

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İZMİR ÇAMALTI TUZLASINDAN İZOLE EDİLEN HALOFİLİK
MİKROALGLERİN BİYOTEKNOLOJİDE KULLANIM POTANSİYELLERİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra ŞENTÜRK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

TEMMUZ 2018

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İZMİR ÇAMALTI TUZLASINDAN İZOLE EDİLEN HALOFİLİK
MİKROALGLERİN BİYOTEKNOLOJİDE KULLANIM
POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Kübra ŞENTÜRK
(171083115)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mete YILMAZ

TEMMUZ 2018

BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 171083115 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Kübra ŞENTÜRK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan İzole Edilen Halofilik Mikroalglerin Biyoteknolojide Kullanım Potansiyellerinin İncelenmesi” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Mete YILMAZ**
Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Muharrem BALCI**
İstanbul Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER
Bursa Teknik Üniversitesi

Savunma Tarihi : **09.07.2018**

FBE Müdürü : **Doç. Dr. Murat ERTAŞ**
Bursa Teknik Üniversitesi /...../.....

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Kübra ŞENTÜRK





Aileme,

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesi esnasında bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her türlü imkanı sağlayıp desteklerini esirgemeyen değerli tez danışman hocam Sayın Doç.Dr.Mete YILMAZ'a,
TÜBİTAK 114Z274 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilen tez çalışmamda finansal desteklerinden ötürü TÜBİTAK'a,
Tez çalışmamın laboratuvarında yürütülmesi aşamasında bana destek ve yardımcı olan değerli arkadaşım Esra DÖKÜMCÜOĞLU ve Cem DİRLİK'e,
Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi hep yanımda olan, sevgi ve desteklerini bir an olsun ayırmayan aileme,
Sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Temmuz 2018

Kübra ŞENTÜRK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	vii
SEMBOLLER	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR.....	4
3. MATERYAL VE METOD.....	10
3.1 Genomik DNA İzolasyonu.....	10
3.1.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve filogenetik analizler	10
3.2 Mikroalg Büyüme Deneyleri.....	12
3.3 <i>Dunaliella</i> Suşlarında Total Karotenoit Miktarı Analizleri	12
3.4 Mikroalg Suşlarında Protein Miktarı Ölçümleri	14
3.4.1 Mikrolaglerden protein ekstraksiyonu	15
3.4.2 Mikroalglerde protein miktar tayini	15
3.5 Mikroalglerde Karbonhidrat Miktar Tayini	15
3.6 Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile β -Karoten Analizi	16
3.7 Yağ Asidi Analizi.....	16
4. BULGULAR	17
4.1 Filogenetik Analizler.....	17
4.1.1 AQUAMEB <i>Dunaliella</i> suşlarının rRNA büyük alt ünite (LSU) genine dayalı karakterizasyonları	17
4.1.2 AQUAMEB <i>Tetraselmis</i> ve Cryptophyceae suşlarının rRNA büyük alt ünite (LSU) genine dayalı karakterizasyonları	18
4.2 <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB Suşlarının Yüksek ve Düşük Işık Yoğunluklarında Büyüme Özellikleri	20
4.3 <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB Suşlarının Yüksek ve Düşük ışık Yoğunluklarında Pigment Üretimleri.....	24
4.3.1 Total karotenoit, klorofil-a ve klorofil-b derişimlerinin spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi	24
4.3.2 <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB suşlarının β -Karoten üretimlerinin yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmesi	26
4.4 AQUAMEB Suşlarının Protein, Karbonhidrat, Yağ Asidi Miktar Analizleri ..	35
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR	47

KISALTMALAR

AA	: Araşidonik Asit
DAD	: Diyot Dizisi Dedektörü
DHA	: Dokosaheksaenoik Asit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
GC-FID	: Alev İyonlaşma Dedektörlü Gaz Kromatografisi
HPLC	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
LSU	: rRNA Büyük Alt Ünite Genleri
ML	: Maksimum Olabilirlik
MUFA	: Tekli Doymuş Yağ Asidi
NaCl	: Sodyum Klorür
NJ	: Neighbour Joining
AA	: Araşidonik Asit
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	: Ribozomal Ribo Nükleik Asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
SFA	: Doymuş yağ asidi

SEMBOLLER

β	: Beta
CO_2	: Karbondioksit
C_{40}	: C_{40} Karbon atomu
$^{\circ}\text{C}$	: Derece
μl	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
mM	: Milimolar
μM	: Mikromolar
μmol	: Mikromol
ml	: Mililitre
μg	: Mikrogram
NaCl	: Sodyum Klorür

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 4.1 : Işık denemelerinde kullanılan <i>Dunaliella</i> suşları ve kültür ortamı tuzlulukları. PES, Plymouth Erdschreiber kültür ortamı	12
Çizelge 4.2 : Tez çalışmasında kullanılan AQUAMEB suşlarının toplam protein, karbonhidrat ve yağ asidi miktarları..	37
Çizelge 4.3 : AQUAMEB mikroalg suşlarının temel yağ asitleri kompozisyonu. Değerler yüzde oranları temsil etmektedir.	39
Çizelge 4.4 : Tez çalışmasında kullanılan mikroalg suşlarının yağ asitleri kompozisyonu.	40

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1 : <i>Dunaliella</i> suşlarının yüksek ve düşük ışık yoğunluğunda kültürünü sağlayan deney düzeneği.....	13
Şekil 4.1 : Tez çalışmasında kullanılan <i>Dunaliella</i> suşlarının rRNA büyük alt ünite genlerine dayalı Maksimum Olasılık (ML) ağacı.	19
Şekil 4.2 : Tez çalışmasında kullanılan <i>Cryptophyceae</i> AQUAMEB-1 ve <i>Tetraselmis</i> sp. AQUAMEB-22 ile gen bankasından ağaca eklenen diğer suşların rRNA LSU geni Maksimum Olasılık (ML) ağacı.	20
Şekil 4.3 : <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB suşlarının düşük ışık yoğunluğunda ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) büyüme eğrileri.....	21
Şekil 4.4 : <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB suşlarının yüksek ışık yoğunluğunda ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) büyüme eğrileri.....	22
Şekil 4.5 : <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB suşlarının yüksek ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ve düşük ışık ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) yoğunluklarında büyüme eğrileri.	22
Şekil 4.6 : <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB-2, -4, ve -10 suşlarının 36 gün sonunda renk değişimleri.....	23
Şekil 4.7 : <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB-16, -14, ve -21 suşlarının 36 gün sonunda renk değişimleri.....	23
Şekil 4.8 : <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB suşlarında yüksek ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ve düşük ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ışık yoğunluklarında toplam karotenoit üretimi. YI, yüksek ışık; DI, düşük ışık. Kar, karotenoit.	24
Şekil 4.9 : <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB suşlarında yüksek ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ve düşük ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ışık yoğunluklarında klorofil-a miktarları. YI, yüksek ışık; DI, düşük ışık. Chl-a, klorofil-a.	25
Şekil 4.10: <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB suşlarında yüksek ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ve düşük ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ışık yoğunluklarında klorofil-b miktarları. YI, yüksek ışık; DI, düşük ışık. Chl-b, klorofil-b.	26
Şekil 4.11 : Yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) analizinde β -Karoten standardı ile oluşturulan eğri.....	26
Şekil 4.12 : β -Karoten standardı (2,5 ppm) HPLC Kromatogramı.	27
Şekil 4.13 : <i>Dunaliella viridis</i> AQUAMEB-2 özütü HPLC Kromatogramı.	28
Şekil 4.14 : <i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-4 HPLC kromatogramı.....	29
Şekil 4.15 : <i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-10 HPLC kromatogramı.....	30
Şekil 4.16 : <i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-14 HPLC kromatogramı.....	31
Şekil 4.17 : <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB-16 Özütü HPLC Kromatogramı <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB-16 HPLC kromatogramı.	32
Şekil 4.18 : <i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-21 Özütü HPLC Kromatogramı.	33
Şekil 4.19 : <i>Dunaliella salina</i> ve <i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB suşlarında HPLC ile belirlenen β -karoten miktarları.....	34
Şekil 4.20 : Mikroalglerin protein içeriklerinin belirlenmesi amacıyla bovin serum albumin (BSA) standardı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	35

Şekil 4.21 : Mikroalglerin karbohidrat miktarlarının belirlenmesi amacıyla D-glukoz standardı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.	36
Şekil 4.22 : Tez çalışmasında kullanılan mikroalg suşlarının kuru ağırlık içinde yüzde protein, karbohidrat ve yağ asidi oranları.	41



İZMİR ÇAMALTI TUZLASINDAN İZOLE EDİLEN HALOFİLİK MİKROALGLERİN BİYOTEKNOLOJİDE KULLANIM POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Mikroalgler hızlı büyüme özellikleri, çeşitli çevresel faktörlere karşı geniş tolerans göstermesi ve biyokimyasal içerikleri nedeniyle gıda, yem, ilaç ve biyo-yakıt gibi çeşitli biyoteknolojik alanlarda kullanılma potansiyeline sahiptirler. Bu doğrultuda tez çalışmasında İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole edilmiş halofilik mikroalgler, biyoteknolojide kullanım potansiyellerinin araştırılması amacıyla, çeşitli genetik, fizyolojik ve biyokimyasal analizlere tabi tutulmuştur. Ribozomal RNA büyük alt ünite gen dizilerine (rRNA LSU) dayalı filogenetik analiz, 17 *Dunaliella* sp. suşundan 11'nin *D. salina* ile gruplandığını, ikisinin *D. viridis* benzeri olduğunu göstermiştir. Dört suşun tür seviyesindeki tanımlaması yapılamamıştır. Diğer taraftan gen bankalarında halofilik *Tetraselmis* sp. ile Cryptophyceae suşlarına yüksek benzerliğe sahip rRNA LSU gen dizilerinin mevcut olmadığı görülmüştür. Genetik farklılığa sahip 6 *Dunaliella* suşu, büyüme özellikleri ve pigment üretimlerinin karşılaştırılması için, düşük ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ve yüksek ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ışık yoğunluklarında kültüre alınmıştır. En iyi büyüme *D. viridis* AQUAMEB-2'nin düşük ve yüksek ışık kültürleri ile *D. salina* AQUAMEB-21'in yüksek ışık kültüründe gözlenmiştir. En yüksek total karotenoid içeriği *Dunaliella salina* suşlarının yüksek ışık kültürlerinde belirlenmiştir. *Dunaliella salina* suşlarında kuru ağırlığın % 3-5'inin beta karoten olduğu yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan mikroalg suşlarının kuru ağırlık başına protein miktarları 60 mg.g^{-1} ile 180 mg.g^{-1} arasında; toplam karbohidrat miktarları 60 mg.g^{-1} ile 250 mg.g^{-1} arasında; toplam yağ asidi miktarları ise 12 mg.g^{-1} ile 40 mg.g^{-1} arasında değişmiştir. Cryptophyceae AQUAMEB 1 ve *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22'de kuru ağırlık başına ökosapentaenoik asit (EPA) miktarları sırasıyla 1.4 mg.g^{-1} ve 0.8 mg.g^{-1} olarak bulunmuştur. Dokosahegzaenoik asit (DHA) ise, 0.5 mg.g^{-1} alg kuru ağırlığı ile sadece Cryptophyceae AQUAMEB-1'de bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Algal biyoteknoloji, β -karoten, Çamaltı Tuzlası, *Dunaliella* sp., DHA, EPA, Karbonhidrat, Protein, rRNA büyük alt ünite, Yağ asidi.

EXPLORING THE BIOLOGICAL POTENTIAL OF HALOPHILIC MICROALGAE ISOLATED FROM İZMİR ÇAMALTI SALTEN

SUMMARY

Microalgae, with their fast growth rates, wide environmental tolerance of some species and with their biochemical composition, have the potential to be used in various biotechnological fields such as food, feed, medicine and biofuels. Therefore, in this thesis study, halophilic microalgae isolated from İzmir Çamaltı Saltern were genetically, physiologically and biochemically characterized to determine their biotechnological potential. Phylogenetic analysis based on rRNA large subunit genes (LSU) clustered 11 of 17 *Dunaliella* strains with *D. salina* and 2 were similar to *D. viridis*. Four strains could not be assigned to a species. On the other hand, rRNA LSU genes with high similarity to those of halophilic *Tetraselmis* sp. and Cryptophyceae were absent in gene databases. Six genetically different *Dunaliella* strains were grown in low ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and high light ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) conditions to compare their growth and pigment production properties. Highest biomasses were observed in low and high light cultures of *D. viridis* AQUAMEB-2 and high light culture of *D. salina* AQUAMEB-21. Highest total carotenoids were observed in high light cultures of *D. salina*. In these *D. salina* strains 3‰ to 5‰ of algal dry weight were beta carotene according to high pressure liquid chromatography (HPLC) results. Total protein concentrations ranged between 60 mg.g^{-1} and 180 mg.g^{-1} , total carbohydrate concentrations ranged between 60 mg.g^{-1} and 250 mg.g^{-1} and total fatty acid concentrations ranged between 12 mg.g^{-1} and 40 mg.g^{-1} per dry weight of the microalgae strains used in the thesis. Eicosapentaenoic acid (EPA) content of Cryptophyceae AQUAMEB-1 and *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22 were 1.4 mg.g^{-1} ve 0.8 mg.g^{-1} , respectively, of the algal dry weight. Docosahexaenoic acid (DHA) was only observed in Cryptophyceae AQUAMEB-1 with 0.5 mg.g^{-1} algal dry weight.

Key words: Algal biotechnology, β -karoten, Carbohydrate, Çamaltı Saltern, *Dunaliella* sp., DHA, EPA, Fatty acid, Protein, rRNA large subunit gene

1. GİRİŞ

Mikroalgler tek hücreli formlardan filamentli formlara kadar çeşitli morfolojilere sahip ve fotosentez yapabilen mikro-organizmaların oluşturduğu bir topluluktur . Bu evrimsel ve filogenetik çeşitlilik aynı zamanda mikroalglerin kimyasal bileşimlerinde de büyük bir çeşitlilik olması anlamına gelir. Bu çeşitliliğin bir sonucu olarak hücre içeriklerinde bulunan değerli metabolitlerden dolayı mikroalgler ilgi odağı haline gelmiştir. Mikroalgler biyo-temelli üretimde biyo-yakıt üretimi haricinde kıymetli ilaç bileşenleri, gıda katkı maddeleri, kozmetik gibi bir çok farklı alanda önemli ticari potansiyele sahiptir. Sağlıklı gıda kategorisinde Japonya ve Meksika’da satılan *Chlorella* ve *Spirulina* ilk ticari mikroalglerden olmuştur. Daha sonra 1980’lerde *Dunaliella salina*’ dan β -karoten, 1990’larda ise *Haematococcus Pluvialis*’den astaksantin ve *Cryptocodinium Cohnii*’den dokosaheksaenoik asit ticari olarak elde edilmeye başlanmıştır [1]. Mikroalgler yalnızca bu kimyasal bileşikler değil, aynı zamanda fungi, bakteri ve yüksek yapılı bitkiler tarafından sentezlenen doğal bileşenlerin kimyasal sentezini de gerçekleştirmektedirler. Mikroalglerden sentezlenen bu bileşikler alternatiflerine kıyasla daha düşük maliyetle üretilmektedir, örnek olarak vitaminler verilebilir [1].

Fotosentetik *Dunaliella*, *Chlorophyta* soyuna ait, morfolojik olarak katı bir hücre duvarına sahip olmamaları ile karakterize edilen türlerdir. Bu cinse ait türler yüksek tuzluluk toleransına sahiptir ve yüksek oranda β -karoten üretebilmektedirler [2]. *Dunaliella* suşlarının ekstrem tuzluluk değerlerinde yaşayabilmeleri yoğun üretimlerinde kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Günümüzde Avustralya, İsrail, Çin ve Hindistan gibi ülkeler *Dunaliella*’dan β -karoten üretimi yapmakta ve bu alanda yüksek ticari gelir elde etmektedir. *Dunaliella* tuzlu su arıtımı gibi biyoteknolojik proseslerde kullanılabilme potansiyeline sahiptir [1].

Dunaliella hücreleri çevresel koşullara bağlı olarak çok kolay şekil değiştirebilen ve genellikle ovoid, küresel, piriform veya fusiform formlardır. Hücre uzunlukları 5-25 μm arasında değişirken; genişlikleri 3-13 μm arasında değişmektedir. *Dunaliella*

hücreleri klorofil-a ve -b nin yanı sıra β -karoten, α -karoten, violaksantin, neoksantin, zeaksantin ve lutein gibi değerli karotenoit pigmentler üretebilmektedir [3]. Bu türler yüksek tuzlulukta yaşayabilmeleri sebebiyle bilinen en halotolerant ökaryotlar içerisinde yer almaktadır. *Dunaliella*'ların yüksek tuzluluğa adapte olabilmeleri hücre içi gliserol konsantrasyonlarını ayarlayabilmelerinden kaynaklanmaktadır. *Dunaliella* yüksek tuzluluğa maruz kaldığı zaman hücre içi gliserol miktarı %50'nin üzerine çıkar ve bu oran gerekli osmotik basıncın sağlanması için yeterlidir. Bu durumda gliserol, enzimleri hem inaktivasyon hem de inhibisyona karşı koruyan uyumlu bir çözücü madde olarak davranmaktadır [4].

Cryptophyceae sınıfında bulunan türler arasında tatlı suda yaşayanlar olduğu gibi deniz suyunda yaşayanlar da mevcuttur. Hücre şekilleri asimetrik yapıdadır ve çoğu tek loblu kloroplasttan oluşmaktadır. Hücre gövdesiyle yaklaşık olarak aynı uzunlukta olan 2 adet flagellaya sahiptirler [3]. Bu sınıf üyelerinin bazıları yüksek miktarda omega-3 yağ asitleri üretimi ile bilinmektedir. *Cryptophyceae* hücreleri kloroplast içerisinde tilakoidlerde klorofil-a, klorofil-b ve fikobiliproteinler içermektedir. Temel karotenoit olarak α -karoten üretmektedirler [4]. Bazı üyelerinin yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi üretiminden dolayı denizel ve tatlı su besin zincirinde önemli rolleri vardır [5].

Tetraselmis sp. hücreleri oval şekillidir. Hücrelerinin tepe noktasındaki çukurda 4 adet flagellaları bulunur [4]. Mikroalg türleri içerisinde *Tetraselmis*'in biyodizel üretiminde kullanılma potansiyeli mevcuttur [3]. *Tetraselmis* sp. su ürünleri yetiştiriciliğinde gıda maddesi olarak kullanılmaktadır [6]. *Tetraselmis* sp. karides larvaları için mükemmel bir besin kaynağı olmakla birlikte, denizel canlılarda beslenmeyi uyaran doğal amino asitler içermektedir. Tuzlu su karideslerinin beslenmeleri için de uygun bir boyuta sahiptir. İstiridye ve midyenin büyüme oranlarını arttıran, ayrıca Zoea sendromuyla savaşılan iyi bir yem kaynağıdır [7]. Bir çok *Tetraselmis* türü besleyici özelliği ve basit kültür koşullarından dolayı akuakültür sektöründe öneme sahiptir. Besleyici özelliklerinden dolayı larva veya rotifer yemi olarak kullanılmalarının yanında, yüksek oranda lipid içeriklerinden dolayı biyoyakıt üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahiptirler [8].

Bu tez çalışması Türk karasularında izole edilmiş halotolerant/ halofilik mikroalg suşlarının biyoteknolojide kullanım potansiyellerini belirlemeyi hedeflemiştir. Bu doğrultuda Tübitak 114Z274 no'lu proje kapsamında İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan

izole edilmiş 19 mikroalg suşu genetik olarak karakterize edilmiştir. Bu suşlardan genetik farklılığa sahip ve pigmentasyon farkı gösteren 9 tanesi pigment üretimleri, protein, karbohidrat ve yağ asidi içerikleri açısından daha detaylı incelenmiştir. Dokuz mikroalgden 7 tanesi *Dunaliella* cinsine aittir. Bir mikroalg suşu *Tetraselmis* cinsine aitken, diğeri cins bazında tanımlanamayan bir *Cryptophyceae* üyesidir.



2. LİTERATÜR

Karotenoitler tüm fotosentetik organizmalar ve bazı fotosentetik olmayan fungi ve bakteriler tarafından sentezlenebilen lipofilik isoprenoidler. C₄₀ atomu merkezinde, konjuge çift bağlardan oluşan polien zinciri formunda 8 isopropen biriminden oluşmaktadırlar. Yapılarındaki konjuge çift bağların sayısı karotenoitlerde yeşilden kırmızıya renk değişimini sağlar. Yediyüz elliden fazla karotenoit çeşidi doğal kaynaklardan elde edilebilmektedir [9].

Karotenitlerin birincil görevleri fotosentetik organizmalarda ışığı absorbe etmeye yardımcı pigment olarak görev almaları ve fotooksidasyonun zararlı etkilerinden hücreyi korumalarıdır. Karotenoitlerin singlet oksijeni yakalayıcı katalitik özellikleri vardır. Son yıllarda karotenoitlerin kanser ve diğer dejeneratif hastalıklar üzerinde önleyici etkisinin olması olasılığı karotenoitlere olan ilgiyi arttırmıştır. Bu hastalıklar yaşlanma ile ilgili olan primer dejeneratif hastalıklardan kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, beyin disfonksiyonu, artrit ve katarakttır. Epidemiyolojik araştırmalar yeşil ve sarı sebzelerin tüketiminin kanser oluşum insidansının azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Beslenmede meyve ve sebzelerin iyi tüketilmesi kanser oluşumunu azaltmaktadır. Araştırmalar yaşam beklentisinin DNA, protein ve lipidlerin oksidatif hasarına bağlı olduğunu göstermektedir. Karotenoitler ve diğer doğal antioksidanlar oksidatif hasarı engellemektedir [10].

Karotenoitler insan ve hayvan beslenmesinde büyük öneme sahiptirler ancak insanlar ve hayvanlar bu karotenoitleri kendileri sentezleyemezler, bu nedenle beslenmelerinde dışarıdan hazır olarak almak zorundadırlar. Karotenoitler kimyasal yapılarından kaynaklı iki temel gruba ayrılırlar: karotenler (örneğin β -karoten), ksantofiller (örneğin lutein). Karotenler arasında β -karoten vitamin A'nın temel kaynağı olup retina fonksiyonu için gerekli olduğu gibi, bir çok dokunun fonksiyonel etkisi için de gerekli bir antioksidandır. β -karoten antioksidan özelliği ile deriyi güneş ışınları etkisiyle meydana gelen yaşlanmadan korur [11]. Ayrıca yapılan çalışmalarda β -karotenin hayvanlarda ve insanlarda deri kanseri, pankreas kanseri,

meme kanserlerinde tümör oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür. β -karoten kolesterol kontrolündeki etkisi ile kardiyovasküler hastalık riskini azaltıcı etkiye sahiptir. β -karoten sebzeler, meyveler, mikroalgler, *Blakeslea* mantarından doğal olarak elde edilebilir.

Yüksek tuzlulukta bulunan *Dunaliella* sp. hücreleri fotosentez ile yapısına kattığı CO_2 'in %80'ini gliserolün yapısına katmaktadır. Gliserol hücrenin osmotik basıncını dengeleyerek yüksek tuzlu ortama hücrelerin adapte olmasını sağlamaktadır. Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada %16'lık NaCl ortamında bulunan *Dunaliella* sp. hücrelerinin kuru ağırlıklarının %82'sinin gliserol olduğu belirlenmiştir. Düşük tuzluluklarda oksijenlenmiş karotenoitler olan keto-karotenoitler mevcut iken, yüksek tuzluluklarda oksijenlenmiş karotenoitlerin üretimi durmaktadır ve β -karoten üretimi artmaktadır [12]. β -karoten sentetik olarak sentezlenebilmektedir, hatta bu proses β -karoteni mikroalg gibi doğal kaynaklardan elde etmeden çok daha kolay ve hızlıdır. Ancak sentetik olarak üretilen β -karoten yalnızca trans-izomer formunda iken *Dunaliella*' dan sentezlenen β -karotende trans-izomer ve 9-cis-izomer formu birlikte yer almaktadır. *Dunaliella*'dan üretilen β -karoten ilk kez Japonya'da insanlarda kullanılması amacıyla satışa sunulmuştur. Dünyadaki toplam β -karoten marketi 270 milyon dolara ulaşmıştır ve bunun %20-30' unu doğal β -karoten oluşturmaktadır [1].

2010 yılında hesaplanan verilere göre kimyasal olarak sentezlenen karotenoitler ile birlikte toplam karotenoit piyasasının 1,2 milyar ABD doları olduğu tespit edilmiştir. Mikroalglerden elde edilen β -karoten ve astaksantin bu karotenoitler içerisinde en temel doğal ürünler oldukları görülmektedir. Mikroalglerden β -karoten üretimi 1980'lerde 4 şirket tarafından başlatılmıştır. Bu şirketler İsrail'de Nature Beta Teknoloji, Avustralya'da Western Biyoteknoloji ve Betatene Biyoteknoloji ile Amerika'da Nutralite Biyoteknolojidir. İsrail tesisinin sahibi olan Nikken Shohonsa Co tarafından ve Avustralya tesislerinin sahibi BASF tarafından β - karoten üretimi devam etmektedir. Hindistan ve Çin'de az miktarda da olsa, *Dunaliella*' dan β -karoten üretimi devam etmektedir [1].

Dunaliella sp.'lerden halofilik ve karotegenik olanlar karotenoitler içinde en fazla β -karoten üretmektedirler. Loeblich ve arkadaşları (1982) yaptıkları çalışmada *Dunaliella salina* kuru ağırlığının yaklaşık %5'inin β -karoten'den oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasında kullanılan *Dunaliella salina* suşlarının 20 pg/

hücre ve üzeri β -karoten üretme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir [12]. Çeşitli *Dunaliella* türleri karşılaştırıldığında *Dunaliella pseudosalina* suşlarının *Dunaliella salina* ve *Dunaliella parva* suşlarından daha büyük olduğu ve diğer iki türde bulunmayan kantaksantini daha yoğun ürettiği belirlenmiştir [13]. Borowitzka ve arkadaşlarının (1990) yaptıkları çalışmada *Dunaliella salina* suşlarında maksimum karotenoit üretimi yüksek tuzluluk (%5 NaCl) içeren ortamda gözlenmiştir, bununla birlikte hücrelerin karotenoit oluşturma hızının ışığa bağımlı bir proses olduğu Ben-Amotz ve Avron (1989) tarafından belirtilmiştir [13]. Yapılan çalışmada türlerin maksimum düzeyde karotenoit oluşturabilmesi için yüksek ışık şiddetine ($>500 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) maruz kalmaları ya da daha fazla süre (hafta) düşük ışık şiddetine ($<200 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) maruz kalması gerektiği sonucuna varılmıştır [2].

Loeblich'in (1982) yaptığı çalışmada *Dunaliella* hücrelerinin 17800 lux ışık şiddetinde, %10 NaCl içeren ortamda hücre başına 23 pg karotenoit ürettiği gözlenmiştir. Hücre başına üretilen klorofil-a ve klorofil-b miktarlarının da ışık yoğunluğu 9100 lux olana kadar ışık yoğunluğuyla orantılı bir şekilde arttığı, ancak bu değerden sonra ışık yoğunluğu artsa da klorofil-a ve klorofil-b miktarlarının değişmediği gözlenmiştir. Klorofil/karotenoit oranı düşük ışık (2700 lux) yoğunluğunda daha yüksek iken, yüksek ışık yoğunluğunda (17800) bu oranın azaldığı görülmüştür [12].

Neil ve arkadaşlarının (1992) yaptığı çalışma gün ışığının karotenoitlerin yapısını bozabileceğini öne sürmüşlerdir. Işığa maruz kalan karotenoitler cis-izomer formundan trans-izomer formuna dönüşmektedir, bu nedenle bu tez çalışmasında da karotenoitlerin ekstraksiyonu loş ışık altında örneklerin ışığa direkt temasından kaçınılarak yapılmıştır [14].

Borowitzka (2007) *Dunaliella* türlerinin kültür koşullarının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalar sonucunda *Dunaliella* suşlarının kültür ortamındaki optimum tuz konsantrasyonlarının %2 ile 4% NaCl arasında değişebileceği, ancak halofilik türlerin optimum tuz konsantrasyonunun %6 ve daha fazla olabileceği belirlenmiştir. *Dunaliella* türleri içerisinde *D. parva*, *D. pseudosalina*, *D. salina*'nın kültür içerisinde zamanla renkleri kırmızı ve turuncuya dönmektedir. *Dunaliella asymetrica*, *D. peircei* ve *D. turcomanica* ise yeşil renkte kalmaktadırlar [2].

Borowitzka (1991) yaptığı çalışmada *Dunaliella salina*'nın kimyasal içeriğini belirlenmiş ve hücre kuru ağırlığının %40'ının gliserol, %5'inin ise β -karotenolduğunu gözlemlemiştir [15].

Proteinler mikroalglerde biyokütlenin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Mikroalgler yüksek protein içeriklerinden dolayı besin kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Örneğin *Spirulina* protein içeriği yüksek ve ticari olarak üretilen besin kaynaklarından [16]. *Dunaliella bardawil* ile yapılan bir çalışmada büyüme ortamındaki nitrat, sülfat ve fosfat miktarlarının biyokimyasal içeriğe etkisi araştırılmıştır. Nitrat eksikliğinin hücrenin protein içeriğini azalttığını, karbohidrat içeriği ve β -karoten/klorofil oranını ise arttırdığını gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte hücre biyokütlesinde ve gliserol içeriğinde bir farklılık gözlenmemiştir. Sülfat ve fosfat eksikliğinin karbohidrat, protein, β -karoten ve hücre biyokütle miktarının artmasına neden olduğu ancak gliserol miktarında bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Nitrat eksikliğinde hücre büyüme hızı ve hücre yapılarının normal olduğu, ancak fosfat ve sülfat eksikliğinde hücre büyüme hızının azaldığı ve yüksek hacimli kültürde durağan faz hücrelerinin olduğu görülmüştür [17].

Mikroalglerin bir başka biyoteknolojik ürünü yağ asitleridir. Bu yağ asitlerinden en önemlileri omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerinden dokosaheksaenoik asit (DHA) ve eikosapentaenoik asit (EPA)'dır. DHA nörolojik dokularda yaygın olarak bulunan yağ asitlerindendir. DHA kalp kası dokusunda ve sperm hücrelerinde bulunurken, insan beyninin total yağ asidinin de %25' ini oluşturmaktadır. İnsanlar DHA yağ asidi sentezleyemediklerinden dolayı dışarıdan hazır almak zorundadırlar. Balık ve balık yağı ürünleri DHA ve EPA bakımından zengindirler, ancak bununla birlikte balıkta ve balık yağlarında biriken ağır metaller bir risk unsurudur. Ayrıca balık stoklarının da tükeniyor olması bu yağ asitlerinin doğal olarak elde edilebileceği başka kaynak arayışlarını artırmıştır. Balıklardaki omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin kaynağı da mikroalgler olduğu için yağ asidi eldesi konusunda mikroalgler önemli doğal kaynaklar olarak görülmektedir [18].

Denizel mikroalgler içerdikleri yüksek oranda yenilenebilir biyoaktif çoklu doymamış yağ asitleri sayesinde (PUFA) çeşitli hastalıkların önlenmesinde kullanılma potansiyeline sahiptir. Çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) n-3 PUFA'lar, örneğin α -linolenik asit (ALA), eikosapentaenoik asit (EPA), dokosapentaenoik asit (DPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) kardiyovasküler

hastalıklar, astım, kanser, tip-2 diyabet , cilt hastalıkları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [19].

Birçok denizel canlının 20:5 (n-3) (EPA) ve 22:6 (n-3) (DHA) gibi çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) sentezleyebilme yetenekleri yoktur. Bu yağ asitleri mikroalgler tarafından sentezlenebilmektedir. Bazı canlılar bu yağ asitlerine gereksinim duymazlar ancak bu yağ asitlerinin istiridye ve karideslerin beslenmelerine eklenmesiyle bu canlıların büyüme hızları ve larvalarının yaşam oranlarının büyük oranda arttığı görülmektedir. Mikroalglerde yağ asidi kompozisyonları ve oranlarını ışık yoğunluğu, sıcaklık, nutrient kompozisyonu, karanlık ve aydınlık evre süreleri gibi birçok parametre etkilemektedir [20].

Araşidonik asit (AA), eikosapentaneoikasit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) çoklu doymamış yağ asitlerindendir. Bahsi geçen yağ asitlerinin birçok nörolojik ve farmasötik uygulamaları bulunmaktadır. EPA ve DHA'lar ateroskleroz, kanser, romatoid artrit, sedef hastalığı ve Alzheimer gibi yaşlanma ile alakalı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar. AA ve DHA'ların özellikle beyin ve kan damarları için önemi büyüktür; beyin ve retina gelişimi için de önemlidirler. Yaraların iyileşmesi ve embriyonik gelişmede etkisi olan prostaglandin, prostasiklin ve lökotrien gibi eikosanoidler PUFA'lardan sentezlenmektedir[21].

Günlük PUFA ve DHA kaynakları olarak deniz balıkları kullanılmaktadır. 2003 yılında küresel su ürünleri yetiştiriciliği üretimi 547 milyon ton olmuştur ve bu miktar yılda yaklaşık olarak %9 oranında büyümektedir. Balık azalan bir kaynaktır ve genişleyen bir piyasanın taleplerini karşılamak için balık stoklarının sürekli olarak kullanılmasıyla ilgili ciddi çevresel sonuçlar vardır. Balıklar ayrıca yapılarında kirleticileri de biriktirirler. Balıklardan ekstrakte edilen yağlar kötü kokuya sahiptirler ve triağılglicerollerindeki spesifik yağ asitlerinin oranının kontrol edilmesi zordur. Balıklardaki PUFA'lar zooplankton ile beslendiklerinden besin zinciri yolu ile mikroalglerden gelmektedir [21].

Patil ve arkadaşlarının (2005) 12 mikrolag türüyle yaptığı çalışmada *Cyanophyceae* larda C16:1 ve C18:3 yağ asitlerinin yoğun olarak sentezlendiğini tespit etmiştir. *Tetraselmis suecica*'da ise yoğun olarak sentezlenen yağ asitlerinin C16:0, C18:1, C18:3 x3, C18:4 x6 and C20:5 olduğu görülmektedir. C16:0 ve C18:1 yağ asitleri yeşil alglerde sentezlenen total yağ asitlerinin %50'sini oluşturmaktadır. Günümüze

kadar yapılan çalışmalar doğrultusunda tüm mikroalglerde C16:0 yağ asidinin temel yağ asidi olduğu söylenebilir. *Phaeodactylum tricornutum*'da ise temel yağ asidinin C14:0 olduğu görülmektedir. Patil ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada denizel alglerin temel olarak PUFA (EPA ve DHA) rettikleri görülürken, tatlı suda yetişen alglerin yoğun olarak doymuş ve doymamış yağ asitlerini ürettikleri görülmektedir [21].



3. MATERYAL VE METOD

3.1 Genomik DNA İzolasyonu

Türlerin genomik DNA izolasyonları Promega'nın Wizard Genomic DNA Purification Kit'i (Promega, Madison, Wisconsin, ABD) ile yapılmıştır. Deney prosedürü kitte belirtildiği üzere oluşturulmuştur. 2 ml kültür ependorf tüpe alınmış ve 14000xg'de 10 dk santrifüj edilerek hücreler hasat edilmiştir. Altı yüz µl Nuclei Lysis Solution eklenmiş ve tüpler 1-3 saniye vortekslenmiştir. Ardından örnekler 65 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Her bir tüpe 3 µl RNase solüsyonu eklenmiş ve tüpler aşağı yukarı çalkalanmıştır. Enzimin çalışması için örnekler 37 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Devam etmeden önce 5 dakika örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Tüplere 200 µl Protein Precipitation Solution eklenmiş ve yüksek hızda 20 saniye vortekslenmiştir. Örnekler 16000xg de 3 dk santrifüjlenmiştir. DNA içeren süpernatant dikkatli bir şekilde, pelete dokunmadan, oda sıcaklığında 600 µl izopropanol içeren başka bir tüpe alınmış ve tüp iyice karıştırılmıştır. Örnekler 16000xg'de oda sıcaklığında 1 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Oda sıcaklığında 600 µl %70 etanol eklenmiş ve tüpler birkaç defa çalkalanarak DNA'nın yıkanması sağlanmıştır. Örnekler 16.000xg'de oda sıcaklığında 1 dk santrifüjlenmiş ve DNA'nın çökmesi sağlanmıştır. Etanol pipet yardımı ile DNA peletinden uzaklaştırılmış ve ardından 15 dakika kadar etanolün uçması beklenmiştir. Son olarak 100 µl steril ultra saf su eklenmiş ve DNA 65 °C de 1 saat inkübe edilerek çözündürülmüştür. Hazır olan DNA - 20 °C'de saklanmıştır [22].

3.1.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve filogenetik analizler

Tez çalışmasında kullanılan mikroalg suş ve türlerinin doğru tanımlamasını yapmak için bu suşların rRNA büyük alt ünite (LSU rRNA) gen dizileri belirlenmiştir. Bu doğrultuda her suş ve türden izole edilen genomik DNA'lar ve bu gen bölgesini çoğaltacak primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerler 114Z274 no'lu TÜBİTAK projesinde geliştirilen LSUalgF ve

LSUalgR primerleridir. PZR reaksiyonları bir BioRad T100 thermal cyclers kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR deney prosedürü aşağıdaki gibidir;

1x Karışım

- 10 X Taq Buffer = 2.5 µl (Thermo #EP0402)
- 2.5 mM MgCl₂ = 2.5 µl
- 10 mM dNTP = 0.5 µl
- İleri primer = 0.2 µl (10 µM stok)
- Geri primer = 0.2 µl (10 µM stok)
- Taq polimeraz = 0.25 µl (1 U)
- Steril Ultrasaf Su = 17.85 µl
- Genomik DNA = 1 µl

Optimal PZR döngüsü 95 °C’de 3 dk, 30 döngü: 95 °C’de 30 s, 60 °C’de 30 s, 72 °C’de 1 dk, son çoğaltma 72 °C’de 5 dk olarak belirlenmiştir.

Elde edilen PZR ürünleri %1.5’luk agaroz içeren TBE solüsyonu içinde yürütülmüş; doğru boyuttaki PZR ürünleri Promega Gel Extraction Kit (Promega, Madison, Wisconsin, ABD) ile jelden saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PZR ürünleri PZR’de kullanılan primerler ile çift yönlü olarak hizmet alımı yoluyla dizilenmiştir. Gen dizileri Mega 6 yazılımı ile görüntülenmiş ve aynı yazılımda elle düzeltilmiştir (Tamura vd 2013). Düzeltme yapılırken Chromas ve CodonCode Aligner yazılımlarında yer alan kalite skorlarından da yararlanılmıştır. Tez çalışmasındaki suşların rRNA LSU gen dizilerinin yakın ve uzak akraba gen dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri bankasından BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ile elde edilmiştir.

Tüm gen dizileri Mega 6 yazılımında yer alan Muscle ile hizalanmıştır. Hizalama dosyası kullanılarak Yanına-Birleştirme (Neighbor Joining-NJ) ve Maksimum Olabilirlik (Maximum Likelihood-ML) ağaçları oluşturulmuştur. NJ ağacı 2000 yeniden örnekleme (bootstrapping) ile maksimum kompozit olabilirlik yöntemi ile oluşturulmuştur. ML yönteminde kullanılacak en uygun nükleotit değişim modeli Mega 6 yazılımında yer alan model seçme yazılımı ile belirlenmiştir [23]. ML ağaçları bu model kullanılarak 2000 yeniden örnekleme ile oluşturulmuştur.

3.2 Mikroalg Büyüme Deneyleri

Bazı *Dunaliella* türlerinde stres koşullarında karotenoit üretimi artmaktadır. Yüksek ışık yoğunluğu bu stres koşullarından bir tanesidir. Bu doğrultuda genetik farklılıklara sahip ve kültürlerinde farklı renklere sahip 6 *Dunaliella* suşu yüksek ve düşük ışık deneylerine tabii tutulmuştur. Düşük ışık yoğunlukları LED lambaların üzerinin gözenekli perdeler ile kaplanması ile elde edilmiştir. Düzenekteki ışık yoğunlukları bir Li-Cor LI-190SA kuantum sensörü (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) ile ölçülmüş ve ayarlanmıştır. Bu denemelerde *Dunaliella* sp. AQUAMEB-2, -4, -10, -14, 16 ve -21 suşları kullanılmıştır. Bu suşlara LED lambalar ile yüksek ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ve düşük ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ışık yoğunluğunun verildiği bir deney düzeneği oluşturulmuştur (Şekil 3.1). Her suş, yüksek ve düşük ışık yoğunluklarında, 24 ± 1 °C’de üç tekrarlı olarak 36 gün boyunca büyütülmüştür. *Dunaliella* suşlarının büyümesi 3 günde bir alınan kültür örneklerinin optik yoğunluklarının (OD 750 nm) ölçülmesi ile izlenmiştir. İlave olarak her tekrardan 0, 12, 24 ve 36. günlerde total karotenoit ve klorofil ölçümleri için 10 mL örnek alınmıştır. Pigment örnekleri 4 °C’de, 4500 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiş (Beckman Allegra, X30R, Beckman Coulter, CA, USA) ve peletler analizlere kadar – 20 °C’de saklanmıştır. Denemelerde kullanılan suşlar ve kültür ortamı tuzlulukları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Işık denemelerinde kullanılan *Dunaliella* suşları ve kültür ortamı tuzlulukları. PES, Plymouth Erdschreiber kültür ortamı

Dunaliella suşları	Kültür ortamı tuzluluğu
<i>Dunaliella viridis</i> AQUAMEB-2	160 ppt PES
<i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-4	60 ppt PES
<i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-10	160 ppt PES
<i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-14	160 ppt PES
<i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB-16	165 ppt PES
<i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB 21	120 ppt PES

3.3 *Dunaliella* Suşlarında Total Karotenoit Miktarı Analizleri

Karotenoitler iki gruba ayrılmaktadır. İlk grup oksijen içermeyen karotenoitler iken ikinci grup ise oksijen içeren ksantofillerdir (Ör: Hidroksi ve epoksi grubu içeren formlar).



Şekil 3.1 : *Dunaliella* suşlarının yüksek ve düşük ışık yoğunluğunda kültürünü sağlayan deney düzeneği

Toplam karotenoid miktarı (ksantofil+ β -karoten) total pigment ekstraktından hesaplanabilmektedir. Bu hesaplamada klorofil-a ve klorofil-b'nin maksimum absorbans verdiği dalga boylarındaki ölçümlerle birlikte karotenoidlerin iyi absorpsiyon verdiği 470 nm'de de ölçüm yapılır. 470 nm absorbans değerinde temel olarak karotenoidlerin absorpsiyonu gözlemlenirken, çok az miktarda klorofil-b ve klorofil-a'nın da absorpsiyonu gözlenmektedir. Bu sebeple total karotenoid miktarı hesaplamalarında klorofil-a ve klorofil-b derişimleri 470 nm ölçümlerinden belirli katsayılarla çarpıldıktan sonra çıkarılır [24].

Toplam karotenoit ölçümlerinde, büyüme deneyleri sırasında alınan ve karotenoit ölçümleri için ayrılarak -20 °C’de saklanan örnekler kullanılmıştır. Çözücü olarak saf aseton kullanılmış ve deney sırasında örnekler soğukta buz üzerinde bekletilmiştir. Ekstraksiyondan sonra süpernantant ölçüm yapılmak üzere ayrılmıştır ve formülde belirtilen absorbans değerlerinde spektrofometrede (VWR UV-1600PC Spektrofotometre) ölçüm yapılmıştır. Ölçülen absorbans değerlerindeki miktarlar formülde yerlerine konularak total karotenoit miktarları hesaplanmıştır. Son olarak hesaplanan karotenoit miktarları aynı gündeki optik yoğunluk değerlerine bölünerek birim biyomas başına düşen total karotenoit miktarları elde edilmiştir. Total karotenoit miktarı hesaplamalarında kullanılan formül aşağıdaki gibidir;

$$C_a = 11.24 \times A_{661.6} - 2.04 \times A_{644.8} \quad (3.2)$$

$$C_b = 20.13 \times A_{644.8} - 4.19 \times A_{661.6} \quad (3.3)$$

$$C_{a+b} = 7.05 \times A_{661.6} - 18.09 \times A_{644.8} \quad (3.4)$$

$$C_{x+c} = 1000 \times A_{470} - 1.90 \times C_a - 63.14 \times C_b \quad (3.5)$$

Denklem 3.2, 3.3, 3.4, 3.5’de görüleceği üzere C_a , klorofil a konsantrasyonunu ($\mu\text{g/mL}$), C_b , klorofil b konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$), $C_{(x+b)}$, total karotenoit konsantrasyonunu ($\mu\text{g/mL}$) gösterir [25] .

3.4 Mikroalg Suşlarında Protein Miktarı Ölçümleri

Protein ve karbonhidrat analizleri için tezde kullanılan suş ve türler, hacimleri kademeli olarak artırılarak, dört aylık bir süreçte 1 L’lik hacme ulaştırılmıştır. Yeterli hacme ulaşan kültürler 4000 x g’de 10 dk santrifüjlenerek hasat edilmiş, liyofilize edilerek -20 °C’de saklanmıştır. Protein miktarı hesaplanırken yaygın olarak kullanılan bir yöntem olan Lowry yöntemi kullanılmıştır. Lowry yöntemi Biuret reaksiyonları temeline dayanır. Bu reaksiyonunun temel prensibi proteindeki peptit bağlarının bazik koşullarda bakır ile reaksiyonu sonucu Cu^+ iyonunun üretilmesidir. Üretilen Cu^+ iyonu ise Folin–Ciocalteu reaksiyonunda folin ile tepkimeye girmektedir. Biuret reaksiyonu sonucunda, proteinlerde triptofan ve tirozin yoğunluğuna bağlı olarak güçlü bir mavi renk oluşur. Bu yöntem 0.01 mg protein/mL’ye kadar duyarlı olmakla birlikte, optimum ölçüm aralığı 0.01–1.0 mg/mL protein olarak belirlenmiştir [26].

Tez çalışmasında inkubasyon süresi, sıcaklığı ve asit konsantrasyonu gibi parametreler daha önce yapılmış olan makalelerden faydalanarak belirlenmiş ve deney planı oluşturulmuştur [27].

3.4.1 Mikroalglerden protein ekstraksiyonu

Çalışmada 1 mg liyofilize edilmiş mikroalg örneğine 40 µl %24 TCA (trikloroasetik asit) eklenmiş ve kuru blok ısıtıcıda 95 °C’de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 120 µl ultra saf su eklenerek TCA konsantrasyonu %6’ya seyreltilmiştir. Ardından örnek 15.000xg +4 °C’de 20 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelete 0.1 mL Lowry reaktif D ilave edilmiştir. Lowry reaktif D günlük olarak hazırlanmıştır ve içeriğinde 48:1:1 oranında Reaktif A, Reaktif B ve Reaktif C bulunur. Reaktif A: 0.1 N NaOH içinde %2 (w/v) Na₂CO₃; Reaktif B : %1 (w/v) NaK tartrat tetrahidrat; Reaktif C : % 0.5 (w/v) CuSO₄.5H₂O. Lowry reaktif D ilave edilmiş numuneler 55 °C de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler 15000 x g’de 20 dk santrifüjlenmiş (oda sıcaklığı) (Microfuge, Beckman Coulter, CA, USA) ve süpernatant ayrılmıştır. Elde edilen protein özütü (süpernatant) ölçümlere kadar -20 °C’de saklanmıştır [28].

3.4.2 Mikroalglerde protein miktar tayini

İki N Folin-Ciocalteu fenol reaktifi 1:1 oranında ultra saf su ile sayretilip günlük olarak taze bir şekilde hazırlanmıştır. On µl’ye kadar protein özütüne 190 µl Lowry reaktif D eklenmiş ve karıştırılmıştır. Örnek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından örneğe 20 µl Folin-Ciocalteu fenol reaktifi eklenmiş ve 30 dk oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 600 nm’de ölçüm yapılmıştır. Protein miktar tayini için kalibrasyon eğrisi BSA (sığır serum albumini) kullanılarak oluşturulmuştur. Standart ile oluşturulan grafik yardımıyla örneklerin protein miktarları hesaplanmıştır [28].

3.5 Mikroalglerde Karbonhidrat Miktar Tayini

Karbonhidrat miktar tayininde fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır. Karbonhidrat analizi için önerilen bir çok yöntem arasından fenol-sülfürik asit yöntemi güvenilir ve basit olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır [29].

Fenol-sülfürik asit yöntemi fenol varlığında konsantre sülfürik asidin kullanılmasını içerir. Karbonhidratlar güçlü asit varlığında furfuraldehid ya da furfuraldehidin homologlarını oluştururlar. Karbonhidratların bu türevleri aromatik fenoller ile polimerizasyon ya da yoğunlaşma ile renkli bileşikler üretirler [30].

Liyofilize edilmiş mikroalg örnekleri derişimleri 1 mg/mL olacak şekilde ultra saf su ile sulandırılmıştır. Bir mL, derişimi 0.5 mg/mL olan örneğe, 3 mL konsantre sülfürik asit eklenmiş ve 30 sn vortekslenmiştir. Ardından 1 mL %5'lik fenol ilave edilmiş; örnekler vorteksleme sonrası su banyosunda 90 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından oda sıcaklığına gelen örneklerin 490 nm'de ölçümü yapılmıştır [31]. Karbonhidrat miktar tayininde kalibrasyon eğrisi oluşturmak için D-glukoz kullanılmıştır. Oluşturulan standart grafiğinden faydalanılarak örneklerin karbonhidrat miktarı hesaplanmıştır [32].

3.6 Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile β -Karoten Analizi

Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizleri için ticari olarak satın alınan β -karoten standardı (Sigma-Aldrich, 22040) kullanılmıştır. Standart, derişimi 1 mg/mL olacak şekilde kloroform içerisinde çözdürerek hazırlanmıştır.

Stok β -karoten standardı kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla aseton ile seyreltilerek çeşitli derişimlerde hazırlanmıştır. Liyofilize edilmiş *Dunaliella* örneklerinin pigment özütlemesi için 10:90 oranında aseton:metanol kullanılmıştır. Derişimi bilinen özütler 0.22 μ m filtrelerden geçirilerek analiz için hazır hale getirilmiştir.

HPLC analizi C18 analitik kolon ZORBAX ODS (boyut: 4.6x150 mm, partikül boyutu: 5 mikron; Agilent, CA, ABD) ile yapılmıştır. DAD detektör ile 440 nm'de ölçüm yapılmıştır [33]. Mobil faz olarak 40:60 oranında aseton: metanol kullanılmıştır. Analiz 1mL/dk akış hızında izokratik olarak gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 μ l'dir. Standart ile oluşturulan grafik yardımıyla örneklerdeki β -karoten miktarları hesaplanmıştır [34].

3.7 Yağ Asidi Analizi

Liyofilize örnekler temel yağ asitlerinin belirlenmesi amacıyla GC-FID analizi için Yeni Zelanda, Cawthron Enstitüsü'ne gönderilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Filogenetik Analizler

4.1.1 AQUAMEB *Dunaliella* suşlarının rRNA büyük alt ünite (LSU) genine dayalı karakterizasyonları

Bu tez çalışmasında kullanılan *Dunaliella* suşlarının tür tanımlamalarını yapmak, birbirleriyle ve dünyadaki benzerleriyle genetik ilişkilerini incelemek için rRNA büyük alt ünite gen dizileri belirlenmiştir. Oluşturulan ML filogenetik ağacında 4 temel grup belirlenmiştir (Şekil 4.1). İlk grup 11 *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşunu, 3 adet *D. Salina* suşunu ve 1 adet *D. Tertiolecta* suşunu içermiştir. Ancak ilk grubun yeniden örnekleme yüzdeleri düşüktür, dolayısıyla grup üyeleri arasında ayırım yapmak mümkün olmamıştır. Birinci gruptaki *Dunaliella* suşlarının nükleotid benzerlikleri %98.3 ile %100 arasında bulunmuştur ve grup üyelerinin ortalama nükleotid benzerlikleri %99.2 olarak hesaplanmıştır (p uzaklığı: 0.00809). Borowitzka ve Siva (2007) UTEX 199 suşunun *D. salina* olması gerektiğini önermiştir. Bu gruptaki *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşları gerek genetik gerekse morfolojik özellikleri ile *D. salina* ile uyumludur.

Maksimum olabilirlik (ML) LSU ağacında ikinci grup, yüksek yeniden örnekleme yüzdesi ile, *Dunaliella* sp. AQUAMEB-6, -9, -8, -16 izolatları ile *D. viridis*, *D. peircei* ve *D. maritima* olarak tanımlanmış izolatlardan oluşmuştur (Şekil 4.1). *Dunaliella* sp. AQUAMEB-16 ve -8'in birbiriyle, *Dunaliella* sp. AQUAMEB-6 ve -9'un birbiriyle %100 rRNA büyük alt ünite gen dizisi benzerliğine sahip olduğu görülmüştür. Bunların komşuları olan *D. viridis*, *D. peircei* ve *D. maritima* da birbirleriyle %100 gen dizi benzerliğine sahiptir. İkinci grup üyelerinin karşılıklı LSU gen dizisi benzerlikleri %99'un üzerindedir.

Dunaliella viridis suşu CONC002-Gonzalez diğer *D. viridis* suşlarından ayrılmış ve üçüncü grupta kümelenmiştir. *Dunaliella* sp. AQUAMEB-2 suşu da bu grupta yer almıştır. Üçüncü grup taksonları yüksek yeniden örnekleme yüzdeleri ile diğer *Dunaliella* suşlarından ayrılmıştır. Bu grup üyeleri kendi içinde %99'un üzerinde

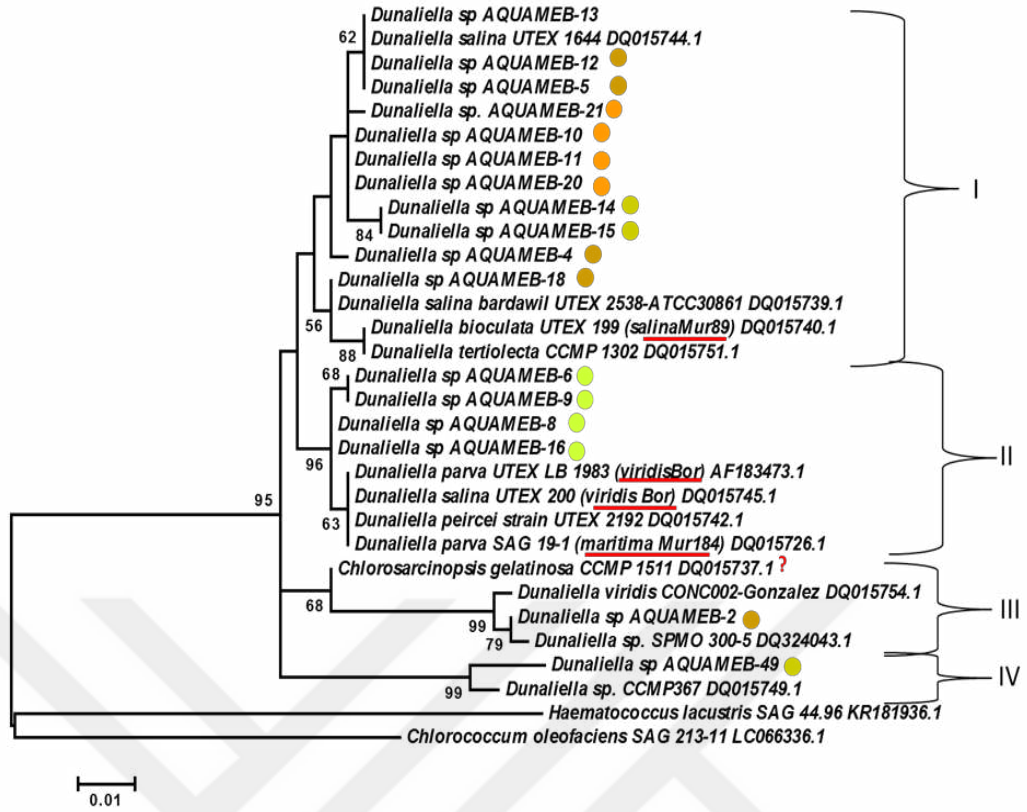
benzerlik göstermiş, ancak diğer gruplardaki *Dunaliella* suşlarından ayrılmıştır. Diğer taraftan dördüncü grup, %98 üstü benzerliğe sahip, *Dunaliella* sp. AQUAMEB-49 ile *Dunaliella* sp. CCMP 367 suşlarını içermiştir. Diğer *Dunaliella* suşlarına genetik uzaklıkları ve morfolojik özellikleri düşünüldüğünde, AQUAMEB-2 ve -49 suşları *D. viridis* benzeri olarak tanımlanabilir.

Şekil 4.1'deki filogenetik ağaç oluşturulmadan önce en uygun model Mega 6 yazılımında belirlenmiştir (Kimura-2 parametre modeli ve Gama dağılımı [+G= 0.2647]). Şekil en yüksek log olasılığa sahip ağacı göstermektedir (-1010.0079). Ağaç ölçekli çizilmiştir ve dal uzunlukları bölge başına baz değişimini göstermektedir. Analizde 31 dizi ve 351 baz pozisyonu kullanılmıştır. Analizde 1000 yeniden örnekleme (bootstrap) yapılmıştır. %50'nin altındaki yeniden örnekleme değerleri gösterilmemiştir. Tezde kullanılan *Dunaliella* suşları renkli şekillerle gösterilmiştir. Renkler suşların yaşlı kültürlerindeki pigmentasyonu temsil etmektedir. Kırmızı çizgili kısımlar Borowitzka ve Siva (2007)'nin önerdiği tür ismi değişiklikleridir. *Haemotococcus lacustris* ve *Chlorococcum oleofaciens* dış grup olarak kullanılmıştır. Gen bankasından alınan tüm suşlar için erişim kodları eklenmiştir.

4.1.2 AQUAMEB *Tetraselmis* ve Cryptophyceae suşlarının rRNA büyük alt ünite (LSU) genine dayalı karakterizasyonları

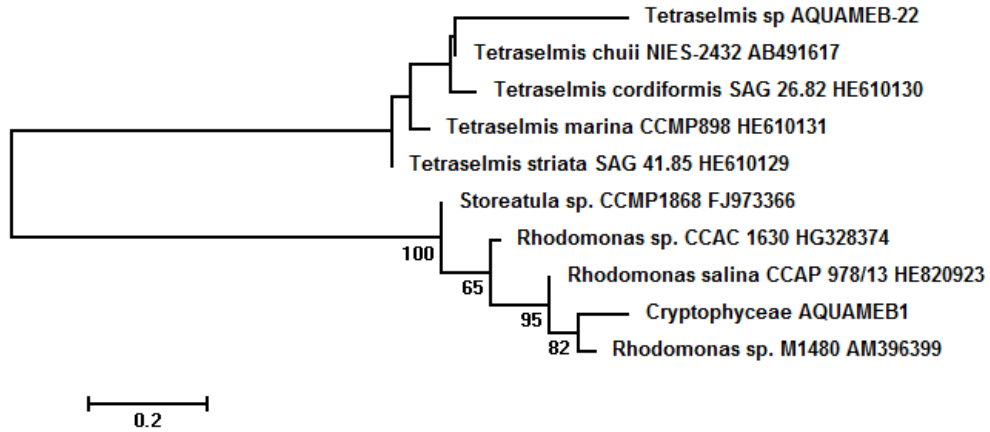
Tetraselmis sp. AQUAMEB-22 morfolojik olarak denizel *Tetraselmis* suşları ile benzerdir. Oluşturulan ML ağacında da denizel *Tetraselmis* suşlarına yakın yer almıştır (Şekil 4.2) ancak en yüksek benzerliği %77 ile *Tetraselmis* marina suşuna göstermiştir. Halofilik *Tetraselmis* suşlarına (Ör: *Tetraselmis* sp. GSL018) ait LSU gen dizileri gen veri bankalarında mevcut olmadığı için bu analize dahil edilememiştir. Şu aşamada, yeterli veri olmadığı için, bu suş *Tetraselmis* sp. olarak bırakılmıştır.

Cryptophyceae AQUAMEB-1 suşu BLAST sonucunda en yüksek benzerliği %90 benzerlik ile *Rhodomonas* sp. M1480 suşuna göstermiştir.



Şekil 4.1 : Tez çalışmasında kullanılan *Dunaliella* suşlarının rRNA büyük alt ünite genlerine dayalı Maksimum Olasılık (ML) ağacı.

Şekil 4.2'deki filogenetik ağaç oluşturulmadan önce en uygun model Mega 6 yazılımında belirlenmiştir (Kimura-2 parametre modeli ve Gama dağılımı ($[+G=0.8682]$). Şekil en yüksek log olasılığa sahip ağacı göstermektedir (-1731.9291). Ağaç ölçekli çizilmiştir ve dal uzunlukları bölge başına baz değişimini göstermektedir. Analizde 10 dizi ve 323 baz pozisyonu kullanılmıştır. Analizde 2000 yeniden örnekleme (bootstrap) yapılmıştır. %50'nin altındaki yeniden örnekleme değerleri gösterilmemiştir. Ağaçta kök kullanılmamıştır.

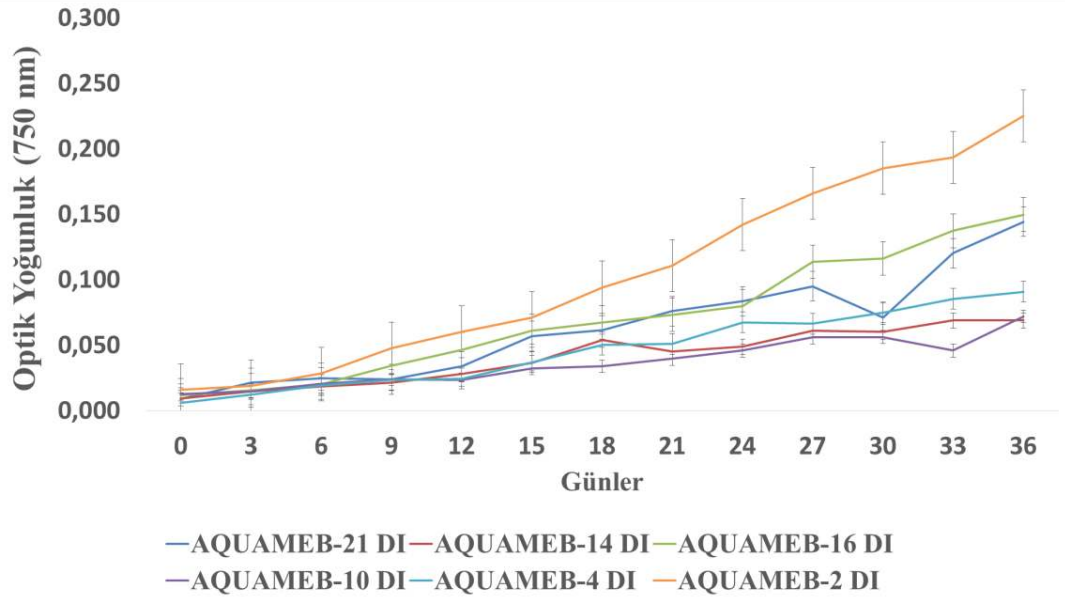


Şekil 4.2 : Tez çalışmasında kullanılan *Cryptophyceae* AQUAMEB-1 ve *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22 ile gen bankasından ağaca eklenen diğer suşların rRNA LSU geni Maksimum Olasılık (ML) ağacı.

4.2 *Dunaliella* sp. AQUAMEB Suşlarının Yüksek ve Düşük Işık Yoğunluklarında Büyüme Özellikleri

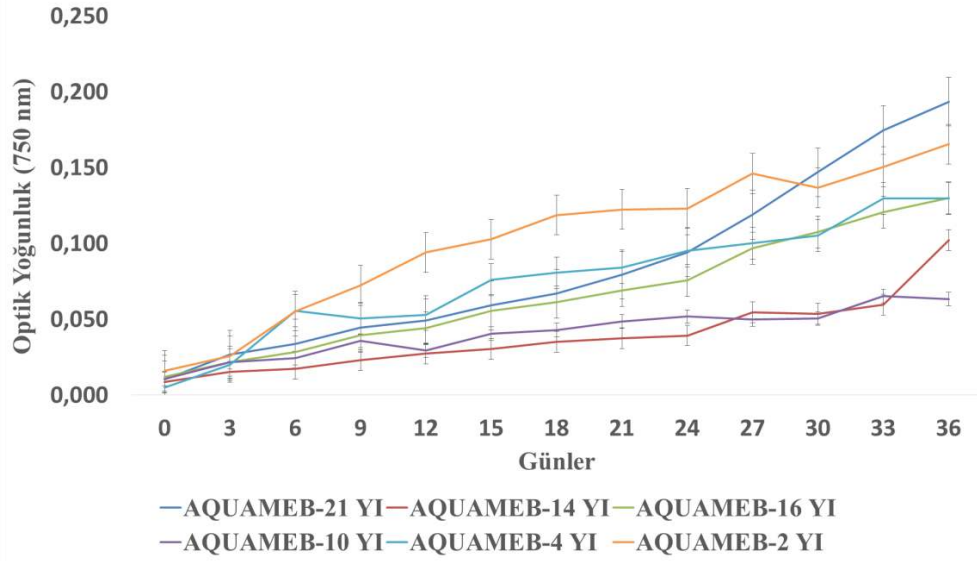
Genetik karakterizasyonu yapılan 15 *Dunaliella* AQUAMEB suşundan genetik ve pigment üretimi farklılığına sahip 6 tanesinin yüksek ve düşük ışık yoğunluklarında büyüme özellikleri incelenmiştir. Bu deney düzeneğinde yüksek ışık β -karoten üretimini tetiklemek için kullanılmış ve düşük ışık kültürleriyle kıyaslanmıştır.

Deneylere tabii tutulan kültürler, kültür koleksiyonunda bulundukları tuzluluklarda büyütülmüştür. Bu tuzluluklar bu suşların izole edildikleri ortamın tuzluluğunu yansıtmaktadır. Düşük ışık yoğunluğunda ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) büyütülen kültürlerde en iyi büyüme *D. viridis* AQUAMEB-2 suşunda görülmüştür. Bu suş 36 günlük kültür periyodu boyunca logaritmik artışını sürdürmüş ancak büyüme eğrisi düşük bir eğime sahip olmuştur. Ulaştığı maksimum optik yoğunluk 750 nm’de ortalama 0.225 olmuştur. Diğer taraftan *D. salina* AQUAMEB-16 ve -21, AQUAMEB-2’ye göre daha az büyümüş ve her iki suş da 750 nm’de ortalama maksimum 0.150 seviyelerine ulaşmıştır (Şekil 4.3).



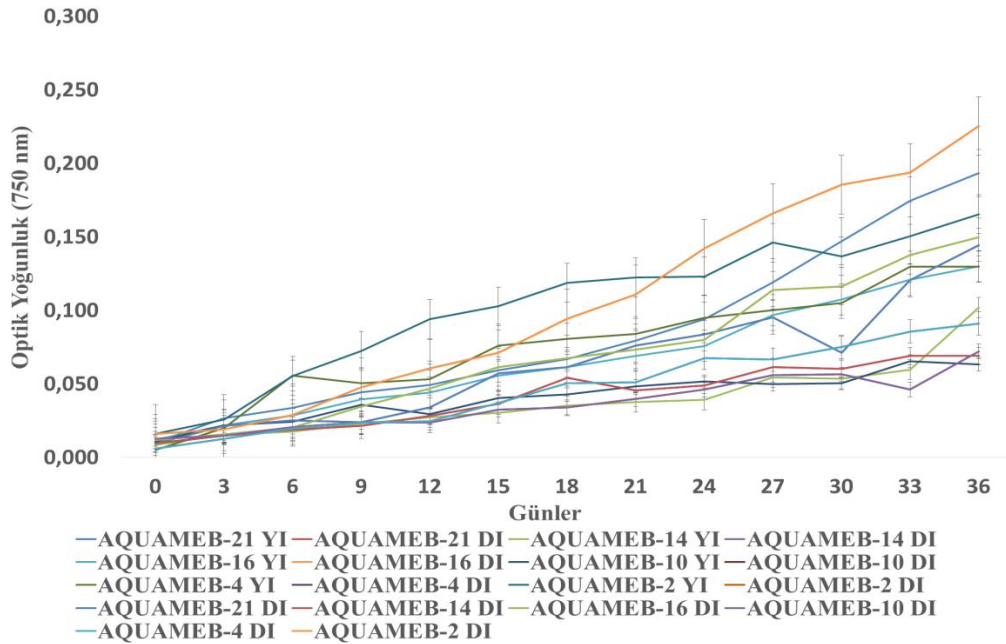
Şekil 4.3 : *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşlarının düşük ışık yoğunluğunda ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) büyüme eğrileri. Hata çubukları tekrarlar arasındaki varyansı gösteren standart hatayı göstermektedir. DI, düşük ışık.

Yüksek ışık yoğunluğunda ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) yetiştirilen kültürlerden en iyi büyüme *D. viridis* AQUAMEB-2 ve *D. salina* AQUAMEB-21’de görülmüştür (Şekil 4.4). Bunlardan AQUAMEB-2 suşu birinci haftadan sonra duraklama fazına girmeye başlamıştır. AQUAMEB-21 suşunun ise birinci aydan sonra duraklama fazına girmeye başladığı görülmektedir. Ancak her iki suşun büyüme eğrileri düşük bir eğime sahiptir. Bu suşlar 36 günlük kültür periyodu sonunda sırasıyla ortalama 0.165 ve 0.193 optik yoğunluk seviyelerine ulaşmıştır. *Dunaliella salina* AQUAMEB-4 ve *Dunaliella* sp. AQUAMEB-16 ise daha düşük bir büyümeyle ortalama 0.13 optik yoğunluk seviyelerine ulaşmıştır. Diğer suşlar çok az büyümüştür.



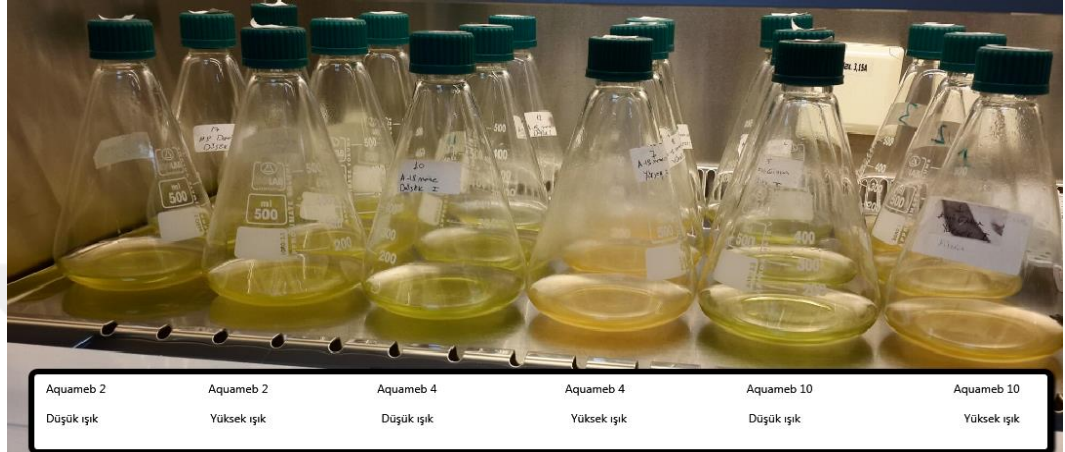
Şekil 4.4 : *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşlarının yüksek ışık yoğunluğunda ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) büyüme eğrileri. Hata çubukları tekrarlar arasındaki varyansı gösteren standart hatayı göstermektedir. YI, yüksek ışık.

Yüksek ve düşük ışık yoğunluğunda yetiştirilen kültürler beraber değerlendirildiğinde en iyi büyüme *D. viridis* AQUAMEB-2 suşunun düşük ışık kültürlerinde gözlenmiştir (Şekil 4.5). Bunu *D. salina* AQUAMEB-21'in yüksek ışık kültürü ve *D. viridis* AQUAMEB-2'nin yüksek ışık kültürü takip etmiştir.



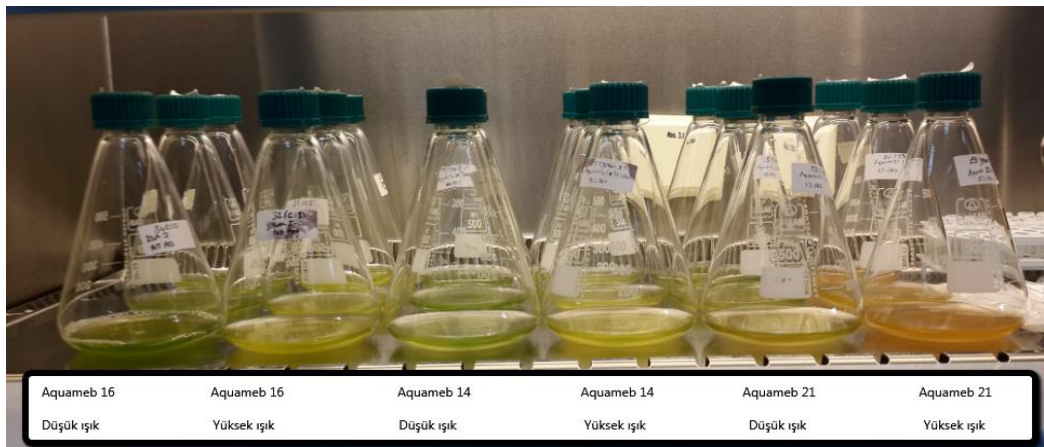
Şekil 4.5 : *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşlarının yüksek ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ve düşük ışık ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) yoğunluklarında büyüme eğrileri. Hata çubukları tekrarlar arasındaki varyansı gösteren standart hatayı göstermektedir. YI, yüksek ışık, DI, düşük ışık

Büyüme deneyleri sonucunda kültürlerin renk değişimleri incelendiğinde bazı suşların renklerinin yeşil olarak kaldığı gözlenmiş; bazı suşlarda ise karotenoit üretiminden kaynaklı kültürlerin turuncu renge döndüğü görülmüştür. *Dunaliella viridis* AQUAMEB-2, *D. salina* AQUAMEB-14 ve *Dunaliella* sp. AQUAMEB-16’ da yeşil renkli kültürlerin yüksek ışıktaki tekrarlarının renkleri hafif açılarak sarımsı yeşil olarak kalmışlardır (Şekil 4.6, 4.7).



Şekil 4.6 : *Dunaliella* sp. AQUAMEB-2, -4, ve -10 suşlarının 36 gün sonunda renk değişimleri.

Dunaliella salina AQUAMEB-4, AQUAMEB-10 ve AQUAMEB-21’in ise yüksek ışıktaki kültürlerinin renkleri turuncu olurken düşük ışıktaki kültürlerde renk değişimi gözlenmemiştir (Şekil 4.6-4.7). Bu veriler büyüme analiz verileri ile karşılaştırıldığında turuncu renkli olan türlerin aynı zamanda yüksek ışıktaki daha iyi büyüyen türler olduğu gözlenmiştir. Yeşil renkli olarak kalan türlerin ise düşük ışık şiddetinde daha iyi büyüme gösteren türler olduğu görülmüştür.



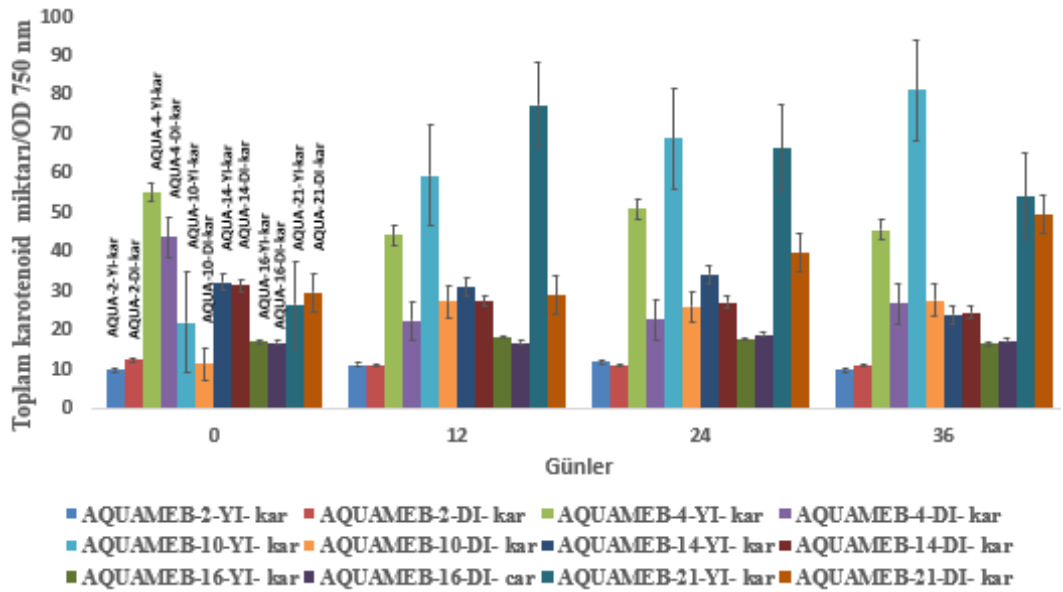
Şekil 4.7 : *Dunaliella* sp. AQUAMEB-16, -14, ve -21 suşlarının 36 gün sonunda renk değişimleri.

4.3 *Dunaliella* sp. AQUAMEB Suşlarının Yüksek ve Düşük ışık Yoğunluklarında Pigment Üretimleri

4.3.1 Total karotenoid, klorofil-a ve klorofil-b derişimlerinin spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi

Yüksek ve düşük ışık yoğunluklarında büyütülen *Dunaliella* suşlarından 0, 12, 24 ve 36. günlerde pigment miktarlarının belirlenmesi için örnekler alınmıştır. Toplam karotenoid, klorofil-a (chl-a) ve klorofil-b (chl-b) derişimleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Birim biyokütle başına toplam pigment derişiminin belirlenmesi için bu değerler örnek alınan andaki optik yoğunluk değerine bölünmüştür.

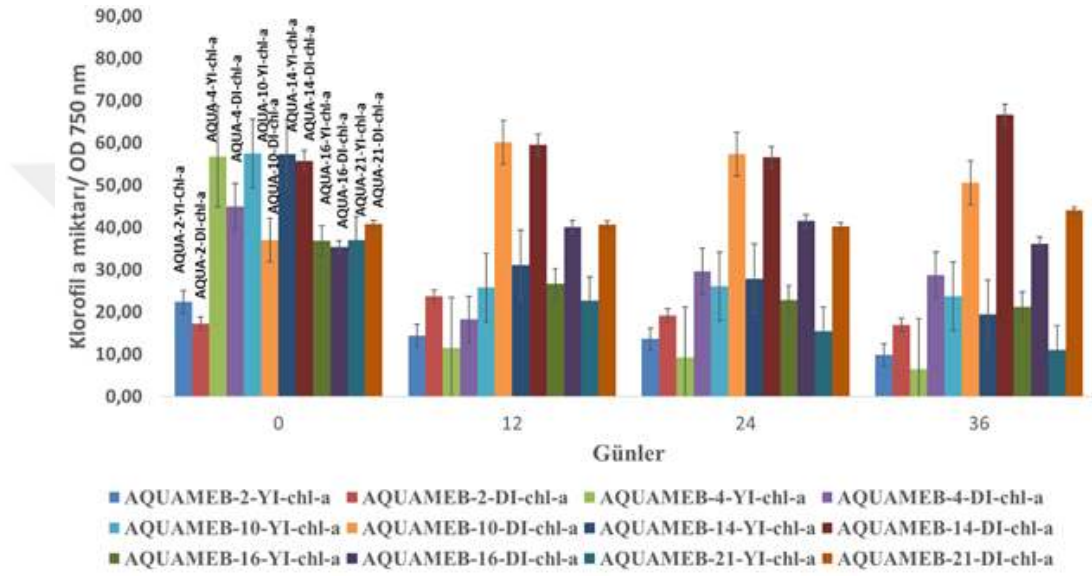
Deney başlangıcında en yüksek toplam karotenoid miktarına sahip kültürler, *D. salina* AQUAMEB-4 suşunun yüksek ve düşük ışık yoğunluğunda başlatılan kültürleri olmuştur (Şekil 4.8). *Dunaliella salina* AQUAMEB-14 ve AQUAMEB-21 suşlarının ise benzer ancak daha düşük seviyede toplam karotenoid miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. On ikinci günde, birim biyokütle başına en yüksek toplam karotenoid üretimi *Dunaliella salina* AQUAMEB-4, -10 ve -21'in yüksek ışık kültürlerinde görülmüştür. Benzer durum 24. ve 36. günlerde de görülmüş, ancak AQUAMEB-21 suşunun düşük ışık kültürlerinde birim biyokütle başına karotenoid üretimi de 24. günden itibaren artmaya başlamıştır.



Şekil 4.8 : *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşlarında yüksek ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ve düşük ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ışık yoğunluklarında toplam karotenoid üretimi. YI, yüksek ışık; DI, düşük ışık.

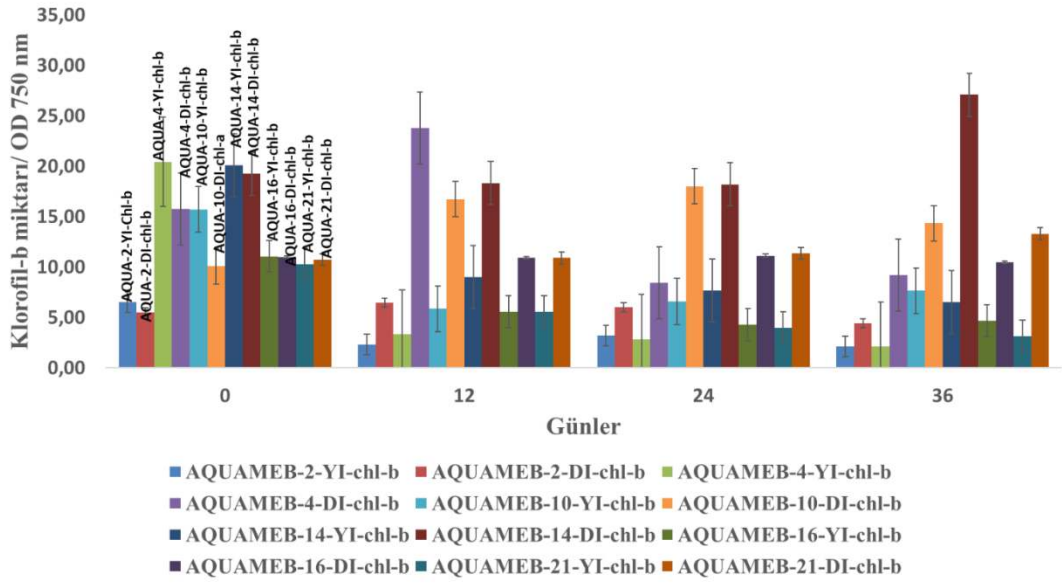
yüksek ışık; DI, düşük ışık. Kar, karotenoit. Hata çubukları, ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Deney başlangıcında tüm suşların klorofil-a miktarları birbirlerine yakındır ancak *D. viridis* AQUAMEB-2'nin klorofil-a içeriği diğer suşlardan farklı ve azdır (Şekil 4.9). On ikinci günden itibaren tüm *Dunaliella* suşlarının düşük ışıktaki tekrarlarının yüksek ışıktaki tekrarlarından daha fazla miktarda klorofil-a içerdiği görülmüştür. En yüksek klorofil-a içeriği ise *D. salina* AQUAMEB-10 ve -14 suşlarının düşük ışıktaki tekrarlarında görülmüştür.



Şekil 4.9 : *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşlarında yüksek ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ve düşük ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ışık yoğunluklarında klorofil-a miktarları. YI, yüksek ışık; DI, düşük ışık. Chl-a, klorofil-a. Hata çubukları, ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

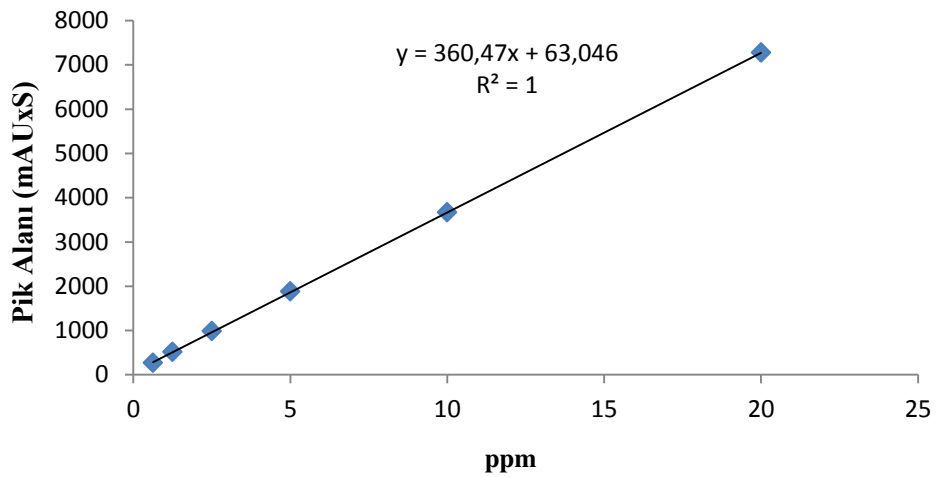
Deney başlangıcında en yüksek klorofil-b (chl-b) içeriği *Dunaliella salina* AQUAMEB-4 ve AQUAMEB-14'de görülürken, en düşük klorofil-b içeriği *Dunaliella viridis* AQUAMEB-2'de görülmüştür (Şekil 4.10) On ikinci günde ise en yüksek klorofil-b içeriği *Dunaliella salina* AQUAMEB-4'ün düşük ışık kültüründe görülmüş; bunu AQUAMEB-10 ve -14'ün düşük ışık kültürleri izlemiştir. Takip eden örneklemelerde (24. ve 36. günler) AQUAMEB-4'ün düşük ışık kültüründeki klorofil-b miktarında azalma gözlenirken, AQUAMEB-10 ve -14'ün düşük ışık kültürlerinde yüksek chl-b üretimi devam etmiştir.



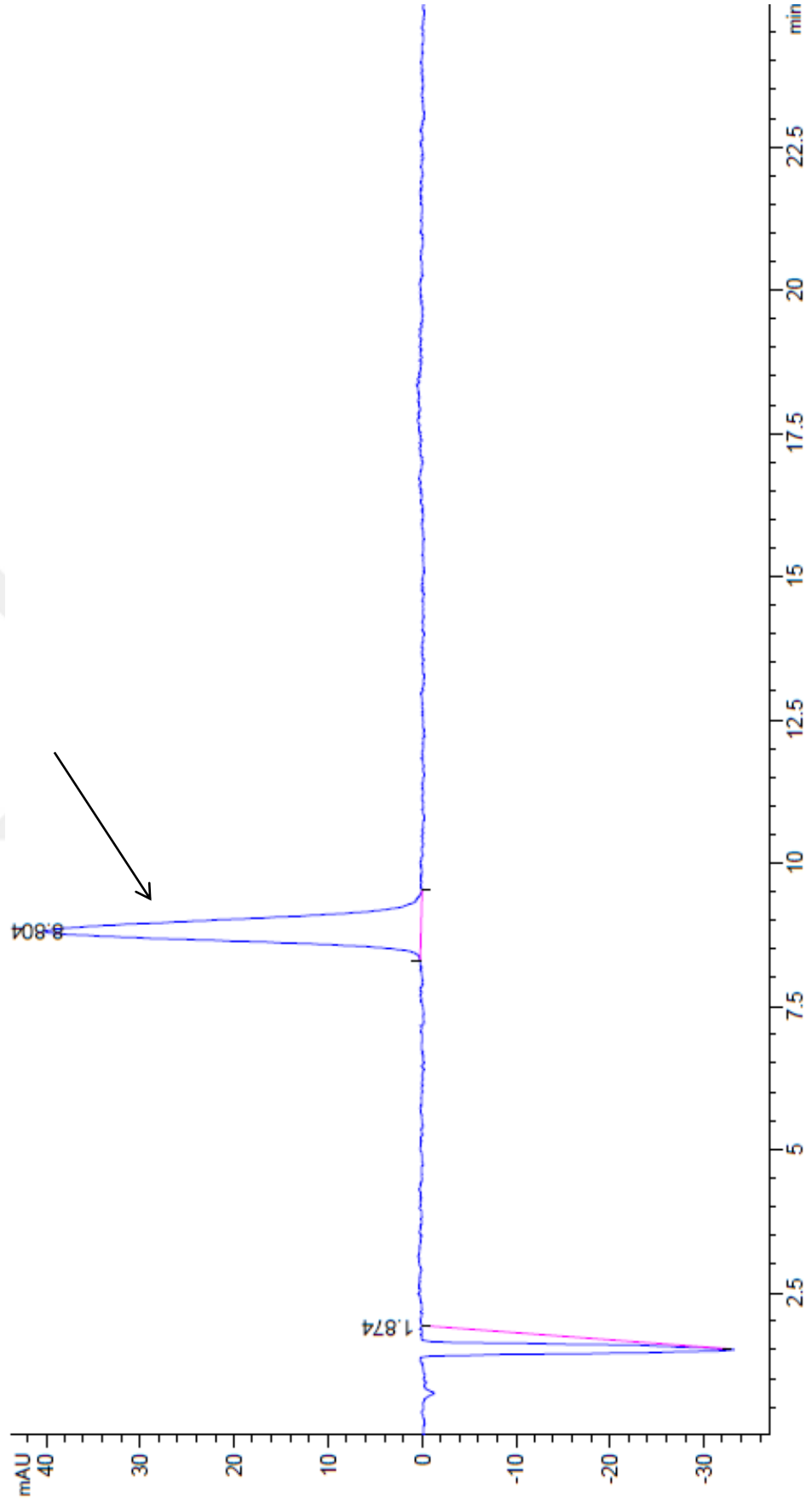
Şekil 4.10: *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşlarında yüksek ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ve düşük ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ışık yoğunluklarında klorofil-b miktarları. YI, yüksek ışık; DI, düşük ışık. Chl-b, klorofil-b. Hata çubukları, ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

4.3.2 *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşlarının β -Karoten üretimlerinin yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmesi

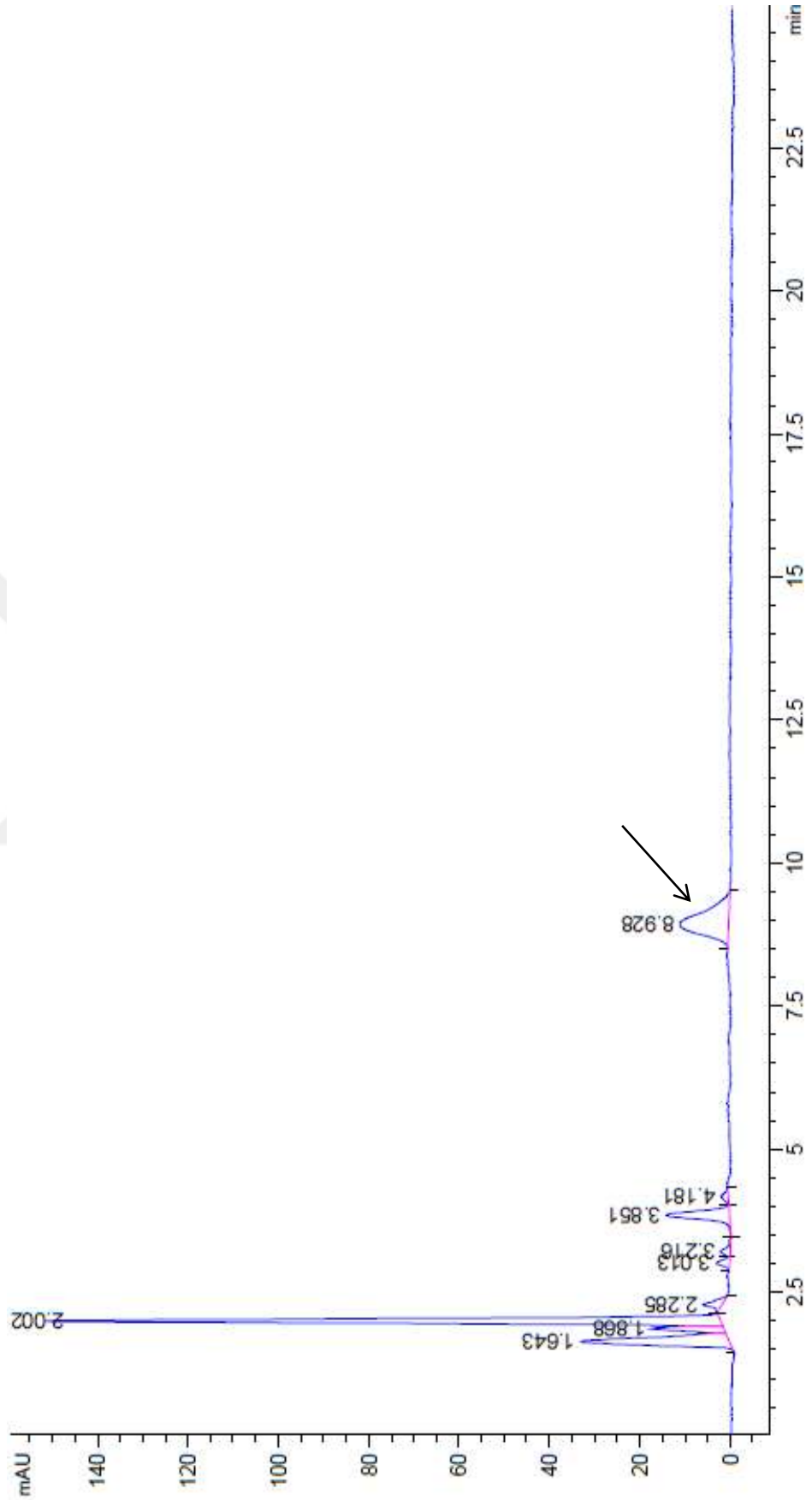
Yüksek ışık yoğunluğunda ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) kültürü yapılan suşların 36. gününde toplanan alt-örnekler dondurulmuş, sonrasında liyofilize edilmiştir. Bu örneklerde kuru ağırlıkta β -Karoten miktarları yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Örneklerdeki β -Karoten miktarları oluşturulan β -Karoten standardı ile belirlenmiştir (Şekil 4.11)



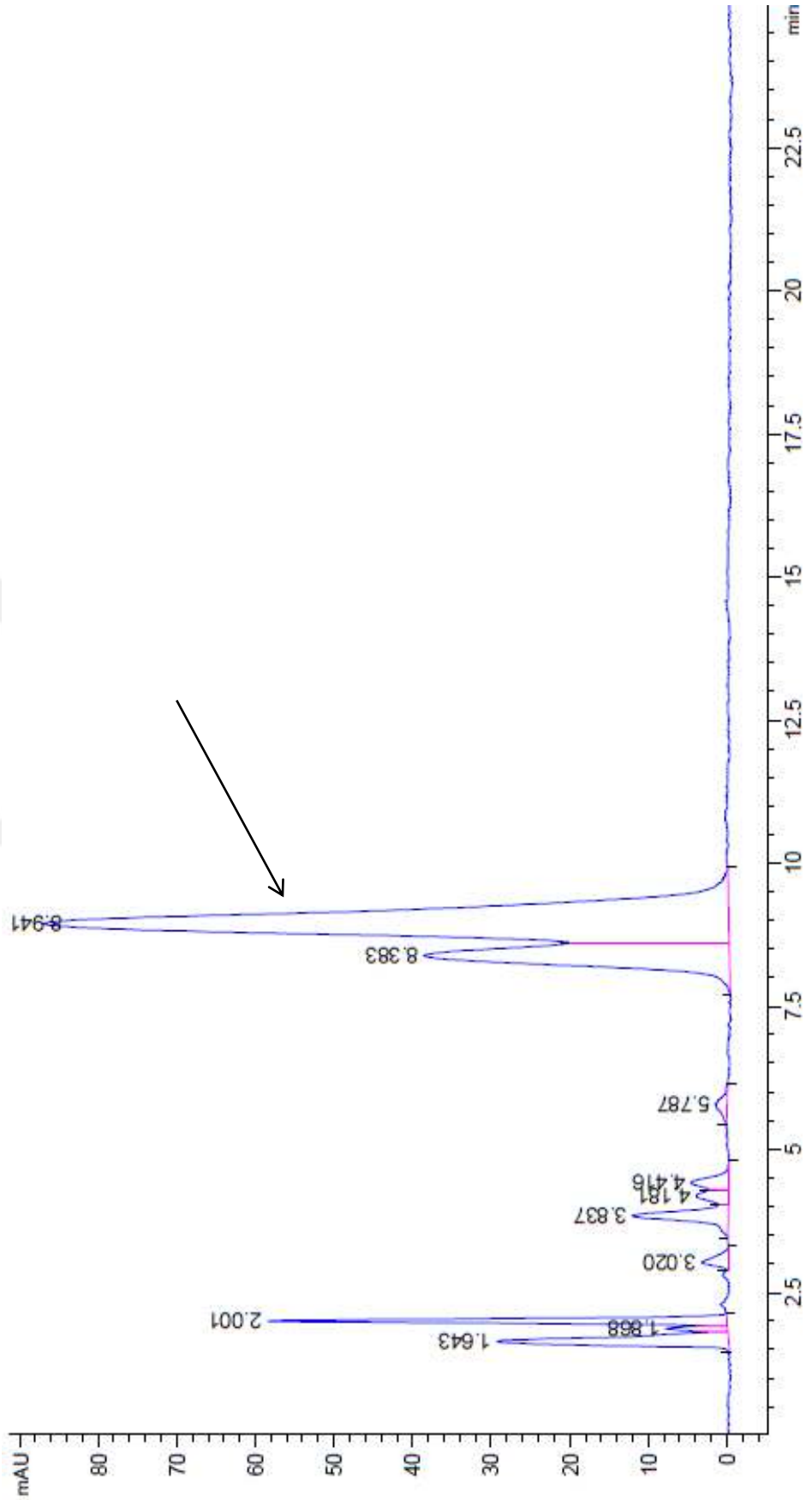
Şekil 4.11 : Yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) analizinde β -Karoten standardı ile oluşturulan eğri.



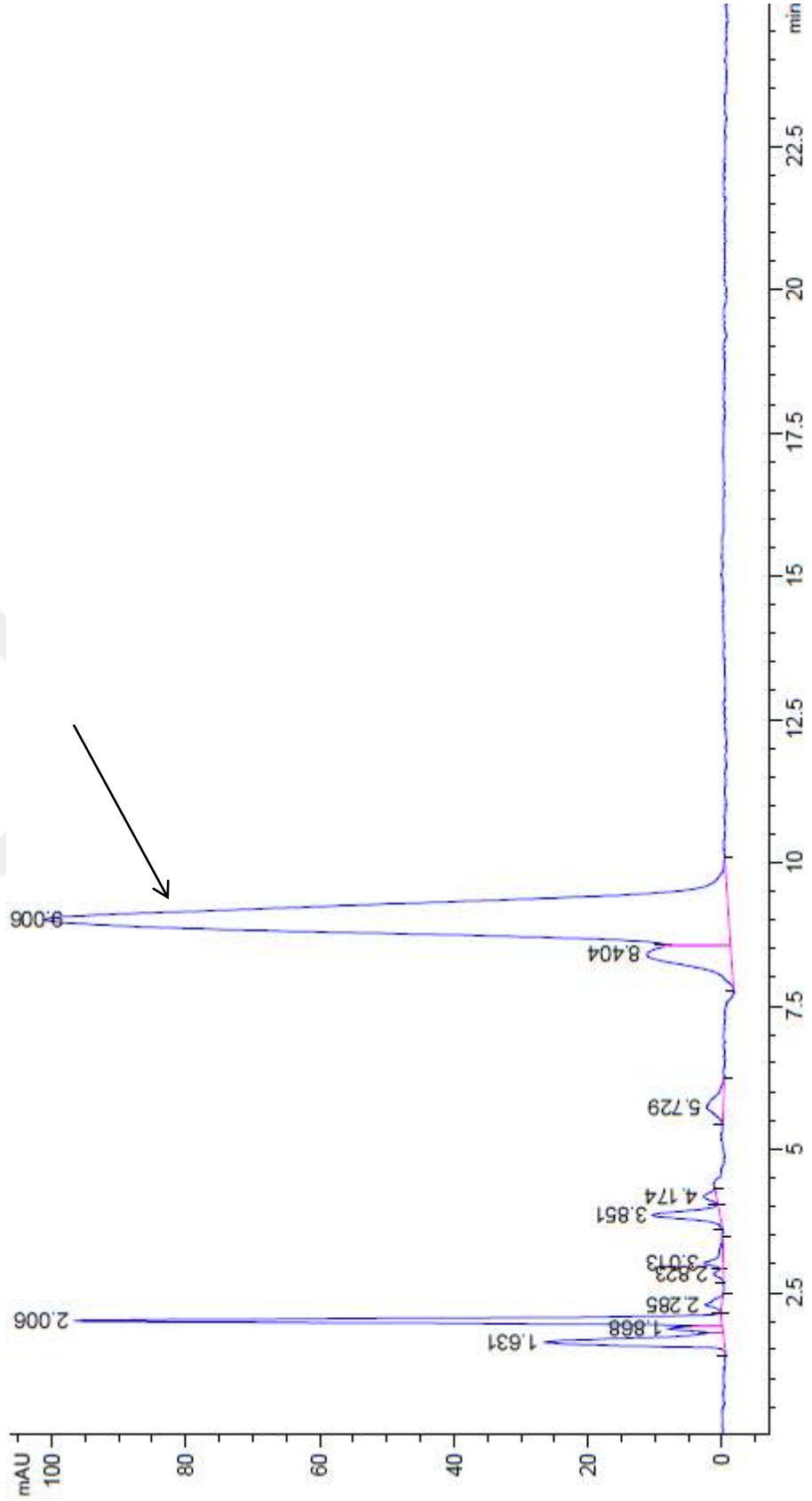
Şekil 4.12 : β -Karoten standardı (2,5 ppm) HPLC Kromatogramı. Ok β -Karoten pikini göstermektedir.



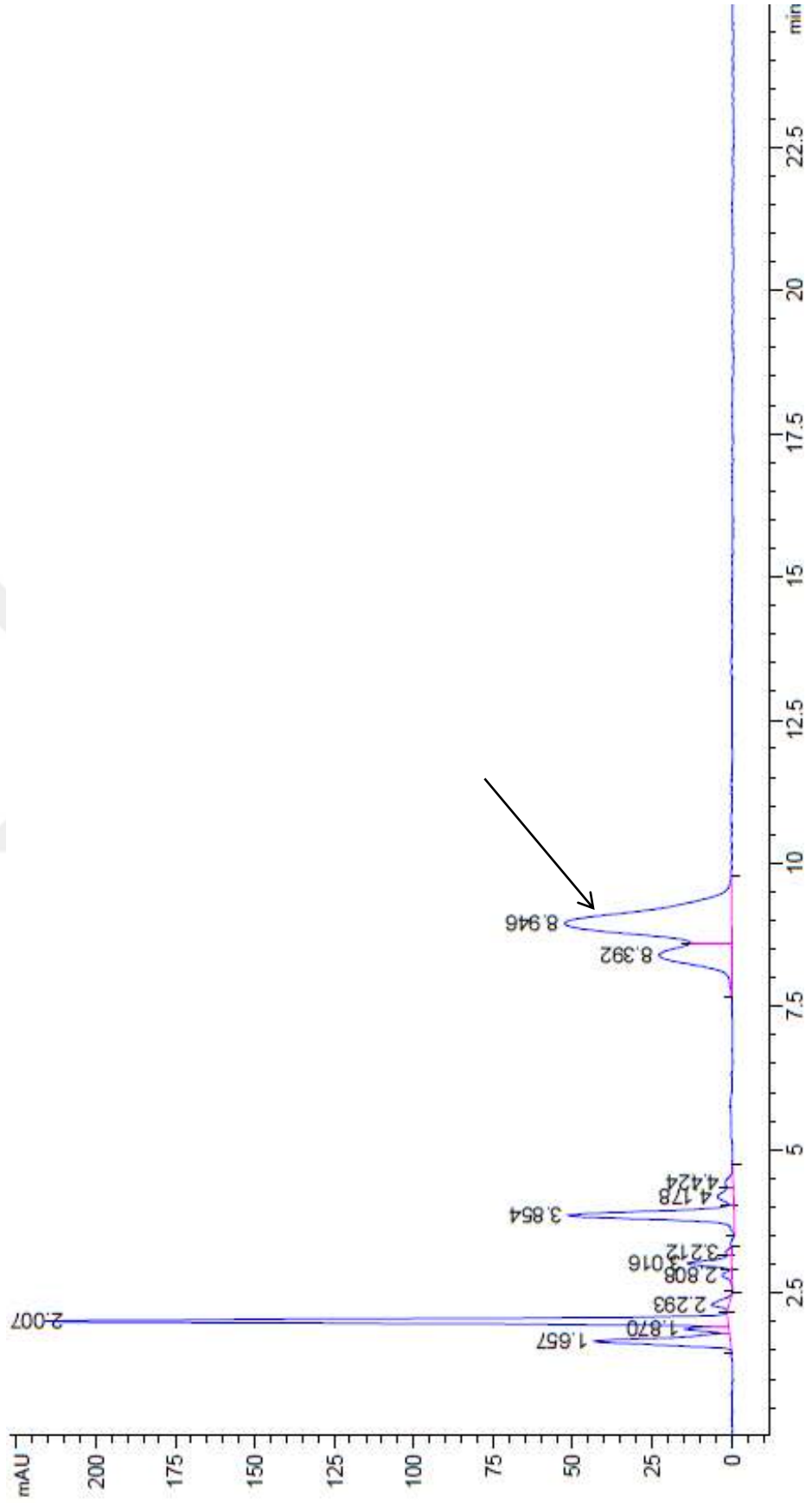
Şekil 4.13 : *Dunaliella viridis* AQUAMEB-2 özütü HPLC Kromatogramı. Ok β -karoten pikini göstermektedir.



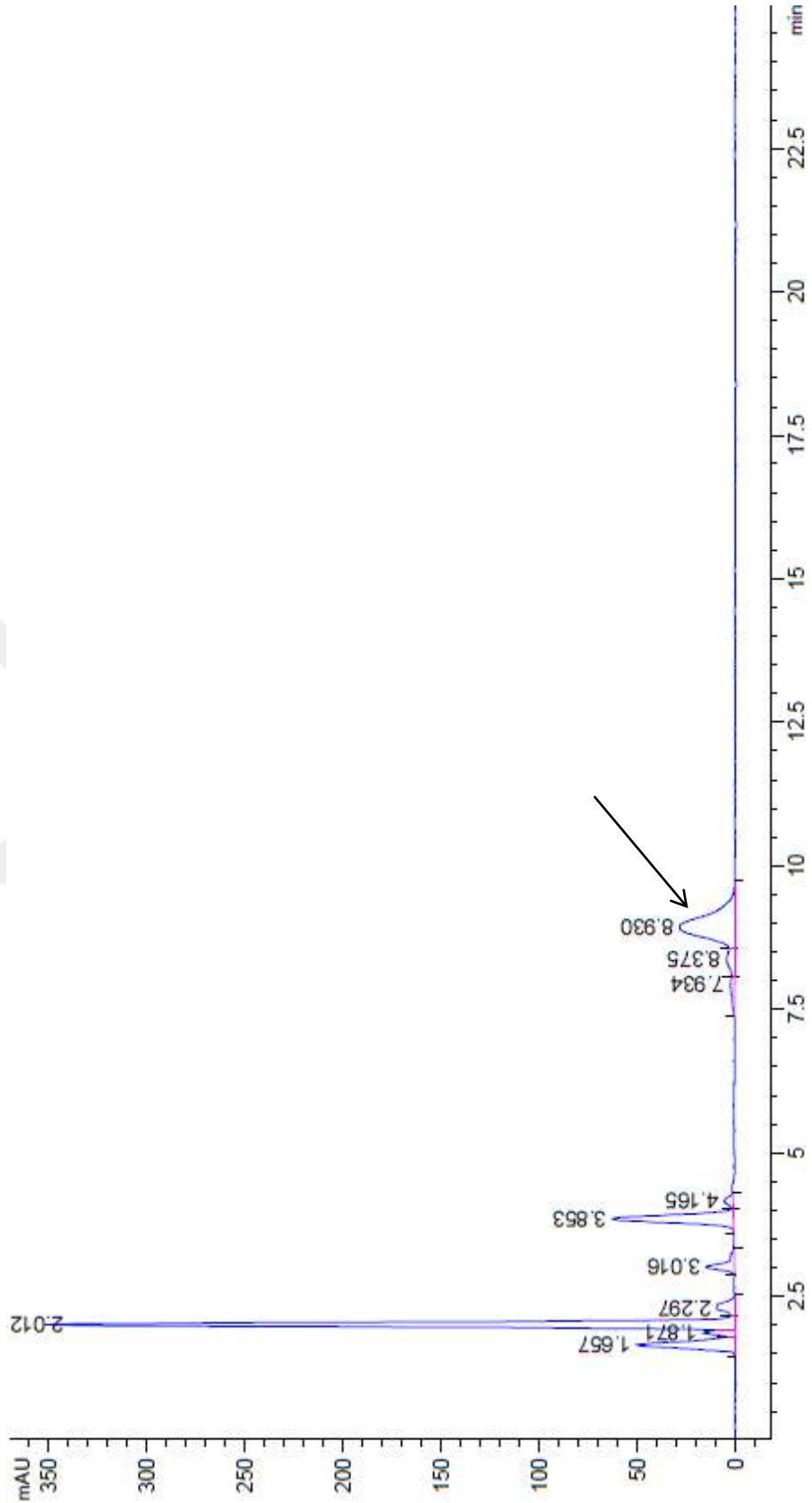
Şekil 4.14 : *Dunaleilla salina* AQUAMEB-4 HPLC kromatogramı. Ok β -karoten pikini göstermektedir.



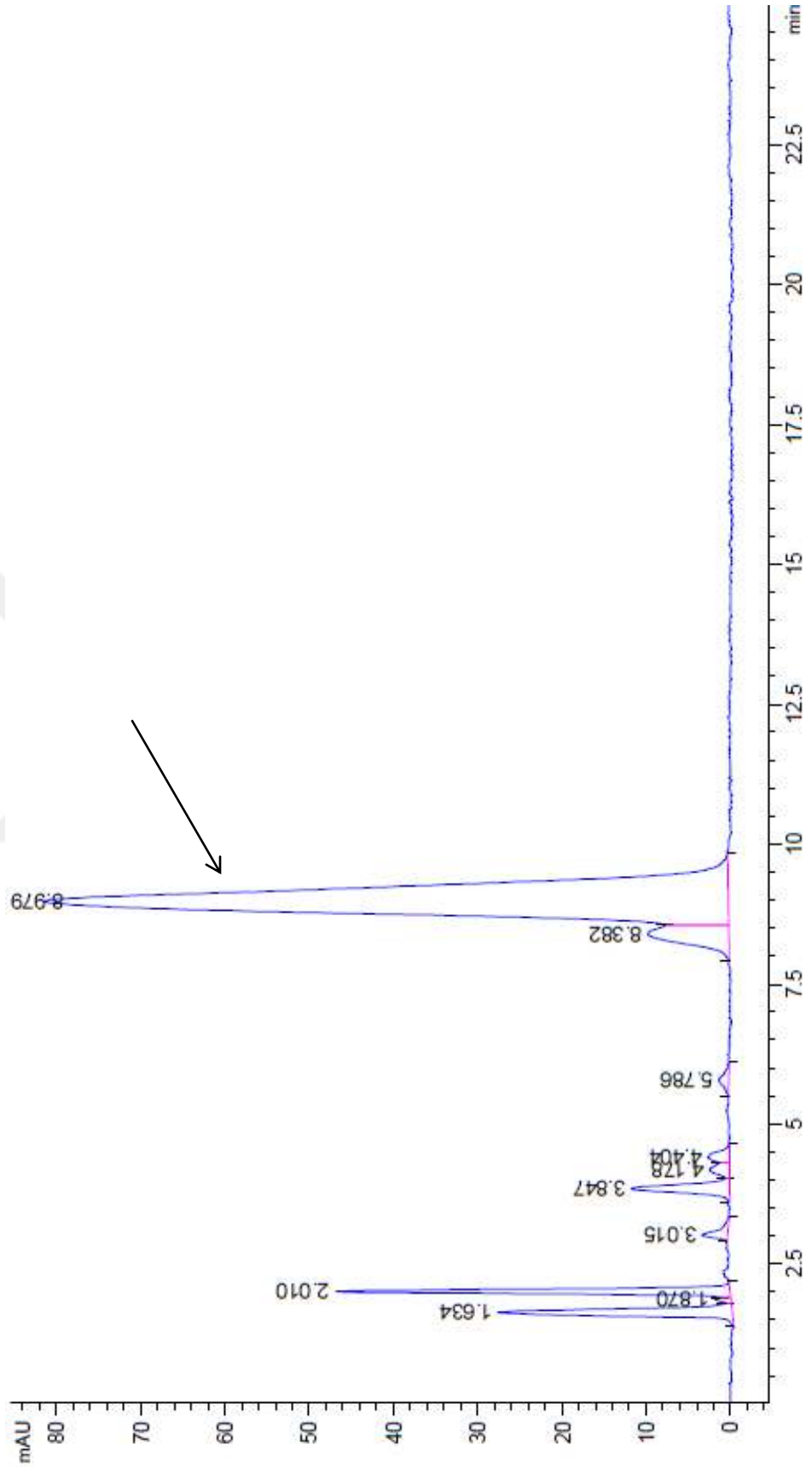
Şekil 4.15 : *Dunaliella salina* AQUAMEB-10 HPLC kromatogramı. Ok β -karoten pikini göstermektedir.



Şekil 4.16 : *Dunaliella salina* AQUAMEB-14 HPLC kromatogramı. Ok β-karoten pikini göstermektedir.



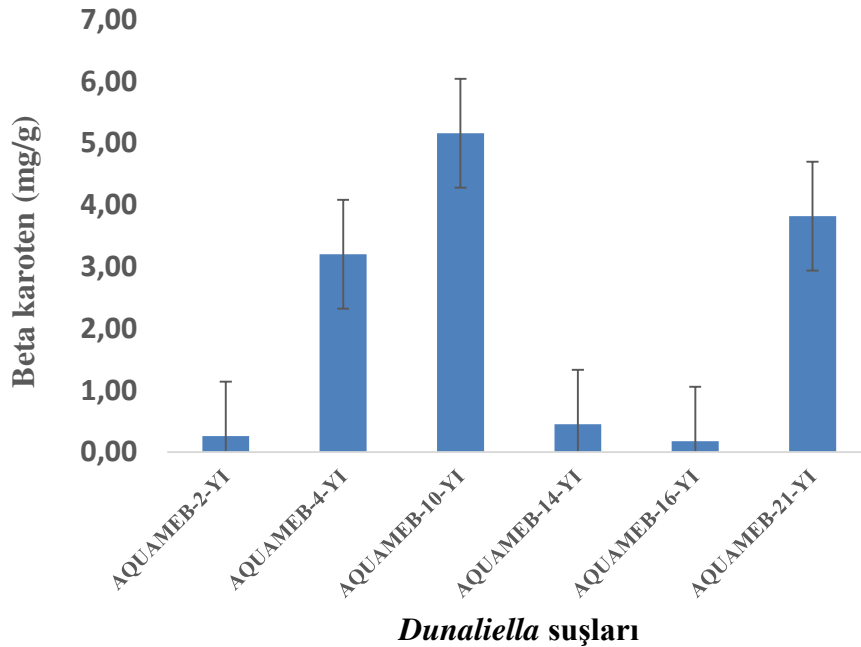
Şekil 4.17 : *Dunaliella* sp. AQUAMEB-16 Özütü HPLC Kromatogr *Dunaliella* sp. AQUAMEB-16 HPLC kromatogramı. Ok β -karoten pikini göstermektedir.



Şekil 4.18 : *Dunaliella salina* AQUAMEB-21 Özütü HPLC Kromatogramı. Ok β -karoten pikini göstermektedir.

Yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) analizinde β -Karoten standardı 9. dakikaya doğru elüe olmuştur (Şekil 4.12). Analize tabii tutulan tüm kültür örneklerinde de β -karoten piki gözlenmiş ve aynı sürede elüe olmuştur (Şekil 4.13-4.18). *Dunaliella salina* AQUAMEB-4, -10, 14 ve -21 ile *Dunaliella* sp. AQUAMEB-16 suşlarında β -Karoten pikinden hemen önce görülen pikin (8.4 dk) α -karoten olduğu daha önceki yayınlardan yola çıkarak tahmin edilmektedir. Sekizinci dakikadan önce gelen pikler yine daha önce yapılan çalışmalardan faydalanarak yorumlanmıştır [36, 37]. Violaksantin pigmentinin 1.6'ncı, neoksantin 1.8'inci, klorofil-b'nin 2., luteinin 2.28'inci, klorofil-a'nın 3., echinenon pigmentinin ise 5.78'inci dakikada gelen pik olması muhtemeldir. Ancak tez çalışmasında bu pigmentlerin standartları mevcut olmadığından kesin bir değerlendirme yapmak mümkün olmamıştır.

Yüksek ışığa maruz bırakılan suşların üçünde, *Dunaliella salina* AQUAMEB-4,-10 ve -21'de, yüksek miktarda β -karoten üretimi olduğu belirlenmiştir. *Dunaliella salina* AQUAMEB-21'de 5 mg.g⁻¹ kuru ağırlık seviyesinde β -karoten üretimi varken, AQUAMEB-4 ve 10'da 3-4 mg.g⁻¹ aralığında β -karoten üretimi belirlenmiştir (Şekil 4.19).

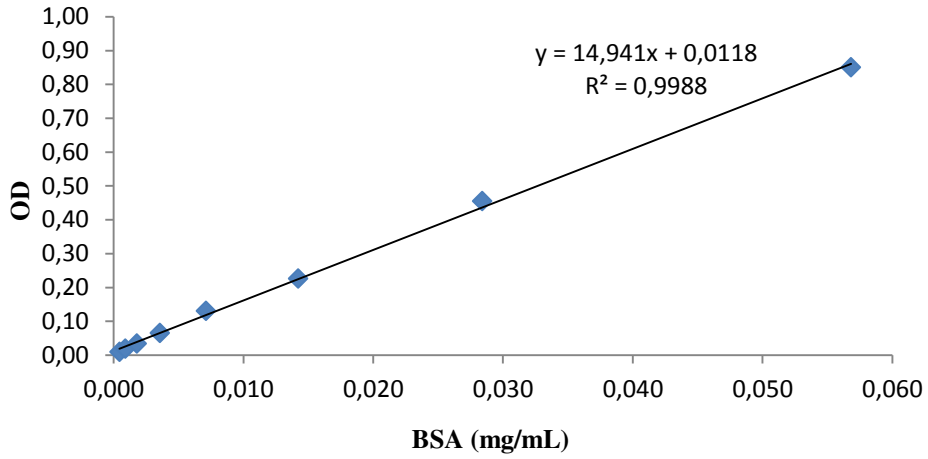


Şekil 4.19 : *Dunaliella salina* ve *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşlarında HPLC ile belirlenen β -karoten miktarları. Değerler 3 tekrarlı kültür çalışmalarından alınan örneklerin özütlerindeki β -karoten miktarlarının ortalamasıdır. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını göstermektedir. YI, yüksek ışık.

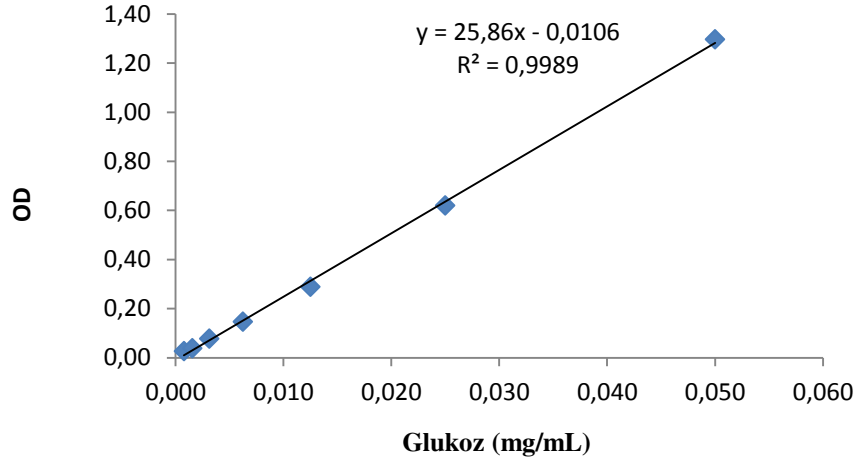
4.4 AQUAMEB Suşlarının Protein, Karbonhidrat, Yağ Asidi Miktar Analizleri

Temel biyokimyasal kompozisyonlarının belirlenmesi amacıyla 9 mikroalg suşu seçilmiştir. Pigment üretimi denemelerinde kullanılan *Dunaliella* AQUAMEB suşlarına ilave olarak *D. salina* AQUAMEB-20, *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22 ve *Cryptophyceae* AQUAMEB-1 de bu kısımdaki analizlerde kullanılmıştır. Özellikle son iki grup mikroalgler yüksek protein veya yağ asidi içerikleri ile bilinmektedir. Mikroalglerin protein ve karbonhidrat içerikleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenirken, yağ asidi içerikleri kromatografik yöntemlerle belirlenmiştir.

Protein içeriklerinin belirlenmesi amacıyla bahsedilen 9 mikroalg liyofilize edilmiş ve toplam protein miktarı bovin serum albumin (BSA) standart olarak kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.20). Benzer şekilde, aynı kuru örneklerdeki toplam karbonhidrat miktarı glukoz standard eğrisinden hesaplanmıştır (Şekil 4.21). Aynı örnekler Gaz Kromatografisi- Alev İyonizasyon Detektörü (GC-FID) ile temel yağ asidi miktar ve kompozisyonları için analiz edilmiştir.



Şekil 4.20 : Mikroalglerin protein içeriklerinin belirlenmesi amacıyla bovin serum albumin (BSA) standardı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Örneklerdeki protein miktarları eğriden elde edilen formül ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.21 : Mikroalglerin karbohidrat miktarlarının belirlenmesi amacıyla D-glukoz standardı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Örneklerdeki karbohidrat miktarları eğriden elde edilen formül ile hesaplanmıştır.

Tez çalışmasından kullanılan mikroalg suşlarının kuru ağırlık başına protein miktarları yaklaşık 60 mg.g^{-1} ile 180 mg.g^{-1} arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek protein miktarı *Dunaliella viridis* AQUAMEB-2 suşunda belirlenmiştir ($184.42 \pm 31.85 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$). En düşük protein üretimi ise $63.27 \pm 2.43 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$ ile *D. salina* AQUAMEB-4 suşunda görülmüştür. Diğer *Dunaliella* suşlarının toplam protein miktarları yaklaşık $120 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$ ile $140 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$ arasında değişmiştir. Diğer cinslere ait suşlardan *Cryptophyceae* AQUAMEB-1'in protein miktarı $113.39 \pm 10.00 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$ iken, *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22'nin protein miktarı $93.74 \pm 9.31 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$ olmuştur.

Mikroalg suşlarının toplam karbohidrat içerikleri yaklaşık $60 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$ ile $250 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$ arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). En düşük protein içeriğine sahip *D. salina* AQUAMEB-4 suşu $253.91 \pm 5.07 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$ ile en fazla karbohidrat üreten suş olmuştur. Diğer taraftan en yüksek protein miktarına sahip *D. viridis* AQUAMEB-2 suşu, *Cryptophyceae* AQUAMEB-1 ile en düşük toplam karbohidrat içeriğine sahip suş olmuştur ($79.76 \pm 20.54 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$) (Çizelge 4.2). Diğer *Dunaliella* suşlarının toplam karbohidrat üretimleri yaklaşık $85 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$ ile $160 \text{ mg.g}^{-1} \text{ k.a}$ arasında değişmiştir. *Dunaliella salina* AQUAMEB-20 ve -21 suşlarının aynı anda yüksek miktarda protein ve karbohidrat üretimi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1 : Tez çalışmasında kullanılan AQUAMEB suşlarının toplam protein, karbonhidrat ve yağ asidi miktarları. K.a, kuru ağırlık. Değerler $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Mikroalg suşu	Toplam protein (mg.g ⁻¹ k.a)	Toplam karbohidrat (mg.g ⁻¹ k.a)	Toplam yağ asidi (mg.g ⁻¹ k.a)
Cryptophyceae AQUAMEB-1	113.39 $\pm$ 10.00	62.36 $\pm$ 12.57	12
<i>Dunaliella viridis</i> AQUAMEB-2	184.42 $\pm$ 31.85	79.76 $\pm$ 20.54	40.2
<i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-4	63.27 $\pm$ 2.43	253.91 $\pm$ 5.07	19.9
<i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-10	132.84 $\pm$ 24.55	105.16 $\pm$ 26.46	33.7
<i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-14	120.71 $\pm$ 3.24	114.44 $\pm$ 23.68	32.4
<i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB-16	142.55 $\pm$ 18.32	85.69 $\pm$ 7.66	36.1
<i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-20	142.28 $\pm$ 10.98	160.58 $\pm$ 11.86	25.5
<i>Dunaliella salina</i> AQUAMEB-21	131.50 $\pm$ 7.86	161.23 $\pm$ 7.48	37.5
<i>Tetraselmis</i> sp. AQUAMEB-22	93.74 $\pm$ 9.31	145.24 $\pm$ 10.14	19.7

Mikroalg suşlarının toplam yağ asidi miktarları 12 mg.g⁻¹ k.a ile 40 mg.g⁻¹ k.a arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek toplam yağ asidi üretimi olan suş 40.2 mg.g⁻¹ k.a ile *D. viridis* AQUAMEB-2 olmuştur. En düşük toplam yağ asidi ise 12 mg.g⁻¹ k.a ile *Cryptophyceae* AQUAMEB-1’de görülmüştür. Diğer *Dunaliella* suşlarının toplam yağ asidi miktarları yaklaşık 20 mg.g⁻¹ k.a ile 38 mg.g⁻¹ k.a arasında değişirken, *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22’de bu değer 19.7 mg.g⁻¹ k.a olarak belirlenmiştir.

Suşların ürettikleri yağ asidi çeşitleri ve yüzdeleri incelendiğinde, analizi yapılan tüm yağ asitleri içinde doymuş yağ asitlerinin (SFA) yüzdesinin 23 ile 30 arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.3). Diğer taraftan bu suşlarda tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) %4 ile %14 arasında bir orana sahipken, çoklu doymamış yağ asitlerinin oranı %35 ile %45 arasında olmuştur (Çizelge 4.3). En yüksek oranda PUFA üretimine sahip suş yaklaşık % 45 ile *D. salina* AQUAMEB-14 olmuştur. En düşük PUFA üretimi ise %35 ile *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22’de görülmüştür. Ölçümü yapılan yağ asitleri içinde omega 3 PUFA’ların toplam yüzdesi 22 ile 40 arasında değişmiştir. En yüksek omega-3 PUFA içeriğine sahip suş yine *D. salina* AQUAMEB-14 iken (%40), en düşük yüzde *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22’de görülmüştür (%22). Tüm yağ asitleri içinde toplam omega-6 PUFA’ların yüzdesi yaklaşık 5 ile 16 arasında değişmiştir. En yüksek omega-6 PUFA yüzdesine sahip

suş *D. viridis* AQUAMEB-2 iken, en düşük yüzdeye sahip suş *D. salina* AQUAMEB-14 olmuştur.

İnsan sağlığı açısından önemli olan ökosapentaenoik asit (EPA- C20:5n3) sadece *Cryptophyceae* AQUAMEB-1 ve *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22’de belirlenmiştir. *Cryptophyceae* AQUAMEB 1’de EPA, analizi yapılan yağ asitleri içinde % 9.2’lik bir orana sahip olmuştur (1.4 mg.g⁻¹ alg kuru ağırlığı) (Çizelge 4.3 ve 4.4). *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22’de ise EPA oranı % 3.1’dir (0.8 mg.g⁻¹ alg kuru ağırlığı) (Çizelge 4.3 ve 4.4). Sağlık açısından önemli bir diğer yağ asidi olan dokosaheksaenoik asit (DHA- C22:6n3) ise sadece *Cryptophyceae* AQUAMEB-1’de bulunmuştur (% 3.3 veya 0.5 mg.g⁻¹ alg kuru ağırlığı) (Çizelge 4.3 ve 4.4).

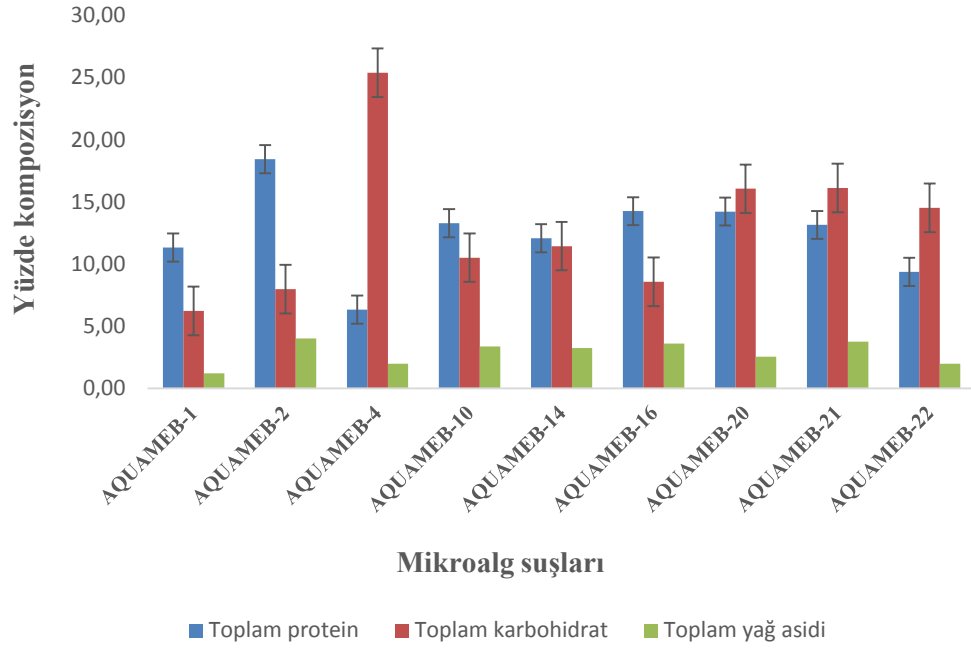
Çizelge 4.2 : AQUAMEB mikroalg suşlarının temel yağ asitleri kompozisyonu. Değerler yüzde oranları temsil etmektedir. Σ SFA , toplam doymuş yağ asitleri yüzdesi; toplam omega 3 çoklu doymamış yağ asidi yüzdesi; Σ omega 6 PUFA, toplam omega 6 çoklu doymamış yağ asidi yüzdesi.

Yağ Asidi	Aquameb-1	Aquameb-2	Aquameb-4	Aquameb-10	Aquameb-14	Aquameb-16	Aquameb-20	Aquameb-21	Aquameb-22
C12:0	2,2	3,2	2	2,7	2,6	3,1	2,6	2,7	2,4
C14:0	7	0,3	0,5	0,5	0,7	0,5	0,5	0,6	1,8
C15:0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0,2
C16:0	18,1	15,6	28	18,9	20,6	18,7	22,1	21,2	20,7
C16:1	2,2	0,5	1	1,3	0,8	0,3	0,6	0,9	0,5
C17:0	0,3	0,1	0,2	0	0	0	0	0,1	0
C17:1	0,2	0,1	0,4	0	0	0	0,1	0,1	0,1
C18:0	2,1	0,5	0,7	0,4	1,2	0,3	0,5	0,4	0,5
C18:1n7	4,9	2,3	1,9	3,9	3	2,4	2,9	3,5	2,3
C18:1n9c	0,6	3,4	3,6	1,7	1,5	1,5	2,9	2,5	6,5
C18:1t	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0
C18:2n6c	4,1	15,7	9,8	7,4	3,5	5	8,9	6,8	10,2
C18:3n3	10,4	25,5	27,3	32,1	38,2	35,5	30,2	30,3	14,8
C18:3n6	1,4	0,2	2,4	1,9	1,3	1,5	1,5	2	1,4
C18:4n3	14,4	0	0,5	0,5	0,6	0,5	0,4	0,8	2,7
C20:0	0	1,5	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	0
C20:1	0	0	0	0	0,1	0	0	0	4,2
C20:4n3	1	0	0	0	0	0,1	0	0	1,3
C20:4n6	0,3	0	0	0	0	0	0	0	1,4
C20:5n3	9,2	0	0	0	0	0	0	0	3,1
C22:0	0	1,2	0	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0
C22:5n3	0	0	0	0	1,2	0	0,8	0	0
C22:6n3	3,3	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ SFA	30,3	22,7	31,5	22,9	25,6	23	26,2	25,4	25,6
Σ MUFA	9,2	6,3	6,9	6,9	5,6	4,2	6,5	7	13,7
Σ PUFA	44,1	41,4	40	41,9	44,8	42,7	41,7	39,9	35,3
Σ omega 3 PUFA	38,3	25,5	27,8	32,6	40	36,2	31,3	31,1	22
Σ omega 6 PUFA	5,8	15,9	12,2	9,3	4,8	6,5	10,4	8,8	13,3

Çizelge 4.3 : Tez çalışmasında kullanılan mikroalg suşlarının yağ asitleri kompozisyonu. Değerler yüzde oranları vermektedir. Σ SFA , toplam doymuş yağ asidi yüzdesi; Σ MUFA, toplam tekli doymamış yağ asidi yüzdesi; Σ PUFA, toplam çoklu doymamış yağ asidi yüzdesi; Σ omega 3 PUFA, toplam omega 3 çoklu doymamış yağ asidi yüzdesi; Σ omega 6 PUFA, toplam omega 6 çoklu doymamış yağ asidi yüzdesi.

Yağ Asidi	Aquameb-1	Aquameb-2	Aquameb-4	Aquameb-10	Aquameb-14	Aquameb-16	Aquameb-20	Aquameb-21	Aquameb-22
C12:0	0,3	1,8	0,5	1,3	1,1	1,6	0,9	1,4	0,7
C14:0	1	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,5
C15:0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
C16:0	2,7	8,9	7,2	8,9	8,8	9,7	7,6	11	5,7
C16:1	0,3	0,3	0,2	0,6	0,3	0,1	0,2	0,5	0,1
C17:0	0	0,1	0	0	0	0	0	0,1	0
C17:1	0	0,1	0,1	0	0	0	0	0,1	0
C18:0	0,3	0,3	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2	0,1
C18:1n7	0,7	1,3	0,5	1,8	1,3	1,2	1	1,8	0,6
C18:1n9c	0,1	1,9	0,9	0,8	0,6	0,8	1	1,3	1,8
C18:1t	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0
C18:2n6c	0,6	9	2,5	3,5	1,5	2,6	3	3,5	2,8
C18:3n3	1,5	14,6	7	15	16,4	18,3	10,3	15,7	4
C18:3n6	0,2	0,1	0,6	0,9	0,6	0,8	0,5	1	0,4
C18:4n3	2,1	0	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1	0,4	0,7
C20:0	0	0,9	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0
C20:1	0	0	0	0	0,1	0	0	0	1,1
C20:2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C20:4n6	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4
C20:5n3	1,4	0	0	0	0	0	0	0	0,8
C22:0	0	0,7	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0
C22:5n3	0	0	0	0	0,5	0	0,3	0	0
C22:6n3	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
Total (mg/mL)	12	40,2	19,9	33,7	32,4	36,1	25,5	37,5	19,7

Tüm suşların protein, karbohidrat ve yağ asidi yüzdeleri incelendiğinde *Dunaliella salina* AQUAMEB-10 ve -14 ile *Dunaliella* sp. AQUAMEB-16'nın benzer içeriğe sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.22). Diğer taraftan *D. salina* AQUAMEB-20 ve -21'in diğer *Dunaliella* suşlarına göre daha fazla karbohidrat içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Bu suşlarda karbohidrat yüzdeleri protein içeriğinden fazla olmuştur. *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22 içeriği de bu suşlar gibidir ve bu tür daha fazla karbohidrat üretmektedir. Tüm suşlar içinde en yüksek protein içeriğine sahip suş *D. viridis* AQUAMEB-2 iken, en yüksek karbohidrat yüzdesi *D. salina* AQUAMEB-4'te görülmüştür. En yüksek yağ asidi yüzdesine sahip suş ise *D. viridis* AQUAMEB-2 olmuştur (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 : Tez çalışmasında kullanılan mikroalg suşlarının kuru ağırlık içinde yüzde protein, karbohidrat ve yağ asidi oranları. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Pigment analizleri için seçilen *Dunaliella* suşlarının filogenetik analizleri sonucunda AQUAMEB-4, -10, -14 ve -21'in *Dunaliella salina* türüne ait olduğu görülmüştür. AQUAMEB-2'nin *Dunaliella viridis* türüne ait olduğu gözlenmiştir ancak AQUAMEB-16 tür bazında ayrıştırılamamış olup *Dunaliella* sp. olarak tanımlanmıştır (Şekil4.1). Farklı tanımlanmış *Dunaliella* suşlarının çok benzer rRNA büyük alt ünite gen dizilerine sahip olması bu grup üyelerinin tür isimlerinin sorunlu olduğunu düşündürmektedir.

AQUAMEB-1 ve AQUAMEB-22'nin filogenetik analizleri sonucunda AQUAMEB-22'nin *Tetraselmis* sp. olabileceği Tetraselmis suşuna gen benzerliğinden dolayı gözlemlenmiştir ayrıca suşun yağ asidi içeriği bu sonucu destekler niteliktedir. . Filogenetik çalışmalar sonucu elde edilen benzerlik değerleri halofilik (AQUAMEB-22) ve denizel *Tetraselmis* suşlarının aslında farklı cinslere ait olduğunu işaret etmektedir. .AQUAMEB-22'de filogenetik çalışmalarda elde edilen benzerlik seviyesi de cins bazında tanımlama için düşüktür ve AQUAMEB-1 suşuna çok benzer bir LSU gen dizisi gen bankalarında yoktur. Şu aşamada sadece bu suşun bir *Cryptomonad* olduğunu ifade etmek mümkündür.

AQUAMEB-22'nin *Tetraselmis* suşuna özgü Araşidonik asit içerdiği görülmüştür. Gen bankasında AQUAMEB-1'e benzerlik oranı yüksek olan bir dizi bulunamadığı için cins bazında tanımlaması yapılamamış olup bu suşun bir *Cryptomonad* olabileceği görülmüştür (Şekil 4.2).

Bu tez çalışmasında kullanılan *Dunaliella* suşlarının karotenoit ve β -karoten üretim miktarlarına ışık şiddetinin etkisini gözlemlemek amacıyla suşlara farklı ışık şiddetleri ile muamele edilmiştir. Bu ışık şiddetleri Borowitzka (2007)'deki çalışmadan faydalanarak belirlenmiştir [1]. Yapılan deneyler sonucunda *Dunaliella*'da karotenoit üretiminin suşların bulunduğu ortamın ışık yoğunluğundan etkilendiği görülmüştür. Yüksek ışık şiddetindeki ($650 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) *Dunaliella* suşlarının düşük ışıktaki ($65 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) tekrarlarına göre daha

fazla miktarda total karotenoit ve β -karoten ürettikleri yapılan deneyler ile gösterilmiştir.

Farklı ışık şiddetlerinde *Dunaliella* suşlarının büyüme potansiyelleri incelenmiştir. Düşük ışıktaki en iyi büyüme *Dunaliella viridis* AQUAMEB-2’de gözlemlenirken yüksek ışıktaki en iyi büyüme *Dunaliella salina* AQUAMEB-21 ve onu takiben *Dunaliella viridis* AQUAMEB-2’de gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan tüm *Dunaliella* suşlarının büyüme özellikleri değerlendirildiğinde fazla miktarda β -karoten üreten suşların (AQUAMEB-4, -10, -21) yüksek ışıktaki daha iyi büyüdükleri ancak diğer *Dunaliella* suşlarına kıyasla daha az miktarda β -karoten üreten suşların (AQUAMEB-2, -14, -16) ise düşük ışıktaki daha iyi büyüebildikleri gözlenmiştir. *Dunaliella viridis* AQUAMEB-2 her iki ışık şiddetinde de en iyi büyüme gösteren *Dunaliella* suşu olmuştur (Şekil 4.5). Bunun nedeni birçok faktör olabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda *Dunaliella* suşlarının iyi büyüme gösterdiği ideal tuzluluk 1-2 M olarak bulunmuştur [38]. Bu tez çalışmasında 2,5 M tuzluluk kullanılmıştır. Bu tuzluluk değeri *Dunaliella* suşlarının büyümesini sınırlandırmış olabilir [38]. Düşük ışıktaki tekrarların daha iyi büyümüş olması Teo (2014) yaptığı çalışmada *Dunaliella* suşlarının en iyi büyüme gösterdikleri ışık şiddetini $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ olarak belirtmiştir [38]. Bu çalışmada kullanılan yüksek ışık şiddeti ($650 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) *Dunaliella* suşlarının strese girmesine ve bu nedenle yavaş büyüme göstermelerine neden olmuştur. Mikroalgler fotosentez sırasında yüksek ışık fotooksidasyon ve fotoinhibisyona sebep olarak hücre büyümesini yavaşlatmıştır. Sıcaklık mikroalglerin büyümesine etki eden başka bir faktördür. Tez çalışmasında oluşturulan sistemin sıcaklık kontrolü klimala ile sağlanmaya çalışılmıştır ancak elektrik kesintisi vs. gübri nedenlerden dolayı sıcaklık değeri her zaman kontrol edilememiştir. Sıcaklık stresi karbon ve azot kullanımını azaltmaktadır bu durum hücre büyümesini olumsuz yönde etkiler [39]. Deney süresince karıştırma manuel olarak yapılmıştır ancak karıştırma gazların ve besin maddelerinin homojen olarak dağılması optimum hücre büyümesi için oldukça önemlidir. Daha yüksek seviyede hücre büyümesi elde edebilmek için karıştırılmalı, sıcaklık, CO_2 , pH kontrollü bir biyoreaktör kullanılması daha iyi sonuçlar verecektir.

Yüksek ışıktaki kalan hücreler daha kısa sürede fazla miktarda β -karoten sentezlerken düşük ışıktaki hücrelerin aynı β -karoten miktarına ulaşabilmeleri için yüksek ışıktakilere göre daha uzun süre düşük ışık altında kalmaları gerekmektedir. Bu tez

çalışmasında *Dunaliella salina* AQUAMEB-21’de gerçekleşen durum Borowitzka’nın çalışmasını destekler niteliktedir. *Dunaliella salina* AQUAMEB-21’de 12.gün ve 24.günde yüksek ışık ve düşük ışıktaki tekrarların total karotenoit miktarları arasında büyük bir fark varken 36. gün aradaki bu fark büyük oranda kapanmıştır. Bu durum düşük ışıktaki hücrelerin 36. gün sonunda daha fazla β -karoten üretmeye başlamaları ile açıklanabilmektedir (Şekil 4.8).

Dunaliella suşlarının klorofil-a ve klorofil-b içerikleri incelendiğinde tüm suşların düşük ışıktaki tekrarlarında yüksek ışıktaki tekrarlarına göre klorofil pigmentinin daha fazla miktarda üretildiği gözlenmiştir. Bu durumun nedeni düşük ışık şiddetindeki *Dunaliella* suşlarının yüksek ışıktaki tekrarlarına oranla daha fazla miktarda fotosentez yaptığı ve bu nedenle daha fazla miktarda klorofil pigmenti oluşturdıkları şeklinde açıklanır.

Yüksek ışık şiddetinde 36 gün boyunca maruz bırakılan toplam 6 *Dunaliella* suşunun HPLC ile β -karoten miktar tayini yapılmıştır. Daha önce yapılmış çalışmalar bu tez çalışmasındaki sonuçlar karşılaştırılarak kromatogramlar yorumlanmıştır. Beta karoten pikine tüm suşlarda rastlanmasının yanında daha önce yapılan çalışmalardan violaksantin, neoksantin, klorofil-b, lutein, klorofil-a’ya ait olduğu tahmin edilen piklere de tüm *Dunaliella* suşlarında rastlanmıştır. Ancak 5,8’inci dakikada gelen ve echinenon’a ait olduğu tahmin edilen pike yalnızca renk değişimi (turuncu renge dönen) gözlenen *Dunaliella salina* AQUAMEB-4, -10, -21 suşlarında rastlanmıştır (Şekil A.3, 4, 7). Echinenone pigmentinin kırmızı-turuncu bir renge sahip olması bu sonucu destekler niteliktedir ancak kesin yorum yapabilmek için echinenone standardı kullanılarak HPLC yapılması gerekmektedir. *Dunaliella* suşlarının HPLC kromatogramları incelendiğinde renk değişimi gözlemlenmeyen (yeşil olarak kalan) *Dunaliella* suşlarında AQUAMEB-2, -14, -16’da zayıf β -karoten piki gözlenirken β -karoten’den önce pik veren ve α -karotene ait olduğu tahmin edilen pike rastlanmamıştır (Şekil A.2, 5, 6) . Bu sonuç yeşil kalan *Dunaliella* suşlarının düşük konsantrasyonda β -karoten içerdiğini destekler niteliktedir. En fazla β -karoten üreten *Dunaliella salina* AQUAMEB-10 (5,16 mg/g) iken AQUAMEB-21(3,82 mg/g) ve AQUAMEB-4 (3,20 mg/g)’de yüksek miktarda β -karoten üreten *Dunaliella* suşlarındandır. *Dunaliella viridis* AQUAMEB-2; 0,26 mg/g , *Dunaliella salina* AQUAMEB 14; 0,45 mg/g ve *Dunaliella* sp. AQUAMEB-16; 0,18 mg/g ile diğer suşlara kıyasla daha az miktarda β -karoten içermektedirler (Şekil 4.12).

Tez çalışmasında kullanılan tüm mikroalg suşlarının kuru ağırlıklarında protein, karbondhidrat ve yağ asidi oranları incelendiğinde her suş için farklı oranlarda protein, yağ asidi ve karbondhidrat bulunduğu görülmüştür. Tez çalışmasında kullanılan mikroalglerin biyomaslarının %6-18 protein, %6-25 karbondhidrat, %1-4 yağ asidi olduğu görülürken bunların dışında kalan biyomasın %50-70'lik kısmı protein, karbondhidrat ya da yağ asidi içeriği değildir. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde bu içeriğin gliserol olabileceği görülmüştür. Halofilik mikroalgler yüksek tuzlukta ortama uyum sağlayabilmek için hücre içi gliserol miktarlarını artırır ve böylece hücrenin osmotik dengesini korurlar. Önceki çalışmalarda yüksek tuzlulukta *Dunaliella* hücrelerinin hücre içi gliserol oranının %50'nin üzerinde olduğu rapor edilmiştir [4]. Lee (2015) yaptığı çalışmada mikrolalgal biyokütle üretiminin artırılabilmesi için aydınlık evre süresinin artırılabilceğini önermiştir. Bu süre ışık kullanım verimliliği açısından önemlidir. Bu tez çalışmasında karanlık ve aydınlık evre süreleri 12 saat periyotlar olarak ayarlanmıştır [40]. Kullanılan suşların biyokütlelerinin artırılabilmesi için bu sürelerde düzenlemeler yapılabilir. Protein, karbondhidrat ve yağ asidi oranları literatürle karşılaştırıldığında *Dunaliella salina*'da kuru ağırlığın %57'sinin protein, %32'sinin karbondhidrat ve %6'sının yağ olduğu görülmüştür [41]. Değerler bu çalışmadaki değerler ile karşılaştırıldığında genel olarak düşük biyokimyasal içerik olduğu görülmüştür. Bunun nedeni kültür koşulları, sıcaklık, yüksek tuzluluk, homojen gz dağılımının sağlanamamış olması (manuel karıştırma sebebiyle) gibi durumlar olabilir.

Tez çalışmasında kullanılan tüm mikroalg suşlarının yağ asidi kompozisyonları incelendiğinde özellikle AQUAMEB-1 ve AQUAMEB-22 yağ asidi içerikleri olarak *Dunaliella* sp. suşlarından farklı bir profil oluşturmuşlardır. Yağ asidi analiz sonuçlarına göre en yüksek toplam yağ asidi içeriğine sahip *Dunaliella viridis* AQUAMEB-2 (40 mg/g) iken en düşük toplam yağ asidi içeriğine sahip *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22 (19,7 mg/g) ve *Cryptophyceae* AQUAMEB-1 (12mg/g) olarak gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Yağ asidi içerikleri düşük olmasına rağmen *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-ve *Cryptophyceae* AQUAMEB-1 suşları içerdikleri farklı yağ asitleriyle diğer mikroalg suşlarından ayrılmaktadırlar (Çizelge 4.3). *Cryptophyceae* AQUAMEB-1'in tez çalışmasında kullanılan *Dunaliella* sp. ve *Tetraselmis* sp. suşlarından farklı olarak dokosahekzanoik asit (DHA) içerdiği görülmüştür. DHA'lar ateroskleroz, kanser, romatoid artrit, sedef hastalığı ve Alzheimer gibi yaşlanma ile

alakalı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca *Dunaliella* suşlarından farklı olarak *Cryptophyceae* AQUAMEB-1 ve *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22'nin pentadekanoik asit ve eikosapentaenoik asit metil ester içerdiği görülmüştür. *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22 tez çalışmasında kullanılan mikroalgler içerisinde diğerlerinde bulunmayan, içerdiği Araşidonik asit kaynağı olarak ilgi çekmektedir. Araşidonik asit(AA) nörolojik ve farmasötik uygulamalarda kullanılan önemli bir yağ asidi çeşididir [21]. Palmitik asit (C16:0) ve oleik asit (C18:1) yağ asitleri yeşil alglerde sentezlenen total yağ asitlerinin %50'sini oluşturmaktadır yapılan analizler de bu bilgiyi doğrulamıştır. Yapılan analizler sonucunda çalışmada kullanılan tüm *Dunaliella* suşlarında araşidik asit ve beherik asidin yoğun olarak sentezlendiği görülmüştür.

Bu tez çalışmasında biyoteknolojik potansiyelleri araştırılan mikroalg suşları Çamaltı Tuzla'sındaki mikroalglerin biyoteknolojik potansiyelleri ile ilgili bilgi sahibi olunmasına katkıda bulunmuştur. *Dunaliella salina* AQUAMEB-4, -10, -21 β -karoten üretimi için değerlendirilebilecek suşlar olarak belirlenmiştir. *Dunaliella viridis* AQUAMEB-2 içerdiği yüksek protein ve yağ asidi kompozisyonlarıyla mikroalg biyoteknolojisinde değerlendirilebilecek suşlardandır. *Dunaliella salina* AQUAMEB-4 tez çalışmasında kullanılan diğer türlerden yüksek oranda karbonhidrat içermektedir. *Cryptophyceae* AQUAMEB-1 içerdiğiyle farklı yağ asidi kompozisyonlarıyla ve genetik olarak tam anlamıyla tanımlanamamış bir tür olması sebebiyle üzerine çalışılması gereken suşlardandır. *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-22 içerdiği değişik yağ asidi kompozisyonları nedeniyle mikroalg biyoteknolojisinde kullanılma potansiyeli taşıyan türlerdendir.

KAYNAKLAR

- [1] **Borowitzka M.A., Siva C. J.**(2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species, *J. Appl. Phycol.*,19 (5), 567–590.
- [2] **Borowitzka M. A.** (2013). High-value products from microalgae their development and commercialisation, 743–756.
- [3] **Likun W. E. I., Xuxiong H., Zhengzheng H.**(2015). Temperature effects on lipid properties of microalgae *Tetraselmis subcordiformis* and *Nannochloropsis oculata* as biofuel resources, *Chinese Society for Oceanology and Limnology*,33 (1), 99–106.
- [4] **Lee R.E.** (2008). *Phycology*. USA, Colorado State University
- [5] **Klaveness D.** (2013), *Biology and Ecology of the Cryptophyceae : Status and Challenges*, *Biological Oceanography*, 5581, 257–270.
- [6] **Pane L., Feletti M., Bertino C., Carli A.**(1998). Viability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* grown free and immobilized in alginate beads, *Aquaculture International*, 420, 411–420.
- [7] **Hemaiswarya S., Raja R., R. Kumar R., Ganesan V., Anbazhagan C.** (2011). Microalgae : a sustainable feed source for aquaculture, *World J Microbiol Biotechnol* ,1737–1746
- [8] **M. Arora and N. Delhi.** (2012). *Tetraselmis :an Introduction*, *The Botanica*, 66,155-175.
- [9] **J.Varela J. C., Pereira H., Vila M., León R.** (2015). Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges, *Photosynth. Res.*, 125 (3), 423–436.
- [10] **Johnson E. A., Schroeder W. A.** (1995). Microbial Carotenoids Yield of cells on substrate, *Adv. Biochem. Eng.*, 53, 119–178.
- [11] **Fu W.** (2013). Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97 (6),. 2395–2403.
- [12] **Loeblich L.A.** (1982). Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *dunaliella salina*, *Marine Biology*, 493–508.
- [13] **Amotz B.E.** (1989). The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella Bardawil*, *Journal of Phycology*, 175-178..
- [14] **Neil C. A., Schwartz S. J.** (1992). Chromatographic analysis of cis/trans carotenoid isomers, *J. Chromatogr. A*, 624 (1), 235–252.
- [15] **Borowitzka M. A.** (1992). Algal biotechnology products and processes matching science and economics, *Journal of Applied Phycology*, 267–279.
- [16] **Vázquez L. C, C., Morales A., Lozano-Ramírez C., M. Rodríguez-Palacio C.**(2016). Fitoplancton de la Laguna del Carpintero, Tampico, Tamaulipas, México, *Interciencia*, 41(2), 103–109.

- [17] **Amotz A. B.** (1987). Effect of Irradiance and Nutrient Deficiency on the Chemical Composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta), *J. Plant Physiol.*, 131 (5), 479–487.
- [18] **Apt K. E., Behrens P. W.** (1999). Review commercial developments in microalgal biotechnology 1, 226, 215–226.
- [19] **Priyadarshani I., Rath B.** (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – A review, *J. Algal Biomass*, 3(4), 89–100.
- [20] **Volkman J. K., Jeffrey S. W., Nichols P. D., Rogers G. I.** (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 128, 219–240.
- [21] **Patil V., Källqvist T., Olsen E., Vogt G., Gislerød H. R.** (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed, *Aquac. Int.*, 15 (1), 1–9.
- [22] **Corporation P.** (2009). Wizard® Genomic DNA Purification Kit Wizard® Genomic DNA, *Solutions*, 1123–1126, 2009.
- [23] **Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S.** (2013). MEGA6 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6 . 0, *Mol. Biol. Evol.*, 30, 2725–2729.
- [24] **Pisal D. S., Lele S. S.** (2005). Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*, *Indian J. Biotechnol.*, 4 (4), 476–483.
- [25] **Lichtenthaler H. K.** (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods Enzymol.*, 148, 350–382.
- [26] **Waterborg J. H. & Matthews H. R.** (1984). The lowry method for protein quantitation., *Methods Mol. Biol.*, 1, 1–3.
- [27] **Slocombe S. P., Ross M., Thomas N., McNeill S., Stanley M. S.** (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass, *Bioresour. Technol.*, 129, 51–57.
- [28] **Barbarino E. & Lourenço S. O.** (2005), An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae, *J. Appl. Phycol.*, 17 (5), 447–460.
- [29] **Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S. I., Lee Y. C.** (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format, *Anal. Biochem.*, 339 (1), 69–72.
- [30] **Kochert G.** (1978). Carbohydrate Determination by Phenol-Sulfuric Acid, *Handb. Phycol. method*, 1, 171–173.
- [31] **Laurens L. M. L. ve diğ.** (2012). Algal biomass constituent analysis: Method uncertainties and investigation of the underlying measuring chemistries, *Anal. Chem.*, 84 (4), 1879–1887.
- [32] **Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F.** (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.*, 28 (3), 350–356.
- [33] **Mäki-Arvela P., Hachemi I., Murzin D. Y.** (2014). Comparative study of the extraction methods for recovery of carotenoids from algae: Extraction kinetics

and effect of different extraction parameters, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 89 (11), 1607–1626.

- [34] **Woitke, P. C., Martin D., Nicklisch S., Kohl, J. G.** (1994). HPLC determination of lipophilic photosynthetic pigments in algal cultures and lake water samples using a non-encapped C18-RP-column, *J. Anal. Chem.*, 348(11), 762–768.
- [35] **Amotz A. B., Lers A., Avron M.** (1988). Stereoisomers of beta-Carotene and Phytoene in the Alga *Dunaliella bardawil.*, *Plant Physiol.*, 86 (4), 1286–1291.
- [36] **Stoń-Egiert J. & Kosakowska A.** (2005). RP-HPLC determination of phytoplankton pigments Comparison of calibration results for two columns, *Mar. Biol.*, 147 (1), 251–260.
- [37] **Laviale M. & Neveux J.** (2011). Relationships between pigment ratios and growth irradiance in 11 marine phytoplankton species, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 425, 63–77.
- [38] **Teo C.L., Atta M., Bukhari A., Taisir M., Yusuf A.M., Idris A.** (2014)., Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths, *Bioresour. Technol.*, 162, 38-44.
- [39] **Venkata Subhash G., Rohit M.V., Devi M.P., Swamy Y.V., Venkata Mohan S.**(2014). Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater, *Bioresour. Technol.*, 169, 789-793.
- [40] **Lee C.S., Lee S.-A., Ko S.-R., Oh H.-M., Ahn C.-Y.** (2015), Effects of photoperiod on nutrient removal, biomass production, and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater, *Water Res.*, 68, 680-691.
- [41] **Razzak S.A., Hossain M.M., Lucky R.A., Bassi A.S., de Lasa H.** (2013), Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 27, 622- 653.

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad :Kübra ŞENTÜRK
Doğum Tarihi ve Yeri : 04/01/1992, Bursa
E-posta : senturkkubr@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik
- **Yüksek Lisans** : 2018 , Bursa Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Biyoteknoloji

BİLİMSEL FAALİYETLER

- Biotechnological potentials (Biochemical compositions) of halophilic microalgae isolated from Çamaltı Saltern, İzmir, Turkey (Hazırlık aşamasında)
- First report of toxic *Prorocentrum Lima* in the Marmara Sea (Hazırlık aşamasında)
- Molecular and morphological taxonomy of *Dunaliella* strains isolated from Çamaltı Saltern, İzmir Turkey (Hazırlık aşamasında)