T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYEL EKZOPOLİSAKKARİTLERE ALTERNATİF OLARAK MİKROALGAL EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

SEDEF KAPTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. DİDEM ÖZÇİMEN

İSTANBUL, 2016

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYEL EKZOPOLİSAKKARİTLERE ALTERNATİF OLARAK MİKROALGAL EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Sedef KAPTAN tarafından hazırlanan tez çalışması 21.11.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Sevil YÜCEL

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Yrd. Doç. Dr. Serdar UYSAL

Bezmialem Vakıf Üniversitesi _____

Bu çalışma, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nün 15/AR-GE/35 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, farklı besiyeri içeriklerinin ve ışıklanma döngülerinin ekzopolisakkarit (EPS) üretimine etkilerini incelemek amacıyla bakterilerden farklı olarak yeni nesil hammadde ve enerji kaynağı olan mikroalgler değerlendirilmiştir. Çalışmada ekzopolisakkarit üretimi için farklı mikroalg türleri belirlenmiş *(Chlorella minutissima, Botrycoccus braunii, Chlorella sorokiniana*) ve ekzopolisakkarit üretim miktarlarındaki farklılığın ayrıntılı incelenebilmesi için alglerin petri ortamında katı besiyerinde üretimleri gerçekleştirilmiştir. Alg üretim parametrelerinin EPS ürün verimi üzerine olan etkisi Box-Behnken deneysel tasarım metotu kullanılarak istatistiksel olarak incelenmiş ve her mikroalg türü için en yüksek EPS veriminin sağlandığı optimum alg üretim koşulları belirlenmiştir. Ayrıca üretilen EPS ürünlerine FTIR, TGA analizleri uygulanmış olup bakteriyel kaynaklı EPS ile mikroalgal kaynaklı EPS ürünleri arasındaki farklılık ortaya konulmuş ve EPS üretiminde yeni nesil bir hammadde kaynağı önerilmiştir.

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca biliminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı değerli hocam sayın Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim esnasında bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Mustafa Tahsin YILMAZ' a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım sırasında bilgilerinden faydalandığım, yardımlarını hiç esirgemeyen arkadaşlarım Benan İNAN ve Anıl Tevfik KOÇER' e teşekkür ederim.

Ayrıca; tüm yaşamım boyunca her türlü zorluğa rağmen sevgisini ve maddi manevi desteklerini asla esirgemeyen aileme de çok teşekkür ederim.

Kasım,2016

SEDEF KAPTAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ VII

KISALTMA LİSTESİ VIII

ŞEKİL LİSTESİ IX

ÇİZELGE LİSTESİ X

ÖZET XI

ABSTRACT XIII

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Orijinal Katkı 3

BÖLÜM 2

EKZOPOLİSAKKARİTLER 4

2.1 Ekzopolisakkaritler 4
2.2 Ekzopolisakkarit Çeşitleri ve Genel Özellikleri 8
2.3 Ekzopolisakkaritlerin Kullanım Alanları 13

BÖLÜM 3

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA 20

3.1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Mikroalgler 20
3.1.1 Chlorella minutissima 20
3.1.2 Botrycoccus braunii 21
3.1.3 Chlorella Sorokiniana 24
3.2 Mikroalgal EPS Üretim Parametreleri 25

3.3 Deneysel Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 27
3.3.1 BG 11 Besiyeri İçeriği (Blue Green Medium) 27
3.4 Deneysel Prosedür 29
3.4.1 EPS Üretim Prosesi Aşamaları 29
3.4.2 Mikroalglerin İçeriğindeki EPS Miktarlarının Belirlenmesi 31
3.4.3 Box Behnken Analizi 32
3.4.4 JMP Analizi ve Sonuçları 40
3.4.5 FTIR Analizi ve Sonuçları 41
3.4.6 Klorofil-a Analizi 43
3.4.7 Termogravimetrik Analiz 45

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 48

KAYNAKLAR 52

EK-A

BOX BEHNKEN TASARIM MATRİSİ 59

A-1 *Chlorella sorokiniana* mikroalginden üretilen EPS miktarları için Box Behnken tasarım matrisi 59
A-2 *Botrycoccus braunii* mikroalginden üretilen EPS miktarları için Box Behnken tasarım matrisi 60
A-3 *Chlorella minutissima* mikroalginden üretilen EPS miktarları için Box Behnken tasarım matrisi 61

EK-B

FTIR SPEKTRUMU 62

B-1 *Chlorella sorokiniana* mikroalginden üretilen EPS' nin FTIR spektrumu 62
B-2 *Botrycoccus braunii* mikroalginden üretilen EPS' nin FTIR spektrumu 63
B-3 *Chlorella minutissima* mikroalginden üretilen EPS' nin FTIR spektrumu 63

EK-C

TG-DTG GRAFİKLERİ 64

C-1 *Chlorella sorokiniana* mikroalginden üretilen EPS' nin TG-DTG grafikleri 64
C-2 *Botrycoccus braunii* mikroalginden üretilen EPS' nin TG-DTG grafikleri 65
C-3 *Chlorella minutissima* mikroalginden üretilen EPS' nin TG-DTG grafikleri 65

ÖZGEÇMİŞ 66

SİMGE LİSTESİ

Da	Dalton
g	Gram
l	Litre
μg	Mikrogram
ml	Mililitre
°C	Santigrat

KISALTMA LİSTESİ

BG	Blue Green Medium
EPS	Ekzopolisakkarit
FTIR	Flouresence Transform Infrared
GRAS	Genellikle güvenliği kabul edilen ürünler
TGA	Termogravimetrik Analiz
TCA	Trikloroasetik asit
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1 Farklı fenotipteki mikroalgler [1] 1
Şekil 1. 2 Mikroalglerin genel kullanım alanları [2] 2
Şekil 2. 1 EPS biyosentezi [7] 5
Şekil 2. 2 Ksantan biyosentezi [15] 9
Şekil 2. 3 Gellan biyosentezi [13] 10
Şekil 2. 4 Aljinat biyomolekülünün kimyasal yapısı [17] 10
Şekil 2. 5 Glukan biyomolekülünün kimyasal yapısı [6] 11
Şekil 2. 6 Hyaluronan biyomolekülünün kimyasal yapısı [13] 11
Şekil 2. 7 Levan biyomolekülünün kimyasal yapısı [13] 11
Şekil 3. 1 *Chlorella minutissima* 20
Şekil 3. 2 *Botrycoccus braunii* 22
Şekil 3. 3 *Chlorella sorokiniana* 24
Şekil 3. 4 Besiyeri hazırlanışı 29
Şekil 3. 5 EPS sentezi 30
Şekil 3. 6 Farklı stres koşulları altında mikroalg gelişimi 31
Şekil 3. 7 Karbonhidrat analizi için farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış örnekler .. 32
Şekil 3. 8 Toplam karbonhidrat analizinde kullanılan PG Instrument T60 model UV spektrofotometre 32
Şekil 3. 9 Mikroalgal EPS' lerin FTIR spektrumu 42
Şekil 3. 10 Klorofil analizi sonrası mikroalgler 43
Şekil 3. 11 Mikroalg türlerinin TG eğrileri 46
Şekil 3. 12 Mikroalgal EPS' lerin DTG eğrileri 46

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Bakterilerden elde edilen EPS üretim miktarı [12,13] 7
Çizelge 2. 2 Mikroalglerden elde edilen EPS üretim miktarı[13,14]..... 7
Çizelge 2. 3 EPS' lerin fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri, uygulama alanları [13] 12
Çizelge 2. 4 Gıda alanında kullanılan EPS türlerinin fizikokimyasal özellikleri ve uygulama alanları [17]..... 14
Çizelge 2. 5 İlaç ve biyomedikal alanlarında kullanılan EPS türlerinin fizikokimyasal özellikleri ve uygulama alanları [17]..... 17
Çizelge 3. 1 *Botrycoccus braunii'* nin farklı parametrelerde hidrokarbon üretim oranı 23
Çizelge 3. 2 BG 11 besiyeri içeriği [62]..... 28
Çizelge 3. 3 İz elementi solüsyon içeriği [62]..... 28
Çizelge 3. 4 Standart glikoz konsantrasyon değerleri [64] 31
Çizelge 3. 5 Mikroalg türleri için UV değerleri ve hücre sayıları..... 33
Çizelge 3. 6 Farklı koşullar altında üretilmiş olan mikroalglerden ekzopolisakkarit eldesi deney parametreleri 33
Çizelge 3. 7 *C. sorokiniana* mikroalginden ekzopolisakkarit üretim parametrelerinin ürün verimi üzerine etkisinin istatistiksel incelenmesi 34
Çizelge 3. 8 *B. braunii* mikroalginden ekzopolisakkarit üretim parametrelerinin ürün verimi üzerine etkisinin istatistiksel incelenmesi..... 36
Çizelge 3. 9 *C. minutissima* mikroalginden ekzopolisakkarit üretim parametrelerinin ürün verimi üzerine etkisinin istatistiksel incelenmesi 38
Çizelge 3. 10 Bir hücre başına EPS miktarlarının Box Behnken deneysel tasarım modelinden elde edilen deneysel sonuçları ve giriş değişkenleri arasındaki etkileşimin denklemleri ve korelasyon katsayılarının karesi . 39
Çizelge 3. 11 Mikroalgal EPS üretim miktarlarının karşılaştırılması 40
Çizelge 3. 12 Mikroalgal EPS' lerin varyans analizi sonuçları 40
Çizelge 3. 13 Mikroalglerden Elde Edilen EPS'lerin FTIR Analiz Spektrumuna Göre Tanımlanabilen Fonksiyonel Grupları [66,67,68,69] 41
Çizelge 3. 14 Aydınlanma döngüsü 8:16 için klorofil-a miktarları..... 44
Çizelge 3. 15 Aydınlanma döngüsü 12:12 için klorofil-a miktarları..... 44
Çizelge 3. 16 Aydınlanma döngüsü 14:10 için klorofil-a miktarları..... 44
Çizelge 3. 17 Mikroalgal EPS' lerin bozunma sıcaklıkları ve miktarları..... 47

ÖZET

BAKTERİYEL EKZOPOLİSAKKARİTLERE ALTERNATİF OLARAK MİKROALGAL EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Sedef KAPTAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Didem Özçimen

Canlıların vücudunda gerçekleşen metabolik reaksiyonlar sonucunda oluşan ürünler, metabolitlerdir. Metabolitler büyüme, gelişme ve çoğalma için gerekli olmanın yanı sıra diğer canlıların yaşamı için de fayda sağlayabilmektedir. Mikroalgler, ticari değeri olan metabolitlere sahip mikrobiyal kaynaklardır. Bu metabolitler karbonhidrat, protein, yağ, vitaminler ve biyoaktif moleküllerdir. Dünya çapında yüksek oranda bulunan mikroalgler 1950' li yıllarda biyoteknolojik uygul8uamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Mikroalglerin güneş enerjisini biokütleye dönüştürmeleri bilinen en etkin ve ekonomik yoldur. Uzakdoğu'da insan gıdası olarak kullanılan mikroalgler birçok ülkede de hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca mikroalg metabolitleri olan antibiyotikler, vitaminler ve pigmentler; kozmetik, tıp ve eczacılık ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Mikroalglerin en önemli metabolitlerinden biri olan ekzopolisakkaritler (EPS), karbonhidrat yapıda olup gıda katkı maddesi, deterjan, yapıştırıcı, ilaç etken maddesi ve atık su iyileştirme prosesleri gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. Biyopolimer olarak kabul edilen EPS' nin fonksiyonel özellikleri mikroalg türüne, yaşam koşullarından sıcaklık, ışık yoğunluğu, besiyeri içeriği, ağır metaller, aydınlanma süresi gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Bu çalışmada, mikroalg türlerinden *Botrycoccus braunii, Chlorella sorokiniana* ve *Chlorella minutissima'* nın büyüme koşulları ekzopolisakkarit üretim miktarlarındaki farklılığın ayrıntılı incelenebilmesi için alglerin petri ortamında katı besiyerinde üretimleri gerçekleştirilmiştir. Optimum EPS üretim koşullarının belirlenmesi için

azot(N_2), karbondioksit(CO_2) ve aydınlık-karanlık süreleri üzerinde değişiklikler yapılmıştır. Alg üretim parametrelerinin EPS ürün verimi üzerine olan etkisi Box Behnken metotu kullanılarak istatistiksel olarakta incelenmiş ve her mikroalg türü için en yüksek EPS veriminin sağlandığı optimum alg üretim koşulları belirlenmiştir. Ayrıca üretilen EPS ürünlerine FTIR, TGA gibi kararkterisazyon işlemleri uygulanmış olup bakteriyel kaynaklı EPS ile mikroalgal kaynaklı EPS ürünleri arasındaki farklılık ve/veya benzerlikler ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ekzopolisakkarit (EPS), *Botrycoccus braunii, Chlorella sorokiniana, Chlorella minutissima*

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE MICROALGAL EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION AS AN ALTERNATIVE TO BACTERIAL EXOPOLYSACCHARIDE

Sedef KAPTAN

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN

There are many metabolic reactions that occur in living creature. Metabolites occur as a result of this metabolic reactions. These products are beneficial for necessary of growing and reproducing and life of living creature. Microalgae which are metabolites, having financial values are used as microbial resource. Metabolites of microalgae are carbohydrate, protein, fat, vitamin and bioactive molecules. Microalgae which exist in high amounts around the World have been used in biotechnological methods since 1950. It is one of the outstanding and economics roles of microalgae, which solar energy transforms into biomass. In addition to this, microalgae are utilized as both a human food in Far East and animal feed in other many countries. Also, microalgae metabolites are antibiotic, vitamin, and pigments, are benefited as an additive in pharmaceuticals, medical and cosmetics products.

One of the most significant metabolites of microalgae is exopolysaccaharide that is composed of carbohydrates, used in many applications that are food additive, detergent, adhesive, pharmaceutical active substance, wastewater treatment, etc. EPS is admitted as a biopolymer. Therefore, functional characteristics of EPS vary with parameters that are microalgae species, temperature in living conditions, light intensity, broth content, heavy metals, luminous time, etc.

In this project, for growth conditions of microalgae species that are *Botrycoccus braunii, Chlorella sorokiniana* and *Chlorella minutissima,* the production was carried out in petri plate in a solid environment. Nitrogen (N_2), carbondioxide (CO_2) and luminous-darkness time were changed to be determined the optimum EPS production conditions. Algae production parameters that effect on the yield of EPS product been statistically examined by using Box Behnken method. In addition to this, optimum algae production conditions, providing the highest yield of EPS has been determined for each microalgae. Also, EPS products which were produced has been applied to characterization procedures which include FTIR, TGA. It has revealed that there are differences and/or similarities of products which were produced from bacterial EPS and from microalgae EPS.

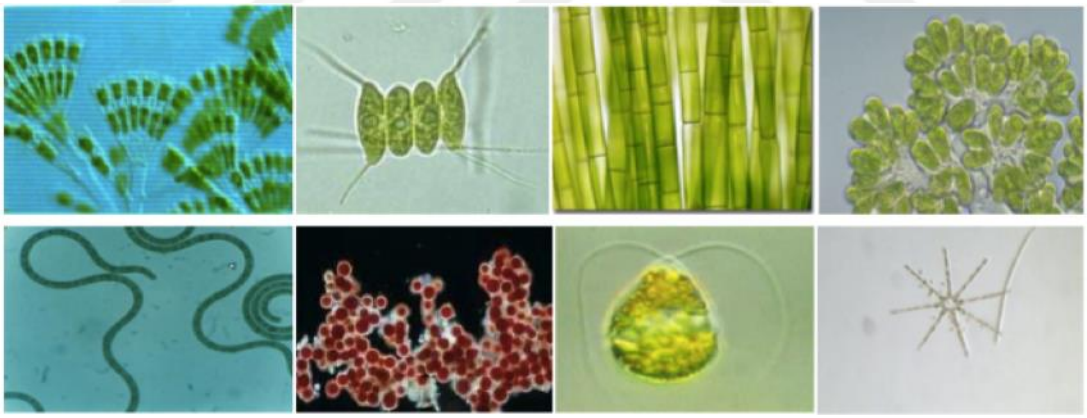
Keywords: Exopolysaccharides (EPS), *Botrycoccus braunii, Chlorella sorokiniana, Chlorella minutissima*

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

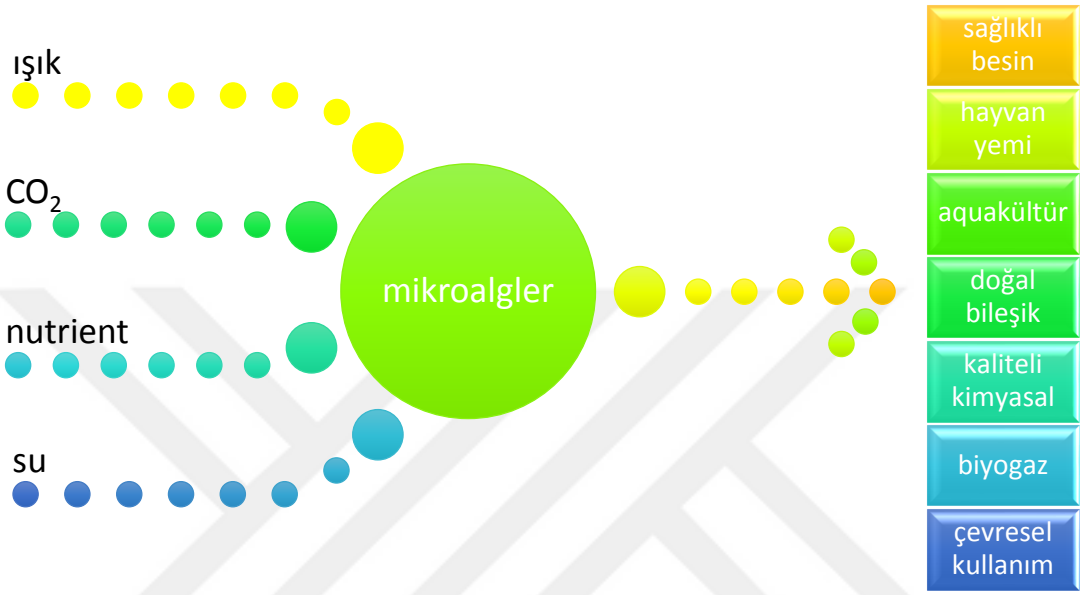
Mikroalgler, tatlı su ve deniz sistemlerinde bulunan mikroskobik boyuttaki canlılardır. Fotosentez mekanizmaları sayesinde yeryüzündeki yaşam için önemli olan mikroalgler, büyüme esnasında CO_2 ve sera gazı kullanarak atmosferdeki oksijenin yaklaşık yarısını üretmektedir. Mikroalglerin biyolojik çeşitliliği çok fazla olmasına rağmen hammadde kaynağı olarak endüstriyel alanda kullanımı çok azdır.



Şekil 1. 1 Farklı fenotipteki mikroalgler [1]

Mikroalgler, sahip oldukları zengin kimyasal bileşimleri sayesinde hayvan yemi ve besin katkı maddesi olarak kullanılabilir. Bunun yanı sıra, alglerden elde edilen vitaminler, poliansatüre yağ asitleri, polisakkaritler ve doğal boyalar; kozmetik ve ilaç sanayisinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Mikroalgler, antioksidan ve anti-inflamatuar aktivite, bağışıklık baskılayıcı, antiviral, antikanser etki gösteren bileşikleri de üretmektedir. Günümüzde mikroalglerin kullanımının odak noktası ise yenilebilir enerji kaynakları ve çevre uygulamalarıdır. Mikroalgler biyogaz, biyohidrojen, biyoetanol,

biyodizel gibi biyoyakıtlarının üretimi için potansiyel kaynaklardır. Çevresel uygulamalarda ise CO_2 ve sera gazı azaltımı, atık suların temizlenmesi amacıyla kullanılabilmektedir. Bu biyokütlenin, her bileşeninden kullanılabilir ürünler üretmek için biyorafineri sistemleri kurularak maksimum fayda sağlanabilmektedir [1].



Şekil 1. 2 Mikroalglerin genel kullanım alanları [2]

Mikroalglerin sahip olduğu en önemli içeriklerden biri olan ekzopolisakkaritler birçok endüstriyel uygulamada kullanılan, suda çözünen, yüksek moleküler ağırlıklara sahip karbonhidratlardır. Farklı fizikokimyasal ve reolojik özelliklerinden dolayı mikroalgler Şekil 1.2' de görüldüğü gibi gıda, tekstil, atık su arıtımı, tarım ve metalürji endüstrisi gibi değişik alanlarda kullanılmaktadır. Gıdalarda kullanılan polisakkaritlerin kaynağı genellikle bitkiseldir. Polisakkarit yapısının özelliklerinin değiştirilmesi için modifikasyon gerekli olduğundan, bakteri veya mikroalg gibi birçok türü bulunan mikroorganizmalar tercih edilebilir. Mikroorganizma türüne göre elde edilen ekzopolisakkaritler dekstran, jellan, levan ve ksantan gibi değişiklik göstermektedir. EPS' ler gıdalarda yoğunlaştırıcı, jelleştirici, emülgatör, stabilize edici ve monosakkarit kaynağı olarak kullanılmaktadır [3].

Bu çalışmanın amacı; bakteriyel ekzopolisakkarit üretim metodları örnek alınarak mikroalgal EPS üretiminin gerçekleştirilmesidir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, farklı türdeki mikroalgler petrilerde büyütülmüş ve içeriğindeki ekzopolisakkarit miktarının arttırılması için azot, karbondioksit ve aydınlanma süresi gibi parametreler değiştirilerek uygun koşulların belirlenmesi incelenmiştir. Ayrıca alg üretim parametrelerinin EPS ürün verimi üzerine olan etkisi Box behnken tasarım metotu kullanılarak istatistiksel olarakta incelenmiş ve her mikroalg türü için en yüksek EPS veriminin sağlandığı optimum alg üretim koşulları belirlenmiştir.

1.3 Orijinal Katkı

Bu çalışmayla, ekzopolisakkarit üreten bakteriler üzerindeki çalışmalar örnek alınarak farklı mikroalg türlerinden EPS üretimi için uygun koşullarının belirlenmesi sağlanmış olup, literatürde mevcut olmayan farklı tipteki mikroalgal EPS çalışmalarına öncü olarak orijinal katkı sağlanacaktır. Literatürde mikroalglerin büyüme koşullarının EPS üretimini arttıracak şekilde değişimlerinin incelenmesi üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır.

BÖLÜM 2

EKZOPOLİSAKKARİTLER

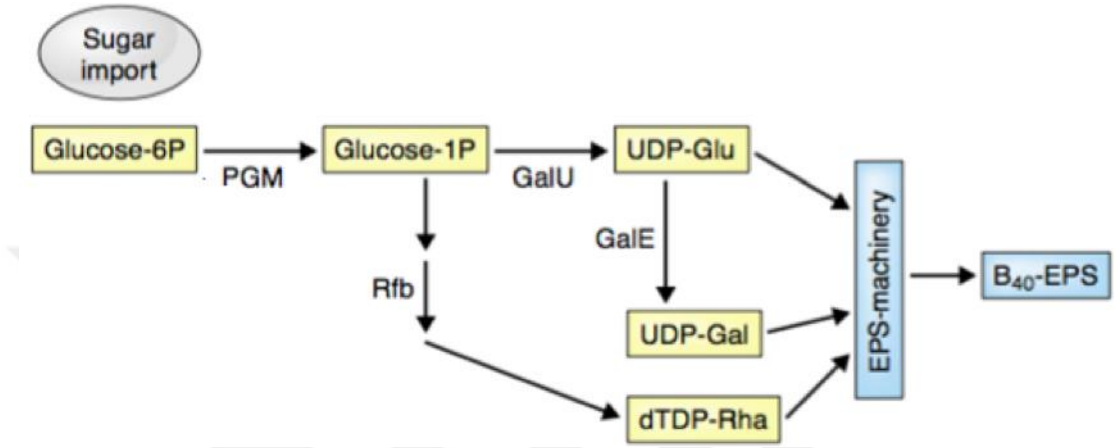
2.1 Ekzopolisakkaritler

Vegan veya vejeteryan beslenmeye ilgi son yıllarda giderek artmaktadır. Laktoz duyarlılığı veya alerji gibi hastalık problemleri, etik ve sürdürülebilir yaşam tarzı seçimi bireyleri et ve süt ürünlerinden uzaklaştırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı bitkisel kaynaklı ürünlerin tüketiminde artış görülmektedir. Zengin protein, karbonhidrat ve vitamin içeriklerine sahip olan mikroalgler, dünya genelinde bu açığı kapatabilecek canlılardır [4].

Mikroalglerin sentezlediği en önemli bileşenlerden biri olan ekzopolisakkaritler yeryüzünde bulunan mikroorganizmaların agregat formlarındaki biyopolimerler içerisinde yaşamını tanımlamak için kullanılmaktadır. Mikroorganizmalarla ilgili ilk çalışmalarda, EPS 'ekzopolimer', 'ekzopolisakkaritler' ve 'ekstraselüler polisakkaritler' olarak adlandırılmıştır, çünkü polisakkaritler bu aşamada en çok bulunan bileşen olarak görülmüştür. EPS tanımı zamanla genişletilmiştir ve EPS' ler hücrede çözünmüş veya bağlı formda olan polisakkarit formları olarak kabul edilmiştir.

Genellikle polisakkaritler EPS' nin ana bileşeni olarak kabul edilmektedir. Diğer bileşenler olan humik asit, nükleik asitler, yağlar, üronik asitler de belli miktarlarda EPS' nin içerisinde bulunmaktadır [5]. EPS' nin kimyasal yapısındaki farklılık çok fazladır, çünkü tekrar eden dizilerin içerisinde de değişiklik görülmektedir. Bu polimerler genellikle doğrusaldır ve molekül ağırlıkları $1*10^5$ ve $3*10^5$ Da arasındadır.

Monosakkarit yapılarına ek olarak asetat, pirüvat, süksinat, fosfat ve sülfat gibi yapılara da sahip olabilir. Genellikle EPS yapısında heksozlar, pentozlar, üronik asitler ve amino şekerleri vardır. 1,4-β- veya 1,3-β- bağlarıyla bağlı monosakkaritler güçlü rijit polimer yapısında iken 1,2-α- veya 1,6-α- bağları mevcut olduğunda genellikle esnek polisakkarit yapısındadır [6]. Şekil 2.1' de görüldüğü gibi glikoz ya EPS biyosentezi için ya da glikoliz sonucu laktik asit üretiminde kullanılmaktadır.



Şekil 2. 1 EPS biyosentezi [7]

Karbonhidrat polimerleri, biyolojik sistemlerde önemli rol oynarlar. Ekzopolisakkarit olarak bilinen yapılar yaygın olarak algler dışında bakteri, mantar ve arkeler tarafından üretilmektedir. Bu moleküllerin doğal fonksiyonları mikroorganizmaları koruma, enfekte bitki veya hayvanların kolonizasyonu ve aynı zamanda patojenik aracılıktır. Sonuç olarak, bu molekülleri ve onların üretimini anlamak, giderek artan kimya endüstrisi, tarım ve medikal bilimi için önemlidir. Böylece EPS gibi biyopolimerler petrol bazlı polimerlerin yerini alabilir ve kimya endüstrisinin yeşillendirilmesine katkıda bulunabilir [8].

Ekzopolisakkaritler biyokimyasal faaliyetlerin büyük kısmında önemli rol oynamaktadır. Glisemik gelişmelerle birlikte, insan sağlığında polisakkaritlerin önemli katkısı son yıllarda artan bir ilgi görmektedir. Genellikle mikroalglerden elde edilen polisakkaritler fizyolojik rollerine bağlı olarak enerji polisakkaritleri ve ekzopolisakkaritler olarak ikiye ayrılmaktadır. Ticarileşmesi açısından bakıldığında, ekzopolisakkaritlerin kültür içerisinden kolayca toplanması ve saflaştırılmasından dolayı umut vericidir [9].

Karasal veya denizel kaynaklardan izole edilen ksantan veya gellan sakız gibi birçok mikrobiyal EPS, başarıyla çeşitli sektörlerde kullanılmaktadır. Örneğin, atık su arıtma sektöründe, pıhtılaştırıcı madde, gıda endüstrisinde kıvam, stabilize edici ve doku verici, kozmetik endüstrisinde anti yaşlanma etkilidir [10]. Algler toprak yüzeyinde veya birkaç santimetre derinliktede büyüyebilmektedir. Toprak algleri, toprağın stabilizasyonu, bitkilerin besin kullanılabilirliğini, su tutma kapasitesini arttırırken, toprak erozyonunun azaltılmasını sağlar. Algler tarımsal yararlılığından dolayı birçok ülkede biyolojik gübre olarak kullanılmaktadır [11].

Denizel ortamlar sıcaklık, tuzluluk ve basınç gibi son derece değişken koşullarından dolayı oldukça komplekstir. Bu nedenle bu ortamlardan izole edilen ekzopolisakkarit sentezinin de dahil olduğu adaptasyon mekanizmalarında karasal olanlara göre farklı mekanizmaları geliştirmişlerdir. Dünya okyanusları EPS keşfi için açık ve çok umut verici araştırma alanı olarak kalan, hala keşfedilmemiş ve gözden kaçan alanlardır. Kuşkusuz, birçok sanayi sektörü için artan biyoteknolojik uygulamalarla yenilikçi EPS üretimi için büyük bir katma değer sunmaktadır [10].

Çizelge 2. 1 Bakterilerden elde edilen EPS üretim miktarı [12,13]

Bakteriler	**Ortalama EPS üretim miktarı(μg/ml)**
Lactobacillus plantarum	177
Lactobacillus brevis	270
Pediococcus damnosus	142
Leuconostoc citreum	494
Ganoderma applanatum	210
Pleurotus ostreatus	570
Lentinus edodes	820
Streptococcus sp.	400-6900
Clavibacter michiganensis	700

Çizelge 2. 2 Mikroalglerden elde edilen EPS üretim miktarı[13,14]

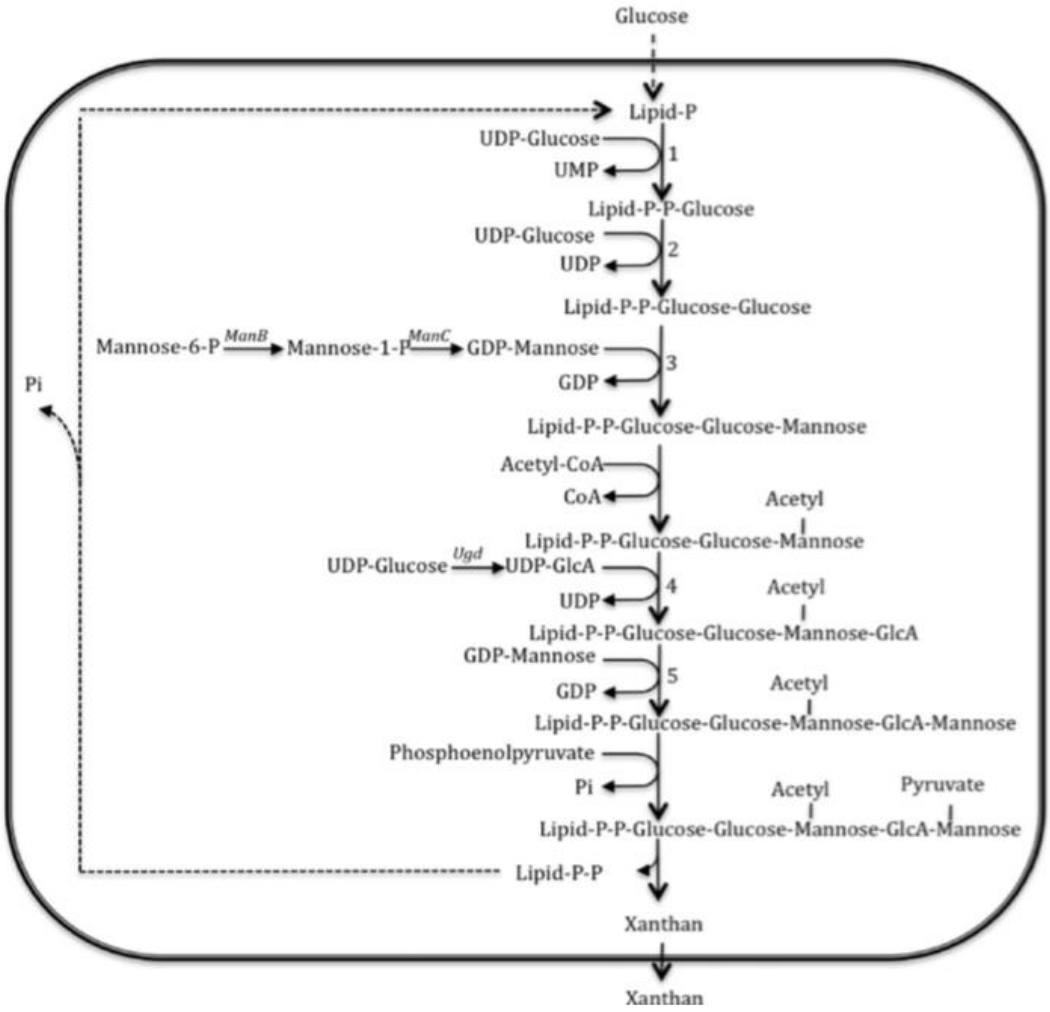
Mikroalg	**Ortalama EPS üretim miktarı(μg/ml)**
Porphyridium cruentum	100-300
Botrycoccus braunii	250
Amphora holsatica	27
Navicula directa	26
Chlorella vulgaris	289
Chlorella minutissima	135
Spirulina platensis	490

EPS üretim miktarları bakteri ve mikroalg türleri arasında değişiklik göstermektedir. Endüstriyel üretim için maksimum EPS veriminin elde edilmesi gerekmektedir. Bunu sağlamak için mikroorganizma gelişme koşullarında değişikliklerden ve genetik modifikasyondan yararlanılabilmektedir.

2.2 Ekzopolisakkarit Çeşitleri ve Genel Özellikleri

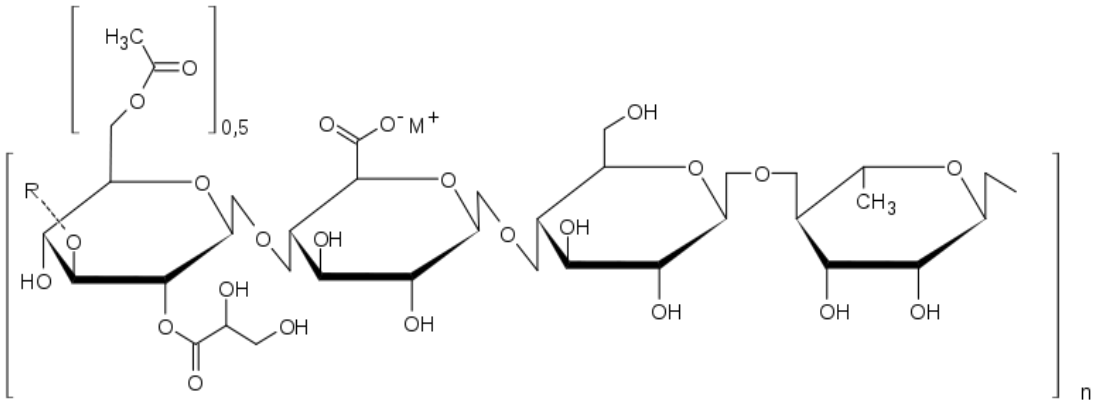
Ekzopolisakkaritler son on yıldır önemli ticari değeri olan biyopolimerlerdir. Bazı bakteriler tarafından üretilen guar zamkı veya pektin, algler tarafından üretilen karagen veya pektin gibi ekzopolisakkaritler geleneksel uygulamalarda kullanılmaktadır. Ksantan veya gellan zamkı gibi ekzopolisakkaritler, fiziksel özellikleri geliştirdiğinden endüstriyel uygulamalarda kullanımı diğer ekzopolisakkarit yapılarına göre daha çok tercih edilmektedir.

Ksantan zamkı: Endüstriyel olarak ilk üretilen, üzerinde en çok çalışılan ve ticari uygulamalarda yaygın olarak kullanılan mikrobiyal polimerdir. Heterosakkarit yapıda olan ksantan zamkı, glikoz omurgasına bağlı glukuronik asit, mannoz ve asetil yan zincirlerinden oluşmaktadır[15].



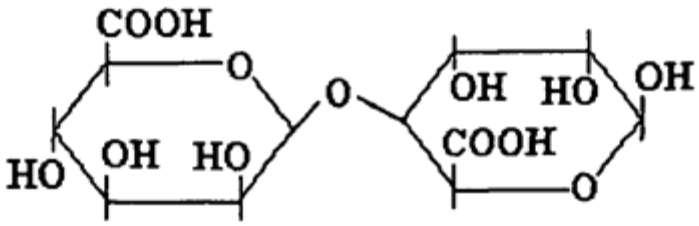
Şekil 2. 2 Ksantan biyosentezi [15]

Gellan: Tetrasakkarit omurga üzerinde ramnoz, glikoz ve glikonik asit zincirleri bulunan heterosakkarit yapıdaki ekzopolisakkarittir. Zincir bileşimindeki ve bağlardaki değişiklikler sonucunda farklı gellan türleri oluşmaktadır: velan, ramsan ve diutan [15].



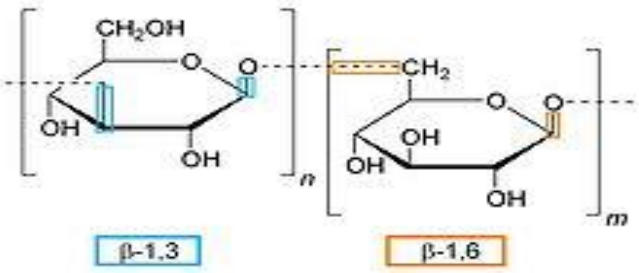
Şekil 2. 3 Gellan biyosentezi [13]

Aljinat: Lineer yapıdaki polisakkarit, manuronik ve glukonik asitin karışık sekanslarından oluşmaktadır. Algal ve bakteriyel aljinatlar asetil yapısına göre farklılık göstermektedir [14].



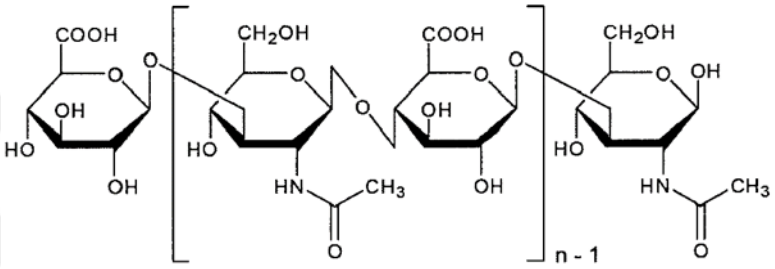
Şekil 2. 4 Aljinat biyomolekülünün kimyasal yapısı [17]

Glukan: Homopolisakkarit, glikoz yapılarından oluşan polisakkaritlerdir. Glikozik bağ, derecesi ve dallanma türü ile moleküler ağırlığı ve zincir uzunluğu farklılık gösterebilmektedir. İki temel glukan tipi vardır: β-glukanlar (selüloz, kurdlan vb.) ve α-glukanlar (dekstran, alternan, mutan vb.) [13].



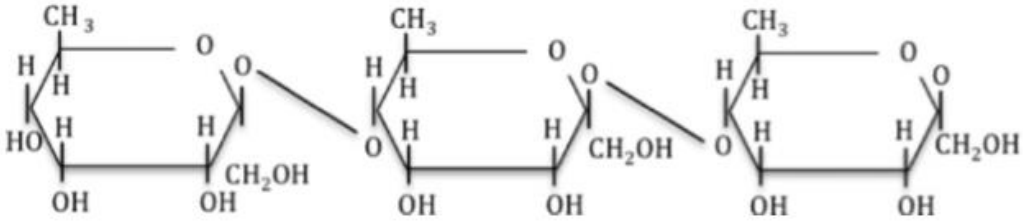
Şekil 2. 5 Glukan biyomolekülünün kimyasal yapısı [6]

Hyaluronan: Tekrar eden disakkarit birimlerinden oluşan lineer yapıdaki glukuronik yapısıdır [13].



Şekil 2. 6 Hyaluronan biyomolekülünün kimyasal yapısı [13]

Levan: Levan-sükraz enzimlerinin aktivasyonu ile sükrozlardan sentezlenen, homopolisakkarit yapıdaki yüksek ölçüde dallı früktozdur [13].



Şekil 2. 7 Levan biyomolekülünün kimyasal yapısı [13]

Çizelge 2. 3 EPS' lerin fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri, uygulama alanları [13]

EPS	BİLEŞEN	YÜK	MOLEKÜLER AĞIRLIK	GENEL ÖZELLİKLERİ	UYGULAMA ALANLARI	ÜRETİM MİKTARI (ton)	SATIŞ FİYATI (dolar/kg)
Ksantan	Glikoz Mannoz Glukoronik asit Asetat Pirüvat	Anyon	$(2.0\text{-}50)*10^6$	Hidrokolloit Yüksek viskozite Geniş sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu aralığında stabilite	Gida Petrol endüstrisi İlaç sanayisi Kozmetik Tarım	96000	3-5
Gellan	Glikoz Ramnoz Glukoronik asit Asetat	Anyon	$5.0*10^5$	Hidrokolloit Jelleşme kapasitesi Isıl tersinir	Gida Hayvan yemi İlaç sanayisi Araştırma: agar ve jel elektroforez	-	55-66
Aljinat	Glukoronik asit Manuronik asit Asetat	Anyon	$(0.3\text{-}1.3)*10^6$	Hidrokolloit Jelleşme kapasitesi Film yapısı oluşturabilme	Gida Kontrollü ilaç salınımı Yara malzemeleri	30000	5-20
Dekstran	Glikoz	Nötral	$10^6\text{-}10^9$	Non-iyonik İyi stabilite Newtonian akış davranışı	Gida İlaç sanayisi Kromotografik medya	2000	680-700
Hyaluronan	Glukoronik asit Asetilglukozamin	Anyon	$2.0*10^6$	Biyolojik aktivite Yüksek hidrofilik Biyouyumlu	Sağlık Katı kültür medya	-	100000
Levan	Fruktoz	Nötral	$3.0*10^6$	Düşük viskozite Anti-tümör ve anti-inflamatuar aktivite Yapışma kapasitesi	Gida Hayvan yemi kozmetik	-	330-350

2.3 Ekzopolisakkaritlerin Kullanım Alanları

Gıda Uygulamaları

- Mikrobiyal EPS, viskozite arttırıcı, jelleştirici, stabilizatör ve lezzet arttırıcı olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Jelleştirme ajanları üç çeşittir: jelleşme için aljinat gibi iyonların bulunması gereken, jelleşme için iyon gerektirmeyen kurdlan ve diğer polisakkarit türlerini gerektiren EPS ise ksantandır.
- EPS' ler GRAS (genellikle güvenliği kabul edilen ürünler) olarak kabul edilmiş olup insan kullanımı ile ilgili hayati önem taşımaktadır.
- Ksantan diğer katkı maddeleriyle birlikte gıdanın kalitesini arttırmaktadır. Örneğin baharat gibi katı parçacıkların süspanse olmasını, dondurulmuş gıda ve içeceklerde kullanılan ksantan ise dondurmada hoş bir dokunun oluşturulmasına yardımcı olmaktadır.
- Bazı ülkelerde kullanımına sınırlamalar getirilen gellan, gıdaların su tutma kapsitesini arttırmaktadır. Şekerleme ürünlerinde yüksek oranda netlik kazandırılması için uygundur. Yüksek sıcaklıklarda ürünlerin görünümünü ve yumuşak dokusunun korumasını sağlamaktadır. Peynir içerisindeki süt proteinleri ile etkileşen gellan toplam verimin artmasını ve katı ürün kaybını azalmasını sağlamaktadır [17].

Çizelge 2. 4 Gıda alanında kullanılan EPS türlerinin fizikokimyasal özellikleri ve uygulama alanları [17]

EPS	FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ	UYGULAMANIN ANA GIDA ALANI
Ksantan	Kaplama Kıvamlaştırıcı madde Düşük kayma hızlarında yüksek viskozite Sıcaklık ve Ph stabilitesi Donma çözülme stabilitesi Güzel tat bırakma kokusuz	Şekerleme Salata sosu Reçel, soslar Soğuk yemek endüstrisi Şuruplar Süzme peyniri Meyveli süt içecekleri Yoğurt kreması Baharatlar
Gellan	Yapıştırıcı Kıvamlaştırıcı madde Termik jeller Esnek Sıcaklık ve pH stabilitesi Erime noktası esnekliği Oldukça berrak Suda kolayca çözülebilir	Şekerli krema ve Jöleler Meşrubatlar Evcil hayvan gıdası Şekerleme ve unlu mamuller Düşük kalorili Reçel, turta ve pudingler Sosların tat bırakma özelliklerini korur Peynir verimini sağlar ve geliştirir
Dekstran	Kararlılık Newton akışkanı davranışı Gelişmiş nem tutma ve viskosite İnhibe şeker kristirilizasyonu	Şekerleme Puding karışımları Sakız ver jöle Dondurma
Pullulan	Yapıştırıcı özellikleri Tatsız Kokusuz	Jambon paketleme Nefes spreyi
Alginat	Dengeleyici İnhibe şeker kristirilizasyonu Kıvamlaştırıcı madde Köpük dengeleyici Suyu hızlı absorbe eder Film oluşturucu	Dondurmalar Tatlılar Kremalar Donmuş yiyecekler Reçel, Hamur,Peynir, Ekmek
Curdlan	Tatsız Elastik jellerde donabilir Suda çözünmez	Doku ve stabilite Düşük kalorili yiyecekler Tat bileşeni
Levan	Düşük viskosite Yüksek su çözünürlüğü	Prebiyotik gıdalar Gıda ve yem katkı maddesi

Tarım ve Ekolojik Uygulamaları

- Sanayinin ivme kazanan prosesleri, sosyal ekonominin hızlı gelişimini desteklemesine rağmen, aynı zamanda özellikle ağır metallerin neden olduğu su kirliliğine neden olmaktadır. Gelişmekte olan birçok ülke, ağır metal kirliğine çözüm bulabilmek için yıllardır çalışma yapmaktadır. Ağır metal gideriminde kullanılan fiziksel metotlar yetersiz kalırken, kimyasal metotlar ise çevreye başka zararlar vermektedir. Biyoemilim doğal maddeler kullanıldığı için çevreye herhangi bir zarar vermemektedir. Yapılan deneyler sonucunda, biyoemilim için kullanılan EPS, Cd^{+2}, Cu^{+2} ve Zn^{+2} gibi ağır metallerin sudan uzaklaştırılmasını sağlamıştır. Ayrıca biyoemilimi etkileyen parametrelerin pH, etkileşim zamanı, metal konsantrasyonu ve EPS miktarı olduğu görülmüştür [18].
- Flokülasyon sürecinde EPS uygulamaları belediye ve atık su arıtma işlemlerinde çevre dostu kullanımında büyük bir potansiyele sahiptir. Ağır metaller ve zararlı sentetik polimerleri bağlanma özelliği sayesinde nörotoksitite, kanserojen ve Alzheimer hastalığı gibi olumsuz durumlara karşı korumaktadır.
- EPS bitkilerde su akışı, besin düzenlemesi ve patojenlerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır.
- Büyüyen ekinlere uygulanarak tarım spreyi ve böcek ilacı olarak kullanılabilmektedir.
- Biyofilm aracılı biyoremidasyon için ekzopolisakkaritlerin daha etkili ve güvenli alternatif maddeler olduğu düşünülmektedir.

Kozmetik ve Kişisel Bakım

- EPS kozmetik ürünler içerisinde emülsiyon, stabilize edici, viskozite arttırıcı ve deri bakım malzemesi olarak kullanılmaktadır.
- Ksantan zamkı kozmetik maddesi olarak hemen hemen her kategoride kullanılmaktadır. Bir emülsiyon edici madde olmamasına rağmen, yağ damlacıkları ve bileşenlerin kaynaşmasını önleyerek bu görevi yerine getirmektedir.
- Ksantan zamkı, fırçalamayı kolaylaştırmak ve süspansiyonu sağlamak amacıyla diş macunu teknolojisinde kullanılmaktadır.

- HA kozmetik cerrahide doku boşlukları doldurmak için hizmet vermektedir.

Petrol Sanayisi Uygulamaları

- Ksantanın günümüzdeki en önemli kullanım alanlarından biri kalınlaşma ajanı olarak ham petrol kurtarma çalışmalarında kullanılmasıdır.
- Ksantan sondaj çalışmalarında kaya parçalarının çıkarılması için mükemmel bir süspansiyon maddesi olarak görev yapmaktadır.
- EPS' ler su yüzeyinden petrol agregatlarının kaldırılmasına katkı sağlamaktadır. Aromatik hidrokarbonların çözünürlüğünü etkili bir şekilde arttırarak, petrolle kirlenmiş yüzey sularının mikrobiyal topluluklar tarafından biyolojik parçalanmasını arttırmaktadır.

İlaç ve Biyomedikal Uygulamaları

- EPS'ler biyouyumlu olarak sentezlenen, doğal ve biyoçözünür malzemelerdir. Bu özelliği sayesinde ilaç salınım sistemlerinde, doku mühendisliğinde**,** biyoyapışkan, protez ve tıbbi cihazlarda kullanılabilmektedir.
- Pullulan, gellan zamkı, levan, kurdlan ve hiyalüronan film oluşturma kapasitesine sahip EPS' lerdir. Bu nedenle cerrahi dolgu malzemeleri, yara sargıları ve ilaç kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır.
- Doku mühendisliği uygulamaları için, bu malzemeler uygun degradasyon oranı, mekanik özellikler, gözeneklilik, gaz ve besin geçirgenliğine sahip olmaları beklenmektedir.
- Yara bandı gibi malzemelerde antibakteriyel veya trombojenik özellikleri sayesinde kullanılmaktadır.
- Clavan gibi fruktozca zengin polisakkaritler, nemlendirici kremlerde, antikor sentezi için medikal uygulamalarda, akciğer kanserinin önlenmesi ve romatoid artrit tedavisinde kullanılmaktadır [17].

Çizelge 2. 5 İlaç ve biyomedikal alanlarında kullanılan EPS türlerinin fizikokimyasal özellikleri ve uygulama alanları [17]

EPS	Fizikokimyasal özellikleri	İLAÇ ve BİYOMEDİKAL UYGULAMA ALANLARI
Ksantan	Düşük kesme Dermal tahriş ve hassaslaştırma Hidrofil matris Stabilizatör, yoğunlaştırıcı, ve emülsiyon faktörü	İlaçların kontrollü salınımı Farmasotik kremler
Gellan	Yüksek berraklık Dağılabilirlik Biyouyumluluk	Yeni geliştirilen ilaç taşıma araçları Transdermal ilaç verimi için film formasyon Düşük burunsal, gözsel, midesel ve kolon ile ilgili ilaç serbestliği Göz damlaları İnsülin aktarımı Doku mühendisliği için 3D iskele
Dekstran	Suda düşük çözünürlük Antijenik özellikler	Kan plazması genişletici Etiketli dekstran lenfosintigrafide izleyici olarak kullanılır
Alginat	Jelleşme kapasitesi Film oluşturucu	Hareketsizleştirici insülin üreten hücreler Cerrahi pansumanlar Yaralar Kontrolllü ilaç serbestliği
Levan	Biyolojik uyumluluğu Prebiyotik, immün uyarıcı ve hipokolesterolemik etkiler	Anti-AİDS faktörü İlaç kaplama malzemesi
Pullulan	Film uyarıcı faktör Yoğunlaştırıcı	Diyet takviyeleri için kapsüller Tabletler için kaplama Yara iyileştirme bileşenleri

Sağlık Uygulamaları

***a.Anti-tümör aktivite*:** Son yıllarda doğal, inşaat ve sosyal çevrelerde gerçekleşen etkileyici değişimler, modern yaşam kalitesinin artmasını sağlamaktadır. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) dünya çapında kanserden ölen kişilerin son on yılda %40 oranında artış gösterdiğini açıklamıştır (2012). Kanser kemoterapi işlemlerinin pahalı olması ve istenmeyen yan etkilerinden dolayı biyolojik anti-kanser ilaçlarına olan ilgi giderek artmaktadır. Biyolojik aktive gösteren polisakkaritler, biyokimyasal ve tıbbi alanlarda antioksidan ve anti-tümör etki göstermektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, oral yolla alınan EPS' nin bağışıklık uyarıcı etki gösterdiği görülmüştür. EPS' nin anti-kanser ajan geliştirmek için yararlı olacağı düşünülmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, tümöre karşı kemoterapötik ve kemo önleyici olarak adjuvan EPS kullanılması teorik olarak destekteklenmiştir [19].

b.İmmünostimilatör aktivite: EPS' nin aktiviteleri, doğal katil hücrelerin (NK) tümörisidal etkinliği, fagositik hücre kapasitesini ve T/B lenfosit proliferasyonunu uyarmaktır, böylece konak bağışıklığını arttırabilmektedir. EPS'ler ile lenfosit çoğalması üzerine yapılan deneylerde, konsantrasyonunun 25 g/ml'den daha fazla olduğu koşullarda önemli ölçüde mitojenik aktivite göstermiştir [20].

c.Kolesterol düşürücü: Glikoz ve mannoz içeren heteropolisakkarit yapıdaki ekzopolisakkaritler, askorbik asite benzer bir şekilde antioksidan etki göstermektedir. EPS, α-amilaz enzimini inhibe ederek kolesterol düşürücü etkiye sahip olduğundan sağlık yardımı uygulamaları için iyi bir potansiyele sahiptir [21].

d.İmmün etki: EPS' lerin yapısı ve kompozisyonu, bağışıklık sistemini düzenleyici etkiye sahiptir. EPS ile immün sistem arasında doğrudan bir etkileşim bağırsak epitel hücrelerinde gerçekleşmektedir. Ancak, EPS, T hücrelerini bu şekilde aktive etmesinde yetersiz kaldığından aşı gibi uygulanarak etkisinin arttırılacağı düşünülmektedir [22].

e.Antiviral aktivite: Algal Polisakkaritlerin potansiyel anti-viral aktiviteleri, ilk olarak Gerber (1958) tarafından bulunmuştur. *Gelidium cartiagenium (*kırmızı alg*)* alginden ekstrakte edilen polisakkarit, influenza B ve kabakulak virüslerine karşı koruyucu etki göstermektedir. Antiviral aktiviteye sahip bu polisakkaritler yüksek oranda sülfat

içermektedir. Sülfatlı polisakkaritler önemli biyolojik özelliklere sahiptir. Deniz yosunu, sülfatlanmış polisakkaritlerce zengin kaynaklardır ve bu bileşikler pıhtılaşma önleyici özelliklere de sahiptir [23].

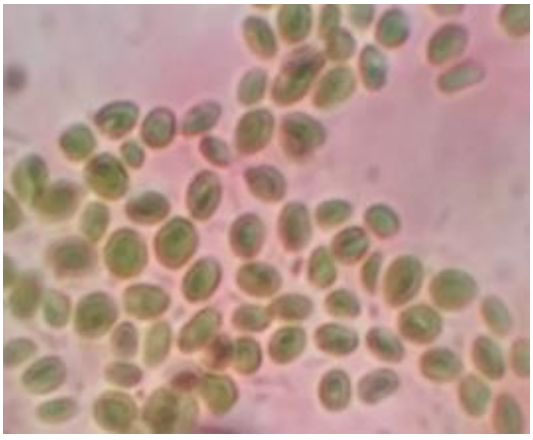
BÖLÜM 3

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Mikroalgler

3.1.1 Chlorella minutissima

Chlorella minutissima, tek hücreli 2-10 μm çapında, tatlı sularda hızlı büyüyen ve kamçısı olmayan yeşil alg türüdür [24]. *C. minutissima'* nın yararlı insan besini kaynağı ve biyoyakıt hammaddesi olarak kullanımı oldukça yaygındır [25]. *C. minutissima* iyi bir besin kaynağı olup yararlı protein, yağ ve karbonhidratın yanı sıra yüksek oranda poliansatüre yağ asitleri, aksantin ve β-karoten üretmektedir [26]. Yüksek sıcaklıklara (40°C) tolerans, kayma gerilimine dayanıklılık, biyoreaktör yüzeyinde düşük adezyon özelliği sayesinde büyük ölçek üretimde avantajlıdır [27]. Şekil 3.1 'de OLYMPUS CX22 mikroskobu ile çekilen *Chlorella minutissima* fotoğrafı görülmektedir.



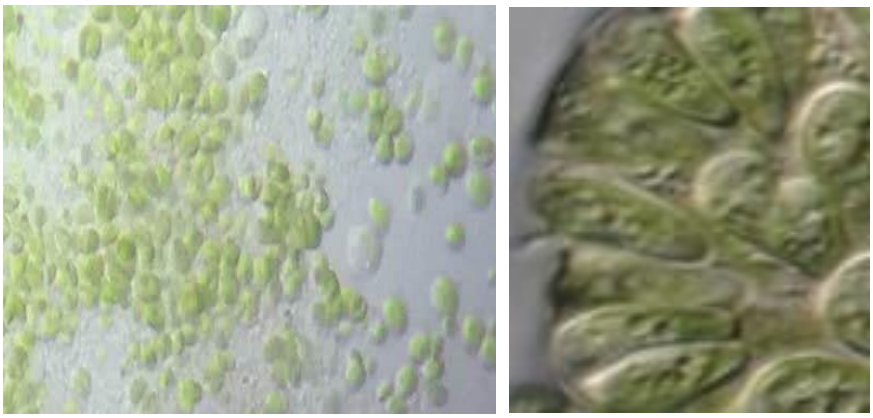
Şekil 3. 1 *Chlorella minutissima*

C. minutissima da azot kıtlığında fotosentez verimliliği arttığından hücredeki lipit miktarında artış gözlenmektedir. Besiyerine azot eklendiğinde yüksek oranda gliserin, glisin ve manitol oluşturmaktadır. Ozmotik stres durumunda ise hücreler içerisinde su problemi mevcut olduğundan biyokimyasal ve fiziksel aktiviteler zayıflar [20]. Tuzluluk oranı *C. minutissima*' nın verimliliğini ve büyümesini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Yüksek tuzluluk öncelikle mebran geçirgenliğini ve akışkanlığını etkileyerek lipit biyosentezini arttırır. Böylece, artan lipit oranları sayesinde biyodizel üretimi gerçekleşmektedir. Üretilen biyodizelin, dizelin yerini alması beklenmektedir. Sıcaklık değişimi alg içeriğini değiştiren en önemli parametrelerden biridir. 25°C ve altındaki sıcaklıklarda lipit içeriği artarken üzerindeki sıcaklıklarda ise biyokütle miktarı ve karbonhidrat içeriğinde artış gözlenmektedir [28].

Çeşitli immünolojik etki gösteren *C. minutissima,* antibakteriyel ve antiviral etki göstermektedir. Ayrıca hücresel zararları, oksidatif stres sonucu oluşan toksinleri ve kadmiyum indüklemesini önleyici etkiye sahiptir [29]. Yapılan araştırmalar sonucunda *Chlorella* türlerinin tüketimi sonucunda hemoglobin konsantrasyonunu arttırdığı, kan şekerini düzenlediği ve hipokolesterole müdahale ettiği görülmüştür [30].

3.1.2 Botrycoccus braunii

Botrycoccus braunii, yeşil algler grubunun tek hücreli, yavaş büyüyen fotosentetik mikroalgi olup büyük miktarda biyokütle, yağ, karbonhidrat ve diğer biyoaktif molekülleri üretmektedir [31]. *B. braunii* tatlı sularda, hafif tuzlu göllerde, su depolarında ve havuzlarda yaygın olarak bulunmaktadır. *B. braunii* çeşitli kültür koşullarında daha fazla hidrokarbon biriktirmektedir. Bu hidrokarbonlar özelliklere göre A-sınıfı n-alkadienler (C_{25}-C_{31}), B-sınıfı öz karbonlar (C_{30}-C_{37}) ve L-sınıfı tetraterpendir (C_{40}). Ayrıca *B. braunii,* sterol, triasetilgliserol ve yağ asitlerini sentezlemektedir. Hidrokarbonların dışında, *B. braunii* ekzopolisakkarit ve karotenoid gibi biyoaktif molekülleri üretmektedir [32,33,34]. Şekil 3.2 'deki fotoğraf OLYMPUS CX22 mikroskobu ile çekilmiş olup, diğeri [35] literatürden alınmış *Botrycoccus braunii* fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 3. 2 *Botrycoccus braunii*

B. braunii hücreleri lipit biyofilm matriksi içerisinde, yeşil renkli piramit şeklinde koloidal yapıdadır. Bu hücreler sıcaklık, pH, ışık yoğunluğu, azot, fosfor, karbondioksit, tuz gibi kültür koşullarından etkilenmektedir [36]. pH gelişim, biyokimyasal bileşen ve enzim formlarını etkilediğinden en önemli parametredir. İdeal kültür pH'ı 7.4 civarında olup büyüme esnasında fotosentez mekanizmasında CO_2 tüketildiğinden artmaktadır [37]. Ancak pH' ın biyokütle ve hidrokarbon üretiminde önemli bir etkisi olmadığı yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür (pH 6.0-11.0) [38].

Bazı alg türleri yüksek sıcaklık ve ışık yoğunluğunda büyüyebilir, *B. braunii* de 30°C ± 2°C, 1.2 ± 0.2 klux ışık yoğunluğunda ve 16:8 aydınlık karanlık döngüsünde optimal gelişim göstermektedir [39]. Sıcaklık, alglerde yağ asidi bileşimini etkileyebilir. Işık yoğunluğu ise fotosentezde CO_2' in şeker gibi organik bileşenlere dönüşümünde önemli bir rol oynamaktadır [40].

Çizelge 3. 1 *Botrycoccus braunii'* nin farklı parametrelerde hidrokarbon üretim oranı

Örnek	Sıcaklık (°C)	Işık yoğunluğu (µmol/m^2/s)	Aydınlık (sa)	CO_2 (%)	Hidrokarbon (%)	Referans
1	25	303	12	0	65	[41]
2	25	240	12	2	40	[42]
3	25	150	24	0	24	[43]
4	25	200	24	0	39	[44]
5	30	850	14	10	---	[45]

Karbondioksit (CO_2) medium pH' ını ayarlamak için gerekli bir bileşen olup *B. braunii'* nin düşük karbon zinciri (C_{30}-C_{32}) biriktirmesini sağlar. $C0_2$ içermeyen kültürlerde büyüme gerçekleşmesine rağmen maksimum biyokütle %20 CO_2 konsantrasyonunda elde edilir [46]. Azot mikrolalglerin gelişiminde ve lipit biriktirmesinde önemli bir rol oynamaktadır. *B. braunii* azotun sınırlandığı koşullarda yüksek oranda oleik asit ile triasetilgliserol (TAG) biriktirirken, polar lipitler ve yağ asiti bileşenlerinde değişiklik gözlemlenmektedir. Düşük oranda eklenen azottan dolayı hücreler bazen birbirinden ayrılarak hidrokarbonların yağ asitlerine dönüşmesine neden olur [47].

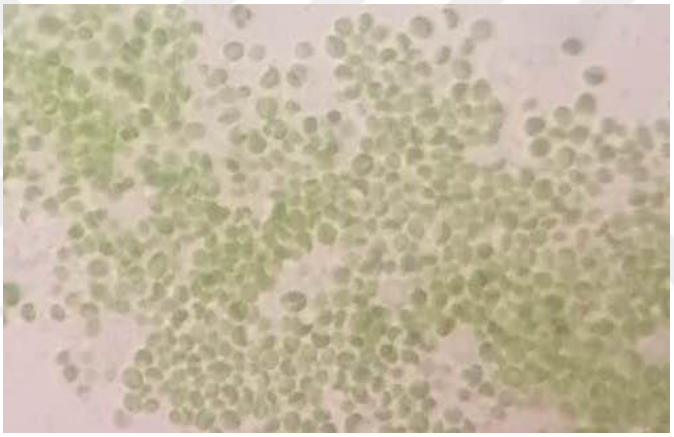
B. braunii ekzopolisakkarit üretmesine rağmen, ticari olarak kullanımı yaygın değildir. Polisakkaritlerin kullanımı reolojik özelliklerine bağlı olup EPS' nin sanayide bir çok alanda kullanımı mevcuttur: yiyecek, kağıt, boya, tekstil ve yapıştırıcı. *B. braunii* gelişimi esnasında 250 g/m^3 ten 1 kg/m^3 kadar ekzopolisakkarit biriktirebilir. Ekzopolisakkarit içeriğinde galaktoz, früktoz, arabinoz, ramnoz, üronik asit ve şeker olmayan yapılar bulunmaktadır [48,49,50,51].

Mikroalgal biokütle yüksek oranda yararlı metabolitler, karbonhidrat, protein, karotenoid, nükleik asit ve fibrin içerdiğinden yiyecek ve yem uygulamaları gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Birçok ülke ekstraksiyon sonrası elde edilen hidrokarbon ve yağların, ticari uygulamalarda kullanımına izin vermektedir. Yapılan araştırmaların büyük çoğunluğu yiyecek, yem ve hastalıkları önleyici veya tedavi edici özelliği olan gıdalar üzerinedir [52,53,54]. *B. braunii* ekstraktının içerdiği biyoaktif molekülleri % 70 antioksidan aktivitesi göstermektir. Ayrıca bakteriyel enfeksiyonlara

karşı anti-adhesive etki, sitotoksik etkiler ve anti tümör özellikleri de göstermektedir [55].

3.1.3 Chlorella Sorokiniana

Algal üretim proseslerinde en önemli boyut uygun alg çeşidinin belirlenmesidir. Aday organizmalardan biri olan *Chlorella sorokiniana* sıcaklığa dirençli, hızlı büyüyen, 2-4.5 μm boyutunda ve tek hücrelerden oluşmaktadır. *C. sorokiniana'*nın yüksek oranda ürettiği yağ, polisakkarit ve diğer hücresel ürünler, katkı maddesi olarak veya biyoenerji uygulamalarında kullanılmaktadır [56]. Şekil 3.3 'te OLYMPUS CX22 mikroskobu ile çekilen *Chlorella* Şekil 3.1 'de OLYMPUS CX22 mikroskobu ile çekilen *Chlorella sorokiniana* fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 3. 3 *Chlorella sorokiniana*

Optimum büyüme sıcaklığı 30-35°C olan *C. sorokiniana'* nın fototropik bölünme süresi 4-6 saattir. Uzun bölünme süresi glikoz gibi şeker kaynaklarının besiyerine eklenmesi sonucunda azaltılır [57,58]. Besiyeri içeresindeki CO_2 oranları biokütle ve lipit miktarında önemli miktarda değişiklik göstermektedir. İdeal CO_2 oranı %12' dir ve bu oranın üzerine çıkıldığında veya altına inildiğinde verimlilikte düşüş gözlenmektedir [59]. *C. sorokiniana*' nın gelişiminde optimum pH aralığı 6.4-7.5 civarındadır, fotosentezin devam ettiği ışıklı saatlerde $C0_2$ tüketildiği için ortamın asidikliği azaldığı için pH' ta yükselme gözlemlenir [60]. Önemli parametrelerden biri olan azot miktarının azlığında stres durumuna geçen *C. sorokiniana* da, yağ üretiminde artış gözlenmektedir. Yağ oranındaki artış karbonhidrat oranındaki düşüşe neden olmaktadır. Bu nedenle istenilen içeriğe göre stres faktörlerinde değişiklik yapılmalıdır

[58]. Azot kıtlığının olduğu durumda besiyerindeki glikoz miktarı arttırıldığında büyüme oranı ve biyokütle artarken yağ oranının azalmasına neden olmaktadır [60].

3.2 Mikroalgal EPS Üretim Parametreleri

Biyoteknolojik uygulamalar için mikroalgal EPS kullanımı kültür parametrelerine bağlıdır. Parametreler, EPS' nin sentezini ve karakterini etkilediğinden, uygun polimer karakteristiği için koşullar optimize edilmelidir. Son otuz yıldır yapılan çalışmalarda, mikroalgal EPS üretiminin kontrolü için birkaç ana faktör belirlenmiştir. En önemlilerden biri C:N oranıdır. Bunun yanı sıra, diğer önemli parametreler ışık yoğunluğu, aydınlanma süresi, tuzluluk ve sıcaklıktır.

Azot

Azot hücre materyali sentezi için en önemli elementtir ve mikroalgler azot kaynağına bağlı olarak atmosferik azotun düzenlenmesine katkı sağlamaktadır. Azot kaynağı ile üretilen EPS arasındaki ilişki mikroalglerin içerisinde bulunduğu strese göre değişiklik göstermektedir. Kültür içerisine eklenen azot kaynakları: $Mg(NO_3)_2$, KNO, $NaNO_3$, NH_4NO_3 ve NH_4Cl' dir. Azot azlığı genellikle EPS sentezini arttıran bir durumdur, çünkü C:N oranının artmasına katkıda bulunmaktadır, böylece polimerlere karbonun eklenmesi sağlanır. Protein sentezinden kaynaklanan karbon yükselmesi de hücre içi karbonhidrat rezervlerinin yani glikojenin birikimine neden olmaktadır. Diğer bir etkili karbon zenginleştirme yöntemi ise glioksilat ilavesi ile karbon miktarında artışın sağlanmasıdır.

Fosfat

Mikroalglerin büyümesini düzenleyen en önemli elementlerden biri olan fosfat, özellikle sucul ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Uygun hava koşullarıyla birlikte artan fosfat seviyesi, 20° C sıcaklığın üzerinde su yüzeyinde mikroalglerin gelişimini hızlandırmaktadır. Çoğu zaman, fosfat azlığı EPS üretiminde artışa neden olmasına rağmen, bazı türlerde belirgin bir etki göstermemektedir. Genel olarak büyüme ortamında fosfat konsantrasyonunun artışı, ekzopolisakkarit miktarının artışı üzerinde az bir etki göstermektedir.

Sülfat

Mikroalgal EPS sülfat gruplarını içermektedir. Kükürt sınırlaması azot sınırlamasına benzer şekilde hücrelerin fiziksel ve morfolojik özelliklerini değiştirmektedir. Kükürt azlığı durumunda, polihidroksibütan ve glikojen granülleri birikimi, tilakoit membran parçalanması gerçekleşmektedir. Bu değişiklerin çoğu kültüre sülfat ilavesi ile tersine dönmektedir.

Tuz

Mikroalg kültüründeki tuz miktarındaki artış solunum azalması gibi çeşitli metabolik değişiklere neden olarak sükroz gibi karbonhidratların birikimine neden olmaktadır. Genellikle tuz stresi (yaklaşık 0.5 M) altında, mikroalgler büyük miktarlarda EPS üretmektedir. Ancak, bazı istisnalarda, tuz konsantrasyonunun artması EPS verimliliğini düşürücü bir etki gösterebilmektedir. Bazı mikroalglerde bulunan kalın ve bağlanmanmış kapsül yapıları ozmotik şoklara karşı koruyarak EPS üretiminde artış sağlamaktadır.

Havalandırma

Havalandırma, EPS üretimini arttırmak için hayati önem taşımaktadır ve sürekli havalandırma ile maksimum üretim sağlanmaktadır. Kültür türbülansındaki artış, hücre yüzeyindeki polisakkaritlerin serbest kalmasını kolaylaştırır, böylece yeni ekzopolisakkarit sentezini uyarmaktadır.

Sıcaklık

Mikroalglerin EPS üretimine sıcaklığın etkisi mikroalg türüne ve optimal büyüme koşullarına göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, *Anabaena sp.* türünde sıcaklık 30°C' den 40°C' ye çıkarıldığında EPS üretiminde belirgin bir artış gözlenmesine rağmen *Nostoc sp* türünde EPS üretimde değişiklik gözlenmemekte ve *Spirulina sp.* ise EPS üretiminde az miktarda azalış gözlenmektedir [61].

Işık

Işık, bir tür enerjidir ve birçok bitki ve mikroalglerin büyümesini ve metabolizmasını etkilemektedir. Örneğin, yapılan bir araştırma sonucunda *Spirulina platensis* türü mikroalginin ürettiği karotenoid, fikosiyanin gibi metabolitler büyük ölçüde çeşitli ışık

kaynaklarının kullanımından etkilendiği görülmüştür. Bazı durumlarda, düşük enerjili dalga boyları da mikroalglerin büyümesini ve metabolitleri etkileyebilmektedir [60].

EPS sentezi farklı ışık rejimlerinde (sürekli ışık, aydınlık-karanlık döngüler), polimer içerisindeki monosakkarit bileşiminde ve şeker birimlerinin oranlarında önemli etkilere sahiptir. Genellikle, yüksek ve düşük ışık yoğunluklarında EPS üretimi gerçekleştirilmesine rağmen ışık yoğunluğu ayarlanırken kültür hacmi ve biyoreaktör geometrisine de dikkat edilmelidir. Ayrıca, bazı dalga boyları EPS üretimini etkilemektedir. Örneğin, *N. commune* mikroalgi UV-B radyasyonunda ektraselüler glikan üretimini uyarmasının yanı sıra fotokoruyucu pigmentlerin sentezini indüklemektedir [61].

3.3 Deneysel Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.3.1 BG 11 Besiyeri İçeriği (Blue Green Medium)

Tatlı su mavi yeşil algleri için genel bir ortamdır.

Hazırlanışı: 829 ml saf suya tablolardaki bileşikler ilave edilip, 1M NaOH ve HCl ile pH değeri 7.1' e optimize edilmektedir. Bazı mavi yeşil algler B_{12}' ye ihtiyaç duyduklarından son çözeltiye 1 μg ilave edilebilmektedir. Katı ortam isteniliyorsa 15 g/l agar ilave edilmektedir [62].

Çizelge 3. 2 BG 11 besiyeri içeriği [62]

mL	Stok solüsyonu	g/1000 H_2O
100	$NaNO_3$	15.0
10	K_2HPO_4	4.0
10	$MgSO_47H_2O$	7.5
10	$CaCl_2.2H_2O$	3.6
10	Sitrik Asit	0.6
10	Amonyum ferrik sitrat	0.6
10	Na_2EDTA	0.1
10	NA_2CO_3	2.0
1	İz elementi solüsyonu	-

İz elementi solüsyonu

1000 ml saf suya aşağıdaki bileşikler ilave edilmektedir.

Çizelge 3. 3 İz elementi solüsyon içeriği [62]

Bileşik	Miktar (g)
H_3BO_3	2.86
$MnCl_2.4H_2O$	1.81
$ZnSO_47H_2O$	0.222
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.39
$CuSO_4.5H_2O$	0.079
$Co(NO_3)_26H_2O$	0.0494

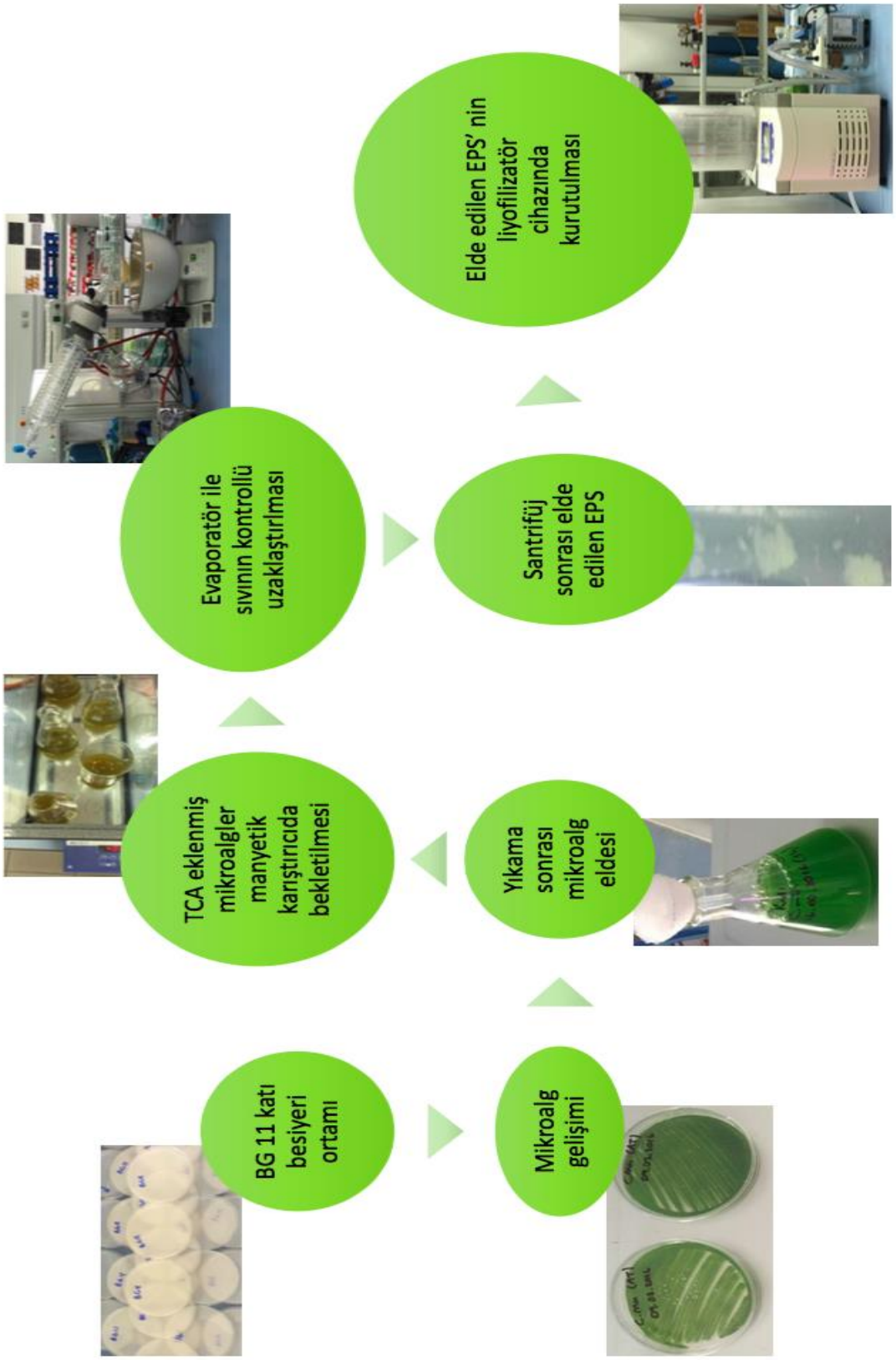


Şekil 3. 4 Besiyeri hazırlanışı

3.4 Deneysel Prosedür

3.4.1 EPS Üretim Prosesi Aşamaları

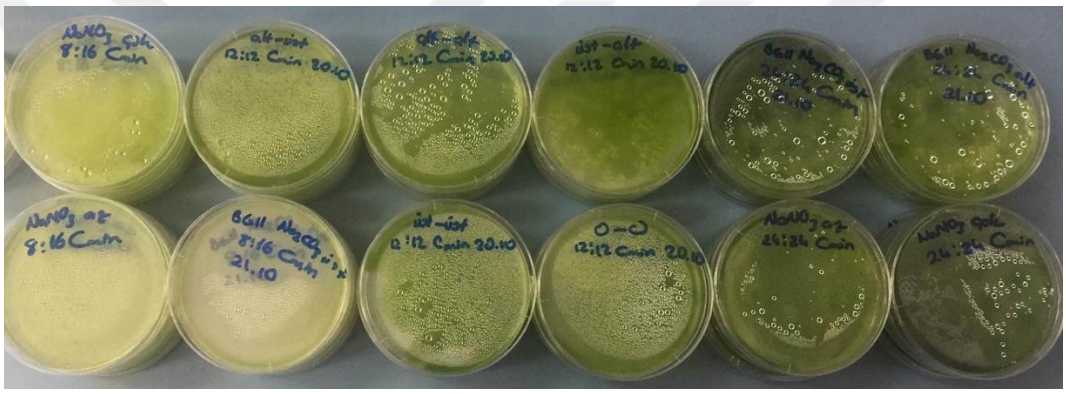
Mikroalglerden EPS üretim prosesi çeşitli aşamalardan oluşmaktadır. Üretim sürecinde uygulanan işlemler şematik olarak Şekil 3.5' te gösterilmektedir. Petrilerde farklı parametrelerde büyütülen *Chlorella minutissima, Botrycoccus braunii, Chlorella sorokiniana* mikroalgleri, distile su ile yıkanarak erlenlere toplanılmıştır. Toplanan mikroalglere miktarının %4 oranında TCA (trikloroasetik asit) eklenerek proteinlerin çöktürülmesi sağlanmıştır. 5000 rpm' de santrifüj işleminin ardından çöken protein kısmından süpernatant kısmı ayrılmıştır. %50 oranında sıvının uzaklaştırılmasından sonra kalan miktarın 2 katı kadar etonol eklenerek bir gece +4°C' de bekletilmiştir. Örnekler 5000 rpm'de santrifüj işleminin sonrasında EPS dibe çökmüş şekilde elde edilmiştir. Katı EPS liyafilizatörde 3-4 saat kurutularak saklanılacak forma getirilmiştir [63].



Şekil 3. 5 EPS sentezi

3.4.2 Mikroalglerin İçeriğindeki EPS Miktarlarının Belirlenmesi

Mikroalg içerisindeki toplam EPS içeriği fenol-sülfürik asit yöntemi ile belirlenmiştir. Fenol reaktifi %80 (w/w) olacak şekilde 20 g distile suya 80 g fenol eklenmesi ile hazırlanmıştır. Analiz için standart olarak glikoz kullanılmıştır. Standart eğrisini oluşturmak için tüplerin içerisinde Çizelge 3.4' te verilen farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış glikoz çözeltilerine 0.05 ml fenol reaktifi eklenmiş ardından 5 ml H_2SO_4 ilave edilmiştir [64]. Oda sıcaklığında 10 dk bekletilen tüplerden alınan örneklerin PG Instruments T60 model UV spektrofotometrede (Şekil 3.8) 490 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen verilerle standart eğri grafiği oluşturularak mikroalgin içindeki toplam karbonhidrat miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3. 6 Farklı stres koşulları altında mikroalg gelişimi

Çizelge 3. 4 Standart glikoz konsantrasyon değerleri [64]

	µg glikoz/2 ml					
	0	20	40	60	80	100
Glikoz stok çözeltisi (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Saf su (ml)	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0



Şekil 3. 7 Karbonhidrat analizi için farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış örnekler



Şekil 3. 8 Toplam karbonhidrat analizinde kullanılan PG Instrument T60 model UV spektrofotometre

3.4.3 Box Behnken Analizi

Ekzopolisakkarit üretim şartları, yanıt yüzey metodu kullanılarak ekzopolisakkarit verimi dikkate alınarak optimize edilmiştir. Bu amaç için 3 faktörlü (azot miktarı, karbon miktarı ve aydınlanma süresi) deneme dizaynı kullanılmıştır. Deneme dizaynında faktörler Çizelge 3.5' de verilmiş olup azot miktarı 0.1875, 0.75, 3 g aralığında; karbon miktarı 0.025, 0.1, 0.4 g ve aydınlanma süresi 8:16, 12:12, 14:10 h aralığında değiştirilmiştir. Bu üç faktörün çeşitli kombinasyonlarından oluşan 15 deneme noktası, Çizelge 3.7, 3.8 ve 3.9' de gösterilmiştir. Şekil 3.6' da üretilen mikroalgler ile deney sonuçlarının doğruluğunu ispatlamak için bir mikroalg hücresi başına EPS üretim miktarları hemositometre yöntemi ile belirlenmiş olup deneysel sonuçların doğruluğunu ispatlamak amacıyla mikroalg konsantrasyonları ve hücre sayıları belirlenmiş ve Çizelge 3.6' de verilmiştir.

Çizelge 3. 5 Farklı koşullar altında üretilmiş olan mikroalglerden ekzopolisakkarit eldesi için deney parametreleri

Değişkenler, birimleri	**Faktörler**	**Seviye**		
	X	Düşük(-1)	Orta(0)	Yüksek(+1)
$NaNO_3$ miktarı (gr)	X_1	0.1875	0.75	3
Na_2CO_3 miktarı (gr)	X_2	0.025	0.1	0.4
Aydınlatma döngüsü(h)	X_3	8:16	12:12	14:10

Çizelge 3. 6 Mikroalg türleri için UV değerleri ve hücre sayıları

Deney No	**Deney koşulları**			***Chlorella sorokiniana***		***Botrycoccus braunii***		***Chlorella minutissima***	
	X_N	**X_C**	**X_A**	**680 nm UV değeri**	**1 ml örnek başına hücre sayısı*10^4**	**680 nm UV değeri**	**1 ml örnek başına hücre sayısı*10^4**	**680 nm UV değeri**	**1 ml örnek başına hücre sayısı*10^4**
1	-1	-1	0	1,321	200	1,567	180	1,914	200
2	0	-1	1	2,421	380	2,655	280	2,488	240
3	-1	0	1	1,768	240	2,183	240	3,102	300
4	-1	0	-1	2,264	340	2,523	120	6,390	240
5	1	-1	0	2,424	380	1,796	200	4,013	460
6	0	1	-1	1,945	300	2,155	240	4.203	310
7	1	0	1	3,830	560	4,815	420	2,632	260
8	0	1	1	4,785	380	2,558	270	4,853	500
9	1	0	-1	1,130	170	1,205	130	2,477	240
10	1	1	0	1,650	230	2,043	230	2,393	240
11	-1	1	0	1,344	310	1,701	190	1,658	180
12	0	-1	-1	1,782	270	1,243	140	1,794	190
13	0	0	0	3,013	480	2,850	300	6,030	560
14	0	0	0	3,125	480	2,826	300	6,012	560
15	0	0	0	3,057	480	2,864	300	6,107	560

Çizelge 3. 7 *C. sorokiniana* mikroalginden ekzopolisakkarit üretim parametrelerinin ürün verimi üzerine etkisinin istatistiksel incelenmesi

Deney No	**$NaNO_3$ (gr)**	**Na_2CO_3 (gr)**	**Aydınlanma döngesi (h)**	**Üretilen EPS miktarı (μg/ml)**	**Bir hücre başına EPS miktarı*10^{-6}(OD=2)**
1	0.1875	0.025	12:12	281,565	211,96
2	0.75	0.025	14:10	59,3	13,217
3	0.1875	0.1	14:10	67,85	15,53
4	0.1875	0.1	8:16	261,048	67,138
5	3	0.025	12:12	192,503	41,254
6	0.75	0.4	8:16	242,241	82,262
7	3	0.1	14:10	138,103	12,532
8	0.75	0.4	14:10	95,826	10,449
9	3	0.1	8:16	222,191	203,539
10	3	0.4	12:12	212,709	111,515
11	0.1875	0.4	12:12	195,612	93,719
12	0.75	0.025	8:16	315,915	131,313
13	0.75	0.1	12:12	141,367	19,249
14	0.75	0.1	12:12	140,568	18,56
15	0.75	0.1	12:12	142,107	18,972

C. sorokiniana mikroalgal EPS için Box-Behnken deneysel tasarım modelinden elde edilen deneysel sonuçlar ve giriş değişkenleri arasındaki etkileşimin denklemi aşağıda verilmiştir.

$$Y = +141{,}00 - 5{,}00*X_1 - 12{,}88*X_2 - 85{,}13*X_3$$

Yanıt yüzey modelinde uygulanan modifiye modeline bağlı olarak *C. sorokiniana* için aydınlanma süresinin artışı EPS miktarını azalttığı ve en etkili parametre olduğu görülmüştür. Karbon ve azot miktarının etkileri incelendiğinde karbon ve azot miktarlarının azaltılması EPS üretim miktarını arttırdığı görülmüştür. Korelasyon katsayısı R^2=0,9571 olarak bulunmuştur. R^2'nin bire yakınlığı lineer bir denklem elde edilmiştir.

Çizelge 3. 8 *B. braunii* mikroalginden ekzopolisakkarit üretim parametrelerinin ürün verimi üzerine etkisinin istatistiksel incelenmesi

Deney düzeni	**$NaNO_3$ (gr)**	**Na_2CO_3 (gr)**	**Aydınlanma döngesi (h)**	**Üretilen EPS miktarı (μg/ml)**	**Bir hücre başına EPS miktarı*10^{-6}(OD=2)**
1	0.1875	0.025	12:12	131,01	93,171
2	0.75	0.025	14:10	101,186	27,118
3	0.1875	0.1	14:10	127,64	48,557
4	0.1875	0.1	8:16	46,6	30,12
5	3	0.025	12:12	163,85	90,200
6	0.75	0.4	8:16	71,8	26,914
7	3	0.1	14:10	52,8	4,984
8	0.75	0.4	14:10	74	21,110
9	3	0.1	8:16	98,5	124,481
10	3	0.4	12:12	44,83	18,600
11	0.1875	0.4	12:12	80,2	49,382
12	0.75	0.025	8:16	196	225,261
13	0.75	0.1	12:12	44,83	10,526
14	0.75	0.1	12:12	45,03	10,615
15	0.75	0.1	12:12	44,65	10,474

B. braunii mikroalga EPS için Box-Behnken deneysel tasarım modelinden elde edilen deneysel sonuçları ve giriş değişkenleri arasındaki etkileşimin denklemi aşağıda verilmiştir.

$$Y= +62,00 – 3,38*X_1 – 40,25*X_2 – 7,13*X_3$$

Yanıt yüzey modelinde uygulanan modifiye modelin bağlı olarak *B. braunii* için karbon miktarının artışı EPS miktarını azalttığı ve en etkili parametre olduğu görülmüştür. Azot miktarı ve aydınlanma süresinin azaltılması EPS üretim miktarında artış oluşturduğu görülmüştür. Korelasyon katsayısı R^2=0,9203 olarak bulunmuştur. $R^{2'}$nin bire yakınlığı lineer bir denklem elde edilmiştir.

Çizelge 3. 9 *C. minutissima* mikroalginden ekzopolisakkarit üretim parametrelerinin ürün verimi üzerine etkisinin istatistiksel incelenmesi

Deney düzeni	**$NaNO_3$ (gr)**	**Na_2CO_3 (gr)**	**Aydınlanma döngesi (h)**	**Üretilen EPS miktarı (μg/ml)**	**Bir hücre başına EPS miktarı*10^{-6}(OD=2)**
1	0.1875	0.025	12:12	272,89	142,11
2	0.75	0.025	14:10	69,83	23,311
3	0.1875	0.1	14:10	345,53	74,145
4	0.1875	0.1	8:16	209,32	27,23
5	3	0.025	12:12	281,08	39,4
6	0.75	0.4	8:16	195,7	29,974
7	3	0.1	14:10	280,83	82,066
8	0.75	0.4	14:10	185,11	15,248
9	3	0.1	8:16	320,08	114,387
10	3	0.4	12:12	198,6	69,368
11	0.1875	0.4	12:12	87,5	59,107
12	0.75	0.025	8:16	380,08	222,965
13	0.75	0.1	12:12	175,65	10,281
14	0.75	0.1	12:12	174, 568	10,313
15	0.75	0.1	12:12	176,107	10,152

C. minutissima mikroalgal EPS için Box-Behnken deneysel tasarım modelinden elde edilen deneysel sonuçları ve giriş değişkenleri arasındaki etkileşimin denklemi aşağıda verilmiştir.

$$Y= +152,33 + 20.75*X_1 – 42,13*X_2 – 28,13*X_3$$

Yanıt yüzey modelinde uygulanan modifiye modeline bağlı olarak *C. minutissima* için karbon miktarının artışı EPS miktarını azalttığı ve en etkili parametre olduğu görülmüştür. Azot miktarının azaltılması EPS miktarını azaltırken, aydınlanma süresinin azaltılması ise EPS üretim miktarında artışı sağlamıştır. Diğer mikroalg türlerinden farklı olarak azot miktarının arttırılması EPS üretim miktarında artışa neden olmuştur. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda oluşturulan azot stresinin *C. minutissima* türü için yetersiz olduğu görülmüştür [65]. Bu nedenlerden dolayı korelasyon katsayısı R^2=0,76 olarak bulunmuştur. R^2 değeri diğer mikroalgler gibi bire yakın olmadığından lineerlikten uzak bir denklem oluşturduğu görülmektedir.

Çizelge 3. 10 Bir hücre başına EPS miktarının Box-Behnken deneysel tasarım modelinden elde edilen deneysel sonuçları ve giriş değişkenleri arasındaki etkileşimin denklemleri ve korelasyon katsayılarının karesi

Mikroalg türleri	**Box Behnken tasarım modelinden elde edilen denklemler**	**Korelasyon katsayılarının karesi (R^2)**
Chlorella Sorokiniana	$Y = +18,33 – 2,38*X_1 – 12,50*X_2 –54,13*X_3$	84
Botrycoccus braunii	$Y= +38,65 – 2,25*X_1 – 40,13*X_2 – 42,38*X_3$	96
Chlorella minutissima	$Y= +10 + 0.25*X_1 – 31,75*X_2 – 24,75*X_3$	73

Bir hücre başına mikroalgal EPS miktarlarının Box-Behnken deneysel tasarım modelinden elde edilen deneysel sonuçları ve giriş değişkenleri arasındaki etkileşimin denklemleri incelendiğinde üretilen toplam EPS için alınan sonuçlar ile parametrelerin aynı etkileri gösterdiği görülmüştür.

3.4.4 JMP Analizi ve Sonuçları

Box-Behnken analizine göre belirlenen koşullar altında mikroalg türlerinin ürettikleri EPS miktarları istatistiksel yazılım programı JMP (sürüm 6.0.0; SAS enstitü) kullanılarak Çizelge 3.7' deki sonuçlar elde edilmiştir. Kullanılan anlamlılık düzeyi % 5' tir.

Çizelge 3. 11 Mikroalgal EPS üretim miktarlarının karşılaştırılması

Mikroalg türü	**Seviye**	**Ortalama üretim miktarı (μg/ml)**
Chlorella sorokiniana	A	180,59367
Chlorella minutissima	A	223,54333
Botrycoccus braunii	B	89,33973

Çizelge 3. 12 Mikroalgal EPS' lerin varyans analizi sonuçları

Source	**DF**	**Sum of Squares**	**Mean Square**	**F Ratio**
Model	2	140912,80	70456,4	13,2212
Error	42	223819,17	5329,0	Prob>F
C.Total	44	364731,98		<.0001*

Yapılan deney sonuçlarında türler arasındaki EPS üretim miktarlarının varyans analizi sonuçlarında anlamlılık düzeyi p=0.0001< 0.05 olarak bulunmuştur.

3.4.5 FTIR Analizi ve Sonuçları

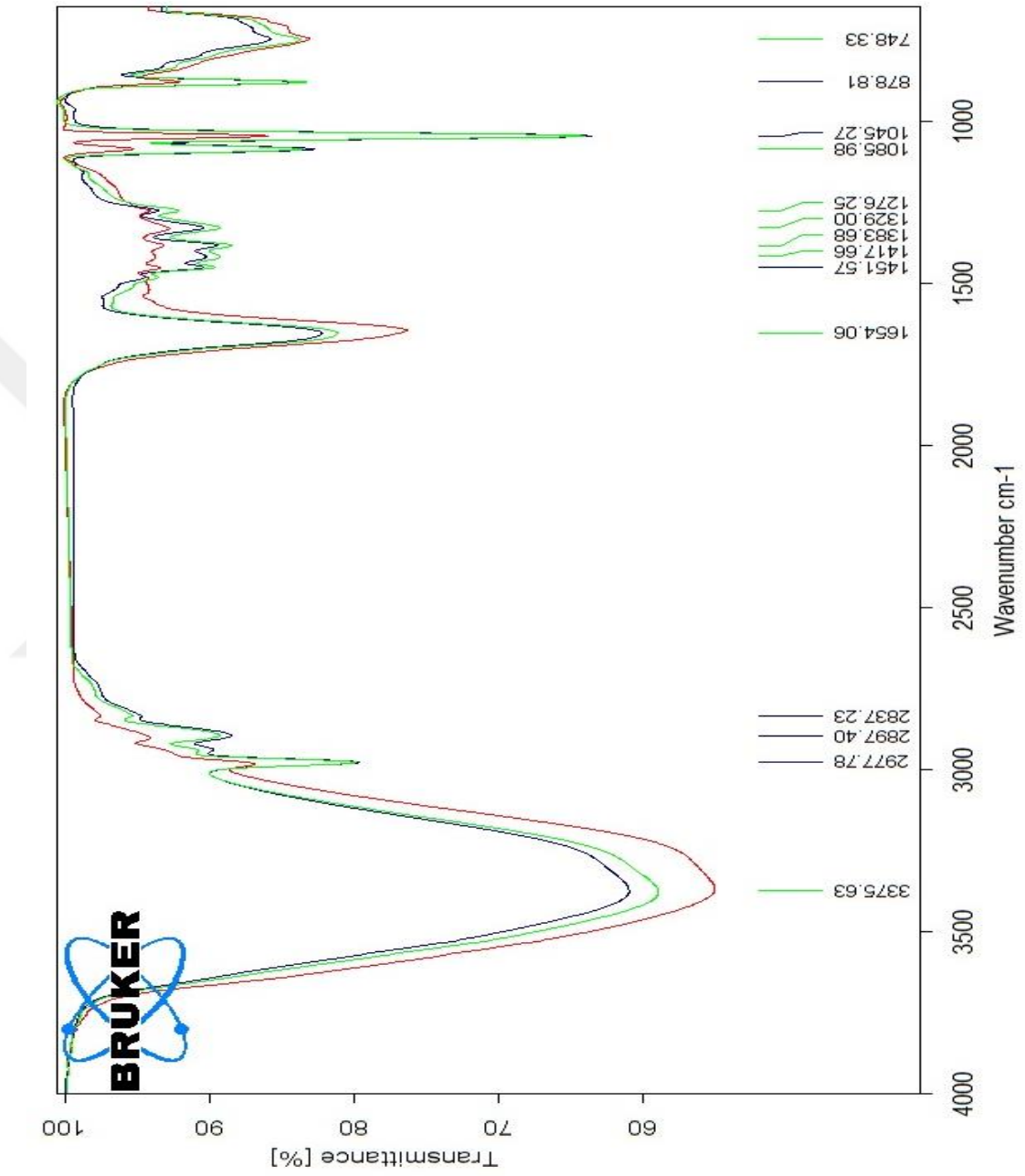
Bazı mikroalglerin EPS' lerinde metil, karboksil ve hidroksil gruplarının yanı sıra sülfat ve piruvat gruplarıda bulunmaktadır. Peptit, asetat ve ramnoz varlığı EPS' ye doğal bir hidrofobik yapı kazandırmaktadır. Mikroalgal EPS' de hem hidrofilik hem de hidrofobik grupların bulunması emülsiyonun dengelenmesine yardımcı olabilir veya biyoflokülasyon ajanı olarak kullanılmasına olanak sağlayabilmektedir.

EPS' de fonksiyonel grupların ve çeşitli şeker yapılarının varlığı farklı uygulamalarda da kullanılmasına olanak sağlamaktadır [66]. Karboksil grubunun varlığı iki değerlikli katyonların bağlantı yeri olarak görev yapmaktadır. Ayrıca, yeni ve modifiye edilmiş polimerlerin üretilmesine imkan vermektedir [67].

Mikroalg türlerinden elde edilen EPS' nin içerdiği fonksiyonel grupların belirlenmesi amacıyla, Thermoscientific Marka Nicolet 6700 model FTIR cihazı kullanılmış ve numunelerin 600-4000 cm^{-1} aralığında içerdiği fonksiyonel grupların adsorbans değerleri belirlenmiştir. Spektrumlardan okunarak tanımlanan fonksiyonel gruplar Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3. 13 Mikroalglerden Elde Edilen EPS'lerin FTIR Analiz Spektrumuna Göre Tanımlanabilen Fonksiyonel Grupları [66,67,68,69]

Dalga sayısı(cm^{-1})	**Fonksiyonel gruplar**
3400	0-H titreşim gerilmesi
2927	Alifatik C-H gerilmesi
1640	Aromatik C=C halka gerilmesi
1418	C-H metil gerilmesi
1064	Oligomer içerisindeki C-O-C gerilmesi
863	Glikosidik bağı gerilmesi



Şekil 3. 9 Mikroalgal EPS' lerin FTIR spektrumu

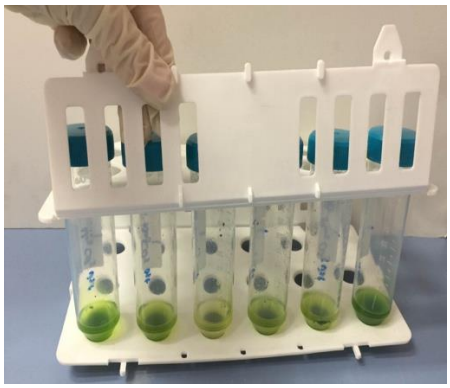
FTIR analizi ile EPS yüzeyindeki hidroksi, karboksil ve glikosidik bağları gibi birçok işlevsel grupların mevcudiyeti ortaya çıkarılmıştır [68]. 3400-3200 cm^{-1} EPS piki tüm polimerlerde mevcut olan 0-H bağlarından ve titreşimlerinden kaynaklanmıştır. 3000-2800 cm^{-1}EPS piki metil gruplarındaki C-H bağlarından, 1850-1600 cm^{-1} EPS piki ise C=O bağlarındaki titreşimden ve polisakkaritlerin karakteristik pikinden kaynaklanmıştır. 1400-1370 cm^{-1} sinyali C-O bağlarındaki titreşimden kaynaklanmaktadır. Karbonhidratlar 1200-950 cm^{-1} dalga numaraları arasında yüksek absorbans değerleri göstermektedir. Bu pikler ekzopolisakkaritlerin parmak izi bölgesi olarak kabul edilmektedir. 1024 cm^{-1} pikindeki yoğunluk α-(1→6) glikozik bağının varlığını ve 950-700 cm^{-1} absorbsiyon bölgesindeki pik mannoz varlığını kanıtlamıştır. 1200-1000 cm^{-1} yakınlarındaki pikler α-piranoz polisakkaritinin varlığını göstermektedir [69].

3.4.6 Klorofil-a Analizi

Klorofil-a analizi için mikroalg örneklerinden 5 ml tüplere alınarak, santrifüjde 5000 rpm' de 10 dakika çöktürme işlemi yapılmıştır. Ardından üzerinde kalan fazla su dökülmüş ve üzerine 5 ml aseton ile muamele edilmiştir. Ardından örnekler 70°C' de 10 dakika su banyosunda bekletildikten sonra tekrar santrifüj ile ayrılmıştır. Santrifüjden çıkan örneklerin üzerinde kalan sıvı, spektrofotometrede 666 nm dalga boyunda okunmuş, aşağıda verilen formül ile klorofil-a miktarı tespit edilmiştir [70].

Klorofil a (µg/ml) = 13,9 A_{666}

A_{666} = 666 nm' de okunan absorbans (soğurma) değeri



Şekil 3. 9 Klorofil analizi sonrası mikroalgler

Çizelge 3. 14 Aydınlanma döngüsü 8:16 için klorofil-a miktarları

	Chlorella Sorokiniana			**Botrycoccus brauni**			**Chlorella Minutissima**		
	$NaNO_3$ min	Opt.	$NaNO_3$ max	$NaNO_3$ Min	Opt.	$NaNO_3$ max	$NaNO_3$ min	Opt.	$NaNO_3$ max
Klorofil-a miktarı ($\mu g.ml^{-1}$)	2.1	2,51	5.89	3,13	4,31	13,6	1,56	4,56	11,43

Çizelge 3. 15 Aydınlanma döngüsü 12:12 için klorofil-a miktarları

	Chlorella Sorokiniana			**Botrycoccus brauni**			**Chlorella Minutissima**		
	$NaNO_3$ min	Opt.	$NaNO_3$ max	$NaNO_3$ min	Opt.	$NaNO_3$ max	$NaNO_3$ min	Opt.	$NaNO_3$ max
Klorofil-a miktarı ($\mu g.ml^{-1}$)	3,67	4,56	6,90	4,31	6,21	20,91	5,21	7.68	18,26

Çizelge 3. 16 Aydınlanma döngüsü 14:10 için klorofil-a miktarları

	Chlorella Sorokiniana			**Botrycoccus brauni**			**Chlorella Minutissima**		
	$NaNO_3$ min	Opt.	$NaNO_3$ max	$NaNO_3$ min	Opt.	$NaNO_3$ max	$NaNO_3$ min	Opt.	$NaNO_3$ Max
Klorofil-a miktarı ($\mu g.ml^{-1}$)	5,19	6,34	7.91	5,53	9,31	24,22	8,94	11,6	23,05

* Optimum: Ticari BG 11 solüsyonunda azot fazlalığı veya stresi yoktur

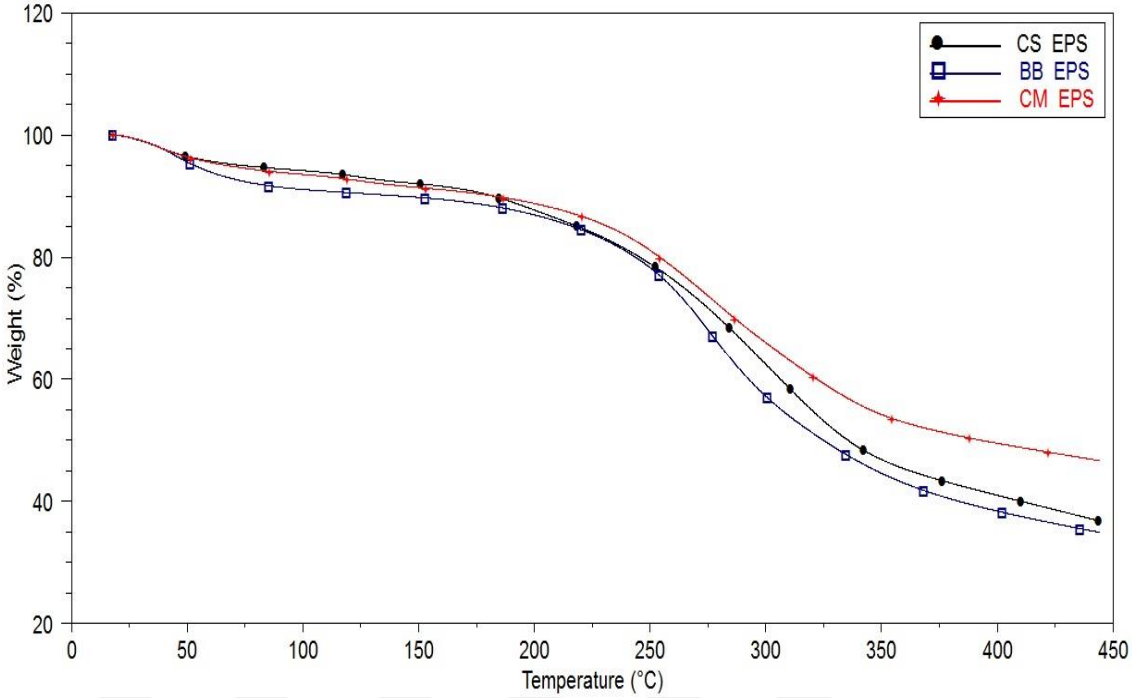
Farklı aydınlanma süreleri içerisinde klorofil-a üretim miktarları incelendiğinde artan aydınlanma süresi ile klorofil-a miktarının arttığı görülmüştür. Azalan azot miktarı gelişen mikroalgin klorofil-a sentezini yavaşlattığı, artan azot kaynağı ise klorofil-a sentezini hızlandırdığı görülmüştür. Aydınlanma süresi ile azot kaynağının arttırılması klorofil-a sentezi için pozitif sinerjetik etki oluşturmaktadır.

3.4.7 Termogravimetrik Analiz

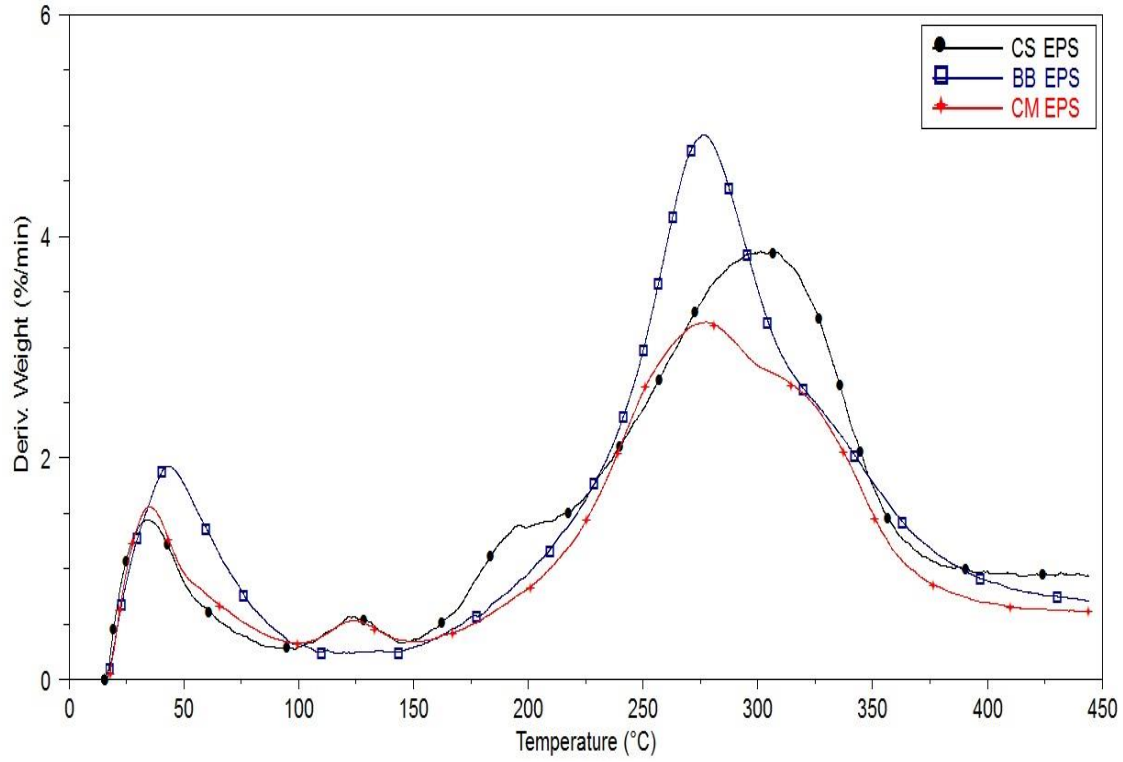
Termogravimetrik analiz, kurutulmuş örneğin ısıtılmasıyla ağırlığının zamanla değişiminin belirlendiği bir tekniktir [71]. İnert gaz akışı veya hava ortamında ve sabit veya doğrusal bir ısıtma hızında gerçekleştirilen analizlerde, sıcaklık değişimini ve kütle değişimini otomatik olarak kaydeden bir sistem vasıtasıyla "termogramlar" elde edilir [72].

TGA eğrilerinin birinci türevi zaman ya da sıcaklığa bağlı olarak kullanılmasıyla elde edilen değerler kütle değişimini göstermektedir. Bu eğrilere "Derivative (Türev) Termogravimetrik Analiz (DTG)" eğrileri adı verilir. TG eğrilerinde, kütle değişimi (m), zaman ya da sıcaklığın fonksiyonu olarak verilirken, DTG eğrilerinde, kütle kaybı değişim hızı (dm/dt), zaman ya da sıcaklığın fonksiyonu olarak verilir [73].

Kütle değişikliği, numunenin birkaç farklı yoldan malzeme kaybıyla ya da bulunduğu ortamla reaksiyona girmesiyle oluşur. Bu oluşum TGA eğrilerinde basamak şeklinde ya da DTG eğrilerinde bir doruk noktası seklinde oluşur. DTG eğrilerindeki pik maksimum noktası, kütle değişim hızının en büyük olduğu zaman ve sıcaklığa karşılık gelmektedir [74].



Şekil 3. 10 Mikroalgal EPS'lerin TGA eğrileri



Şekil 3. 12 Mikroalgal EPS' lerin DTG eğrileri

Çizelge 3. 17 Mikroalgal EPS' lerin bozunma sıcaklıkları ve miktarları

Mikroalgal EPS	I. Bölge		II. Bölge		Maksimum Bozunma Sıcaklığı (ºC)	Maksimum bozunma hızı (%/dak)
	Sıcaklık Aralığı (ºC)	Bozunma Miktar (%)	Sıcaklık Aralığı (ºC)	Bozunma Miktar (%)		
Chlorella sorokiniana	20 - 140,54	7,712	140,54 - 386,98	50,02	303,91	3,840
Botrycoccus braunii	20 - 129,24	9,688	129,24 - 419,92	53,55	276,97	4,921
Chlorella minutissima	20 - 129,71	7,815	120,71 - 410,91	43,37	279,18	3,230

Mikroalgal EPS' nin başlangıçta sahip olduğu kütle kaybı EPS yüzeyindeki su bağlarından kaynaklanmaktadır. Polisakkaritler yüksek oranda –COOH radikal gruplarını içerdiklerinden I. Bölgedeki bozunma miktarında artışa neden olmaktadır [75]. Bundan sonra, ağırlık 215 ° C' ye kadar stabil kalmıştır ve nedenle EPS 215 ° C'ye kadar yüksek sıcaklıklara dayanabilir ve bu özellik endüstriyel uygulamalar için kullanılabilir. Mikroalgal EPS' lerin I. bölgedeki bozunmalarındaki ağırlık kayıpları 20-145° C aralığında *Chlorella sorokiniana*' nın % 7,712, *Botrycoccus braunii*' nin % 9,688 ve *Chlorella minutissima'* nın % 7,815' dir. II. Bölgedeki bozunma miktarları sırasıyla % 50, 54 ve 43' tür ve sıcaklıklar 420 ° C' lere kadar ulaşmıştır. DTG termogramı sonuçlarına göre küçük endotermik tepeler ve bir majör endotermik pik görülmüştür. Chlorella sorokiniana mikroalginin majör endotermik piki olan 303,91 ° C' de, *Botrycoccus braunii*'nin 276,97 ° C' de ve *Chlorella minutissima*' nın 279,18 ° C' de görülmüştür.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı deney koşulları altında *Chlorella sorokiniana, Botrycoccus braunii ve Chlorella minutissima* mikroalglerinden EPS üretimi gerçekleştirilerek, bu deneysel koşulların EPS verimine olan etkisinin incelendiği bu tez çalışmasının genel sonuçları ve önerileri aşağıda özetlenmiştir:

1. Mikroalglerin hücre duvarları evrimsel, ekolojik ve ekonomik bakımdan yararlı olan farklı bileşenleri içermektedir. Karasal bitkilere yakın akraba olan yeşil mikroalgler polisakkarit bakımından zengin bir hücre duvarına sahiptir. Bu hücre duvarındaki en önemli bileşenlerden olan EPS' lerin endüstride birçok alanda kullanıldığı görülmüştür. Yapılan bu çalışmada mikroalgal EPS üretimini maksimum seviyelere çıkarmak amaçlanmıştır.

2. Mikroalgal EPS üretimini düzenleyen en önemli parametrelerin; azot miktarı, karbon miktarı ve aydınlanma süresi olduğu düşünülmektedir. Optimum parametreler ve tolerans aralıkları türe özgüdür ve parametreler birbirleriyle sinerjetik etki içerisindedir [76]. Ayrıca mikroalg türlerinin kimyasal kompozisyonları da azot miktarı, karbon miktarı ve aydınlanma süresinden etkilenmektedir [77].

3. Final optimize koşulları Box-Behnken programından alınan deney reçetesi çerçevesine göre yapılan farklı koşullardaki deneylerde EPS üretimi *C. sorokiniana* için 59,3-315,92 μg/ml, *B. braunii* için 46,6-163,85 μg/ml ve *C. minutissima* için 69,83-380,08 μg/ml aralığında bulunmuştur.

4. *C. sorokiniana* için elde edilen model eşitliğine göre aydınlanma süresi stresinin mikroalg üzerindeki etkisi diğer parametreler göre daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Korelasyon katsayısı R^2=0,9571 olarak bulunmuştur. $R^{2'}$nin bire yakınlığı daha lineer bir denklem elde edilmiştir.

5. *B. braunii* için elde edilen model eşitliğine göre karbon stresinin mikroalg üzerindeki etkisi diğer parametreler göre daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Korelasyon katsayısı R^2=0,9203 olarak bulunmuştur. $R^{2'}$nin bire yakınlığı daha lineer bir denklem elde edilmiştir.

6. *C. minutissima* için elde edilen model eşitliğine göre karbon stresinin mikroalg üzerindeki etkisi diğer parametrelere göre daha fazla etkili olmasına rağmen azot stresi beklenenin aksine bir sonuç göstermiştir. Bu sonuç incelendiğinde yapılan deneylerde C. minutissima için oluşturulan azot stresinin yetersiz olduğu görülmüştür (N miktarı< 7 mg). Bu nedenle korelasyon katsayısı lineerlikten uzak bir değer almıştır (R^2=0,76) [65].

7. Mikroalg türlerinin UV değerleri ve 1 ml başına hücre sayıları belirlenerek Box Behnken tasarım matrisinden elde edilen sonuçların doğruluğu ispatlanmıştır.

8. Üç mikroalg türünden EPS üretimi için en verimli olanının *Chlorella minutissima* olduğu görülmüştür. *C. minutissima* türünden elde edilen ekzopolisakkaritlerin yüksek sıcaklıklara toleransı, kayma gerilimine dayanıklılığı ve biyoreaktör yüzeyinde düşük adezyon özelliği sayesinde büyük ölçek üretimde avantajlı olması gıda, ilaç ve sağlık uygulamalarında kullanılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

9. Mikroalg türlerinin ürettikleri EPS miktarları JMP programına göre karşılaştırıldığında *C. sorokiniana* ve *C. minutissima* mikroalglerinin birbirlerine yakın miktarlarda ürettikleri görülmüştür. *B. braunii* mikroalginin diğer mikroalglere oranla daha az EPS ürettiği görülmüştür. Varyans analizi sonuçlarına göre $p=0.0001 < 0.05$ olduğundan mikroalg türünün EPS üretim miktarına etkisinin önemli olduğu görülmüştür.

10. Fotosentezde en çok kullanılan pigment olan klorofil, mikroalglerin sitoplazması içinde dağılmış olarak bulunmaktadır. Klorofil-a sentezi için gerekli

olan minerallerden biri olan azot (N)' un sınırlanması klorofil-a miktarını azalttığı görülmüştür.

11. Gölcük göletinden elde edilen *Scenedesmus obliquus* mikroalgiyle yapılan çalışmada da görüldüğü gibi ortamdaki azot miktarının artışı klorofil-a miktarının artışına neden olmuştur [78]. Artan klorofil-a fotosentez sonucu canlılık fonksiyonlarının devamı için artan biyokütlede protein miktarının artışına neden olurken, EPS sentezinde düşüşe neden olduğu görülmüştür.

12. FTIR analizi göre 3400-3200 cm^{-1} EPS piki tüm polimerlerde mevcut olan 0-H bağlarından ve titreşimlerinden kaynaklanmıştır. 3000-2800 cm^{-1} EPS piki metil gruplarındaki C-H bağlarından, 1850-1600 cm^{-1} EPS piki ise C=O bağlarındaki titreşimden ve polisakkaritlerin karakteristik pikinden kaynaklanmıştır. 1400-1370 cm^{-1} sinyali C-O bağlarındaki titreşimden kaynaklanmaktadır.

13. Karbonhidratlar 1200-950 cm^{-1} dalga numaraları arasında yüksek absorbans değerleri göstermektedir. Bu pikler ekzopolisakkaritlerin parmak izi bölgesi olarak kabul edilmektedir.

14. 1200-1000 cm^{-1} yakınlarındaki pikler α-piranoz polisakkaritinin varlığını göstermektedir

15. 1024 cm^{-1} pikindeki yoğunluk α-(1→6) glikozik bağının varlığını ve 950-700 cm^{-1} absorbsiyon bölgesindeki 812 cm^{-1} piki mannoz varlığını kanıtlamıştır.

16. Ekzopolisakkaritlerin yapısındaki su bağları ve –COOH radikal grupları I. Bölgedeki bozunma miktarında artışa neden olduğundan bozunma miktarı karşılaştırıldığında *B. braunii'* nin en fazla su veya –COOH grubu içerdiği görülmüştür.

17. I. bozunmanın ardından ağırlığın ilk azalmaya başladığı nokta bize EPS' nin endüstriyel uygulamalar için kaç santigrat dereceye kadar dayandığını göstermiştir. Yaptığımız analizler sonucunda mikroalgal EPS' ler için bu sıcaklığın 215 ° C civarında olduğu görülmüştür.

18. II. Bölgedeki maksimum bozunma miktarına (% 53,55) ve toplam maksimum bozunma miktarına (63,238) sahip mikroalgal EPS *B. braunii*' ye aittir.

19. Maksimum bozunma sıcaklığına sahip *C. Sorokiniana' dan elde edilen* EPS (303° C) iken maksimum bozunma hızına sahip mikroalgal EPS *B. braunii* (4,921 %/dak)' dir.

20. Termogravemetrik mikroalgal EPS analizi sonuçlarında bozunma oranı ve hızındaki farklılıklar elde edilen EPS türlerinin farklı olduğunu göstermiş olup ileride yapılacak EPS karakterizasyon çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

21. Türkiye'nin toplam güneşlenme süresinin fazlalığı mikroalg üretimi için gerekli enerjinin güneşten elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca, ülkemizin su kaynaklarında mevcut canlı kaynaklarının değerlendirilmesi ve ekonomiye kazandırılması ancak üzerinde yapılacak araştırmalarla mümkündür. Mikroalglerin hücre içinde ve dışında biriktirdikleri metabolitler bakımından önemli canlı gruplarındandır. Bu bakımdan mikroalglerden elde edilen EPS gibi değerli metabolitlerin, farklı kullanım amaçlarına hizmet etmesi ve aynı zamanda ticari ürün olarak dünya pazarında önemli bir yer tutması ile ülke ekonomisine önemli bir katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Marques, A.E, Miranda J.R., Batista A.P. ve Gouveia L., (2012). "Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy", Published by Nova Science Publishers, Chapter 1 edited by Johansen, M.N., New York, 1-61.

[2] YILMAZ, H.K., (2008). "Mersin İçin Mikroalg Üretiminin Önemi", Mersin Sempozyumu, 417-429.

[3] Ergene, E., (2015). Bazı Bacillus Suşları ile Melastan Ekzopolisakkarit, Koşullarının Optimizastonu ve Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Sakarya Üniversitesi, Sakarya.

[4] Hickisch, A., Beer, R., Vogel, R.F. ve Toelstede, S., (2016). "Influence of lupin-based milk alternative heat treatment and exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria on the physical characteristics of lupin-based yogurt alternatives", Food Research International, 84: 180–188.

[5] Lin, H., Zhang, M., Wang, F., Meng, F., Liao, B., Hong, H., Chen, J. ve Gao, W., (2014). "A critical review of extracellular polymeric substances (EPSs) in membrane bioreactors: Characteristics, roles in membrane fouling and control strategies", Journal of Membrane Science, 460: 110–125.

[6] Kambourova, M., Oner, E. T. Ve Poli, A., (2015). "Exopolysaccharides from Prokaryotic Microorganisms Promising Sources for White Biotechnology Processes", Industrial Biorefineries and White Biotechnology Elsevier B.V., Chapter 15, 469-490.

[7] Kleerebezem, M. ve Hugenholtz, J., (2003). "Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria", Current Opinion in Biotechnology, 14: 232–237.

[8] Rühmann, B., Schmid, J. ve Sieber, V., (2015). "High throughput exopolysaccharide screening platform: From strain cultivation to monosaccharide composition and carbohydrate fingerprinting in one day", Carbohydrate Polymers, 122: 212–220.

[9] Liu, B., Sun, Z., Ma, X., Yang, B., Jiang, Y., Wei, D. ve Chen, F., (2015). "Mutation Breeding of Extracellular Polysaccharide-Producing Microalga Crypthecodinium cohnii by a Novel Mutagenesis with Atmospheric and Room Temperature Plasma", Int. J. Mol. Sci., 16: 8201-8212.

[10] Roca, C., Lehmann, M., Torres, C., Baptista, S., Gaudencio, S.P., Freitas, F. ve Reis, M., (2016). "Exopolysaccharide production by marine *Pseudoalteromonas sp.* Strain isolated from Madeira Archipelago ocean sediments", New Biorechnology, 33: 460-466.

[11] Hokputsa, S., Hu, Ch., Paulsen, B. S. ve Harding, S.E., (2003). "A physico-chemical comparative study on extracellular carbohydrate polymers from five desert algae", Carbohydrate Polymers, 54: 27–32.

[12] Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., Philippis, R.D. ve Tamagnini, P., (2009). "Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly", Federation of European Microbiological Societies Published by Blackwell Publishing, 33: 917-941.

[13] Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C. ve Schorr-Galindo, S., (2012). "Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction", Carbohydrate Polymers, 87: 951–962.

[14] Angelis, S.,(2024). Exopolysaccharide production and antioxidant activity by submerged co-culture of macromycetes and microalgae, Doktora Tezi, Mention Microbiology, Plant Biology and Biotechnologies in the University of Provence, University of the Mediterranean Sea and Federal University of Parana, Brezilya.

[15] Freitas, F., Alves, V.D. ve Reis, M.A.M., (2011). "Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications", Trends in Biotechnology, 29: 8-23.

[16] "Alginate viscoelastic composition, method of use and package", (2009). Patent yayınlanma numarası, EP1720518.

[17] Wikipedia, Beta-glukan, https://tr.wikipedia.org/wiki/Beta-glukan, 03 Eylül 2016.

[18] Li, H., Wei, M., Min, W., Gao, Y., Liu, X. ve Liu, J., (2016). "Removal of heavy metal Ions in aqueous solution by Exopolysaccharides from Athelia rolfsii", Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 6: 28–32.

[19] Cao, J., Hou, D., Lu, J., Zhu, L., Zhang, P., Zhou, N. ve Chen, K., (2016). "Anti-tumor activity of exopolysaccharide from Rhizopus nigricans Ehrenb on S180 tumor-bearing mice", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 26: 2098–2104.

[20] Han, M., Du, C., Xu, Z.Y., Qian, H. ve Zhang, W.G., (2016). "Rheological properties of phosphorylated exopolysaccharide produced by Sporidiobolus pararoseus JD-2", International Journal of Biological Macromolecules, 88: 603–613.

[21] Dilna, S.V., Surya, H., Aswathy, R.G., Varsha, K.K., Sakthikumar, D.N., Pandey, A. Ve Nampoothiri, K.M., (2015). "Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic Lactobacillus plantarum RJF_4", LWT - Food Science and Technology, 64: 1179-1186.

[22] Welman, A.D., (2015). "Exopolysaccharides from fermented dairy products and health promotion", Advances in Fermented Foods and Beverages.

[23] Yim, J.H., Kim S.J., Ahn, S.H., Lee, C.K., Rhie, K.T. ve Lee, H.K., (2004). "Antiviral Effects of Sulfated Exopolysaccharide from the Marine Microalga Gyrodinium impudicum Strain KG03", Marine Biotechnology, 6: 17–25.

[24] Scheffler J., (2007). "Underwater Habitats", Illumin 9, 4: 1–9.

[25] Halim, R., Danquah, M.K. ve Webley, P.A., (2012). "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review", Biotechnol. Adv., 30: 709–732.

[26] Gyenis B., Szigeti J., Molna´r N. ve Varga L., (2005). "Use of dried microalgal biomasses to stimulate acid production and growth of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* in milk", Acta Agraria Kaposva´riensis, 9(2): 53–9.

[27] Wang, S.T., PAN, Y., LIU, C., CHUANG, L. ve CHEN, C.N., (2011). "Characterization of a green microalga UTEX 2219-4: Effects of photosynthesis and osmotic stress on oil body formation", Botanical Studies, 52: 305-312.

[28] Valdivia, V.B., Butro´n, R.O., Reynoso, M.P., Garcia, A.H. ve Europa, E.C., (2011). "*Chlorella vulgaris* administration prevents HgCl2-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney", J Appl Phycol, 23: 53–5.

[29] Barrow, C. ve Shahidi, F., (2008). "Marine nutraceuticals and functional foods", Boca Raton, Fla., CRC Press., 367–403.

[30] Dayananda, C., Sarada, R., Usha Rani, M., Shamala, T.R. ve Ravishankar, G.A., (2007). "Autotrophic cultivation of Botryococcus braunii for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media", Biomass and Bioenergy, 31: 87–93.

[31] Metzger, P. ve Largeau, C., (2005). "*Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids", App. Microbiol Biotechnol, 66: 486-496.

[32] Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C., (2002). "*Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals", Crit. Rev. Biotechnol, 22: 245-279.

[33] Barupal, D.K., Kind, T., Kothari, S.L., Lee do, Y. ve Fiehn, O., (2010). "Hydrocarbon phenotyping of algal species using pyrolysis-gas chromatography mass spectrometry", BMC Biotechnol, 10: 40.

[34] Wong, M.T., Zhang, D., Li, J., Hui, R.K. ve Tun, H.M., (2013). "Towards a metagenomic understanding on enhanced biomethane production from waste activated sludge after pH 10 pretreatment", Biotechnol Biofuels, 6: 38.

[35] Rao, A.R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R. ve Ravishankar, G.A., (2007). "Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents", Bioresour Technol, 98: 560-564.

[36] Weiss,T. L., Roth, R., Goodson, C., Vitha, S., Black, I., Azadi, P., Rusch, J., Holzenburg, A., Devarenne, T. P. Ve Goodenough, U., (2012). "Colony Organization in the Green Alga *Botryococcus braunii* (Race B) Is Specified by a Complex Extracellular Matrix", American Society for Microbiology, 1424-1440.

[37] Ren, H.Y., Liu, B.F., Ma, C., Zhao, L. ve Ren, N.Q., (2013). "A new lipid-rich microalga Scenedesmus sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production", Biotechnol Biofuels, 6: 143.

[38] Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G. ve 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: 195-214.

[39] Li, Y. ve Qin, J.G., (2005). "Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains", Appl Phycol, 17: 551-556.

[40] Okada, S., Tonegawa, I., Mastuda, M., Murakami, M. ve Yamaguchi, K., (1997). "Braunixanthins 1 and 2, new carotenoids from the green 0016 microalga *Botryococcus braunii*", Tetrahedron, 53: 11307-11316.

[41] Ge, Y., Liu, J. ve Tian, G., (2011). "Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO_2 concentration in photobioreactor", Bioresour Technol, 102: 130-134.

[42] Ruangsomboon, S., (2012). "Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga", *Botryococcus braunii* KMITL 2. Bioresour Technol, 109: 261-265.

[43] Yoshimura, T., Okada, S. ve Honda, M., (2013). "Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: optimal CO_2, salinity, temperature, and irradiance conditions", Bioresour Technol, 133: 232-239.

[44] Liu, J., Sun, Z. ve Gerken, H., (2014). "Recent Advances in Microalgal Biotechnology", Published by OMICS Group eBooks Gull Ave, Foster City, CA 94404, USA, 731-750.

[45] Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R. ve Ravishankar, G.A., (2006). "Influence of nitrogen sources on growth, hydrocarbon and fatty acid production by *Botryococcus braunii*", Asian J Plant Sci, 5: 799-804.

[46] Shen, Y., Zhang, H., Xu, X. ve Lin, X., (2015). "Biofilm formation and lipid accumulation of attached culture of *Botryococcus braunii*", Bioprocess Biosyst Eng, 38: 481–488.

[47] Anderson, D.B. ve Eakin, D.E., (1985). "A process for the production of polysaccharides from microalgae", Biotechnol Bioeng Symp, 15: 533-547.

[48] Koren, K.M. ve Rayburn, W.R., (1984). "Influence of growth status and nutrients on exocellular polysaccharides synthesis by the soil alga Chlamydomonas mexicana", J. Phycol, 20: 253-257.

[49] Allard, B. ve Casadevall, E., (1990). "Carbohydrate composition and characterisation of sugars from the green microalga *Botryococcus braunii*", Phytochem, 29: 1875-1878.

[50] Fernandes, H.L., Tomme, M.M., Lupi, F.M., Fialho, A.M. ve Sa Correia, I., (1989). "Biosynthesis of high concentration of an exopolysaccharide during cultivation of the microalga *Botryococcus braunii*", Biotechnol Lett, 11: 433-436.

[51] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. Ve Isambert, A., (2006). "Commercial applications of microalgae", J. Biosci Bioeng, 101: 87-96.

[52] Milledge, J.J., (2011). "Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review", Rev. Environ Sci Biotechnol, 10: 31-41.

[53] Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A. ve Ibáñez, E., (2009). "Innovative natural functional ingredients from microalgae", Agricultural Food Chemical, 57: 7159-7170.

[54] Ranga Rao, A., Raghunath Reddy, R.L., Baskaran, V., Sarada, R. ve Ravishankar, G.A., (2010). "Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model", Agricultural Food Chemical, 58: 8553-8559.

[55] Becker, E.W., (2007). “Microalgae in human and animal nutrition”, In: A Richmond (editor), Hand book of micro algal culture, Blackwell, Oxford, UK, 312-351.

[56] Lizzul, A.M., Hellier, P., Purton, S., Baganz, F., Ladommatos, N. ve Campos, L., (2014). “Combined remediation and lipid production using Chlorella sorokiniana grown on wastewater and exhaust gases”, Bioresource Technology, 151: 12–18.

[57] Tingting, Li., Mahmoud, G., Feng, J., Park, J.J., Gao, D., Miao, C., Dong, T., Gang, D.R. ve Chen, S., (2015). “Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga Chlorella sorokiniana”, Bioresource Technology, 180: 250–257.

[58] Juntila, D.J., Bautista, M.A. ve Monotilla, W., (2015). “Biomass and lipid production of a local isolate Chlorella sorokiniana under mixotrophic growth conditions”, Bioresource Technology, 191: 395–398.

[59] Turon, V., Trably, E., Fouilland, E. ve Steyer, J-P., (2015). “Growth of Chlorella sorokiniana on a mixture of volatile fatty acids: The effects of light and temperature”, Bioresource Technology, 198: 852–860.

[60] Chader S., Mahmah, B., Chetehouna, K. ve Mignolet, E., (2011). “Biodiesel production using Chlorella sorokiniana a green microalga”, Revue des Energies Renouvelables, 14: 21 – 26.

[61] Kho, C.-H., Kan, S.-C., Chang, C-Y., Cheng, H.-Y., Lin, C-C., Chiou, P-C., Shieh, C-J. ve Liu, Y-C., (2016). “Analysis of exopolysaccharide production patterns of Cordyceps militaris under various light-emitting diodes”, Biochemical Engineering Journal, 112: 226-232.

[62] Sukatar, A., (2002). “Alg Kültür Yöntemleri”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, İzmir.

[63] Chowdhury, S.R., Manna, S., Saha, P., Basak, R.K., Sen, R., Roy, D. ve Adhikari, B., (2011). “Composition analysis and material characterization of an emulsifying extracellular polysaccharide (EPS) produced by Bacillus megaterium RB-05: a hydrodynamic sediment- attached isolate of freshwater origin”, Journal of Applied Microbiology ISSN, 1364-5072.

[64] Nielsen, S.S., (2003). “Food analysis laboratory manual”, Fourth Edition, Purdue University West Lafayette, IN, USA.

[65] Ördög, V., Staden, J., Stirk, W. ve Lovasz, C., (2012). “Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures”, Journal of APplied Phycology, 24: 907-914.

[66] Khattar, J.I.S. ve Singh, D.P., (2013). “Optimization, characterization, and flow properties of exopolysaccharides produced by cyanobacterium *Lyngbya stagnina”,* Journal of Basic Microbiology, 53: 902-912.

[67] Vijayabaskar, P., Babinastarlin, S., Shankar, T., Sivakumar, T. ve Anandapandian, K.T.K., (2011). Quantification and Characterization of Exopolysaccharides from *Bacillus subtilis,* Advances in Biological Research, 5: 71-76.

[68] Shuhong, Y., Meiping, Z., Hong, Y., Han, W. ve Shan, X., (2014). "Biosorption of Cu^{+2}, Pb^{+2} and Cr^{+6} by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter* ps-5", Carbohydrate Polymers, 101: 50-56.

[69] Dilna, S. V., Surya, H., Aswaty, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D.N., Pandey, A. ve Nampoothiri, K. M., (2015). "Characterization of an exopolysaccharide with potential health benefit propertiesfrom a probiotic *Lactobacillus plantarum",* Food Science and Technology, 64: 1179-1186.

[70] Pirinç, P., (2014). "Bazı Deniz Mikroalglerinin Kültüründe Işık ve Tuzluluk Konsantrasyonunun Büyüme ve Biyokimyasal Yapısına Etkisinin Araştırılması", Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yeteriştiricilik Anabilim Dalı, İzmir.

[71] Bridgwater, A. ve Peacocke, G., (2000). "Fast pyrolysis process for biomass", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 4: 1-73.

[72] SKOOG, DA. ve LEARY, JJ., (1992). "Principles of Instrumental Analysis", Fourth Edition, Saunders College Publishing, New York.

[73] JANG, BN. ve WILKIE, CA., (2005). "The thermal degradation of polystyrene nanocomposite",Polymer, 46: 2933-2942.

[74] WENDLANDT, WW., (1964). "Thermal Methods of Analysis", Wiley-Interscience, New York.

[75] Zhang, J., Cao, Y., Wang, J., Guo, X., Zheng, Y., Zhao, W., Mei, X. ve Guo, T., Yang, Z., (2016). "Physicochemical characteristics and bioactivities of the exopolysaccharide and its sulphated polymer from Streptococcus thermophilus GST-6", Carbohydrate Polymers, 146: 368–375.

[76] Coutteau, P., Lavens, P. ve Sorgeloos, P. (1996). "Manual on the production and use of live food for aquaculture", FAO Fisheries Technical Paper 361. FAO, Rome, 7-48.

[77] Asulabh K.S., Supriya, G. ve Ramachandra, T.V., (2012). "Effect of Salinity Concentrations on Growth Rate and Lipid Concentration in Microcystis Sp., Chlorococcum sp. and Chaetoceros sp.", LAKE: National Conference on Conservation and Management of Wetland Ecosystems, School of Environmental Sciences Mahatma Gandhi University, 6-9 November 2012, Kottayam, Kerala.

[78] Balcı, M., Çelekli, A., Deveci, A. ve Eyüboğlu, F., (2006). "Scenedesmus obliquua türünün gelişimine, klorofil-a ve protein üretim kapasitesine pH, nitrat ve fosfat konsantrasyonlarının etkisi", Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Türkiye.

EK-A

BOX BEHNKEN TASARIM MATRİSİ

A-1 *Chlorella Sorokiniana* mikroalgiden üretilen EPS miktarları için Box Behnken tasarım matrisi

Deney No	X_N	X_C	X_T	Üretilen ekzopolisakkarit miktarı
1	-1	-1	0	281,565 μg/ml
2	0	-1	1	59,3 μg/ml
3	-1	0	1	67,85 μg/ml
4	-1	0	-1	261,048 μg/ml
5	1	-1	0	192,503 μg/ml
6	0	1	-1	242,241 μg/ml
7	1	0	1	138,103 μg/ml
8	0	1	1	95,826 μg/ml
9	1	0	-1	222,191 μg/ml
10	1	1	0	212,709 μg/ml
11	-1	1	0	195,612 μg/ml
12	0	-1	-1	315,915 μg/ml
13	0	0	0	141,367 μg/ml
14	0	0	0	140,568 μg/ml
15	0	0	0	142,107 μg/ml

A-2 *Botrycoccus braunii* mikroalgiden üretilen EPS miktarları için Box Behnken tasarım matrisi

Deney No	X_N	X_C	X_T	Üretilen ekzopolisakkarit miktarı
1	-1	-1	0	131,01 μg/ml
2	0	-1	1	101,186 μg/ml
3	-1	0	1	127,64 μg/ml
4	-1	0	-1	46,6 μg/ml
5	1	-1	0	163,85 μg/ml
6	0	1	-1	71,8 μg/ml
7	1	0	1	52,8 μg/ml
8	0	1	1	74 μg/ml
9	1	0	-1	98,5 μg/ml
10	1	1	0	62 μg/ml
11	-1	1	0	80,2 μg/ml
12	0	-1	-1	196 μg/ml
13	0	0	0	44,83 μg/ml
14	0	0	0	45,03 μg/ml
15	0	0	0	44,65 μg/ml

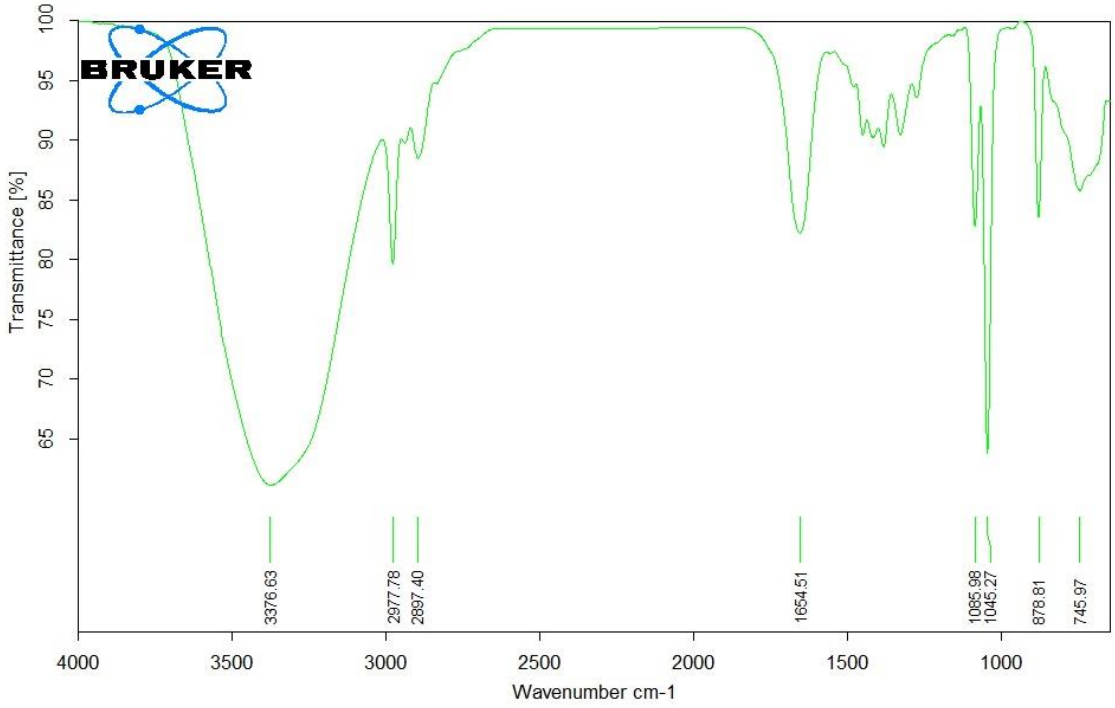
A-3 *Chlorella minutissima* mikroalgiden üretilen EPS miktarları için Box Behnken tasarım matrisi

Deney No	X_N	X_C	X_T	Üretilen ekzopolisakkarit miktarı
1	-1	-1	0	272,89 μg/ml
2	0	-1	1	69,83 μg/ml
3	-1	0	1	345,53 μg/ml
4	-1	0	-1	209,32 μg/ml
5	1	-1	0	281,08 μg/ml
6	0	1	-1	195,7 μg/ml
7	1	0	1	280,83 μg/ml
8	0	1	1	185,11 μg/ml
9	1	0	-1	320,08 μg/ml
10	1	1	0	198,6 μg/ml
11	-1	1	0	87,5 μg/ml
12	0	-1	-1	380,08 μg/ml
13	0	0	0	175,65 μg/ml
14	0	0	0	174, 568 μg/ml
15	0	0	0	176,107 μg/ml

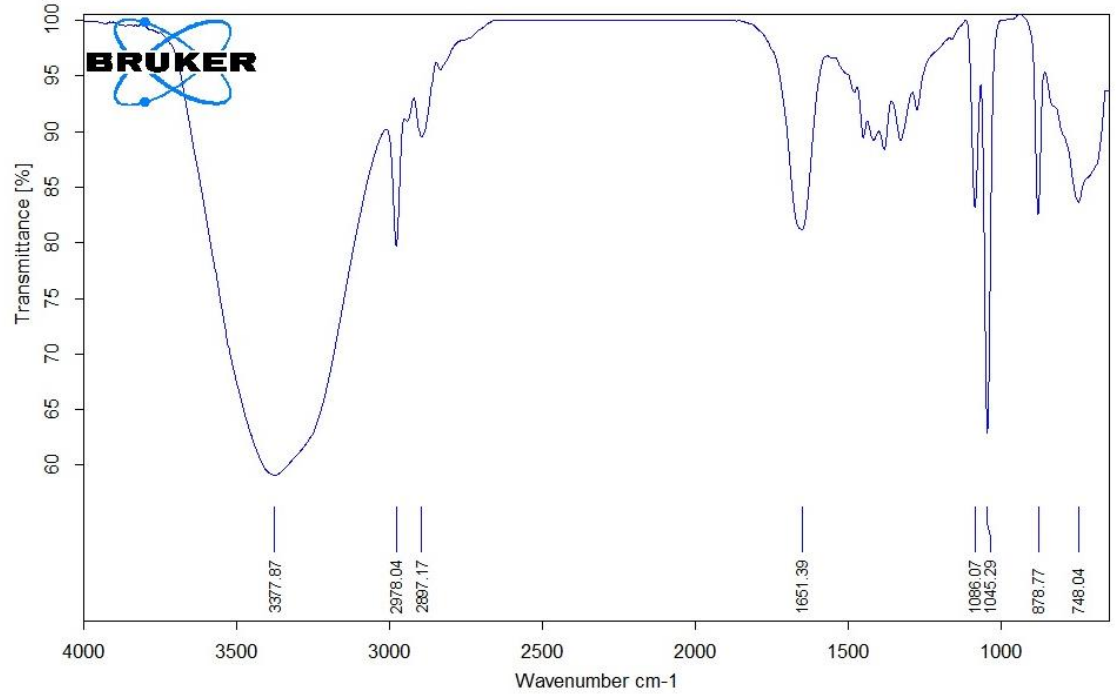
EK-B

FTIR SPEKTRUMU

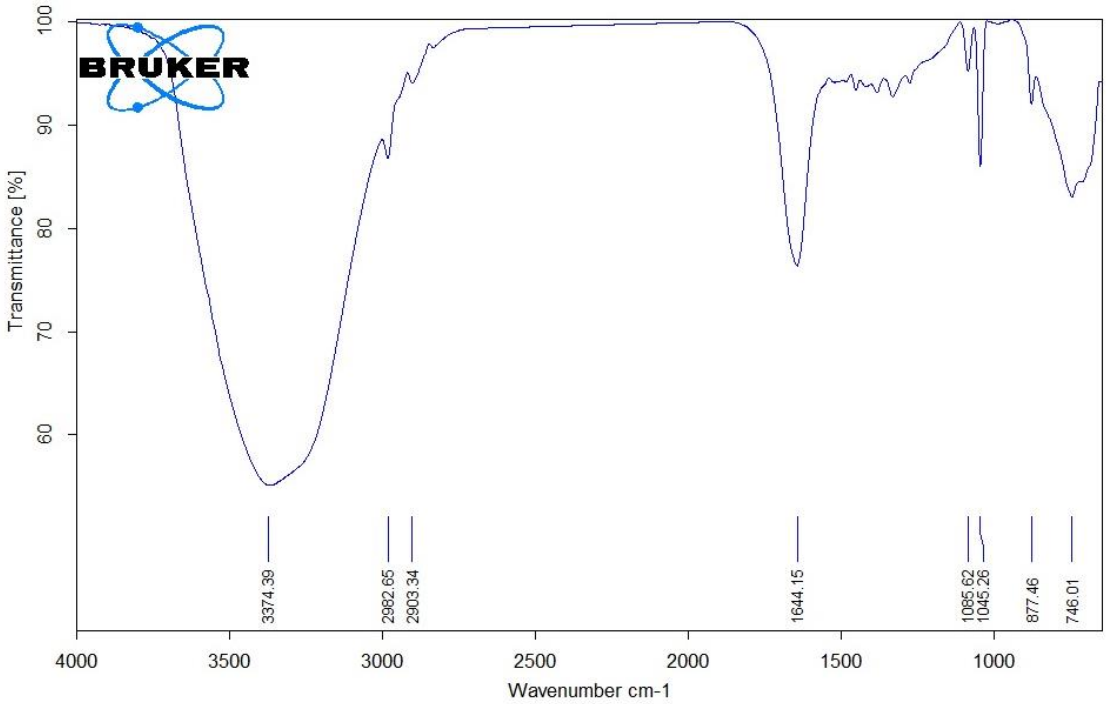
B-1 *Chlorella sorokiniana* mikroalginden üretilen EPS' nin FTIR spektrumu



B-2 *Botrycoccus braunii* mikroalginden üretilen EPS' nin FTIR spektrumu



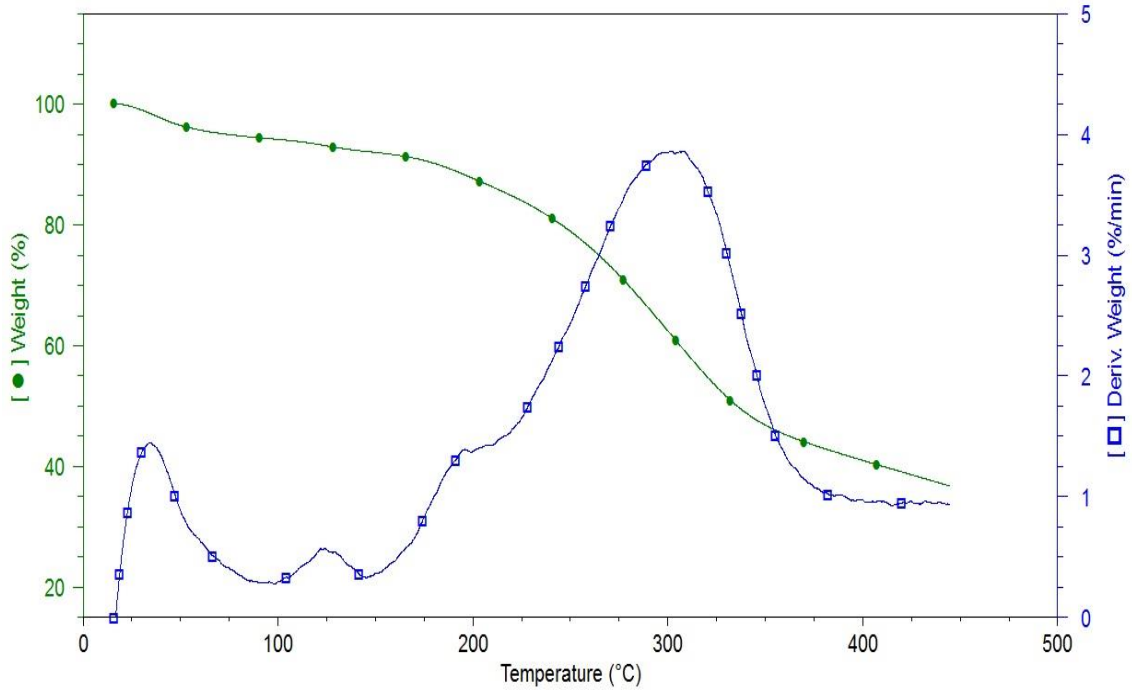
B-3 *Chlorella minutissima* mikroalginden üretilen EPS' nin FTIR spektrumu



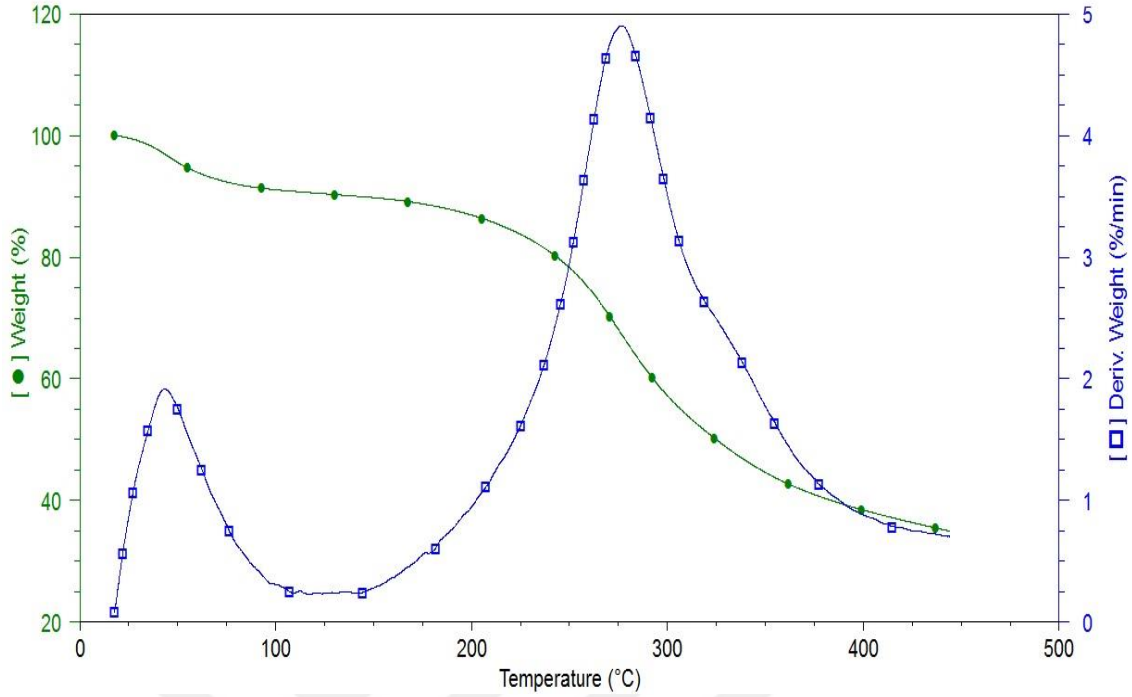
EK-C

TG-DTG GRAFİKLERİ

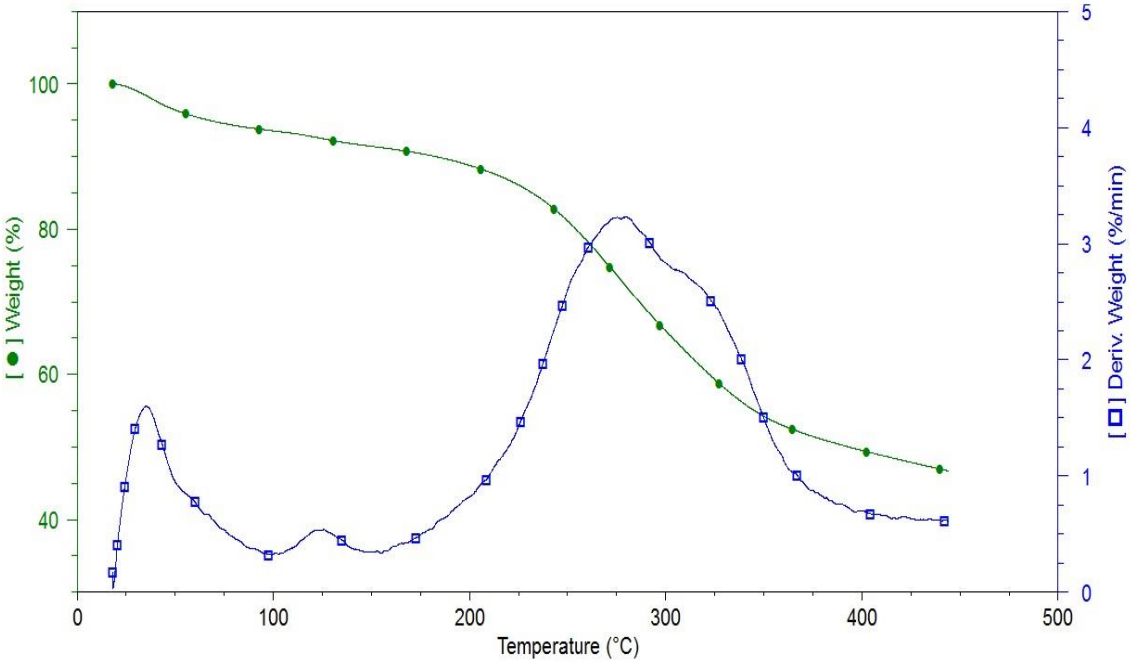
C-1 *Chlorella sorokiniana* mikroalginden üretilen EPS' nin TG-DTG grafikleri



C-2 *Botrycoccus braunii* mikroalginden üretilen EPS' nin TG-DTG grafikleri



C-3 *Chlorella minutissima* mikroalginden üretilen EPS' nin TG-DTG grafikleri



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sedef KAPTAN

Doğum Tarihi ve Yeri : 22.02.1990

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : sedefkaptan@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2014
Lise	Sayısal	Selimpaşa Atatürk Lisesi	2008

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2012	Memorial Hastanesi Genetik ve Tüp Bebek Merkezi	Stajyer
2013	Bilim İlaç San. Ve Tic. A.Ş.	Stajyer

YAYINLARI

Bildiri

1. Kaptan S., Koçer A.T., Özçimen D., Yılmaz M.T., Novel Exopolysaccharide (EPS) Source: Microalgae, ICENS International Conference on Engineering and Natural Science, Sarajevo-Bosnia-Herzegovina, May 24-28 2016

Proje

1. Mikroalgal ekzopolisakkaritlerin sütlü tatlılar endüstrisinde kullanımı ve biyoaktif, reolojik ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi, TAGEM, No: TAGEM/15/AR-GE/35 2016-2017, Görevi: Araştırmacı