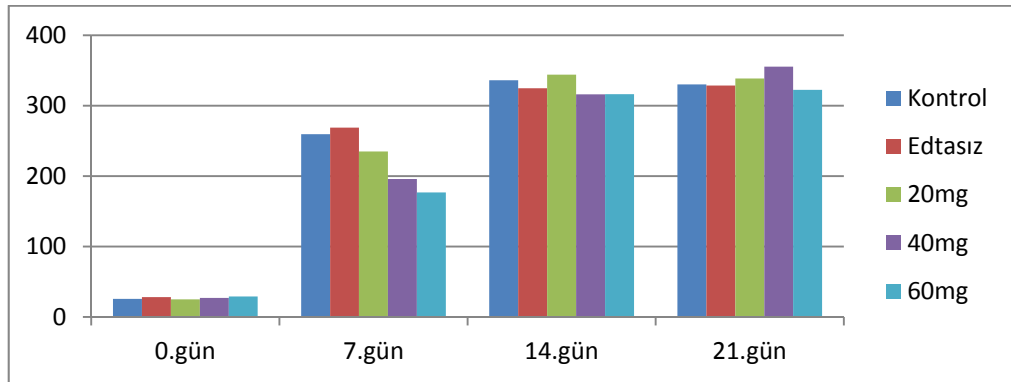
Protein konsantrasyonu, belirli bir hacimdeki protein miktarını ifade ederken; protein verimi, örnekteki toplam protein miktarını gram cinsinden göstermektedir. Yukarıda grafikleri verilen 4 ayrı denemede, her deneme kendi içerisinde değerlendirilmek kaydıyla, protein verimi fulvik asit içeren BG-11 besi ortamı hariç, tamamı kontrol grubunun protein veriminden farklı değildir. *Spirulina platensis* hücrelerinde, hümik ve fulvik asit hücrenin normal olarak üretebildiğinden daha fazla protein üretmesini sağlamamış ve hücrenin protein miktarı kontrol grubuyla aynı kalmıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.21-4.22). Benzer sonuç hümik asit içeren BG-11 besi ortamında da görülmektedir. Hücre miktarının ve kurumaddenin artması doğrusal olarak gerçekleşmiştir. Protein konsantrasyonu hücre sayısının artmasına bağlı olarak artmıştır, ancak birim gramdan

elde edilen protein miktarını değiştirmemiştir ($p>0,05$) (şekil 4.23). Aynı durum fulvik asit içeren BG-11 besi ortamı için geçerli değildir. Burada fulvik asit hücre geleişimini sınırlayarak, birim gramdan elde edilen protein miktarını da azaltmıştır ($p<0,05$) (şekil 4.24).



şekil 4.21 Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in protein verimi (mg/g)

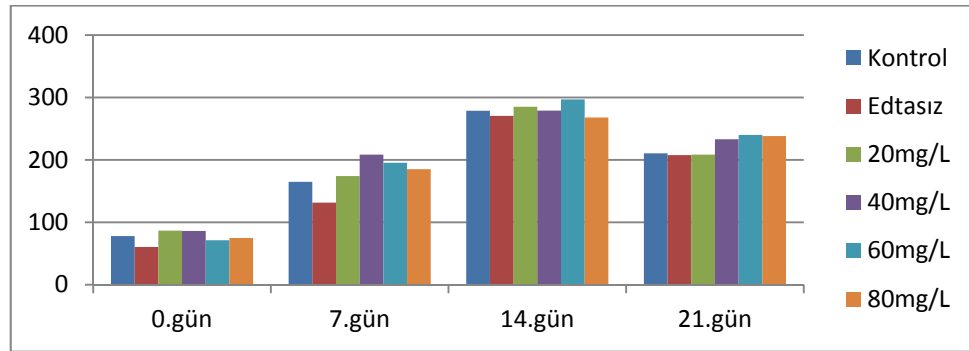
Fulvik asit denemesinde aynı günlerdeki gruplar arasında fark olmamasına karşın, günler arasında verim farkı göze çarpmaktadır. Özellikle gelişmenin ilk haftasında hücre içinde protein sentezinin, diğer hücre bileşenlerinin sentezinden hızlı olması, düşük biyokütle ağırlığında yüksek protein içermesi bu sonucu doğurmuştur



şekil 4.22 Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in protein verimi (mg/g)

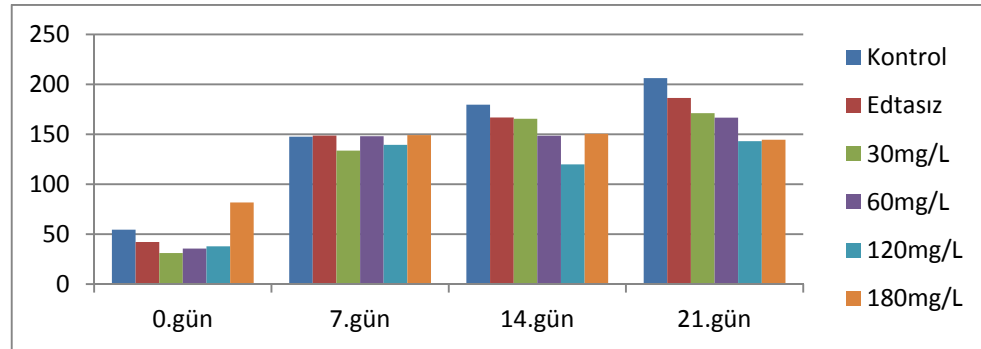
şekil 4.22 de gösterildiği üzere, bu grupta zamanla doğru orantılı olacak şekilde protein verimi artmaya devam etmiştir. Gelişimin nc ve dördüncü haftaları arasında toplam proteinde önemli bir değişme olmamıştır. Hücre çoğalması sabit faza ulaşmış

olup, bu iki hafta arasındaki protein miktarları birbirleriyle benzerdirler. En yüksek protein değerine ($355,4 \pm 9,12$ mg/g) 40 mg/L hümik asit konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Bu sonuç fulvik asit içeren örnek grubu ile karşılaştırıldığında, fulvik asitte ilk haftada 406,122 mg/g'a ulaşan protein verimi (150 mg/L), hümik asitte 268,82 mg/g'da (EDTAsız) kalmıştır. Bu sonuç alglerin birbirinden farklı ortamda gelişmelerinden kaynaklanabileceği gibi, fulvik asidin *Spirulina platensis* hücrelerinin ikilenme sürelerini kısaltması ve protein metabolizmasını hızlandırılmasıyla da açıklanabilir.



Şekil 4.23 Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein verimi (mg/g)

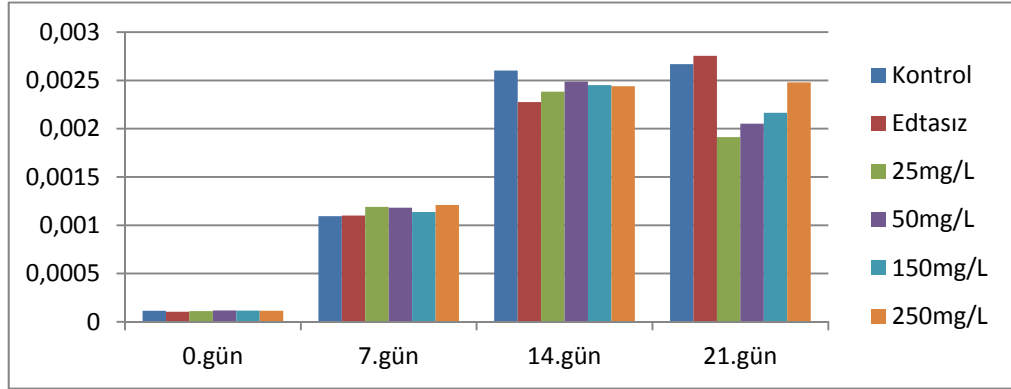
Hümik asit içeren ortamda *Chlorella vulgaris* gelişimiyle birlikte hücrenin sahip olduğu protein miktarı da artmıştır. Ancak 14.günde elde edilen bu yüksek sonuçlar gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermemektedir. Bu günde en yüksek protein miktarına 60 mg/L hümik asit içeren örnekte ulaşılmıştır.



Şekil 4.24 Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein verimi (mg/g)

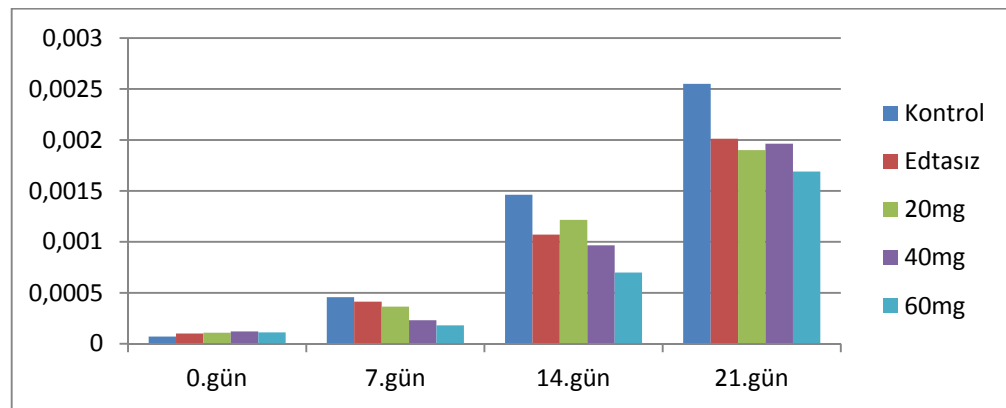
Fulvik asit içeren besi ortamında gelişen *Chlorella vulgaris*'in protein miktarı, hümik asit içeren örnek grubuna göre yarı yarıya düştüğü görülmektedir. Hümik asitin aksine, burada en yüksek protein verimine 21.günde kontrol grubunda ulaşılmıştır.

4.3.2.2 Büret metodu ile toplam protein miktarı



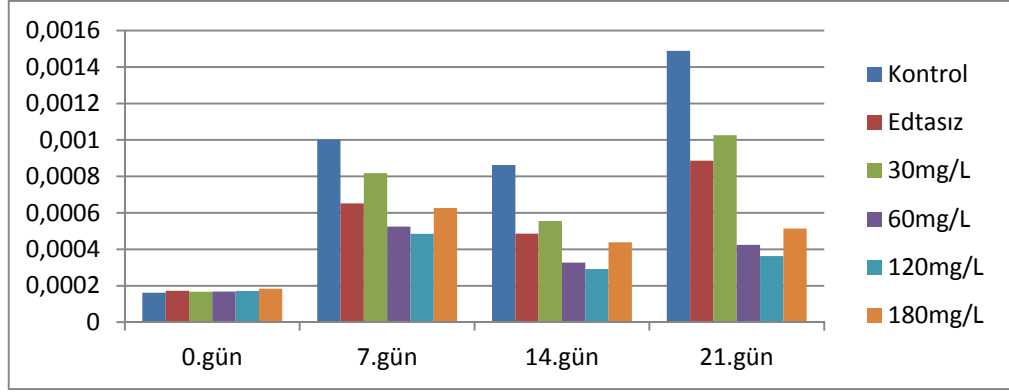
Şekil 4.25 Fulvik asit içeren Zarrowk besi ortamında *Spirulina platensis*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)

Büret yöntemiyle protein tayininde, fulvik asit kullanılan Zarrowk besi ortamında en yüksek protein konsantrasyonunda EDTA içermeyen grupta ulaşılmıştır.

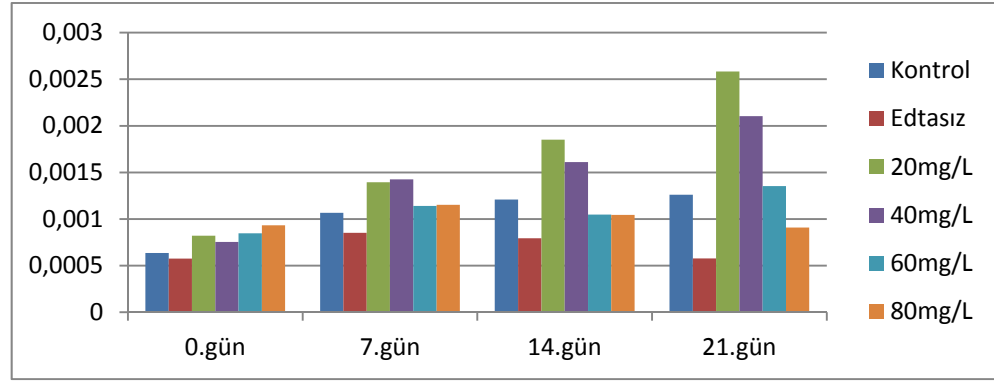


Şekil 4.26 Hümik asit içeren Zarrowk besi ortamında *Spirulina platensis*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)

Hümik asit denemesinde ise Lowry metoduyla paralel, kontrol grubuna ait örnek grubunun protein konsantrasyonu en yüksek değerdedir.



Şekil 4.27 Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)



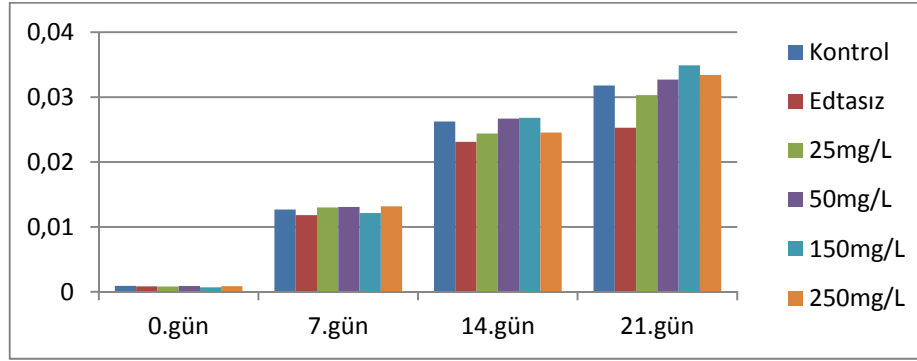
Şekil 4.28 Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)

Bilindiği gibi biüret metodu ile protein tayini, Lowry protein tayinine göre 10-100 kat düşük hassasiyete sahiptir. Elde edilen protein çözeltilerinde bulunan protein miktarı, biüret protein tayininin, gerçek protein değerlerini tespit edebileceğinden düşük konsantrasyondadır. Toplam protein tayininin Lowry metoduyla yapılması, biüret yöntemine göre hassasiyetin, fulvik asit içeren *Spirulina platensis* kültürü için 166 kat, hümik asit içeren *Spirulina platensis* kültürü için 160 kat, fulvik asit içeren *Chlorella vulgaris* kültürü için 26 kat, hümik asit içeren *Chlorella vulgaris* kültürü için 38 kat artmasını sağlamıştır.

Her ne kadar konsantrasyonlar arasındaki fark çok yüksek olsa da, Lowry protein tayininde farklı derişimlerde belirlenen en yüksek konsantrasyonlar değişmemiştir. Böylelikle kalitatif olarak sonuçların doğrulaması yapılmıştır.

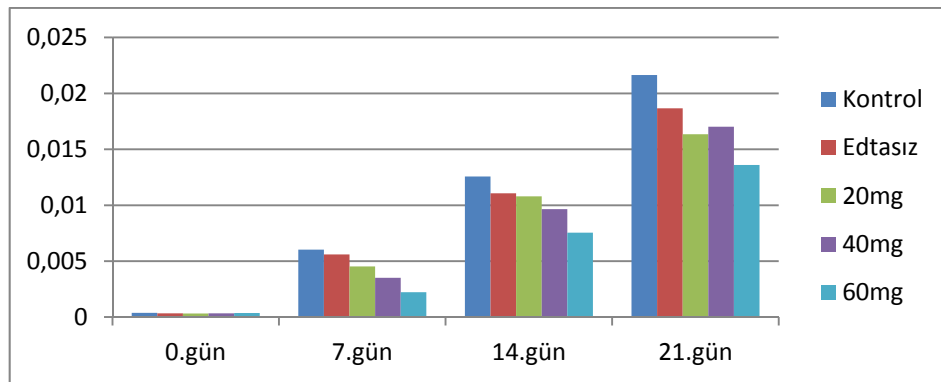
Büret protein tayininde ölçülen protein konsantrasyonlarının değerinin çok düşük olması verim (mg/g) hesaplamalarını olanaksız hale getirmiştir.

4.3.3 Klorofil-*a* miktarı



Şekil 4.29 Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in klorofil-*a* konsantrasyonu (mg/mL)

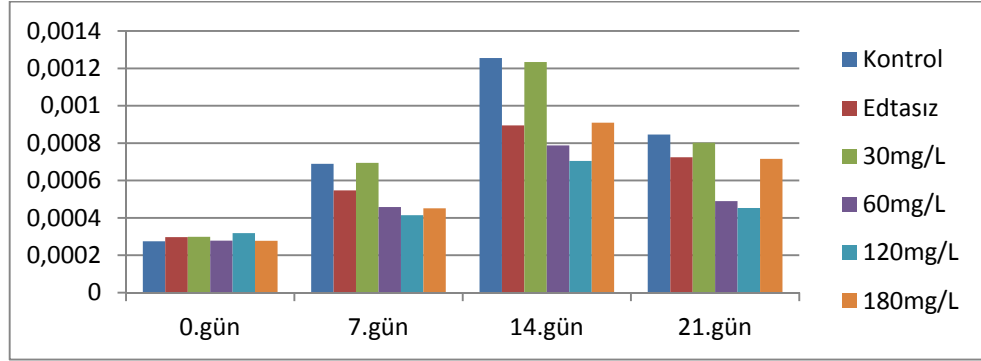
25 mg/L ve artan konsantrasyonda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamı, *Spirulina platensis*'in klorofil-*a* miktarında kontrol grubuna göre istatistik olarak önemli bir değişikliğe yol açmamıştır ($p>0,05$). Gruplar arasındaki fark tesadüfen ileri gelmiştir ve EDTA/hümkik asit/fulvik asit gibi şelatlayıcı madde içermeyen besi ortamında klorofil-*a* miktarının diğer gruplara göre düşük olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir



Şekil 4.30 Hümkik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in klorofil-*a* konsantrasyonu (mg/mL)

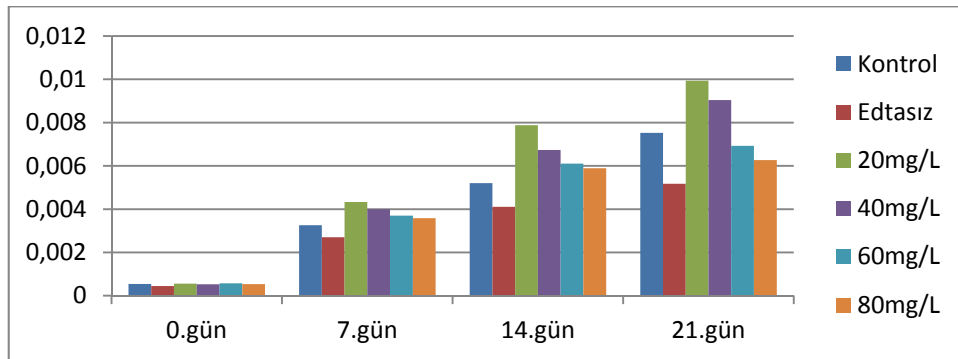
20 mg/L ve artan konsantrasyonda hümkik asit içeren besi ortamında *Spirulina platensis* klorofil-*a* miktarı ise, hümkik asit konsantrasyonu arttıkça azalmıştır. Daha önce elde

edilen kuru madde ve protein konsantrasyonları da dikkate alındığında hümik asidin *Spirulina platensis* gelişimini zayıflattığı ve kontrol grubuna göre düşük yoğunlukta hücre bileşenine sahip olduğu görülmektedir ($p<0,05$).



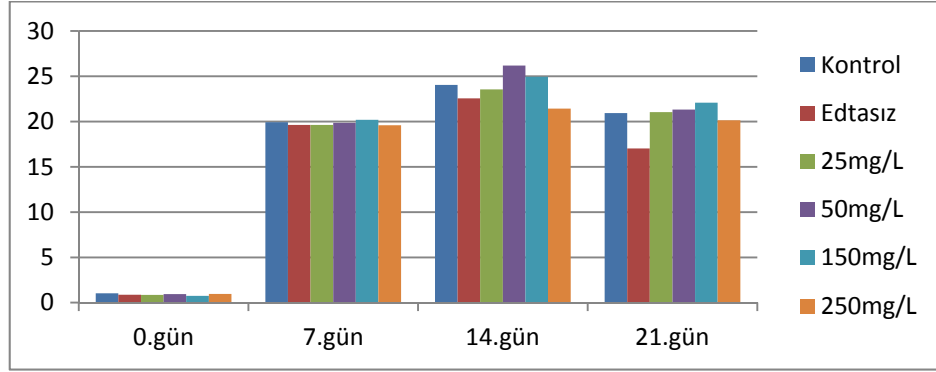
Şekil 4.31 Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in klorofil-*a* konsantrasyonu (mg/mL)

Fulvik asit içeren besi ortamında ise en yüksek konsantrasyona 14. günde ($0,0013 \pm 0,0003$ mg/mL) ulaşılmış ardından klorofil-*a* miktarı azalışa geçmiştir. Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris* klorofil-*a* konsantrasyonu 30 mg/L fulvik asit içeren besi ortamında kontrol grubu klorofil konsantrasyonu ile aynı kalmıştır ($p>0,05$). Ancak ortamda şelat yapan maddelerin olmayışı ve fulvik asit düzeyinin 30 mg/L'den yüksek olması kültür gelişimini zayıflatmıştır. mL'den elde edilen klorofil-*a* miktarı bu gruplarda, kontrol grubuna göre önemli miktarda azalmıştır ($p<0,05$).

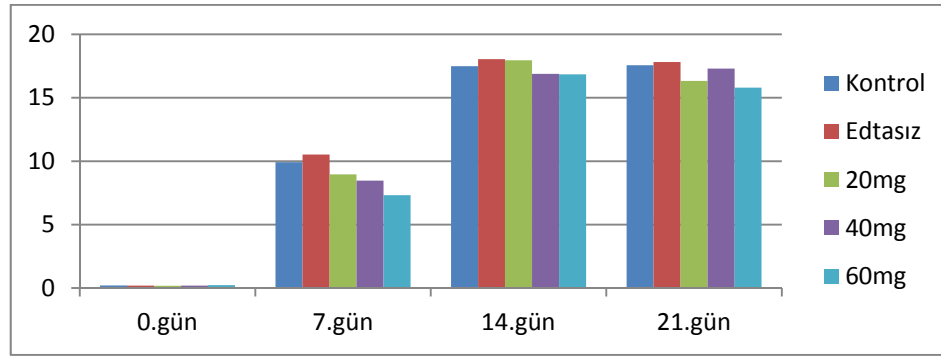


Şekil 4.32 Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in klorofil-*a* konsantrasyonu (mg/mL)

Fulvik asit içeren besi ortamında gelişen *Chlorella vulgaris* kültürü hariç, diğer kültürlerin tamamında klorofil-*a* konsantrasyonu zamana bağlı olarak artış göstermektedir.

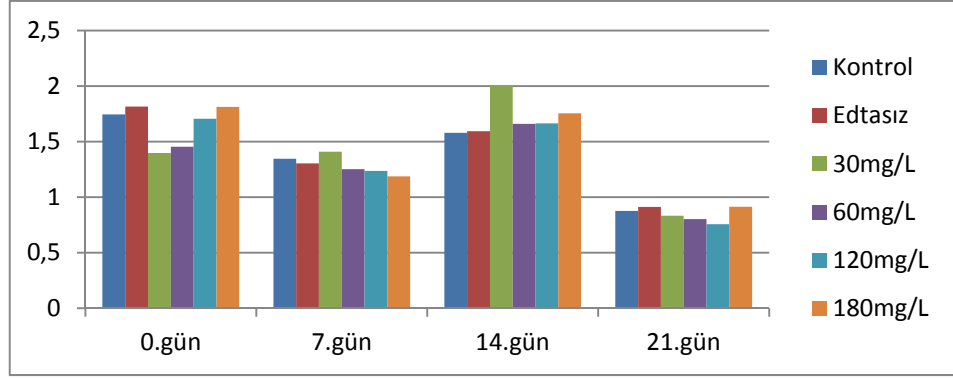


Şekil 4.33 Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in klorofil-*a* verimi (mg/g)



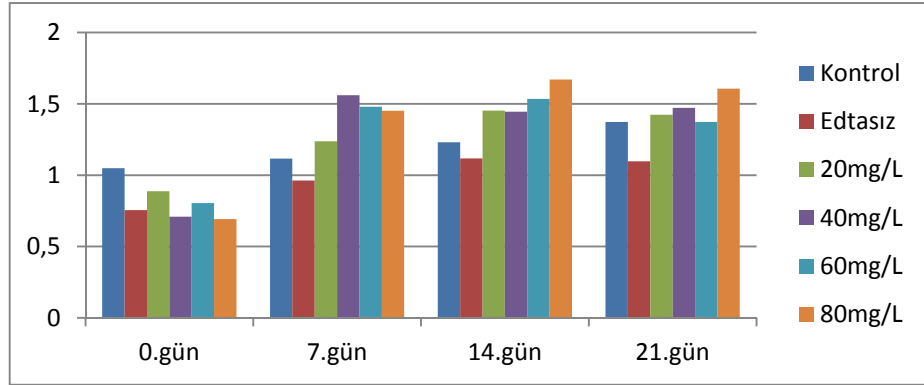
Şekil 4.34 Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in klorofil-*a* verimi (mg/g)

Hümik ve fulvik asit *Chlorella vulgaris* ve *Spirulina platensis*'in klorofil-*a* verimlerinde önemli değişikliklere neden olmamıştır. Hümik asit içeren besi ortamında *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* ile fulvik asit içeren besi ortamında *Spirulina platensis* klorofil-*a* konsantrasyonu, kontrol grubu ile önemli bir fark oluşturmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.35 Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in klorofil-*a* verimi (mg/g)

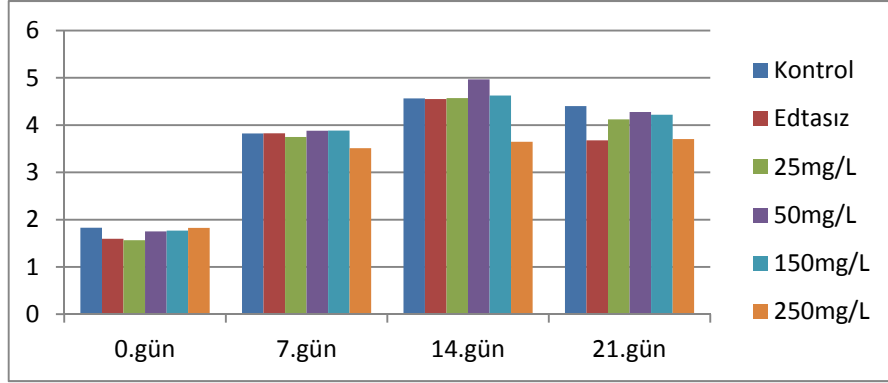
30 mg/L konsantrasyonunda fulvik asit içeren kültür ortamında 14. günde en yüksek değerine ulaşan ($2,0061 \pm 0,036$ mg/g) *Chlorella vulgaris* ise, klorofil verimi bakımından kontrol grubu ve diğer gruplara göre istatistik olarak önemli fark oluşturmuştur ($p < 0,05$).



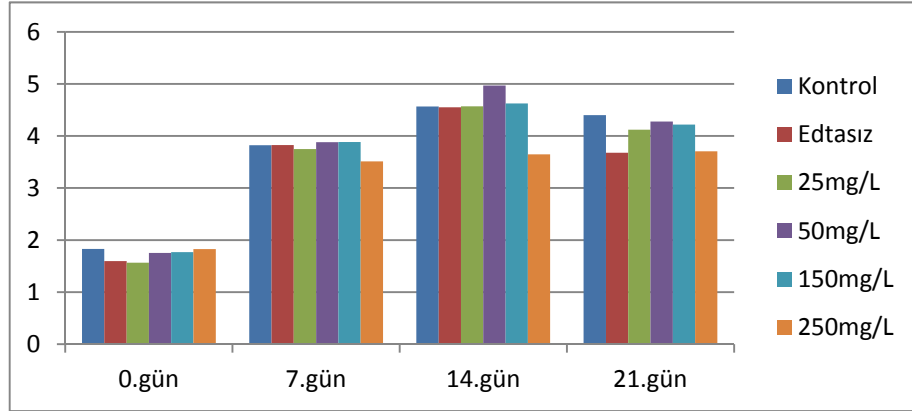
Şekil 4.36 Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in klorofil-*a* verimi (mg/g)

Dört deneme grubu içerisinde klorofil-*a* verimleri, fulvik asit içeren besi ortamında gelişen *Chlorella vulgaris* hariç, kendi grupları arasında önemli bir fark oluşturmamışlardır. Yani hücrelerin klorofil-*a* verimleri birbirine benzerdir.

4.3.4 Karotenoid miktarı

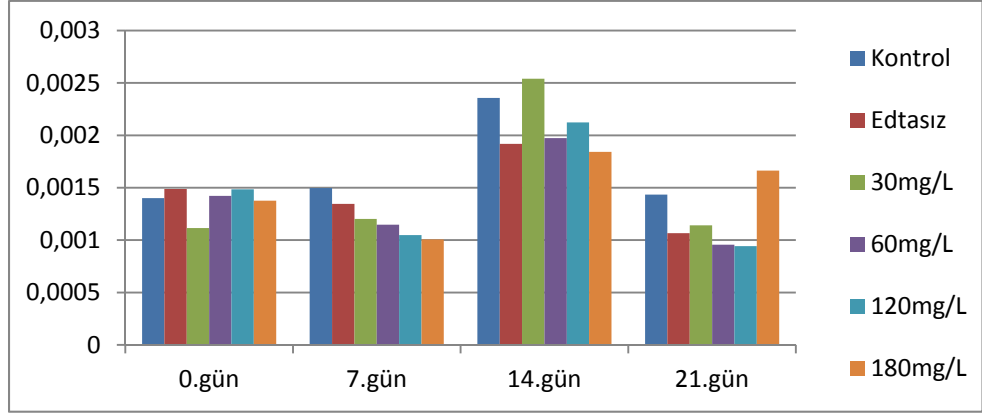


Şekil 4.37 Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in karotenoid verimi (mg/g)



Şekil 4.38 Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in karotenoid verimi (mg/g)

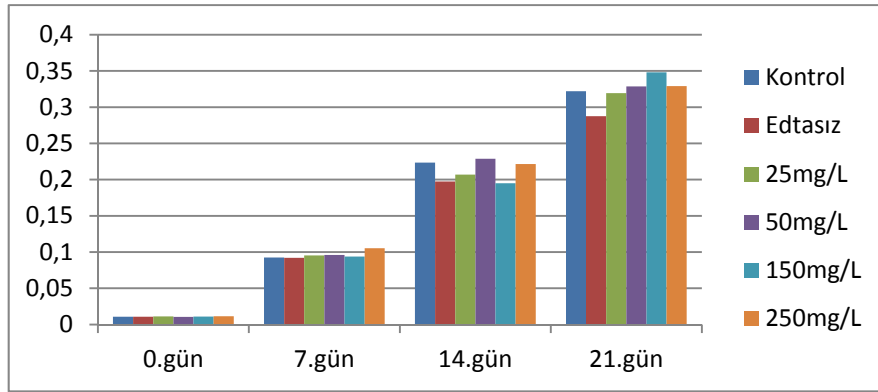
Spirulina platensis'in hem fulvik asit içeren, hem de hümik asit içeren besi ortamlarındaki karotenoid verimleri zamana bağlı olarak artış gösterirken, karotenoid madde verimleri kendi grupları arasında farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Aynı durum fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında da gözlenmiş olup, kontrol grubuna göre istatistik olarak önemli bir fark oluşturmamışlardır ($p>0,05$)



Şekil 4.39 Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in karotenoid verimi (mg/g)

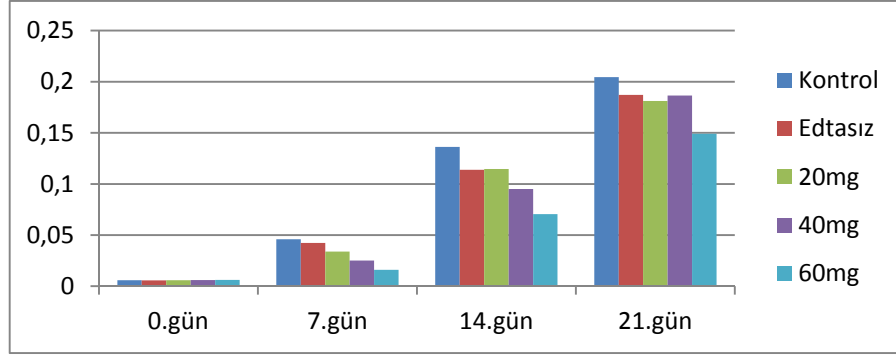
Hümkik asit içeren besi ortamında gelişen *Chlorella vulgaris* kültüründe hümkik asit santrifüj sırasında çökmüştür. Bu nedenle pelet %90'lık aseton içerisinde toplam karotenoid miktarının çok üzerinde değerler verdiği için sonuçlara burada yer verilmemiştir.

4.3.5 Fikosiyanin miktarı



Şekil 4.40 Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in fikosiyanin konsantrasyonu (mg/mL)

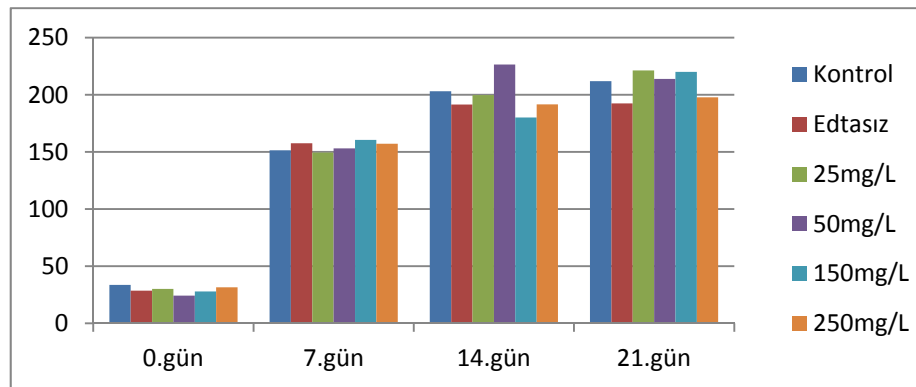
Spirulina platensis en yüksek fikosiyanin konsantrasyonuna $0,348 \pm 0,012$ mg/mL değeri ile 21.günde 150 mg/mL fulvik asit konsantrasyonunda ulaşmıştır.



Şekil 4.41 Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in fikosiyenin konsantrasyonu (mg/mL)

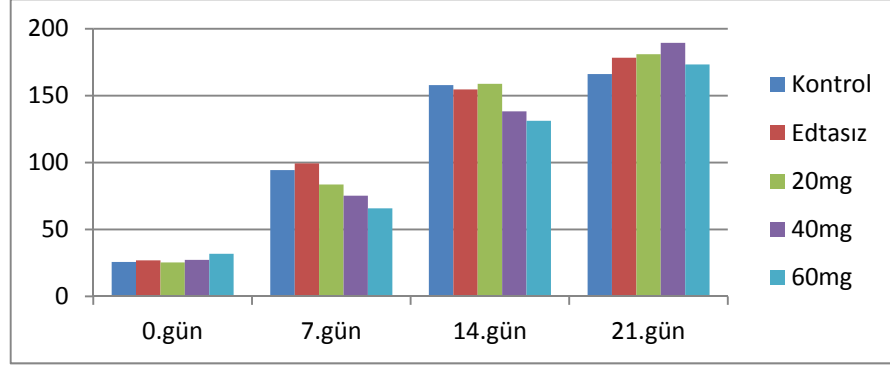
Hümik asit içeren besi ortamlarında gelişen hücreler kontrol grubuna eş gelişim göstermişlerdir ($p>0,05$). $0,21 \pm 0,02$ mg/mL değeri ile en yüksek fikosiyenin konsantrasyonuna 21.günde kontrol grubunda ulaşılmıştır. 60 mg/mL hümik asit içeren ortamda hücre gelişiminin zayıf seyretmesinden dolayı fikosiyenin konsantrasyonu da ($0,149 \pm 0,006$ mg/mL) diğer gruplara göre önemli miktarda azalmıştır ($p<0,05$).

Bu çalışmada elde edilen fikosiyenin konsantrasyonları daha önce literatürde belirtilen fikosiyenin konsantrasyonlarından (Abalde vd. 1998, Soni vd. 2006, Walter 2011) daha yüksektir. Bu farklılığın sebebi pek çok çalışmada yapılmamış olan $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece parçalanmış hücrelerin bekletilerek, fikosiyenin tamamının tampon içerisinde çözünmesinin sağlanmasıdır (Akoğlu 2012).



Şekil 4.42 Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in fikosiyenin verimi (mg/g)

Spirulina platensis hücreleri en yüksek fikosiyenin verimine 14.günde 50 mg/L fulvik asit konsantrasyonunda ulaşmışlardır ($226,45 \pm 29,8$ mg/g).

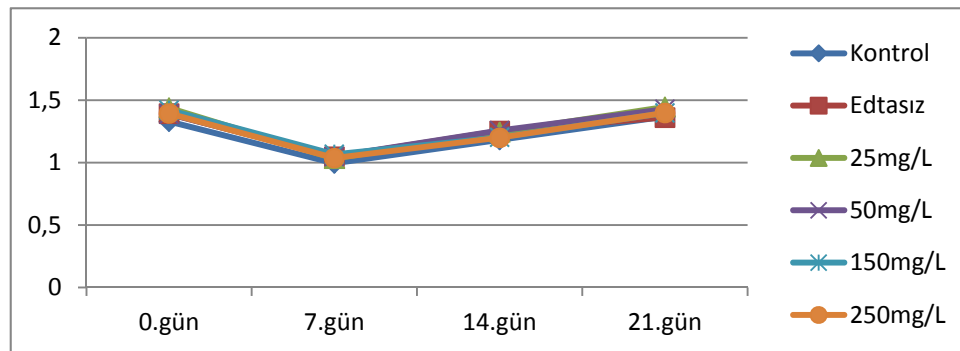


Şekil 4.43 Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in fikosiyenin verimi (mg/g)

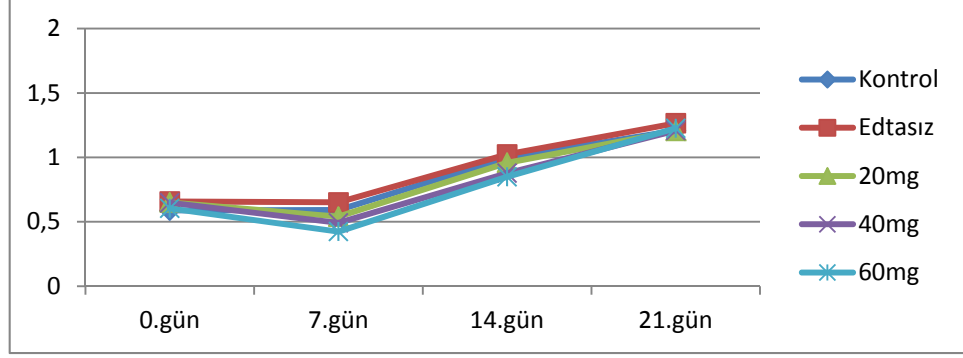
Hümik asit içeren ortamda ise en yüksek fikosiyenin verimi 40 mg/L hümik asit içeren besi ortamında $189,48 \pm 0,01$ mg/g elde edilmiştir.

Hümik ve fulvik asit içeren besi ortamlarında gelişen *Spirulina platensis*'in hücre kuru ağırlığı ile fikosiyenin konsantrasyonları paralel artış göstermişlerdir. Bu nedenle de aynı günde elde edilen fikosiyenin verimleri arasında oluşan fark istatistik olarak önemli değildir ($p > 0,05$) ve kontrol grubuyla benzerdir.

A_{620}/A_{280} oranının $>0,7$ olması gıdalarda kullanıma uygun, $>3,9$ olması reaktif saflık, >4 ve üzeri olması analitik saflık olarak değerlendirilmektedir (Eriksen 2008).



Şekil 4.44 Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'ten elde edilen fikosiyenin saflık değerleri (A_{620}/A_{280})



Şekil 4.45 Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'ten elde edilen fikosiyenin safılık değerleri (A_{620}/A_{280})

Bu çalışmada elde edilen fikosiyenin önemli ölçüde gıdalarda kullanıma uygun saflıkta olduğu görülmektedir. Fulvik asit denemesinden elde edilen fikosiyenin saflık derecesi deneme süresince 1 ve üzerinde seyrederken hümik asit denemesinde 14.gün ve sonrasında 1 ve üzeri değerlere ulaşmıştır.

5. SONUÇ

Çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- Çalışmada kullanılan *Spirulina platensis* ve *Chlorella vulgaris*'in hücre kompozisyonları karşılaştırıldığında *Spirulina platensis*'in protein miktarı, klorofil-*a* ve toplam karotenoid içeriğinin *Chlorella vulgaris*'ten daha yüksek olduğu görülmüştür. Buna ek olarak *Spirulina platensis*'in sahip olduğu fikosiyanın bu siyanobakterinin kullanım alanını genişleterek *Chlorella vulgaris*'e göre katma değerini arttırmaktadır.
- Literatürde belirtilenin aksine hümik asit yalnızca *Chlorella vulgaris* gelişimini teşvik etmiştir. *Spirulina platensis* gelişimini yavaşlatarak, hücrenin zayıf gelişmesine neden olmuştur.
- Fulvik asidin 30 mg/L konsantrasyonunda *Chlorella vulgaris* gelişimi kontrol grubuyla eş düzeyde gerçekleşmiştir. *Spirulina platensis* hücreleri ise artan fulvik asit konsantrasyonlarında, gelişmeye devam etmişlerdir.
- *Spirulina platensis* gelişiminde hümik ve fulvik asitlerin etkisi karşılaştırıldığında, her iki grupta hücre kompozisyonlarının değişimi kontrol gruplarıyla farklılık göstermemektedir. Hümik asidin artan konsantrasyonları hücre gelişimini azaltırken bu etki fulvik asitte görülmemektedir. Maddelerin birbirine göre üstünlükleri kıyaslandığında, fulvik asidin hümik aside göre hücre tarafından daha kolay kullanıldığı görülmektedir. Yani *Spirulina platensis* gelişimi için fulvik asit, hümik aside göre daha etkilidir.
- *Chlorella vulgaris*'te ise tersi durum gerçekleşmiş olup hümik asit, fulvik aside göre hücreler tarafından daha iyi kullanılmıştır. 20 mg/L hümik asit içeren ortamda hücrenin sahip olduğu protein ve klorofil-*a* konsantrasyonu en yüksek değerlere ulaşarak kontrol grubuna göre önemli bir fark oluştururken, buna paralel olarak 30

mg/L fulvik asit içeren besi ortamında gelişen hücreler kontrol grubuyla eş gelişim göstermişlerdir.

- Bu çalışmada *Spirulina platensis* deneme düzenlerinde sentetik metal bağlayıcı EDTA içermeyen kültür gruplarının, kontrol gruplarına yakın gelişme gösterdiği görülmektedir. Buradan Lange'nin (1974) da belirttiği gibi *Spirulina platensis*'in yüksek pH değerlerinde gelişimini devam ettirebilmesi için kendisinin ürettiği şelat maddelerinden söz edilebilir. Ayrıca kendi şelat maddelerini üreten siyanobakteri türlerinin gelişmelerinin son evresinde kültür sıvısının viskoz özellik gösterdiği (Lange 1974) ve *Spirulina platensis* kültürünün de 14. ve 21. günler arasında viskozitesinin arttığı gözlemlendiğinden, *Spirulina platensis*'in de kendi şelat maddesini üreten türlerden olduğu düşünülmektedir. Bu özellik çalışmamızın amacı dışında kaldığından ileriki çalışmalarda bu özelliğin niteliğinin belirlenmesine çalışılacaktır.
- Endüstriyel anlamda *Chlorella vulgaris*'ten klorofil eldesi için dondurma-çözme yöntemi, karotenoid eldesi için ise HCl ile hidroliz yöntemi önerilmektedir. HCl ile klorofil pigmentinin yıkıma uğrayarak sarı renkli feofitinlere dönüşmesine neden olduğundan sonuçlarda dalgalanmalar görülmektedir.
- Alglerin toprak verimini artırıcı özellikleri ile hümik maddelerin hem alg gelişimini hem de bitki gelişimini artırıcı özelliği birleştirilip, inorganik gübreye alternatif olup olmadığının araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızın ikinci aşamasında elde edilen ürünün bitki gelişimine etkisi Bahçe Bitkileri Bölümü ile gerçekleştirilecek ortak çalışmalarla ortaya konacaktır.
- Mikroalgler çok zengin birer protein kaynağı olmalarına rağmen bilgi ve yatırım eksikliğinden dolayı üretici tarafından yeterince karlı görülmemektedir. Bu nedenle bugün için geleneksel protein kaynaklarıyla rekabet edememektedirler. Uygun türlerin seçimi ve uygun ekstraksiyon metodları ile mikroalglerden birden fazla yan ürün elde edilebilir. Özellikle protein ağırlıklı olarak alglerden yararlanıldığında dünya nüfusunun besin ihtiyacının rahatlıkla karşılanabileceği, siyanobakterilerden

ham protein elde elde edilirken yanında yan ürün olarak renk maddelerinin de eldesi mümkündür.

- Çalışmamız bu alana yeni bir yaklaşım getirmeyi amaçlamıştır.

KAYNAKLAR

- Abalde, J., Betancour, L., Torres, E., Cid, A. and Barwell, C. 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. 109201. *Plant Science*, Vol. 136; pp. 109- 120.
- Akoğlu, A. 2012. Siyanobakteriden elde edilen fikosiyenin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora tezi (Basılmamış). Ankara Üniversitesi, 109s., Ankara
- Alava, D., Mello, PC., and Wagener, K. 1997. The relevance of the CO₂ partial pressure of sodium bicarbonate solutions for the mass cultivation of the microalga *Spirulina*. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 8(5); pp. 447-450.
- Anonim. 2006. Web sitesi: http://www.tarimmerkezi.com/yazar_kose.php?hid=222, Erişim Tarihi: 30.01.2012.
- Anonim. 2011. Web Sayfası: yunus.hacettepe.edu.tr/~roner/denbi.htm. Erişim tarihi: 31.01.2011.
- Anonim. 2011. Wikipedia, 2011. Web sayfası: wiki.answers.com/Q/what_does_NaCl_do_during_protein_extraction, Erişim tarihi: 28.02.2012.
- Anonim, 2012. <http://humikasit.org/?&Bid=76350&/HANIN-İNSAN-SAğLIğINA> ETKİSİ, Erişim Tarihi: 30.01.2012.
- Anonymus. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO, 30p.
- Anonymus. 2006. Web sitesi: <http://www.optimallyorganic.com/PDF/GuideFulvicAcid.pdf>. Erişim tarihi: 16.03.2012.
- Anonymus. 2007. Web Sitesi: http://epsag.netcity.de/pdf/media_and_recipes/02_Spirulina_Medium.pdf. Erişim tarihi: 18.05.2011
- Anonymus. 2008. Web Sitesi: http://epsag.netcity.de/pdf/media_and_recipes/20_BG11_Medium.pdf. Erişim tarihi: 18.05.2011
- Anonymus. 2011. Biogro Web sitesi: <http://www.biogro.com/resources/CFMS/BG%20CFS%2003%20%20Amino%20Minerls%20and%20Foliar%20Feeding.pdf>. Erişim tarihi: 18.06.2012.
- Bähns, H. and Steinberg, C. E. W. 2012. Impact of two different humic substances on selected coccal green algae and cyanobacteria—changes in growth and photosynthetic performance. *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 19 (2); pp. 335-346.

- Becker, E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25; 207-210.
- Belkin, S. and Boussiba, S. 1991. Resistance of *Spirulina platensis* to ammonia at high values. *Plant Cell Physiol.*, Vol. 32 (7); pp. 953-958.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. and Dunstan, G.A. 1997. Nutritional Properties of Microalgae for Mariculture. *Aquaculture*, Vol. 151; pp. 315-331.
- Bulda, O.V., Rassadina, V.V., Alekseichuk, H.N. and Laman, NA. 2008. Spectrophotometric measurement of carotenoid, xanthophylls and chlorophylls in extracts from plant seeds. *Russian Journal of Plant Physiology*, Vol. 55 (4); pp. 544-551.
- Cemeroğlu, B. 2007. Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 463-465, ss,535. Ankara.
- Chader, S., Mahmah, B., Chetehouna, K. and Mignolet, E. 2011 Biodiesel production using *Chlorella sorokiniana*. *Revue des Energies Renouvelables*, Vol. 14 (1) pp. 21-26.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S. and Bunnag, B. 2011. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource Technology*, Vol. 102; pp. 7159-4164.
- Chiou, C.T. 1989. Theoretical Considerations in The Partition Uptake of Nonionic Soil Compounds. p. 1-23. In B.L. Sawley and K.Brown (ed). *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils*. SSSA Spec. Publ. 22, ASA, CSSA, and SSSA, Madison WI.
- Chronakis, I.S. 2001. Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* strasin Pacifica): Thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 49; pp. 888-898.
- Colyer, C.L., Kinkade, C.S. Viskari, P.J. and Landers, J.P. 2005. Analysis of cyanobacterial pigments and proteins by electrophoretic and chromatographic methods. *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 382; pp.559-569.
- Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G. ve Çakır, İ. 2008. Mikrobiyoloji. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No 36; 225 s., Ankara.
- Dalay, M.C., İmamoğlu, E. ve Öncel, S. 2008. Mikroalgal Biyokütle Üretimi için Düşük Maliyetli Fotobiyoreaktör Tasarımı. Proje No: 104M354.
- Danesi, E.D.G., Navacchi, M.F.P., Takeuchi, K.P., Frata, M.T. and Carvalho J.C.M. 2010. Application of *Spirulina platensis* in protein enrichment of manioc based bakery products. *Special Abstracts., Journal of Biotechnology*, 150s, 311.
- De Paolis, F. and Kukkonen, J. 1997. Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: Influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere*, Vol. 34 (8); pp. 1693-1704.

- Eriksen, N.T. 2008. Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbio. Biotechnol.*, Vol. 80; pp. 1-14.
- Falquet, J. 2006. The nutritional aspects of Spirulina. Web sitesi: http://antenna.ch/en/documents/AspectNut_UK.pdf. Erişim tarihi: 18.5.2011.
- Furuki, T., Maeda, S., Imajo, S., Hiroi, T., Amaya, T., Hirokawa, T., Ito, K. and Nozawa, H. 2003. Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. *Journal of Applied Phycology*, Vol. 15; pp. 219-324.
- Gantar, M., and Svirčev, Z. 2008. Microalgae and Cyanobacteria: Food for thought. *J. Phycol.*, Vol. 44; pp. 260-268.
- Godoy Danesi, E.D., Polonio Navacchi, M.F., Takeuchi, K.P., Frata, M.T. and Monteiro Carvalho, J.C. 2010. Application of *Spirulina platensis* in Protein Enrichment of Manioc Based Bakery Products. *Journal of Biotechnology*, Vol. 150 (1); pp. 311.
- Goodwin, T.W. 1957. The nature and distribution of carotenoids in some blue-green algae. *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 17; pp. 467-473.
- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J. and Empis, J. 1996. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, Vol. 57; pp. 157-163.
- Gouveia, L., Batista, A.P., Sousa, I., Raymundo, A. and Bandarra, N.M. 2008. Microalgae in Novel Food Products. *Food Chemistry Research Developments*, Chapter 2.
- Govindjee, A.K.G.A. 1966. Transfer of the Excitation Energy in *Anacystis nidulans* Grown to Obtain Different Pigment Ratios. *Biophysical Journal*, Vol. 6; pp. 611-619.
- Graham, L.E, Graham, J.M., Wilcox, L.W., 2004. *Bitki Biyolojisi (Plant Biology)*, Çeviri Editörü: Işık, K., Palme Yayıncılık, 572 sayfa, Ankara.
- Gu, Z., Deming, C., Yongbin, H., Zhigang, C. and Feirong, G. 2008. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *LWT- Food Science and Technology*, Vol. 41 (6); pp.1082-1088.
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L. and Goycoolea. 2006. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Vol. 46; pp. 185-196.
- Hoeffner, S.L. and Manahan, S.E. 1980. Influence of coal humic acid on the growth of *Chlorella vulgaris* algae. *Journal of Environmental Science and Health*, Vol. A15(2); pp. 149-161.

- Ishiura, M., Katsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C.R., Tanabe, A., Golden, S.S., Johnson, C.H. and Kondo, T. 1998. Expression of agene cluster *kaiABC* as circadian feedback process in cyanobacteria, *Science*, Vol. 281, pp.1519-1523.
- Jin, X., Chu, Z., Yan, F. and Zeng, Q. 2009. Effects of lanthanum (III) and EDTA on the growth and comptetition of *Microcystis aeruginosa* and *Scendesmus quadricauda*. *Limnologica*, Vol. 39; pp. 86-93.
- Karakaya, E. 2002. Oxidative treatment of algogenic organic matter. Yüksek lisans tezi, (Basılmamış). Boğaziçi Üniversitesi, 139s., İstanbul.
- Kutluca, M. 2007. Hümik asitlerin metal tutma ve ligand değiştirme özelliklerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi (Basılmamış). Selçuk Üniversitesi, 118s., Konya.
- Kyler, K. 2003. Algal Pigments. *Bio* 4415.
- Lee, R.E. 1999. *Phycology*. Cambridge University Press, 614p, Londra.
- Lange, W. 1970. Blue-green algae and humic substances. *Proc. 13th Conf.Great Lakes Res*, pp. 58-70.
- Lange, W. 1974. Chelating agents and blue-green algae. *Canadian Journal of microbiology*, Vol. 20 (10); pp. 1311-1321.
- Lorenz, TR. 1998. Quantitative Analysis of Chorophyll-a from *Spirulina Pacifica*. *Spirulina Pacifica Technical Bulletin*, No 006.
- Ma, M., Zhu, W., Wang, Z. and Witkamp, G.J. 2003. Accumluation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus suspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquatic Toxicology*, 63; 221-228.
- Madhyastha, H.K. and Vatsala, T.M. 2007. Pigment production in *Spirulina fussiformis* in different photophysical conditions. *Biomolecular Engineering*, Vol. 24; pp. 301–305.
- Mitchell, B.G., and Kiefer, D.A. 1984. Determination of absorption and fluorescence excitation spectra for phytoplankton. *Lecture Notes on Coastal and Estuarine Studies*, Vol. 8; pp. 157-169.
- Moraes, C.C., Sala, L., Cerveira, G.P. and Kalil, S.J. 2011. C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 28 (01); pp. 46-49.
- Mostafa, S.S.M. and Ali, L.K.M. 2009. Evaluation of humic substances on *Spirulina platensis* growth for preparation of fertilizers. 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture.

- Newton, J. 2002. Analysis of Phytoplankton Pigments: Determination of Chlorophyll *a*. Lecture notes of School of Oceanography, University of Washington. Web sitesi: http://courses.washington.edu/ocean220/misc/Chla_method_newton.pdf. Erişim tarihi: 02.01.2012.
- Oğuz, H. 2008. Çukurova İklim Koşullarının *Spirulina platensis* (Cyanophyta)'deki Fikosiyanin Miktarına Etkisi.Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış). Çukurova Üniversitesi, 52s., Adana.
- Ohkubo, N., Yagi, O. and Okada, M. 1998. Effects of humic and fulvic acids on the growth of *Microcystis aeruginosa*. Environmental Technology, Vol. 19; pp. 611-617.
- Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P. and Abalde J. 2000. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. Journal of Applied Phycology, Vol. 12; pp. 553-556.
- Pouneva, I.D. 2005. Effect of humic substances on the Growth of Microalgal Cultures. Russian Journal of Plant Physiology, Vol. 52 (3); pp. 410-413.
- Prakash, A. and Rashid, M.A. 1968. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: Dinoflagellates. Limnol. Oceanogr., Vol. 13 (4); pp. 598-606.
- Prakash, P., Dhanalakshimi, P.K. and Anusha, B. 2011. Effect of humic acid on *Spirulina platensis* production and analysis of nutrient contents. Recent Research in Science and Technology, Vol. 3 (1); pp. 87-89.
- Ritchie, R. J. 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. Photosynth Res.,Vol. 89; pp. 27-41.
- Sanchez M.D., Mantell, C., Rodriguez, M., Martinez de la Ossa, E.,Lubian, L.M. and Montero, O., 2005. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll *a*. Journal of Food Engineering, Vol. 66; pp. 245-251.
- Sarada, R., Pillai, M.G. and Ravishankar, G.A. 1999. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. Process Biochemistry, Vol. 34; pp. 795-801.
- Schagerl, M. and Müller, B. 2006. Acclimation of Chlorophyll *a* and Carotenoid Levels to Different Irradiances in Four Freshwater Cyanobacteria. Journal of Plant Physiology, Vol. 163; pp. 709-716.
- Silveira, S.T., Burkert J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V. and Kalil, S.J. 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. Bioresource Technology, Vol. 98; pp. 1629-1634.

- Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U. and Madamwar, D. 2006. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry*, Vol. 41; pp. 2017-2023.
- Sun, B., Tanji, Y. and Unno, H. 2005. Influences of iron and humic acid on the growth of the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 24; pp. 195-201.
- Tomaselli, L. 1997. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. 1-15 *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell biology and biotechnology*, Vonshak, A. (Ed.), Taylor and Francis publishers, London. Pp 233.
- Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijsk, H. C. P., Ohno, T. and Tanaka, A. 1999. Chlorophyll b and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature*, Vol. 400; pp. 159-162.
- Tunail, N. 2009. *Mikrobiyoloji. Pelin ofset*, 448s, Ankara.
- Walter, A., Carvalho, J.C., Soccol, V.T., Faria, A.B.B., Ghiggi, V. and Soccol, C.R. 2011. Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 54; pp. 675-682.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G. and Jahns, H.M. 1995. *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press, 468p., England.
- Vananuvat, P. and Kinsella, J.E. 1975. Extraction of protein, low in nucleic acid, from *Saccharomyces fragilis* grown continuously on crude lactose. *J. Agr. Food Chem.* Vol. 23 (2); pp. 216-221.
- Yeh, K.L., Chang, J.S. and Chen, W.M. 2010. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Eng. Life Sci.*, Vol. 10 (3); pp. 201-208.
- Zeng, X., Danquah, M.K., Zhang, S., Zhang, X., Wu, M., Chen, X.D., Ng, I., Jing, K. and Lu, Y. 2012. Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO₂ fixation and phycocyanin production. *Chemical Engineering Journal*, Vol. 183; pp. 192-197.
- Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X. and Dou, C. 2011. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis and microwaves. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol. 164; pp. 1215-1224.
- Zou, N. and Richmond, A. 2000. Light-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*). *Journal of Applied Phycology*, Vol. 12; pp. 349-354.

EKLER

EK 1 Deneme boyunca kullanılan kültür ortamlarının bileŒimleri

EK 2 Deneme süresince kullanılan ekipman listesi

EK 3 Protein analizleri için kullanılan standart eēriler

EK 1 Deneme boyunca kullanılan kültür ortamlarının bileşimleri

A: Zarrrouk (Spirulina) Besiyeri Bileşimi

(Anonymus, 2007)

| 1.Kısım | | 2. Kısım | |
|------------------------------------|---------|--------------------------------------|--------|
| NaHCO ₃ (Merck,Almanya) | 13,61 g | NaNO ₃ | 2,5 g |
| | | K ₂ SO ₄ | 1 g |
| Na ₂ CO ₃ | 4,03 g | NaCl | 1 g |
| | | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g | CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,04 g |
| | | FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,01 g |
| Saf Su | 500 mL | Na ₂ EDTA | 0,08 g |
| | | İz Element Çözeltisi | 5 mL |
| | | Saf Su | 495 mL |

İz Element Çözeltisi

| | Stok (10mL) | Çözelti (1 L) |
|---|-------------|----------------|
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 g | 100 µL |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 0,1 g | 200 µL |
| H ₃ BO ₃ | 0,2 g | 500 µL |
| Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O | 0,02 g | 500 µL |
| Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O | 0,02 g | 500 µL |
| CuSO ₄ . 2H ₂ O | 0,025 g | 200 µL |
| Saf Su | | 998 mL |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,7 g | |
| Na ₂ EDTA | 0,8 g | |

Besiyeri kısımları ayrı erlenlerde 121°C’de 15 dk sterilize edilip soğutulduktan sonra, aseptik koşullarda 1. ve 2. kısım bir araya getirilmiştir.

EK 1 Deneme boyunca kullanılan kültür ortamlarının bileşimleri (Devam)

B: BG-11 Besiyeri (Anonymus, 2008)

| S 1 (100 mL) | | S 2 (100 mL) | | S 3 (100 mL) | | İz Element Solüsyonu | |
|--------------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|---------------------------------|-------|---|---------|
| Na ₂ EDTA | 0,01 g | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,75 g | K ₂ HPO ₄ | 0,4 g | H ₃ BO ₃ | 61 mg |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,36 g | | | | | MnSO ₄ .4H ₂ O | 169 mg |
| Sitrik Asit | 0,06 g | | | | | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 287 mg |
| Demir Amonyum Sitrat | 0,06 g | | | | | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4 H ₂ O | 12,5 mg |
| | | | | | | CuSO ₄ . 5H ₂ O | 2,5 mg |

- 1L besiyeri için S1, S2, ve S3'ten 10 mL, iz element çözeltisinden 1 mL alınır.
- 970 mL saf su ilave edilir.
- Üzerine;
 - Na₂CO₃ 0,02 g
 - NaNO₃ 1,5 g

ilave edilir, manyetik karıştırıcı ile iyice karıştırıldıktan sonra 121°C'de 15 dk sterilize edilir.

* Her iki besi ortamı için de Belirlenen konsantrasyonlarda hümik asit ve fulvik asit tartılıp sırasıyla 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl çözeltileri içinde çözüldükten sonra EDTA içermeyen besi yeri içine ilave edilmiştir. EDTA içermeyen besi ortamları için EDTA içermeyen iz element çözeltisi kullanılmıştır.

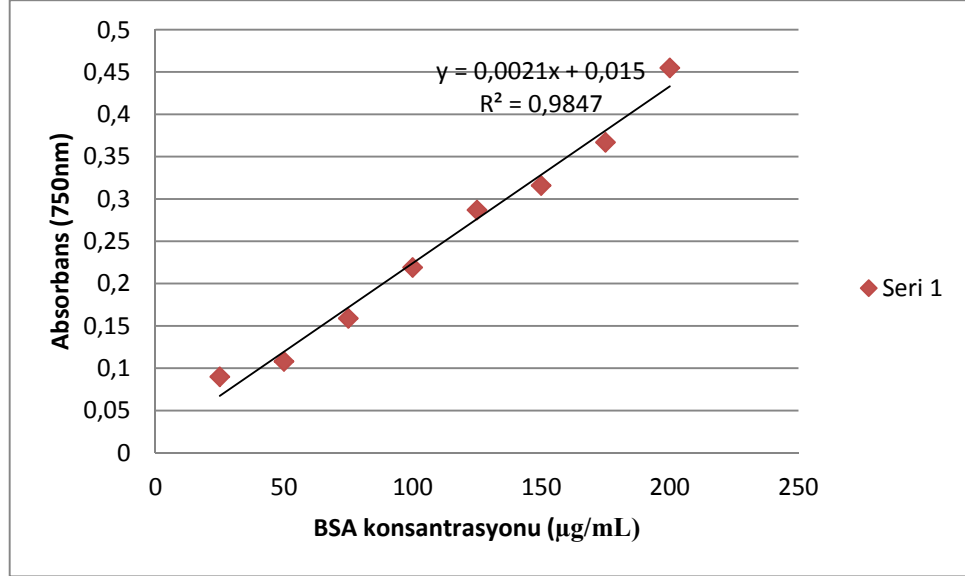
*Besi yeri hazırlanmasında kullanılan kimyasallardan EDTA Sigma-Aldrich (Amerika) firmasından, bunun dışında kalanların tamamı Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

EK 2 Deneme süresince kullanılan ekipman listesi

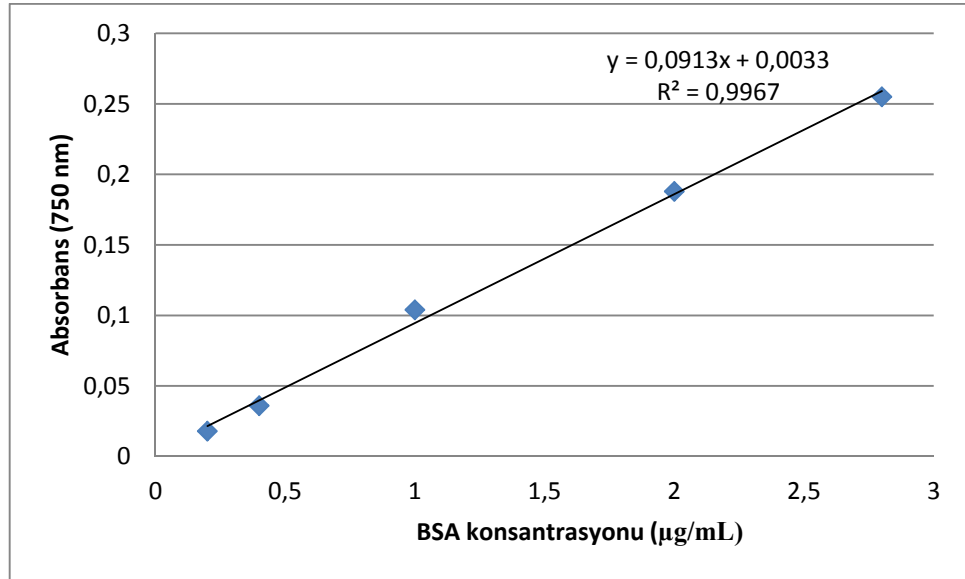
| Ekipman | Model/Ülke |
|------------------|-------------------------------------|
| pH-metre | J.P. Selecta, İspanya |
| Otoklav | Hirayama, Japonya |
| Santrifüj | Sigma 3K-30, Almanya |
| Spektrofotometre | Shimadzu UV-1700, Japonya |
| Analitik Terazı | Shimadzu AUX220, Japonya |
| Su banyosu | GFL, Almanya |
| Etüv | Heraeus, Almanya |
| Derin dondurucu | Arçelik Derin Dondurucu, Türkiye |
| Çalkalayıcı | New Brunswick Scientific, ABD |
| Vakum pompası | Sartorius, Almanya |
| Mikroskop | Canon YS 100, Japonya |

EK 3 Protein analizleri için kullanılan standart eğriler

A: Lowry Protein Tayini Standart Eğrisi



B: Biüret Protein Tayini Standart Eğrisi



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Şebnem KURHAN

Doğum Yeri :Ergani/Diyarbakır

Doğum Tarihi :18.03.1988

Medeni Hali :Bekar

Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Söke Hilmi Fırat Anadolu Lisesi (2002-2006)

Lisans : Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
(2006-2010)

Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Temmuz 2012)