

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***PRASINOCOCCUS* SP. VE *PORPHYRIDIMUM*
CRUENTUM'DAN ELDE EDİLEN TOPLAM
EKZOPOLİSAKKARİTİN FARKLI YETİŞTİRME
KOŞULLARINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Mina TEBİANİ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Meltem Conk Dalay

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunum Tarihi :28.01.2015

Bornova-İZMİR

2015

Mina TEBİANİ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Prasinococcus* sp. ve *Porphyridium Cruentum*’dan Elde Edilen Toplam Ekzopolisakkaritin Farklı Yetiştirme Koşullarında Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 28.01.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

.....

Raportör Üye : Yrd. Doç. Dr. Esra İMAMOĞLU

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Meltem BAYRAKTAR

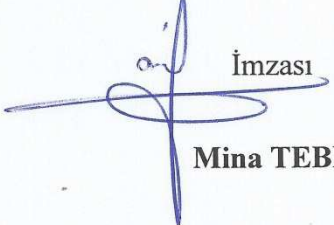
.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Prasinococcus* sp. ve *Porphyridium Cruentum*’dan Elde Edilen Toplam Ekzopolisakkaritin Farklı Yetiştirme Koşullarında Değerlendirilmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

04 / 02 / 2015

 İmzası
Mina TEBIANI

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Prasinococcus* sp. ve *Porphyridium Cruentum*’dan Elde Edilen Toplam Ekzopolisakkaritin Farklı Yetiştirme Koşullarında Değerlendirilmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

04 / 02 / 2015

İmzası

Mina TEBIANI

ÖZET

***PRASINOCOCCUS* SP. VE *PORPHYRIDIDIUM CRUENTUM*'DAN ELDE
EDİLEN TOPLAM EKZOPOLİSAKKARİTİN FARKLI YETİŞTİRME
KOŞULLARINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

TEBIANI, Mina

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

Ocak 2015, 65 sayfa

Prasinococcus sp. (yeşil mikroalg) ve *Porphyridium cruentum* (kırmızı mikroalg) polisakkaritler gibi değerli biyokimyasalların üretim için iyi adaylardır. Bu çalışmanın amacı, iki farklı ışık şiddetinde (10 ve $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 16:8 saat aydınlık:karanlık) ve F/2 ortamında kontrole karşı sodyum bikarbonat ve sodyum glikozilat monohidrat enzimi eklenmesiyle *Prasinococcus* sp. ve *P. cruentum*'nun şeker içeriğinin karşılaştırılmasıdır. Deneyler 900 ml F/2 ortamı içeren 1000 ml'lik şişelerde 14 gün boyunca 22 ± 2 °C sıcaklıkta, 1 vvm hava akış hızında gerçekleştirilmiştir. Işık şiddeti kuantum metre (Lambda L1-185) ile şişelerin merkezini baz alarak ölçülmüştür. Üretim süresinde optik yoğunluk, klorofil-a ve toplam şeker ölçümleri yapılmıştır. Üretim sonunda en yüksek şeker miktarı ($275,5 \text{ mg/L}$) ve en yüksek klorofil-a miktarı ($5,99 \text{ mg/L}$) $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve sodyumbikarbonatın bulunmadığı ortamda *Prasinococcus* sp.'den elde edilmiştir. Diğer yandan en yüksek toplam şeker konsantrasyonu ($246,53 \text{ mg/L}$) *P. cruentum*'dan $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve $0,25 \text{ mmol/L}$ sodyum gliokzilat monohidrat enzim eklendiğinde ve en yüksek klorofil-a miktarı ($5,37 \text{ mg/L}$) *Prasinococcus* sp.'den $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve enzimin bulunmadığı ortamdan elde edilmiştir. Yüksek ışık yoğunluğu *Prasinococcus* sp. nin şeker üretimini tetiklemesine rağmen her iki kimyasalın eklenmesi şeker üretiminde önemli bir etkisi olmamıştır.

Anahtar sözcükler: *Porphyridium cruentum*, *Prasinococcus* sp., ışık şiddeti, şeker birikimi, sodyum bikarbonat, sodyum glikozilat monohidrat

ABSTRACT

**EVALUATION OF TOTAL EXOPOLISACCHARIDE
PRODUCED BY *PRASINOCOCCUS* SP. AND *PORPHYRIDIDIUM*
CRUENTUM UNDER DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS**

TEBIANI, Mina

M.Sc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr.Meltem CONK DALAY

January 2015, 65 pages

Prasinococcus sp. (green microalgae) and *Porphyridium cruentum* (red microalgae) are good candidates for the production of valuable biochemicals such as polysaccharides. The aim of this study was to investigate sugar amount of *Prasinococcus* sp. in comparison with *Porphyridium cruentum* as a control strain under two different light intensities (10 and 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with the light-dark cycle of 16h:8h) in F/2 medium with or without sodium bicarbonate and sodium monohydrate glyoxylate enzyme, respectively. Experiments were carried out in 1000 ml Erlenmeyer flasks containing 900 ml of F/2 medium at the air flow rate of 1 vvm under the temperature of 22 ± 2 °C for 14 days. Irradiance was measured in the center of the flask with a quantum meter (Lambda L1-185). During the cultivation period chlorophyll-a, optical density and total sugar amounts were measured. After 14 days of cultivation period the highest total sugar concentration (275.5 mg/L) and the maximum chlorophyll-a amount (5.99 mg/L) were obtained under the light intensities of 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in F/2 medium without NaHCO_3 for *Prasinococcus* sp. and the highest total sugar concentration (246.53 mg/L) obtained from *P. cruentum* and the maximum chlorophyll-a amount (5.37) were obtained for *Prasinococcus* sp. under the light intensities of 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with adding sodium glyoxylate monohydrate enzyme to F/2 medium. It was reported that the existence of NaHCO_3 has no effect on sugar production of both microalgae, whereas adding 0.25 mmol/L glyoxylate monohydrate enzyme caused an increase in sugar production of *Porphyridium cruentum* under the light intensity of 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Higher light intensity triggered the sugar production of *Prasinococcus* sp. but adding both of chemical components to the medium didn't have any remarkable effect on sugar production of this microalgae.

Keywords: *Porphyridium cruentum*, *Prasinococcus* sp., light intensity, sugar accumulation, sodium bicarbonate, sodium glyoxylate monohydrate

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımda bana her zaman destek olan danışmanım Prof. Dr. Meltem CONK DALAY'a çok teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren ve destekleyen Dr. Zeliha DEMİREL'e, teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım sırasında sorularımı yanıtlayan ve yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Sait SARGIN'a çok teşekkür ederim. Değerli katkı ve önerileri nedeniyle Sayın jüri üyelerime de teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu aşamasında da maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan sevgili ailem; annem Nasrin MASOOMI, babam Hossein TEBIANI, ablam Soroosh TEBIANI ve abim Sina TEBIANI'ye tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Mikroalglerin Genel Özellikleri	3
2.2 Mikroalg Üretimi İçin Gereki Olan Faktörler	4
2.2.1 Işık	5
2.2.2 Sıcaklık	6
2.2.3 Ph	7
2.2.4 Tuzluluk.....	8
2.2.5 Besin	8
2.2.6 Havalandırma.....	10
2.2.7 Oksijen seviyesi	10
2.3 Çevresel Faktörler Arasındaki Etkileşim.....	11

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

2.4 Polisakkaritler	13
2.5 Alglerin büyümesini ve polisakkarik üretimini etkileyen faktörler:	15
2.5.1 Işık ve sodyumbikarbonat	15
2.5.2 Karbon akışında artış	15
2.5.3 Işık rejiminin ve kalitesinin ekzopolisakkarit üretiminde etkisi	16
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1 Materyal	18
3.1.1 Mikroorganizmalar.....	18
3.1.2 Besin ortamları.....	19
3.1.3 Işık kaynağı.....	21
3.1.4 Ekipmanlar	22
3.1.5 Kimyasallar	22
3.2 Metot	23
3.2.1 Stok kültür hazırlanması	23
3.2.2 İnokulum hazırlanması:.....	23
3.2.3 Kültür sistemleri.....	24
3.2.4 Hücre konsantrasyon belirlenmesi	24
3.2.5 pH ölçümü.....	25

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.6 Hücre sayım yöntemi.....	25
3.2.7 Süpernatant eldesi.....	25
3.2.8 Toplam şeker analizi.....	25
3.2.9 İndirgen şeker tayini	26
3.2.10 Ön işlemler.....	27
3.2.11 Monosakkarit analizi	27
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	29
4.1 İndirgen şeker	29
4.2 pH	29
4.3 10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonunun Hücre Sayısına Etkisi.....	29
4.4 10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonun Klorofil A Miktarına Etkisi	30
4.5 10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonunun Hücre Yoğunluğuna Etkisi	31
4.6 10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonun Ekzopolisakkarit Miktarına Etkisi	33
4.7 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonun Hücre Sayısına Etkisi.....	34
4.8 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonun Klorofil A Miktarına Etkisi	35

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.9	50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat Konsantrasyonunun Hücre Yoğunluğunda Etkisi	36
4.10	50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonunun Ekzopolisakkarit Miktarına Etkisi	37
4.11	10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyum Glikosilat Monohidrat Enziminin Hücre Sayısına Etkisi	38
4.12	10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Glikosilat Monohidrat Enziminin Klorofil A Miktarına Etkisi	39
4.13	10 μE Işık Şiddeti ve 2 Farklı Glikosilat Monohidrat Enziminin Hücre Yoğunluğuna Etkisi	40
4.14.	10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyum Glikosilat Monohidrat Enziminin Ekzopolisakkarit Miktarına Etkisi	41
4.15.	50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumglikosilat Monohidrat Enziminin Hücre Sayısına Etkisi	42
4.16	50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyum Glikosilat Monohidrat Enziminin Klorofil A Miktarına Etkisi.....	43
4.17	50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Glikosilat Monohidrat Enziminin Hücre Yoğunluğuna Etkisi	44
4.18	50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Glikosilat Monohidrat Enziminin Ekzopolisakkarit Miktarına Etkisi	46
4.19	10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ve 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddetlerinde ve 0,54 ve 2 g/L Sodyum Bikarbonat ve 0,25 ve 1,25 mmol/L Enzim Varlığında Büyüme Hızında Değişimler	47

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.20 $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ve $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddetlerinde ve 0,54 ve 2 g/L Sodyum Bikarbonat ve 0,25 ve 1,25 mmol/L Enzim Varlığında Toplam Şeker Miktarındaki Değişimlerin Karşılaştırılması	48
4.21 $50\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Enzim Konsantrasyonunun Ekzopolisakarit Kompozisyonuna Etkisi	50
ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 <i>Prasinococcus</i> sp. - Işık mikroskobu görüntüsü, 63x	18
3.2 <i>Porphyridium Cruentum</i> - Işık mikroskobu görüntüsü, 63x	19
3.3 Stok kültür hazırlanma aşamaları	23
3.4 İnkübatör içinde üretim düzeni	24
3.5 Toplam şeker tayininde kullanılan standart eğrisi.....	26
3.6 İndirgen şeker tayininde kullanılan standart eğrisi	26
4.1 <i>Prasinococcus</i> sp. $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun hücre sayısına etkisi	29
4.2 <i>P. cruentum</i> $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 3 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun hücre sayısına etkisi.....	30
4.3 <i>Prasinococcus</i> sp. $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun klorofil A miktarına etkisi	30
4.4 <i>P. cruentum</i> $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 3 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun klorofil A miktarına etkisi	31
4.5 <i>Prasinococcus</i> sp. $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum bikarbonat konsantrasyonun 530 ve 680 nm'deki hücre yoğunluğu.....	32
4.6 <i>P. cruentum</i> $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum bikarbonat konsantrasyonun 530 ve 680 nm'deki hücre yoğunluğu	32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.7 <i>Prasinococcus</i> sp. 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti 22± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonun hücre sayısında etkisi	34
4.8 <i>P. cruentum</i> 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum bikarbonat konsantrasyonun hücre sayısında etkisi	34
4.9 <i>Prasinococcus</i> sp. 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ±2°C sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonun klorofil A miktarına etkisi.....	35
4.10 <i>P. cruentum</i> 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonun klorofil A da etkisi	35
4.11 <i>Prasinococcus</i> sp. 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum bikarbonat konsantrasyonun hücre yoğunluğunda etkisi	36
4.12 <i>P. cruentum</i> 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonun hücre yoğunluğuna etkisi	36
4.13 <i>Prasinococcus</i> sp. 10 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, ve 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre sayısına etkisi	38
4.14 <i>P. cruentum</i> 10 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2°C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre sayısına etkisi.....	39
4.15 <i>Prasinococcus</i> sp. 10 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin klorofil A miktarına etkisi.....	39
4.16 <i>P. cruentum</i> 10 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin klorofil A miktarına etkisi	40
4.17 <i>Prasinococcus</i> sp. 10 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum gliksalat monohidrat enziminin hücre yoğunluğuna etkisi.....	40

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.18 <i>P. cruentum</i> 10 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre yoğunluğuna etkisi	41
4.19 <i>Prasinococcus</i> sp. 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre sayısına etkisi.....	42
4.20 <i>P. cruentum</i> 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre sayısına etkisi	43
4.21 <i>Prasinococcus</i> sp. 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin klorofil A miktarına etkisi	43
4.22 <i>P. cruentum</i> 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin klorofil A miktarına etkisi	44
4.23 <i>Prasinococcus</i> sp. 50 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre yoğunluğuna etkisi	44
4.24 <i>P. cruentum</i> 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enzimin hücre yoğunluğuna etkisi	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Alglerin biyokimyasal kompozisyonu üzerindeki çevresel faktörlerin genel etki özeti.	12
3.1 F/2 ortamın kompozisyonu.....	20
3.2 İz element stok solüsyonunun	20
3.3 İz element stok solüsyonunun kompozisyonu.....	20
3.4 BG-11 ortamının kompozisyonu	21
3.5 BG-11 için iz element solüsyonun kompozisyonu.....	21
3.6 Kullanılan ekipman markaları ve özellikleri	22
3.7 Bruker HCT Ultra Ion Trap LC-MS ⁿ ile kütle dedeksiyonu	28
4.1 10 $\mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonun da hücrelerin spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresi.....	33
4.2 <i>Prasinococcus</i> sp. 10 $\mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22±2°C ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda ölçülen ekzopolisakkarit miktarı(mg/L)	33
4.3 <i>Porphyridium cruentum</i> ’ da 10 μmolE ışık şiddeti, 22±2°C ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda ölçülen ekzopolisakkarit miktarı (mg/L)	33
4.4 50 $\mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonu da elde edilen spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresi	37

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.5 <i>Prasinococcus</i> sp. de $50\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda ölçülen ekzopolisakkarit miktarı (mg/L)	37
4.6 <i>P. cruentum</i> 'de $50\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda ölçülen ekzopolisakkarit miktarı (mg/L)	38
4.7 $10\mu \text{ molE}$ ışık şiddeti ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat konsantrasyonun'da elde edilen spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresi.....	41
4.8 <i>Prasinococcus</i> sp.'de $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enzim varlığında ölçülen ekzopolisakkarit miktarı (mg/L).....	42
4.9 <i>Porphyridium cruentum</i> 'da $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enzimin varlığında ölçülen ekzopolisakkarit miktarı (mg,L)	42
4.10 $50\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat konsantrasyonun'da elde edilen spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresi.....	45
4.11 <i>Prasinococcus</i> sp.'de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat varlığında ölçülen ekzopolisakkarit miktarı	46
4.12 <i>P. cruentum</i> 'da $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat varlığında ölçülen ekzopolisakkarit miktarı (mg,L)	46

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.13 14.günde $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ve $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve $22 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ölçülen eksopolisakkarit miktarı (mg/L).....	50
4.14 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 3 farklı enzim konsantrasyonunun ekzopolisakarit kompozisyonuna etkisi	50
4.15 Aktif biyofilmden elde edilen kapsular polisakkaritin kompozisyon incelenmesi.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Fuc	Fukoz
Rhamn	Ramnoz
Ara	Arabinoz
Gal	Galaktoz
Glc	Glukoz
Man	Mannoz
ClcA	Glukuronik asit
Rib	Riboz
GalA	Galaktronik asit

1. GİRİŞ

Ekonomilerin gelişmesi ve dünya nüfusunun artmasıyla dünyanın doğal kaynakları hızla tükenmektedir. Tahminlere göre 2050 yılında, dünya nüfusu günümüz nüfusunun 1,5 katı olan 9 milyona ulaşacaktır. Günümüz koşullarına göre geçmişte sürdürülebilir çevre ihtiyacı bu kadar fazla değildi. Mikroalg yetiştiriciliği biyolojik temelli ekonomiye geçiş yapılmasına ve sürdürülebilir bir çevre edinilmesine yardımcı olabilir. Algler sadece çevre dostu hammadde üretimi açısından değil aynı zamanda atık suların tekrar kullanılabilmesi açısından da önemlidir (Hans Wolkers et al, 2011).

Biyoteknoloji çağında mikroalgal biyoteknoloji geliştirmekte olan alanlardan biridir (Kyong and Choul-Gyun, 2001). Okyanusların dünya yüzeyinin %70'den fazlasını kapsamasından dolayı deniz mikroorganizmaları geniş çeşitlilikte besleyici ürünlerin zengin kaynağı olarak önerilmektedirler. Deniz ortamları fonksiyonel materyallerin temelini içermektedir. Bu fonksiyonel materyaller doymamış yağ asitleri, polisakkaritler, gerekli mineraller, antioksidanlar, enzimler ve biyoaktif peptidleri kapsamaktadır (Mayakrishnan et al., 2013).

Mikroalglerin kültüre alınması 20. yüzyılın sonuna doğru gerçekleşmiştir. Geçmişten günümüze mikroalg biyoteknolojisi konusunda yapılan ticari ve bilimsel çalışmalar giderek önem kazanmıştır. Bugün 1500 tonluk hasat ile alg üretimi dünya çapında yaklaşık 10 milyon dolarlık bir pazara sahiptir(Wolkers et al., 2011)

Algler güneş enerjisini biyodizele çevirmekte bitkilerden daha verimlidirler. Çünkü bitkilerle kıyaslandığında iç ve dış yetiştiricilikte daha az alana ihtiyaç duyulmaktadır ve belirli bir miktar biyodizel üretmek için iç sistemlerde 1000 kat daha az suya ihtiyaç duymaktadırlar (Al-Qasmi et al., 2012).

Algal polisakkaritler endüstriyel özelliklere sahip olmaları nedeni ile ilgi uyandırmışlardır (Standford and Baird, 1983). Algler endüstride kullanılacak emülsifier, stabilizer ve koyulaştırıcı için alternatif polisakkarit kaynağı sağlayabilirler. Uzun zamandan beri kırmızı mikroalglerin suda çözünebilen polisakkaritlerinin jelleşme özelliğinden dolayı ilgi çekmektedir. Polisakkaritler ksiloz, glikoz, galaktoz ve sülfat esterlerinden oluşan asidik bir heteropolimerdir. Bu polimer iki değerlikte olan katyon boyunca iyonik bağlar kurar, böylece

yüksek moleküler ağırlığa ulaşır ve termodinamik olarak stabil bir yapı oluşturur (You and Barnett, 2004).

Prasinococcus sp. (yeşil mikroalg) ve *Porphyridium cruentum* (kırmızı mikroalg) polisakkaritler gibi değerli biyokimyasalların üretimi için kullanılan mikroalg türleridirler. Bu çalışmada, iki farklı ışık şiddetinde (10 ve $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) F/2 ortamına kontrole karşı iki farklı kimyasal (sodyum bikarbonat ve sodyum gliokzilat monohidrat enzimi) ekleyerek ticari polisakkarit ürettiği bilinen *P. cruentum*'a karşı *Prasinococcus* sp.'nin toplam şeker miktarında ki değişim incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Mikroalglerin Genel Özellikleri

Mikroalgler biyologlar tarafından fitoplankton olarak tanımlanan, 1-50 mikrometre çapında, çok küçük bitki benzeri köksüz ve yapraksız organizmalardır. Mikroalgler ve makroalgler ile birlikte sucul biyokütlenin bir parçasıdır. Bu mikroorganizmalar yüz binlerce tür içerip, tatlı ve deniz suyunda yaygındır ve birçok tür besin zincirinin temelini oluşturmaktadır. Çoğu türler klorofil içermektedir ve bu sayede güneş ışığını enerji kaynağı olarak kullanıp karbondioksiti biyokütleyle dönüştürmektedir. Bu fotosentez prosesinde alg O_2 üretir. Dünya çapında mikroalgler, hayvanların ve insanların oksijen ihtiyaçlarının %75 den fazlasını karşılamaktadır (Hans Wolkers et al, 2011).

Normalde mikroalgler çıplak gözle görünmezler ama eğer su ototrofik olursa alg patlaması gerçekleşir, suyun rengi yeşil, mavi ya da turuncu renge dönüşür. Literatürde toplam 200,000-800,000 farklı türden sadece onlarca kadar tanımlanmıştır. Mikroalglerin genetik analizleri ve DNA dizilimi hala devam etmektedir. Bu nedenle henüz tamamlanmış ve tutarlı bir sınıflandırma mevcut değildir. Şu anda taksonomistler mikroalgleri 7 ana guruba ayırmışlardır(Hans Wolkers et al., 2011).

Yeşil Algler, 7500 türle en büyük alg guruplarından birini oluşturmaktadırlar. Bu algler bitkiler gibi klorofil ve büyük miktarda protein içermektedirler. Bunlara ek olarak, stres altında bu mikroorganizmalar hücre içinde nişasta ve yağ üretmektedirler. Yeşil mikroalgler tek hücreli ve çok hücreli türler şeklinde bulunmaktadır. *Chlorella* tanınmış tek hücreli bir türdür ve ticari olarak yetiştirilmektedir (Hans Wolkers et al., 2011).

Kırmızı Algler, 500 ve daha fazla türden oluşan, çok hücreli yapıları olan bir guruptur ve denizlerin git-gel bölgesinde yaşamaktadırlar (Hans Wolkers et al., 2011).

Tek hücreli olan diyatom grubu 100,000'den fazla türle yeryüzünde en çok biyokütle oluşturur. Diyatomlar tatlı ve tuzlu sularda zooplanktonların kaçınılmaz yem kaynağıdır. Bu mikroorganizmalar silikalı bir iskelete sahiptir. Bu iskeletler bir kürenin iki yarısı gibi bir birine uymaktadırlar. Bu grup daha çok

yağ üretmektedir ve bunu da hücre içinde depolamaktadır (Hans Wolkers et al., 2011).

Çok hücreli olan kahverengi Algler, Hemen hemen 1500-2000 türe sahiptirler. Tamamen denizde yaşamaktadırlar. Bu grup makroalgler, klepler gibi sahilde bulunurlar ve bu nedenle birçok kişi tarafından eski yosunlar olarak kabul edilirler (Hans Wolkers et al., 2011).

Altın Algler, 1000 türden oluşan tek hücreli ve altın sarısı renkli alglerdir. Daha çok tatlı suda yaşarlar fakat aynı zamanda denizel türleri de bilinmektedir. Bu mikroalgler hareket etmelerine yardımcı olan flagella (kamçıya)'ya sahiptir (Hans Wolkers et al., 2011).

Sarı-yeşil Alglerin kahve renkli alglerle yakın bağlantısı vardır fakat yaklaşık 600 türü tek hücrelidir ve tatlı suda yaşamaktadır. *Nannochloropsis* denizde hızlı üreyen tek denizel türüdür. Bu algler büyük miktarda yağ üretirler ve bu nedenle biyodizel eldesi için son derece uygundur (Hans Wolkers et al., 2011).

Mavi-yeşil Algler (Siyanobakterikler), toksin üretebilen bir grup olarak tanımlanmaktadır ve yüksek konsantrasyonlarda olunca suyun kalitesini etkileyebilmektedirler. Mavi-yeşil algler fazla besini nişasta formunda depolamasına rağmen, hücrenin yarıdan fazlası proteinden oluşmaktadır. *Spirulina* Dünya çapında yetiştirilmekte ve gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır (Hans Wolkers et al., 2011).

2.2 Mikroalg Üretimi İçin Gerekli Olan Faktörler

Her alg türü besin ve ışık ihtiyaçları, yaşam döngüsü ve üreme koşulları bakımından farklılık gösterir. Bu nedenle kültürün durumu alglerin çoğalma oranında ve biyokütle üretiminde kültürün durumu önemli bir etkisi vardır (Krzeminska et al., 2013).

Mikroalglerin büyümesini etkileyen çevresel faktörler; Sıcaklık, pH, tuzluluk, inorganik karbon kullanılabilirliği, ışık vb'dir. Işık miktarı ve kalitesi fotosentez için gereken enerji miktarını belirlemektedir. Aynı şekilde karanlık/ışık döngüsü de önemlidir çünkü alglerin büyümesini ve biyokütle üretiminide etkiler. Işık kalitesinin değişmesi mikroalglerin biyokimyasal kompozisyonlarında

değişikliklere neden olur. Işık/karanlık döngü sıklığı artarsa ciddi bir şekilde verimlilik ve fotosentez etkisi artabilir (Krzeminska et al., 2013)

Sıcaklığın alg kültürlerinin genel biyokimyasal bileşimi üzerinde etkili bir faktör olduğu yaygın bir şekilde kabul edilmiştir (Dermoun and Chaumont, 1992).

2.2.1. Işık

Alglerde bitkiler gibi inorganik maddeleri organik maddeye dönüştürmek için fotosentez yaparlar ve bu proses içinde ışığı enerji kaynağı olarak kullanırlar. Işık, yoğunluğuna, şiddetine, spektrum kalitesine ve aydınlatma süresine göre değişiklik göstermektedir (Sukatar, 2002).

- Işık koşulları (süre ve yoğunluk) doğrudan mikroalglerin büyümesini ve fotosentezini etkilerler. Mikroalglerin verimli bir fotosentez için ışık/karanlık döngüsüne ihtiyaçları vardır. Fotokimyasal faz yani ATP (adenozin tri fosfat) ve NADH (Nikotinamid adenin dinükleotit) üretimi için ışığa ve biyokimyasal faz yani alglerin büyümesi ve gerekli moleküllerin üretilmesi için karanlığa ihtiyaç vardır (Cheirsilp and Torpee, 2012).

- Işık yoğunluğu, kültürün derinliğine ve alg konsantrasyonuna bağlı olarak ayarlanmalıdır. Örneğin, araştırmalara göre erlende yapılan ekimler için 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sn}$ ışık yeterli olabilir ama daha büyük hacimlerde ekim yapılıyorsa 100-230 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sn}$ ışık yoğunluğu gerekmektedir (Sukatar, 2002). Deneysel araştırmalarda belirtilen ışık süresinin artırılması kültüre edilen mikroalglerin sayısındaki artışla, ışık yoğunluğundaki gibi doğrudan orantılıdır (Al-Qami *et al.*, 2012). Güneş ışığın yoğunluğu gün boyunca ve mevsimlerde değişiklik göstermektedir. Aydınlatma bir algin verimliliğinde önemli etkiye sahip olan faktördür. Işık enerjisi tamamen alg büyümesini destekler fakat aydınlatma fazla olursa oksidasyon stresine yol açabilir (Simionato et al., 2013). Mikroalglerin fotobiyoreaktörde yetiştirilmesi için uygun ışık süresine, ışık yoğunluğuna ve ışık dalga boyuna ihtiyaç duyulmaktadır. Yetersiz ışık sınırlı büyüme, fotooksidasyona ve inhibasyona neden olabilir (Carvalho et al., 2010).

- Işık kaynağı doğal ya da floresan lambalar gibi yapay olabilir. Aşırı ışık yoğunluğundan fotorespirasyon meydana gelebilir bu yüzden aşırı ışıktan kaçınılmalıdır. Bunun yanı sıra kaçınılması gereken diğer faktör ışık kaynağın ortamı ısıtmasıdır. Bu nedenle floresan tüplerin ışık kaynağı olarak kullanılmaları

uygundur. Bu tüpler hem ortamı ısıtmaz hemde fotosentezin en fazla yapıldığı spektrumları yani mavi ve kırmızı desteklemektedir. Aydınlatma süresi en az 18 saat olmalıdır (Sukatar, 2002).

Işık şiddetini ölçmek için kuantum sensörlü kuantummetre kullanılmaktadır (Sukatar, 2002).

Mikroalgler çevresel fizikokimyasal değişimlere yanıt vermektedirler ancak bu çevresel etkileşimlerin doğası ve boyutu henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Carvalho et al., 2010).

2.2.2 Sıcaklık

Sıcaklığın kültür hücreleri üzerinde etkisi başlıca iki faktörle ilgilidir. Birincisi, hücre bileşenlerinin yapısı özellikle proteinler ve yağlar (metabolik düzenleyici mekanizmalar); ikincisi ise enzim reaksiyonların hızı (hücre geçirgenliği ve hücre bileşimi)'dir (Carvalho et al.,2010).

Fitoplankton kültürlerinin optimum sıcaklığı genellikle 20-24°C arasındadır. Fakat bu sıcaklık kültürün besin ortamına ve ekilmiş olan algin türüne göre değişir. Kültüre alınan alglerin çoğu 16-27°C aralığındaki sıcaklığa tolerans gösterebilmektedir. Sıcaklık 16°C den düşük olursa büyümeyi yavaşlatabilir ve 35°C fazla olursa genellikle hücrelerin ölmesine neden olabilir. Ülkemizde sıcak bölgelerde alg külürlerini fazla sıcaktan korumak için üst katmanlarına sürekli soğuk su püskürtülmeli yada ortam klima cihazlarıyla oda sıcaklığında tutulmalıdır (Sukatar., 2002).

Sıcaklık, alglerin büyüme hızını, hücre boyutunu, biyokimyasal kompozisyonunu ve besin gereksinimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Renaud et al., 2002). Optimum sıcaklıkta büyüme minimum hücre boyutuna neden olur ve optimum olmayan koşullarda karbon ve nitrojen kullanım verimliliği azalır. Yetersiz sıcaklıkta sitoplazmik viskozite değişikliklerinin daha az etkili karbon ve azot kullanımına neden olduğu düşünülmektedir. Sıcaklık değişimi ile en sık görülen değişikliklerden biri hücre zarındaki doymamış yağ asitlerin miktarının değişimidir. Ayrıca sıcaklık algal büyümesini etkileyen fotorespirasyonda önemli bir rola sahiptir (Juneja et al., 2013). Sıcaklık alglerin hücre içinde nişasta kompozisyonunu etkilemektedir (Emerson et al., 1944; Juneja et al., 2013). Artan sıcaklık, üretilen nişastanın bozulmasına neden olur (Juneja et

al., 2013). Sıcaklık karotenoid oluşumu üzerinde de önemli bir etkiye sahiptir. Karotenoidler fotosentez için ışık enerjisini absorbe ederken fotohasardan klorofili korur (Armstrong and Hearst, 1996). Alg türlerinde karotenoid birikimi sıcaklığın artmasıyla artar çünkü sıcaklık artınca oksidatif etki ve fotohasar etkisi de artar (Tjahjono et al., 1994; Tripathi et al., 2002; Juneja et al., 2013). Başka bir çalışmada, siyanobakteri *Synechocystis* sp. ve yeşil alg *Chlorococcum* sp.'den oluşan bir biyofilmin kapsular polisakkarit (CPS) miktarı, 20°C ve 30°C sıcaklıkta 60 µmolE ışık şiddetinde incelenmiştir. Bu çalışmaya göre, CPS miktarı 30 °C ve 60 µmol E de 20 °C sıcaklığına göre daha yüksektir. Bu çalışmanın başka konusu farklı sıcaklık ve farklı ışık şiddetinde kompozisyonda olan monosakkaritlerin miktarının değişmesidir. Bu çalışmada, fukoz (Fuc) monosakkariti 120 µmolE ışık şiddetinde 20 °C de 0 iken 30 °C de %11,8 mol arttığı belirtilmiştir (Di Pippo et al., 2011).

2.2.3 pH

pH, CO₂ ve besin nutrienlerin çözünürlüğünü ve kullanılabilirliğini etkilediğinden ve alglerin metabolizması açısından önemli bir faktördür (Juneja et al., 2013). Algler inorganik karbonu kullandıkları için ortamın pH' ı artabilir (Hansen, 2002; Juneja et al., 2013). Alglerin maksimum büyümesi nötr pH' da gerçekleşmektedir. Optimum pH alglerin büyümek için ilk adapte olduğu kültür pH' sıdır. Ortam pH' sındaki her hangi bir değişiklik alglerin büyümesini kısıtlayabilir çünkü pH düşüşü metabolik inhibisyona neden olur (Juneja et al., 2013). Özellikle pH, su içerisinde bulunan karbon çeşitlerinin konsantrasyonunun belirlenmesinde önemlidir (Azov, 1982; Juneja et al., 2013). Yüksek pH, CO₂'den karbonun kullanılmasını kısıtlar, bu da alg büyümesini baskılar (Azov, 1982; Juneja, 2013). Yüksek pH'da algerin ihtiyacı olan karbon karbonat şeklindedir. Alkali pH trigliserid birikiminde artışa neden olur ama hücre döngüsünde inhibisyon meydana geldiğinden hücre zarındaki polar lipidlerin miktarında düşer. *Chlorella*' nin membran lipidlerinin alkali' pH da daha az doymamış olduğu gözlenmiştir. Alkali pH gibi asidik pH da besin alımını değiştirebilir ve metal toksisitesine yol açarak alglerin büyümesini etkiler (Juneja et al., 2013). Alglerin bir çok türü maksimum büyümeyi nötr pH (7.0-7.6) da gösterir. Başka bir araştırmaya göre bir çok alg için ortam pH'sı 7 ile 9 arası olabilir ama optimum pH 8.2-8.7 arasında değişmektedir. Kültürdeki aşırı hücre ölümlerinde serbest hücre kalıntılarından dolayı pH aşırı derecede düşebilir bu sebepten dolayı yoğun kültürlerde ortama karbondioksit ilavesi yapılır, pH değeri artırılabilir (Sukatar, 2002).

2.2.4 Tuzluluk

Algal hücrelerin biyokimyasal kompozisyonunu değiştiren diğer bir faktör tuzluluktur (Aksi belirtilmediği sürece tuzluluk başlıca sodium klorür konsantrasyonu anlamına gelir). Alglerin adapte olduğu tuzluluk seviyesinden yüksek ya da düşük seviye de tuzluluğa maruz kalmaları onların büyüme hızını ve kompozisyonunu değiştirebilir. Örneğin, yüksek tuzluluk alglerin lipid içeriğini arttırır (Zhila et al., 2010; Juneja., 2013). *Dunaliella*'da NaCl konsantrasyonu 0,4 M den 4 M çıkınca doymamış ve mono-doymamış yağ asitleride bir artış göstermiştir (Xu and Beardall, 1997; Juneja, 2013). Çoğu tür, doğal ortamdaki tuzluluk derecesinden daha düşük tuzluluklarda daha iyi büyümektedir. Bir çok tür için 20-24 g/L arasındaki salinite oldukça uygundur (Sukatar, 2002).

2.2.5 Besin

Besin kısıtlaması hangi besin ve ne derece kısıtlı olduğuna bağlı olarak alglerin biyokimyasal kompozisyonunda önemli değişime neden olmaktadır. Genellikle alglerin büyüme hızı, pH ve sıcaklığın optimum olduğu koşullarda en fazla kısıtlı besin alınımları hızı ile orantılıdır ve genellikle Michaelis-Menten denklemi ile tarif edilmektedir (Titman, 1976; Juneja et al, 2013).

Azot ve fosfor hücre büyümesi ve metabolizma için önemli makrobesinlerdir. Nitrojen protein ve nükleik asitlerin oluşumunda temel yapıtaşdır. Ayrıca her canlının önemli makromolekülleri yani DNA ve RNA'nın temel yapısının bir parçasıdır (Juneja., 2013). Bu önemli besinlerin sınırlanması organizmanın metabolik yolunun değişmesine neden olur. Karbon, hidrojen ve oksijen mineral olmayan fakat çok önemli besinlerdir. Alglerde karbon fiksasyonu 3 amaç için gerçekleşmektedir: (1) solunum, (2) enerji kaynağı, (3) hücre oluşumunda hammadde (Berman-Frank and Dubinsky, 1999; Juneja et al., 2013). İndirgenmiş karbon fiksasyon oranı, algal hücrelerin büyüme hızının azalmasını gösterir. Algler fotosentez için inorganik karbona ihtiyaçlar duyar. ototrofik büyümede karbon kaynağı CO₂, karbonat ve bikarbonat şeklinde iken, heterotrofik büyümede asetat ve glukoz şeklinde kullanılabilir (Juneja et al., 2013).

Azot: Azot alg hücrelerinin tüm yapısal ve fonksiyonel proteinleri için önemli bir bileşendir ve hücrenin kuru ağırlığında %7-%20'sini oluşturur. Algler tarafında alınan inorganik azot hemen biyokimyasal aktif maddeye dönüşür hem de değişen fizyolojik ihtiyaçlarını karşılamak için geri dönüşüm yapar (Juneja et

al., 2013). Algal kültürlerde azot eksikliği biyosentezin gelişmesine neden olurken yağ ile (Converti, 2009; Demirbas, 2010) triglisirid birikmesini sağlar ve protein içeriğinde bir azalamaya neden olur (Morris et al,1974; Kilham, 1997; Juneja et al, 2013). Azot kısıtlanmasındaki diğer etkiler ise oksijen değişikliğide, karbondioksit fiksasyonunda, klorofil içeriğide ve doku üretiminde azalmaya neden olmasıdır (Kolber, 1988, Richardson,; Juneja et al., 2013). *Chlorella pyrenoidosa* da artan aminoasit içeriği, yetiştirilen kültüre amonyun (azot kaynağı) ilavesi ile şekerfosfatlarının (örneğin, glikoz-6-fosfat, fruktoz-6-fosfat) tüketilmesiyle açıklanmıştır (Juneja et al., 2013).

Fosfor: Alglerin normal büyümesi ve hücre gelişmesi için fosfor önemli bir bileşendir (Juneja et al., 2013). Bilindiği üzere doğal ortamlarda fosfor, azota göre daha fazla sınırlayıcı bir besindir (Larned, 1998). Genellikle fosfor alglerin % 1 hücre kuru ağırlığını teşkil eder (Borchardt and Azad, 1968; Juneja et al., 2013). Ama ilave edilen fosforlar metal iyonlarıyla kompleks oluşturdıkları için hepsinden yararlanmaları mümkün değil bu nedenle daha fazla fosfor ilavesi yapılmalıdır (Chisti, 2007; Juneja et al., 2013). Fosfor sınırlandırılmasının en hızlı etkileri arasında Kalvin-Benson döngüsünde substrat yenilenmesinde sentezi azaltılır ve karbon fiksasyonu için gereken ışığın kullanımı düşürür. Fosforun sınırlandırılması organizmalarda lipit birikmesine yol açar. *Scenedesmus* sp. de başlangıç daki fosfor miktarının 2 mg/L den 0.1 mg/L'a düşmesi ile toplam lipit içeriği %23'den %53'e yükselmiştir (Juneja et al., 2013). Azot eksikliği gibi fosfor eksikliğinde de klorofil a ve protein içeriğini azalırken karbonhidrat miktarını artırır (Kilham et al,1997; Juneja et al.,2013). Ayrıca fosfat kısıtlamasında astaksantin birikimi ve hücre büyümesinde azalma olduğu belirlenmiştir (Kobayashi et al., 1993; Juneja et al., 2013)

İz metal: İz metaller algal hücrelerde son derece küçük miktarlarda bulunan metallerdir (<4 ppm). Demir (Fe), mangan (Mn), kobalt (Co), çinko (Zn), bakır (Cu) ve nikel (Ni) hücrelerin çeşitli metabolik fonksiyonları için gereken 6 önemli iz metaldir (Juneja et al., 2013). İz metallerin eksikliği hücre büyümesini sınırlayabilir ama bu metallerin fazla olması da (toksisitesi) büyümeyi engelleyebilir, fotosentezi azaltabilir, antioksidanları tüketebilir ve hücre zarına zarar verebilir (Juneja et al., 2013).

Demir hücrenin normal büyümesinde, solunumunda ve fotosentez işleyişin de en önemli iz metaldir. Ayrıca demir, fotosentezde redoks katalizörü olarak görev alır ve fotosentez yapan organizmalarda azotözümsemesini gerçekleştirir ve

elektron taşıma reaksiyonlarında aracılık yapar. *Chlorella vulgaris* de demir konsantrasyonu yüksek olunca lipid miktarı artar (Liu et al., 2008; Juneja et al., 2013) ve demir miktarı azalınca karotenoid miktarı azalır (Kobayashi et al.1993; Van Leeuwe and Stefels, 1998; Juneja et al.,2013). Gerekli olmayan metaller (örneğin; Cd, Ph ve Cr) hatta küçük miktarlarda bile olsalar, metabolik prosesleri önleyebilirler (Juneja et al., 2013). Bununla birlikte önemli ve gerekli elementler (örneğin; Zn ve Cu) eğer yüksek miktarlarda bulunurlarsa toksisiteye neden olabilirler (Campanella, 2001; Juneja et al., 2013). Alglerin hücre yüzeyinde metal iyonlar için yüksek afiniteye sahip fonksiyonel gruplar mevcuttur. Bu gruplar karboksilik, sülfidril ve fosfatik gruplarla metaller birleşip hücre yüzeyinden hücre içine taşırlar (Juneja et al., 2013).

2.2.6 Havalandırma

Havalandırma karıştırmaya yardımcı oluşu için önemli bir faktördür. Karıştırma alglerin büyümesine yardımcı olması ile birlikte biyokütlenin çökmesini engeller, alglerin besinlerden eşit bir şekilde yararlanmalarını sağlar, yoğun kültürlerde hücrelerin tamamının ışıktan faydalanmalarına yardımcı olur, ortamın sıcaklık katmanlaşmasını önler ve tank ile hava arasındaki alış verişini tetikler. Özellikle gaz alışverişi fotosentez için gereken karbon kaynağını sağladığı için önemlidir. Yoğun kültürlerde verilen havada yeterli karbon olmazsa (havada %0,03 CO₂ vardır) havayla birlikte karbondioksit verilmesi tavsiye edilir (Hava hacminin %1'i kadar). Çünkü karbondioksit hem karbon kaynağı olarak hemde CO₂ HCO₃ dengesini koruyarak suyun pH değişimini engellemekte tampon etkisi yaratır. Verilen havadan gelen kontaminasyonu engellemek için hava filtreleri kullanılmalıdır (Sukatar, 2002).

2.2.7 Oksijen seviyesi

Suda çözünmüş oksijen miktarı her saat başı ölçülmelidir. Bunun için biyolijik monitorlü (örneğin, YSI 5300) modeli kullanılabilir. Kültürdeki oksijen miktarı, oksijen doygunluğunun % 150'sini geçmemelidir, aksi takdirde kültürdeki algler zarar görmektedir. Bu oranı azaltmak için aydınlatmanın azaltılması gerekebilmektedir (Sukatar, 2002).

2.3 Çevresel Faktörler Arasındaki Etkileşim

Alg büyümesi ya da hücre kompozisyonun ilişkili olduğu diğer faktörler çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Örneğin, sıcaklığın yükselmesi ile nutriyentlerin kullanılabilirliği azalır (Sterner and Grover, 1998; Juneja et al., 2013). Smith ve Morris'e göre güney buz denizin de yapılan çalışmada yüksek sıcaklıkta fitoplanktonlar daha fazla karbonu proteine dönüştürürken lipid miktarı azalmıştır. Aksine Morris et al.'a göre *Phaeodactylum tricornutum* da düşük sıcaklıkta protein miktarı yükselmiştir (Morris et al., 1974; Juneja et al., 2013). Bu değişiklikler türün özelliğine, ışık yoğunluğuna ve farklı birincil büyüme koşullarına bağımlıdır (Juneja et al., 2013). Başka bir çalışmada Kudo et al'ın gözlemlediğine göre sıcaklık 5-30 °C'den fazla olursa demir stresi altında olan hücrelerin büyüme hızı demir varlığında büyüyen hücrelerin % 50'si kadardır (Kudo et al., 2000; Juneja et al., 2013). Alglerin büyüme hızı, ışık ve nutriyentler ile arasındaki ilişkiyle de değişebilir (Juneja et al., 2013). Cloern et al. göre nutriyentlerin varlığında ve düşük ışıktaki büyüme verimliliği artmıştır (Cloern et al., 1995; Juneja et al., 2013). *Chlorella pyrenoidosa*'nın büyüme hızı çok yüksek ışıktaki, düşük ve yüksek sıcaklıkta incelenmiştir. Yüksek ışıktaki ve yüksek sıcaklıkta büyüme hızı, yüksek ışık ve düşük sıcaklığa göre daha yüksek görünmüştür. Yüksek ışık ama düşük sıcaklıkta büyüme hızının düşmesi fotosentez üzerindeki olan etkiden dolayıdır (Sorokin and Krauss, 1962; Juneja, 2013). Çevresel koşulların alglerin biyokimyasal kompozisyonu üzerindeki etkileri Çizelge 2.1'de özetlenmiştir. Çizelgedeki sonuçlara göre, büyük çapta yetiştirilen alg hücrelerinin büyüme davranışlarını anlamak için önceki büyüme koşulları, farklı nutrientlerin etkileşimleri ve çevre koşulları ile bağlantısını bilinmek önemlidir (Juneja, 2013).

Çizelge 2.1. Algerin biyokimyasal kompozisyonu üzerindeki çevresel faktörlerin genel etki özeti (Juneja et al, 2013).

Etken Faktör	Organizma	Çevresel Koşullar	Gözlemlenen Biyokimyasal Değişiklik
Sıcaklık	<i>Botryococcus braunii</i>	Sıcaklığın 25 °C'den 35 °C'ye artırılması	Hücre içi lipid içeriğinin yağ ağırlıkta %22'den %5'e azalması Polisakkaritlerin birikimi
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Sıcaklığın 20°C'den 38 °C'ye artırılması	Sukroz artışına yol açan nişasta miktarında azalış
		Sıcaklığın 10°C'den 38 °C'ye artırılması	Isı ile geri dönüşebilen nişastanın L formundan (yüksek moleküler ağırlık), S formuna (düşük moleküler ağırlık) değişmesi
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Sıcaklığın 20°C'den 30 °C'ye artırılması	Astaksantin oluşumunda 3 kat artış
	<i>Chlorococcum sp.</i>	Sıcaklığın 5°C'den 20 °C 'ye artırılması	Toplam karotenoid hacminde iki kat artış
	<i>Nitella mucronata Miquel</i>	Sıcaklığın 5°C'den 20 °C'ye artırılması	Sitoplazmik hareketliliğin artması
Işık	<i>Dunaliella viridis</i>	Mutlak karanlık	Toplam lipid içeriğinin artması, serbest yağ asitleri, alkol ve sterol miktarlarının azalması,
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	Işığın kısıtlandığı ortam	Lipid içeriğinin artışı, EPA miktarının artışı
	<i>Porphyridium cruentum</i>	Kırmızı ışık	Fotosistem I ve fikobilizomlara nazaran fotosistem II 'nin gelişmesi
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Kırmızı ışık	Sukroz ve nişasta yapımının artışı
pH	<i>Chlamydomonas acidophila</i>	pH 4.4	V-lizin'lerin denaturasyonu
	<i>Coccochloris peniocyctis</i>	pH değerinin 7.0'dan 5.0 ve 6.0'a düşmesi	Toplam karbohidrat birikiminin azalması ve oksijenin oluşması
Nitrojen	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Nitrogen miktarının %75'lik azalışı	Lipid sentezinin %7.9'dan %15.31'e artması
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Nitrojen kısıtlaması	Lipid sentezinin artışı, protein içeriğinin azalışı
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Nitrogen miktarının %75'lik azalışı	Lipid sentezinin %5.9'dan %16.41'e artması
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Nitrojen kısıtlaması	Karotenoid oluşumunun artışı (%13 w/w)
Fosfor	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Fosforun Kısıtlanması	Fosfatidilgliserol'in azalışı
	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	Fosforun Kısıtlanması	Klorofil a ve protein miktarının azalışı, Karbohidrat ve lipid miktarının artışı
	<i>Selnastrum minutum</i>	Fosforun Kesilmesi	Respirasyon hızının azalması, fotosentetik CO ₂ fiksasyonunun azalışı
Demir	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Kısıtlanma	Hücre içi klorofil konsantrasyonunun azalması
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Demirin yüksek konsantrasyonu	Lipit miktarının artışı
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Demirin yüksek konsantrasyonu	Karotenoid oluşumunun artışı
Karbon	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	9.0'dan yüksek pH deyerleri	Yetersiz karbon birikimi, fotosentetik aktiviteleri aktif tutması için yüksek miktarda karbonat birikimi
	<i>Dunaliella salina</i>	CO ₂ konsantrasyonunun %2'den %10 bir günlük artışı	Yağ asit miktarının %30'luk artışı (kuru ağırlık üzerinden)
		CO ₂ konsantrasyonunun %2'den %10 yedi günlük artışı	Yağ asitlerinin 2.7 kat artışı
	<i>Spirulina platensis</i>	Arttırılmış CO ₂ konsantrasyonu	Karbohidrat miktarının artışı, protein ve pigmentlerin azalması

2.4 Polisakkaritler

Doğada karbohidratlar çoğu orta ve yüksek molekül ağırlıklı polimerler olan polisakkarit şeklinde bulunurlar. Glikanlar olarakda bilinirler. Polisakkaritler genellikle belli bir molekül ağırlığına sahip değildir. Polisakkarit zinciri için belli bir kalıp yoktur. Tekrarlanan monosakkarit birimleri zincir uzunluğunu, birimlerin bağlanma tipleri, bağlanma derecelerine bağlı olarak homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olarak ikiye ayrılırlar.

Homopolisakkaritler sadece tek bir tip monomer içerirler. Nişasta ve glikan gibi homopolisakkaritler bazı monosakkaritlerin depolanmış halidir. Selüloz ve kitin gibi homosakkaritler bitkilerin hücre duvarında ve hayvanların dış iskeletinde yapısal eleman olarak bulunurlar.

Heteropolisakkaritler iki veya daha fazla çeşit monomer içerirler. Heteropolisakkaritler tüm hayvanlar aleminde hücre dışı desteği sağlarlar. Hayvan dokularında hücre dışı boşluk birkaç heteropolisakkaritlerce doldurulur. Bu sayede hücreler bir arada tutturulur, koruma ve şekil vermeyi sağlar. Ayrıca hücre, doku ve organlara desek oluşturur (http://www.marmarabiyokimya.com/tl_files/biyo_kimya/files/02%20polisakkaritler.pdf).

Mikroorganizmalar intraselüler (depo) polisakkaritler, ekstraselüler (EPS) polisakkaritler ve yapısal formdaki polisakkaritler olmak üzere 3 ayrı polisakkarit türünü sentezlemektedirler. EPS (ekzopolisakkaritler) formları hücre duvarı ile birleşmiş olabilen kapsüller veya büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır.

EPS'ler glikozid bağları ile birbirine bağlı olan şeker ünitelerinden oluşmaktadır. Bakteriyel EPS'lerin çoğunluğu düzenli oligosakkaridlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarid yapıda, bazı bakteriyel EPS'ler ise tek tip şekerden meydana gelen bir homopolisakkarid yapıdadır. EPS'yi oluşturan homopolisakkaridlerin çoğunluğu nötr olmasına rağmen bir çok bakteriyel EPS negatif yük taşır ve yüksek kütleye sahiptir. Ayrıca polisakkaridler hidrofilik özellik taşımakla birlikte çoğu polimerler lipofilik, hidrofilik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir.

EPS'deki yapısal ve düzenleyici genlerin üretimi kromozomal veya plasmid DNA kodlu olabilir. EPS üretimini düzenlenmesi oldukça komplekstir ve hem

pozitif hem de negatif regülatörler içermektedir. Bu regülatörlerden bazıları global regülatörlerdir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğer hücre metabolizmalarının sentezini de düzenlemektedir. Ozmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarıların etkisiyle EPS üretimi etkilenmektedir (<http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070202.pdf>).

Polisakkaritler nötral, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerdir. Birçoğu hücre yüzeyini kaplar ve çeşitli biyolojik mekanizmalarda örneğin, bağışıklık tepkisi, yapışma, enfeksiyon ve sinyal transdüksiyonunda da önemli rola sahiptir (McWilliams, 2011; Sutherland IW, 1998). Yapılan araştırmalara göre bitki ve mantarların biyoaktif polisakkarit açısından zengin oldukları bilinmektedir. Bu polisakkaritlerin iltihaplı hastalıklar ve kanser tedavisinde kullanılabilir oldukları kanıtlanmıştır. Bu yüzden polisakkaritler yapı-fonksiyon analizleri ile biyolojik aktivite mekanizmasını açığa çıkaran araştırmalara yönelilmiştir (Ramberg et al., 2010). Polisakkaritler sağlık ve nanobiyoteknoloji sektöründe kullanımlarının yanı sıra, gıda ve kozmetik sanayinde koyulaştırıcı, biyoyapışkan, dengeleyici, probiyotik olarak (Donot et al., 2012; Nicolaus et al., 2010) ve çevre sektöründe emülsifayer, biyosorbent ve biyoflocculant olarak kullanılmaktadırlar (Sam et al., 2011). Polisakkaritler algal biyokütleden, yüksek bitkilerden veya bakteriyal ve fungal sıvı kültürlerin fermentasyonundan geri kazanılabilir.

Prasinococcales için yapılan bir patent çalışmasına göre polisakkariti buluşta kullanmak için elde edilen polisakkarit en az 1,2,3,4 veya 5 niteliklerle karakterize edilmelidir:

1. Moleküler ağırlık aralığı
2. Monosakkarit kompozisyonu
3. Bağışıklık aktivitesi
4. Sülfat içeriği (molekülün molekül ağırlığının bir yüzdesi olarak)
5. Vizkozite jel oluşturan özellikleri molekül ağırlık aralığı

Ayrıca bu araştırmaya göre eğer polisakkaritlerin herhangi bir terapötik kullanımı olmazsa bile kozmetik alanlarında kullanılabilir. *Prasinococcus capsulatus* veya *P.capsulatus* suşundan elde edilen polisakkaritlerden bir doğal besin takviyesi sağlanabilir. Bu polisakkaritler jel oluşturan sulfatlı bir heteropolimerdir. Molekül ağırlığı 670 kDa'dan büyüktür. Başlıca glukoz,

galaktoz, arabinoz ve uronik asit ünitelerinden oluşmaktadır (<http://www.google.com/patents/WO2013167911A1?cl=en>).

2.5 Alglerin Büyümesini ve Polisakkarik Üretimini Etkileyen Faktörler

2.5.1 Işık ve sodyumbikarbonat

Işık koşulları (süre ve yoğunluk) doğrudan mikroalglerin büyümesini ve fotosentezini etkiler. Mikroalgler verimli bir fotosentez için aydınlık/karanlık döngüsüne ihtiyaçları vardır. Fotootorofik büyüme aşamasında ışık, enerji kaynağıdır. Organizmalar ışık enerjisini kullanarak karbondioksidi organik bileşenlere özellikle şekerlere dönüştürürler (Juneja et al., 2013). Velea et al., a göreyararlı koşullar altında *Porphyridum purpureum* hücre kültürünün büyümesini optimize etmiş ve böylelikle ekzopolisakkaritin miktarı ve kalitesi artmıştır. Bu araştırmaya göre sıvıdan alınan CO₂ havadan alınan miktara göre daha yüksek oranda olduğu için ASW ortamı CO₂ ile zenginleştirilmiştir. Bu amaç için taşıyıcı olarak NaHCO₂ kullanımı belirtilmiştir. Beklenildiği gibi aydınlatma seviyesi 2 katına çıktığında alg kütlesi %25 oranında artmıştır. Ayrıca aydınlatmanın biyosentezde ve polisakkarit birikmesinde belirleyici bir faktör olduğu ispatlanmıştır.

2.5.2 Karbon akışında artış

Glikosilat yeşil yapraklarda ve olgunlaşmamış meyvelerde bulunur ve bazı alg türlerinde salgılanır, genelde orman toprakları, rizosfer topraklar ve yaprak yapılarında bulunur (Sakai et al., 2013). Glikosilat ve diğer organik asitler örneğin sitrat ve oksalat, bitkiler için iz metallerin çözünürlüğünü artırmaktadır. Glioksiat, örneğin glikosilat döngüsünde çeşitli metabolik yol izlerinde önemli ara üründür. Ayrıca glikosilat birçok bakteri tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Çeşitli ortamlarda glikosilat CO₂ ve H₂O'a dönüşerek veya dönüşmeyerek sonunda oksitlenir (Sakai et al., 2013).

Glikosilat metabolizması için çeşitli yol izleri bildirilmiştir. *Escherichia coli* de anaerobik koşullar altında glikosilatın oksidatif yıkımında dikarboksilik asit ve trikarboksilik asitdöngüleri bulunur (Kornberg and Sadler, 1961; Ornsto nand Ornsto, 1969; Sakai et al., 2013).

Glikosilat enzimi karbon metabolizmasını tetikleyen bir kimyasaldır. Bu kimyasal yüksek bitkilerde ve bazı siyanobakterilerde *Anabaena cylindrica* ve *Cyanospira capsulate* da fotorespirasyonu önleyerek fotosentez artışına neden olmaktadır (Yang et al., 2010). Alglerde glikosilat ilavesi, karbon akışında artış oluşturduğu için hücre içi polisakkarit birikimine ve çözünebilir ekzopolisakkarit salgılanmasına neden olur (Liu, 2010). Ayrıca glikosilat, gliserat yol izi ve trikarboksilik asit döngüsü ile metabolize edilir (Sakai et al., 2013).

2.5.3 Işık rejiminin ve kalitesinin ekzopolisakkarit üretiminde etkisi

Işık şiddeti, aydınlatma süresi ve ışık dalga boyu polisakkarit üretiminde ve hücre büyümesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Ligin et al., 2008). Işık kalitesi mikroalglerin büyümesini ve polisakkarit üretimini etkileyen bir faktördür. Benzer bir çalışmada panel tipi biyoreaktörde ışık dalga boyu ve ışık şiddetine göre *Porphyridum cruentum*'un büyümesi ve ekzopolisakkarit miktarındaki değişim incelenmiştir. Bu mikroalgin büyüme hızı ve polisakkarit üretimi ışık şiddetinin artması ile artmıştır. Ama çok yüksek şiddetler de mikroalgin büyümesini engellenmiştir. Aydınlatma süresi arttıkça büyüme sırasında hücrelerin bir kısmında ölüm gerçekleştiği için hücre sayısı azalmıştır. Böylece maksimum miktara göre hücre yoğunluğu ve ekzopolisakkarit üretimi sırayla % 61,7 ve % 67,4 düşmüştür. Sürekli aydınlatma büyüme hızını artmıştır ama maksimum polisakkarit miktarı 18:6 ışık/ karanlık döngüsün de elde edilmiştir.

Farklı ışık renklerinde polisakkarit miktarı değişiklik göstermiştir. Bununla ilgili bir çalışmada ise *P.cruentum* OMI ortamında ve $80 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ışık şiddetinde yeşil, nötr ve sarı ışıklarda polisakkarit miktarı artmıştır fakat mavi ve kırmızı ışıklar bu amaç için uygun bulunmamıştır (Ligin et al., 2008). Ama buna benzer başka bir çalışmada *P.cruentum*'dan elde edilen polisakkarit miktarı ASW ve $40 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ışık şiddetinde olankırmızı ve mavi ışıkta daha fazla belirlenmiştir (You ve M.Barnett, 2004).

Emerson ve Brody'nin teorisine göre ışık, hücrenin büyüme süresini ve stansyoner faza gelmesini kısaltabilir. Işık seviyesi ve kalitesi hücre büyümesinde ve polisakkarit büyümesine önemli bir rola sahiptir (C.H. Wang ve S.H.Wen, 1999; Ligin et al., 2008).

Emersonun belirttiğine göre *Chlorella*'da yeterli fotosentez mavi ve kırmızı ışıklarda gerçekleşmiştir ama *P. cruentumda* aynı sonuç elde edilmemiştir. *P.cruentum* büyüme esnasında yüksek ışık şiddetinde meydana gelen fotoinhibasyon belirtilerinin sebebini muhtemelen kloroplast lamellatlarının bozulmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Bao ve Changhai, 2003; Ligin et al., 2008).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

Bu çalışmada, polisakkarid üretim miktarını incelenmek üzere *Prasinococcus* sp. (EGEMACC 50) suşu ve *Porphyridum cruentum* (EGEMACC 9) Ege Üniversitesi mikroalg kültür koleksiyonun'dan (EGEMACC) temin edilmiştir.

Algaebase'de *Prasinococcus* sp. sınıflandırılması (<http://eol.org/pages/11820338/overview>):

Empire : Eukaryota

Kingdom: Plantae

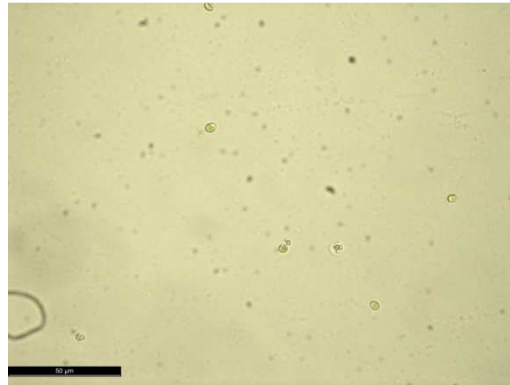
Phylum: Chlorophyta

Class: Prasinophyceae

Order: Prasinococcales

Family: Prasinococcaceae

Genus: *Prasinococcus*



Şekil 3.1 *Prasinococcus* sp. - Işık mikroskobu görüntüsü, 63x

Algaebase’de *Porphyridium cruentum*’un sınıflandırılması:

Empire: Eukaryota

Kingdom: Plantae

Phylum: Rhodophyta

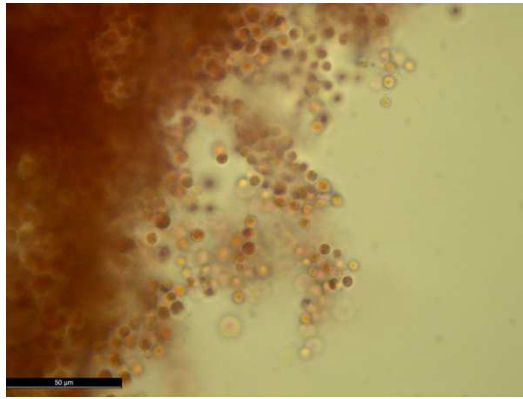
Subphylum: Rodellophytine

Class: Porphyridiophyceae

Order: Porphyridiales

Family: Porphyridiaceae

Genus: Porphyridium



Şekil 3.2 *Porphyridium Cruentum* - Işık mikroskobu görüntüsü, 63x

3.1.2 Besin ortamları

Prasinococcus sp.’nin inokülüm ve kültivasyonu için F/2 ve *P. cruentum* mun inokulumu için deniz suyuna BG11 ve kültivasyonu için F/2 ortamı kullanılmıştır. Bu ortamların kompozisyonu Çizelge 3.2 ve 3.3’te gösterilmiştir.

Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Merk markadır. Kimyasallar distile suda çözülüp pH 7 ye ayarlanmıştır. Katı kültür ortamı için 15 g/L agar ilave edilmiştir. Kültür ortamlarını steril hale getirmek için 121°C’de 20 dakika otoklav kullanılmıştır.

F/2 ortamın hazırlanışı: 998 ml saf suyun içine Çizelge 3.1’de belirtilen bileşikler ve çözeltiler ilave edildi. 1 M NaOH veya HCl ile pH 8.0’e ayarlandı. Bileşiklerin çözülmesi için besin ortamı manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.

Çizelge 3.1 F/2 ortamın kompozisyonu

Bileşik	Miktar
Deniz tuzu	30 g/L
NaNO ₃	0,075 g/L
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,005 g/L
F2 iz element solüsyonu	1cc
Vitamin solusyonu	1cc

İz element stok solüsyonunun hazırlanması:

1000 ml saf suya aşağıdaki bileşikler ilave edildi. Bileşiklerin çözülmesi için manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

Çizelge 3.2 İz element stok solüsyonunun

Bileşik	Miktar (g/L)
Na ₂ EDTA	4,36
FeCl ₃ .4H ₂ O	3,15
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006

Vitamin stok solusyonunun hazırlanışı:

1000 ml saf suya aşağıdaki bileşikler ilave edili. Vitamin solüsyonu ortam sterilizasyonu yapıldıktan sonra ilave edildi.

Çizelge 3.3 Vitamin stok solüsyonunun kompozisyonu

Bileşik	Miktar (g/L)
Thitamin HCL	0,1
B ₁₂ vitamini	0,0005
Biyotin	0,0005

BG-11 (Blue-Green Algae) ortamının hazırlanması:

829 mL saf suya çizelge 3.4’ de belirtilen bileşikler ilave edildi. 1M NaOH ve HCl ile pH değeri 7,1’e ayarlandı. Bileşiklerin çözülmesi için besin ortamı manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

Çizelge 3.4 BG-11 ortamının kompozisyonu

mL	Stok hazırlanması	Miktar(g/L)
100	NaNO ₃	15
10	K ₂ HPO ₄	4
10	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5
10	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6
10	Sitrik asit	0,6
10	Amonyum ferric sitrat	0,6
10	Na ₂ EDTA	0,1
10	Na ₂ CO ₃	2
1	İz element solüsyonu	
	Deniz tuzu	30

İz element stok solüsyonunun hazırlanması:

1000 mL saf suya aşağıdaki bileşikler ilave edildi. Bileşiklerin çözülmesi için solusyon manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Çizelge 3.5 BG-11 için iz element solüsyonun kompozisyonu

Bileşik	Miktar (g/L)
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079
Co(NO ₃).6H ₂ O	0,0494

3.1.3 Işık kaynağı

Işık kaynağı olarak philips marka (18w/54) gün ışığı floresans ve cata marka (15 w) LED white lambalar kullanılmıştır.

Işık şiddetini ölçmek için kuantum sensörlü kuantum metre kullanılmıştır.

3.1.4 Ekipmanlar

Çizelge 3.6’da kullanılan ekipmanların markaları ve özellikleri verilmiştir.

Çizelge 3.6 Kullanılan ekipman markaları ve özellikleri

Marka	Marka ve Özellikler
Otoklav	Hirayama HMC
Santrifüj	Hettich Universal 32R
Spektrofotometre	ULTrospec 1100 pro
Lüksmetre	Lutron LX-105
pH-metre	Hanna HI 2211
Vortex	Stuart scientific SA 2
Analitik terazi	RADWAG AS 220/c12
Membran filtre	Sartorius Stedim Glass-Microfibre Discs Dia:47mm
Su banyosu	Memmert wi 322
Çalkalayıcı	IKAKS 4000 ic
Kültür dolabı	Şenocak
Mikroskop ve fotoğraf çekim aparatı	Olympus CH40
Etüv	Memmert
Rotary evaporator	Rocker
Derin dondurucu	Vestel
Pipet 100-1000 µL	Thermo scientific
Pipet 500 µL- 5 mL	Rainin pipet-lite XLS
Lamba	CATA 15 W, LED Downlight Model CT-5255, whiteWisetlite 230 V/25 W,Day light Day light 18 W, Tekfen

3.1.5 Kimyasallar

Analizler için kullanılan kimyasalların hepsi Merk ve Sigma Aldrich markasından temin edilmiştir.

Sülfürik asit %95-98, DNS çözeltisi (NaOH, Na-k tartarate, Phenol, Na metabisülfite), Fenol çözeltisi, Metanol, Sodyumbikarbonat, Sodyum glikosilat monohidrat enzim.

3.2 Metot

3.2.1 Stok kültür hazırlanması

İlk olarak Ege-MACC kültür koleksiyonundan alınan *Prasinococcus sp.* (Ege-macc 50) F/2 agarda ve *P. Cruentum*(Ege-macc 9) deniz suyuna BG11 agar da petri kapında çizgi yöntemi ile ekilmiştir ve 8-10 gün boyunca koloni oluşturmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem yaklaşık üç kere tekrar edilmiştir. Monoalgal koloniler izole edilene kadar bu işleme devam edilmiştir. Oluşan kolonilerin monoalgal hale gelip gelmedikleri mikroskop altında yapılan incelemelerle belirlenmiştir. Monoalgal hale gelen koloniler, 10 mL steril sıvı ortam içeren test tüplerine ateş yanında öze yardımıyla aktarılmıştır. On gün boyunca bu tüplerin vorteks ile karıştırılarak homojenizasyonu ve havalanması sağlanmıştır. Bir hafta sonra 10 mL'lik tüpleralt kültürleme yoluyla tekrar çoğaltılmıştır ve inkübasyona bırakılmışlardır. Yoğunlaşan kültürler tüplerden steril sıvı ortam içeren 250 mL'lik erlenlere aktararak kültür dolabında $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de $15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır.

Tüplerden birçoğu stok kültür olarak, erlendeki kültür ise ölçek büyütmek için kullanılmıştır.



Şekil 3.3 Stok kültür hazırlanma aşamaları

3.2.2 Stok inokulum hazırlanması

Çalışmada kullanılacak kültürlerin aynı özellikte olması deneylerin güvenliği bakımından önem taşımaktadır. Bu nedenle deneylerde kullanacak aşı kültürlerin sabit koşullarda hazırlanması gerekmektedir. *Prasinococcus sp.* ve *P. cruentum* hücrelerinin üretiminde hazırlanan inokulum için inkübasyon süresi 15 gün olarak belirlenmiştir. 15 günden sonra hücreler logaritmik büyüme evresine girmiştir.

3.2.3 Kültür sistemleri

Kültürlerin üretimi 1 litrelik otoklavlanabilen cam şişelerde sıcaklık kontrollü bir iklim dolabında gerçekleştirilmiştir. 2 adet 30 cm boyunda ve 0,6 çapında cam borular, biri havalandırmak için diğeri örnek alma için kullanılmıştır. Bu borulara 15 cm uzunluğunda, 5 mm'lik iç çapına sahip silikon hortum bağlanmıştır (Şekil 3.2). Tüm bağlantıların dış ortamla temas edebilecek kısımları pamuk ve alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra, 121 °C' de 20 dakika otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Üretimde beslenen hava 1 L/dak' ır.

Hazırlanan ortamlar $22 \pm 2^\circ\text{C}$ da $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ve $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde, 15 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve her gün günlük analizler için örnek alınmıştır.

Işık kaynağı olarak kullanılan floresanlar kültür kapların üzerine yerleştirilmiştir. Işık şiddeti lux-metre cihazıyla ölçümlenerek belirlenmiştir. İnkübatör içine dıştan gelen ışığı engellemek için inkübatörün camları alüminyum folyo ile kaplanmıştır.



Şekil 3.4 İnkübatör içinde üretim düzeni

3.2.4 Hücre konsantrasyonunun belirlenmesi

Bu çalışmada kültürün büyümesini takip etmek amacıyla kullanılacak dalga boyunu belirlenmek için spektrofotometre ile tarama yapılmıştır. *Prasinococcus* sp. için 530 nm ve *P. cruentum* için 680 nm dalga boyu belirlenmiştir. Her 2 türde günlük gözlemler ile bu dalga boylarında ölçülmüştür. Spektrofotometrik ölçümün yanında hücre sayımında yapılmıştır. Bunun için Neubauer lamı kullanılmıştır.

Hücreler çökelme eğiliminde olduklarından örneklerin spektrofotometre küvetlerine koymadan önce iyice vorteks ile karıştırılması gerekmektedir ve analiz hızlı bir şekilde yapılmalıdır.

3.2.5 pH ölçümü

Günlük pH ölçümlerinde Hanna PI 2211 kullanılmıştır. pH metrenin günlük kalibrasyonu pH 7 ve pH 10 tamponları ile yapılmıştır.

3.2.6 Hücre sayım yöntemi

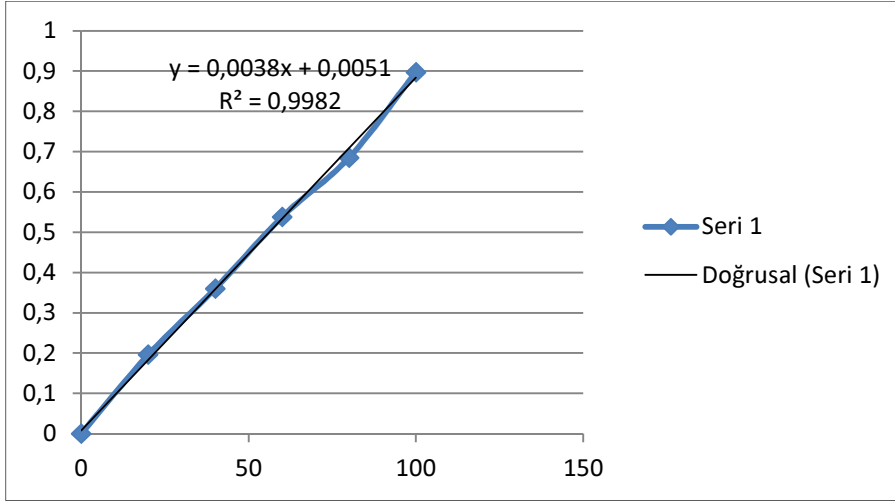
Mikroskobik hücre sayımı Neubauer lamı kullanılarak yapılmıştır. lamın üzerinde lamelin oturacağı yer hafifçe ıslatılır ve lameli lam üzerinde ileri ve geri hareket ettirerek, hareketsiz şekilde kalması sağlanmıştır. Sayılacak örnek homojenize edildikten sonra mikropipetle 200 µL alınmış ve hazır hale gelmiş kamaranın boş alanına doldurulmuştur. Örnekler homojen bir şekilde dağıldıktan sonra sayıma başlanmıştır. Hücre sayımı 2 tekrarlı yapılmıştır ve sonuçta ortalama olarak mL deki hücre miktarı belirlenmiştir.

3.2.7 Süpernatant eldesi:

Her sette 1., 4., 7., 10. ve 14. gün'lerde aseptik koşullar altında örnekler alınmış ve 15 mL'lik falkonlara aktarılan *Prasinococcus* sp. ve *P. cruentum*, F/2 ortamı ile 5000 rpm'de 5 dak. süreyle santrifuj edilmiştir. Süpernatant toplam şeker ve indirgen şeker analizi için temiz fakonlara aktarılmıştır.

3.2.8 Toplam şeker analizi

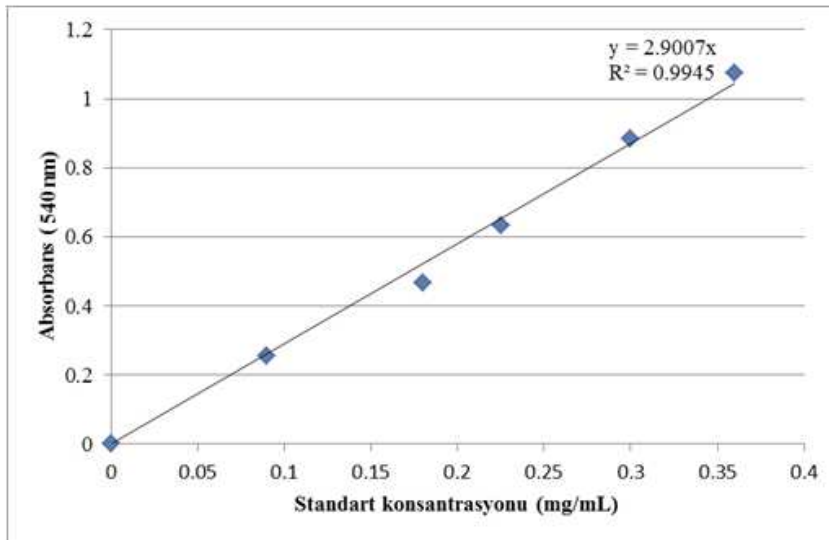
Hücresiz supernatant hazırlandıktan sonra Fenol-Sülfirik Asit yöntemine göre toplam şeker tayini yapılmıştır (Dubois et al., 1956). Bu yöntemde 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL glikoz içeren standart çözeltiler kullanılmış ve okumalar spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda yapılmıştır. Elde edilen standart grafik (Şekil 3.3) yardımı ile örnekteki toplam şeker miktarı glikoz cinsinden belirlenmiştir. Toplam şeker miktarlarını belirlemek için kullanılan konsantrasyon-absorbans grafiği ve denklemleri verilmiştir. Yapılan tüm analizler 2 paralel halinde yapılmış ve aritmetik ortalamaları hesaplanarak kullanılmıştır.



Şekil 3.5 Toplam şeker tayininde kullanılan standart eğrisi

3.2.9 İndirgen şeker tayini

Örneklerden supernatantı ayırdıktan sonra dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi (Ghose, 1987) kullanılmıştır. Buna göre 0,09, 0,18, 0,27, 0,36 mg/ml glikoz içeren standart çözeltiler kullanılmış ve okumalar spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda yapılmıştır. Elde edilen standart grafik (Şekil 3.4) yardımı ile örnekteki indirgen şeker miktarı glikoz cinsinden belirlenmiştir. İndirgen şeker miktarlarını belirlemek için kullanılan konsantrasyon-absorbans grafiği ve denklemleri verilmiştir.



Şekil 3.6 İndirgen şeker tayininde kullanılan standart eğrisi

3.2.10 Ön işlemler

Bu çalışmada amaç ekzopolisakkarit miktarının belirlenmesi olduğu için, alınan örnekler önce 5 dakika 5000 rpm de santrifuj edilmiştir. Hücresiz supernatant analiz için alınmıştır.

3.2.11 Monosakkarit analizi

Sonuçlara göre en yüksek polisakkarit miktarı yüksek 50 μmolE ve enzim varlığında elde edilmiştir. Bu yüzden bu koşullarda elde edilmiş polisakkaritlerin monosakkarit içeriği incelenmiştir.

3.2.11.1 Standartların hazırlanması

Monosakkarit analizi için standart olarak kullanılan Glikoz (EY Laboratories), Galaktoz (EY Laboratories), N-asetilgalaktozamin (GalNAc, Sigma Aldrich), N-asetilglukozamin (GlcNAc, EY Laboratories), Mannoz (Merck), Ksiloz (Difco Laboratories), Arabinoz (Difco Laboratories) monosakkaritleri ultra saf su ile hazırlanmıştır.

3.2.11.2 Monosakkarit analizi için asit hidrolizi

Örnek, 4M TFA (trifloroasetik asit) ile hidroliz için 100 °C’de 3 saat inkübe edilmiştir. Vakum konsantratörde (Martin Christ, RVC 2-25) kuruluğa kadar uçurulmuştur.

3.2.11.3 Monosakkaritlerin türevlendirilmesi (PMP reaktifi ile türevlendirme)

Vakum evaporatörde kuruluğa kadar uçurulan örneklerin LC-MS sisteminde daha duyarlı analiz edilebilmesi amacıyla PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, Sigma Aldrich) flouresan reaktifi ile türevlendirilmiştir. Son aşamada çözelti 16000g’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant CapLC-ESI-MS/MS analizi için viallere aktarılmış ve analiz edilmiştir.

3.2.11.4 Monosakkarit analizinde LC-MS/MS

Agilent 1200 Capillary HPLC (Polo alto, USA) sisteminde (ACE 5 C18 150 x 0,5 mm 5 µm) ters faz kolon kullanılarak kromatografik ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Mobil faz Asetonitril (Sigma Aldrich) ve ultra saf su ikilisinden oluşur. Mobil faz akış hızı 20 µL/dak. ve enjeksiyon hacmi 0,1 µL olarak belirlenmiştir Toplam analiz süresi 60 dakikadır.

Kolon sonrası kütle dedeksiyonu Bruker HCT Ultra Ion Trap LC-MSⁿ (Bremen, Germany) ile pozitif modda yapılmıştır.

Çizelge 3.7 Bruker HCT Ultra Ion Trap LC-MSⁿ ile kütle dedeksiyonu

Monosakkarit	Ana iyon [M+H] ⁺	Parçalanma İyonları
Mannoz	511	175-271-373
Ramnoz	495	175-285-373-477
N-asetilGlukozamin	552	175-253-378- 534
Glukoz	511	175-271-373
N-asetilGalaktozamin	552	175-253-378- 534
Galaktoz	511	175-271-373
Arabinoz+Ksiloz	481	175-271-373

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1 İndirgen Şeker

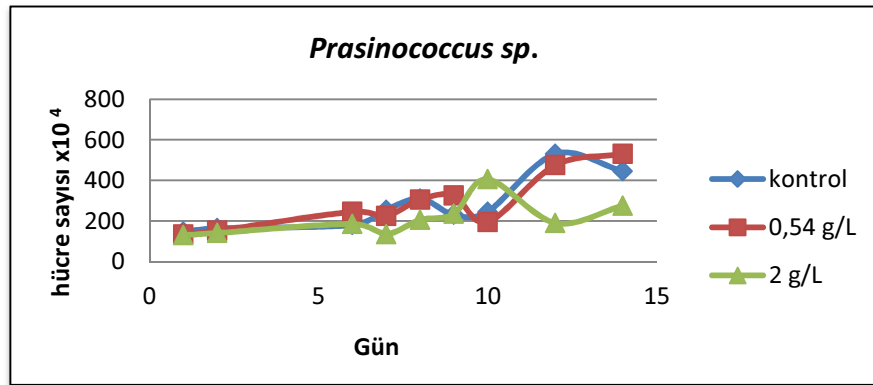
Bu çalışmada farklı koşullarda yapılan incelemelerde *Prasinococcus* sp. ve *Porphyridium cruentum*dan indirgen şeker tespit edilmemiştir.

4.2 pH

Tüm setlerde pH değeri 7,5-8 arası ölçülmüştür. Sodyum bikarbonat ve enzim ilavesi pH değerlerinde ciddi bir etki yaratmamıştır.

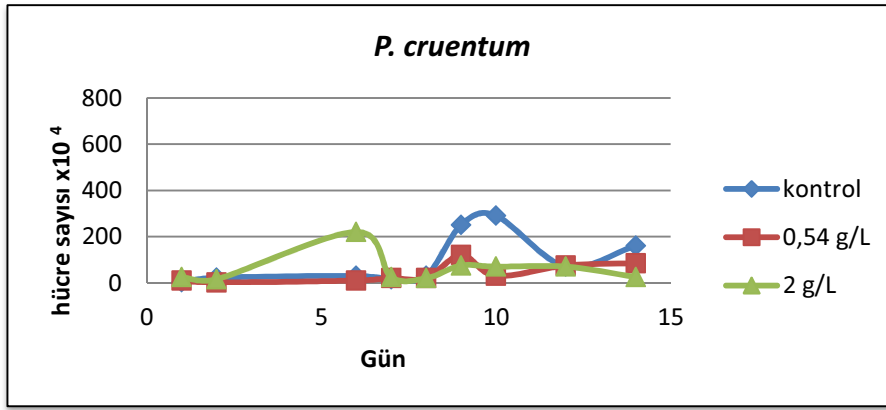
4.3 $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonunun Hücre Sayısına Etkisi

Prasinococcus sp.'de 10. güne kadar sodyum bikarbonatın her 2 konsantrasyonunda (0,54 ve 2 g/L) hücre sayısı aynı şekilde artmaya başlamıştır ama kontrol koşullarında hücre sayısı diğer konsantrasyonlara göre daha fazla ölçülmüştür. 10. günden sonra 2 g/L konsantrasyonunda ciddi bir düşüş görülmüştür ama diğer konsantrasyonlarda 14. güne kadar artış devam etmiştir. Kontrol koşullarında ve 0,54 g/L sodyum bikarbonat varlığında sonuncu güne kadar artış miktarı birbirine yakın devam etmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 *Prasinococcus* sp.'de $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun hücre sayısına etkisi

Şekil 4.2'de gösterildiği gibi *P. Cruentum*'da her 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda hücre sayısında ciddi anlamda etkilenme görünmemektedir.

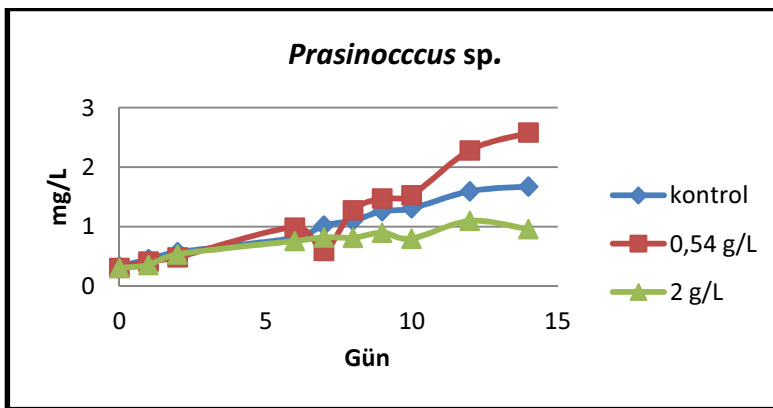


Şekil 4.2 *P. cruentum*' da $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun hücre sayısına etkisi

Prasinococcus sp. ve *Porphyridum cruentum* arasında hücre sayısına bakınca bu koşullarda *Prasinococcus* sp.'nin hücre sayısı daha fazla olduğu görünmüştür ve kültivasyon 14. güne doğru ilerledikçe 2 tür arasında ki hücre sayısının farkı yaklaşık 2,5 katına çıktığı belirlenmiştir.

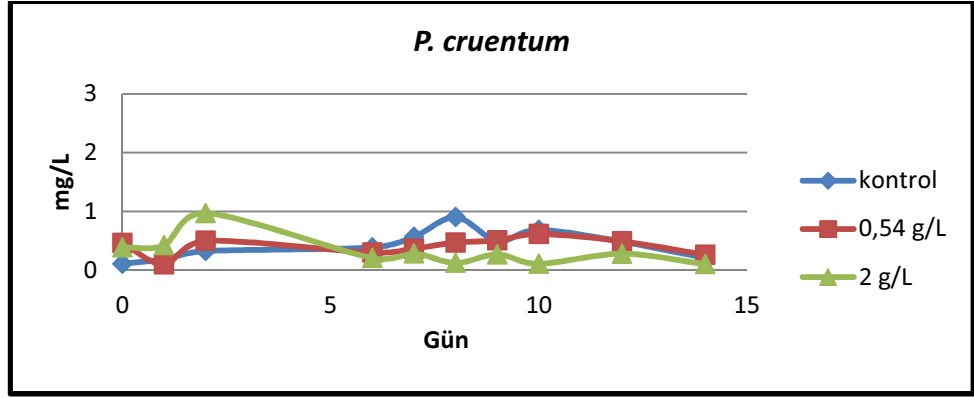
4.4 $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonunun Klorofil A Miktarına Etkisi

Prasinococcus sp.'de 2 farklı konsantrasyonda (0.54 ve 2 g/L) son günlere doğru, 0,54 g/L konsantrasyonunda klorofil A miktarı artarken ama 2 g/L konsantrasyonda ise klorofil A miktarı kontrole göre düşmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 *Prasinococcus* sp.'de $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun klorofil A miktarına etkisi

P. cruentum'da sodyumbikarbonatın farklı konsantrasyonlarında klorofil A miktarında değişim gözlemlenmiştir.



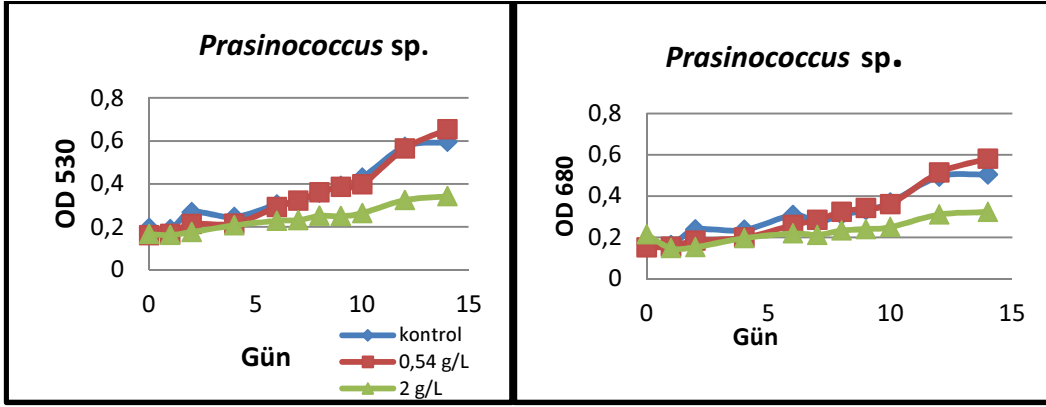
Şekil 4.4 *P. cruentum*'da $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun klorofil A miktarına etkisi

Prasinococcus sp. ve *P. cruentum* arasında klorofil A miktarlarını kıyaslandığında kültivasyonun son günlerine doğru klorofil A miktarı *P. cruentum*'da düşmeye başlarken *Prasinococcus* sp.'de artış görülmektedir. *Prasinococcus* sp.'de artış miktarı sodyumbikarbonatın 0,54 g/L varlığında daha yüksek olmuştur.

4.5 $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonunun Hücre Yoğunluğuna Etkisi

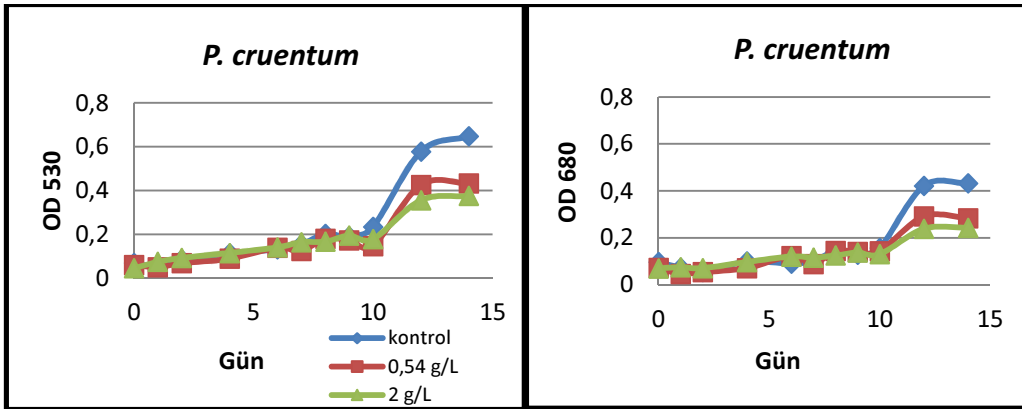
Her iki türün hücre yoğunluğu, optik densitesi (OD) 530 ve 680 nm de spektrofotometre yardımıyla ölçülmüştür. OD 530 ve 680 nm arasında elde edilen değerlerin farkına bakınca 530 nm de her iki türün hücre yoğunluğundan elde edilen değerler 680 nm ye göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

530 nm de *Prasinococcus* sp.'nin hücre yoğunluğu belirtilen koşullarda, kontrolle birlikte 0,54 g/L konsantrasyonun aynı miktarda arttığı gözlenmiştir. Fakat 2 g/L sodyumbikarbonat eklendiğinde hücre konsantrasyonunda düşüş meydana gelmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 *Prasinococcus* sp' nin $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun 530 ve 680 nm deki hücre yoğunluğu

P. cruentum'da sodyumbikarbonatın hücre yoğunluğunda ciddi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 *P. cruentum*'da $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda 530 ve 680 nm' deki hücre yoğunluğu

Hücrelerin büyümesini incelemek için hücre sayısı, klorofil A ve OD ölçümleri yapılmıştır. Genel olarak bir kıyaslama yapıldığında, en iyi hücre büyümesi kontrol de elde edilmiştir. Sodyumbikarbonat ilavesinin hücrelerin büyümesinde pozitif bir etkisi olmamıştır.

Hücre yoğunluğu grafikleri kullanılarak, spesifik büyüme hızları (μ) ve ikilenme süreleri (D.T) gün olarak hesaplanmış ve Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 $10 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda hücrelerin spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresi

NaHCO ₃ konsantrasyonu	<i>Prasinococcus</i> sp.		<i>Porphyridium cruentum</i>	
	$\mu(\text{Gün}^{-1})$	D.T(Gün)	$\mu(\text{Gün}^{-1})$	D.T(Gün)
Kontrol	0,106	6,728	0,283	2,44
0,54 g/L	0,12	5,775	0,144	4,812
2 g/L	0,056	12,375	0,114	6,078

4.6 $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO₃) Konsantrasyonun Ekzopolisakkarit Miktarına Etkisi

Prasinococcus sp.' de $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve 0,54 ve 2 gr/L sodyumbikarbonat varlığında kontrole göre şeker miktarında artış gözlenmemiştir. 14. günün sonunda en yüksek şeker miktarı kontrol koşullarında elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 *Prasinococcus* sp.' de $10 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda ölçülen ekzopolisakkarit miktarı (mg/L)

Gün NaHCO ₃	1	4	7	10	14
Kontrol	29,84	44,05	52,6	55,99	96,15
0,54 gr/L	19,97	46,41	35,76	44,31	80,63
2 gr/L	15,49	42,99	43,65	55,49	67,6

P. cruentum'da *Prasinococcus* sp.'deki gibi sodyumbikarbonat varlığı ciddi bir etki göstermemiştir. Polisakkarit miktarı kontrolde daha fazla elde edilmiştir (Çizelge 4.3).

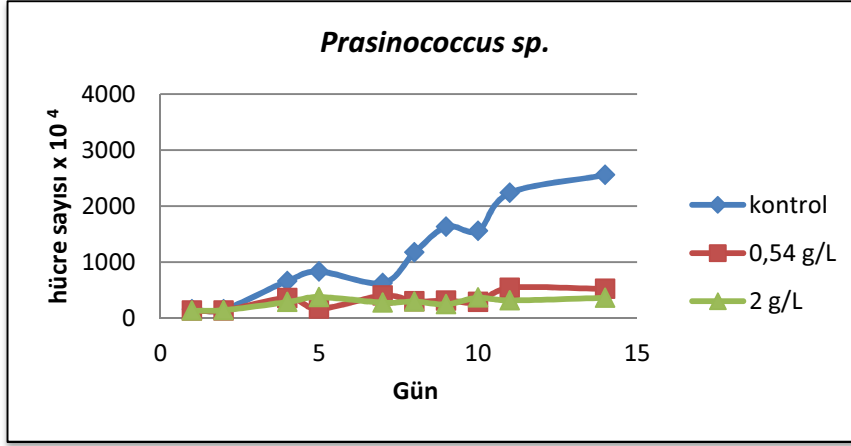
Çizelge 4.3 *Porphyridium cruentum*'da $10 \mu\text{molEm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda ölçülen ekzopolisakkarit miktarı (mg/L)

Gün NaHCO ₃	1	4	7	10	14
Kontrol	28,65	35,62	48,39	52,21	84,57
0,54 gr/L	43,65	37,33	46,28	48,13	70,76
2 gr/L	35,1	40,89	42,73	74,05	81,68

Belirtilen iki tür arasında polisakkarit miktarını kıyasladığımızda, en yüksek şeker miktarı *Prasinococcus* sp.'de ve kontrolünden elde edilmiştir.

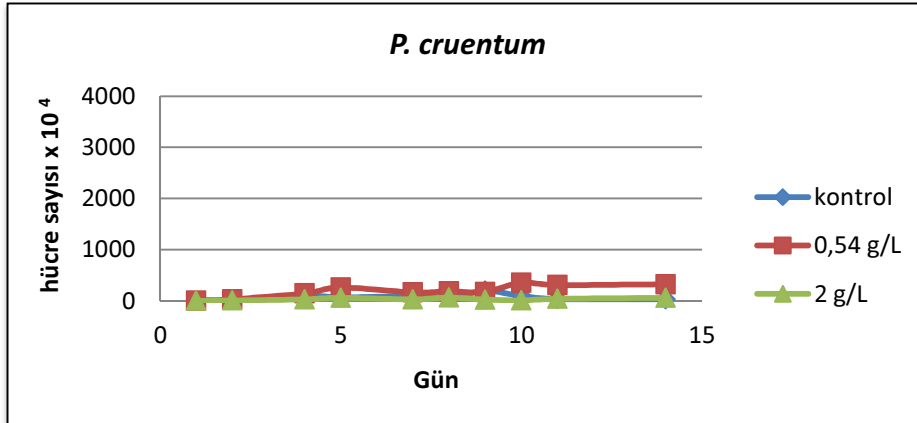
4.7 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonunun Hücre Sayısına Etkisi

Prasinococcus sp.'de en iyi hücre sayısını kontrolde elde edilmiştir. 0,54 ve 2 g/L konsantrasyonlarında hücre sayısı düşük ve hemen hemen aynı sayıda belirlenmiştir.



Şekil 4.7 *Prasinococcus* sp.' de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti $22 \pm 2^\circ \text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun hücre sayısına etkisi

P. cruentum'da $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve 0,5 g/L sodyumbikarbonat varlığında hücre sayısı artmıştır. Fakat kontrolde ve 2 g/L sodyumbikarbonat varlığında kültürasyon boyunca pek artış görülmemiştir. *P.cruentum*'da 0,5 g/L sodyumbikarbonat varlığında hücre sayısının diğer konsantrasyonlara göre yaklaşık 6 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8).

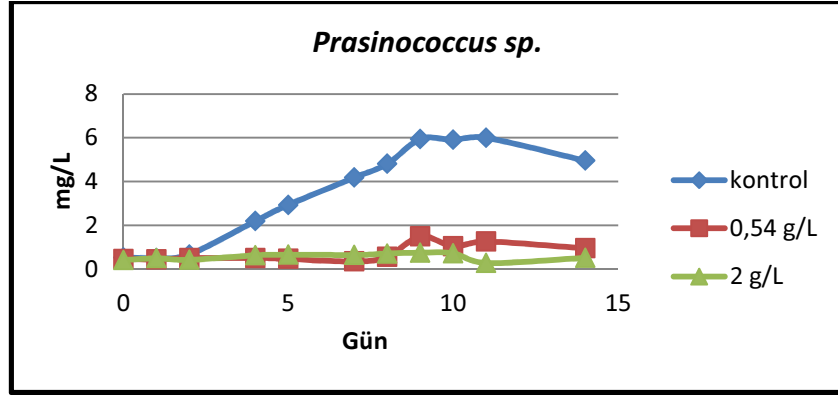


Şekil 4.8 *P. cruentum*'da $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22 \pm 2^\circ \text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun hücre sayısına etkisi

Bu koşullarda iki tür arasında, *Prasinococcus* sp.' nin hücre sayısı'nın her iki konsantrasyonda yüksek olduğu belirlenmiştir.

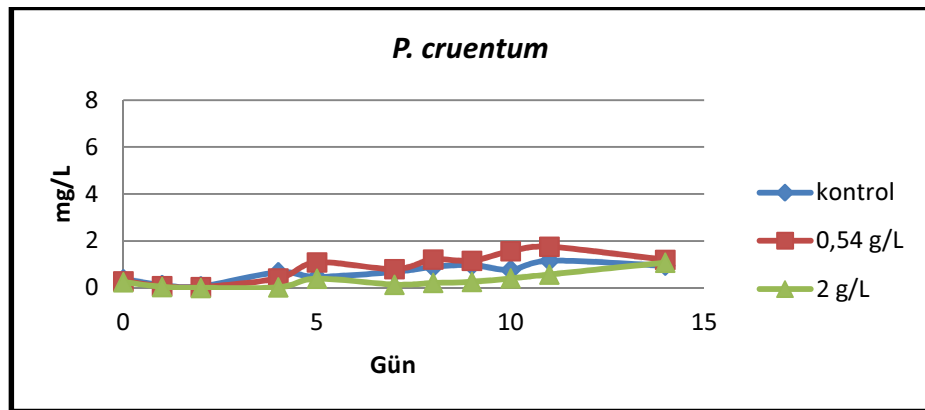
4.8 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO_3) Konsantrasyonunun Klorofil A miktarına Etkisi

Prasinococcus sp.'de belirtilen koşullarda, kontrolde diğer konsantrasyonlara göre daha fazla klorofil A miktarı tespit edilmiştir. 0,54 ve 2 g/L sodyum bikarbonat konsantrasyonları klorofil A miktarında ciddi bir etkiye neden olmamıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 *Prasinococcus* sp.'de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun klorofil A miktarına etkisi

P. cruentum'da iki konsantrasyonda klorofil A miktarının aynı miktarda olduğu saptanmıştır (Şekil 4.10). 5. gün ile 10. gün arasında 0,5 g/L sodyumbikarbonat konsantrasyonu, klorofil A miktarını az arttırmıştır fakat bu artış çok önemli bir artış olarak görülmemiştir.



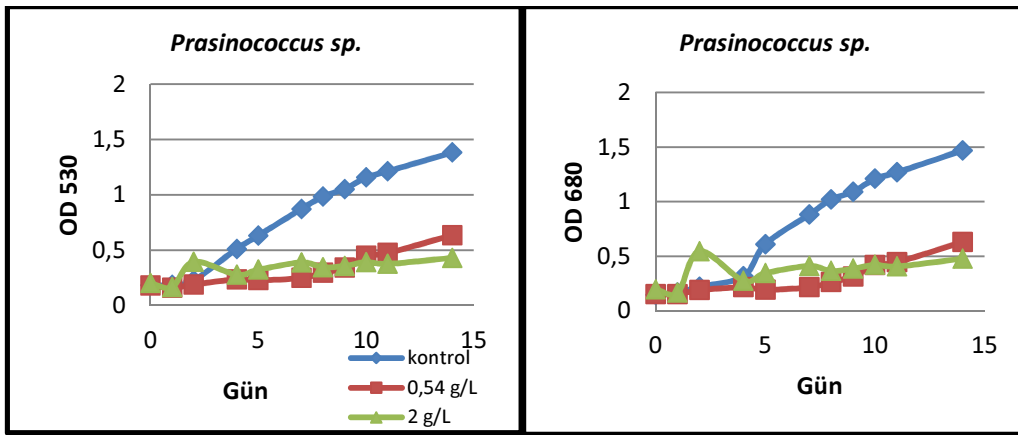
Şekil 4.10 *P. cruentum*'da $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun klorofil A miktarına etkisi

Belirtilen koşullarda sodyumbikarbonatın 2 farklı konsantrasyonunda klorofil A miktarı *Prasinococcus* sp.'de *P. cruentum*'a göre, daha fazla

belirlenmiştir. Bu iki farklı tür arasında yaklaşık 5 kat kadar fark olduğu belirlenmiştir.

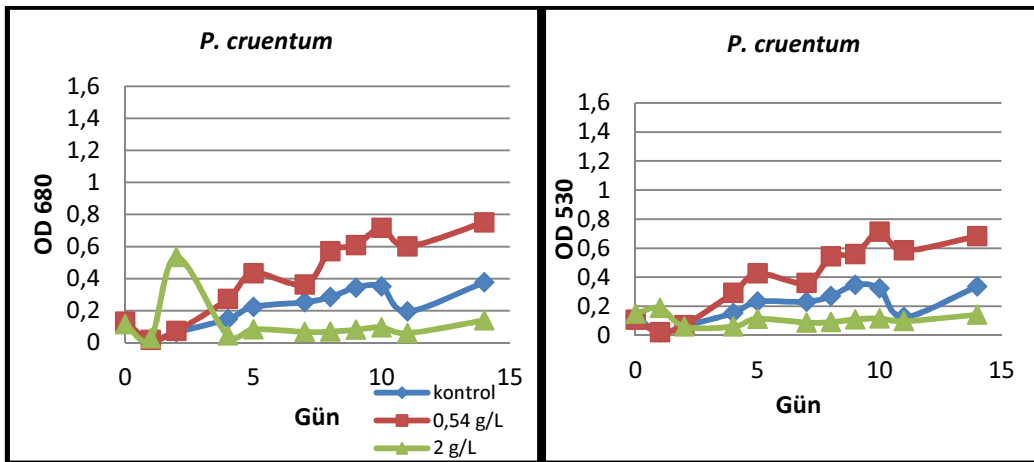
4.9 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat Konsantrasyonunun Hücre Yoğunluğuna Etkisi

Belirtilen koşullar altında 530 ve 680 nm’de *Prasinococcus* sp.’nin hücre yoğunluğu, sodyumbikarbonat içermeyen ortamda daha fazla ölçülmüştür. 0,54 ve 2 gr/L sodyum bikarbonat konsantrasyonlarında hücre yoğunluğunda ciddi fark gözlenmemiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 *Prasinococcus* sp.’de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun hücre yoğunluğuna etkisi

530 ve 680 nm’de ölçülen hücre yoğunluğu *P. cruentum*’da 0,54 gr/L sodyumbikarbonat konsantrasyonunda elde edilmiştir. En düşük hücre yoğunluğu sodyumbikarbonatın 2 g/L konsantrasyonunda ölçülmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 *P. cruentum*’da $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunun hücre yoğunluğuna etkisi

İki türün en yüksek hücre yoğunluğu kıyaslandığında, *Prasinococcus* sp.'nin hücre yoğunluğunun *P. cruentum*'un yoğunluğundan yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Bu koşullarda hücre büyümesini incelemek için hücre sayısı, klorofil A ve optik densite ölçümleri yapılmıştır. Genel olarak bir kıyaslama yapıldığında bu çalışmada en iyi hücre büyümesi *Prasinococcus* sp.'da kontrol koşullarında, *P. cruentum*'da ise 0,5 g/L'lık sodyumbikarbonat konsantrasyonunda elde edilmiştir. Hücre yoğunluğu grafikleri kullanılarak, spesifik büyüme hızları (μ) ve ikilenme süreleri (D.T) gün olarak hesaplanmış ve Çizelge 4.4 de verilmiştir.

Çizelge 4.4- 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonu da elde edilen spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresi

	<i>Prasinococcus</i> sp.		<i>Porphyridium cruentum</i>	
NaHCO ₃ konsantrasyonu	μ (Day ⁻¹)	D.T (Day)	μ (Day ⁻¹)	D.T (Day)
Kontrol	0,123	5,634	0,123	5,634
0,54 gr/L	0,1	6,93	0,099	7
2 gr/L	0,042	16,5	0,071	9,760

4.10 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumbikarbonat (NaHCO₃) Konsantrasyonunun Ekzopolisakkarit Miktarına Etkisi

Prasinococcus sp.'nin toplam şeker miktarı sodyumbikarbonatın 2 farklı konsantrasyonunda incelenmiştir. 14. günün sonunda en yüksek şeker miktarı sodyumbikarbonat içermeyen ortamda, en düşük şeker miktarı ise 0,54 g/L'lik sodyumbikarbonat konsantrasyonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 *Prasinococcus* sp.'de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 22±2°C sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda ölçülen ekzopolisakkarit miktarı (mg/L)

Gün NaHCO ₃	1	4	7	10	14
kontrol	22,86	52,6	76,94	143,52	275,5
0,54 g/L	17,07	49,04	34,05	60,76	116,02
2 g/L	21,02	61,94	62,73	96,02	133,65

Belirtilen koşullarda *P. cruentum* da en yüksek şeker miktarı 0,54 g/L'lik sodyumbikarbonat konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bu miktar, kontrol ve 2 g/L'lik sodyumbikarbonat konsantrasyonunda elde edilen şeker miktarının yaklaşık 2 katı kadardır (Çizelge 4.6).

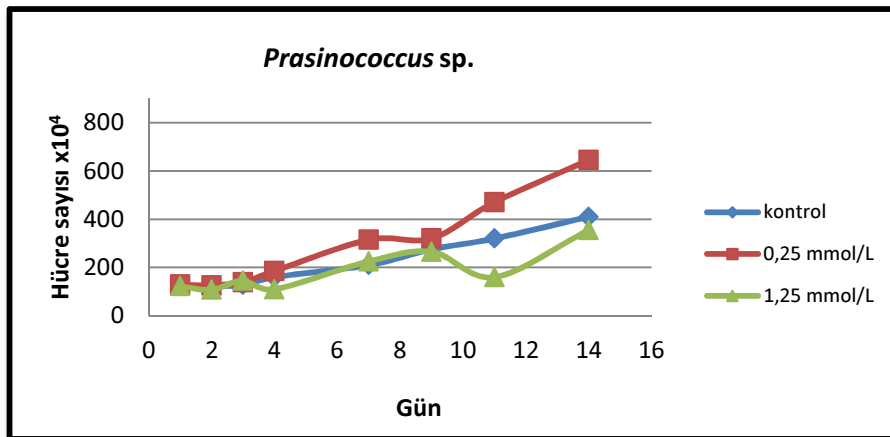
Çizelge 4.6 *P. cruentum* da $50\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda ölçülen eksopolisakkarit miktarı(mg/L)

Gün NaHCO ₃	1	4	7	10	14
kontrol	11,9	28,78	31,41	40,63	40,89
0,54 g/L	13,26	27,99	41,41	59,44	92,2
2 g/L	15,76	17,07	19,18	27,47	36,41

Bu koşullarda iki türdeki şeker miktarları kıyaslandığında, *Prasinococcus* sp.'deki şeker miktarı *Porphyridium*'un yaklaşık 3 katı kadar fazla gözlenmiştir (Çizelge 4.5 ve çizelge 4.6).

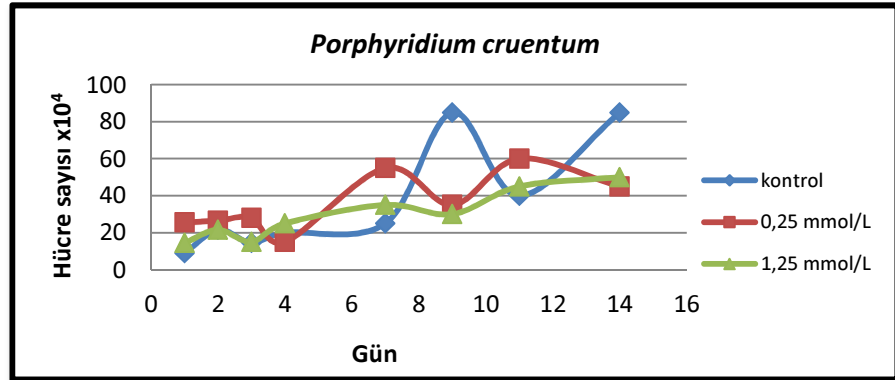
4.11 $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyum Glikosilat Monohidrat Enziminin Hürce Sayısına Etkisi

Belirtilen koşullarda *Prasinococcus* sp. nin ortamında en yüksek hücre sayısı 0,25 mmol/L enzim varlığında belirlenmiştir. Kontrol koşullarında ve 1,25 mmol/L enzim konsantrasyonunda hücre sayısı hemen hemen aynı miktarda elde edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 *Prasinococcus* sp.'de $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre sayısına etkisi

Belirtilen koşullar altında *P. cruentum*'un en yüksek hücre sayısı kontrol de görülmüştür.

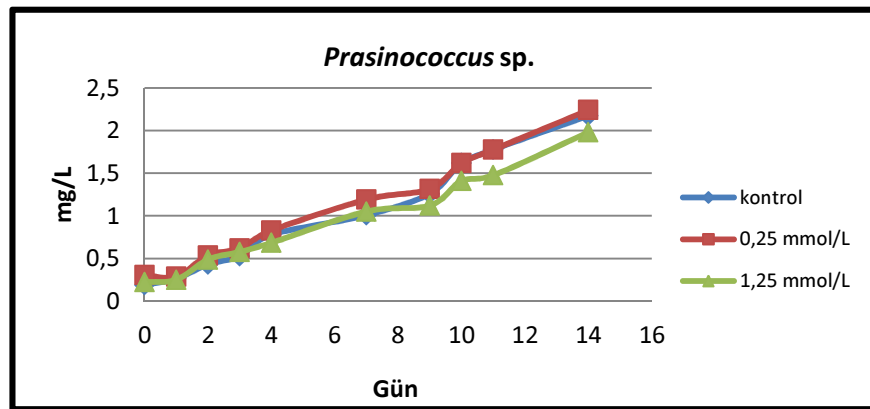


Şekil 4.14 *P.cruentum*'da $10 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre sayısına etkisi

Bu koşullarda *P.cruentum* ve *Prasinococcus* sp. arasında kıyaslama yapıldığında *Prasinococcus* sp.'nin en yüksek hücre sayısı, *P. cruentum*'dan elden edilen en yüksek hücre sayısının yaklaşık 7 katı kadar olduğu saptanmıştır.

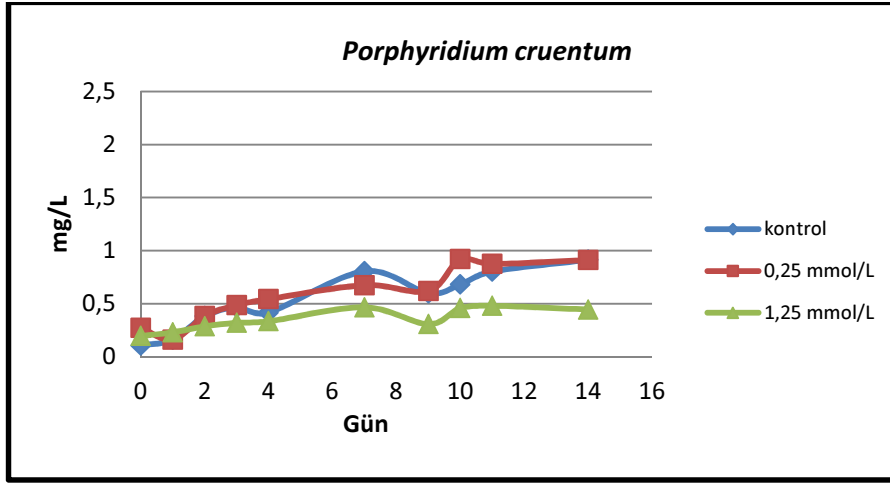
4.12 $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Glikosilat Monohidrat Enziminin Klorofil A Miktarına Etkisi

Bu koşullar altında kontrol ve 0,25 mmol/L enzim ilave edildiğinde *Prasinococcus* sp.'de klorofil A miktarı her 2 konsantrasyonda da hemen hemen aynı ölçülmüştür. 1,25 mmol da klorofil A miktarı diğerlerine göre biraz daha düşük miktarda elde edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 *Prasinococcus* sp.'de $10 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin klorofil A miktarına etkisi

P. cruentum' da bu koşullarda, kontrolde ve 0,25 mmol/L enzim ilave edildiğinde aynı miktarlarda klorofil A tespit edilmiştir. Bu miktar 1,25 mmol/L enzim varlığında ölçülen miktarın yaklaşık 2 katıdır (Şekil 4.16).

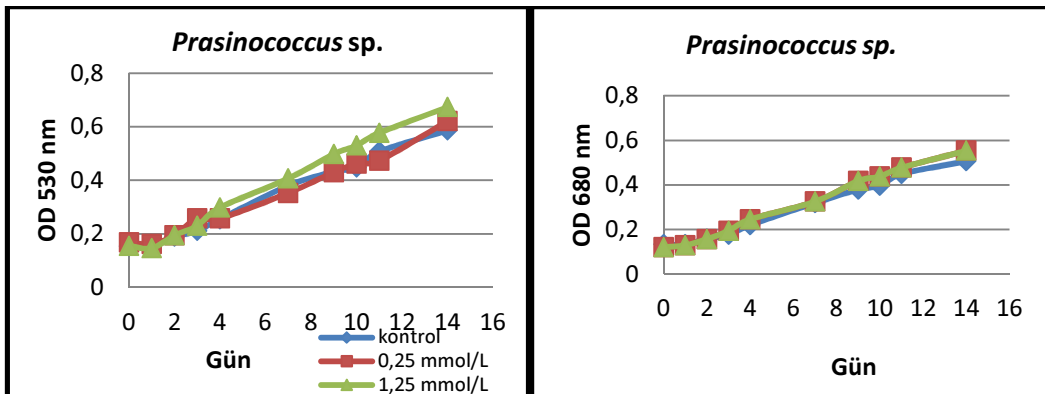


Şekil 4.16 *P. cruentum*' da $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin klorofil A miktarına etkisi

Bu 2 tür arasında kıyaslama yapıldığında, *Prasinococcus* sp.'den elde edilen en yüksek klorofil A miktarı, *P. cruentum*' dan elde edilen en yüksek miktarın yaklaşık 2,5 katıdır.

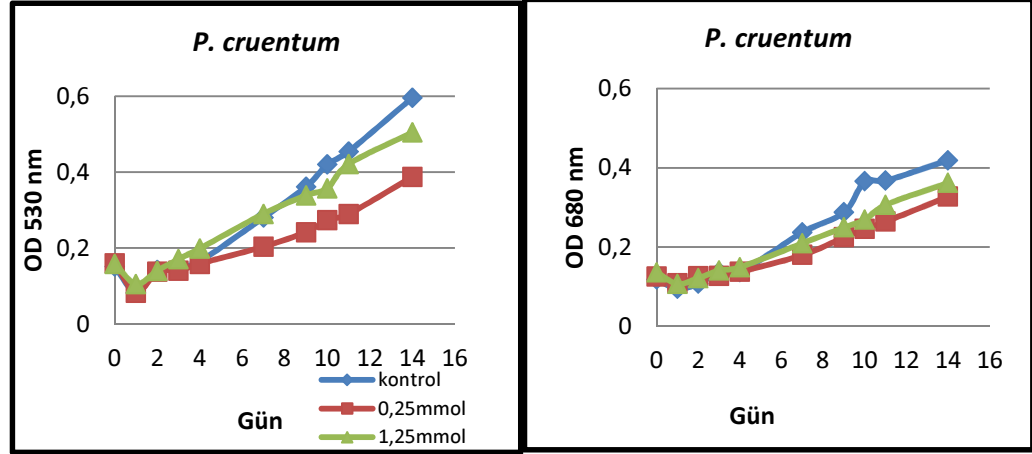
4.13 $10 \mu\text{E}$ ışık şiddeti ve 2 Farklı Glikosilat Monohidrat Enziminin Hücre Yoğunluğuna Etkisi

Bu koşullar altında *Prasinococcus* sp.'de, en yüksek hücre yoğunluğu 530 ve 680 nm' de 1,25 mmol/L enzim varlığında ölçülmüştür. Kontrolde ve 0,25 mmol/L konsantrasyonunda ölçülen hücre yoğunluğu birbirine yakın miktarlarda ve diğer konsantrasyona göre çok az daha düşük ölçülmüştür (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 *Prasinococcus* sp.'de $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre yoğunluğuna etkisi

Belirtilen koşullar altında *P. cruentum*'un hücre yoğunluğu 530 ve 680 nm'de ölçüldüğünde en yüksek hücre yoğunluğu kontrol koşullarında ölçülmüştür. 1,25 mmol/L enzim varlığında ölçülen değerler kontrol değerine yakın olarak belirlenmiştir. En düşük hücre yoğunluğu 0,25 mmol/L enzim konsantrasyonunda ölçülmüştür(şekil 4.18).



Şekil 4.18 *P. cruentum* 10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre yoğunluğuna etkisi

OD 530 ve 680 nm' de elde edilen sonuçlar hemen hemen aynı miktarlarda belirlenmiştir. Spesifik büyüme hızları (μ) ve ikilenme süreleri (D.T) gün olarak hesaplanmış ve Çizelge 4.7 de verilmiştir.

Çizelge 4.7 10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat konsantrasyonun' da elde edilen spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresi

Enzim konsantrasyonu	<i>Prasinococcus</i> sp.		<i>P. cruentum</i>	
	μ (Gün ⁻¹)	D.T (Gün)	μ (Gün ⁻¹)	D.T (Gün)
Kontrol	0,102	6,794	0,142	4,880
0,25 mmol/L	0,094	7,372	0,093	7,45
1,25 mmol/L	0,094	7,372	0,110	6,3

4.14 10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyum Glikosilat Monohidrat Enziminin Ekzopolisakkarit Miktarına Etkisi

Bu koşullarda *Prasinococcus*'un en yüksek şeker miktarı, 1,25 mmol/L enzim varlığında elde edilmiştir. İkinci yüksek şeker miktarı kontrol koşullarında belirlenmiştir. En düşük miktar ise 0,25 mmol/L enzim konsantrasyonundan elde edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 *Prasinococcus* sp.' de $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enzim varlığında ölçülen ekzopolisakkarit miktarı (mg/L)

Gün \ Enzim	1	4	7	10	14
Kontrol	24,35	44,99	38,45	48,71	71,79
0,25mmol/L	49,22	49,99	39,35	67,69	68,2
1,25mmol/L	38,2	54,35	45,38	53,71	79,1

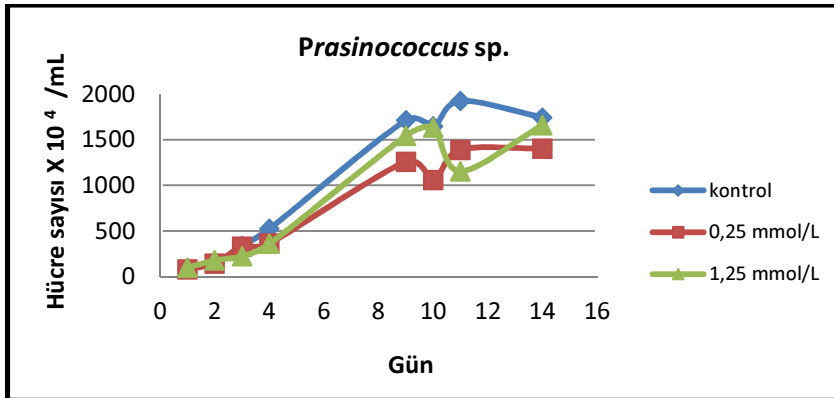
P. cruentum'da en düşük şeker miktarı 0,25 mmol/L enzim konsantrasyonunda elde edilmiştir. 14. günde kontrolde ve 1,25 mmol/L enzim varlığında elde edilen toplam şeker miktarı daha yüksek ve birbirine yakın miktarlarda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 *P. cruentum*'da $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enzimin varlığında ölçülen ekzopolisakkarit miktarı(mg/L)

Gün \ Enzim	1	4	7	10	14
kontrol	27,3	52,94	53,2	67,81	91,4
0,25mmol/L	52,04	56,79	49,61	54,74	63,45
1,25mmol/L	58,97	68,71	60,76	67,05	90,63

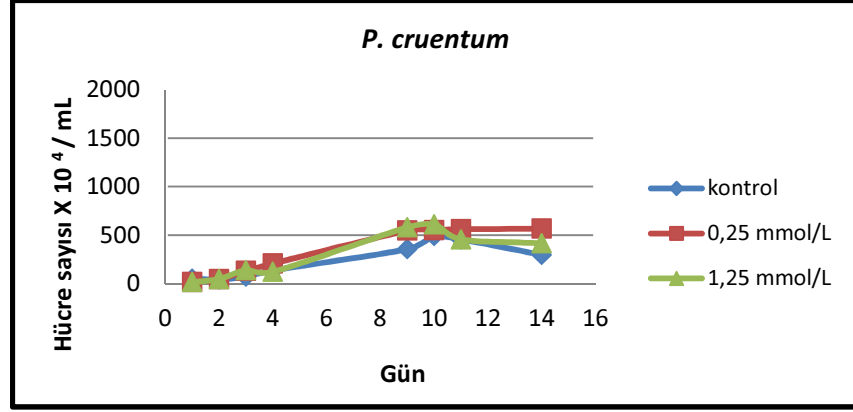
4.15 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyumglikosilat Monohidrat Enziminin Hücre Sayısına Etkisi

Belirtilen koşullarda *Prasinococcus* sp.' nin en yüksek hücre sayısı kontrol koşullarında gözlemlenmiştir. Ancak 1,25 mmol/L enzim varlığında hücre sayısı kontrol değerlerine çok yakın belirlenmiştir. En düşük hücre sayısı 0,25 mmol/L konsantrasyonunda elde edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre sayısına etkisi

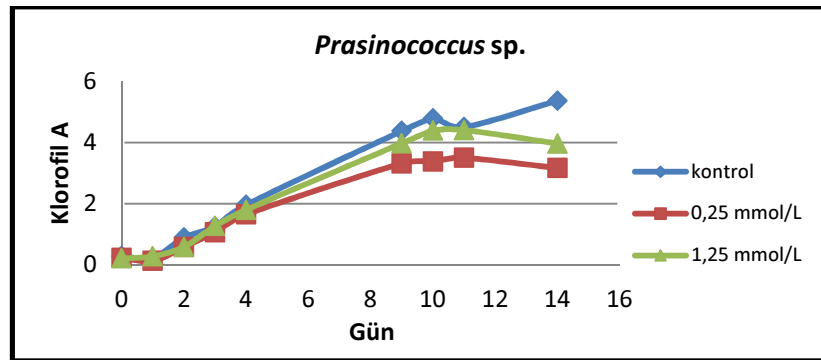
P. cruentum'un bu koşullarda en yüksek hücre sayısı 0,25 mmol/L enzim konsantrasyonunda gözlemlenmiştir. En düşük hücre sayısı kontrol koşullarında belirlenmiştir (şekil 4.20).



şekil 4.20 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre sayısına etkisi

4.16 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık şiddeti ve 2 Farklı Sodyum Glikosilat monohidrat Enziminin Klorofil A Miktarına Etkisi

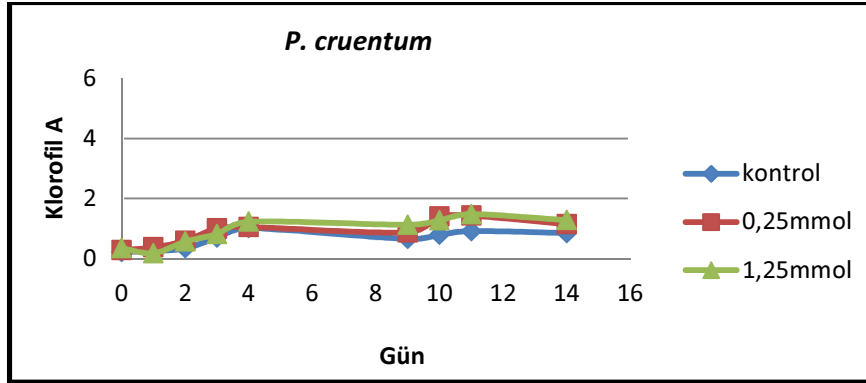
En yüksek klorofil A miktarı enzim varlığında elde edilmiştir. 1,25 mmol/L enzim varlığında elde edilen değerler 10. güne kadar kontrol değerlerine yakın llmştir. Son günlere doğru kontrol koşullarındaki klorofil A miktarı artmıştır. En düşük klorofil A miktarı 0,25mmol/L enzim konsantrasyonundan elde edilmiştir (şekil 4.21).



şekil 4.21 *Prasinococcus sp.*'de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin klorofil A miktarına etkisi

Belirtilen koşullarda *P. cruentum*'dan elde edilen klorofil A miktarı'nın her iki konsantrasyonda hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir. 1,25 mmol/L enzim

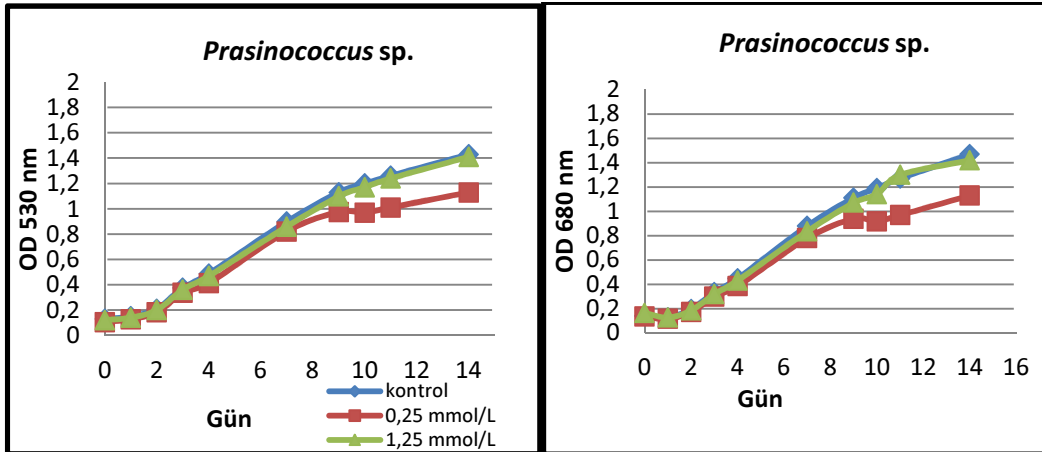
konsantrasyonundan elde edilen miktar diğerlerine göre çok az daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 *P. cruentum*'da $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin klorofil A miktarına etkisi

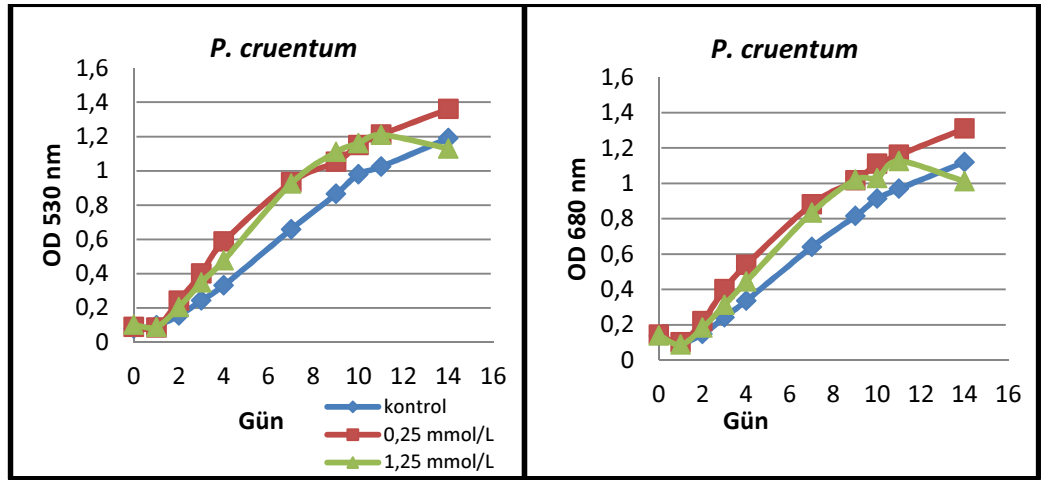
4.17 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Sodyum Glikosilat Monohidrat Enziminin Hücre Yoğunluğuna Etkisi

530 OD'de en yüksek hücre yoğunluğu kontrol koşullarında ve 1,25 mmol/L enzim varlığında ölçülmüştür. Bu konsantrasyonların her iki OD değerleri de hemen hemen aynı yoğunlukta olmuştur (Şekil 4.23). En düşük hücre yoğunluğu 0,25 mmol/L enzim ilave edildiğinde ölçülmüştür.



Şekil 4.23 *Prasinococcus sp.*'de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enziminin hücre yoğunluğuna etkisi

P. cruentum'un hücre yoğunluğu 530 nm dalga boyunda incelenmiştir. En yüksek hücre yoğunluğu 0,25 ve 1,25 mmol/L enzim varlığında görülmüştür. Bu iki konsantrasyonda elde edilen değerler 11. güne kadar aynı miktarda ölçülmüştür. Fakat son güne doğru, 1,25 mmol/L enzim varlığında hücre yoğunluğunda düşüş meydana gelmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 *P. cruentum* $50\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat enzimin hücre yoğunluğuna etkisi

Hücre yoğunluğu OD 680' de de ölçülmüştür. OD 530 ve 680 nm' de elde edilen sonuçların hemen hemen aynı miktarlarda olduğu belirlenmiştir.

Spesifik büyüme hızları (μ) ve ikilenme süreleri (D.T) gün olarak hesaplanmış ve Çizelge 4.10'da verilmiştir. Genel olarak bir kıyaslama yapıldığında enzim ilavesi az miktarda da olsa hücre büyümesi üzerine etkisi görülmüştür. *Prasinococcus* sp.'de en iyi hücre büyümesi sırasıyla kontrol ve 1,25 mmol/L enzim varlığında elde edilmiştir. *P. cruentum*'da en yüksek hücre büyümesi sırasıyla 1,25 ve 0,25 mmol/L enzim varlığında elde edilmiştir

Çizelge 4.10 $50\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat konsantrasyonunun elde edilen spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresi

Enzim konsantrasyonu	<i>Prasinococcus</i> sp.		<i>P. cruentum</i>	
	μ (Gün ⁻¹)	D.T(Gün)	μ (Gün ⁻¹)	D.T(Gün)
Kontrol	0,134	5,17	0,161	4,304
0,25 mmol/L	0,137	5,058	0,103	6,728
1,25 mmol/L	0,138	5,021	0,133	5,210

4.18 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddeti ve 2 Farklı Glikosilat Monohidrat Enziminin Ekzopolisakarit Miktarına Etkisi

Belirtilen koşullarda *Prasinococcus*'un en yüksek toplam şeker miktarı kontrol koşullarında elde edilmiştir. İkinci yüksek şeker miktarı 1,25 mmol/L enzim varlığında ölçülmüştür. Çizelge 4.11'e göre enzim ilavesinin toplam şeker miktarına önemli bir etki yaratmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.11 *Prasinococcus* sp.'de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat varlığında ölçülen ekzopolisakarit miktarı

Gün Enzim	1	4	7	10	14
Kontrol	23,33	31,92	67,045	109,35	214,61
0,25mmol/L	21,53	22,55	67,69	102,69	124,09
1,25mmol/L	25,64	40,25	71,4	139,35	140,12

Çizelge 4.12'de belirtildiği gibi *P. cruentum* için en yüksek şeker miktarı 0,25 mmol/L enzim varlığında ölçülmüştür. İkinci en yüksek şeker miktarı 1,25 mmol/L enzim konsantrasyonunun da belirlenmiştir. En düşük şeker miktarı kontrol koşullarında elde edilmiştir. Böylece enzim ilavesinin ekzopolisakarit miktarında artışa neden olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.12 *P. cruentum*'da 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 2 farklı sodyum glikosilat monohidrat varlığında ölçülen ekzopolisakarit miktarı (mg/L)

Gün Enzim	1	4	7	10	14
kontrol	28,20	39,09	68,84	91,53	118,07
0,25mmol/L	22,05	37,24	110,89	148,33	246,53
1,25mmol/L	28,84	61,79	107,69	144,1	147,3

Belirtilen koşullarda enzim ilavesinde iki tür arasında, en yüksek şeker miktarı *Porphyridium*'da elde edilmiştir. Bu değerin *Prasinococcus*'dan elde edilen değerden en az iki katı daha fazla olduğu belirlenmiştir.

4.19 $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ve $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddetlerinde ve 0,54 ve 2 g/L Sodyumbikarbonat ve 0,25 ve 1,25 mmol/L Enzim Varlığında Büyüme Hızında Değişimler

Hücre büyümesini incelemek için hücre sayısı, klorofil A ve OD ölçümleri yapılmıştır. Genel olarak her 4 farklı üreme koşullarında büyüme hızı ve ikilenme süreleri incelendiğinde, *P. cruentum*'un büyüme hızının kontrol koşullarında diğer ortamlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sodyumbikarbonatın ve enzim ilavesinin büyüme hızında ve ikilenme süresinde önemli bir etkisi olmamıştır.

Bizim çalışmaya benzer başka bir çalışma *Chlorella pyrenoidosa* için yapılmıştır. BG-11 ortamında, $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve 0,25 mmol/L ve 0,5 mmol/L enzim eklendiğinde hücre sayısının arttığı fakat büyüme hızının etkilenmediğini rapor etmiştir. Fakat 1,25 mmol/L enzim eklendiğinde bu durum hücre büyümesinde inhibisyona neden olmuştur (Yang et al., 2010).

Scenedesmus obliquus da BG-11 ortamında ve $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde, 0, 0,25 ve 0,5 mM enzim varlığında elde edilen hücre yoğunluğunun 1,25 mM enzim konsantrasyonunda elde edilen miktara göre daha yüksektir. Fakat hücre büyüme hızı 0,85 ve 1,25 mM enzim konsantrasyonlarında, 0,25 ve 0,5 mM konsantrasyonlarındaki miktara göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Düşük enzim konsantrasyonlarda kültür durgun faza ulaşmıştır ama yüksek konsantrasyonlarında, kültür fazla stresden kurtulmaya başlamıştır (Ying Liu et al., 2010).

Porphyridium cruentum'un büyüme hızı 5 farklı ışık şiddetinde (39, 48, 60, 70, 90 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incelenmiştir. Sonuçlara göre ışık şiddeti arttıkça büyüme hızının arttığı belirlenmiştir. Fakat 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetine kadar artış devam etmiştir. 90 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'nin inhibisyon etkisi olmuştur ve büyüme hızı düşmeye başlamıştır (You and Barnette, 2004).

Sodyum bikarbonatın 0, 0,54 ve 2 g/L konsantrasyonlarında ve 120 ve 240 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde *P. purpureum*'un ikileme süresini incelemiştir. En iyi ikilenme süresi 240 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ve 2 g/L sodyum bikarbonat varlığında elde edilmiştir (Vela et al., 2011).

Scenedesmus obliquus' un büyüme hızı BG-11 ve $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ortamında incelemiştir. Sonuçlara göre glikosilat enzimin konsantrasyonu arttıkça büyüme

hızı artmıştır. Kullanılan enzim konsantrasyonları 0, 0,25, 0,50, 0,85 ve 1,25 mM olarak belirtilmiştir (Liu et al.,2010).

P. cruentum 'un ikilenme süresi ışık şiddeti arttıkça artmıştır. 30, 40, 40, 60, 80, 100, 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde yapılan incelemede elde edilen sonuçlara göre 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetine kadar ikilenme süresi artmıştır ama 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'den sonra ikilenme süresi düşmeye başlamıştır (Ligin et al.,2008).

4.20 10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ve 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Işık Şiddetlerinde ve 0,54 ve 2 g/L Sodyum Bikarbonat ve 0,25 ve 1,25 mmol/L Enzim Varlığında Toplam Şeker Miktarındaki Değişimlerin Karşılaştırılması

Dört farklı koşullar altında *Prasinococcus* sp. ve *Porphyridium cruentum*'dan elde edilen toplam ekzopolisakkarit miktarı F/2 ortamında incelenmiştir.

10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve iki farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda *Prasinococcus* sp. ve *P. cruentum*'dan elde edilen polisakkarit miktarı *Prasinococcus* sp. ve *P. cruentum*'da kontrol koşullarında daha yüksek belirlenmiştir. Sodyumbikarbonat ilavesi kültürlerin hiç birinde önemli bir etki göstermemiştir. 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 2 farklı sodyumbikarbonat konsantrasyonunda elde edilen en yüksek polisakkarit miktarı *Prasinococcus* sp.'de kontrol koşullarında elde edilmiştir. Fakat *P. cruentum* 0,54 g/L sodyumbikarbonat varlığında en yüksek şeker miktarı elde edilmiştir. Bu koşullarda iki türdeki şeker miktarlarını kıyasladığımızda, *Prasinococcus* sp.'den elde edilen şeker miktarı, hem yüksek ışıktaki hem düşük ışıktaki kontrol koşullar altında daha yüksektir. Sodyumbikarbonat ilavesi *Prasinococcus* için önemli bir etkisi olmamıştır. Fakat *P.cruentum* kültüründe yüksek ışıktaki 0,54 g/L sodyumbikarbonat varlığında ekzopolisakkarit miktarında artış gözlenmiştir. Bu çalışmaya benzer başka bir çalışma *P. purpureum* için yapılmıştır. Bu çalışmada ASW ortamında, 240 ve 120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde en yüksek ekzopolisakkarit miktarı 2 g/L sodyumbikarbonat eklendiğinde elde edilmiştir. Ama 240 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde üreyen *Porphyridium*'lar daha yüksek miktarda şeker üretmişlerdir (Velea et al.,2011).

10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve iki farklı enzim konsantrasyonunda *Prasinococcus* sp. ve *P. cruentum*' dan elde edilen toplam ekzopolisakkarit miktarı incelenmiştir. Her iki türde kontrol koşullarında ve 1,25 mmol/L enzim varlığında elde edilen değerler birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. En düşük şeker miktarı 0,25 mmol/L enzim eklendiğinde elde edilmiştir. Bu iki tür arasında toplam şeker miktarları kıyaslandığında, en yüksek şeker miktar *Porphyridum*'dan kontrol koşullarında elde edildiği belirlenmiştir. Belirtilen koşullarda enzim ilavesi polisakkarit miktarında önemli bir etki yaratmamıştır. 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve iki farklı enzim konsantrasyonunda en yüksek polisakkarit miktarı *Prasinococcus* sp.' de kontrol koşullarında elde edilmiştir. En düşük şeker miktarı 0,25 mmol/L enzim varlığında elde edilmiştir. *P. cruentum* ortamına 0,25 mmol/L enzim eklendiğinde en yüksek şeker miktarı elde edilmiştir. En düşük şeker miktarı kontrol koşullarında tespit edilmiştir. Fakat bu iki tür arasında elde edilen şeker miktarı kıyaslandığında en yüksek şeker miktarı *Prasinococcus*'un kontrol koşullarında elde edilmesi belirlenmiştir. *Prasinococcus* sp. ortamına enzim ilavesi ekzopolisakkarit miktarına önemli bir etkisi olmamıştır ama *P. cruentum*'da polisakkarit miktarında artışa neden olmuştur.

Bu çalışmaya benzer diğer çalışmalar *Chlorella* ve *Scenedesmus* için yapılmıştır. BG-11 ortamında ve 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde *Scenedesmus obliquus* ve *Chlorella pyrenoidosa*'dan elde edilen ekzopolisakkarit miktarı enzim konsantrasyonunun artması ile artmıştır. Bu çalışmaya göre enzim ilavesi toplam ekzopolisakkarit miktarında önemli bir etkiye neden olmuştur (Liu et al., 2010 ve Yang et al., 2010).

Diğer bir çalışmada sodyum glikozilatı bir kere 30 mM konsantrasyonunda veya günlük 10mM konsantrasyonunda heterocytous cyanobacterium ortamına ilave edildiğinde ekzopolisakkarit miktarı kontrol ortamına göre %43 oranında artmıştır (Philippis et al., 1996).

Başka bir çalışmada glikosilat ilavesi farklı etkiler yaratmıştır. Bergman'a göre *Anabaena cylindrica* ortamına glikozilat ilavesi ile ortamda viskozite artmıştır ve karbohidrat miktarında artışa neden olmuştur. Özellikle siyanobakterilerde depolanan glikojen granalların miktarında artışa neden olmuştur. Fikosiyanin konsantrasyonunda düşüş meydana gelmiştir. Klorofil A, fikosiyanin oranı artmıştır. Bununda nedeni glikozilat varlığında C,N oranı artmıştır. N₂ ve CO₂ fiksasyonu artmıştır.

Bizim çalıştığımız projenin sonuçlarının fikir aldığımız kaynaklardan farklı olduğunu tespit ettik. Bu farklılıkların nedeni kullanılan ortamların farklı olması, ışık şiddetlerinin farklı olması ve türlerin birbirinden farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çevresel koşullar farklı mikroorganizmalarda farklı etkiler yaratır ve buda mikroorganizmalardan elde edilen kimyasalları etkilemektedir.

Çizelge 4.13 14 . günde $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ve $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde ve $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ölçülen ekzopolisakkarit miktarı(mg/L)

	$10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde (mg/L)				$50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde (mg/L)			
	Enzim miktarı	Şeker miktarı	Sodyum bikarbonat miktarı	Şeker miktarı	Enzim miktarı	Şeker miktarı	Sodyum bikarbonat miktarı	Şeker miktarı
<i>Prasinococcus</i> sp.	Kontrol	71,79	Kontrol	96,15	Kontrol	214,61	Kontrol	275,5
	0,25 mmol/L	68,2	0,54 gr/L	80,63	0,25 mmol/L	124,09	0,54 gr/L	116,02
	1,25 mmol/L	79,1	2 gr/L	67,6	1,25 mmol/L	140,12	2 gr/L	133,65
<i>P. cruentum</i>	Kontrol	91,4	Kontrol	84,57	Kontrol	118,07	Kontrol	40,89
	0,25 mmol/L	63,45	0,54 gr/L	70,76	0,25 mmol	246,53	0,54 gr/L	92,2
	1,25 mmol/L	90,63	2 gr/L	81,68	1,25 mmol/L	147,3	2 gr/L	36,41

4.21 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 2 farklı enzim konsantrasyonunun ekzopolisakkarit kompozisyonuna etkisi

	Organizma	<i>Prasinococcus</i> sp.			<i>Porphyridum cruentum</i>		
	Enzim konsantrasyonu	Kontrol	0,25mmol/L	1,25mmol/L	Kontrol	0,25mmol/L	1,25mmol/L
Monosakkarit	Man	1,95	1,635	1,729	2,074	3,244	6,041
	Rham	0,685	1,467	0,449	0,694	1,224	1,498
	GlcNAC	0,001	0,017	0	0,002	0,056	0,018
	Glc	0,138	0,444	0,075	0,613	5,996	8,047
	GalNAC	0,001	0,002	0	0,001	0,018	0,019
	Gal	0,721	1,461	0,474	2,470	5,126	5,601
	Arb+xyl	1,587	2,571	0,654	2,336	3,717	3,402

Çizelge 4.14 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 2 farklı enzim konsantrasyonunun ekzopolisakkarit kompozisyonuna etkisi

Prasinococcus sp.de kontrole göre monosakkaritlerin miktarını en fazla etkileyen enzim konsantrasyonu 0,25 mmol/L dir. 1,25 mmol/L enzim varlığı hiçbir artış gözlenmemiştir. 0,25 mmol/L enzim varlığında, Rham (Ramnoz),

GlcNAC (N-Asetilglukozamin), Glc (glukoz), Gal (Galaktoz), Arab+xyl (Arabinoz+ ksiloz) miktarları hem kontrol hem de 1,25 mmol/L ye göre daha yüksektir. Kontrol koşullarında sadece Man (Mannoz)' nin miktarı diğerlerine göre daha yüksektir.

P. cruentum'da en yüksek monosakkarit miktarı 1,25 mmol/L enzim varlığında ve en düşük miktar kontrolde elde edilmiştir. 1,25 mmol/L ve 0,25 mmol/L enzimin monosakkaritlerin miktarlarındaki etkiye bakınca 0,25 mmol enzim eklendiğinde sadece GlcNAC ve Arb xyl miktarı, 1,25 mmol/L konsantrasyonda ki miktara göre daha yüksektir. Diğer kompozisyonların miktarı (Man, Rham, Glc, GalNAC, Gal) 1,25 mmol/L enzim varlığında kontrol ve 0,25 mmol/L enzim konsantrasyonuna göre daha yüksektir.

P.cruentum ve *Prasinococcus* sp. arasında kompozisyonların miktar farkına bakınca, *Prasinococcus* sp.'de en fazla etki yaratan konsantrasyonun 0,25 mmol/L iken *P.cruentum*'da 1,25 mmol/L olduğu anlaşılmıştır. Fakat genel bir kıyaslamada 0,25 ve 1,25 mmol/L konsantrasyonlarında *Porphyridium*'da tüm monosakkaritlerin mikatrı daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Sadece *Prasinococcus* sp. supernatantında Rham miktarı *P.cruentum*'un kine göre daha yüksektir.

Başka bir çalışmada siyanobakteri *Synechocystis* sp. ve *Chlorococcum* sp.'den oluşan bir biyofilmin farklı koşullarda ürettiği kapsular polisakkaritlerin monosakkarit incelenmesi yapılmıştır. Yapılmış olan bu çalışmada farklı ışık şiddetlerinde ve farklı sıcaklıkta monosakkarit miktarları değişmiştir (Di pippo et al., 2011). Bu sonuçlar Çizelge 4.15' de özetlenmiştir.

Çizelge 4.15 Aktif biyofilmden elde edilen kapsular polisakkaritin kompozisyon incelenmesi- 20°C ve 30°C- 60 ve 120 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Mol %) (Di pippo et al., 2011)

Sıcaklık	20°C		30°C	
Işık şiddeti	60	120	60	120
Fuc	0	0	8,8	11,8
Rhamn	20,4	22,5	6,2	7,8
Ara	0	0	9,9	5,8
Gal	3,2	4	17,3	14,2
Clc	27,3	36,5	37,6	41,3
Man	0	0	9,1	7,3
Xil	2	0	5,6	4
Rib	13,9	0	1,7	1,8
GlcA	16	12	0	2,3
GalA	0	0	0	0,5
Galam	0	0	1,4	3,2
Glcam	17,2	25	2,4	0

ÖNERİLER

Son yıllarda yenilenebilir enerji kaynaklarına ve ekonomik üretim yöntemlerine olan ilgi artmıştır. Alglerin bu enerji kaynakları arasındaki yerinialma nedeni ise hızlı büyüme özelliğine sahip olmaları, ortam koşullarındaki değişimlere dayanıklı ve toleranslı olmaları sayılabilir.

Yapılan çalışmada *Prasinococcus sp.* ve *P. cruentum*'dan farklı üretim koşullarında polisakkarit eldesi amaçlanmıştır.

Tek hücreli yeşil mikroalg olan *Prasinococcus sp.* ve tek hücreli kırmızı mikroalg olan *P. cruentum* birçok kimyasal açıdan zengindirler. İçeriğindeki polisakkarit, çoklu doymamış yağ asitleri, B-PE gibi değerli ve ticari açıdan önemli bileşikler nedeniyle de giderek önem kazanmakta olduklarından dolayı ve ayrıca mikroalglerdeki biyokimyasal kompozisyonun ortam koşullarına göre değiştiği bilindiğinden böyle bir çalışma düzenlenmiştir. Sıcaklık, ışık şiddeti, kültür ortamı ve ışık kalitesi gibi parametreler değiştirilerek hücre artışı ve biyokimyasal kompozisyonları değerlendirilmiştir.

Prasinococcus sp. içeriğindeki bileşenlerin hangi ortam koşullarında daha iyi artış gösterdiğini bilmek ekonomik açıdan iyi olacağından analizi yapılan biyokimyasal komponentlerin optimum üretiminin gerçekleştiği koşullar belirlenmiştir. Ayrıca, Türkiye'de *Prasinococcus sp.* ile ilgili çalışmaların kısıtlı sayıda olduğu görülmüş ve bu eksikliği gidermek amacıyla böyle bir ön çalışma düzenlenmiştir.

Bu çalışmada, *Prasinococcus sp.* *P. cruentum* ile yüksek polisakkarit potansiyeli olduğundan dolayı karşılaştırılmıştır. Her iki türün polisakkarit miktarı farklı fiziksel ve kimyasal koşullarında incelenmiştir. Aynı koşullar altında elde edilen polisakkarit miktarının *Prasinococcus sp.*'de daha fazla olduğu belirtilmiştir. Ama başka kaynaklara göre bu kırmızı mikroalg başka koşullar altında daha fazla polisakkarit üretmiştir. Bunun nedeni *P. cruentum*'un F/2 ortamını ve bu ortamda sodyumbikarbonat varlığını tolere edememesidir. Bu sonuçlara dayanarak dikkat etmemiz gereken nokta şu ki her mikroorganizmanın üreme koşulları diğer mikroalglerden farklıdır ve her koşulda aynı performansı göstermeyebilir. Önemli olan nokta, bizim koşullarımıza ve imkanlarımıza uyabilecek türün doğru seçilmesidir.

Prasinococcus sp. yeni bir tür olduğundan dolayı bu konuda yeterli çalışma ve inceleme yapılmamıştır. Bu yüzden sonuçları karşılaştırma için uygun kaynak bulunmamaktadır. Bu projede elde ettiğimiz veriler; *Prasinococcus* sp.'nin toleranslı bir tür olduğu ve en kısıtlı koşullarda bile üremeye devam ettiği'dir. Ayrıca, ışık şiddetinin artması hücrenin büyümesini artırmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar beklentileri karşılamamıştır ama gelecekte yapılacak diğer çalışmalar için yararlı bir kaynak olacağı düşünülmektedir. Farklı ortamların kullanılmasıyla beraber ışık şiddetinin artırılması hücreden daha fazla polisakkarit elde edilebileceğini düşünülmektedir.

Literatürlerde kimyasal ve fiziksel koşulların değişmesi şeker miktarının değişmesine neden olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada da kimyasal ve fiziksel koşulların şeker üretimine etkisi üzerine değerlendirme yapılmıştır. Enzim ilavesi ile ortamın kimyasal kompozisyonunda değişiklik yaratılmıştır ve elde edilen sonuçlar önceki çalışmaları doğrulamıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Al-Qasmi M., Member N.R., IAENG, Talebi S., Al-Rajhi S. and Al-Barwani T.**, 2012, A Review of Effect of Light on Microalgae Growth, Proceedings of the World Congress on Engineering WCE, I:4 – 6pp.
- Armstrong, G.A. and Hearst, J.E.**, 1996, Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoidpigment biosynthesis. FASEB J. USA, 10:228–237pp.
- Azov, Y.**, 1982, Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. Appl. Environ. Microbiol, Israel, 43:1300–1306pp.
- Bailey, E. and Hullin, R.P.**, 1966, The metabolism of glyoxylate by cell-freeextracts of *Pseudomonas* sp. Biochem. J., 101:755–763pp.
- Bavington, C.D. and Moss C.**, 2013. “Patents-Polysaccharides from prasinococcales WO 2013167911 A1” <http://www.google.com/patents/WO2013167911A1?cl=en> (Erişim tarihi: 14 Nov 2013).
- Bergman B.**, 1985, Glyoxylate induce changes in the carbon and nitrogen metabolism of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*, Plant Physiol, 80: 698-701pp.
- Berman-Frank, I. and Dubinsky, Z.**, 1999, Balanced growth and aquatic plants: Myth or reality? Phytoplankton use the imbalance between carbon assimilation and biomass production to theirstrategic advantage, Bioscience, 49:29-37pp.
- Borchardt, J.A. and Azad, H.S.**, 1968, Biological extraction of nutrients. J. Water Pollut. Control Fed, 40:1739–1754pp.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M. and Saoncella, A.**, 2001, An algal biosensor for themonitoring of water toxicity in estuarine environments. Water Res, 35:69–76pp.
- Campbell, Jr. L.L.**, 1954, The mechanism of allantoin degradation by a *Pseudomonas*. J. Bacteriol, 68:598–603pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Campbell, L.L., Jr.** 1955, The oxidative degradation of glycine by a *Pseudomonas*. J. Biol. Chem, 217:669–673pp.
- Carvalho P.A, Cristina, M., Monteiro, F. and Xavier M.,** 2011, Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*, Journal of applied phycology, 21(5):543-552 pp.
- Carvalho, P.A, Silva, S.O, Baptista, J.M. and Malcata, F.X,** 2010, Light requirements in microalgal photobioreactors:an overview of biophotonic aspects, Appl Microbiol Biotechnol, 89:1275–1288pp.
- Cheirsilp, B. and Torpee, S.,** 2012, Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophicculture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batchcultivation, Bioresource Technology 110 Thailand, 510–516pp.
- Chisti, Y.,** 2007, Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv, 25:294–306pp.
- Cloern, J.E., Grenz, C. and Videgar-Lucas, L.,** 1995, An empirical model of the phytoplanktonchlrophyll: Carbon ratio—the conversion factor between productivity and growth rate. Limnol. Oceanogr, 40:1313–1321pp.
- Coleman, J.R. and Colman, B.,** 1981, Inorganic carbon accumulation and photosynthesis in a blue-green alga as a function of external pH. Plant Physiol, 67: 917–921pp.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P. and del Borghi, M.,** 2009, Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chem. Eng. Process. 48:1146–1151pp.
- Cunningham, F.X., Jr. Dennenberg, R.J., Jursinic, P.A. and Gantt, E.,** 1990, Growth under red light enhances photosystem II relative to photosystem I and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum*. Plant Physiol, 93:888–895pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Demirbas, A.**, 2010, Use of algae as biofuel sources. *Energy Convers. Manag.* 51:2738–2749pp.
- Dermoun D, Chaumont D**, 1992, Modelling of growth of *Porphyridium cruentum* in connection with two interdependent factors: light and temperature, *Bioresour and Technol*, 42:113-117
- Di Pippo, F., William Ellwood, N.T., Guzzon, A., Siliato, L., Micheletti, E., De Philippsis, R., and Albertano, B.P.**, 2011, Effect of light and temperature on biomass, photosynthesis and capsular polysaccharides in cultured phototrophic biofilms, *J.appl. Phycol*, 24:211-220 pp.
- Donot, F., Fontana, Ab, Baccou, J.C. and Schorr-Galindo, S.**, 2012, Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction, *Carbohydrate Polymers*, 87(2): 951–962pp.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A. and Smith, F.**, 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28: 350-356pp.
- Emerson, R.; Stauffer, J. and Umbreit, W.**, 1944, Relationships between phosphorylation and photosynthesis in *Chlorella*, *Am. J. Bot.* 31, 107–120pp.
- Filomena de Jesus Raposo, M., Manuel Santos Costa de Moraes, R. and Maria Miranda Bernardo deMoraes, A.**, 2013, Health applications of bioactive compounds from marine microalgae, *Life Sciences*, 93(15):479–486pp.
- Ghose, T.K.**, 1987, Measurement Of Celulase Activities, *Pure & Ap!.Chem.*, Vol. 59, No. 2, p. 257—268:1987pp.
- Gordillo, F.J.L., Goutx, M., Figueroa, F.L. and Niell, F.X.**, 1998, Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *J. Appl. Phycol*, 10:135–144pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gordillo, F.J.L., Jiménez, C., Figueroa, F.L. and Niell, F.X.**, 1998, Effects of increased atmospheric CO₂ and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). J. Appl. Phycol, 10:461–469pp.
- Greene, R.M., Geider, R.J., Kolber, Z. and Falkowski, P.G.**, 1992, Iron-induced changes in light harvesting and photochemical energy conversion processes in eukaryotic marine algae. Plant Physiol, 100:565–575pp.
- Hansen, P.J.**, 2002, Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: Implications for species succession. *Aquat. Microb. Ecol.* 01:28, Denmark, 279-288pp.
- Hansen, R.W. and Hayashi, J.A.**, 1962, Glycolate metabolism in *Escherichiacoli*. J. Bacteriol, 83:679–687pp.
- Juneja, A., Micheal Ceballes, R. and SMurthy, G.**, 2013, Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production, energies, 6, USA, 4607-4638pp.
- Kalacheva, G., Zhila, N., Volova, T. and Gladyshev, M.**, 2002, The effect of temperature on the lipid composition of the green alga *Botryococcus*. Microbiology, 71:286–293pp.
- Kilham, S., Kreeger, D., Goulden, C. and Lynn, S.**, 1997, Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. Freshw. Biol, 38:591–596pp.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S.**, 1993, Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. Appl. Environ. Microbiol, 59:867–873pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kolber, Z., Zehr, J. and Falkowski, P.,** 1988, Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. *Plant Physiol*, 88:923–929pp.
- Koller, M., Salerno, A., Tuffner, P. Koinigg, M., Böchzelt, H., Schober, S., Pieber, S., Schnitzer, H., Mittelbach, M. and Braunegg, G.,** 2012, Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: a review, *Journal of Cleaner Production*, Volume 37, Austria, 377–388pp.
- Kornberg, H.L. and Gotto, A.M.,** 1961, The metabolism of C₂ compounds in micro-organism. 6. Synthesis of cell constituents from glycolate by *Pseudomonas* sp. *Biochem. J*, 78:69–82pp.
- Kornberg, H.L. and Sadler, J.R.,** 1961, The metabolism of C₂-compounds in micro-organisms. *Biochem. J*, 81:503–513pp.
- Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcińska, M. and Tys, J.,** 2013, Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 37 (4):735–741pp.
- Kudo, I., Miyamoto, M., Noiri, Y. and Maita, Y.,** 2000, Combined effects of temperature and iron on the growth and physiology of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 36:1096–1102pp.
- Kyong, H. P. and Choul-Gyun L.,** 2001, Effectiveness of flashing light for increasing photosynthetic efficiency of microalgal cultures over a critical cell density, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Volume 6, Issue 3, Korea, 189-193 pp.
- Larned, S.,** 1998, Nitrogen-versus phosphorus-limited growth and sources of nutrients for coral reef macroalgae. *Mar. Biol*, 132:409–421pp.
- Liu, B.H. and Lee, Y.K.,** 2000, Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol*, 12:301–307pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, Y.A., Wang, W.A., Zhang, M.B., Xing P.B. and Yang, Z.A.,** 2010, PSII-efficiency, polysaccharide production, and phenotypic plasticity of *Scenedesmus obliquus* in response to changes in metabolic carbon flux, *Biochemical Systematics and Ecology*, 292–299pp.
- Liu, Z.Y., Wang, G.C. and Zhou, B.C.,** 2008, Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol*, 99:4717–4722pp.
- Mayakrishnan, V. Kannappan, P. Noorlidah, A. and Abdul Bakrudeen A. A.,** 2013, Cardioprotective activity of polysaccharides derived from marine algae: An overview, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 30, Issue 2, Malaysia, 98–104pp.
- Moroney, J.V. and Tolbert, N.E.,** 1985, Inorganic carbon uptake by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 77:253–258pp.
- Morris, I. Glover, H. and Yentsch, C.,** 1974, Products of photosynthesis by marine phytoplankton: The effect of environmental factors on the relative rates of protein synthesis. *Mar. Biol*, 27:1–9pp.
- Muradyan, E., Klyachko-Gurvich, G., Tsoglin, L., Sergeyenko, T. and Pronina, N.,** 2004, Changes in lipid metabolism during adaptation of the *Dunaliella salina* photosynthetic apparatus to high CO₂ concentration. *Rus. J. Plant Physiol*, 51:53–62pp.
- Nicolaus B., Kambourova, M. and Toksoy Öner, E.,** 2010, Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology, *Environ Technol*, 31(10):1145-58pp.
- Ornston, L.N. and Ornston, M.K.,** 1969, Regulation of glyoxylate metabolism in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol*, 98:1098–1108pp.
- Philippis, R.D, Silic, C. An Vincenzini, M.,** 1996, Response of an exopolysaccharide-producing heterocystous cyanobacterium to changes in metabolic carbon flux, *Journal of Applied Phycology*, 8:275-281pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pohlmann, A. A. and McColl. J.G.** 1988, Soluble organics from forest litter and their role in metal dissolution. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 52:265–271pp.
- Raven, J.A.; Geider, R.J.**, 1988, Temperature and algal growth. *New Phytol.* 110, 441–461pp.
- Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G. and Parry, D.L.**, 2002, Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211 Australia, 195–214pp.
- Richardson, B. Orcutt, D., Schwertner, H., Martinez, C.L. and Wickline, H.E.**, 1969, Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Appl. Microbiol*, 18:245–250pp.
- Sakai, S., Inokuma, K., Nakashimada, Y. and Nishio, N.**, 2007, Degradation of Glyoxylate and Glycolate with ATP Synthesis by a Thermophilic Anaerobic Bacterium, *Moorella* sp. Strain HUC22-Applied and Environmental Microbiology, 1447–1452pp.
- Sam, S., Küçükaşık, F., Yenigun, O., Nicolaus, B., Toksoy Öner, E. and Yükselen, MA.**, 2011, Flocculating performances of Exopolysaccharides produced by a Halophilic bacterial strain cultivated on agro-industrial waste, *Bioresource Technology*, Volume 102, Issue 2, Cyprus, 1788–1794pp
- Sato, N., Hagio, M., Wada, H. and Tsuzuki, M.**, 2000, Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes. *Biochem. Soc. Trans*, 28:912–914pp.
- Shinsuke, S., Kentaro I., Yutaka N. and Naomichi N.**, 2008, Degradation of Glyoxylate and Glycolate with ATP Synthesis by a Thermophilic Anaerobic Bacterium, *Moorella* sp. Strain HUC22-1, *Appl Environ Microbiol*, 74(5): 1447–1452pp.
- Simionato D., Basso S., Giacometti G.M., Morosinotto T.**, 2013a, Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae, *Biophys. Chem.*, 182, 71-78pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sorokin, C. and Krauss, R.W.**, 1962, Effects of temperature & illuminance on chlorella growth uncoupled from cell division. *Plant Physiol*, 37:37–42pp.
- Standford, P.A and Braind, J.** 1983, Industrial Utilization Of Polysaccharide. The polysaccharides, G.O. Aspinall (Ed), Academic press, 2:411-490pp.
- Sterner, R.W. and Grover, J.P.**, 1998, Algal growth in warm temperate reservoirs: Kinetic examination of nitrogen, temperature, light, and other nutrients. *Water Res*, 32:3539–3548pp.
- Stewart, R. and Codd. G.A.**, 1981, Glycollate and glyoxylate excretion by *Sphaerocystis schroeteri* (*Chlorophyceae*). *Br. Phycol. J*, 16:177–182pp.
- Sukatar, A.**, 2002, Alg kültür yöntemleri, ege üniversitesi basım evi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi kitaplar serisi no.184, 168pp.
- Sutherland, IW.**, 1998, Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol*, 16(1):41-6pp.
- Sverre Mykkestad, M.**, 1999, Phytoplankton extracellur production and leakage with consideration on the polysaccharide accumulation, *Anne. Ist. Super. Sanita*, 35(3): 401-404pp.
- Tani, M., T. Higashi, and S. Nagatsuka.** 1993. Dynamics of low-molecularweightaliphatic carboxylic acids (LACAs) in forest soils in Japan. *Soil Sci.Plant Nutr*, 39:485–495pp.
- Theodorou, M.E., Elrifi, I.R., Turpin, D.H. and Plaxton, W.C.**, 1991, Effects of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green alga *Selenastrum minutum*, *Plant Physiol*, 95:1089–1095pp.
- Titman, D.**, 1976, Ecological competition between algae: Experimental confirmation of resource-based competition theory, *Science*, 192(4238):463-465pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tjahjono, A.E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N. and Nagai, S.** 1994, Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures, biotechnology letters, 16(2):133-138 pp.
- Toksoy Öner, E.,** 2013, Microbial Production of Extracellular Polysaccharides from Biomass, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 53-57pp.
- Tripathi, U., Sarada, R. and Ravishankar, G.,** 2002, Effect of culture conditions on growth of greenalga—*Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. Acta Physiol. Plant, 24(3):323-329pp.
- Van Leeuwe, M.A. and Stefels, J.,** 1998, Effects of iron and light stress on the biochemical composition of Antarctic *Phaeocystis* sp. (*Prymnesiophyceae*). II. Pigment composition. J. Phycol, 34:496–503pp.
- Velea, S., Iie, L. and Filipescu, L.,** 2011, Optimization of *porphyridium purpureum* culture growth using two variables experimental design: Light and Sodiumbicarbonate, U.P.B. Sci. Bull., Series B, 73(4):81-94pp.
- Vijayakumar, M., Priya, K., Noorlidah Abdullaha and Abdul Bakrudeen A. A.,** 2013, Cardioprotective activity of polysaccharides derived from marine algae: An overview, Trends in Food Science & Technology xx 1-7pp.
- Visviki, I. and Palladino, J.,** 2001, Growth and cytology of *Chlamydomonas acidophila* under acidic stress. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 66:623–630pp.
- Wegener, W.S., H. C. Reeves, R. Rabin, and Ajl. S.J.,** 1968, Alternate pathways of metabolism of short-chain fatty acids. Bacteriol. Rev, 32:1–26pp.
- Wolkers, H. Barbosa, M. Dorinde M. Kleinegris, M.. Bosma R. and René Wijffels, H.** 2011, microalgae the green gold of the future?,
- Xu, X.Q. and Beardall, J.,** 1997, Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an antarctic hypersaline lake. phytochemistry, 45(4):655–658pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang Z., A., Liu Z., A., Ge J., A., Wei W., Chen Y., B. and Montagnes D., C.,** 2010, Aggregate formation and polysaccharide content of *Chlorella pyrenoidosa* Chick (Chlorophyta) in response to simulated nutrient stress, *Bioresource Technology*, 101(21):8336–8341pp.
- You, T. and Barnett, M.S.,** 2004, Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*, *Biochemical Engineering Journal*, 19:251–258pp.
- Zhila, N.O., Kalacheva, G.S. and Volova, T.G.,** 2011, Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *J. Appl. Phycol*, 23(1): 47-52 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Mina TEBİANİ 1985 yılında İran'ın Tebriz şehrinde doğmuştur. Lise eğitimini 2003 yılında Rahnemun Lisesin'de tamamlamıştır. İran Azad Üniversitesi gıda mühendisliği Bölümünden gıda mühendis ünvanı alarak 2008 yılında mezun olmuştur. 2011 yılında Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başlamıştır.