T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KARBON VE AZOT KAYNAKLARININ *Dunaliella salina* MİKROALGİNİN MİKSOTROFİK BÜYÜMESİNE ETKİSİ

Meltem FIÇICIOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Didem BALKANLI

Ocak, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KARBON VE AZOT KAYNAKLARININ *Dunaliella salina* MİKROALGİNİN MİKSOTROFİK BÜYÜMESİNE ETKİSİ

Meltem FIÇICIOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 24.01.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Didem BALKANLI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Didem BALKANLI, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Fatma GÜLEN İSKENDER, Üye

İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Benan İNAN, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Didem BALKANLI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının *Dunaliella salina* Mikroalginin Miksotrofik Büyümesine Etkisi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Meltem FIÇICIOĞLU

İmza

Canım aileme…

TEŞEKKÜR

Tez çalışması sırasında her türlü yardım ve kolaylığı esirgemeyen fikir ve düşünceleriyle yol gösteren değerli Hocam Prof. Dr. Didem BALKANLI'ya,

Çalışma süresince her zaman büyük destek ve teşviklerini gördüğüm kıymetli arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Fatma Nur DEMİRBAŞ'a,

Bu tez çalışmasında deneylerimi gerçekleştirmem için laboratuvar imkanlarını sunan Nuvita İlaç ve Kimya San. Tic. A.Ş'ye

Manevi ve maddi destekleriyle hayatım boyunca yanımda olan aileme sonsuz teşekkürler.

Meltem FIÇICIOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR v
SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ x
TABLO LİSTESİ xii
ÖZET xiii
ABSTRACT xv
1 GİRİŞ 17
1.1 Literatür Özeti 17
1.2 Tezin Amacı 19
1.3 Orijinal Katkı 19
2 KAYNAK ÖZETLERİ 20
2.1 *Dunaliella salina*'nın Sistematikteki Yeri 20
2.2 *Dunaliella salina* Biyolojisi 20
2.3 *Dunaliella salina* Ekolojisi 22
2.4 *Dunaliella salina* Büyümesini Etkileyen Besin Ortamı Faktörleri 22
2.5 *Dunaliella salina*'dan β-karoten Üretimi 24
2.6 Mikroalgal Biyokütle Üretimi 26
2.6.1 Fototrofik Üretim 26
2.6.2 Heterotrofik Üretim 26
2.6.3 Miksotrofik Üretim 27
3 MATERYAL VE YÖNTEM 28
3.1 Materyal 28
3.1.1 Mikroalg 28
3.1.2 Kültür Ortamları 28
3.1.3 Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar 29
3.1.4 Kullanılan Kimyasallar 29
3.2 Yöntem 30
3.2.1 *Dunaliella salina* Kültürlerinin Yetiştirilmesi 30
3.2.2 Farklı Organik Karbon Kaynaklarında *Dunaliella salina* Türlerinin Yetiştirilmesi 30
3.2.3 Farklı Azot Kaynaklarında *Dunaliella salina* Türlerinin Yetiştirilmesi 34

3.2.4 Tuz Gölü'nden İzole Edilen *Dunaliella sp.* Türünün Farklı Karbon/Azot Oranlarında Yetiştirilmesi 36
3.2.5 Tuz Gölü'nden İzole Edilen *Dunaliella* sp. Türünün Stres Koşullarında β-karoten Birikimi 37
4 BULGULAR VE TARTIŞMA **39**
4.1 Bulgular 39
4.1.1 AS100 Besin Ortamında *Dunaliella Salina* Kültürlerinin Yetiştirilmesi 39
4.1.2 Farklı Karbon Kaynaklarının *Dunaliella salina* Kültürlerinin Büyümesi Üzerine Etkisi 42
4.1.3 Farklı Azot Kaynaklarının *Dunaliella salina* Kültürlerinin Büyümesi Üzerine Etkisi 56
4.1.4 Farklı Karbon/Azot Oranları İçeren Besin Ortamının Tuz Gölü'nden İzole Edilen *Dunaliella sp.* Türünün Büyümesi Üzerine Etkisi 64
4.1.5 Tuz Gölü'nden İzole Edilen *Dunaliella sp.* Türünün Stres Koşullarında β-Karoten Birikimi 66
4.2 Tartışma 69
5 SONUÇ **76**
KAYNAKÇA **77**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **85**

SİMGE LİSTESİ

atm	Atmosfer basıncı
β	Beta
dk	Dakika
ln	Doğal Logaritma
g	Gram
l	Litre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
ml	Milimetre
mm	Milimetre
M	Molar
nm	Nanometre
sn	Saniye
℃	Santigrat Derece
μ	Spesifik Büyüme Hızı
W	Watt
%	Yüzde Değer

KISALTMA LİSTESİ

CCAP	Alg ve Protozoa Kültür Koleksiyonu
Ark.	Arkadaşları
B12	Kobalamin
OD	Optik Yoğunluk
pH	Potansiyel Hidrojen
UV	Ultraviyole
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 *Dunaliella* türlerinin yapısı [a] büyüme evresindeki hücre yapısı, [b] karotenogenez evresinin hücre yapısı, [c] büyüme evresindeki *Dunaliella* türlerinin hücresel yapısı, [d] karoten sentezi evresindeki *Dunaliella* türlerinin hücresel yapısı ve [e] *Dunaliella salina*'nın üst yapısı (Goswami ve ark., 2022) **24**

Şekil 4.1 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türüne ait AS100 besin ortamında büyüme grafiği **39**

Şekil 4.2 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 hücreleri mikroskop görüntüsü **40**

Şekil 4.3 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türüne ait AS100 besin ortamında büyüme grafiği **40**

Şekil 4.4 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 hücreleri mikroskop görüntüsü **40**

Şekil 4.5 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türüne ait AS100 besin ortamında büyüme grafiği **41**

Şekil 4.6 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 hücreleri mikroskop görüntüsü **41**

Şekil 4.7 *Dunaliella sp.* türüne ait AS100 besin ortamında büyüme grafiği **42**

Şekil 4.8 *Dunaliella sp* hücreleri mikroskop görüntüsü **42**

Şekil 4.9 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği **43**

Şekil 4.10 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Optik Yoğunluk – Zaman Grafiği **43**

Şekil 4.11 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü pH – Zaman Grafiği **44**

Şekil 4.12 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği **45**

Şekil 4.13 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği **45**

Şekil 4.14 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü pH – Zaman Grafiği **45**

Şekil 4.15 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği **46**

Şekil 4.16 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği **47**

Şekil 4.17 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü pH – Zaman Grafiği **47**

Şekil 4.18 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği **48**

Şekil 4.19 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği **48**

Şekil 4.20 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü pH – Zaman Grafiği **48**

Şekil 4.21 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği **50**

Şekil 4.22 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği **50**

Şekil 4.23 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü pH – Zaman Grafiği **50**

Şekil 4.24 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği **51**

Şekil 4.25 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği **51**

Şekil 4.26 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü pH – Zaman Grafiği..... **52**
Şekil 4.27 *Dunaliella sp.* türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği **53**
Şekil 4.28 *Dunaliella sp.* türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği..... **53**
Şekil 4.29 *Dunaliella sp.* türü pH – Zaman Grafiği **53**
Şekil 4.30 *Dunaliella sp.* türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği **54**
Şekil 4.31 *Dunaliella sp.* türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği..... **55**
Şekil 4.32 *Dunaliella sp.* türü pH – Zaman Grafiği **55**
Şekil 4.33 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği..... **56**
Şekil 4.34 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği **57**
Şekil 4.35 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü pH – Zaman Grafiği..... **57**
Şekil 4.36 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği..... **58**
Şekil 4.37 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği **59**
Şekil 4.38 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü pH – Zaman Grafiği..... **59**
Şekil 4.39 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği..... **60**
Şekil 4.40 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği **61**
Şekil 4.41 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü pH – Zaman Grafiği..... **61**
Şekil 4.42 *Dunaliella sp.* türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği **62**
Şekil 4.43 *Dunaliella sp.* türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği..... **63**
Şekil 4.44 *Dunaliella sp.* türü pH – Zaman Grafiği **63**
Şekil 4.45 *Dunaliella sp.* Farklı Karbon/Azot Oranı Çalışması Hücre sayısı – Zaman Grafiği..... **65**
Şekil 4.46 *Dunaliella sp.* Farklı Karbon/Azot Oranı Çalışması Optik Yoğunluk (OD680nm) – Zaman Grafiği **65**
Şekil 4.47 *Dunaliella sp.* Farklı Karbon/Azot Oranı Çalışması pH – Zaman Grafiği **65**
Şekil 4.48 *Dunaliella sp.* stres koşulları çalışması başlangıç görüntüleri **66**
Şekil 4.49 *Dunaliella sp.* stres koşulları çalışması son gün görüntüleri..... **67**
Şekil 4.50 *Dunaliella sp.* stres koşulları hücre görüntüleri **67**
Şekil 4.51 *Dunaliella sp.* Stres Koşulları Hücre sayısı – Zaman Grafiği..... **67**
Şekil 4.52 *Dunaliella sp.* Stres Koşulları Optik Yoğunluk (OD680nm) – Zaman Grafiği..... **68**
Şekil 4.53 *Dunaliella sp.* Stres Koşulları pH – Zaman Grafiği..... **68**
Şekil 4.54 *Dunaliella sp.* Stres Koşullarında β-karoten Birikimi – Zaman Grafiği **69**

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 AS100 Besin Ortamı İçeriği **28**

Tablo 3.2 P-I Metal Çözeltisi İçeriği **28**

Tablo 3.3 Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar **29**

Tablo 3.4 Design-Expert programı ile oluşturulan organik karbon kaynağı çalışması 1.deneme planı **32**

Tablo 3.5 Design-Expert programı ile oluşturulan organik karbon kaynağı çalışması 2.deneme planı **33**

Tablo 3.6 Design-Expert programı ile oluşturulan azot kaynağı çalışması deneme planı **35**

Tablo 3.7 Karbon / Azot oranı deneme planı **37**

Tablo 3.8 Design-Expert programı ile oluşturulan besin stresi deneme planı **38**

Tablo 4.1 Her formülasyon için günlük βeta-karoten miktarı sonucu (ppm) **68**

ÖZET

Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının *Dunaliella salina* Mikroalginin Miksotrofik Büyümesine Etkisi

Meltem FIÇICIOĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Didem BALKANLI

Dunaliella türleri tek hücreli, fotosentetik ve hareketli biflagellat mikroalglerdir ve morfolojik olarak sert bir hücre duvarının olmamasıyla ayırt edilirler. En iyi bilinen *Dunaliella* türlerinden biri olan *Dunaliella salina*, β-karoten, gliserol ve yağ asitleri bakımından zengin, özellikle tuzlu sularda ve tuz göllerinde dağılım gösteren bir alg türüdür. Bu çalışmada, 4 farklı *Dunaliella salina* suşunun büyüme kinetiği, fototrofik ve heterotrofik büyümeyi birleştiren miksotrofik bir büyüme ortamında karşılaştırılmıştır. Miksotrofik yetiştiricilik, büyük bir biyokütle ve yüksek biyokimyasal içerik elde etme avantajı sağlayarak fototrofik veya heterotrofik büyümenin getirdiği sorunların üstesinden gelmek için yararlıdır. Bu çalışmada, 3 farklı ticari tür olan *Dunaliella salina* CCAP 19/20, CCAP 19/25 ve CCAP 19/31 ile Tuz Gölü'nden izole edilen yerli bir türün büyümesi karşılaştırılmıştır. Karbon kaynağı olarak beş farklı organik karbon kaynağı kullanılmıştır: glukoz, gliserol, asetik asit, sodyum bikarbonat, sodyum asetat. Azot kaynağı olarak ise sodyum nitrat, üre, amonyum nitrat ve amonyum sülfat kullanılmıştır. Çalışma sonucunda Tuz Gölü'nden izole edilen suş, 16,66 $g.L^{-1}$ glukoz, 16,66 $g.L^{-1}$ gliserol ve 66,66

$g.L^{-1}$ asetik asit organik karbon içeren miksotrofik koşullarda ototrofik besi ortamına kıyasla daha yüksek hücre sayısına ulaşmıştır. Ancak, organik karbon içeren miksotrofik koşullar altında ticari suşlarda büyüme gözlenmemiştir. Sadece azot kaynağı olarak sodyum nitrat kullanıldığında tüm suşlarda büyüme gözlenmiştir. Tuz Gölü'nden izole edilen suşun miksotrofik üretim için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Dunaliella salina*, mikroalg, miksotrofik kültür

ABSTRACT

Effect of Different Carbon and Nitrojen Sources on Mixotrophic Growth of *Dunaliella salina* Microalgae

Meltem FIÇICIĞLU

Department of Bioengineering

Master of Science

Supervisor: Prof. Dr. Didem BALKANLI

Dunaliella species are unicellular, photosynthetic and motile biflagellate microalgae, morphologically distinguished by the absence of a rigid cell wall. *Dunaliella salina*, one of the best known *Dunaliella* species, is an algal species rich in β-carotene, glycerol and fatty acids, especially distributed in salty waters and salt lakes. In this study, the growth kinetics of 4 different *Dunaliella salina* strains were compared in a mixotrophic growth medium combining phototrophic and heterotrophic growth. Mixotrophic cultivation is useful to overcome the problems imposed by phototrophic or heterotrophic growth by providing the advantage of obtaining a large biomass and high biochemical content. In this study, the growth of 3 different commercial species *Dunaliella salina* CCAP 19/20, CCAP 19/25 and CCAP 19/31 was compared with that of a native species isolated from Tuz Gölü. Five different organic carbon sources were used as carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, sodium bicarbonate, sodium acetate. Sodium nitrate, urea, ammonium nitrate and ammonium sulfate were used as nitrogen sources. As a result

of the study, the strain isolated from Tuz Gölü reached higher cell numbers in mixotrophic conditions containing 16.66 $g.L^{-1}$ glucose, 16.66 $g.L^{-1}$ glycerol and 66.66 $g.L^{-1}$ acetic acid organic carbon compared to autotrophic nutrient media. However, no growth was observed in commercial strains under mixotrophic conditions containing organic carbon. Growth was observed in all strains only when sodium nitrate was used as nitrogen source. It was concluded that the strain isolated from Tuz Gölü was more suitable for mixotrophic production.

Keywords: *Dunaliella salina*, microalgae, mixotrophic culture

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Yeşil halofilik mikroalg *Dunaliella salina*, yüksek tuzluluk, ışık, sıcaklık ve pH koşullarına karşı geniş toleransının yanı sıra karotenoidler, gliserol, lipidler gibi biyolojik olarak aktif bileşikleri yüksek düzeyde üretebilme kapasitesi nedeniyle yaygın olarak bilinen ve ilgi çekici bir türdür (Oren, 2005; Ben-Amotz, Polle, & Rao, 2009). *Dunaliella* hücreleri stres koşulları altında kuru ağırlığının %14'üne varan miktarlarda β-karoten biriktirebilir. *Dunaliella* hücrelerinden elde edilen β-karoten, A vitamininin öncüsü niteliğindedir ve antioksidan etki göstermektedir. Bunun yanı sıra renklendirici, anti-tümör ajanı ve kalp hastalıklarını önleyici özellikleri bulunmaktadır (Amotz & Avron, 1990). Bu nedenle *Dunaliella* biyokütlesi hayvancılık, su ürünleri yetiştiriciliği, gıda katkı maddeleri üretimi, gıda, ilaç ve kozmetik sektörlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Borowitzka, 2013; Sathasivam & Ki, 2018).

Dunaliella türlerinden β-karoten elde edilmek üzere yetiştirilmesiyle ilgili hem laboratuvar hem de büyük ölçekli çalışmaların sonuçlarına dayanarak, iki aşamalı yetiştiricilik sisteminin başarılı olduğu kanıtlanmış ve ticari üreticiler tarafından uygulanan yaygın bir yöntem olmuştur (Amotz, 1995). Bu tür iki aşamalı sistemde, ilk aşama olan "yeşil faz" optimum büyüme koşullarıyla yüksek büyüme hızının sürdürülmesi ve biyokütle seviyesinin artmasını sağlamaktadır. Ardından ikinci aşama olan "kırmızı faz" yüksek ışık yoğunluğu, yüksek ışık şiddeti, mineral ve besin sınırlaması gibi gelişmiş stres koşullarıyla β-karoten üretimi olan karotenogenezi teşvik etmektir (Borovkov, ve ark, 2019).

Mikroalg biyokütlesinin ticari üretiminde, aşağı akış işleme maliyetini azaltmak için yüksek hücre yoğunluklu kültür arzu edilir ancak β-karoten birikimini destekleyen stres koşulları altında hücre çoğalması sınırlanmaktadır bu yüzden yüksek yoğunluklu *Dunaliella* biyokütlesine ulaşmak mümkün değildir. Bu problemi aşmak için iki aşamalı yetiştirme yöntemi uygulanmaktadır (Prieto, Canavate , & García-González, 2011).

İki aşamalı kültür tekniğinde, ilk aşama olan "yeşil faz" biyokütle verimliliğini artırmak için besin ortamına ek karbon kaynağı kullanılması yaygın bir yöntemdir. Mikroalglerin çoğu zorunlu ototrofik organizmalar olarak bilinmesine rağmen, bazı türler hücre büyümesi ve çoğalması için organik karbonu besin kaynağı olarak kullanabilmektedir. Karbondioksit ile beslemeye ek olarak organik karbon ve farklı tür enerji kaynağı içeren maddelerin kullanılması yüksek yoğunlukta biyokütle elde edilmesi ile sonuçlanmaktadır.

Fotoototrofik büyüme, mikroalglerin güneş ışığından aldığı enerji ile atmosferik karbondioksiti biyokütleye dönüştürebildiğini ifade eder. Bununla birlikte, fotoototrofik büyüme yavaş hücre büyümesi sebebiyle uzun hasat süreci, düşük biyokütle ve daha yüksek hasat maliyeti sağlar. Fotoototrofik büyümenin sahip olduğu başlıca sınırlamalar, organik karbon kaynakları kullanılarak mikroalg yetiştirmeyi ifade eden heterotrofik üretim ile aşılmaktadır. Heterotrofik büyüme, fotootrofik büyümedeki ışık enerjisinin yerini alan şekerler ve organik asitlerle desteklenmiştir (Huang ve ark., 2010). Glikoz (Liang Y.N. ve ark., 2009) (Hongjin Q. & Guangce, 2009; Wan ve ark., 2011), sodyum asetat (Hongjin Q. & Guangce , 2009; Ratledge ve ark., 2001) ve sodyum bikarbonat (Yeh ve ark., 2010) mikroalglerin heterotrofik üretimi için kullanılan yaygın bilinen karbon kaynaklarıdır. Heterotrofik üretim şekli ışığın gerekliliğinin kalmaması, iyi kontrollü bir yetiştirme, yüksek yoğunlukta biyokütle verimi ve hücrelerde yüksek aktif bileşik içeriği gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Miao & Wu , 2006; Lee & Lee, 2002).

Buna karşılık, miksotrofik üretim hem organik karbon kaynaklarının hem de inorganik karbon kaynağı olan karbondioksitin aynı anda kullanılması ve ışığın ana enerji kaynağı olduğu bir yetiştirme anlamına gelir. Bu nedenle, miksotrofik yetiştirme, yüksek biyokütle verimliliği ve zengin biyokimyasal içerik elde etmek için iyi bir üretim yönetimidir (Lee & Lee, 2002). Mikroalgler tarafından metabolik solunum süreci sırasında salınan karbondioksitin fototrofik yetiştirme ile tutulup yeniden kullanılması gibi ek avantajları da vardır (Mata ve ark., 2010).

Son yıllardaki çalışmalara bakıldığında iki aşamalı kültür tekniğinde yüksek yoğunlukta biyokütle verimliliği elde etmek için ilk aşama olan "yeşil faz" da miksotrofik üretim tekniği uygulanarak, stres koşulları altında daha fazla biyokimyasal elde edilmesine yönelik deneyler görülmektedir. Işık enerjisi ile

birlikte farklı organik karbon kaynakları, farklı karbon/azot oranları ile uygulanmakta ve biyokütle verimine etkisi karşılaştırılmaktadır (Chen, Lu, Nagarajan, & Chan, 2018; Gim, ve ark., 2013; Gim ve ark., 2015).

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, miksotrofik koşullar altında *Dunaliella salina* CCAP 19/20, CCAP 19/25, CCAP 19/31 ve Türkiye'deki Tuz Gölü'nden izole edilen *Dunaliella sp.* olmak üzere dört farklı *Dunaliella* türünün mikroalgal büyümesi karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda β-karoten üretimi için 2 aşamalı üretimin ilk aşaması olan yeşil fazda miksotrofik koşullar altında maksimum büyümenin elde edildiği *Dunaliella* türünün belirlenmesi amaçlanmaktadır.

1.3 Orijinal Katkı

Literatürde, miksotrofik kültür koşulları altında farklı *Dunaliella* türlerinin biyokütle üretimi karşılaştırılmasına rastlanmamıştır. Bu bakımdan çalışmanın literatüre orijinal katkı yapacağı öngörülmektedir.

2
KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Dunaliella salina*'nın Sistematikteki Yeri

Dunaliella türleri, Chlorophyta filumuna aittir, Volvocales takımına ve Polyblepharidaceae familyasında yer alan fotosentetik, tek hücreli ve hareketli biflagellat mikroalglerdir (Ben-Amotz & Avron, 1987). Alg ilk olarak 1838 yılında Dunal tarafından *Haematococcus salinus* olarak tanımlanmıştır (Nguyen ve ark., 2014). *Dunaliella* adı, bu cinsin *Haematococcus*'tan farklı olduğunu gösteren Teodoresco tarafından Dunal onuruna *Dunaliella salina* olarak verilmiştir (Oren, 2006). *Dunaliella salina*'nın tanımlanmasından bu yana birçok farklı türü keşfedilmiştir ve şu anda rapor edilmiş 23 farklı *Dunaliella* türü bulunmaktadır (Borowitzka & Siva, 2007). En iyi bilinen tür halotolerant *Dunaliella salina*'dır (Rad ve ark., 2011).

2.2 *Dunaliella salina* Biyolojisi

Dunaliella hücreleri küresel, oval, fusiform, piriform veya elipsoid gibi çeşitli formlarda olabilir. Büyüklükleri 5 ila 25 µm ve genişliği 3 ila 13 µm arasındadır. Ayrıca hücre yapısında tek bir fincan şeklinde kloroplast bulunur. Bu kloroplast genellikle nişasta granülleri ile çevrili merkezi bir pirenoide sahiptir (Ben-Amotz, 1980). *Dunaliella* hücrelerinde, hücre zarına bağlı çekirdek, vakuoller, golgi aygıtı, mitokondri ve bir göz beneği gibi yeşil alglere özgü başka organeller bulunur (Ben-Amotz & Avron, 1989a). Hücre elastik bir plazma zarı ile çevrilidir ve bu zar bir mukus yüzey kaplaması ile kaplanmıştır. *Dunaliella* hücreleri morfolojik olarak sert bir hücre duvarının olmamasıyla ayırt edilirler (Ben-Amotz & Avron, 1987). Bu ayırt edici özellik, hücrelere, hipertonik ve hipotonik koşullara maruz kaldığında hızla küçülme veya şişme yeteneği kazandırmıştır (Ben-Amotz & Avron, 1990; Ben-Amotz A., 1993).

Hücreler, değişen koşullarla şekil değiştirebilir, genellikle elverişsiz koşullar altında küresel hale gelebilir. Hücre boyutu ayrıca büyüme koşulları ve ışık yoğunluğuna göre değişir (Massyuk, 1973). Halotoleransı nedeniyle *Dunaliella*,

diğer alglerin ve avcıların büyümesini engellediği için seçici bir kriter oluşturan aşırı tuzluluklar altında gelişme yeteneğine sahiptir (Park ve ark., 2013).

Dunaliella ayrıca 0°C'nin altından 40°C'nin üstüne kadar geniş bir sıcaklık aralığında yetiştirilebilir. Optimum büyüme sıcaklığı ışık yoğunluğuna ve suşa bağlıdır. Ayrıca, optimum büyüme aralığı pH 7 ile 9'dur (Borowitzka M.A. & Borowitzka , 1989).

Dunaliela salina hücrelerinin β-karoten ve gliserol açısından zengin alg kaynağı olduğu açıklanmıştır (Mousav ve ark., 2016). *Dunaliella* hücrelerinin hücre içi gliserol konsantrasyonunu değiştirme yeteneğinin, geniş tuz konsantrasyonu aralığına uyum sağlayabildiği mekanizmanın temeli olduğu gösterilmiştir (Jin ve ark., 2003a; Pulz & Gross, 2004). *Dunaliella salina* türü yüksek tuz konsantrasyonunda büyüdüğünde, hücre içi gliserol miktarı %50'nin üzerine çıkarak birçok ozmotik basınç için uyumlu hale gelir. Gliserol, yüksek tuzluluk seviyelerine bağlı olarak enzimlerin inaktivasyonunu önleyen bir çözündürücü ajan rolü oynar (Jin ve ark., 2003b). *Dunaliela salina* hücreleri ortam koşulları, yüksek tuzluluk, yüksek sıcaklık, yüksek ışık yoğunluğu ve besin eksikliği içerdiğinde, klorofil foto hasarını önlemek amacıyla kloroplastta kesecikler halinde büyük miktarlarda β-karoten biriktirir (Ben-Amotz & Avron, 1983 Ben-Amotz & Shaish, 1992).

Dunaliella salina eşeyli ve eşeysiz çoğalabilir. Eşeysiz çoğalması hareketli hücrenin boyuna bölünmesiyle gerçekleştirilirken, eşeyli üremesi, şekil ve boyut bakımından benzer morfolojiye sahip iki hareketli hücrenin bir zigot oluşturması ile nadiren gerçekleşir. Eşeyli üreme kitle kültüründe daha sık görülür (Harker & Hirschberg, 1998; Leon ve ark., 2003; Borowitzka, M.A ve ark., 1982).

Dunaliella salina belirli stres koşulları altında ayrıca bir palmella aşamasına dönüşerek, kalın bir müsilaj tabakasına gömülebilirler veya kalın duvarlı aplanosporlar oluşturabilirler. Zigot yeşil veya kırmızıdır ve çok kalın, pürüzsüz bir sporopollenin duvarı ile çevrilidir. Ortam, optimum büyüme koşullarına döndüğünde zigot çekirdeği mayotik olarak bölünür ve ana hücre duvarındaki bir yırtılma yoluyla hücreler serbest bırakılır. Eşeyli üreme ile 32 adete kadar hücre oluşabilir (Borowitzka, MA ve ark., 1982). Yüksek ışınım, yüksek tuzluluk veya

besin yoksunluğu gibi çevresel stres altında, *Dunaliella* hücreleri karotenoid üretimi nedeniyle yeşilden kırmızıya döner (Tran ve ark., 2014; Taha ve ark., 2012).

2.3 *Dunaliella salina* Ekolojisi

Dunaliella salina geniş tuzluluk, pH ve sıcaklık aralığını tolere edebildiğinden çok farklı ekosistemlerde dağılım göstermektedir. *Dunaliella* dünya çapında en sık olarak okyanuslar, tuzlu su gölleri, tuzlu bataklıklar ve denize yakın tuzlu su hendekleri gibi %10'un üzerinde tuzluluk oranına sahip habitatlarda doğal olarak bulunur (Leach ve ark., 1998; Ben-Amotz & Avron, 1990). *Dunaliella* hücreleri %5 - %30 tuzluluk aralığında büyüme gösterebilir. Ayrıca *Dunaliella salina* fotosentetik akitivitesinin -8°C'ye kadar devam edebildiği açıklanmıştır (Borowitzka M.A. & Borowitzka , 1989). *Dunaliella*, Utah'taki (ABD) Büyük Tuz Gölü'nde, Ürdün ve Filistin'deki Ölü Deniz'de, Batı Avustralya'daki Pembe Göl'de ve dünyanın diğer birçok yerinde bulunur (Nguyen ve ark., 2014). Ülkemizde ise *Dunaliella* türlerinin Çamaltı Tuzlası (İzmir), Ayvalık Tuzlası (Balıkesir), Tuz Gölü (Konya), Gökçeada Tuz Gölü (Çanakkale), Dalyan Tuz Gölü (Çanakkale) ve Gelibolu Tuz Gölü'nde (Çanakkale) bulunduğu rapor edilmiştir (Çelekli & Dönmez, 2006; Dudu ve ark., 2001; Ak ve ark., 2008).

2.4 *Dunaliella salina* Büyümesini Etkileyen Besin Ortamı Faktörleri

Mikroalg yetiştirmek için gerekli besinler genel olarak yüksek içerikli ve düşük içerikli maddeler olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. Ortamdaki konsantrasyonları $g.L^{-1}$ ölçeğinde olan karbon kaynağı, azot kaynağı, fosfor ve kükürt yüksek içerikli besin örnekleridir ve en önemli malzemelerdir. Düşük içerikli malzemeler, kültür ortamında $mg.L^{-1}$ ölçeğindeki miktarlarda bulunurlar ve silikon, magnezyum, potasyum, bakır, demir, çinko vb. gibi çeşitli metaller ve vitaminler bu kategori içinde sayılabilirler (Pourkarimi ve ark., 2020).

Şimdiye kadar incelenen *Dunaliella* türlerinin çoğunun fototrofik olduğu ve karbon kaynağı olarak karbondioksit veya bikarbonat gazı kullandığı rapor edilmiştir. Yüksek tuzlulukta inorganik karbon çözünme kapasitesi düşüktür ve inorganik karbon kaynağı eksikliği büyüme sınırlayıcı faktördür bu yüzden mikroalgleri

beslemek için inorganik karbonun sağlanması gerekmektedir (Coesel ve ark., 2008).

Bazı çalışmalar göstermiştir ki miksotrofik kültür koşulları (ışık kaynağı ve organik karbonun aynı anda uygulanması) hücresel βeta-karoten içeriğini önemli ölçüde artırır. Örneğin, Mojaat ve ark. (2008), *Dunaliella salina* hücrelerinden β-karoten üretimi ve büyümesi üzerinde demir iyonu (Fe^{+2}) ve organik karbonun etkisini incelemişlerdir. $FeSO_4$ ve organik karbon olarak asetat kullanıldığında hücresel β-karoten içeriğinde önemli bir artış olduğunu rapor etmişlerdir (Mojaat ve ark., 2008).

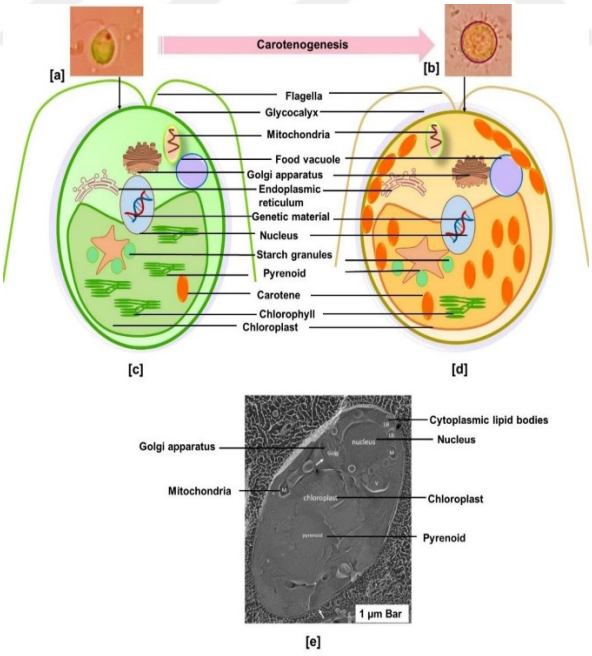
Geun ve ark. (2015), *Isochrysis galbana* LB987, *Nannochloropsis oculata* CCAP849/1, ve *Dunaliella salina* türlerini fototrofik, heterotrofik ve miksotrofik koşullarda yetiştirerek organik karbon kaynakları kullanımının hücre büyümesi, toplam yağ miktarı ve klorofil birikimine etkisini araştırmışlardır. Miksotrofik çalışmada organik karbon kaynağı olarak glikoz, galaktoz, fruktoz, ksiloz, ramnoz ve sakkaroz kullanılmıştır. 0.05 M glikoz içeren formülasyonda maksimum büyüme gözlenmiştir, buna ek olarak aynı çalışmada diğerlerinden daha fazla klorofil birikimi gözlenmiştir (Geun ve ark., 2015).

Dunaliella için en iyi nitrojen kaynağı nitrattır (Mil'ko, 1962; Grant, 1968; Borowitzka M.A. & Borowitzka, 1988b). Amonyum nitrat, amonyum klorür ve amonyum asetat gibi amonyum tuzları genellikle daha az etkili azot kaynaklarıdır. Ayrıca bu tip azot kaynakları yüksek sıcaklıklarda ve yüksek konsantrasyonlarda öldürücü olabilirler (Mil'ko, 1962). Aktif olarak büyüyen kültürlerde amonyum alımının kültür ortamının asitleşmesine sebep olduğu ve bunun sonunda alglerin ölümüyle sonuçlandığını, ayrıca amonyum nitratın β-karoten oluşumunu engellediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Borowitzka M.A. & Borowitzka, 1988b). Üre, özellikle iyi tamponlanmış ortamlarda bir nitrojen kaynağı olarak kullanılabilir. Aynı zamanda, büyük ölçekli dış mekan kültürlerinde üre kullanımı, üre metabolizması sonucu oluşan yüksek amonyum derişimleri nedeniyle kültürün toplu ölümlerine yol açabilir (Massyuk, 1966).

2.5 *Dunaliella salina*'dan β-karoten Üretimi

Karotenoidler, doğada yaygın olarak bulunan kırmızı, sarı veya turuncu renkli bir doğal pigment ailesidir. Meyve ve sebzelere sahip olduğu renkler yapılarındaki bulundurdukları karotenoidlerin varlığından gelmektedir. Karotenoid pigmentler güçlü antioksidanlardır ve provitamin A niteliğindedirler (Krinsky, 1989). Vücuda alındıklarında A vitaminine dönüştürülebilirler. En yaygın karotenoidlerden biri β-karotendir.

Yüksek ışık şiddeti, yüksek tuzluluk veya besin yoksunluğu gibi çevresel stres altında, *Dunaliella* hücreleri karotenoid üreterek yeşilden kırmızıya döner (Tran ve ark., 2014; Taha ve ark., 2012). İlk kez Milko (1963), *Dunaliella*'nın yüksek konsantrasyonlarda β-karoten içerdiğini ve daha sonra ticari bir gliserol kaynağı olarak da değerlendirilebileceğini belirtmiştir (Ben-Amotz, 1980). β-karoten, *Dunaliella* hücrelerinin kloroplastların intertilakoid boşluklarında lipid globülleri olarak biriktirilir (Şekil 2.1) (Raja ve ark., 2007; Emeish, 2012). *Dunaliella salina* için kuru ağırlığın %14'üne kadar β-karoten biriktirebildiği rapor edilmiştir (Aasen ve ark., 1969).



Şekil 2. 1 *Dunaliella* türlerinin yapısı [a] büyüme evresindeki hücre yapısı, [b] karotenogenez evresinin hücre yapısı, [c] büyüme evresindeki *Dunaliella* türlerinin hücresel yapısı, [d] karoten sentezi evresindeki *Dunaliella* türlerinin hücresel yapısı ve [e] *Dunaliella salina*'nın üst yapısı **(**Goswami ve ark., 2022)

β-karoten hücre içinde, *Dunaliella salina* 'nın klorofil ve hücre DNA'sını yüksek ışık şiddetinden korumak için foto-koruyucu görevi görür (Ben-Amotz, 1980; Ben-Amotz ve ark., 1989). β-karoten sentezi, hücreyi stres koşulları altında oluşan serbest radikallerden koruma mekanizmasıdır. Antioksidan özelliği nedeniyle serbest radikalleri söndürürerek fizyolojik dengenin yeniden sağlanmasında görev alır (Pisal & Lele, 2005). Ayrıca β-karotenin, büyümenin sınırlı olduğu ancak fotosentetik faaliyetlerin devam etmesi gereken koşullar altında fotosentez ile üretilen fazla karbonu depolamak için bir "karbon havuzu" görevi yaptığını öne sürmüşlerdir (Borowitzka & Borowitzka, 1988a). Aynı zamanda β-karoten birikiminin, ışık spektrumunun mavi bölgesindeki ışığı emerek yüksek yoğunluklu radyasyonun zararlı etkilerine karşı hücreleri koruma görevi gördüğü belirtilmiştir (Ben-Amotz, 1993; Ben-Amotz ve ark.,1987).

En yaygın kullanılan doğal β-karoten bileşiği, all-trans (% 42), 9-cis (% 41), 15 cis (% 10) ve geri kalan izomerleri (% 6) içerir. Trans izomerler yağda çözünmez ve kolayca kristalleşir. Buna karşılık, β-karotenin 9-cis izomerleri yağda çok yüksek çözünürlüğe sahiptir ve zor kristalleşir (Abd El-Baky & El-Baroty, 2010; Ben-Amotz, 1993). Genel olarak, mikroalglerden elde edilen β-karoten all-trans ve 9-cis izomerleri şeklinde bulunur. 9-cis izomerinin antioksidan özelliği, all-trans izomerlerinden daha güçlüdür. Ancak günümüzde piyasada bulunan βeta-karoten in çoğu kimyasal olarak üretilmekte ve sadece all-trans izomeri içermektedir. Bu yüzden algal kökenli β-karoten yapısında bulundurduğu 9-cis izomerinden dolayı yüksek değerli bir bileşiktir.

β-karoten pigmentleri doğal renklendirici olarak gıda sanayisinde, antioksidan özelliğinden dolayı katkı maddesi olarak gıda takviye ve kozmetik endüstrilerinde ve anti-kanser bileşiği olarak ilaç sanayisinde çok çeşitli uygulamalarda kullanılır. Ayrıca, β-karoten su ürünleri yem endüstrisinde balık dokuları için doğal bir renklendirici ve hayvan yemleri için A vitamini öncüsü olarak kullanılmaktadır (Hejazi & Wijffels, 2003; Amotz & Avron, 1990; (Garcia-Gonzalez ve ark., 2005; Garcia-Chavarria & Lara-Flores, 2013).

2.6 Mikroalgal Biyokütle Üretimi

Mikroalgler için çeşitli üretim teknikleri bulunmaktadır. Bunlar; fototrofik, heterotrofik ve miksotrofik üretim yöntemleridir. Bu üretim yöntemleri arasında en çok fototrofik üretim teknolojisi kullanılmaktadır.

2.6.1 Fototrofik Üretim

Mikroalgler, çoğunlukla ototrofik olarak yaşayan ve sahip oldukları pigmentlerini kullanarak fotosentez yapan canlılardır. Fotosentez ile karbondioksit, su ve güneş ışığından aldıkları enerjiyi biyokütleye dönüştürürler. Fotoototrofik türlerin yetiştirilmesinde ışık en önemli faktördür. Mikroalgal kültürlerde ki büyüme direkt olarak ışık ile bağlantılıdır ve spesifik büyüme hızındaki artış da doğrudan ışık periyoduna bağlıdır. Kültürlerin aydınlatılmasında dikkate alınan faktörler: spektral kalite, spektral aralık, ışık şiddeti ve karanlık/aydınlık döngüsüdür. Bu faktörler mikroalgal üretimde doğrudan etkilidir (Richmond, 1992; Hu ve ark., 1998; Campos ve ark., 2007; Lee, 2000). Mikroalgler fototrofik olarak; açık havuz sistemlerinde (Wen & Chen, 2003), kapalı fotobiyoreaktörlerde (Patel ve ark., 2016; Su, ve ark., 2017) yetiştirilir. Kapalı fotobiyoreaktörlerde sıcaklık, karbondioksit ve pH gibi kültür şartları kontrol altında tutulabildiğinden açık havuz sistemlerine göre daha avantajlıdır. Açık ve kapalı sistemin basamaklı olarak uygulandığı hibrit sistemlerde de fototrofik mikroalg kültürleri yetiştirilir (Milano, ve ark., 2016).

2.6.2 Heterotrofik Üretim

Heterotrofik üretim, ışık varlığı olmadan besin ortamına ek olarak glikoz gibi organik karbon kaynaklarının kullanıldığı karıştırmalı biyoreaktörlerde gerçekleştirilen mikrolag üretim yöntemidir (Turon ve ark., 2016). Heterotrofik üretimde, fototrofik üretimde kullanılan besin ortamına ek olarak organik besin kaynakları kullanılır. Büyüme için karbon kaynağı önemlidir. Seçilen mikroalg çeşidine bağlı olarak glikoz, früktoz, asetat, etanol, gliserol gibi farklı karbon kaynakları kullanılabilir (Huang ve ark., 2010).

Heterotrofik üretim ile yüksek büyüme hızı ve hücre yoğunluğu elde edilebilir. Bu sayede yüksek hacimsel üretim mümkün olmaktadır. Heterotrofik mikroalg üretimi,

mikrobiyal fermentörler gibi mevcut teknolojiye adapte edilebilir ve ışıktan bağımsız bir üretim olması ölçek büyütmeyi kolaylaştırır (Turon ve ark., 2016).

Heterotrofik üretim bazı dezavantajlara sahiptir. Sınırlı sayıda mikroalg türünün heterotrofik olarak yetiştiriliyor olması, kullanılan organik besin kaynaklarından dolayı başka türlerle yarışma ve kontaminasyon riskinin bulunması dezavantajları arasında gösterilebilir (Perez-Garcia ve ark., 2011).

2.6.3 Miksotrofik Üretim

Miksotrofik algler, fototrofik ve heterotrofik beslenmenin birleşimi bir özellik gösterirler, karbon kaynağı olarak hem inorganik karbonu hem de organik karbonu kullanabilirler. Örneğin, *Haematococcus pluvialis, Chlorella vulgaris* ototrofik, heterotrofik ve miksotrofik şartlarda gelişebilen mikroalg türleridir. Miksotrofik ve heterotrofik üretimde, organik karbon kaynağı olarak glikoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, sükroz ve mannoz yaygın olarak kullanılmaktadır (Abreu A.P. ve ark., 2012). Işık enerjisinden dönüştürülen kimyasal enerji depolanırken, organik karbondan kazanılan enerji hücre çoğalmasında kullanılır. Ototrofik mikroalgler, inorganik karbonu kullanarak, hidroksil iyonu üretirler böylece pH yükselir. Heterotrofik yetiştirmede, mikroalgler, organik karbonu kullanarak karbondioksit üretirler ve böylece pH'ı düşürürler. Miksotrofik yetiştirmede ise, mikroalgler aynı zamanda hem inorganik hem de organik karbonu kullanabilirler bu yüzden pH değeri değişkenlik göstermektedir. Miksotrofik üretimde ışık, organik karbon kaynağı büyümeyi desteklediğinden, büyüme sınırlayıcı bir faktör değildir. Miksotrofik üretimin, fototrofik ve heterotrofik üretimden avantajı fotoinhibisyonu engelleyerek biyokütle üretkenliğini arttırmasıdır (Moreno-Garcia ve ark., 2017).

3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroalg

Dunaliella salina CCAP 19/20, CCAP 19/25, CCAP 19/31 İskoçya'daki (Birleşik Krallık) Alg ve Protozoa Kültür Koleksiyonu'ndan (CCAP) temin edilmiştir. Türkiye'deki Tuz Gölü'nden izole edilen *Dunaliella sp.* daha önce yapılan bir çalışmadan temin edilmiştir (Durmaz, 2006). Tuz Gölü, dünyanın en büyük hipersalin göllerinden biridir ve İç Anadolu Bölgesi'nde yer almaktadır.

3.1.2 Kültür Ortamları

Dunaliella salina aşı kültürleri oluşturulurken AS100 (Vonshak, 1986) besin ortamı kullanılmıştır.

Tablo 3. 1 AS100 Besin Ortamı İçeriği

Bileşen Adı	**g.L^{-1}**
$MgSO_4.7H_2O$	2,44
KCl	0,6
$NaNO_3$	1
KH_2PO_4	0,3
Tris buffer	1
NH_4Cl	0,27
vitamin B12	1 ml
P-I metal çözeltisi	10 ml
Şelatlı demir çözeltisi	3 ml

Tablo 3. 2 P-I Metal Çözeltisi İçeriği

Bileşen Adı	**Miktar**
H_3BO_3	3,4 g
$CoCl_2.6H_2O$	1,2 mg
$MnCl_2.4H_2O$	0,4 mg
$ZnCl_2$	31,5 mg
H_2SO_4	1 ml
$(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$	31,2 mg

3.1.3 Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Deneylerde kullanılan cihaz ve ekipmanlar Tablo 3.3'de gösterilmektedir.

Tablo 3. 3 Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Kullanılan Cihaz Adı	**Marka/Model**
Otoklav	Alp (CLG 40L)
Biyogüvenlik Kabini	Faster (SafeFast Classic)
Hassas Terazi	Ohaus (PR 224)
Mikroskop	Olympus (CX23)
pH metre	Mettler Toledo (SevenCompact S210)
Tuzluluk Ölçer	Atago (Pal-α)
Spektrofotometre	Shimadzu (UV-1900)
Manyetik Karıştırıcı	Isolab
Işık Ölçer	Unı-t (Ut 383)
Vorteks	Velp Scientific (Zx4)
HPLC	Shimadzu (LC-2050C)

3.1.4 Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada, besin ortamlarının hazırlanmasında kullanılan analitik saflıkta kimyasallar Merck, Isolab ve Sigma Aldrich'den temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Dunaliella salina* Kültürlerinin Yetiştirilmesi

Tablo 3.1 de belirtilen formülasyona göre AS100 besin ortamı hazırlanarak *Dunaliella salina* kültürleri yetiştirilmiştir.

Besin ortamı bileşenlerinin formülasyonda belirtilen sıra ile eklenmesine ve her bir bileşen eklenmeden, bir öncekinin tamamen çözünmüş olmasına dikkat edilmiştir. Şelatlı demir çözeltisi hazırlanırken önce, 500 ml distile su ısıtılmış ve 10 g Na_2EDTA karıştırılarak eklenmiştir. Ayrı bir şişede 0.81 g $FeCl_3.6H_2O$, 500 ml 0.1 N HCl çözeltisine eklenmiştir. Hazırlanan bu çözelti sıcak EDTA çözeltisine karıştırılarak yavaşça eklenmiş ve çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılmıştır.

Hazırlanan besin ortamları otoklavda 121 ^{0}C de 15 dakika steril edilmiştir. Vitamin çözeltisi steril besin ortamlarına oda sıcaklığına geldikten sonra eklenmiştir. Vitamin çözeltisi 0,22 µm şırınga ucu filtreden geçirilerek biyogüvenlik kabini içerisinde besin ortamlarına eklenmiştir.

Hazırlanan steril besin ortamına ekimi yapılan kültürler OSRAM marka 54 W soğuk beyaz floresan ışık kullanılarak yetiştirilmiştir. Çalışmada kullanılan her bir *Dunaliella* kültüründen düzenli örnekler alınarak hücre sayımları ve 680 nm dalga boyundaki absorbans ölçümleri yapılarak, AS100 besin ortamındaki büyüme grafikleri oluşturulmuştur. Hücre sayımları Improved Neubauer hemositometre sayım lamında yapılmıştır.

3.2.2 Farklı Organik Karbon Kaynaklarında *Dunaliella salina* Türlerinin Yetiştirilmesi

AS100 besin ortamına organik karbon kaynakları eklenerek hücre büyümesine etkisi incelenmiştir. Glikoz, gliserol ($C_3H_8O_3$), asetik asit (CH_3COOH), sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) ve sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$) organik karbon kaynakları olarak seçilmiştir. Design-Expert programı ile deney planları oluşturulmuştur. Karbon kaynağı olarak belirlenen bileşenlerin içerdiği karbon oranı hesaplanmıştır. Deney başlangıcında her formülasyonun aynı miktarda karbon içeriğine sahip olması için besin ortamı oluşturulurken kullanılması gereken miktarlar

belirlenmiştir. Böylece başlangıç karbon oranları aynı olan formülasyonlarda, karbon kaynağının büyüme üzerinde etkisi daha doğru bir şekilde belirlenmesi amaçlanmıştır.

Karbon kaynaklarının büyüme üzerine etkisi 2 ayrı deneme ile araştırılmıştır. Deney planındaki formülasyonlara uygun olarak hazırlanan besin ortamları 121 ^{0}C de 15 dk steril edilmiştir. Glikoz ve sodyum bikarbonat içeren formülasyonlarda, bu iki bileşen hazırlanan besin ortamlarından ayrı olarak otoklava atılarak formülasyonların diğer bileşenleri ile tepkime oluşturması engellenmiştir. Vitamin çözeltisi otoklav sonrasında biyogüvenlik kabini içerisinde eklenmiştir.

Tablo 3.4 Design-Expert programı ile oluşturulan organik karbon kaynağı çalışması 1.deneme planı

Formülasyon Numarası	Formülasyon Asetik asit Miktarı($g.L^{-1}$)	Formülasyon Gliserol miktarı($g.L^{-1}$)	Formülasyon Glikoz Miktarı($g.L^{-1}$)	Asetik asit Karbon Oranı	Gliserol Karbon Oranı	Glikoz Karbon Oranı	Kullanılacak Asetik asit Miktarı($g.L^{-1}$)	Kullanılacak Gliserol Miktarı($g.L^{-1}$)	Kullanılacak Glikoz Miktarı($g.L^{-1}$)
1	0	0	100	40%	40%	40%	0	0	40
2	0	100	0	40%	40%	40%	0	40	0
3	100	0	0	40%	40%	40%	40	0	0
4	0	50	50	40%	40%	40%	0	20	20
5	50	0	50	40%	40%	40%	20	0	20
6	50	50	0	40%	40%	40%	20	20	0
7	16,67	16,67	66,67	40%	40%	40%	6,67	6,67	26,67
8	16,67	66,67	16,67	40%	40%	40%	6,67	26,67	6,67
9	66,67	16,67	16,67	40%	40%	40%	26,67	6,67	6,67
10	33,33	33,33	33,33	40%	40%	40%	13,33	13,33	13,33
11	0	0	100	40%	40%	40%	0	0	40
12	0	100	0	40%	40%	40%	0	40	0
13	100	0	0	40%	40%	40%	40	0	0
14	0	50	50	40%	40%	40%	0	20	20

Tablo 3.5 Design-Expert programı ile oluşturulan organik karbon kaynağı çalışması 2.deneme planı

Formülasyon Numarası	Formülasyon Sodyum bikarbonat Miktarı($g.L^{-1}$)	Formülasyon Glikoz Miktarı ($g.L^{-1}$)	Formülasyon Sodyum asetat Miktarı($g.L^{-1}$)	Sodyum bikarbonat Karbon Oranı	Glikoz Karbon Oranı	Sodyum asetat Karbon Oranı	Kullanılacak Sodyum bikarbonat Miktarı($g.L^{-1}$)	Kullanılacak Glikoz Miktarı($g.L^{-1}$)	Kullanılacak Sodyum asetat Miktarı($g.L^{-1}$)
1	0	0	5	14%	40%	29%	0,00	0,00	17,24
2	0	5	0	14%	40%	29%	0,00	12,50	0,00
3	5	0	0	14%	40%	29%	35,71	0,00	0,00
4	0	2,5	2,5	14%	40%	29%	0,00	6,25	8,62
5	2,5	0	2,5	14%	40%	29%	17,86	0,00	8,62
6	2,5	2,5	0	14%	40%	29%	17,86	6,25	0,00
7	0,83	0,83	3,33	14%	40%	29%	5,95	2,08	11,49
8	0,83	3,33	0,83	14%	40%	29%	5,95	8,33	2,87
9	3,33	0,83	0,83	14%	40%	29%	23,81	2,08	2,87
10	1,67	1,67	1,67	14%	40%	29%	11,90	4,17	5,75
11	0	0	5	14%	40%	29%	0,00	0,00	17,24
12	0	5	0	14%	40%	29%	0,00	12,50	0,00
13	5	0	0	14%	40%	29%	35,71	0,00	0,00
14	0	2,5	2,5	14%	40%	29%	0,00	6,25	8,62

Programda belirlenen 14 formülasyona ek olarak standart AS100 besin ortamında diğer formülasyonlarla eş zamanlı olarak ekimi yapılan kültürün de takibi yapılmıştır. Tüm besin ortamı formülasyonlarının yetiştirilmesinde OSRAM marka 54 W soğuk beyaz floresan ışık kaynağı kullanılmıştır. Çalışmalar yaklaşık 15 gün devam etmiştir. Çalışma boyunca kültürlerden örnek alınarak hücre sayımı, 680 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm ve pH takibi yapılmıştır. Örnek alındığı günlerde kültürlere steril distile su eklenerek başlangıç hacmine tamamlanmıştır.

3.2.3 Farklı Azot Kaynaklarında *Dunaliella salina* Türlerinin Yetiştirilmesi

Bu çalışmada farklı azot kaynaklarının *Dunaliella salina* kültürlerinin büyümesi üzerine etkisi incelenmiştir. Sodyum nitrat ($NaNO_3$), üre (CH_4N_2O), amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), amonyum hidroksit (NH_4OH) azot kaynağı olarak seçilmiştir. *Dunaliella salina* kültürünü yetiştirmek için kullanılan AS100 besin ortamında sodyum nitrat kullanılmaktadır ve formülasyonun içerdiği azot miktarı 0,33 $g.L^{-1}$'dir. Bu çalışmada sodyum nitrat azot kaynağı olarak kullanılmıştır ancak besin ortamında çalışılacak azot kaynağı tüm formülasyonlar için 1 $g.L^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Design-Expert programı ile deney planı oluşturulmuştur. Buna göre besin ortamlarına eklenecek her bir azot kaynağı 1 $g.L^{-1}$ azot içerecek şekilde hesaplanmıştır.

Tablo 3.6 Design-Expert programı ile oluşturulan azot kaynağı çalışması deneme planı

Formül No	Formülasyon Amonyum hidroksit Miktarı (g.L^{-1})	Formülasyon Amonyum sülfat Miktarı (g.L^{-1})	Formülasyon Üre Miktarı (g.L^{-1})	Formülasyon Sodyum nitrat Miktarı (g.L^{-1})	Amonyum hidroksit Azot Oranı	Amonyum sülfat Azot Oranı	Üre Azot Oranı	Sodyum nitrat Azot Oranı	Kullanılacak Amonyum hidroksit Miktarı (g.L^{-1})	Kullanılacak Amonyum sülfat Miktarı (g.L^{-1})	Kullanılacak Üre Miktarı (g.L^{-1})	Kullanılacak Sodyum nitrat Miktarı (g.L^{-1})
1	0	0	0	1	39%	21%	46%	16%	0,00	0,00	0,00	6,25
2	0	0	1	0	39%	21%	46%	16%	0,00	0,00	2,17	0,00
3	0	1	0	0	39%	21%	46%	16%	0,00	4,76	0,00	0,00
4	1	0	0	0	39%	21%	46%	16%	2,56	0,00	0,00	0,00
5	0	0	0,5	0,5	39%	21%	46%	16%	0,00	0,00	1,09	3,13
6	0	0,5	0	0,5	39%	21%	46%	16%	0,00	2,38	0,00	3,13
7	0,5	0	0	0,5	39%	21%	46%	16%	1,28	0,00	0,00	3,13
8	0	0,5	0,5	0	39%	21%	46%	16%	0,00	2,38	1,09	0,00
9	0,5	0	0,5	0	39%	21%	46%	16%	1,28	0,00	1,09	0,00
10	0,5	0,5	0	0	39%	21%	46%	16%	1,28	2,38	0,00	0,00
11	0,125	0,125	0,125	0,625	39%	21%	46%	16%	0,32	0,60	0,27	3,91
12	0,125	0,125	0,625	0,125	39%	21%	46%	16%	0,32	0,60	1,36	0,78
13	0,125	0,625	0,125	0,125	39%	21%	46%	16%	0,32	2,98	0,27	0,78
14	0,625	0,125	0,125	0,125	39%	21%	46%	16%	1,60	0,60	0,27	0,78
15	0,25	0,25	0,25	0,25	39%	21%	46%	16%	0,64	1,19	0,54	1,56
16	0	0	0	1	39%	21%	46%	16%	0,00	0,00	0,00	6,25
17	0	0	1	0	39%	21%	46%	16%	0,00	0,00	2,17	0,00
18	0	1	0	0	39%	21%	46%	16%	0,00	4,76	0,00	0,00
19	1	0	0	0	39%	21%	46%	16%	2,56	0,00	0,00	0,00
20	0	0	0,5	0,5	39%	21%	46%	16%	0,00	0,00	1,09	3,13

Deney planındaki formülasyonlara uygun olarak hazırlanan besin ortamları 121 ^{0}C de 15 dk steril edilmiştir. Amonyak sterilizasyon sırasında yüksek sıcaklık sebebiyle uçacağından amonyak bulunan formülasyonlarda amonyak sterilizasyon sonrası biyogüvenlik kabininde eklenerek 1M HCl ile pH değeri yaklaşık 8 olarak ayarlanmıştır. Çalışmalar yaklaşık 15 gün devam etmiştir. Programda belirlenen 20 formülasyona ek olarak standart AS100 besin ortamında diğer formülasyonlarla eş zamanlı olarak ekimi yapılan kültürün de takibi yapılmıştır. Tüm besin ortamı formülasyonlarının yetiştirilmesinde OSRAM marka 54 W soğuk beyaz floresan ışık kaynağı kullanılmıştır. Günlük olarak kültürlerden örnek alınarak hücre sayımı, 680 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçümü ve pH ölçümleri yapılmıştır. Örnek alındıktan sonra kültürlere steril distile su eklenerek başlangıç hacmine tamamlanmıştır.

3.2.4 Tuz Gölü'nden İzole Edilen *Dunaliella sp.* Türünün Farklı Karbon/Azot Oranlarında Yetiştirilmesi

Tüm *Dunaliella* türlerinde farklı karbon ve azot kaynaklarında büyüme etkisi deneyleri tamamlandıktan sonra elde edilen verilerde sadece Tuz Gölü'nden izole edilen *Dunaliella* türünde organik karbon kaynağı eklenen besin ortamında, standart AS100 besin ortamında elde edilen hücre sayısından fazla büyüme görülmüştür. Bu yüzden bu tür için maksimum büyümenin elde edildiği karbon kaynağı formülasyonu ile farklı karbon/azot oranına sahip besin ortamlarının büyüme üzerine etkisi incelenmiştir.

Maksimum büyümenin elde edildiği karbon ve azot kaynağı belirlendikten sonra bu iki önemli besin kaynağının maksimum büyüme için hangi oranda kullanılacağını belirlemek için Tablo 3.7' de belirtilen deney planı oluşturulmuştur. Bunun için karbon miktarı sabit tutularak azot miktarı değiştirilmiştir. Belirlenen oranlar için 2 paralel besin ortamı hazırlanmıştır. Kullanılacak karbon kaynağı ilk şişe denemesinde belirlendiği üzere 16,66 g.L^{-1} glikoz, 16,66 g.L^{-1} gliserol ve 66,66 g.L^{-1} asetik asit formülasyonudur. En yüksek hücre sayısının elde edildiği bu formülasyonda toplam karbon miktarı 40 g.L^{-1} olarak hesaplanmıştır. Yapılan şişe denemelerinde en uygun azot kaynağı sodyum nitrat olarak belirlendiğinden bu deneyde kullanılacak azot kaynağı sodyum nitrat olarak seçilmiştir. 16,66 g.L^{-1} glikoz, 16,66 g.L^{-1} gliserol ve 66,66 g.L^{-1} asetik asit formülasyonu ile AS100 besin

ortamının içerdiği azot miktarının oranlanması sonucu karbon/azot oranı 25 olarak elde edildiğinden karbon/azot oranı, 10-50 aralığında büyüme parametrelerini karşılaştırmak üzere deney planı oluşturulmuştur. Bu bilgilere göre oluşturulan deneme planı aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 3.7 Karbon / Azot oranı deneme planı

C/N oranı	Toplam karbon miktarı (g)	Toplam azot miktarı (g)	Sodyum nitrat Azot Oranı	Kullanılacak Sodyum nitrat Miktarı (g)
10	40	4	16%	12,5
20	40	2	16%	6,25
30	40	1,33	16%	4,16
40	40	1	16%	3,125
50	40	0,8	16%	2,5

Deney planındaki formülasyonlara uygun olarak hazırlanan besin ortamları 121 ^{0}C de 15 dk steril edilmiştir. Belirlenen oranlar için 2 paralel besin ortamı hazırlanmıştır. Glikoz hazırlanan besin ortamlarından ayrı olarak otoklava atılarak formülasyonların diğer bileşenleri ile tepkime oluşturması engellenmiştir. Vitamin çözeltisi otoklav sonrasında biyogüvenlik kabini içerisinde eklenmiştir. Tüm besin ortamı formülasyonlarının yetiştirilmesinde OSRAM marka 54 W soğuk beyaz floresan ışık kaynağı kullanılmıştır. Çalışma 15 gün devam etmiştir. Günlük olarak kültürlerden örnek alınarak hücre sayımı, 680 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçümü ve pH ölçümleri yapılmıştır. Örnek alındıktan sonra kültürlere steril distile su eklenerek başlangıç hacmine tamamlanmıştır.

3.2.5 Tuz Gölü'nden İzole Edilen *Dunaliella sp.* Türünün Stres Koşullarında β-Karoten Birikimi

Dunaliella salina kültüründen βeta-karoten elde etme çalışmalarında kültüre stres koşulları uygulayarak βeta-karoten birikimi arttırılmaktadır. Besin kıtlığı, yüksek ışık şiddeti, sıcaklık değişimi stres koşulları olarak gösterilebilir. Bu çalışmada besin ortamı bileşenlerinin azaltıldığı besin ortamına kültür eklenerek βeta-karoten birikimine etkisi incelenmiştir. Besin ortamı bileşenlerinden azot tamamen çıkarılarak, sülfat ve fosfat miktarı azaltılmıştır. Design-Expert programı ile deney planı oluşturulmuştur (Tablo 3.8).

Tablo 3.8 Design-Expert programı ile oluşturulan besin stresi deneme planı

Formülasyon Numarası	Azot Miktarı (g/l)	Sülfat Miktarı (g/l)	Fosfat Miktarı (g/l)	Eklenecek Magnezyum sülfat Miktarı (ml)	Eklenecek Potasyum di-hidrojen fosfat Miktarı (ml)
1	0	0,15	0,00	1,5	1,4
2	0	0,85	0,00	3,8	1,4
3	0	0,15	0,03	1,5	8,31
4	0	0,85	0,03	3,8	8,31
5	0	0	0,017	0	4,87
6	0	1	0,017	10,5	4,87
7	0	0,5	0	5,25	0
8	0	0,5	0,034	5,25	9,75
9	0	0,5	0,017	5,25	4,87
10	0	0,5	0,017	5,25	4,87
11	0	0,5	0,017	5,25	4,87
12	0	0,5	0,017	5,25	4,87

Deney planındaki formülasyonlara uygun olarak hazırlanan besin ortamları 121 ^{0}C de 15 dk steril edilmiştir. Aşı olarak kullanılan kültürün hücre sayısı 4,17x10^6 hücre/ml olarak hesaplanmıştır. Besin ortamlarında tuzluluk 2 M olarak hazırlanmıştır. Deney planına ek olarak 13. formülasyonda azot kaynağı bulunmayan AS100 besin ortamı kullanılmıştır. Şişelerde buharlaşmadan dolayı sıvı seviyesi başlangıca göre düştüğünden kültürlere örnek alındığı günlerde steril distile su ilave edilmiştir. Çalışma 30 gün devam etmiştir. Günlük olarak kültürlerden örnek alınarak hücre sayımı, optik yoğunluk (OD 680 nm) ölçümü ve βeta-karoten analizi yapılmıştır.

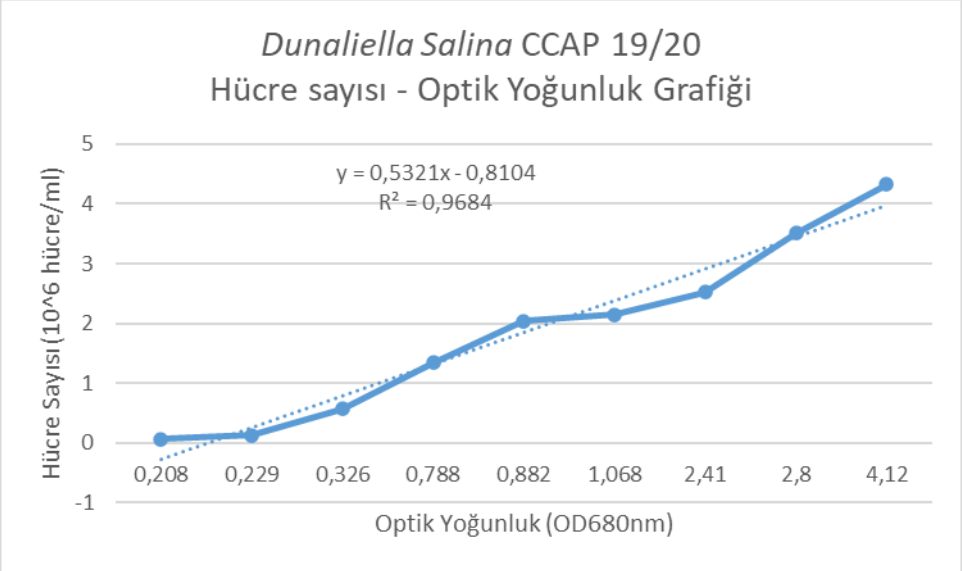
β-karoten analizi için 10 ml kültür 4500 rpm, 4˚C'de 12 dakika santrifüj edilerek pellet elde edilmiştir. Pellete 5 ml aseton eklenerek ultrasonik su banyosunda 5 dk bekletilmiştir. 5000 rpm, 4˚C'de 12 dakika pellet beyaz renk alana kadar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant, santrifüj tüpüne alınarak 0.5 ml %60 KOH çözeltisi eklenmiştir ve vorteks ile karışması sağlanmıştır. Ardından üstteki yeşil katman 0,22 µm gözenek çapındaki şırınga ucu filtreden geçirilerek 1,5 ml hacimli viallere alınmıştır. Hazırlanan örnekler C18 HPLC kolonunda 450 nm dalga boyunda, 28 ˚C kolon sıcaklığında, 0.8 ml/dk akış hızında 50µl enjeksiyon hacmi ile analiz edilmiştir (Wu ve ark. 2020).

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

4.1.1 AS100 Besin Ortamında *Dunaliella Salina* Kültürlerinin Yetiştirilmesi

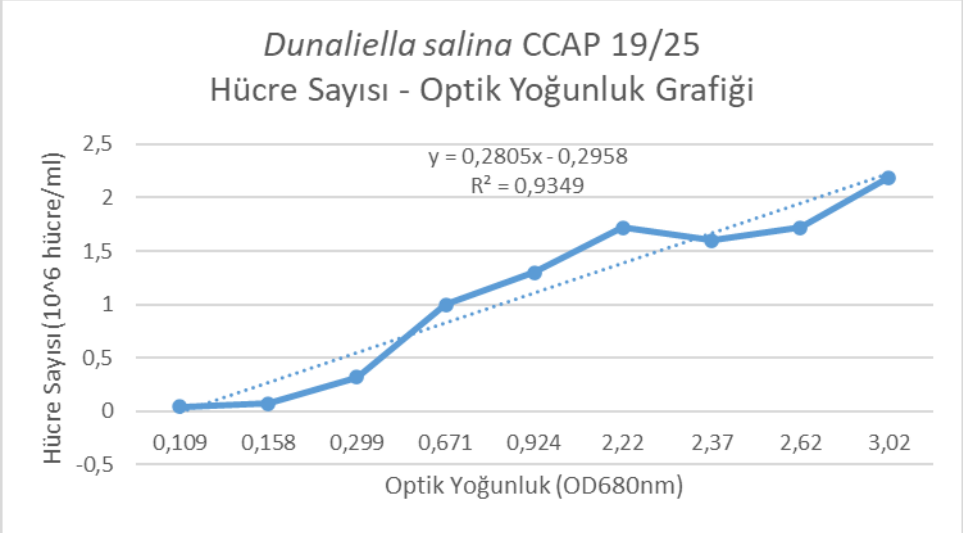
Büyüme takip yöntemi olarak absorbans kullanılıyorsa, öncelikle absorbans ile hücre sayısı arasındaki korelasyonu ve bu ilişkinin farklı kültür koşullarında ne kadar güvenilir olduğunu belirlemek önemlidir. Buna göre kültürlerin AS100 besin ortamında yetiştirilmesi sırasında düzenli olarak alınan örneklerle optik yoğunluğa karşılık gelen hücre sayısı hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ile oluşturulan grafikler aşağıda gösterilmiştir.



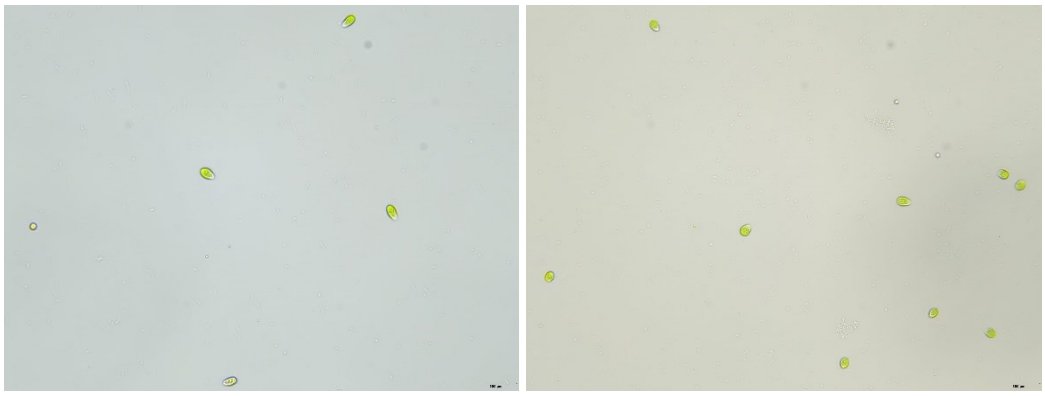
Şekil 4.1 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türüne ait AS100 besin ortamında büyüme grafiği



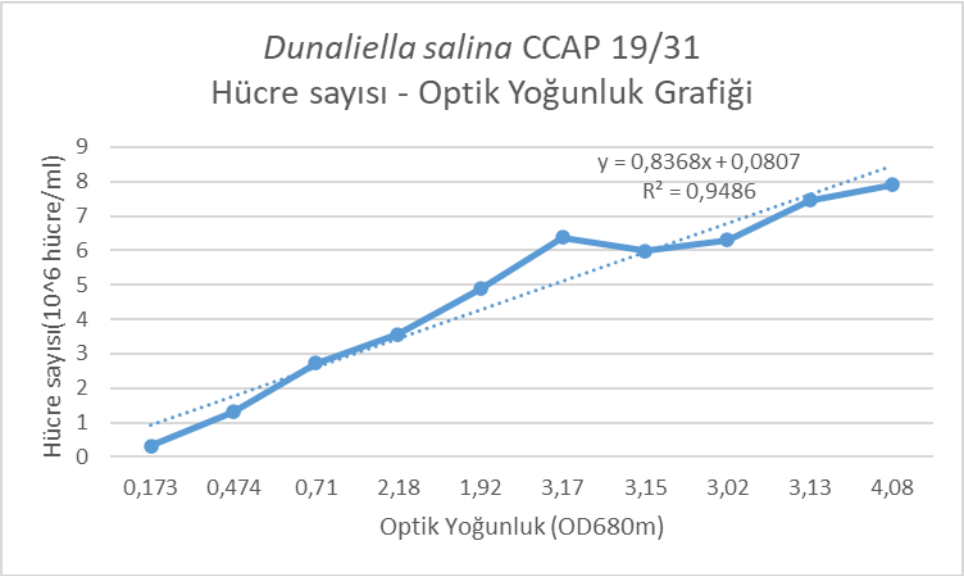
Şekil 4.2 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 hücreleri mikroskop görüntüsü



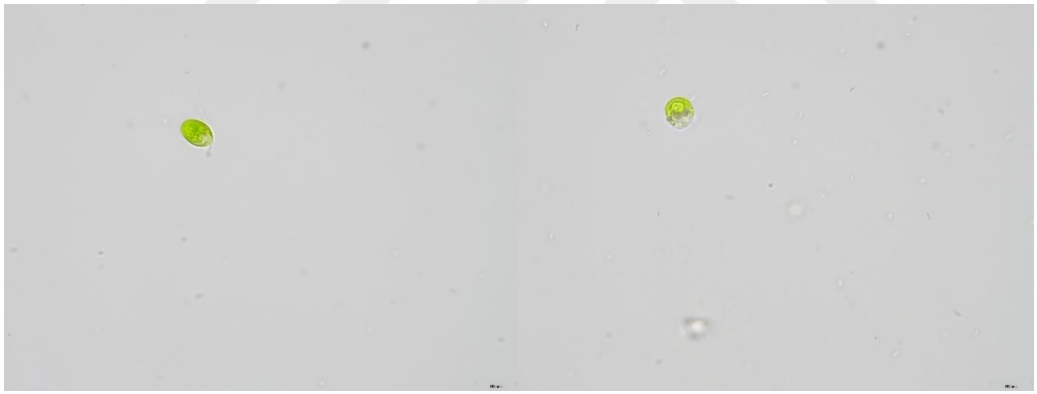
Şekil 4.3 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türüne ait AS100 besin ortamında büyüme grafiği



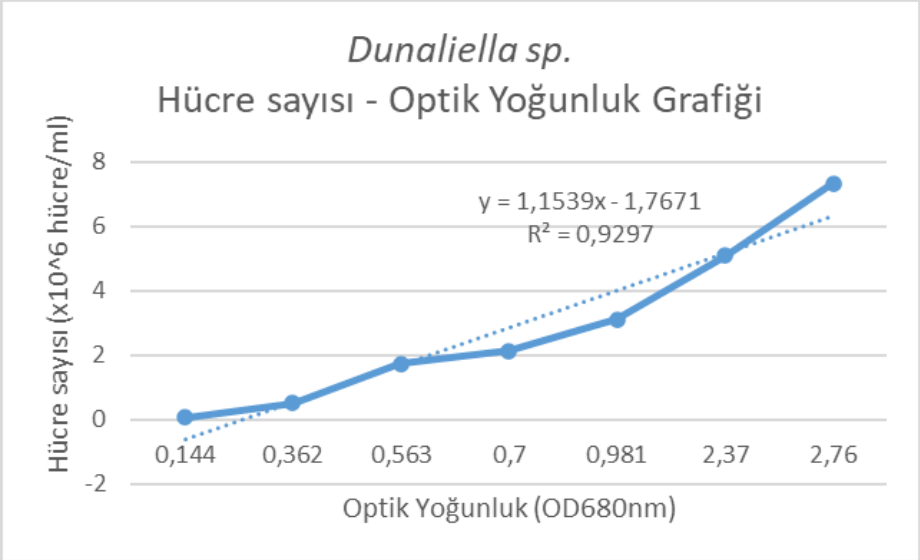
Şekil 4.4 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 hücreleri mikroskop görüntüsü



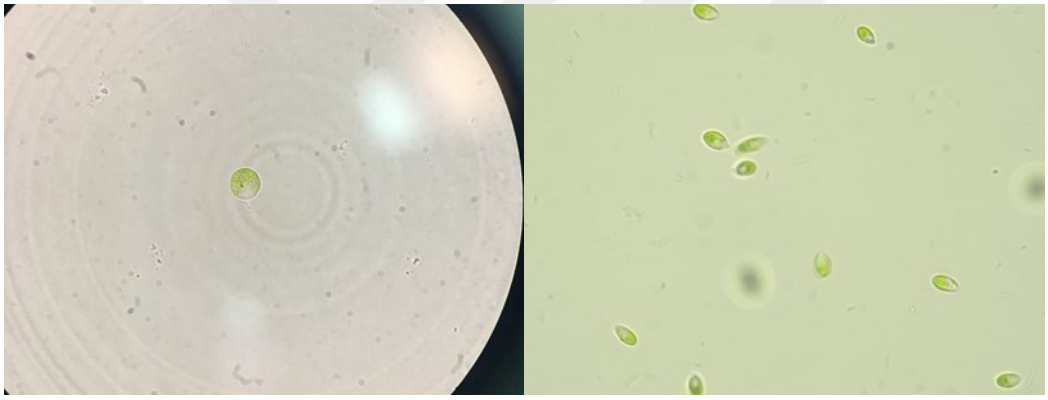
Şekil 4.5 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türüne ait AS100 besin ortamında büyüme grafiği



Şekil 4.6 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 hücreleri mikroskop görüntüsü



Şekil 4.7 *Dunaliella sp.* türüne ait AS100 besin ortamında büyüme grafiği



Şekil 4.8 *Dunaliella sp.* hücreleri mikroskop görüntüsü

Optik yoğunluğa karşılık gelen hücre sayısı verileri ile çalışmada kullanılan tüm *Dunaliella salina* türleri için oluşturulan grafiklerde (Şekil 4.1, Şekil 4.3, Şekil 4.5, Şekil 4.7) korelasyon katsayısının (R^2) değeri ve regresyon denkleminin doğrusallığı, absorbans değerlerini, hücre sayılarına dönüştürmek için kullanılabileceğini göstermektedir.

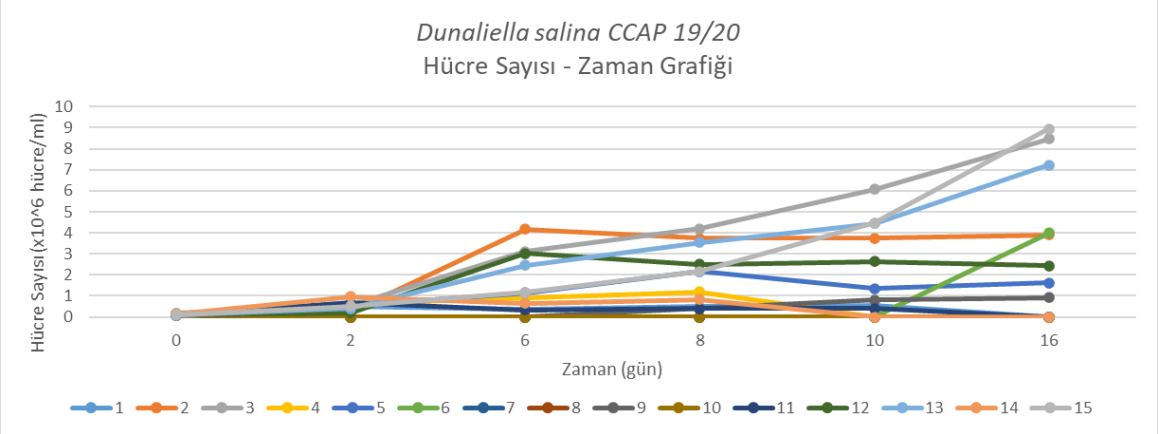
4.1.2 Farklı Karbon Kaynaklarının *Dunaliella salina* Kültürlerinin Büyümesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada farklı organik karbon kaynakları kullanılarak *Dunaliella salina* kültürlerinin büyüme parametreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Düzenli olarak

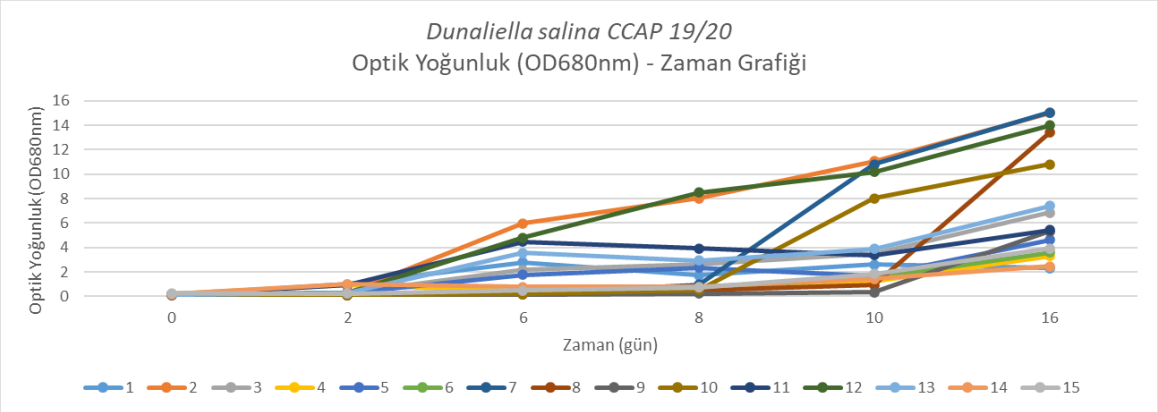
kültürlerden örnek alınarak hücre sayımı, optik yoğunluk (OD 680 nm) ve pH ölçümü yapılmıştır.

4.1.2.1 Farklı Karbon Kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP 19/20 Kültürünün Büyümesi Üzerine Etkisi

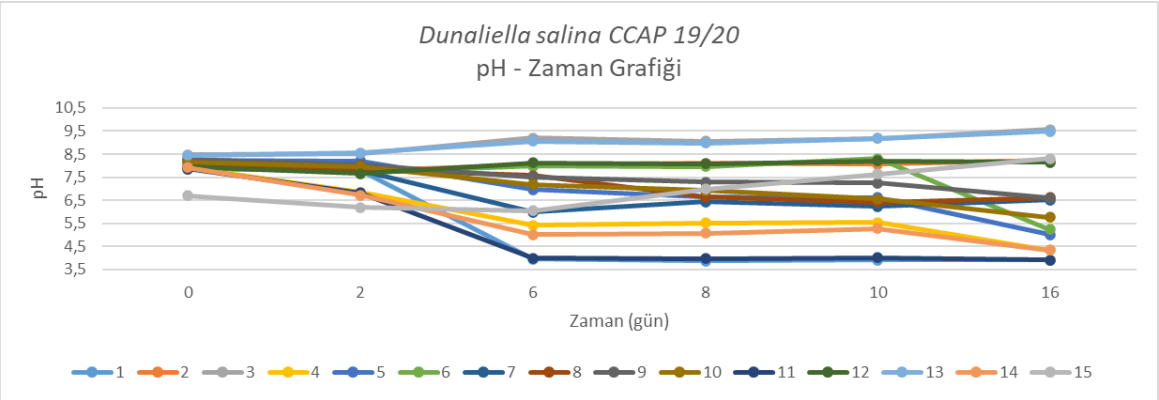
Farklı karbon kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP19/20 türünün büyümesi üzerine etkisini araştırmak üzere 2 deneme planı uygulanmıştır. İlk denemede Tablo 3.4'de belirtilen glikoz, asetik asit ve gliserol içeren formülasyonlar ile büyüme izlenmiştir. Deney sonucu elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.9 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.10 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Optik Yoğunluk – Zaman Grafiği

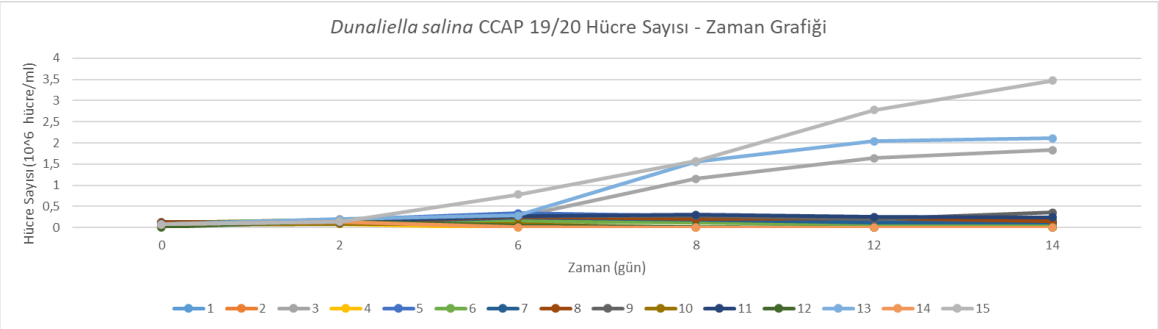


Şekil 4.11 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü pH – Zaman Grafiği

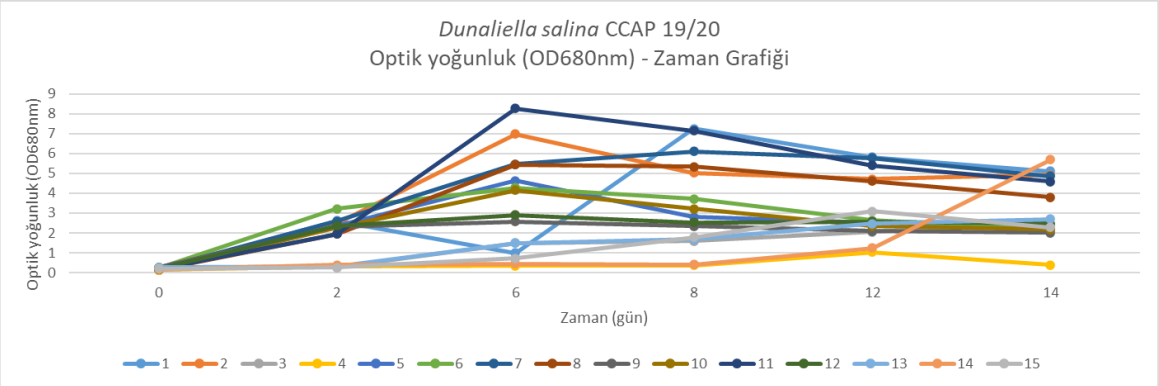
Kültürlerden 16 gün boyunca örnekler alınarak büyüme parametreleri takip edilmiştir. Her formülasyonda hücre sayısının artmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.9). Besin ortamına ek olarak karbon kaynağı içermeyen inorganik AS100 besin ortamı içeren 15 numaralı şişede en yüksek hücre sayısı belirlenmiştir. Ardından en yüksek hücre sayısı, 100 $g.L^{-1}$ asetik asit içeren birbirinin paraleli olan 3 ve 13 (0 $g.L^{-1}$ glikoz, 0 $g.L^{-1}$ gliserol, 100 $g.L^{-1}$ asetik asit) numaralı şişelerde elde edilmiştir. Bu denemede *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü için karbon kaynağı olarak asetik asit, gliserol ve glikoz eklenmesinin, karbon kaynağı eklenmeyen standart AS100 besin ortamında yetişen kültürden daha fazla bir hücre sayısına ulaşmasına katkısı olmadığı görülmüştür.

Optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları çoğu formülasyonda parallellik göstermemektedir (Şekil 4.10). Organik karbon kaynağı olarak glikoz içeren tüm formülasyonlarda pH değerleri başlangıçtan itibaren düşüş göstermiştir (Şekil 4.11). Organik karbon kaynağı içermeyen AS100 besin ortamı (15. formülasyon) ve organik karbon kaynağı olarak sadece asetik asit (3. ve 13.) ve gliserol (2. ve 12.) içeren formülasyonlarda pH değeri başlangıçtan itibaren yükselmiştir. Design-Expert programı ile hazırlanan deney planına göre paralel formülasyonlar olan 1-11. (100 $g.L^{-1}$ glikoz, 0 $g.L^{-1}$ gliserol, 0 $g.L^{-1}$ asetik asit), 2-12. (0 $g.L^{-1}$ glikoz, 100 $g.L^{-1}$ gliserol, 0 $g.L^{-1}$ asetik asit), 3-13. ve 4-14. (50 $g.L^{-1}$ glikoz, 50 $g.L^{-1}$ gliserol, 0 $g.L^{-1}$ asetik asit) formülasyonları kendi aralarında tutarlı sonuçlar göstermiştir.

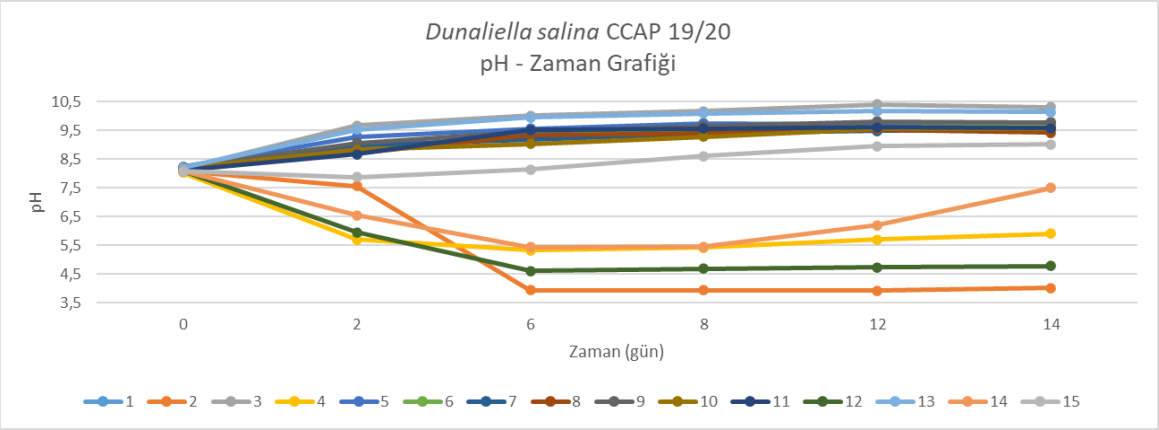
Sonraki karbon kaynağı denemesinde Tablo 3.5'de belirtilen glikoz, sodyum asetat ve sodyum bikarbonat içeren formülasyonlar ile büyüme izlenmiştir. Deney sonucu elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.12 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.13 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği



Şekil 4.14 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü pH – Zaman Grafiği

Analiz sonuçları incelendiğinde 14.günde karbon kaynağı kullanılmayan 15 numaralı AS100 besin ortamında hücre sayımları sonuçlarının diğer formülasyonlardan daha yüksek hücre sayısına ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.12). Ayrıca paralel formülasyon olan 3 ve 13 numaralı (0 $g.L^{-1}$ sodyum asetat, 0 $g.L^{-1}$ glikoz, 5 $g.L^{-1}$ sodyum bikarbonat) 5 $g.L^{-1}$ sodyum bikarbonat içeren şişelerdeki

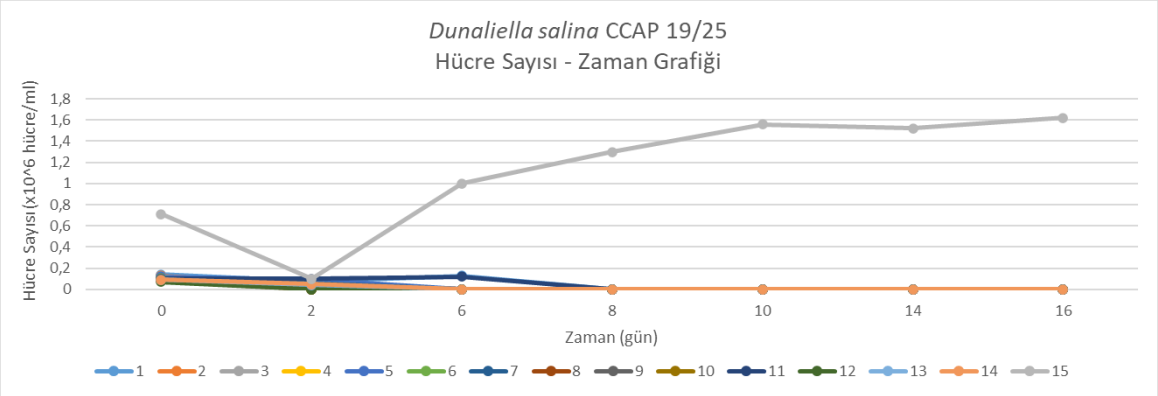
kültürlerin de hücre sayısında artış görülmüştür. Ancak bu artış 15 numaralı formülasyondaki artıştan düşüktür.

Optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları çoğu formülasyonda parallellik göstermemektedir (Şekil 4.13). Organik karbon kaynağı olarak sadece glikoz içeren 2. ve 12. paralel formülasyonda (0 $g.L^{-1}$ sodyum asetat, 5 $g.L^{-1}$ glikoz, 0 $g.L^{-1}$ sodyum bikarbonat) pH değerleri başlangıçtan itibaren düşüş göstermiştir. Ayrıca 2,5 $g.L^{-1}$ glikoz, 2,5 $g.L^{-1}$ sodyum asetat içeren 4 ve 14 numaralı denemede de *Dunaliella salina* hücrelerinin optimum pH aralığının altında kalan pH değerleri gözlenmiştir (Şekil 4.13). Organik karbon kaynağı içermeyen AS100 besin ortamı (15.formülasyon) ve diğer formülasyonlarda pH değeri başlangıçtan itibaren yükselmiştir. Design-Expert programı ile hazırlanan deney planına göre paralel formülasyonlar olan 1-11. (5 $g.L^{-1}$ sodyum asetat, 0 $g.L^{-1}$ glikoz, 0 $g.L^{-1}$ sodyum bikarbonat), 2-12., 3-13. ve 4-14. formülasyonlar kendi aralarında tutarlı sonuçlar göstermiştir.

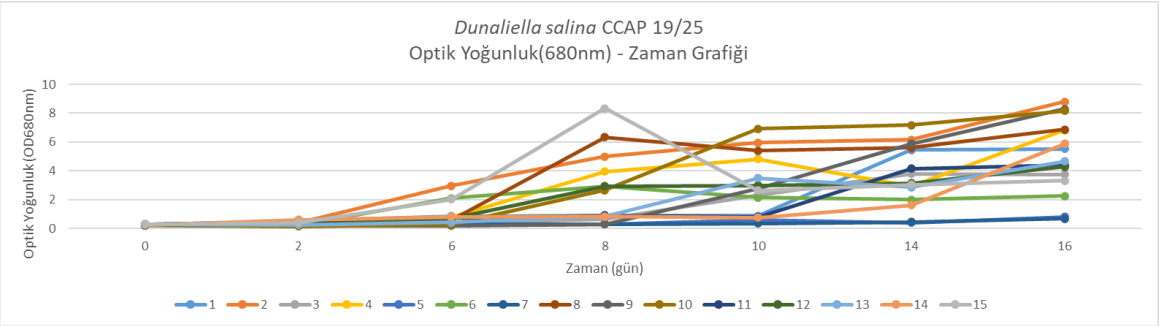
Buna göre *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü yetiştirmek için ek karbon kaynağı kullanımının hücre sayısı artışına fazladan bir etki etmediği sonucu elde edilmiştir.

4.1.2.2 Farklı Karbon Kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP 19/25 Kültürünün Büyümesi Üzerine Etkisi

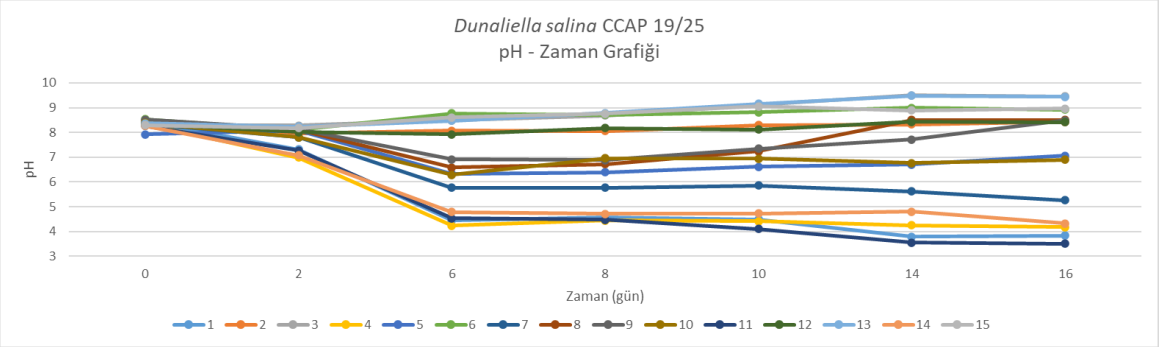
Farklı karbon kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP19/25 türünün büyümesi üzerine etkisini araştırmak üzere Tablo 3.4'de belirtilen glikoz, asetik asit ve gliserol içeren formülasyonlar ile büyüme izlenmiştir. Deney sonucu elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.15 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.16 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği



Şekil 4.17 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü pH – Zaman Grafiği

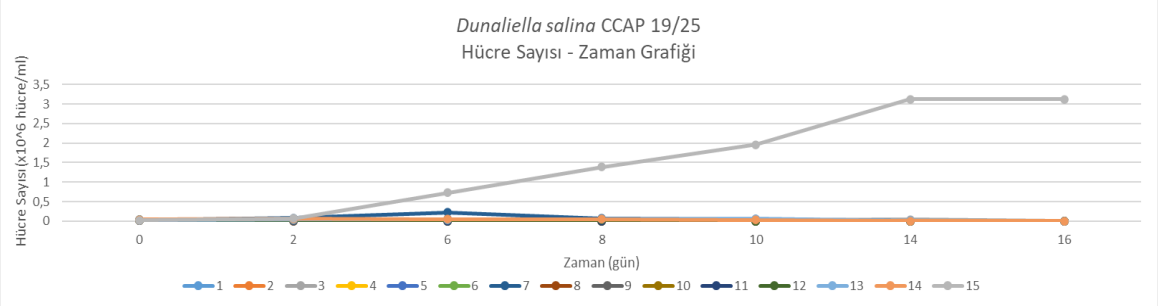
Kültürlerden 16 gün boyunca örnekler alınarak büyüme parametreleri takip edilmiştir. Besin ortamına ek olarak karbon kaynağı içermeyen inorganik AS100 besin ortamı içeren 15 numaralı deneme hariç hiçbir formülasyonda hücre artışı gözlenmemiştir (Şekil 4.15).

Optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları parallellik göstermemektedir (Şekil 4.16). Organik karbon kaynağı olarak glikoz içeren tüm formülasyonlarda pH değerleri başlangıçtan itibaren düşüş göstermiştir (Şekil 4.17). Organik karbon kaynağı içermeyen AS100 besin ortamı (15. formülasyon) ve organik karbon kaynağı olarak sadece asetik asit (3. ve 13.) ve gliserol (2. ve 12.) içeren formülasyonlarda pH değeri başlangıçtan itibaren yükselmiştir. Design-Expert programı ile hazırlanan deney planına göre paralel formülasyonlar olan 1-11. (100 $g.L^{-1}$ glikoz, 0 $g.L^{-1}$ gliserol, 0 $g.L^{-1}$ asetik asit), 2-12. (0 $g.L^{-1}$ glikoz, 100 $g.L^{-1}$ gliserol, 0 $g.L^{-1}$ asetik asit), 3-13. ve 4-14. (50 $g.L^{-1}$ glikoz, 50 $g.L^{-1}$ gliserol, 0 $g.L^{-1}$ asetik asit) formülasyonlar kendi aralarında tutarlı sonuçlar göstermiştir.

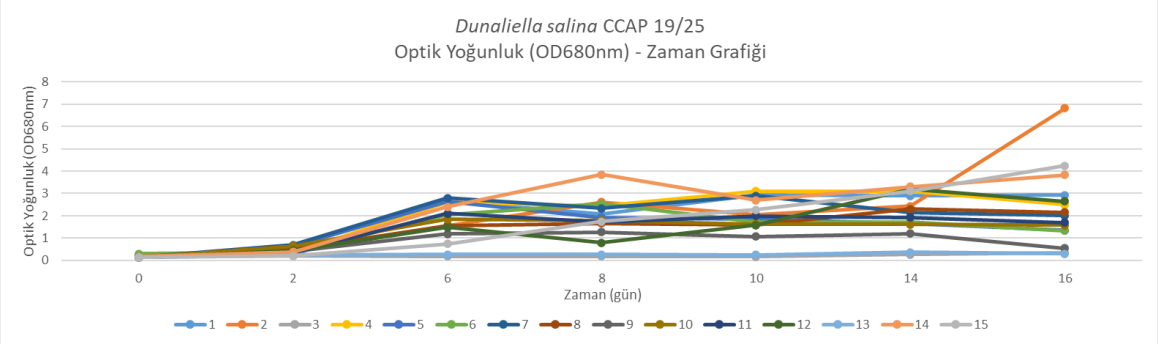
Bu denemede *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü için karbon kaynağı olarak asetik asit, gliserol ve glikoz eklenmesinin, karbon kaynağı eklenmeyen standart AS100

besin ortamında yetişen kültürden daha fazla bir hücre sayısına ulaşmasına katkısı olmadığı görülmüştür.

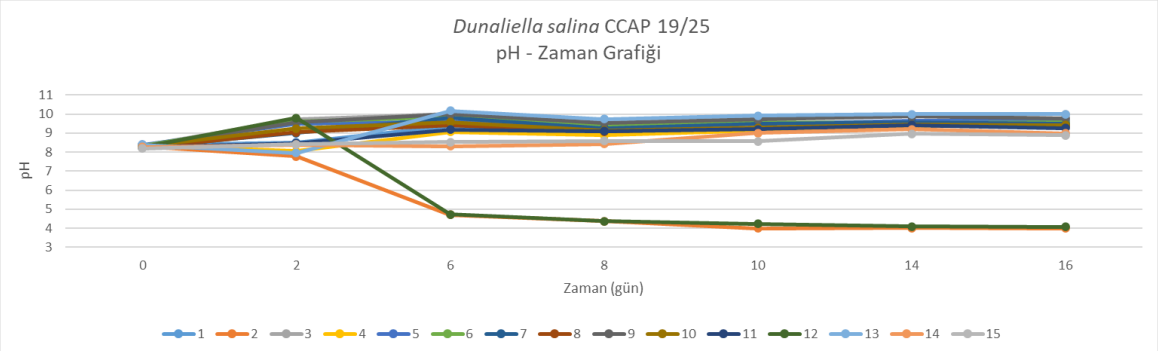
Sonraki karbon kaynağı denemesinde Tablo 3.5'de belirtilen glikoz, sodyum asetat ve sodyum bikarbonat içeren formülasyonlar ile büyüme izlenmiştir. Deney sonucu elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.18 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.19 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği



Şekil 4.20 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü pH – Zaman Grafiği

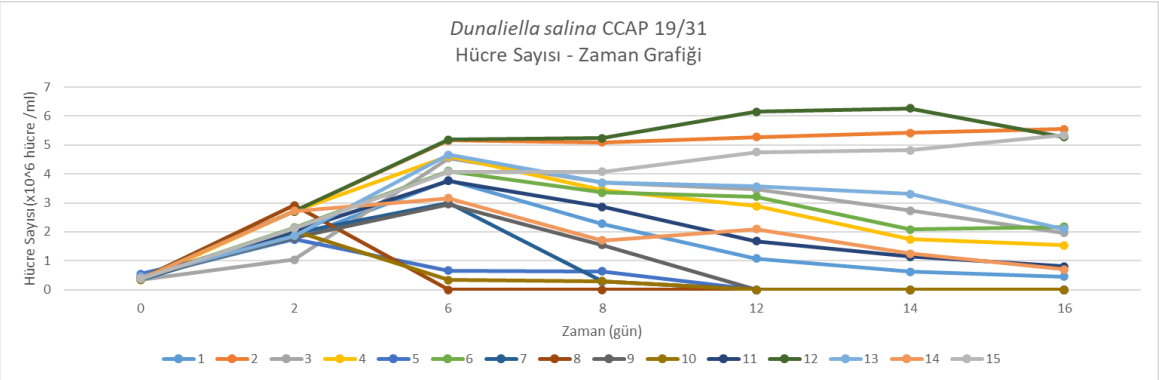
16 gün süren deneme sonuçlarına göre karbon kaynağı kullanılmayan sadece 15 numaralı AS100 besin ortamında hücre sayısında artış gözlenmiştir. Diğer formülasyonlarda hücre sayısında artış elde edilmemiştir (Şekil 4.18).

Optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları parallellik göstermemektedir (Şekil 4.19). Organik karbon kaynağı olarak sadece glikoz içeren 2. ve 12. paralel formülasyonda (0 $g.L^{-1}$ sodyum asetat, 5 $g.L^{-1}$ glikoz, 0 $g.L^{-1}$ sodyum bikarbonat) pH değerleri başlangıçtan itibaren düşüş gözlenmiştir. Organik karbon kaynağı içermeyen AS100 besin ortamı (15. formülasyon) ve diğer formülasyonlarda pH değeri başlangıçtan itibaren yükselmiştir (Şekil 4.20). Design-Expert programı ile hazırlanan deney planına göre paralel formülasyonlar olan 1-11. (5 $g.L^{-1}$ sodyum asetat, 0 $g.L^{-1}$ glikoz, 0 $g.L^{-1}$ sodyum bikarbonat), 2-12. (0 $g.L^{-1}$ sodyum asetat, 5 $g.L^{-1}$ glikoz, 0 $g.L^{-1}$ sodyum bikarbonat), 3-13. (0 $g.L^{-1}$ sodyum asetat, 0 $g.L^{-1}$ glikoz, 5 $g.L^{-1}$ sodyum bikarbonat) ve 4-14. (2,5 $g.L^{-1}$ sodyum asetat, 2,5 $g.L^{-1}$ glikoz, 0 $g.L^{-1}$ sodyum bikarbonat) formülasyonlar kendi aralarında tutarlı sonuçlar göstermiştir.

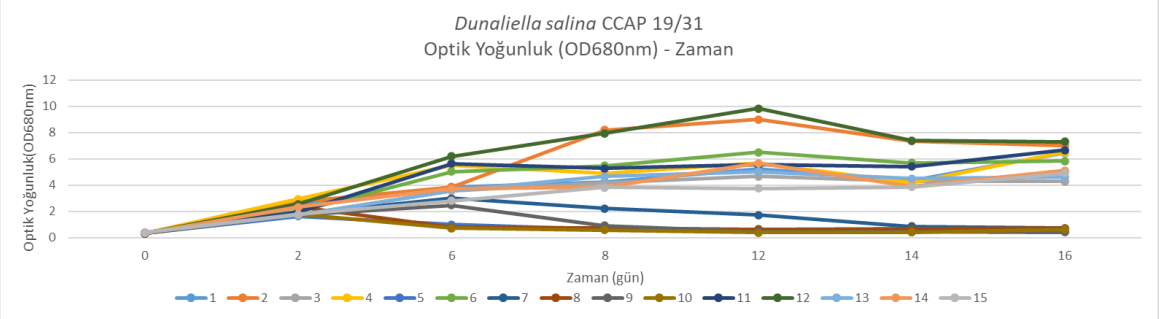
Buna göre *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü yetiştirmek için ek karbon kaynağı kullanımının hücre sayısı artışına fazladan bir etki etmediği sonucu elde edilmiştir.

4.1.2.3 Farklı Karbon Kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP 19/31 Kültürünün Büyümesi Üzerine Etkisi

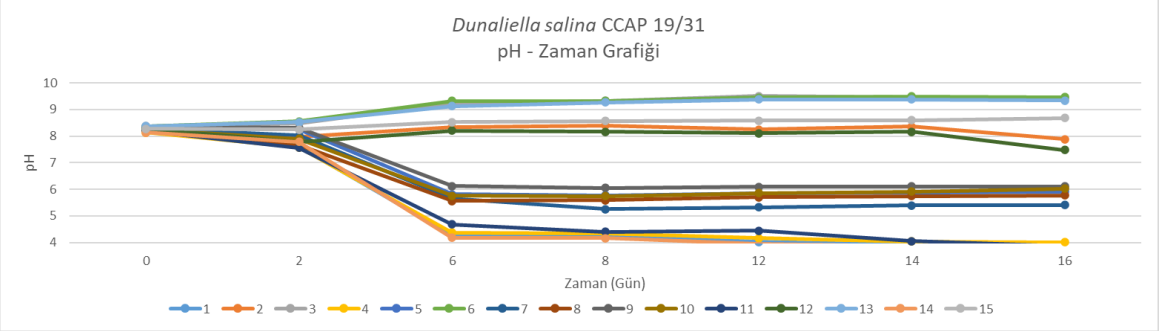
Farklı karbon kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP19/31 türünün büyümesi üzerine etkisini araştırmak üzere ilk olarak Tablo 3.4'de belirtilen glikoz, asetik asit ve gliserol içeren formülasyonlar ile deneme yapılmıştır. Deney sonucu elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.21 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.22 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği



Şekil 4.23 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü pH – Zaman Grafiği

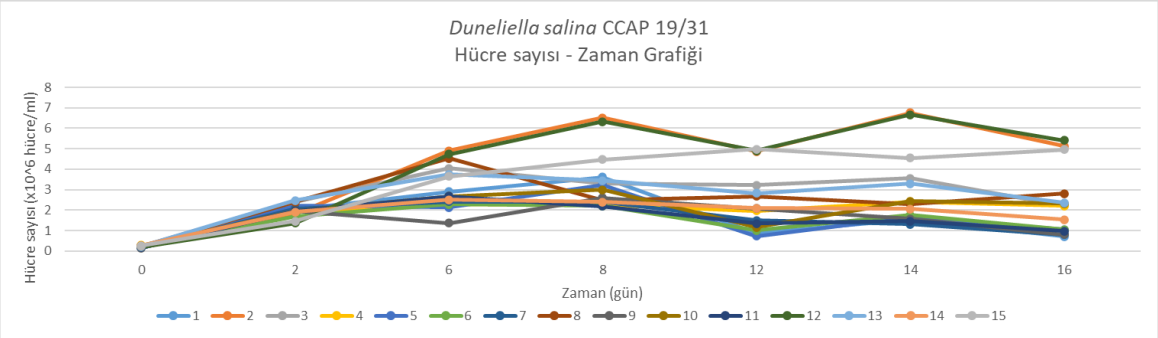
15 formülasyonun 16 gün örnekler alınarak büyüme parametrelerinin takibi sonucu elde edilen sonuçlara göre besin ortamına ek olarak karbon kaynağı içermeyen inorganik AS100 besin ortamı içeren 15 numaralı formülasyonda ve gliserol (2. ve 12.) içeren formülasyonlarda birbirlerine yakın hücre sayısı gözlenmiştir (Şekil 4.21).

Optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları parallellik göstermemektedir (Şekil 4.22). Organik karbon kaynağı olarak glikoz içeren tüm formülasyonlarda pH değerleri başlangıçtan itibaren düşüş göstermiştir. Organik

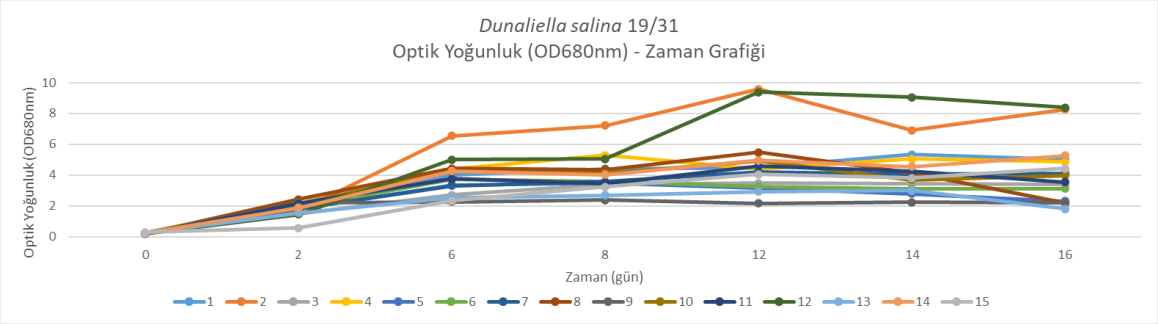
karbon kaynağı içermeyen AS100 besin ortamı (15. formülasyon) ve organik karbon kaynağı olarak sadece asetik asit (3. ve 13.) içeren formülasyonlarda pH değeri başlangıçtan itibaren yükselmiştir. Gliserol (2. ve 12.) içeren formülasyonlarda ise pH değeri başlangıç değerlerine yakın sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.23). Design-Expert programı ile hazırlanan deney planına göre paralel formülasyonlar olan 1-11. (100 $g.L^{-1}$ glikoz, 0 $g.L^{-1}$ gliserol, 0 $g.L^{-1}$ asetik asit), 2-12. (0 $g.L^{-1}$ glikoz, 100 $g.L^{-1}$ gliserol, 0 $g.L^{-1}$ asetik asit), 3-13. ve 4-14. (50 $g.L^{-1}$ glikoz, 50 $g.L^{-1}$ gliserol, 0 $g.L^{-1}$ asetik asit) formülasyonlar kendi aralarında tutarlı sonuçlar göstermiştir.

Bu denemede *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü için karbon kaynağı olarak asetik asit, gliserol ve 100 $g.L^{-1}$ glikoz eklenmesinin, karbon kaynağı eklenmeyen standart AS100 besin ortamında yetişen kültürden daha fazla bir hücre sayısına ulaşmasına katkısı olmadığı görülmüştür.

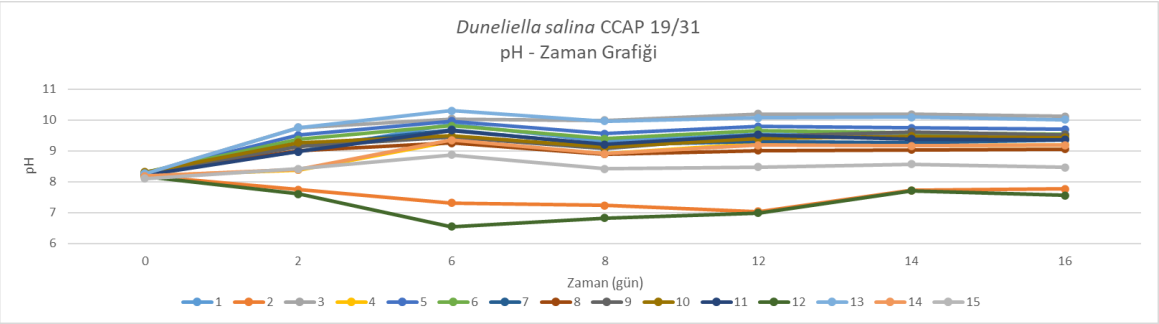
Sonraki karbon kaynağı denemesinde Tablo 3.5'de belirtilen glikoz, sodyum bikarbonat ve sodyum asetat içeren formülasyonlar ile büyüme izlenmiştir. Deney sonucu elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.24 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.25 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği



Şekil 4.26 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü pH – Zaman Grafiği

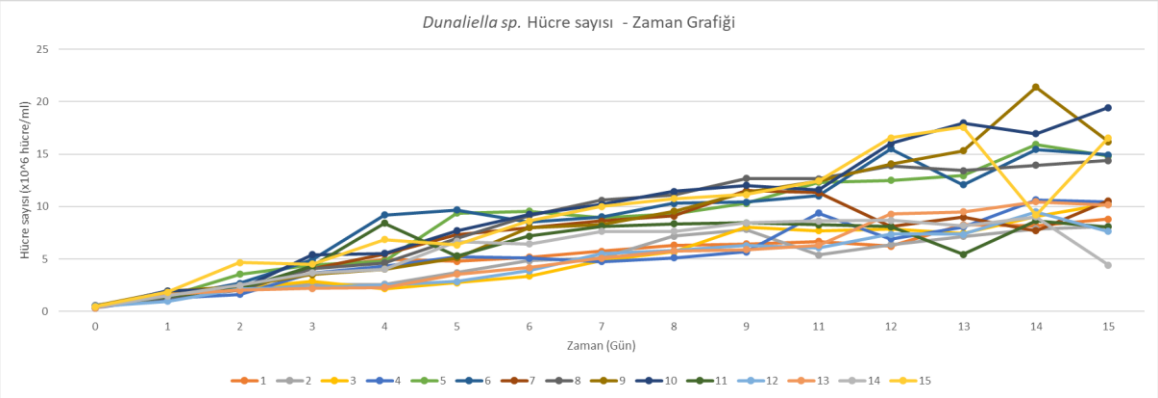
16 gün süren deneme sonuçlarına göre organik karbon kaynağı olarak 5g.L^{-1} glikoz kullanılan 2 ve 12 numaralı formülasyonlarda karbon kaynağı kullanılmayan 15 numaralı AS100 besin ortamından daha fazla hücre sayısı elde edilmiştir. Diğer formülasyonlarda hücre sayısında 15.formülasyondaki hücre sayısından daha yüksek sonuçlar gözlenmemiştir (Şekil 4.24).

Optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları parallellik göstermemektedir (Şekil 4.25). Organik karbon kaynağı olarak sadece glikoz içeren 2. ve 12. paralel formülasyonda pH değerleri başlangıçtan itibaren düşüş göstermiştir. Ancak bu değerler, büyümeyi inhibe edecek optimum pH aralığı dışında pH değerleri olmamıştır. Organik karbon kaynağı içermeyen AS100 besin ortamı (15. formülasyon) ve diğer formülasyonlarda pH değeri başlangıçtan itibaren yükselmiştir (Şekil 4.26). Design-Expert programı ile hazırlanan deney planına göre paralel formülasyonlar olan 1-11. (5 g.L^{-1} sodyum asetat, 0 g.L^{-1} glikoz, 0 g.L^{-1} sodyum bikarbonat), 2-12. (0 g.L^{-1} sodyum asetat, 5 g.L^{-1} glikoz, 0 g.L^{-1} sodyum bikarbonat), 3-13. (0 g.L^{-1} sodyum asetat, 0 g.L^{-1} glikoz, 5 g.L^{-1} sodyum bikarbonat) ve 4-14. (2,5 g.L^{-1} sodyum asetat, 2,5 g.L^{-1} glikoz, 0 g.L^{-1} sodyum bikarbonat) formülasyonlar kendi aralarında tutarlı sonuçlar göstermiştir.

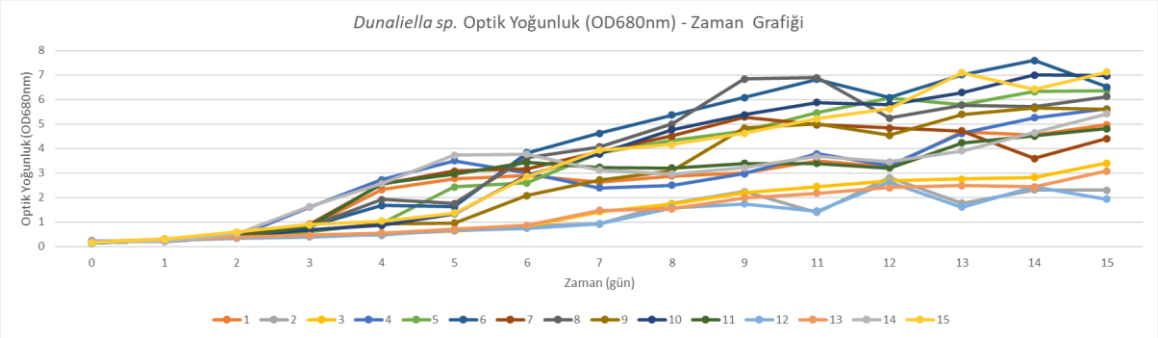
Buna göre *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü yetiştirmek için ek karbon kaynağı olarak 5 g.L^{-1} glikoz kullanımının hücre sayısı artışına fazladan bir etki gösterebileceği ancak glikoz oranı 100 g.L^{-1} olduğunda aynı etkiyi göstermediği sonucu elde edilmiştir.

4.1.2.4 Farklı Karbon Kaynaklarının *Dunaliella sp.* Kültürünün Büyümesi Üzerine Etkisi

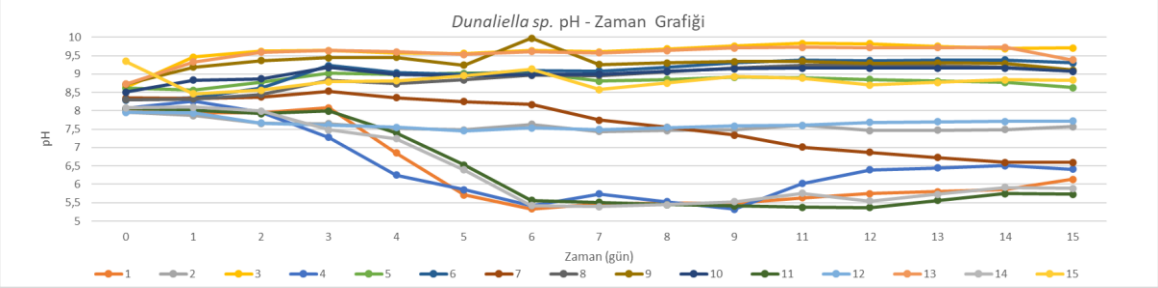
Farklı karbon kaynaklarının *Dunaliella sp.* türünün büyümesi üzerine etkisini araştırmak üzere ilk olarak Tablo 3.4'de belirtilen glikoz, asetik asit ve gliserol içeren formülasyonlar ile büyüme incelenmiştir. Deney sonucu elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.27 *Dunaliella sp.* türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.28 *Dunaliella sp.* türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği



Şekil 4.29 *Dunaliella sp.* türü pH – Zaman Grafiği

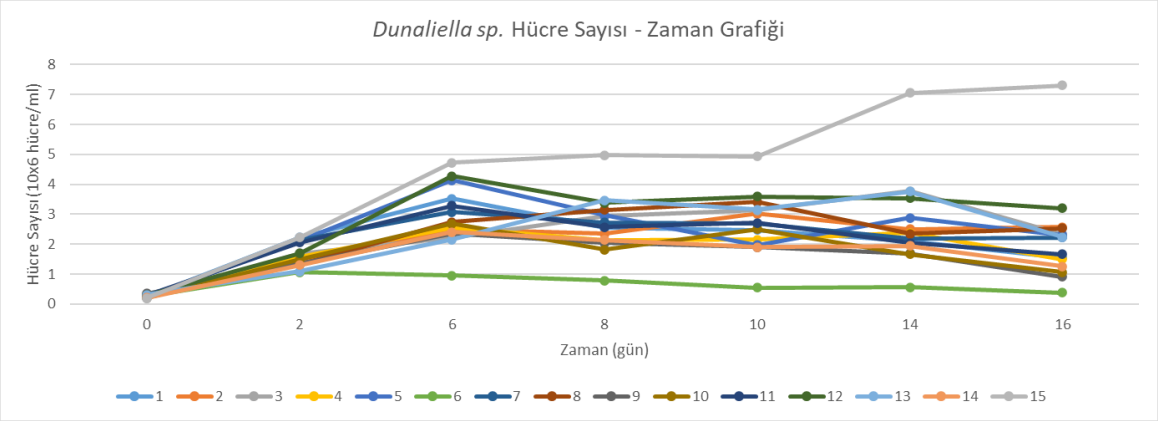
Kültürlerden 15 gün boyunca örnekler alınarak büyüme parametreleri takip edilmiştir. Her formülasyonda hücre sayısının arttığı gözlenmiştir.

Formülasyonların çoğunda karbon kaynağı kullanılmayan standart AS100 besin ortamından daha az yada yaklaşık hücre sayısı artışı gözlendi. Ayrıca gliserol, glikoz ve asetik asitin tek karbon kaynağı olarak kullanıldığı formülasyonlarda 3 kaynağın da farklı oranlarda karıştırılarak hazırlanan formülasyonlara göre daha düşük hücre sayısına ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.27).

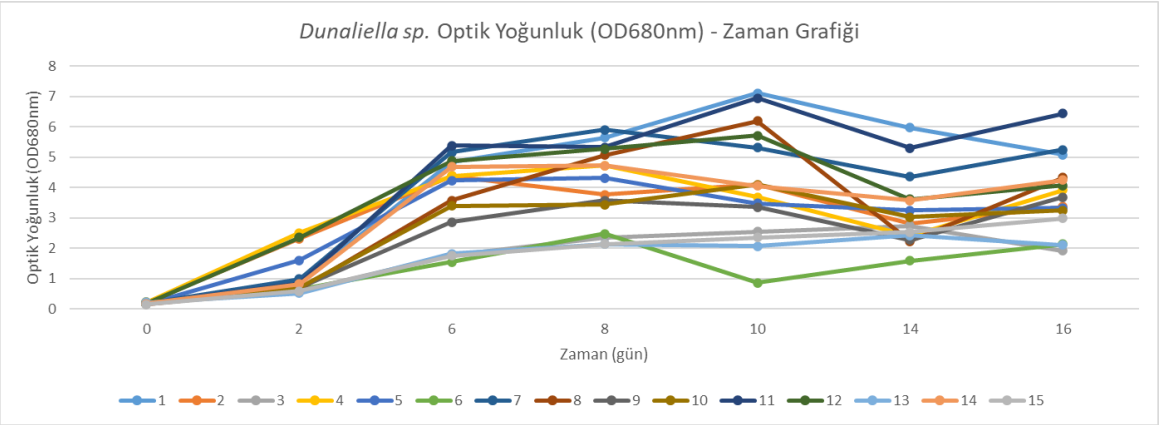
Glikozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı formülasyonlarda en yüksek hücre sayısına sahip formülasyon (9. Formülasyon) hariç tümünde pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Ayrıca glikozun tek karbon kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalarda da hücre sayısı standart AS100 ortamındaki hücre sayısından daha düşüktür.

Değerlendirme sonuçlarına göre 16,66 $g.L^{-1}$ glikoz, 16,66 $g.L^{-1}$ gliserol ve 66,66 $g.L^{-1}$ asetik asit içeriğine sahip formülasyon (9 numaralı formülasyon) maksimum büyümenin görüldüğü formülasyon olarak belirlenmiştir.

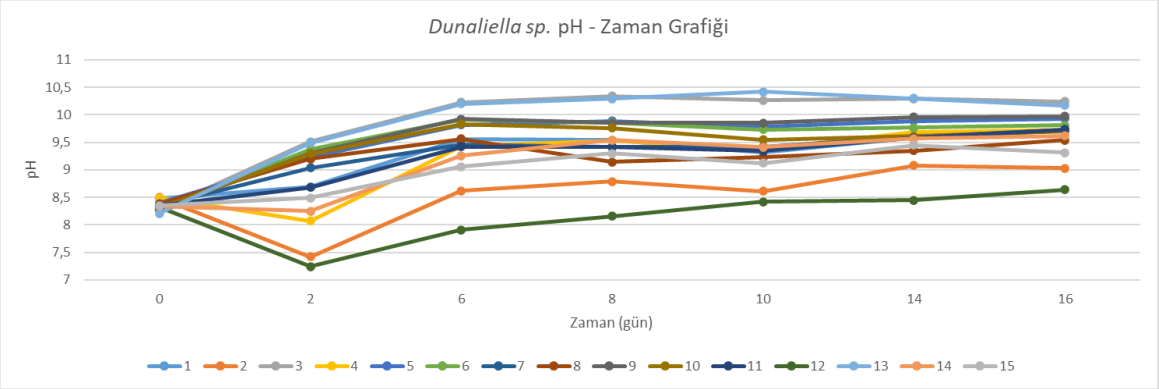
Sonraki karbon kaynağı denemesinde Tablo 3.5'de belirtilen glikoz, sodyum bikarbonat ve sodyum asetat içeren formülasyonlar ile büyüme izlenmiştir. Deney sonucu elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.30 *Dunaliella sp.* türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.31 *Dunaliella sp.* türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği



Şekil 4.32 *Dunaliella sp.* türü pH – Zaman Grafiği

Kültürlerden 16 gün boyunca örnekler alınarak büyüme parametreleri takip edilmiştir. Her formülasyonda hücre sayısında artış gözlenmiştir. Karbon kaynağı olarak glikoz kullanılan formülasyonlarda diğer besin ortamlarından fazla hücre sayısı elde edilmiştir ancak organik karbon kullanılmayan standart AS100 besin ortamının hücre sayısının altında kalmıştır (Şekil 4.30).

Glikozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı formülasyonlarda pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir ancak hücre sayısı diğer formülasyonlara göre yüksektir (Şekil 4.31).

Dunaliella sp. türü ile yapılan bir önceki organik karbon kaynağı çalışmasında 16,66 $g.L^{-1}$ glikoz, 16,66 $g.L^{-1}$ gliserol ve 66,66 $g.L^{-1}$ asetik asit içeriğine sahip formülasyonda standart AS100 besin ortamından fazla hücre sayısı elde edilmiştir. Karbon kaynaklarının tek olarak kullanıldığı formülasyonlarda kayda değer bir büyümeyi teşvik edici durum söz konusu olmamıştır. Ancak bu çalışmada karbon

kaynakları tek olarak kullanıldıklarında büyümede etkisi olmadığı gibi karışım halinde kullanıldıklarında da büyümeye etkileri olmamıştır.

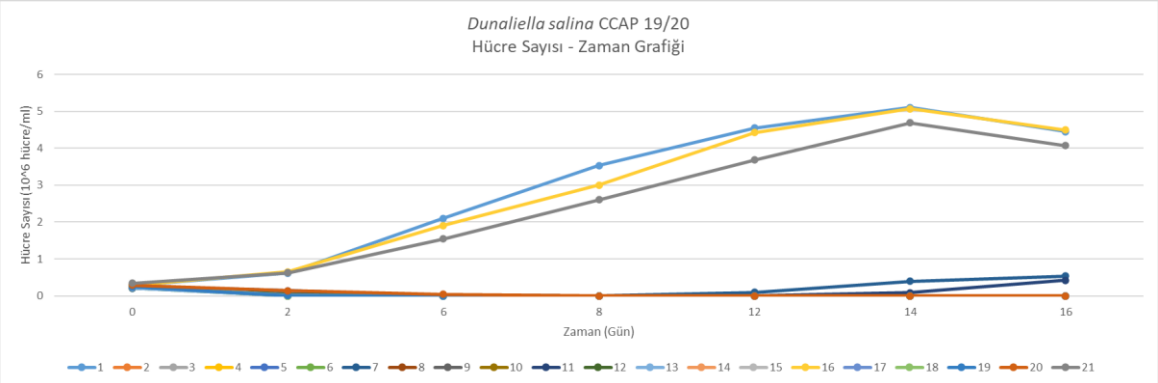
Dunaliella sp. türü ile yapılan 2 farklı karbon kaynağı denemesinde de optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımlarında parallellik görülmemiştir (Şekil 4.28, Şekil 4.31). Her iki deneyde de Design-Expert programı ile hazırlanan deney planına göre paralel formülasyonlar olan 1-11, 2-12., 3-13. ve 4-14. formülasyonlar kendi aralarında tutarlı sonuçlar göstermiştir.

4.1.3 Farklı Azot Kaynaklarının *Dunaliella salina* Kültürlerinin Büyümesi Üzerine Etkisi

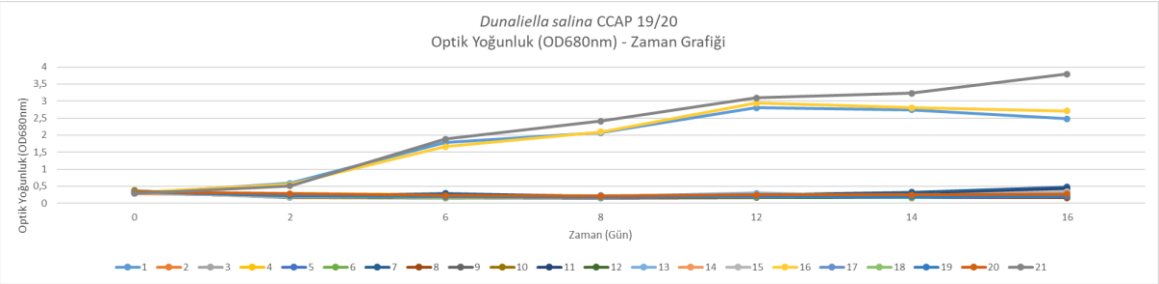
Bu çalışmada farklı azot kaynakları kullanılarak *Dunaliella salina* kültürlerinin büyüme parametreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Düzenli olarak kültürlerden örnek alınarak hücre sayımı, optik yoğunluk (OD 680 nm) ve pH ölçümü yapılmıştır.

4.1.3.1 Farklı Azot Kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP 19/20 Kültürünün Büyümesi Üzerine Etkisi

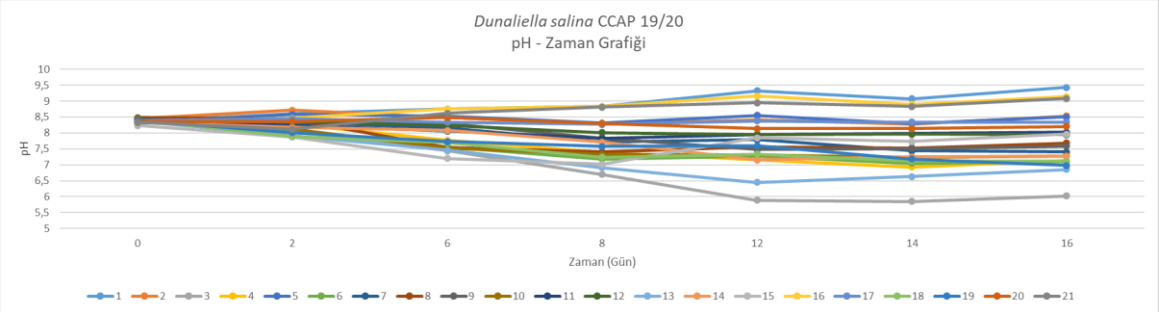
Farklı azot kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türünün hücre büyümesine etkisini incelemek üzere Tablo 3.6' da belirtilen formülasyonlarda sodyum nitrat ($NaNO_3$), üre (CH_4N_2O), amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), amonyum hidroksit (NH_4OH) azot kaynakları ile deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçların grafikleri aşağıda belirtilmiştir.



Şekil 4.33 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.34 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği



Şekil 4.35 *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türü pH – Zaman Grafiği

Kültürlerden 16 gün boyunca örnekler alınarak büyüme parametreleri takip edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan *Dunaliella salina* CCAP 19/20 mikroalg türünün azot kaynağı olarak nitratı verimli bir şekilde kullandığı ancak üre, amonyum sülfat ve amonyağı aynı şekilde kullanamadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.33). Azot kaynağı olarak sadece sodyum nitratın kullanıldığı 1 ve 16 numaralı paralel formülasyonlarda hücre sayısı başlangıçtan itibaren artmış ve 16.günde $4{,}45x10^{6}$, $4{,}89x10^{6}$ hücre/ml olarak hesaplanmıştır. 21 numaralı standart AS100 besin ortamında $4{,}07x10^{6}$ hücre/ml ile bu çalışmadaki 3. en yüksek hücre sayısı gözlenmiştir. AS100 besin ortamı formülasyonunda sodyum nitrattan gelen azot miktarı 0,33 $g.L^{-1}$, bu çalışmada ise 1 $g.L^{-1}$'dir. Bu durumda *Dunaliella salina* CCAP 19/20 türünü yetiştirmek için kullanılan sodyum nitrat miktarı arttırılabilir sonucu elde edilmektedir. Kullanılan diğer azot kaynaklarında başlangıçtan itibaren hücre sayısının hızla düştüğü gözlenmiştir. 8.günden sonra ise hücre sayısında yavaş bir artış başlamıştır.

Azot kaynağı olarak sadece amonyum ile desteklenmiş 3. ve 18. formülasyonlarda, pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.35). Ancak azot kaynağının sodyum nitrat olduğu 1., 16. ve 21. formülasyonlarda pH değerlerinin başlangıçtan itibaren

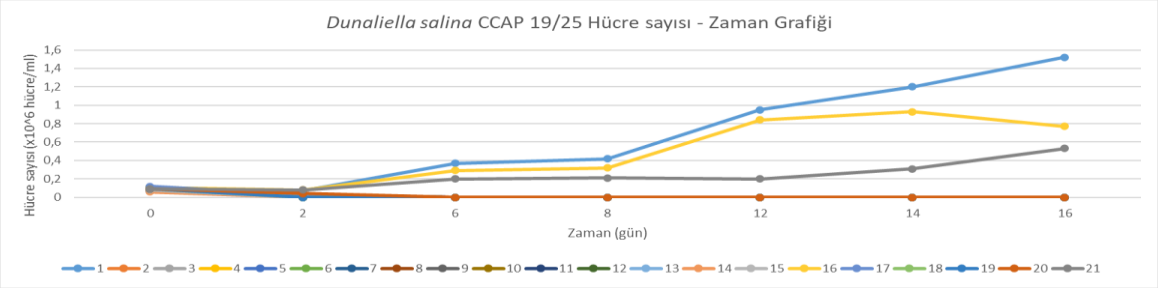
yükseldiği gözlenmiştir. Diğer azot kaynaklarında pH değerleri başlangıç değerlerine yakın olarak devam etmiştir.

Dunaliella salina CCAP 19/20 türü ile yapılan bu çalışmada optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları arasında parallellik görülmemiştir (Şekil 4.34).

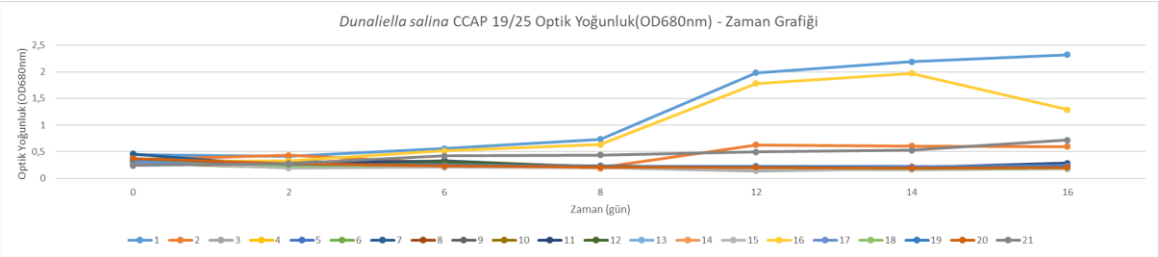
Design-Expert programı ile hazırlanan deney planına göre paralel formülasyonlar olan 1-16. (1 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre ,0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 2-17. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 1 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 3-18. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre, 1 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 4-19. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 1 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit) ve 5-20. (0,5 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0,5 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit) formülasyonları kendi aralarında tutarlı sonuçlar göstermiştir.

4.1.3.2 Farklı Azot Kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP 19/25 Kültürünün Büyümesi Üzerine Etkisi

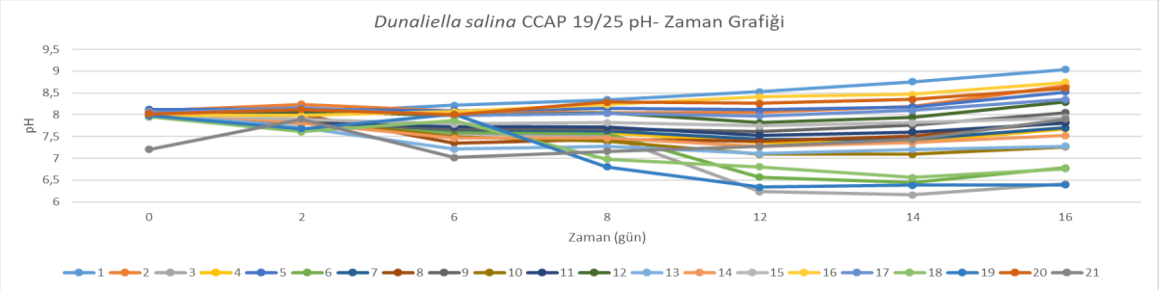
Farklı azot kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türünün hücre büyümesine etkisini incelemek üzere Tablo 3.6' da belirtilen formülasyonlarda sodyum nitrat ($NaNO_3$), üre (CH_4N_2O), amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), amonyum hidroksit (NH_4OH) azot kaynakları ile deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçların grafikleri aşağıda belirtilmiştir.



Şekil 4.36 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.37 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği



Şekil 4.38 *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türü pH – Zaman Grafiği

Kültürlerden 16 gün boyunca örnekler alınarak büyüme parametreleri takip edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan *Dunaliella salina* CCAP 19/25 mikroalg türünün azot kaynağı olarak nitratı verimli bir şekilde kullandığı ancak üre, amonyum sülfat ve amonyağı aynı şekilde kullanamadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.36). Azot kaynağı olarak sadece sodyum nitratın kullanıldığı 1 ve 16 numaralı paralel formülasyonlarda hücre sayısı başlangıçtan itibaren artmış ve 16.günde $1{,}52x10^6$, $0{,}77x10^6$ hücre/ml olarak hesaplanmıştır. 21 numaralı standart AS100 besin ortamında $0{,}53x10^6$ hücre/ml ile bu çalışmadaki 3. en yüksek hücre sayısı gözlenmiştir. AS100 besin ortamı formülasyonunda sodyum nitrattan gelen azot miktarı 0,33 $g.L^{-1}$, bu çalışmada ise 1 $g.L^{-1}$'dir. Bu durumda *Dunaliella salina* CCAP 19/25 türünü yetiştirmek için kullanılan sodyum nitrat miktarı arttırılabilir sonucu elde edilmektedir. Kullanılan diğer azot kaynaklarında kontrol olarak hazırlanan AS100 besin ortamının kullanıldığı 21. formülasyondan daha yüksek hücre sayısı elde edilememiştir.

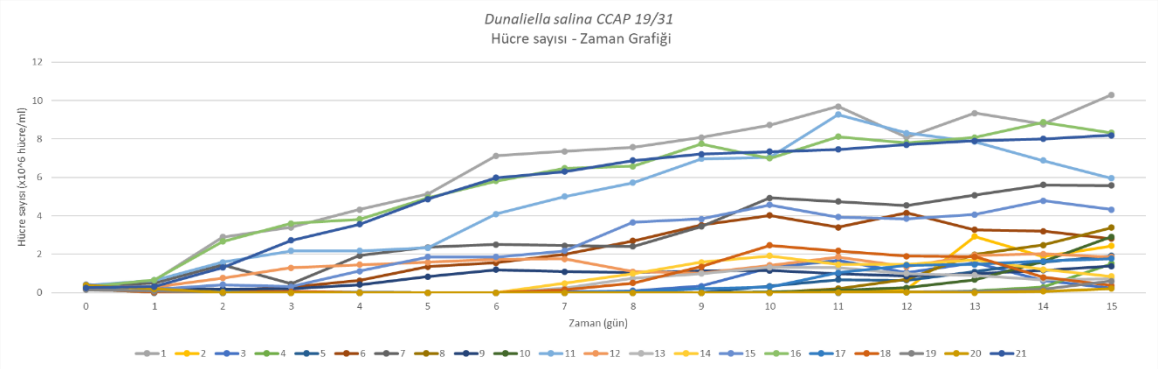
Sodyum nitrat dışındaki azot kaynaklarının kullanıldığı formülasyonlarda pH değerleri başlangıca göre yükselmiştir (Şekil 4.38). Azot kaynağı olarak sadece amonyum sülfat ile desteklenmiş 3. ve 18. formülasyonlarda, pH değerlerinde diğer formülasyonlardan daha fazla düşüş gözlenmiştir. Diğer formülasyonlarda pH değerlerinde önemli bir değişim gözlenmemiştir.

Dunaliella salina CCAP 19/25 türü ile yapılan bu çalışmada optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları arasında parallellik görülmemiştir (Şekil 4.37).

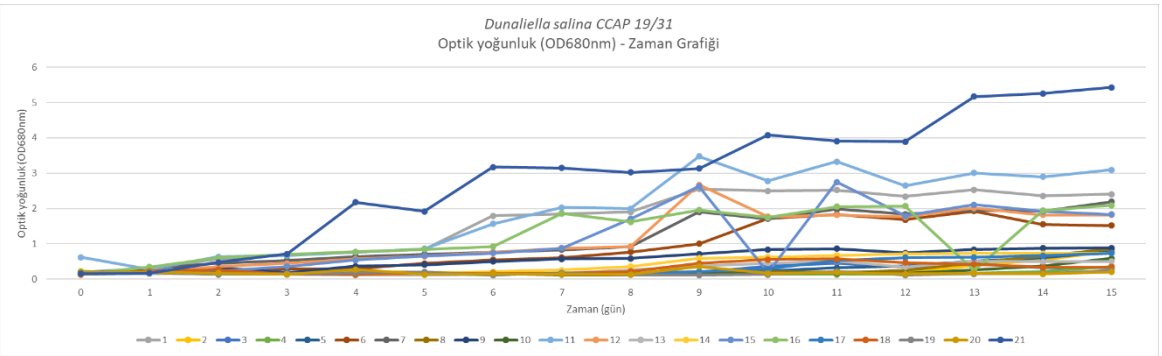
Design-Expert programı ile hazırlanan deney planına göre paralel formülasyonlar olan 1-16. (1 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre ,0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 2-17. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 1 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 3-18. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre, 1 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 4-19. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 1 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit) ve 5-20. (0,5 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0,5 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit) formülasyonları kendi aralarında tutarlı sonuçlar göstermiştir.

4.1.3.3 Farklı Azot Kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP 19/31 Kültürünün Büyümesi Üzerine Etkisi

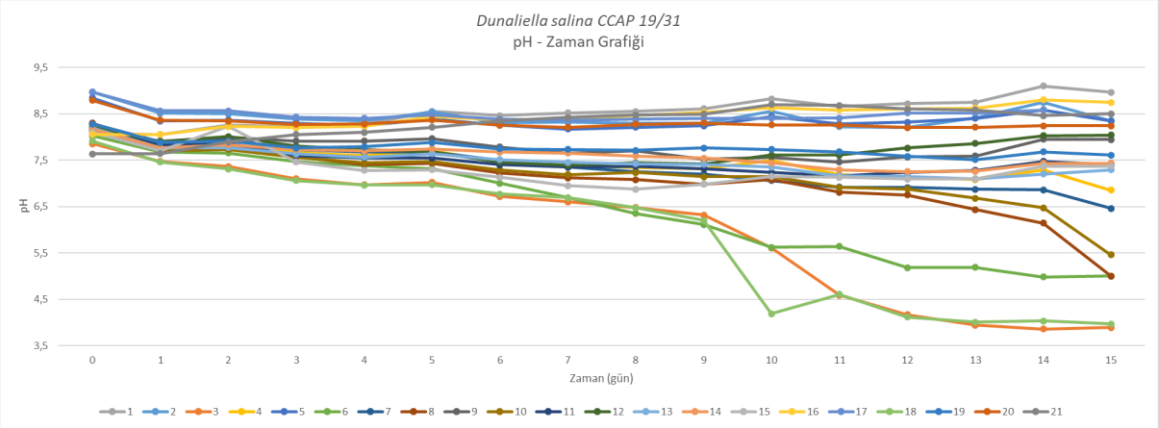
Farklı azot kaynaklarının *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türünün hücre büyümesine etkisini incelemek üzere Tablo 3.6' da belirtilen formülasyonlarda sodyum nitrat ($NaNO_3$), üre (CH_4N_2O), amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), amonyum hidroksit (NH_4OH) azot kaynakları ile deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçların grafikleri aşağıda belirtilmiştir.



Şekil 4.39 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.40 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği



Şekil 4.41 *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türü pH – Zaman Grafiği

Kültürlerden 15 gün boyunca örnekler alınarak büyüme parametreleri takip edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan *Dunaliella salina* CCAP 19/31 mikroalg türünün azot kaynağı olarak nitratı verimli bir şekilde kullandığı ancak üre, amonyum sülfat ve amonyağı aynı şekilde kullanamadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.39). Azot kaynağı olarak sadece sodyum nitratın kullanıldığı 1 ve 16 numaralı paralel formülasyonlarda hücre sayısı başlangıçtan itibaren artmış ve 16.günde $8{,}77x10^{6}$, $8{,}87x10^{6}$ hücre/ml olarak hesaplanmıştır. 21 numaralı standart AS100 besin ortamında $8{,}2x10^{6}$ hücre/ml ile bu çalışmadaki 3. en yüksek hücre sayısı gözlenmiştir. AS100 besin ortamı formülasyonunda sodyum nitrattan gelen azot miktarı 0,33 $g.L^{-1}$, bu çalışmada ise 1 $g.L^{-1}$'dir. Bu durumda *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türünü yetiştirmek için kullanılan sodyum nitrat miktarı arttırılabilir sonucu elde edilmektedir. Kullanılan diğer azot kaynaklarında kontrol olarak hazırlanan AS100 besin ortamının kullanıldığı 21. formülasyondan daha yüksek hücre sayısı elde edilememiştir.

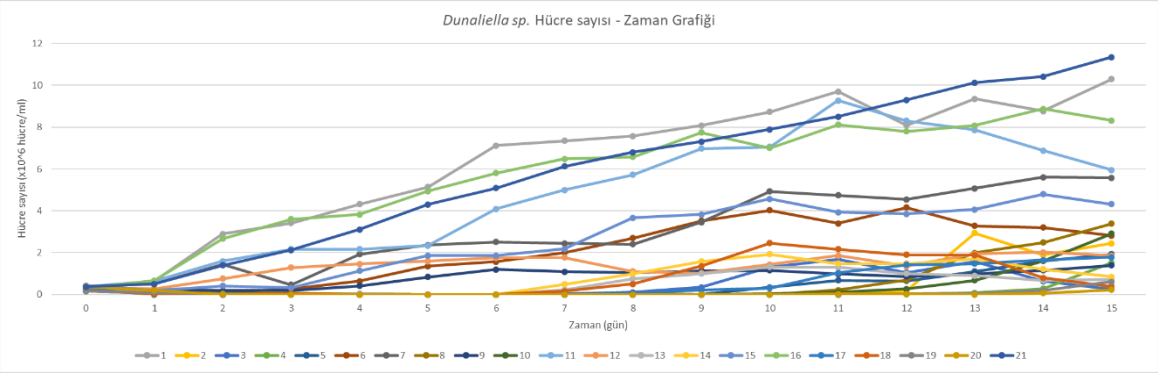
Sodyum nitrat dışındaki azot kaynaklarının kullanıldığı formülasyonlarda pH değerleri başlangıca göre düşmüştür (Şekil 4.41). Azot kaynağı olarak sadece amonyum sülfat ile desteklenmiş 3. ve 18. formülasyonlarda, pH değerlerinde diğer formülasyonlardan daha fazla düşüş gözlenmiştir.

Dunaliella salina CCAP 19/31 türü ile yapılan bu çalışmada optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları arasında parallellik görülmemiştir (Şekil 4.41).

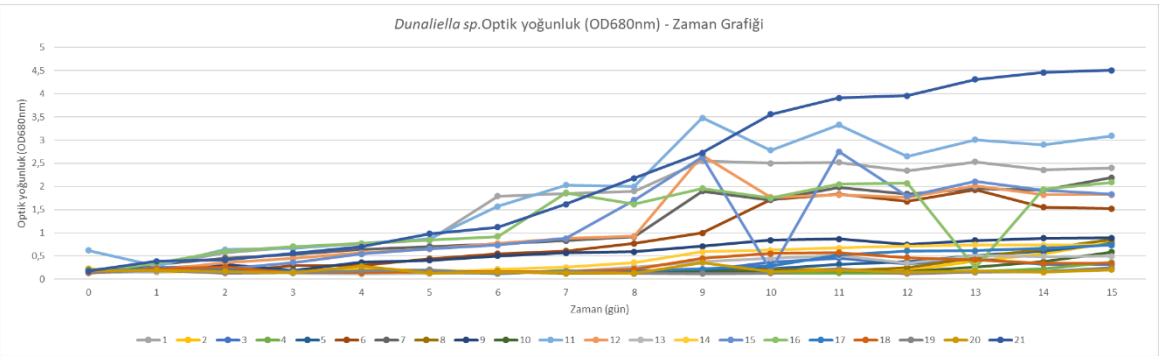
Design-Expert programı ile hazırlanan deney planına göre paralel formülasyonlar olan 1-16. (1 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre ,0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 2-17. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 1 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 3-18. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre, 1 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 4-19. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 1 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit) ve 5-20. (0,5 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0,5 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit) formülasyonları kendi aralarında tutarlı sonuçlar göstermiştir.

4.1.3.4 Farklı Azot Kaynaklarının *Dunaliella sp.* Kültürünün Büyümesi Üzerine Etkisi

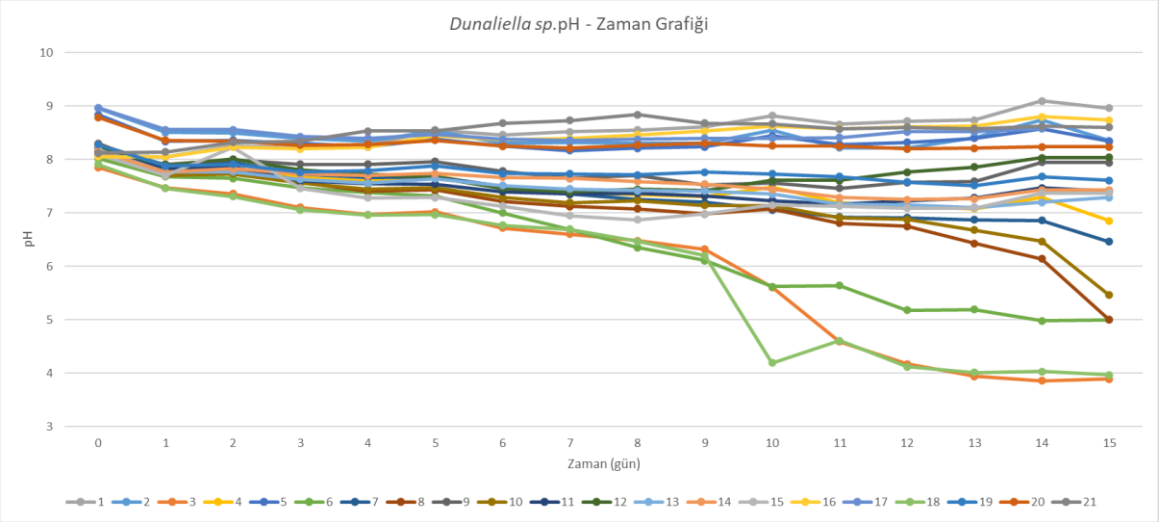
Farklı azot kaynaklarının *Dunaliella sp.* hücre büyümesine etkisini incelemek üzere Tablo 3.6' da belirtilen formülasyonlarda sodyum nitrat ($NaNO_3$), üre (CH_4N_2O), amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), amonyum hidroksit (NH_4OH) azot kaynakları ile deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçların grafikleri aşağıda belirtilmiştir.



Şekil 4.42 *Dunaliella sp.* türü Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.43 *Dunaliella sp.* türü Optik yoğunluk – Zaman Grafiği



Şekil 4.44 *Dunaliella sp.* türü pH – Zaman Grafiği

Kültürlerden 15 gün boyunca örnekler alınarak büyüme parametreleri takip edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan *Dunaliella salina* mikroalg türünün azot kaynağı olarak nitratı verimli bir şekilde kullandığı ancak üre, amonyum sülfat ve amonyağı verimli bir şekilde kullanamadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.42). Azot kaynağı olarak sadece sodyum nitratın kullanıldığı 1 ve 16 numaralı paralel formülasyonlarda hücre sayısının 2 gün içinde hızla artmış ve 15. günde 10,3 $x10^6$, 8,32 $x10^6$ hücre/ml olarak hesaplanmıştır. Sodyum nitrat miktarının fazla olduğu 11 numaralı formülasyonda (0,625 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0,125 $g.L^{-1}$ üre, 0,125 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0,125 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit) 5,95 $x10^6$ hücre/ml ile bu çalışmadaki 3. en yüksek hücre sayısı gözlenmiştir. Kullanılan diğer azot kaynaklarında başlangıçtan itibaren hücre sayısının hızla düştüğü gözlenmiştir. 10.günden sonra hücre sayısı artmaya başlamıştır.

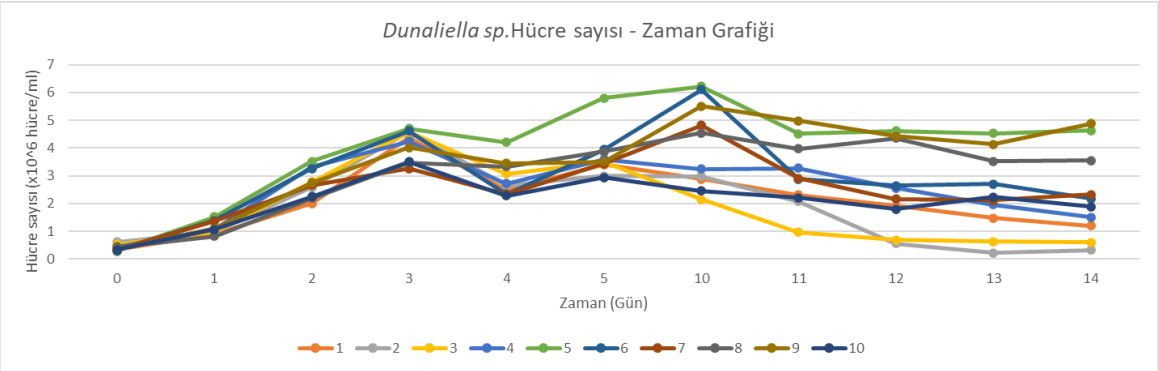
Amonyum ile desteklenmiş tüm kültürlerde, hücre büyümesi inhibisyonu gözlemlenmiştir. Ayrıca amonyum kullanılan formülasyonlarda pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.44).

Dunaliella sp. türü ile yapılan bu çalışmada optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları arasında parallellik görülmemiştir (Şekil 4.43).

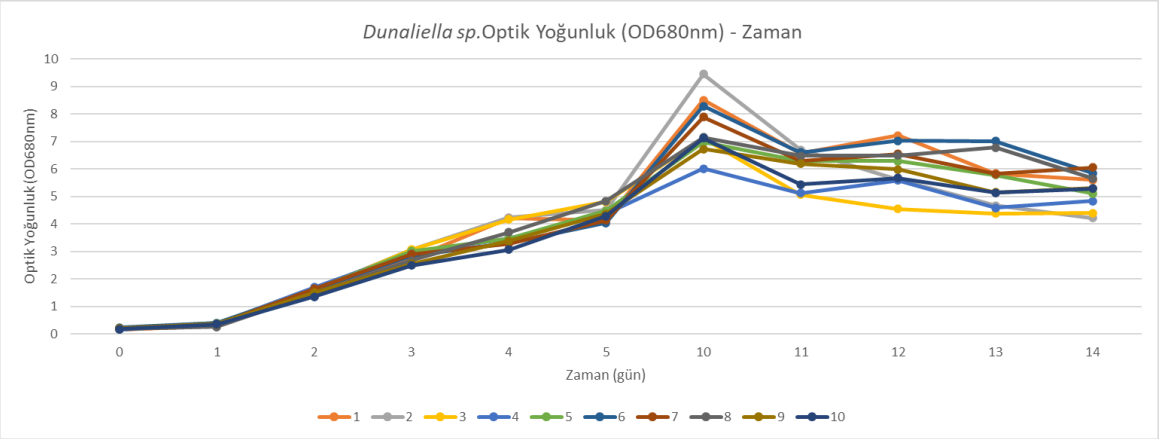
Design-Expert programı ile hazırlanan deney planına göre paralel formülasyonlar olan 1-16. (1 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre ,0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 2-17. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 1 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 3-18. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre, 1 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit), 4-19. (0 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 1 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit) ve 5-20. (0,5 $g.L^{-1}$ sodyum nitrat, 0,5 $g.L^{-1}$ üre, 0 $g.L^{-1}$ amonyum sülfat, 0 $g.L^{-1}$ amonyum hidroksit) formülasyonları kendi aralarında tutarlı sonuçlar göstermiştir.

4.1.4 Farklı Karbon/Azot Oranları İçeren Besin Ortamının Tuz Gölü'nden İzole Edilen *Dunaliella sp.* Türünün Büyümesi Üzerine Etkisi

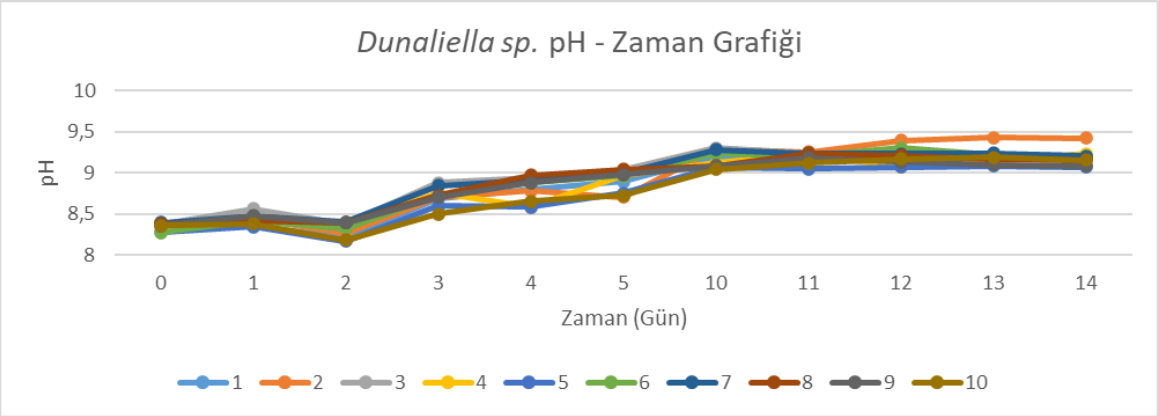
Dunaliella salina CCAP 19/20, CCAP 19/25, CCAP 19/31 ve Tuz Gölü'nden izole edilmiş *Dunaliella sp.* türleri ile yapılan organik karbon kaynağı ve azot kaynağı denemeleri sonucunda kontrol olarak kullanılan AS100 besin ortamından daha fazla hücre sayısı elde edilen tür *Dunaliella sp.* türü olmuştur. Buna göre *Dunaliella sp.* türü için maksimum büyümenin elde edildiği karbon ve azot kaynağı belirlendikten sonra bu iki önemli besin kaynağının maksimum büyüme için hangi oranda kullanılacağını belirlenen deney planı sonucu elde edilen verilerin grafikleri aşağıda belirtilmiştir.



Şekil 4.45 *Dunaliella sp.* Farklı Karbon/Azot Oranı Çalışması Hücre sayısı – Zaman Grafiği



Şekil 4.46 *Dunaliella sp.* Farklı Karbon/Azot Oranı Çalışması Optik Yoğunluk (OD 680 nm) – Zaman Grafiği



Şekil 4.47 *Dunaliella sp.* Farklı Karbon/Azot Oranı Çalışması pH – Zaman Grafiği

Kültürlerden 14 gün boyunca örnekler alınarak büyüme parametreleri takip edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan *Dunaliella sp.* mikroalg türünün maksimum

hücre sayısı karbon/azot oranı 30 olduğunda elde edilmiştir. Karbon/azot oranının 25 olduğu standart AS100 besin ortamında 10.günde hücre sayısı 2,12 x 10^6 hücre/ml iken bu çalışmada karbon/azot oranı 6,23 x 10^6 hücre/ml ve 6,1 x 10^6 hücre/ml hesaplanmıştır. Ancak tüm türlerde 10.günden sonra hücre sayılarında azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.45).

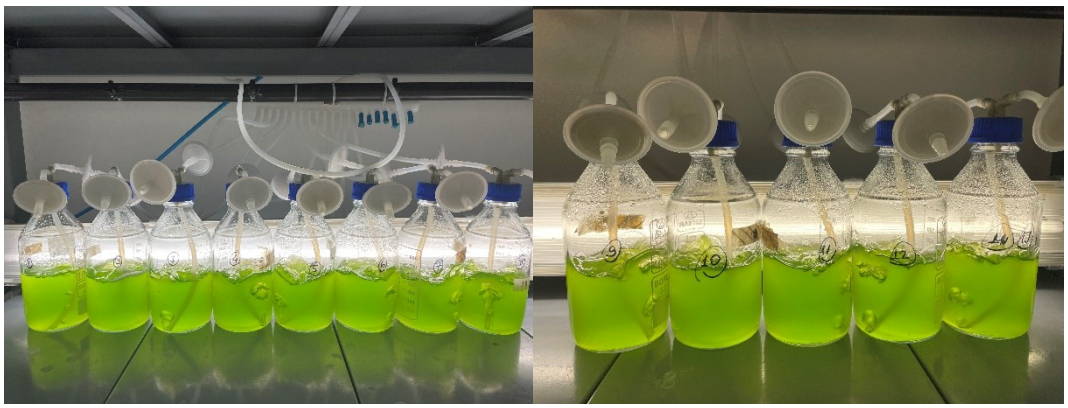
Dunaliella sp. türü ile yapılan bu çalışmada optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları arasında parallel grafikler elde edilmiştir (Şekil 4.46).

Bu çalışmada hücre sayısının düşmeye başladığı 10.günden sonra paraleller arasında hücre sayısı farklılıkları görülmüştür.

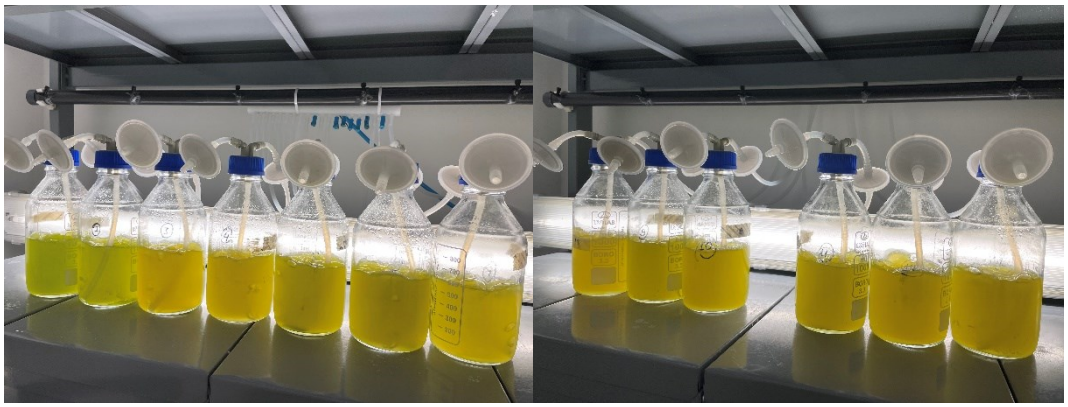
pH değerleri tüm formülasyonlarda yaklaşık değişiklikler göstererek çalışma boyunca artmıştır (Şekil 4.47).

4.1.5 Tuz Gölü'nden İzole Edilen *Dunaliella sp.* Türünün Stres Koşullarında β-Karoten Birikimi

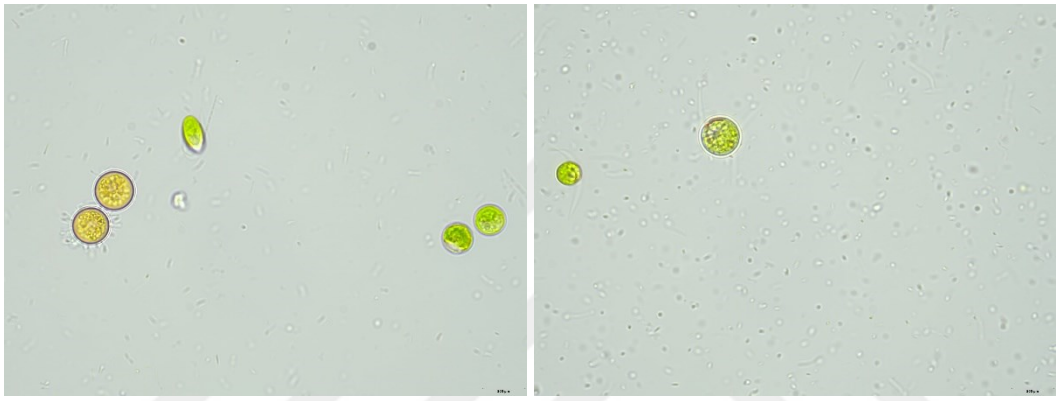
Dunaliella sp. türünün bu çalışmada kullanılan diğer ticari türlere göre miksotrofik yetiştirme yöntemine daha uygun olduğu sonucu elde edildikten sonra bu mikroalg türünde β-karoten birikimini gözlemlemek amacıyla besin sınırlaması stres koşulu uygulanmıştır. Çalışmada oluşturulan formülasyonlara ait başlangıç ve son gün fotoğrafları aşağıda yer almaktadır.



Şekil 4.48 *Dunaliella sp.* stres koşulları çalışması başlangıç görüntüleri

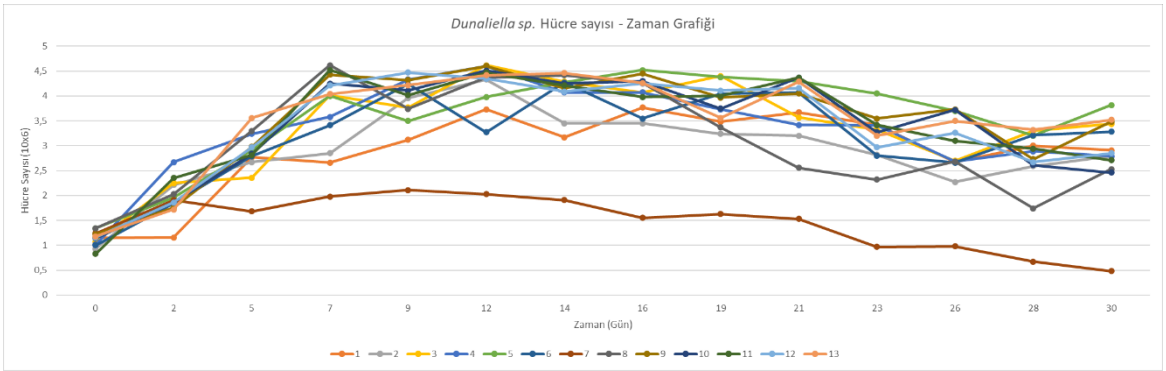


Şekil 4.49 *Dunaliella sp.* stres koşulları çalışması son gün görüntüleri

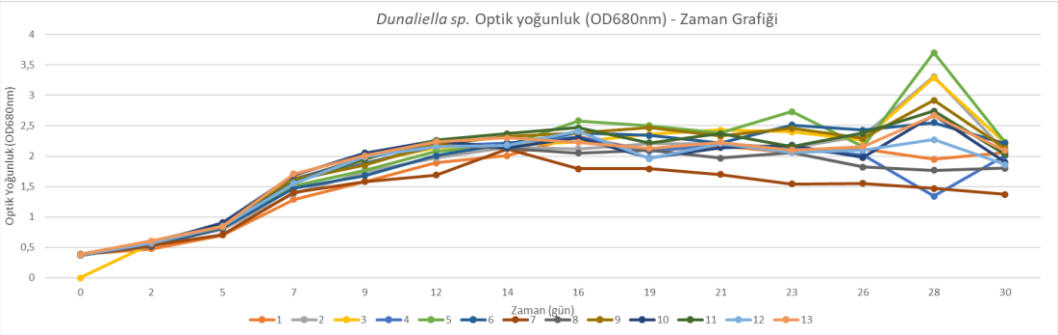


Şekil 4.50 *Dunaliella sp.* stres koşulları hücre görüntüleri

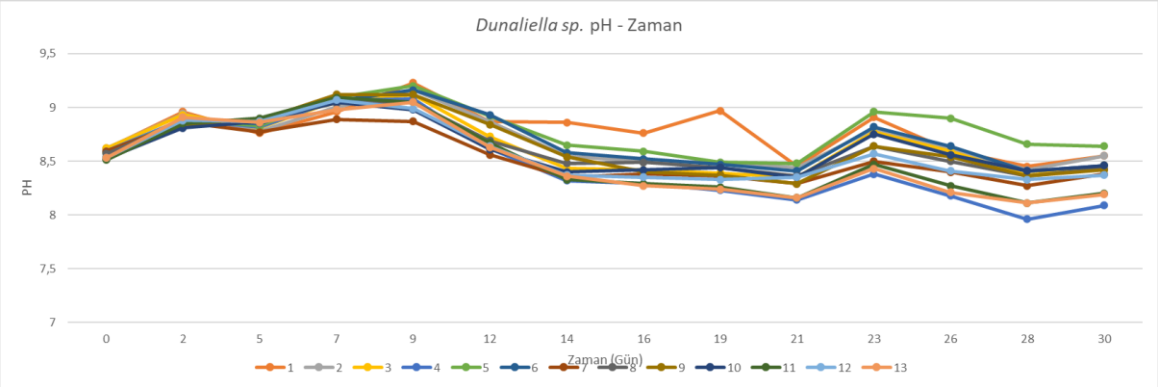
Çalışma sonucunda elde edilen verilerin grafikleri aşağıda yer almaktadır.



Şekil 4.51 *Dunaliella sp.* Stres Koşulları Hücre sayısı – Zaman Grafiği



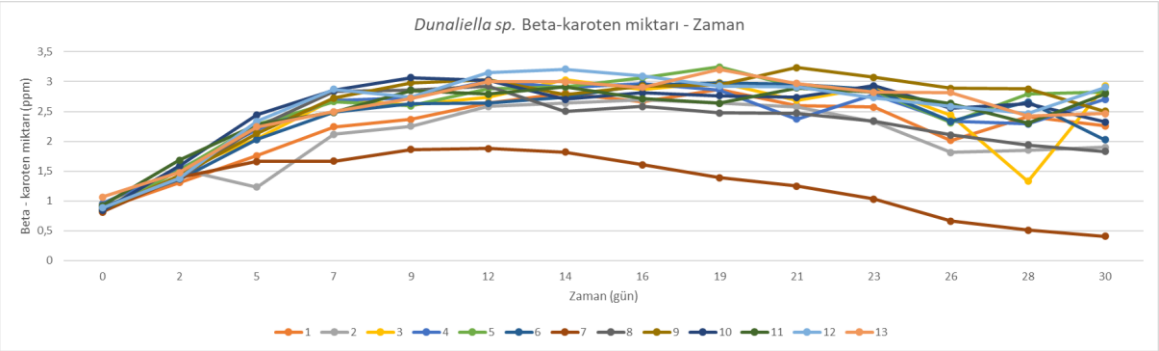
Şekil 4.52 *Dunaliella sp.* Stres Koşulları Optik Yoğunluk (OD 680 nm) – Zaman Grafiği



Şekil 4.53 *Dunaliella sp.* Stres Koşulları pH – Zaman Grafiği

Tablo 4. 1 Her formülasyon için günlük βeta-karoten miktarı sonucu (ppm)

	ŞİŞE NUMARASI												
Gün	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
0	0,859	0,838	0,959	0,957	0,828	0,908	0,817	0,895	0,853	0,844	0,926	0,884	1,064
2	1,311	1,535	1,503	1,533	1,508	1,361	1,39	1,376	1,429	1,584	1,685	1,381	1,475
5	1,758	1,233	2,044	2,194	2,284	2,029	1,664	2,245	2,135	2,444	2,281	2,336	2,245
7	2,241	2,118	2,701	2,688	2,665	2,489	1,667	2,832	2,724	2,855	2,487	2,87	2,497
9	2,369	2,251	2,609	2,729	2,593	2,631	1,865	2,863	2,98	3,065	2,852	2,738	2,719
12	2,646	2,586	2,74	3,007	2,884	2,637	1,879	2,925	3,027	3,024	2,79	3,147	3,003
14	2,809	2,639	3,028	2,904	2,912	2,735	1,817	2,504	2,786	2,705	2,916	3,207	2,995
16	2,663	2,695	2,868	2,968	3,068	2,948	1,609	2,584	2,926	2,813	2,715	3,094	2,906
19	2,87	2,639	2,988	2,862	3,246	2,977	1,393	2,474	2,95	2,762	2,64	2,925	3,203
21	2,598	2,58	2,685	2,37	2,911	2,957	1,248	2,468	3,234	2,734	2,895	2,912	2,97
23	2,571	2,327	2,913	2,777	2,845	2,867	1,03	2,342	3,074	2,933	2,825	2,73	2,825
26	2,014	1,813	2,437	2,332	2,312	2,336	0,663	2,105	2,887	2,555	2,634	2,585	2,818
28	2,414	1,854	1,332	2,29	2,795	2,658	0,513	1,936	2,879	2,628	2,302	2,466	2,422
30	2,257	1,902	2,927	2,703	2,825	2,027	0,408	1,83	2,502	2,324	2,794	2,905	2,467



Şekil 4.54 *Dunaliella sp.* Stres Koşullarında β-karoten Birikimi – Zaman Grafiği

Kültürlerden 30 gün boyunca örnekler alınarak büyüme parametreleri takip edilmiştir. Günlük analiz sonuçları incelendiğinde formülasyonların hepsinde βeta-karoten birikimi gözlenmiştir. Beta-karoten birikimi öncelikle artarken daha sonraki günlerde değişiklik göstermemiştir. Ege Üniversitesi'nden temin edilen *Dunaliella sp.* kültüründe bu çalışma için 7.formülasyon (0 $g.L^{-1}$ azot, 0,5 $g.L^{-1}$ sülfat, 0 $g.L^{-1}$ fosfat) haricindeki formülasyonlarda βeta-karoten birikimi birbirine yaklaşık değerler göstermiştir. Beta-karoten birikiminin en fazla olduğu belirli bir formülasyon elde edilememiştir (Şekil 4.51).

7 numaralı formülasyon aynı zamanda en düşük hücre sayısının görüldüğü formülasyon olmuştur. Diğer formülasyonlarda hücre sayısı yaklaşık 9.güne kadar artış gösterirken 21.güne kadar durağan kalmıştır. 21.günden sonra formülasyonlarda hücre sayısı azalmalar göstermiştir.

Dunaliella sp. türü ile yapılan bu çalışmada optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları arasında parallel grafikler elde edilmemiştir (Şekil 4.52).

Çalışma sonuçlarına göre pH grafiği hücre sayısı grafiği ile paralellik göstermektedir. Hücre sayısı artarken pH artış göstermiş, hücre sayısı azalırken pH da azalmış ve başlangıç pH değerlerine yakın değerler göstermiştir (Şekil 4.53).

4.2 Tartışma

Bu tez çalışmasında ticari olarak tanımlanmış ve yerel olarak izole edilmiş çeşitli *Dunaliella* türlerinin farklı karbon kaynakları kullanılarak besin ortamına ilave edilen organik karbonun ışık altında büyüme üzerine etkisi araştırılmıştır. Glikoz, gliserol, asetik asit, sodyum asetat ve sodyum bikarbonat karbon kaynağı olarak

kullanılmıştır. Ticari türler olan *Dunaliella salina* CCAP 19/20, CCAP 19/25 türlerinde organik karbon kaynağının büyümeyi arttırıcı bir etki göstermediği aksine çoğu formülasyonda pH değişikliklerine sebep olarak büyümeyi inhibe ettiği gözlenmiştir. *Dunaliella salina* CCAP 19/31 türünde ise glikoz 100 $g.L^{-1}$ konsantrasyonunda büyümeyi desteklemezken $5g.L^{-1}$ olduğunda büyümeyi teşvik edici özellik göstermiştir (Şekil 4.21 ve Şekil 4.24). Mojaat ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada demir iyonu (Fe2 +) ve organik karbon asetat kullanımının *Dunaliella salina* türünün βeta-karoten üretimi ve çoğalması üzerinde etkisini incelemişlerdir. Bulgular, organik karbon asetat hücre çoğalması üzerinde olumlu etki oluştururken, $FeSO_4$ kullanımı nedeniyle hücresel βeta-karoten içeriğinde önemli bir artış görülmüştür. *Haematococcus pluvialis* ve *Phaffia rhodozyma* mikroalg türlerinin besin ortamı üzerine yapılan önceki çalışmalar, asetat ve malonatın hem büyümeyi hem de karotenoid üretimini artıran bir karbon kaynağı olduğunu göstermiştir (Mojaat ve ark., 2008). Ancak bu çalışmada karbon kaynağı olarak asetik asit eklenmesinin ticari türlerde hücre büyümesini arttırmadığı sonucu elde edilmiştir. Yerel izole edilmiş *Dunaliella sp.* türünde ise asetat, ancak diğer karbon kaynakları ile desteklendiğinde karbon kaynağı eklenmeyen standart AS100 besin ortamında yetişen kültürden daha fazla bir hücre sayısına ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.27).

Tüm *Dunaliella* türlerinde karbon kaynağı olarak sadece gliserol kullanılan formülasyonda, hücre sayısının, karbon kaynağı bulunmayan standart AS100 besin ortamındaki hücre sayısından düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum bu çalışmada kullanılan *Dunaliella* türlerinin stres koşullarında üretebildiği gliserolü karbon kaynağı olarak verimli kullanamadığını göstermektedir.

Dunaliella kültürleri ile önceki yıllarda yapılan çalışmalarda her türde ek organik karbon ve azot kaynakları ile büyüme gözlenmediği, büyümeye olumlu bir katkı sağlamadığı görülmüştür. Gibor (1956)'un, 50mg KNO_3, 10mg KH_2PO_4 ve Hutner iz element karışımı ve glikoz, asetat, maya glikozu, maya asetat, beyin kalp infüzyon glikoz ve beyin-kalp infüzyonu asetat ile zenginleştirilmiş yapay deniz suyunda *Dunaliella viridis* ve *Dunaliella salina* türlerini üç hafta boyunca karanlıkta heterotrofik koşullarda yetiştirme denemeleri başarısız olmuştur. Ayrıca *Dunaliella bardawil* ve *Dunaliella parva*, glikoz, gliserol ve sodyum asetat karbon kaynakları ile 0.4 ila 1.5 M NaCl içeren bir ortamda heterotrofik olarak

büyütülememiştir (Hard & Gilmour, 1996). Literatürde yer alan bu çalışmalar besin ortamına eklenen karbon ve azot kaynaklarının her *Dunaliella* türünde büyümeyi arttırmadığını göstermektedir. *Dunaliella salina* CCAP 19/20, CCAP 19/25 türlerinde de besin ortamına konulan çeşitli ek karbon kaynakları bu türlerin büyümesini teşvik edecek bir etki göstermemiştir.

Glikozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı formülasyonlarda pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir ve hücre sayısında başlangıçtan itibaren artış gözlenmemiştir. Buna karşılık, Gim ve ark. (2015), *Isochrysis galbana* LB987, *Nannochloropsis oculata* CCAP849/1, ve *Dunaliella salina* türlerinin fotootrofik, heterotrofik ve miksotrofik koşullarda organik karbon kaynaklarının hücre büyümesi, klorofil ve toplam yağ miktarı birikimine etkisini araştırmışlardır. Organik karbon kaynağı olarak glikoz, galaktoz, fruktoz, ksiloz, ramnoz ve sakaroz kullanılan miksotrofik çalışmada *Dunaliella salina* türünde 0.05 M glikoz içeren formülasyonda maksimum büyüme gözlenmiştir. Gim ve ark. (2013), 4 farklı tatlı su mikroalg türü ile yaptığı çalışmada farklı karbon kaynaklarının heterotrofik, ototrofik ve miksotrofik koşullarda büyüme üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışılan tüm mikroalg kültürlerinde karbon kaynağı olarak glikozun hetetrofik ve miksotrofik koşullarda büyümeyi diğer kaynaklara göre daha çok arttırdığı belirtilmiştir. Ren ve ark. (2013), farklı karbon ve azot kaynaklarının *Scenedesmus sp.* türünün büyümesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Kullanılan karbon kaynaklarından (glikoz, fruktoz ve asetat) glikozun büyümede daha etkili olduğu belirtilmiştir. Ancak bu çalışmada *Dunaliellla* salina türlerinde glikozun hücre artışını desteklediğine dair veriler elde edilememiştir.

Optik yoğunluk (OD 680 nm) değerleri ile hücre sayımları çoğu formülasyonda parallellik göstermemektedir. Griffiths ve ark. (2011), büyüme sırasında hücre pigment içeriğindeki değişikliklerin, büyüme ölçüm yöntemi olarak absorbans kullanıldığında, hata oranını artırabileceğini bulmuşlardır. Ayrıca büyüme hızı ile değişebilen hücre boyutu nedeniyle optik yoğunluk ile hücre sayısı arasındaki korelasyonun değişebileceği gösterilmiştir (Borowitzka & Moheimani, 2013). Aynı çalışmada bu açıklamaya örnek olarak log fazındaki hücrelerin sabit fazdan daha küçük olabileceği gösterilmiştir. Bu durumun büyüme takibinde korelasyonun tutarlılığını olumsuz etkileyebileceği gösterilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada hücre sayımları ile optik yoğunluk arasındaki farklılığın sebebi bu şekilde açıklanabilir.

Bu çalışmada farklı azot kaynakları kullanılarak besin ortamına ilave edilen azotun büyüme üzerine etkisi de araştırılmıştır. Özellikle çeşitli beslenme faktörleri arasında azot, alg hücrelerindeki, genetik materyaller, enerji transfer molekülleri, enzimler, klorofiller ve peptitler gibi tüm fonksiyonel ve yapısal proteinlerin bir bileşeni olduğu için büyümeye etki eden en kritik besin faktörlerinden biri olarak gösterilir (Cai ve ark., 2013; Hu, 2013). Besin ortamındaki azot konsantrasyonu hem hücre büyüme hızını hem de mikroalg kültürünün biyokimyasal içeriğini önemli ölçüde etkiler. Bu teoriyle alakalı çok sayıda çalışma, azot besin ortamında sınırlı olduğunda, mikroalg kültürlerinde hücre büyüme hızının yavaşladığını ve lipid veya karbonhidrat içeriği artarken protein sentezinin sınırlandığını rapor etmiştir (Wang ve ark., 2013; Ho ve ark., 2014).

Çoğu mikroalg, nitrat, nitrit, amonyum ve üre gibi organik azot kaynakları dahil olmak üzere çeşitli azot kaynaklarını kullanabilir (Becker, 1994). Her azot kaynağı önce amonyum formuna dönüştürülür ve çeşitli yollarla amino asitlere indirgenir (Cai ve ark., 2013). Amonyumun amino asitlere dönüştürülmesi daha az enerji gerektirdiğinden birçok mikroalg tarafından tercih edildiği yaygın olarak bilinen bir kanıydı, ancak *Botryococcus braunii* ve *Dunaliella tertiolecta* gibi bazı mikroalg hücrelerinin büyümek için nitratı amonyağa tercih ettiği belirtilmiştir (Chen ve ark., 2011; Ruangsomboon, 2015). Büyüme için uygun azot kaynağı türden türe farklılık göstermektedir ve biyokimyasal kompozisyon ilave azot kaynakları kullanılarak da değiştirilebilmektedir. Bu nedenle mikroalg yetiştirirken besin ortamında çeşitli azot kaynakları deneyerek sonuçların karşılaştırılması ve her tür için en uygun kaynağın seçilmesi, verimliliği maksimum seviyeye ulaştırmak için gereklidir (Garam ve ark., 2016).

Bu çalışmada azot kaynağı olarak üre, sodyum nitrat, amonyum sülfat ve amonyum hidroksit kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan *Dunaliella salina* CCAP 19/20, CCAP 19/25, CCAP 19/31 ve *Dunaliella sp.* mikroalg türlerinin tümünün azot kaynağı olarak nitratı verimli bir şekilde kullandığı ancak üre, amonyum sülfat ve amonyum hidroksiti kullanamadığı tespit edilmiştir.

Amonyum ile desteklenmiş tüm kültürlerde, hücre büyümesi inhibisyonu gözlemlenmiştir. Ayrıca amonyum kullanılan formülasyonlarda pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Genel olarak amonyumun birçok mikroalg tarafından nitrat veya nitrit yerine tercih edildiği bilinmektedir. Amonyum, azotun indirgenmiş

formu olduğundan, hücreler içinde doğrudan amino asitlere dönüştürülebilir ancak nitrat veya nitrit, kullanılmadan önce amonyuma indirgenmelidir (Podevin ve ark., 2015). Ancak bu çalışmada, nitratın amonyuma kıyasla yaklaşık 10 kat daha yüksek hücre sayısı verimi göstererek çalışmada kullanılan *Dunaliella salina* hücrelerinin büyümesi için daha elverişli olduğu görülmüştür. Amonyum, verilen 2,42 mM konsantrasyonda bile hücre büyümesi için toksik olduğunu gösteren inhibisyona sebep olmuştur. Amonyumun hücre büyümesi üzerindeki inhibitör etki seviyesi, mikroalgal türlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bir deniz mikroalgası *Dunaliella tertiolecta*'nın, 10 mM'nin üzerindeki amonyum konsantrasyonlarında hücre büyümesi inhibisyonu gösterdiği belirtilmiştir (Chen ve ark., 2011). Hücre büyümesi üzerindeki inhibisyon etkisi, amonyumun hücrelere yüksek konsantrasyonda taşınmasının kloroplastta ATP oluşumunu engellediği böylece fotosentezin inhibisyonuna sebep olduğu şeklinde açıklanmıştır (Ramanna ve ark., 2014). Mikroalg hücrelerinde nitrat taşınması yüksek oranda düzenlenebilir, ancak hücre dışı amonyum seviyesi yüksek olduğunda hücrelere amonyum girişi kontrol edilemez (Norici ve ark., 2002). Ayrıca, besin ortamındaki amonyumun doygun konsantrasyonda olduğu durumlarda, H^+ iyonları salarak pH'ı önemli ölçüde düşürebildiği ve bunun sonucunda hücre büyümesini engellediği hatta lizise neden olduğu rapor edilmiştir (Li ve ark., 2013; Wu ve ark., 2013). Bu açıklama amonyum kullanılan formülasyonlarda görülen dramatik pH düşüşlerinin ve hücre büyüme inhibisyonunun sebebi olarak gösterilebilir.

Bu çalışmada kullanılan diğer bir organik azot kaynağı olan üre, diğer azot kaynaklarından nispeten daha ucuzdur ve çoğu mikroalgde üreaz yoluyla amonyum ve bikarbonata parçalandıktan sonra da kolaylıkla kullanılabilir (Solomon & Glibert, 2008). *Nannochloropsis salina'nın*, büyümesi için nitrat veya amonyum yerine üreye açık bir tercih gösterilmiştir (Campos ve ark., 2014). *Isochrysis galbana*'nın ayrıca nitrat veya nitrit yerine ürede en yüksek hücre sayısına ulaştığı bulunmuştur (Fidalgo ve ark., 1998). Ancak bu çalışmada üre kullanılan formülasyonlarda hücre büyümesi inhibisyonu gözlenmiştir. Borowitzka ve ark., 1990 amonyum tuzları ve üre gibi diğer azot kaynaklarının, belirli koşullar altında alglerin ölümüne neden olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca azot kaynağı olarak NH_4NO_3 veya $(NH_4)_2CO_3$ kullanımının *Dunaliella salina* büyümesi üzerinde inhibe edici etkileri olduğu da gösterilmiştir (Borowitzka, 2013).

Bu sonuçlar azot kaynağı tercihinin ve azotu verimli bir şekilde kullanma yeteneğinin türden türe farklılık gösterdiğini göstermektedir.

Karbon kaynağı ve azot kaynağı çalışmalarından sonra miksotrofik üretime, çalışmada kullanılan diğer ticari türlere göre daha yüksek hücre sayısına ulaşan *Dunaliella sp.* türünün besin kıtlığı stres koşulu ile β-karoten birikimi incelenmiştir. Bunun için azot, kükürt ve fosfor sınırlama uygulanacak bileşenler olarak seçilmiştir. Nitrat varlığının hücre büyümesini artıran ve nitrat sınırlamasının karotenoid birikimini uyaran temel bir etkendir. Kükürt sınırlamasının büyüme özellikleri, pigment içeriği üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Fosfor ise hücre büyümesi ve onarımında önemli bir yapısal rol oynamaktadır (Lv ve ark., 2016). 7.formülasyonda en düşük hücre sayısı ve βeta-karoten birikimi gözlenmiştir. Bu formülasyonda fosfat kullanılmamıştır. Bu durum besin ortamındaki fosfat içeriğinin hücre bölünmesini teşvik ettiği bilgisi ile açıklanabilir. Fosfat nükleotidler gibi genetik materyal içeriğinde bulunduğundan besin ortamındaki fosfat eksikliği hücre bölünmesini yavaşlatmaktadır. Azot sınırlaması karoten üretimini artıracak olsa da, ortamdaki uzun süreli sınırlaması, yüksek hücre ölüm oranına yol açabilir ve böylece birim hacim başına karoten üretimini azaltabilir. Aynı zamanda 1 ve 2 numaralı formülasyonda (Tablo 3.8) da fosfat miktarının azlığının hücre bölünmesine ve dolayısıyla βeta-karoten birikimine etkisi görülmektedir. 7.formülasyondan sonra en düşük hücre sayısına ve βeta-karoten içeriğine sahip formülasyon 1 ve 2 numaralı formülasyonlardır.

Kırmızı fazda besin kıtlığından dolayı hücre sayısında artış beklenmez aksine stres koşullarından dolayı hücre sayısında bir miktar azalma gözlenir (Tafreshi & Shariati, 2008). Bu çalışmada belirli bir süreye kadar hücre artışının gözlenmesinin sebebi, çalışmaya 150 ml kültür eklenirken yeşil faz besin ortamının da stres besin ortamına eklenmesi olduğu düşünülebilir. Yeşil faz besin ortamındaki bileşenler tükenene kadar hücre sayısı artış göstermiş sonrasında hücre artışını teşvik edecek besin ortamı bileşenleri azaldığı için hücre sayısı da azalmıştır. Buna bağlı olarak kültür ortamındaki βeta-karoten miktarı hücre sayısı ile orantılı olarak belirli bir süreye kadar artarken sonrasında azalmıştır. Ancak hücre başına düşen βeta-karoten birikimi miktarı yaklaşık olarak değişmemiştir. Bu durumda βeta-karoten üretim prosesinde yüksek hücre sayısının elde edilmesinin önemi görülmektedir. Yeşil faz

ile maksimum hücre sayısı elde edilerek βeta-karoten üretimi için stres koşulları uygulanmalıdır.

Fosfat miktarının 0,017 g/l üzerinde olduğu formülasyonlarda, βeta-karoten birikiminin azaldığı görülmüştür (Tablo 4.1) Bu çalışmaya göre βeta-karoten birikimini teşvik eden fosfat miktarı 0,017 g/l olarak belirlenmiştir. Sülfat miktarının fosfat miktarından bağımsız olarak βeta-karoten birikimini etkilemediği gözlendi. Aynı fosfat miktarı (0,017g/l) eklenen besin ortamında, sülfat miktarı 0 g/l (5.formülasyon) olduğunda, 0,5 g/l sülfat eklenen tekrar formülasyonlarına göre βeta-karoten birikimi yaklaşık aynı miktarlarda olmuştur. Ancak sülfat miktarının 1 g/l olduğu 6. formülasyonda βeta-karoten birikiminin diğer yüksek formülasyonlara göre düşük olduğu gözlenmiştir. Sülfat miktarının 0,5 g/l den yüksek olması bu çalışmada kültür ortamı için stres koşulu oluşturmadığı söylenebilir.

Lv ve ark., 2016, yaptığı çalışmada benzer bir şekilde azot, kükürt ve fosfor kısıtlaması ile kendi izole ettikleri *Dunaliella salina* türünün karotenoid birikimini incelemişlerdir. Azot ve kükürt sınırlamasının aynı anda uygulandığı kültürde yaklaşık 12 pg/hücre β-karoten birikimi ile diğer deney koşullarına göre maksimum miktarı elde etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen β-karoten miktarı yaklaşık 0,7 pg/hücre ile bu çalışmaya kıyasla çok düşük kalmıştır.

Bunun sebebi olarak *Dunaliella sp.* hücrelerinin bir miktar yeşil faz besin ortamı ile stres besin ortamına eklenmesi gösterilebilir. Hücreler ortamda hala az miktarda olan besin ortamı ile stres koşuluna geç maruz kalarak karotenoid birikimi uyarımı düşük kalmıştır. Ayrıca bu çalışmada kullanılan türe yüksek miktarda karotenoid birikimi için sıcaklık, yüksek ışık şiddeti ya da daha yüksek tuzluluk gibi ek stres koşulu ile desteklenme gerekliliği düşük β-karoten birikimin sebebi olarak gösterilebilir.

5
SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında yapılan deneyler ile miksotrofik üretim tekniğinde yetiştirilmeye elverişli *Dunaliella* türleri araştırılmıştır. Ticari *Dunaliella salina* ve Tuz Gölü'nden izole edilen *Dunaliella sp.* türlerinin farklı organik karbon kaynakları ile ışık şiddeti altında büyümeleri karşılaştırılmıştır. Daha sonra farklı azot kaynakları ile büyüme farklılıkları gözlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda Tuz Gölü'nden izole edilen *Dunaliella sp.* türünün 16,66 $g.L^{-1}$ glikoz, 16,66 $g.L^{-1}$ gliserol ve 66,66 $g.L^{-1}$ asetik asit içeriğine sahip formülasyonda kontrol AS100 besin ortamından daha fazla hücre sayısına ulaştığı görülmüştür. Diğer ticari türlerde kontrol besin ortamından daha fazla hücre sayısına ulaşan organik karbon kaynağı formülasyonu elde edilememiştir. Çalışmada kullanılan tüm türlerde en fazla büyümenin gözlendiği azot kaynağı sodyum nitrat olmuştur. *Dunaliella sp.* türü için en uygun karbon/azot oranını belirlemek amacıyla farklı oranlardaki büyüme parametreleri karşılaştırılmıştır. Bunun için karbon kaynağı olarak 16,66 $g.L^{-1}$ glikoz, 16,66 $g.L^{-1}$ gliserol ve 66,66 $g.L^{-1}$ asetik asit formülasyonu, azot kaynağı olarak sodyum nitrat kullanılmıştır. Deney sonucuna göre *Dunaliella sp.* türü için en uygun karbon/azot oranı 30 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışma sonuçlarına göre denemelerde kullanılan ticari *Dunaliella salina* CCAP 19/20, CCAP 19/25, CCAP 19/31 ve Tuz Gölü'nden izole edilmiş *Dunaliella sp.* türleri arasında miksotrofik üretim için en elverişli türün *Dunaliella sp.* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu tür için besin ortamı karbon/azot içeriği 30 olduğunda optimum büyüme gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Tuz Gölü'nden izole edilen *Dunaliella sp.* türü miksotrofik üretim ile yüksek yoğunluklu biyokütle elde edilmeye elverişli olduğundan, β-karoten üretim süreçlerinde kullanılabilecek uygun bir ticari tür olabilir. Sonraki çalışmalarda genetik tanımlaması yapılarak, daha kapsamlı stres koşulları altında β-karoten birikimi incelenmesi önerilebilir. Böylece katma değeri yüksek bir karotenoid üretimi için Türkiye coğrafyasından izole edilmiş yerel bir tür ticarileştirilerek literatüre kazandırılabilir.

KAYNAKÇA

A., B.-A. (1980). Glycerol production in the alga *Dunaliella*. In Biochemical and Photosynthetic Aspects of Energy Production. *New York: Academic Press.*, 91-208.

Aasen, A., Eimhjellen , K., & Liaaen-Jensen, S. (1969). An extreme source of β-carotene. *Acta Chem Scan 23*, 2544–2545.

Abd El-Baky, H., & El-Baroty, G. (2010). Enhancement of carotenoids in *Dunaliella salina* for use as dietary supplements and in the preservation foods. *Food Chem. Toxicol*.

Abreu A.P., Dragone, G., Teixeira, J., Vicente, A., & Fernandes , B. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour. Technol., 118, 61-66.*, 61-66.

Ak İ., Cirik , S., & Göksan , T. (2008). Effects of Light Intensity, Salinity and Temperature on Growth in Çamaltı Strain of *Dunaliella viridis* Teodoresco from Turkey. *Journal of Biological Sciences,8*, 1356-1359.

Amotz, A. B., & Avron, M. (1990). The biotechnology of cultivating of the halotolerant alga *Dunaliella*. *Tibtech 8*, s. 121-126.

Becker, E. W. (1994). *Microalgae biotechnology and microbiology.* New York: Cambridge University Press.

Ben, A. A. (1995). New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β-carotene production. *Journal of applied phycology*, 65-68.

Ben-Amotz A., Shaish , A., & Avron , M. (1989). Mode of action of the massively accumulated β-carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol. 91*, 1040–1043.

Ben-Amotz, A. (1993). Production of b-carotene and vitamine by the halotolerant algae *Dunaliella*. A. Ahaway, & O. Zabrosky içinde, *In Marine Biotechnology* (s. 411-417). Ahaway, A. and Zabrosky, O.

Ben-Amotz, A., Gressel, J., & Avron, M. (1987). Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. *J Phycol 23*, 176-181.

Ben-Amotz, A., & Avron, M. (1983). On the factors which determine massive beta-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol 72*, 593-597.

Ben-Amotz, A., & Avron, M. (1989a). The biotechnology of mass culturing of *Dunaliella* for products of commercial interest. R. C. Cresswell, T. Ress, & N. Shah içinde, *Algal and Cyanobacterial Biotechnology* (s. 90-114).

Ben-Amotz, A., & Shaish, A. (1992). β-carotene biosynthesis. M. Avron, & A. Ben-Amotz içinde, *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology* (s. 205-216). CRC press.

Ben-Amotz, A., Gressel, J., & Avron, M. (1987). Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. *J Phycol 23,* , 176–181.

Ben-Amotz, A., Polle, J. E., & Rao, D. (2009). The alga *Dunaliella*: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology. *Enfield, NH, Science Publishers*, s. 555.

Borovkov, A. B., Gudvilovich, I., Avsiyan, A., Memetshaeva, O., Lelekov, A., & Novikova, T. (2019). Production Characteristics of *Dunaliella salina* at Two-Phase Pilot Cultivation (Crimea). *Turk. J. Fish.& Aquat. Sci. 20(5)*, 401-408.

Borowitzka M.A., & Borowitzka , L. (1989). Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *Dunaliella salina*. T. Stadler, J. Mollion, M. Berdus, Y. Karamanos, H. Morvan, & D. Christiane içinde, *Algal Biotechnology* (s. 139–150). Elsevier Applied Science, Barking.

Borowitzka, M. A. (2013). *Dunaliella*: biology, production, and markets. A. Richmond içinde, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (s. 265-284).

Borowitzka, M. A., & Moheimani , N. (2013). Algae for energy and biofuels. *Springer Science Business Media Dordrecht,*, 265-284.

Borowitzka, M., & Siva , C. (2007). The Taksonomy of the Genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with Emphasis on the Marine and Halophilic Species. *Journal of Applied Phycology 19(5)*, 567-590.

Borowitzka, M., & Borowitzka, L. (1988a). Algal growth media sources of algal culture. M. Borowitzka, & L. Borowitzka içinde, *Micro-algal Biotechnology* (s. 465). New York: Cambridge University Press.

Cai, T., Li, Y., & Park, S. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev. 19*, 360-369.

Campos, S. M., Souza, A., Copepicolo, P., & Pinto, E. (2014). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 60-78.

Campos, S., Pinto, E., Souza, A., Copepicolo, P., & Torres, M. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, 146*, 60-78.

Chen, C.-Y., Lu, I.-C., Nagarajan, D., & Chan, C.-H. (2018). A highly efficient two-stage cultivation strategy for lutein production using heterotrophic culture of *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12. *Bioresource Technology 253*, 141–147.

Chen, M. S., Ng, K., Tang, H., Ma, H., & Holland, , T. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol. 102*, 1649-1655.

Coesel, S., Ramos, A., Henriques, N., Teles, L., Varela, J., Cancela, L., & Baumgartner, A. (2008). Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript

levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Mar. Biotechnol. 10*, 602–611.

Çelekli, A., & Dönmez, G. (2006). Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β-carotene accumulation by new isolate of *Dunaliella sp. World Journal of Microbiology & Biotechnology 22*, 183-189.

Dudu, E., Kanlıtepe, Ç., C., Ç., & Dönmez, G. (2001). Tuz Gölünden (Konya – Türkiye) Izole Edilen *Dunaliella* Türlerinin Gliserol Üretim Kapasitesinin Belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi I. Algal Teknoloji Sempozyumu*, 225-232.

Durmaz Y., G. Ş. (2006). *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco (Chlorophyceae) Büyümesi Üzerine Tuz Derişimlerinin Etkileri. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi 23*, 121-124.

Emeish, S. (2012). Production of Natural β-Carotene from *Dunaliella* Living in the Dead Sea. *Journal of Earth and Environmental Sciences, 4*, 23- 27.

Fidalgo, J., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., & Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga Isochrysis galbana. *Aquaculture 166*, 105-116.

Garam, K., Mujtaba, G., & Lee, K. (2016). Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis sp*. for lipid production. *Algae 31(3)*, 257-266.

Garcia-Chavarria, M., & Lara-Flores, M. (2013). The use of carotenoid in aquaculture. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology 8*, 81-90.

Garcia-Gonzalez, M., Moreno, J., Manzano , J., Florencio, F., & Guerrero, M. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-Cis-β-Carotene and Lutein in a Closed Tubular Photobioreactor. *Journal of Biotechnology 115*, 81-90.

Gibor, A. (1956). The culture of brine algae. *Biol. Bull. 111*, 223-229.

Gim, G. H., Ryu, J., Kim, M., Kim , P., & Wouk, S. (2015). Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions. *Ind Microbiol Biotechnol 43*, 605–616.

Gim, G. H., Kim, J., Kim, H., Kat, M., Yang, H., Jeong, S.-H., & Kim, S. (2013). Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering.*

Goswami, R., Agrawal , K., & Verma, P. (2022). Microalgae *Duneliella* as biofuel feedstock and β-carotene production: An influential step towards environmental sustainability. *Energy Conversion and Management:X vol.13*, 100154.

Grant, B. (1968). The effect of carbon dioxide concentration and buffer system on nitrate and nitrite assimilation by *Dunaliella tertiolecta*. . *J. Gen. Microbiol. 54*, 327–336.

Griffiths, M., Garcin, C., van Hille, R., & Harrison, S. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Microbiol Methods 85*, 119-123.

H.Y., R., Liu , B., Ma , C., Zhao , L., & Ren, N. (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.

Hard, B., & Gilmour, D. (1996). The uptake of organic compounds by *Dunaliella parva* CCAP 19/9. *Eu.J. Phycol. 31*, 217-224.

Harker, M., & Hirschberg, J. (1998). Molecular biology of carotenoid biosynthesis in photosynthetic organisms. *Methods Enzymol. 297*, 244-263.

Hejazi, M., & Wijffels, R. (2003). Effect of Light Intensity on β-Carotene Production and Extraction by *Dunaliella salina* in Two-Phase Bioreactors. *Biomolecular Engineering 20*, 171-175.

Ho, S., Ye , X., Hasunuma, T., Chang, J., & Kondo, A. (2014). Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae: a critical review. *Biotechnol. Adv. 32*, 1148-1159.

Hongjin Q., & Guangce , W. (2009). Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01. *Chinese J Oceanol Limnol 27*, 762-768.

Hu Q., Faiman, D., & Richmond , A. (1998). Optimal tilt angles of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors. *J Ferment Bioeng., 85*, 230-236.

Hu, Q. (2013). Environmental effects on cell composition. A. Richmond, & Q. Hu içinde, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (s. 114-122). West Sussex: Wiley Blackwell.

Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., & Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy, 87(1)*, 38-46.

Jin, E., Feth , B., & Melis, A. (2003a). A mutant of the green alga *Dunaliella salina* constitutively accumulates zeaxanthin under all growth conditions. *Biotechnol. Bioeng. 81*, 115-124.

Jin, E., Polle, , J., Lee, H., Hyun, S., & Chang, M. (2003b). Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *J. Microbiol. Biotechnol. 13*, 165-174.

Krinsky, N. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology & Medicine, 7*, 617-635.

Leach, G., Oliveira, G., & Morais, R. (1998). Spray-Drying of *Dunaliella salina* to Produce a β-Carotene Rich Powder. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 20*, 82-85.

Lee, C. (2000). Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors. *Biotechnol.Bioprocess Eng.4*, 78-81.

Lee, K., & Lee, C. (2002). Nitrogen removal from wastewaters by microalgae without consuming organic carbon sources. *J Microbiol Biotechnol 12*, 979-985.

Leon, R., Martyn, M., Vigara, J., Vylchez, C., & Vega, J. (2003). Microalgae mediated photoproduction of β-cartoene in aqueous–organic two phase sytems. *Biomol Eng 201*, 77-182.

Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2013). High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Bioresour. Technol. 131*, 60-67.

Liang Y.N., S. ,., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett 31*, 1043-1049.

Lv, H., Cui, X., Wahid, F., Zhong , F., & Jia, S. (2016). Analysis of the Physiological and Molecular Responses of *Dunaliella salina* to Macronutrient Deprivation. *PLoS ONE 11(3): e0152226*.

M.A., B., & Borowitzka, L. (1982). The life cycle of *Dunaliella salina*. *Australasian Soc. for Phycology and Aquatic Botany*, 18.

Massyuk, N. (1966). Mass culture of the carotene containing alga *Dunaliella* salina Teod. *Ukr. Bot. Zh. 23*, 12-19.

Massyuk, N. (1973). *Morphology, Taxonomy, Ecology and Geographic Distribution of the Genus Dunaliella Teod. and Prospects for its Potential Utilization.* Kiev: Naukova Dumka Press.

Mata, T., Martins , A., & Caetano , N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other application: review. *Renew Sustain Energy Rev 14*, 217–232.

Miao, X., & Wu , Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technol 97*, 841-846.

Milano, J., Vellayan, V., Loh, P., Lam, M., Chong, W., Masjuki, H., & Ong, H. (2016). Microalgae biofuels as an alternative to fosil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 58*, 180–197.

Mil'ko, E. (1962). Study of the requirement of two *Dunaliella sp.* in mineral and organic components of the medium. *Moscow Univ. Vset., Biol. 6*, 21-23.

Milko, E. (1963). Effect of various environmental factors on pigment production in the alga *Dunaliella salina*. *Mikrobiologiya 32*, 299–307.

Mojaat M., Pruvost , J., Foucault , A., & Legrand , J. (2008). Effect of organic carbon sources and Fe2+ ions on growth and beta-carotene accumulation by *Dunaliella salina*. *Biochemical Engineering Journal 39,*, 177-184.

Moreno-Garcia, L., Raghavana, G. S., Barnabéb, S., & Adjalléb, K. (2017). Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 76*, 493-506.

Mousavi P., G. Y., Niazi, A., Hamidi, M., Mohagheghzadeh, A., Abolhassanzadeh, Z., Morowvat, M., & Najafabady, N. (2016). Investigating the effects of phytohormones on growth and β-carotene production in a naturally isolates stain of *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 6 (08)*, 161-174.

Nguyen, S., Tran, D., Portilla, S., & Vo, T. (2014). Medium Improvement for Higher Growth and Longer Stationary Phase of *Dunaliella*. *Journal of Plant Sciences 2*, 9-13.

Norici, A., Dalsass, A., & Giordano, M. (2002). Role of phosphoenolpyruvate carboxylase in anaplerosis in the green microalga *Dunaliella salina* cultured under different nitrogen regimes. *Physiol. Plant. 116*, 186-191.

Oren, A. (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems*, s. 1,2.

Oren, A. (2006). Halophlic Microorganisms and Their Enviroments. *Kluwer Academic Publishers*, 517-537.

Park, S., Lee , Y., & Jin, E. (2013). Comparison of the Responses of Two *Dunaliella* strains, *Dunaliella salina* CCAP 19/18 and *Dunaliella bardawil* to Light Intensity with Special Emphasis on Carotenogenesis. *Algae 28*, 203-211.

Patel, A., Gamia , B., Patela, P., & Patela, B. (2016). Microalgae: Antiquity to era of integrated technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 71*, 535-547.

Perez-Garcia O., ,. B., de-Bashan, L., & Escalante, F. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research, 45*, 11-36.

Pisal, D., & Lele, S. (2005). Carotenoid Production from Microlaga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology, 4*, 476-483.

Podevin, M., De Francisci, D., Holdt, S., & Angelidaki, I. (2015). Effect of nitrogen source and acclimatization on specific growth rates of microalgae determined by a high-throughput in vivo microplate autofluorescence method. *J. Appl. Phycol. 27*, 1415-1423.

Pourkarimi, S., Alizadehdakhel, A., Hallajisani, A., Nouralishahi, A., & Golzary, A. (2020). Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 29*, 101771.

Prieto, A., Canavate , J., & García-González, M. (2011). Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *Journal of biotechnology, 151(2)*, 180-185.

Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol. 65*, 635-648.

Rad, F., Aksoz , N., & Hejazi , M. (2011). Effect of Salinity on Cell Growth and β-Carotene Production in *Dunaliella sp.* Isolates from Urmia Lake in Northwest of Iran. *African Journal of Biotechnology 10*, 2282-2289.

Raja, R., Hemaiswarya, S., & Rengasamy, R. (2007). Exploitation of Dunaliella. *Applied Microbiology and Biotechnology 74*, 517-523.

Ramanna, L., Guldhe, A., Rawat, I., & Bux, F. (2014). The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. *Bioresour. Technol. 168*, 127-135.

Ratledge, C., Kanagachandran , K., Anderson, A., Grantham , D., & Steph, J. (2001). Production of docosahexaenoic acid by *Crypthecodinium cohnii*

grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source. *Lipids, 36(11)*, 1241–1246.

Richmond, A. (1992). Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. *J. Appl. Phycol. 4*, 281-286.

Ruangsomboon, S. (2015). Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcus braunii* KMITL and its biodiesel properties based on fatty acid composition. *Bioresour. Technol. 191*, 377-384.

Sathasivam, R., & Ki, J. (2018). A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Marine drugs 16*, 26.

Solomon, C., & Glibert, P. (2008). Urease activity in five phytoplankton species. *Aquat. Microb. Ecol. 52*, 149-157.

Su, Y., Chena, X., Chenga, J., Suc, Y., Zhangb, P., & Songb, K. (2017). Progress of microalgae biofuel's commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 74*, 402-411.

Tafreshi, H., & Shariati, M. (2008). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology 107*, 14-35.

Taha, O., Abd El-Hady, H., Abo El-Kheir , W., & Hammouda, F. (2012). Production of β-Carotene and Glycerol from *Dunaliella bardawil* and *Dunaliella salina* Isolated from the. *International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences.* Dubai.

Tran, D., Doan, N., Louime, C., Giordano, M., & Portilla, S. (2014). Growth, Antioxidant Capacity and Total Carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a Low Cost Enriched Natural Seawater Medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology 30*, 317-322.

Turon, V., Steyer, J., Trably, E., & Fouilland, E. (2016). Potentialities of dark fermentation effluent as substrates for microalgae growth: A review. *Process Biochemistry*.

Vonshak A., & Maske, H. (tarih yok). Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis, section3. *Algae: Growth Techniques and Biomass Production.* içinde

Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J., Oyler, G., & Betenbaugh, M. (2011). The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Appl Microbiol Biotechnol 91*, 835-844.

Wang, J., Sommerfeld, M., Lu, C., & Hu, Q. (2013). Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae 28*, 193-202.

Wen, Z., & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances, 21(4)*, 273-294.

Wu, L., Chen, P., & Lee, C. (2013). The effects of nitrogen sources and temperatures on cell growth and lipid accumulation of microalgae. *Int. Biodeterior. Biodegrad. 85*, 506-510.

Wu, M., Wang, J., Hu, Z., Zhu, H., Lei, A., Lu, ,. J., & Zhu, R. (2020). Effects of different abiotic stresses on carotenoid and fatty acid metabolism in the green microalga *Dunaliella salina* Y6. *Annals of Microbiology 70*, 48.

Yeh, K., Chang , J., & Chen , Y. (2010). Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Eng Life Sci 10*, 201-208.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Fıçıcıoğlu, M., Özçimen D. (2023) Effect of Different Carbon and Nitrojen Sources on Cell Growth Kinetics of *Dunaliella salina* Under Mixotrophic Culture Conditions. Conference Algaeurope, 12-15 December 2023, Prague, Czech Republic.