T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞRU ELEKTRİK AKIMI UYGULAMALARININ MİKROALG *CHLORELLA VULGARIS*'İN BÜYÜME VE KAROTENOİD KOMPOZİSYONU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

OSMAN KÖK
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

KIRIKKALE 2022

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞRU ELEKTRİK AKIMI UYGULAMALARININ MİKROALG *CHLORELLA VULGARIS*'İN BÜYÜME VE KAROTENOİD KOMPOZİSYONU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

OSMAN KÖK
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

KIRIKKALE 2022

OSMAN KÖK tarafından hazırlanan DOĞRU ELEKTRİK AKIMI UYGULAMALARININ MİKROALG *CHLORELLA VULGARIS*'İN BÜYÜME VE KAROTENOİD KOMPOZİSYONU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ adlı tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN İmza…….
Biyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan: Prof. Dr. Tahir ATICI İmza…….
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Prof. Dr. Nursel GÜL İmza…….
Zooloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Prof. Dr. Mustafa TÜRK İmza…….
Biyomühendislik Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ İmza…….
Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 22/02/2022
Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

……
Prof. Dr. Recep ÇALIN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Aileme

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

……..

Osman KÖK

22/02/2022

ÖZET

DOĞRU ELEKTRİK AKIMI UYGULAMALARININ MİKROALG *CHLORELLA VULGARIS*'İN BÜYÜME VE KAROTENOİD KOMPOZİSYONU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Şubat 2022, 134 Sayfa

C*hlorella vulgaris*, büyük ölçekli biyokütle yetiştiriciliği yapılarak, karotenoid türevi bileşiklerinin de içinde bulunduğu, "değerli biyobileşik" üretiminde kullanılan az sayıdaki mikroalg türlerinden birisi olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, Kızılırmak (Kırıkkale) nehrinden örneklenen ve laboratuvar ortamında izolasyonu ve saflaştırılması yapılan *Chlorella vulgaris* mikroalg türünün biyokütlesine doğru elektrik akımı uygulanmak suretiyle, büyüme (kültivasyon) evreleri esnasında ortaya çıkan değişiklikler belirlenmiştir. Bu değişikliklerin, hedef bileşik olarak seçilen karotenoidlerin son üründeki (hasat) miktar ve kompozisyonunu belirlemedeki rolü araştırılmıştır.

Mikroalg kültivasyonları üzerindeki doğru akım uygulamaları, yoğunluk (voltaj şiddeti) ve süre (voltaj uygulama süresi) özelliklerinin çapraz kombinasyonları yapılarak tasarlanmıştır. Buna göre; 10V, 20V ve 30V şeklinde dereceli olarak artışların kullanıldığı her bir voltaj şiddetine ait 5sn, 30sn ve 60sn olmak üzere yine farklı süre uygulamalarını içeren grupların 3X3 faktörlü bir tasarım ortaya çıkmaktadır. Kültivasyon esnasında gün aşırı örneklemeleri yapılarak büyüme parametrelerine ilişkin ölçümleri yapılan mikroalg kültürlerinden 10V ve 20V uygulamasına ait gruplar 33. gün sonunda, 30V uygulamasına ait gruplar ise 29. günde sonlandırılarak hasat işlemleri yapılmıştır. Hasat üzerinde, karotenoidlerin ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiş, miktar ve kompozisyonları HPLC analizi ile yapılmıştır. Hasat örneklemeleri kullanılarak, farklı elektrik uygulamaları sonucu makromoleküllerde ortaya çıkan farklılıklar FT-IR analizi sonuçları ile değerlendirilmiştir.

Büyümenin takibinde kullanılan parametrelerden Hücre Sayısı ve OD_{720} ölçümlerine ilişkin sonuçlar, voltaj şiddeti ve süresindeki tedrici artışlara paralel şekilde biyokütle üzerinde kademeli artışların (şiddet için; K<10V<20V<30V, süre için; K<5sn<30sn<60sn) ortaya çıktığını göstermiştir. Bu durumun, doğru akım uygulamalarının hücre zarları üzerindeki porlaşmaları ve buna bağlı olarak geçirgenliklerini artırmış olabileceği ve dolayısıyla ortamdan besin alışverişini hızlandırmış olabileceği düşünülmektedir. Hasat örneği üzerinde yapılan zeta

potansiyeli ölçümleri bu iddiayı destekler niteliktedir. Büyümenin geç evrelerinde görülen hücre ölümlerinin başlama tarihi, voltaj şiddeti ve süre uygulamalarına göre değişiklik göstermiştir. Özellikle, 30sn ve 60sn süre uygulamalarında belirginleşen bu tarihler, 10V için 27. gün, 20V için 23. gün ve 30V için 19. gün olarak ortaya çıkmıştır. Işık ve elektron mikroskobisi gözlemleri de bu bulguları destekler niteliktedir.

Hücre ölümleriyle başlayan yeni bir evreye girdiklerinde fotosentezde kullanılan PSI ve II sistemlerinde gelişen olayların yeni stratejilerle fotosentetik verimliliği (rate limitasyon ile) artırma (dengeleme) yönüne gittikleri tahmin edilmiştir. Hücre başına düşen pigment (Klo-*a*, *b* ve karotenoid) miktarları, her bir voltaj şiddetine ait 30sn ve 60sn uygulamalarında belirgin bir şekilde daha yüksektir. Ancak, aynı uygulamaların pigment başına iş yapma kabiliyeti (Kuvantum verimliliği/ pigment) daha düşüktür. Fotosentetik verimlilik en yüksek 20V 5sn uygulamasında elde edilmiştir.

Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizi, doğru akım uygulamalarından 20V 5sn uygulamasının toplam karotenoid (toplam all-*trans*-karotenoid ve toplam *cis*-karotenoid miktarı) miktarını artırdığını ortaya koymuştur. Bu artışlarda, toplam karotenoid kütlesi içerisindeki ksantofil karotenoid miktarının yüksek karoten kütlesinin ise daha düşük olarak temsil edildiği belirlenmiş ve yoğun bir izomerleşmeye işaret etmiştir. Diğer doğru akım uygulamaları ise, karotenoid miktarını azaltmıştır. Doğru akım uygulamalarının şiddeti ve süresine bağlı olarak *C. vulgaris*'in biyomolekülleri üzerine farklı etkilerin ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Doğru akım uygulamalarının tamamında karbonhidrat miktarının artışı tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Chlorella vulgaris*, doğru akım, büyüme, biyokütle, karotenoidler, biyomolekül.

ABSTRACT

THE EFFECT OF DIRECT ELECTRIC APPLICATIONS ON THE GROWTH AND CAROTENOIDS COMPOSITIONS OF MICROALGAE, *CHLORELLA VULGARIS*

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph.D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

February 2022, 134 pages

Chlorella vulgaris has been accepted to be the one among few microalgae species that were utilized in the derivation of carotenoids compounds through the mass production of biomass. In this study, by the treatment of Direct Electric Treatment (DET) on the cultured biomass of *C. vulgaris* in the laboratory, that were cultivated through the isolation of cells from the river Kızılırmak (Kırıkkale), changes occurring during growth that were assumed to play some role on the yield and the compositions of carotenoids being targeted molecules in the harvested biomass, was evaluated.

DET experiments were implemented on 3 replicated groups using the cross combinations of intensity as 10V, 20V and 30V and their durations as 5sn, 30sn and 60sn presenting a 3X3 factorial design. Of the microalgae culture groups that were subsampled for the measurements of growth parameters, 10V and 20V groups were terminated on day 33 and 30V on day 29 to harvest. Following the carotenoid extraction from harvested biomass, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to analyse the yield and the composition of carotenoids compounds including *trans* and *cis* forms on the extracted carotenoids. Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR) was resorted to analyse macromolecules on the subsampled harvest in order to explore the differences between groups of each treatment.

Of the growth parameters, Cell Count and OD_{720} measurements showed clearly that increments in the intensity and durations within the designed application resulted in gradual increases being demonstrated as K<10V<20V<30V and K<5sn<30sn<60sn. This first result implied that growth was changed by the electric treatment through changes occurred both growth media and cells and their interactions thereby. The increased cell membrane electroporations upon electric applications were speculatively discussed only with results in the literature where the much higher electric voltages were utilized to lyse microalgae cells during the mass production of large scale bioreactors.

Zeta potential values showing increases on the unstability of cells upon increases in the intensity and durations of direct electric also supported the idea that electroporations on cell membranes were triggered by the electric applications in this

study. Furthermore, light and electron microscopy observations revealed the changes in the samples of harvested cultures. Based upon growth parameters, these changes driven by the level of intensity and duration of electric applications were initiated in the cultures in a consecutive manner which were prominently expressed on 30sn and 60sn durations of each intensity, occurring on day 27 for 10V, day 23 for 20V and day 19 for 30V.

In the new (post growth) phase of cultures initiated by the overwhelming character of cell deaths, microalgae tended to balance mechanisms of photosystem I and II based upon the dynamically changing rate limited strategies in photosynthesis. This was concluded from the results that the amount of pigment per cell was found to be higher in 30sn and 60sn durations of each intensity whereas the photosynthetic efficiency (quantum yield) per cell showed contrasted findings. It was also notably found that photosynthetic efficiency was the highest in 20V 5sn application.

HPLC analysis revealed that 20V 5sn application among others resulted in increases in the amount of total carotenoids (both total all-*trans* and total-*cis* carotenoids). Within the total carotenoids, xanthophyll carotenoids were represented at a higher ratio compared to total carotenes in 20V 5sn application, indicating the occurrence of more intensive isomerization. The remaining electric treatments resulted in contrastingly reduced total carotenoids. As revealed by FT-IR analysis, macromolecules in the samples of harvested biomass of *C. vulgaris* showed changes depending on different intensity and durations. Increases in carbohydrates commonly found in all kinds of treatments were discussed.

Keywords: *C. vulgaris*, direct current, growth, biomass, carotenoids, biomolecule.

TEŞEKKÜR

Bu doktora tez çalışması Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi 2019/054 numaralı projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu projeyi finanse eden Kırıkkale Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim sürecinde tecrübesiyle ve bilgisiyle bana yol gösteren, tezimin her aşamasında katkı ve desteğini esirgemeyen, daima hoşgörü ile yaklaşan, danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhami TÜZÜN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü imkânı sunan, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinin (KÜBTUAM) değerli yöneticisi Sayın Prof. Dr. Siyami KARAHAN'a ve güler yüzlü personeline teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasındaki katkı ve desteği için Öğretim Görevlisi Dr. Yaşar ALUÇ'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Doğru yönlendirmelerinden her zaman faydalandığım Dr. Gökben Başaran KANKILIÇ'a şükranlarımı sunarım.

Doktora öğrenimim sırasında her türlü kolaylığı sağlayan, mensubu olmakla gurur duyduğum şanlı Emniyet Teşkilatına teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan aileme; büyük anlayış gösteren sevgili eşim Meryem KÖK'e, oğlum Mehmet Ali, kızım Saniye Ezgi ve dualarını esirgemeyen anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Osman KÖK

KIRIKKALE-2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT vi

TEŞEKKÜR viii

İÇİNDEKİLER ix

ÇİZELGELER DİZİNİ xii

ŞEKİLLER DİZİNİ xiv

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xvii

1. GİRİŞ 1

1.1. Mikroalglerin Genel Özellikleri 3

1.2. Mikroalgal Biyokütle, Önemi ve Biyoteknolojik Yaklaşım 4

1.3. Mikroalgal Büyümeyi ve Metabolitlerini Etkileyen Faktörler 7

1.3.1. Abiyotik Stres Faktörleri 7

1.3.2. Elektroteknolojik Uygulamalar 8

1.3.3. Doğru Akım 9

1.4. *Chlorella Vulgaris* Mikroalginin Taksonomisi, Genel Özellikleri ve Önemi 10

1.5. *Chlorella vulgaris* Pigment İçeriği 12

1.6. Karotenoidler 13

1.7. Karotenoid Biyosentezi 15

1.8. Karotenoidlerden Bazıları 16

1.8.1. Beta-karoten 16

1.8.2. Astaksantin 17

1.8.3. Kantaksantin 18

1.8.4. Lutein 18

1.9. Çalışmanın Çerçevesi ve Amacı 19

2. MATERYAL VE YÖNTEM 21

2.1. Materyal 21

2.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar 21

2.1.2. Kullanılan Araçlar 22

2.2. Yöntem 23

2.2.1. Deney Yaklaşımı ve Modeli 23

2.2.2. Deneyin Yapılışı 24

2.2.3. Stok Kültür Ortamı 25

2.2.4. TAP Besiyeri İçeriği ve Hazırlanışı 26

2.2.5. Doğru Akım Uygulaması 27

2.2.6. Klorofil ve Karotenoid Deneyleri 28

2.2.7. pH Ölçümü 28

2.2.8. Birey Sayım İşlemi 29

2.2.9. Optik Yoğunluk Ölçümü 30

2.2.10. Ekimi Yapılan Örneklerin Hasat İşlemi 30

2.2.11. Alg Ekstraktlarının Hazırlanması 31

2.2.12. Karotenoid Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 31

2.2.13. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi 32

2.2.14. Karotenoid Hesaplanması ve HPLC Piklerinin Tanımlanması 33

2.2.15. FT-IR Analizi 36

2.2.16. Zeta Potansiyeli ve Zeta Size Ölçümü 36

2.2.17. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Çalışması İçin Numune Hazırlama 37

2.3. İstatistik Yöntemler 38

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 39

3.1. Büyüme Parametreleri; Birey Sayısı, Optik Yoğunluk (OD) ve Klorofil-*a* 39

3.2. Klorofil Floresans Değişimlerinin Pigmentler ve Büyüme ile Olan İlişkisi 57

3.3. Deneyler Sırasında Yapılan Morfolojik Gözlemler ve Mikroskobik İnceleme..... 66

3.4. Zeta Potansiyeli ve pH 74

3.5. Hasat İşlemi ve Elde Edilen Biyokütle Üzerindeki Analizler 76

3.5.1. Hasat İşlemi ve Elde Edilen Biyokütle 76

3.5.2. Hasat Sonrası Elde Edilen Biyokütlede Ekstrakte Edilen Karotenoid Miktarları 77

3.5.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analiz Sonuçları 78

3.5.4. Biyomoleküllerde Meydana Gelen Değişiklikler..... 85

4. DEĞERLENDİRME..... 95

KAYNAKLAR..... 97

ÖZGEÇMİŞ..... 114

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE Sayfa

2.1. Karotenoid standart ve çözücü miktarları 32

2.2. Karotenoid standart solusyon oranları 32

3.1. Kültivasyon süresince, her bir maruziyet süresince uygulanan farklı voltaj şiddetine göre büyüme parametrelerinin farklılık testi [10V, 20V ve 30V için sırasıyla, HS: İki yönlü, Kruskall-Wallis H (2, N= 43) =0.72 p =0.69; H (2, N= 43) =0.16, p =0.91; H (2, N= 43) =0.12, p =0.94. Klo-*a*: H (2, N= 43) =17.06 p =0.00; H (2, N= 43) =18.48 p =0.00; H (2, N= 43) =12.19 p =0.00. Klo-*b*: H (2, N= 43) =19.59 p =0.00; H (2, N= 43) =18.57 p =0.00; H (2, N= 43) =15.16 p =0.00; TKar: H (2, N= 43) =14.73 p =0.00; H (2, N= 43) =14.62 p =0.00; H (2, N= 43) =8.67 p =0.00. OD720: H (2, N= 43) =1.49 p =.47; H (2, N= 43) =8.79 p =0.012; H (2, N= 43) =12.13 p =0.00]. Logaritma (Log 10) dönüşümlü veriler kullanılmıştır. 47

3.2. Kültivasyon süresince, büyüme parametrelerinin her bir voltaj şiddetinde uygulanan süre maruziyetleri arasındaki farklılık testi [10V, 20V ve 30V için sırasıyla, HS: İki yönlü, Kruskall-Wallis- H (3, N= 60) =0.64 p =0.88; H (3, N= 60) =2.37 p =.49; H (3, N= 52) =2.79 p =0.42. Klo-*a*: H (3, N= 60) =13.02 p =0.00; H (3, N= 60) =37.53 p =0.00; H (3, N= 52) =22.31 p =.00. Klo-*b*: H (3, N= 60) =10.28 p =0.016; H (3, N= 60) =28.91 p =0.00; H (3, N= 52) =12.44 p =0.00. TKar: H (3, N= 60) =11.07 p =0.01; H (3, N= 60) =26.26 p =.00; H (3, N= 52) =11.41 p =0.00. OD720: H (3, N= 60) =26.42 p =0.00; H (3, N= 60) =34.93 p =0.00; H (3, N= 52) =35.37 p =0.00]. Logaritmik (Log 10) dönüşümlü veriler kullanılmıştır. HS: Hücre sayısı 48

3.3. Büyüme periyodu ve post büyüme periyodundaki ortalama birey sayıları ve spesifik büyüme oranları 50

3.4. *C. vulgaris*'e ait kültürlerin iki büyüme evresinde doğru akım uygulamalarına göre hesaplanan ortalama OD_{720} ve OD_{680}/OD_{720} oranı değerleri BE: Büyüme Evresi 52

3.5. Büyüme evresi ve post büyüme evresindeki Klo-*a*/Klo-*b* ve Klo-*a*/TKar oranları 57

3.6. Her bir büyüme evresinde birey başına düşen ortalama pigment miktarları (100picog/hücre) ve pigment başına üretilen kuvantum ürünü. QY: Kuvantum ürünü, Klo-*a*: Klorofil-*a*; TKar: Toplam karotenoid; Klo-*b*: Klorofil-*b*; BE: Büyüme Evresi 65

3.7. Hasat zamanı kültürlerin zeta potansiyeli ve pH sonuçları 75

3.8. Hasat işlemi sonrası elde edilen yaş ve kuru biyokütle 76

3.9. *Chlorella vulgaris* mikroalginde ekstrakte edilen toplam karotenoid miktarları 77

3.10. HPLC analizi sonucu hesaplanan karotenoid miktarları..... 78

3.11. HPLC analizi sonucu hesaplanan karotenoid bileşikleri miktarları. 79

3.12. *Chlorella vulgaris* mikroalgi ile yapılan farklı çalışmalardaki karotenoid miktarları 80

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL Sayfa

1.1. Elektroteknolojik uygulamalar; Yüksek Voltaj Elektrik Akımı (HVED), Darbeli Elektrik Alan (PEF), Doğru Akım (DC) ve Alternatif Akım (AC) uygulamalarının genel kurgusu (Geada vd., 2018) 9

1.2. *Chlorella vulgaris* hücresi (Safi vd., 2014) 11

1.3. Karotenlerden likopen ve β-karoten, ksantofillerden zeaksantin ve violaksantinin yapısı (Giuffrida vd., 2018) 13

2.1. Deneyin şematik özeti (Toplam 30 adet stok kültür; 30*150=4500 mL TAP besiyeri + 5'er mL *Chlorella vulgaris* inokülasyonu) 24

2.2. Ekim işlemi, örneklerin alınması ve doğru akım uygulamasının yapıldığı UV steril kabin 25

2.3. Hasat zamanı 20V deneyi stok kültürleri 25

2.4. İklimlendirme kabinindeki kültivasyon ortamı 26

2.5. UV-vis spektrofotometre ve numuneler 28

2.6. pH metre ve hasat sonrası besiyeri pH ölçümü 29

2.7. Birey sayım işlemi için özel tasarlanan sedimantasyon tüpleri ve kültürler 29

2.8. Optik yoğunluk ölçüm cihazı ve küvetleri 30

2.9. Hasat işleminin yapıldığı santrifüj cihazı, kültürler ve muhafaza edilen biyokütle 30

2.10. All-*trans*-β-karoten kalibrasyon grafiği 33

2.11. All-*trans*-lutein kalibrasyon grafiği 34

2.12. Zeaksantin kalibrasyon grafiği 34

2.13. β-kriptoksantin kalibrasyon grafiği 35

2.14. Kapsantin kalibrasyon grafiği 35

2.15. Astaksantin kalibrasyon grafiği 36

2.16. Zetasizer cihazı ve küveti 37

2.17. Taramalı elektron mikroskobu ve numune hazırlama aparatı 37

3.1. Kültivasyon süresi boyunca doğru akım uygulanan kültürlerdeki birey sayılarının değişimi. 40

3.2. Kültivasyon süresi boyunca *C. vulgaris* kültürlerine ait OD_{720} değerlerinin voltaj ve maruz bırakma süresine göre değişimleri 42

3.3. Kültivasyon süresi boyunca kültürlere ait Klorofil-*a* değerlerinin voltaj şiddeti ve maruz bırakma sürelerine göre değişimleri 43

3.4. Kültivasyon süresi boyunca kültürlere ait toplam karotenoid değerlerinin voltaj şiddeti ve maruz bırakma sürelerine göre değişimleri 44

3.5. Kültivasyon süresi boyunca kültürlere ait Klo-*b* değerlerinin voltaj şiddeti ve maruz bırakma sürelerine göre değişimleri 45

3.6. Kültivasyon süresi boyunca kültürlerin F0 değerlerinin değişimi. 59

3.7. Kültivasyon süresi boyunca Fv/Fm değerlerinde meydana gelen değişiklikler 62

3.8. 30V deneyi kültürlerinin görünümü 66

3.9. (-1., -2., -3., -4., -5.) 30V deneyi kültürlerinde kümeleşmenin başlamasını ve devamını gösteren mikroskop (x40) görüntüsü fotoğrafları 67

3.10. 30V deneyi kültürlerindeki flokülasyonun fotoğrafları (Kontrol=K1, 5sn=30-1, 30sn=33-1 ve 60sn=36-1) 68

3.11. 10V ve 20V deneyi 30sn ve 60sn kültürlerindeki flokülasyonun fotoğrafları 69

3.12. *Chlorella vulgaris* mikroalginin kontrol kültürü ve 20V 60sn doğru akım uygulanan kültürünün taramalı elektron mikroskobu fotoğrafı 70

3.13. *Chlorella vulgaris* hücrelerinin hasat zamanı 20V 60sn kültürlerinin taramalı elektron mikroskop fotoğrafı 71

3.14. 10 volt HPLC kromatogramı 81

3.15. 30 volt HPLC kromatogramı 81

3.16. 20 volt HPLC kromatogramı 82

3.17. 10V protein molekülü FT-IR kromatogramı 87

3.18. 10V lipit molekülü FT-IR kromatogramı 88

3.19. 10V karbonhidrat molekülü FT-IR kromatogramı 88

3.20. 20V protein molekülü FT-IR kromatogramı 89

3.21. 20V lipit molekülü FT-IR kromatogramı 90

3.22. 20V karbonhidrat molekülü FT-IR kromatogramı 90
3.23. 30V protein molekülü FT-IR kromatogramı..... 91
3.24. 30V lipit molekülü FT-IR kromatogramı 92
3.25. 30V karbonhidrat molekülü FT-IR kromatogramı 92

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrad Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
Å	Angstrom
AC	Alternatif Akım
BE	Büyüme Evresi
DC	Doğru Akım
dk	Dakika
g	Gram
HVED	Yüksek Voltaj Elektrik Akımı
K	Kontrol
Klo-*a*	Klorofil-*a*
Klo-*b*	Klorofil-*b*
kV	Kilovolt
L	Litre
Lux	Işık Birimi
mg	Miligram
mL	Mililitre
N	Azot
nm	Nanometre
OD	Optik Yoğunluk
PBE	Post Büyüme Evresi
PEF	Darbeli Elektrik Alan
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
rpm	Dakikadaki Dönüş Hız Birimi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
sn	Saniye
T	Ton
TAP	Tris-Asetat-Fosfat Besiyeri

TKar	Toplam Karotenoid
V	Volt
v/v	Hacimce Yüzde
VS	Voltaj Maruziyet Süresi
VŞ	Voltaj Şiddeti
α	Alfa

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun sürekli artışıyla birlikte bitmeyen enerji ihtiyacı, alternatif yenilikçi teknolojilerin uygulanmasıyla çözülmeye çalışılmaktadır (Geada vd., 2018; Chaudhary, Gustafson ve Mathys, 2018; Buchmann, Frey, Gusbeth, Ravaynia ve Mathys, 2019). Bu kapsamda mikroalgler bilim dünyasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Geada vd., 2018).

Dünyadaki en eski yaşam formlarından biri olan mikroalgler; tatlı ve tuzlu sular, deniz ve toprak ortamları gibi çok çeşitli habitatlarda yaşayabilen tek veya çok hücreli, mikroskobik, fotosentetik mikroorganizmalardır (Falkowski ve Raven, 1997). Sucul habitatlarda güneş ışığı yardımıyla; karbonhidratlar, lipitler, proteinler, karotenoidler, alkaloitler ve yağ asitleri gibi organik değerli bileşikleri sentezledikleri bilinmektedir (Bule, Ahmed, Maqbool, Bilal, ve Iqbal, 2018; Goh vd., 2019). Bu bileşikler sağlık, gıda, kozmetik, enerji gibi sektörlerde çeşitli amaçlar için yaygın şekilde kullanılmaktadır (Stange, 2016).

Bu değerli bileşiklerden sekonder metabolitler olarak bilinen, yaşamımızın hemen her aşamasında yer alan ve insan sağlığı için önemli olan karotenoidler; mikroalgler dışında bitkiler, fotosentetik ve fotosentetik olmayan bazı bakteriler, mantarlar ve böcekler gibi diğer yaşam formları tarafından da sentezlendiği bilinen izoprenoid pigmentlerdir (Yabuzaki, 2017). Kırk karbonlu konjuge çift bağlardan oluşan izoprenoid yapı pekçok organizmada önemli biyolojik fonksiyonlar sergilemektedir (Simpson, 1985). Zeaksantin ve lutein gibi oksijen içerenler ksantofiller olarak isimlendirilirken, likopen ve beta-karoten gibi oksijen içermeyenler ise karotenler olarak isimlendirilirler. Ksantofiller yapılarında en az bir OH grubu içermekte olup, karotenlere göre daha fazla polarite göstermektedirler (Krinsky ve Johnson, 2005). Karotenoidlerin 40 karbonlu izoprenoid yapısı, doğada yaygın olarak all-*trans* formunda bulunur. Pek çok araştırmada bu yapının ısı, ışık gibi faktörlerin etkisiyle izomerizasyona uğrayarak *cis* ve/veya *trans* formuna dönüştüğü (Murakami vd., 2018; Xiao vd., 2018; Honda, Takasu, Nakagawa, ve Tsuda, 2021) ve bu izomer

yapıların toplam karotenoid içeriğindeki dağılımının ise türler arasında farklılık gösterdiği (Aluç, Başaran Kankılıç ve Tüzün, 2018) belirtilmiştir. Bazı çalışmalarda *trans* izomerlerinin *cis* izomerlerine göre daha kararlı ve yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir (Agarwal, Shen, Agarwal ve Rao, 2001)

İnsan vücudundaki biyokimyasal işleyiş sırasında oluşan reaktif oksijen (oksijen iyonu veya peroksil radikalleri), lipit, protein ve nükleik asitler gibi temel ve önemli biyolojik birimler ile etkileşime girerek onların fizyolojik fonksiyonlarını bozduğu bilinmektedir (Halliwell, 1996; Agarwal vd., 2001). Oksidasyon neticesinde oluşan bu serbest radikaller, kanser, arterosiklerosis, kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma ve buna bağlı makuler dejenarasyon vb. gibi kronik hastalıkların tetikleyicisi olabilmektedir. Son yıllarda artarak devam eden çalışmalarla birlikte karotenoidlerin sahip oldukları özellikler neticesinde yukarıda belirtilen hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde, insanlar için sağlık koşullarının düzenlenmesinde önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir (Guedes, Amaro ve Malcata, 2011). Bu özelliklerin başında, oksidasyon esnasında, yüksek doymamışlıkları nedeniyle diğer moleküllere göre daha etkili ve istekli antioksidan görevini üstleniyor olmaları gelmektedir. Karotenoidlerin söz konusu antioksidan etki mekanizması, bir molekülün konjuge haldeki çift bağlarının sayısı ve karetonoid molekülündeki uç gruplar ya da karetoneidlerdeki siklik uç grupların özelliklerine bağlı olarak gelişen singlet oksijen ve serbest radikalleri bağlama yeteneklerine dayalı olarak oluşturulmaktadır (Britton, 1995; Stahl ve Sies, 1996).

Ayrıca karotenoidler; doğada yaygın olarak bulunan renkli pigmentlerdir. Bitkiler, algler ve bakteriler tarafından sentezlenen yağda çözünen moleküllerdir. Klorofilli organizmalarda fotosentez için olmazsa olmaz olan, ışığı soğurarak yıkıcı ışık oksidasyonlarına karşı koruyucu görev yapan renk pigmentleridir. Oksijenli ortamda fotosentez karotenoidler olmadan gerçekleşmez. Yani bitkilerin ve alglerin fotosentezinde elzem moleküllerdir (Sun, Ren, Zhao, Ji ve Huang, 2018).

Sıcaklık, ışık, tuzluluk, besin tuzu eksikliği ve fazlalığı gibi stres koşullarının mikroalglerin kimyasal bileşimini etkilediği ve biyosentez mekanizmalarını değiştirdiği bilinmektedir. Işık yoğunluğu ve sıcaklığın mikroalglerin biyokütle üretimini etkilediği pek çok araştırmada ortaya konmuştur (Kaczor ve Baranska, 2016). Bunun yanında bazı mikroalg türlerinin farklı stres koşullarında daha fazla karotenoid ürettiği belirlenmiştir. Özellikle karotenidlerden bazılarının sadece stres

koşullarında sentezlendiği görülmüştür. Mikroalglerden yüksek değerlikli metabolitlerinin senteziyle ilgili olasılıkları ortaya koymak için farklı stres koşullarına verdikleri tepkiyi bilmek ayrıca önem arz etmektedir (Skjånes, Rebours ve Lindblad, 2013). Mikroalglerde karotenoid sentezi beslenme ve çevre koşullarına bağlıdır. Işık şiddeti ve türü, sıcaklık ve özellikle N ve P olmak üzere besin açlığına bağlı olarak karotenoid sentezi etkilenebilir (Garbayo, Cuaresma, Vílchez ve Vega, 2008).

Dünya üzerinde uygulamaları devam eden ve alglerin metabolitleri üzerinde oluşan büyük bir ekonomi ve bunu destekleyen araştırma potansiyelinin bulunduğu çok iyi bilinmektedir. Bu doktora tez çalışmasında, insan sağlığından, gıda, yem katkı maddesi, kozmetik ve biyodizel üretimi gibi yüksek ticari boyutta farklı kullanım imkânları olan, birçok bilimsel çalışmaya konu olmuş *Chlorella vulgaris* mikroalginin büyümesi, karotenoid pigment içeriği ve biyomolekülleri üzerine yeni bir uygulamanın etkisi ortaya konmuştur. Bilimsel literatürde elektroteknolojik uygulamalar (Geada vd., 2018) başlığı adı altında kategorize edilen doğru akım uygulamaları sonucu elde edilen bulgular; son yıllarda bütün dünyada yoğun olarak yapılan çalışmalara katkıda bulunacak orijinallikte olup, uygulamada özellikle biyokütle üretimi, gıda (raf ömrü, katkı maddesi vs.) ve sağlık (tıp ve eczacılık) alanında kullanıma yönelik girişimlere izin verecek niteliktedir.

1.1. Mikroalglerin Genel Özellikleri

Mikroalgler; yeryüzündeki en eski yaşam formlarından biridir (Falkowski vd., 2004). Fotosentetik, prokaryotik veya ökaryotik yapıda olup, tek veya çok hücrelidirler (Darvehei, Bahri ve Moheimani, 2018). Basit hücresel yapıları ve hızlı çoğalabilmeleri sayesinde çok çeşitli habitatlarda ekstrem koşullarda yaşayabilirler (Mata, Martins ve Caetano, 2010). Mikroskobik yapıda olup, boyutları birkaç mikrometreden yüzlerce mikrometreye kadar değişebilir. 50000'den fazla türü olduğu tahmin edilen ve yaklaşık 30000 civarında türü tespit edilen mikroalgler (Mata vd., 2010) morfolojik yapıları ve renklerine göre; altın sarısı algler (Chrysophyceae), diatomlar (Bacillariophyceae), dinoflagellatlar (Dinophyceae), kahverengi algler (Phaeophyceae), kırmızı algler (Rhodophyceae), piko-plankton (Prasinophyceae ve Eustimatophyceae), sarı-yeşil algler (Xanthophyceae), siyanobakteriler (Cyanophyceae), yeşil algler (Chlorophyceae) gibi sınıflara ayrılmıştır (Hoek, Mann, Jahns ve Jahns, 1995).

Sucul habitatlarda güneş ışığı yardımıyla; karbonhidratlar, lipitler, proteinler, karotenoidler, alkaloitler ve yağ asitleri gibi organik değerli bileşikleri sentezledikleri bilinmektedir (Bule vd., 2018; Ambati vd., 2019; Goh vd., 2019). Sentezledikleri değerli bileşiklerin oranı kültür koşulları ve türden türe farklılık göstermektedir (Mata vd., 2010; Parra-Saldivar, Cuellar-Bermudez, Romero-Ogawa ve Rittmann, 2014). Bu bağlamda mikroalgal üretim son derece önemli olup, üretimi artırmak ve üretimdeki hedefe ulaşmak için amaca yönelik mikroalg türü seçilerek çalışmalar yapılmaktadır (Aluç vd., 2018; Sun vd., 2018).

Besin zincirinin birinci halkasını oluşturan mikroalgler; daha hızlı büyüme, kolay hasat edilme, daha düşük su tüketimi, yüksek oranda karbondioksit tutma ve yüksek oranda oksijen üretme gibi özellikleri sayesinde yeryüzündeki ekolojik dengenin işleyişinde önemli rol oynarlar (Gouveia ve Oliveira, 2009; Mata vd., 2010; Gupta, Lee ve Choi, 2015) Mikroalgler; yeryüzündeki en eski yaşam formlarından biridir (Falkowski vd., 2004). Fotosentetik, prokaryotik veya ökaryotik yapıda olup, tek veya çok hücrelidirler (Darvehei vd., 2018). Basit hücresel yapıları ve hızlı çoğalabilmeleri sayesinde çok çeşitli habitatlarda ekstrem koşullarda yaşayabilirler (Atici, Katircioglu ve Akin, 2008; Mata vd., 2010). Mikroskobik yapıda olup, boyutları birkaç mikrometreden yüzlerce mikrometreye kadar değişebilir.

1.2. Mikroalgal Biyokütle, Önemi ve Biyoteknolojik Yaklaşım

Sucul ekosistemlerde biyolojik kütlenin birincil üreticileri olan mikroalgler, en temel haliyle, CO_2'yi O_2'ye dönüştürerek yerkürede yaşamın sürdürülebilir olmasına katkıda bulunan organizmalardır. Dahası, günümüz mikroalgal biyoteknoloji uygulamalarıyla, insan yaşamını ilgilendiren, gıda, gıda katkı maddeleri, kozmetik ve ilaç gibi alanlardaki katma değerli biyokütle üretimi ve dolayısıyla küresel biyoekonomiye olan katkısı da yadsınamaz hale gelmiştir (Gouveia, Batista, Sousa, Raymundo ve Bandarra, 2009; Enzing, Ploeg, Barbosa ve Sijtsma, 2014; Bhalamurugan, Valerie ve Mark, 2018). Bioyakıt, biyogübre üretimi ve ayrıca atıksu ve baca gazı arıtımlarında (Shelknanloymilan, Atici ve Obal, 2012; Acien, Gomez-Serrano, Morales-Amaral, Fernandez-Sevilla ve Molina-Grima, 2016; Eppink vd., 2019) alternatif kaynak olarak kabul edilmesi de, mikroalglerin biyoekonomideki potansiyel paylarının büyüklüğüne işaret etmektedir.

Biyoteknolojik uygulamalar açısından, mikroalgler tasarım gerektiren özel sistemler içerisinde üretilebilirler. Bu sistemlerin tasarımında, mevcut temel biyolojik bilgilerin yanısıra, üretim kapasitesi ve rekabet edici kalite koşullarını sağlaması açısından hedef-pazar gereksinimlerinin de göz önünde bulundurulması gereklidir. Üretimleri için, tatlı-su sistemlerinin kendisine veya ekilebilir tarım arazileri gibi insan için değerli alanların kullanılma ihtiyacı bulunmaması önemli bir avantaj olarak öne çıkmaktadır. Mikroalgler, teorik olarak, bir günden daha kısa bir sürede iki katına çıkabilen hızlı büyümeye sahip, bir yılda 100 ton/hektar (kuru ağırlık) gibi çok yüksek biyokütle üretimi kapasitesinde ve güneş enerjisini %10 gibi (diğer bitkilere göre) en yüksek kapasitede kullanabilen, canlılardır. Ancak, bu durum uygulama esnasında ulaşılabilir olmaktan henüz uzaktır. İki katına çıkma süresi 2 güne çıkmakta, biyomas verimliliği 40 ton/hektar/yıl'a düşmekte ve fotosentetik verimlilik %3 civarlarında kalmaktadır. Bu nedenle, mikroalg büyümesi ve son ürün verimliliği konularında halen çok seçenekli uygulamalar, bu konuları optimize etmek için yoğun bir şekilde sürdürülmektedir.

Mikroalg üretiminde ototrofik ve heterotrofik olmak üzere 2 farklı strateji kullanılmaktadır. Ototrofik olana göre, heterotrofik üretim büyüme ve hücre konsantrasyonlarında gözle görülür bir artış sağlamaktadır (Barros vd., 2019) ancak, kullanılan organik karbon kaynağı nedeniyle maliyetin artması, daha düşük protein ve pigment seviyeleri nedeniyle de biyomas pazar değerinin düşmesini de beraberinde dezavantaj olarak getirmektedir. 1kg mikroalg biyoması üretimi için 2kg'a kadar glukoz ilavesine ihtiyaç bulunmaktadır. Gliserol ve asetik asit gibi diğer karbon kaynağı kullanımı esnasında mantar ve bakterilerin ilavesiyle, gıda-tasnifli biyomas eldesi mümkün olabilmektedir. Bu yönteme şimdilik *Chlorella* benzeri alg türlerinin cevap verebildiği bilinmektedir. Ototrofik üretimde, güneş ışığı enerji kaynağı olarak kullanılmakta, inorganik karbon ve diğer elementlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bir (1) ton alg biyoması üretimi için, 2T CO_2, 0.1T azot, 0.01T fosfor ve 0.015T potasyuma ihtiyaç duyulmakta olup, bu işlemden 2T O_2 açığa çıkmaktadır. Bu strateji, *Spirulina (Arthrospira), Chlorella, Dunaliella* and *Haematococcus* gibi günümüz itibariyle en fazla üretimin yapıldığı türlerde başvurulan başlıca yöntemdir (Draaisma vd., 2013).

Endüstriyel tesisleşme ve üretimleri açısından, soya ve diğer balık yan ürünleri sektörleriyle karşılaştırıldığında mikroalgler küçük ölçekli endüstriyel aktivite sınıfına girmektedir. Gıda katkı maddesi olarak premiks'lerde ve gıda uygulamalarında küresel

mikroalg üretimi 20kt/yıl olup, biyomas değeri 15-25 €/kg arasında değişmektedir. Balık ürünleri sektöründe, 7000kt/yıl olan üretimdeki ürün değeri 1,5€/kg olurken, soya sektöründe 200 000kt/yıl üretiminde elde edilen katkı maddesi ortalama değeri 0.5€/kg'dır. Dünyadaki mikroalg endüstriyel tesislerin çoğunluğu, açık sistem biyoreaktörler için 1-50 hektar, 10-500 m^3'hacimli kapalı biyoreaktörlerden oluşan, küçük ya da orta ölçekli işletmelerdir. Dünyada oldukça yaygın olan ve *Spirulina, Chlorella, Dunaliella* and *Haematococcus* gibi türlerin suşlarını kullanan ve insan kullanımına yönelik ürünleri üreten açık sistemli yaklaşık 500 adet küçük ölçekli (5<ha) ve yaklaşık 300 adet orta ölçekli (5-50ha) tesis bulunmaktadır.

Gıda, gıda katkısı, sağlık ve kozmetik bağlantılı sektörleri ilgilendiren günümüz mikroalg uygulamalarında, 100kt/yıl büyüklüğe sahip pazarda biyokütlenin 5-500€/kg fiyat aralığında değerlendiği görülmektedir. Biyoyakıt, biyogübre ve biyoarıtım sektörlerindeki fiyatlama 5€/kg'a kadar düşmesine ragmen, sektör hacimleri alabildiğince büyüktür.

Gıda katkıları ve sağlıklı gıda sektörlerindeki mikroalg uygulamalarında, bütün esansiyel amino asitleri içeren yüksek protein konsantrasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerince zengin yüksek profilli lipidler, polisakaritlerce zengin aktif karbohidratları içerdiği için, mikroalgler yüksek besin değerine sahip mikroorganizmalar sınıfına dahil edilmektedir. Omega-3 yağ asitleri (örn. Eicosapentaenoic asit (EPA) ve docosahexaenoic (DHA) asitler) ve antioksidantlar (örn. karotenler, klorofiller ve fikobilin proteinler) içermesi açısından sağlıklı gıda sektöründe bugün yerini almış bulunmaktadır. Toz, tablet ve kapsül formatında ulaşılabilir bir pazar söz konusudur. Bu anlamda dünyada en fazla tüketilen türler, *Spirulina, Chlorella, Dunaliella* ve *Haematococcus'*dır. Bunların arasında, *Chlorella'*nın endüstriyel üretimi erken 1960'larda başlamıştır. Yıllık 500T kuru biyomas üretiminin yarısı Çin'de yapılmaktadır. *Chlorella*'nın üretimi, biyomasın doğrudan kullanıldığı (whole biomass) sağlıklı gıda alanının dışında, izole edilen peptitin kullanıldığı pazarlara da sahiptir. Yakın bir zamanda, *Chlorella* ve yağ-protein karışımının sağlıklı gıda ve kişisel bakım ürünleri alanında, büyük bir şirket tarafından (Corbion Şti, Hollanda) satışa sunulduğu da bilinmektedir (Anonymous[a], 2020).

Mikroalglerden üretilen karotenoidlerin korumacı sağlık ve kozmetik ürünü olarak kullanılması da oldukça yaygındır. *Dunaliella salina'*dan üretilen beta-karotenin

angiogenesis'in önlenmesinde etkili olduğu, böylece, kanser gibi hastalıklarda düzensiz yeni kan damarlarının oluşmasını etkilediği gösterilmiştir (Tredici vd., 2015). *Haematococcus pluvialis*'ten üretilen astaksantin'in anti-hipertansiyon ajanı olabileceği belirlenmiş haldedir (Hussein vd., 2005). Karotenoidlerin, anti-kanserojenik aktiviteye sahip oldukları lösemi dahil, karaciğer, meme, bağırsak ve prostat kanserlerinde önleyici rolleri rapor edilmiştir (Ylönen vd., 2003). Beta-karotenin, diyabet tedavisi ve kontrolünde etkili olduğu (Ylönen vd., 2003), likopen, lutein ve zeaksantin'in diyabetik retinopati'yi önlediği (McClinton, Aliani, Kuny, Sauve ve Suh, 2019), fukoksantin ve neoksantin'in anti-obezite aktivitesinin (Okada vd., 2008) olduğu gösterilmiştir. Astaksantin'in en yüksek antioksidan etkiye sahip ksantofil olduğu yaşa bağlı Makula dejenerasyonlarının önüne geçen antioksidan etkisi ispatlanmıştır (Fernandez-Sevilla, Acien Fernandez ve Molina Grima, 2010).

Chlorella (*Arthrospira* ile birlikte) cilt koruma ajanı olarak kullanılan en önemli türdür (Morone, Alfeus, Vasconcelos ve Martins, 2019). Cilt koruma kapsamında, anti-aging, tazelenme ve yenilenme özellikleri ön plana çıkmış, ayrıca saç bakımı, güneş ışını koruma ve anti irritant olarak etki edebilen ürün ve aktivitelerini mikroalg *Chlorella* kullanarak sağlandığı bir ürün gamı halihazırda mevcuttur (McHugh, 2003; Trivedi, Aila, Bangwal, Kaul, ve Garg, 2015).

1.3. Mikroalgal Büyümeyi ve Metabolitlerini Etkileyen Faktörler

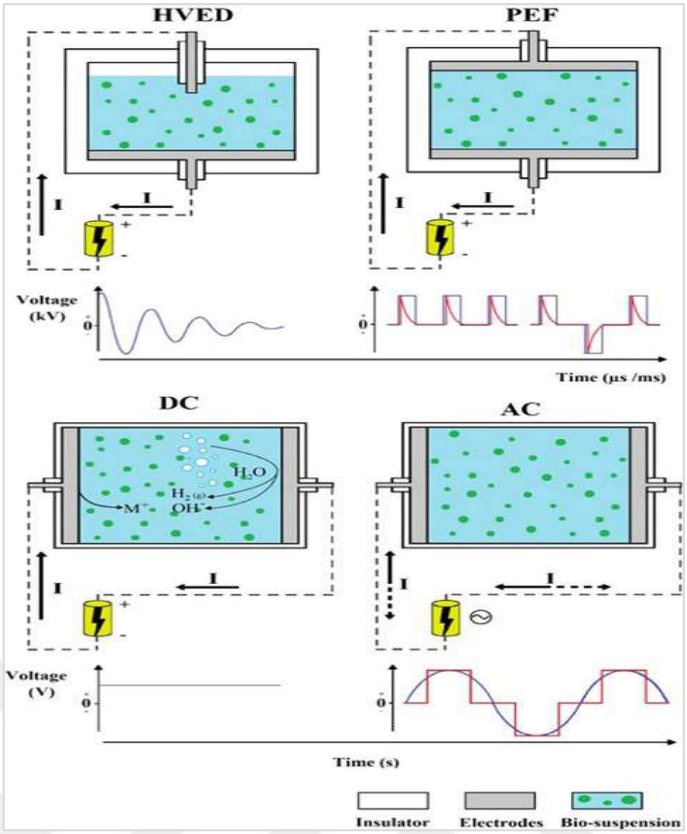
1.3.1. Abiyotik Stres Faktörleri

Habitatından izole edilen herhangi bir organizmanın büyüme koşulları türüne/suşuna özgüdür, ancak biyotik veya abiyotik stres faktörlerinin üstesinden gelmek ve ekstrem ortam koşullarına uyum sağlamak için belirli metabolitler üretirler (Paliwal vd., 2017). Mikroalgler de, abiyotik stres faktörlerine karşı büyük adaptasyon gösterir ve değerli metabolitleri üretir. Mikroalgal büyüme ve metabolitleri; sıcaklık, ışık yoğunluğu, karbondioksit konsantrasyonu, karıştırma, tuzluluk ve kültür ortamının besin bileşimi gibi farklı faktörlerden etkilenir (Kaczor ve Baranska, 2016; Chen vd., 2017; Paliwal vd., 2017; Liu ve Yildiz, 2018; Metsoviti, Papapolymerou, Karapanagiotidis ve Katsoulas, 2019, 2020) ve bu faktörlerin etkisi türler arası farklılık gösterir (Metsoviti vd., 2019, 2020). Optimal koşullar dışında kalan, yukarıda anlatılan faktörlerin hepsi literatürde abiyotik stres (Paliwal vd., 2017; Sun vd., 2018) faktörü olarak

isimlendirilir. Abiyotik stres faktörlerinde kontrollü değişiklikler yapılarak kültür koşullarına uygulanmasıyla (Paliwal vd., 2017); gerek mikroalgal büyüme ve biyokütle, gerekse istenen mikroalgal hedef ürünün elde edilmesi ve bu ürünün biyokütleden ayrılarak saflaştırılması (downstream processing) amaçlanır. Örneğin artan ışık şiddeti, bazı mikroalglerde büyüme hızını belirli bir noktaya kadar artırır. Bununla birlikte, doyma noktasına kadar yüksek ışık yoğunluğu seviyeleri foto-inhibisyona yol açabilir (Difusa, Talukdar, Kalita, Mohanty ve Goud, 2015). Diğer yandan, ışık yoğunluğu doyma noktasının altındaysa, mikroalg büyümesi sınırlı olur (Lee, Jalalizadeh ve Zhang, 2015). Eğer kültivasyon uygun ışık şiddetinde koşullarında yapılmayıp, çok yüksek veya düşük ışık şiddeti gibi koşullarda yapılırsa (Minhas, Hodgson, Barrow ve Adholeya, 2016), büyüme hızında ve biyokütle üretiminde bir düşüş gözlenir (Wijffels, Barbosa ve Eppink, 2010).

1.3.2. Elektroteknolojik Uygulamalar

Elektroteknolojik uygulamalar (Geada vd., 2018); yüksek voltaj elektrik akımı (HVED), darbeli elektrik alan (PEF), doğru akım (DC) ve alternatif akım (AC) (Şekil 1.1) gibi elektrik uygulamalarını içerir. Mikroalgal kültivasyon sistemleri üzerine uygulanan bilinen abiyotik stres faktörleri ve elde edilen sonuçların hepsi bir tarafa, elektrik uygulamaları yeni bir stres faktörü olarak nitelendirilebilir. Gerçekten de son dönemde; kültürlerin hasat edilmesi, ekstraksiyon işlemi ve istenen ürünün elde edilmesi konularında pek çok çalışama yapılmıştır (Gusbeth, Eing, Göttel ve Frey, 2013; Geada vd., 2018; Kim, Lee, Jeon, Park ve Choi, 2018; Leonhardt vd., 2020; Pagels, Pereira, Vicente ve Guedes, 2021; Zhang, Gu, Xu ve Fu, 2021).



Şekil 1.1. Elektroteknolojik uygulamalar; Yüksek Voltaj Elektrik Akımı (HVED), Darbeli Elektrik Alan (PEF), Doğru Akım (DC) ve Alternatif Akım (AC) uygulamalarının genel kurgusu (Geada vd., 2018)

Elektroteknolojik çalışmaların hız kazanarak devam etmesinde en etkili nedenlerden bir tanesi, biyolojik sistemler üzerine yapılan elektrik uygulamalarının daha verimli ve uygun maliyetli olmasıdır (Geada vd., 2018). Ayrıca bu teknolojiler, yenilenemeyen kaynakların daha az kullanımı ve yüksek düzeyde enerji verimliliği göz önüne alındığında, maliyet açısından verimli ve çevre dostu olarak kabul edilen çok çeşitli biyoteknolojik süreçlerin bir parçası olarak kabul edilebilir.

1.3.3. Doğru Akım

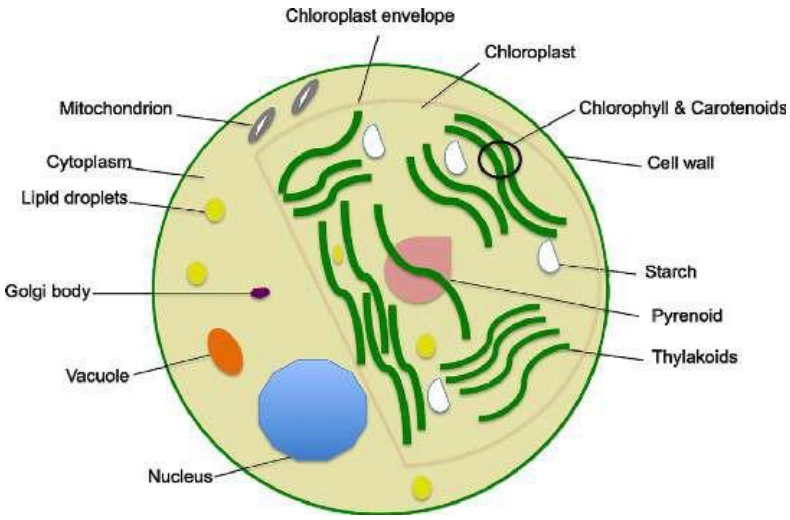
Doğru akım (DC), negatif yüklü katot ve pozitif yüklü anot olmak üzere iki elektrot aracılığıyla elektrik yükünün yüksek potansiyelden alçak potansiyele doğru tek yönlü akışı olarak tanımlanır (Geada vd., 2018). Bu tek yönlü yük akışı neticesinde, yüklü parçacıklar zıt kutuplu elektrota doğru elektroforetik hareket yapar. Elektroforetik hareketin kültür sistemleri üzerine ne tür bir etki yapacağı, elektrik uygulamasının yoğunluğuna ve besiyeri ortamındaki partiküllerin (iyonların) hızına olan etkisine bağlı olarak belirlenebilir (Geada vd., 2018; Luengo, Condón-Abanto, Álvarez ve Raso, 2014; Zhang vd., 2021). Pearsall vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada, bir

DC ile indüklenen elektroforetik hareketin hücreleri kültür ortamından ayıracağı bildirilmiştir. Mikroalgler net negatif yüke sahip olduğunda ve besiyeri ortamı tek değerli sodyum ve potasyum iyonları açısından zengin olduğunda, besiyeri ortamı DC'ye (Pearsall vd., 2011) maruz bırakılırsa mikroalg hücreleri anoda doğru hareket eder. Bu durum, negatif yüklü hücrelerin yüklerini kaybederek bir araya toplanıp yığın haline gelmesine ve flokülasyonuna neden olur (Uduman, Qi, Danquah, Forde ve Hoadley, 2010). Elektroforetik hareketin bir başka etkisi ise kültür ortamındaki hücrelerde geçirgenliğe (permeabilite) neden olmasıdır (Geada vd., 2018). Bunun yanında yukarıda belirtilen etkileri bozabilen; elektrotların polarizasyonu ile elektrokimyasal reaksiyonların meydana gelmesi, özellikle elektrotların elektro-oksidasyonu ve korozyon oluşması, suyun elektrolizi ile kabarcıklanmanın olması gibi uygulamada dikkat edilmesi gereken çeşitli faktörler olabilir (Hamann, Hamnett ve Vielstich, 2007).

1.4. *Chlorella Vulgaris* Mikroalginin Taksonomisi, Genel Özellikleri ve Önemi

Alem : Plantae
Bölüm : Chlorophyta
Sınıf : Trebouxiophyceae
Takım : Chlorellales
Aile : Chlorellaceae
Cins : *Chlorella*
Tür : *Chlorella vulgaris* Beijerinck, 1890.

İlk defa 1890 yılında Beijerinck tarafından tanımlanan *Chlorella vulgaris* türü; yeşil algler şubesinde yer almakta olup, 2-10 µm arasında değişen çapta büyüklüğe sahip, küreye veya elipse benzeyen, tek hücreli ve ökaryotik bir mikroalgtir (Krauss ve Shihira, 1965; Prescott ve Gross, 1973; Safi, Zebib, Merah, Pontalier ve Vaca-Garcia, 2014). Yüksek yapılı bitkilerle benzer birçok yapısal elemente sahiptir (Şekil 1.2). Bu özelliği sayesinde pek çok araştırmaya konu olmuş ve halende araştırmalar yapılan model organizmadır.



Şekil 1.2. *Chlorella vulgaris* hücresi (Safi vd., 2014)

Çoğu gelişmiş ülkede, modern yaşam tarzı nedeniyle insanların yüksek kalorili gıdaları tüketmesi obezite, kalp hastalıkları, şeker hastaları gibi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Sağlık için; proteinler, vitaminler, mineraller vb. tüm besin maddelerini içeren bir diyet gerekir. Sağlıklı bir diyet için, mikroalgler dikkate değer ancak yeterince keşfedilmemiş doğal bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Sathasivam, Radhakrishnan, Hashem ve Abd_Allah, 2019). Mikroalglerden bazılarında karbonhidratlar, proteinler, lipitler ve besleyici değerli bileşenlerin bol olduğu bildirilmiştir (Becker, 2004; Sathasivam vd., 2019). Örneğin *Chlorella vulgaris* türünün toplam protein içeriği, biyokütle kuru ağırlığının %42-58'ini oluşturur (Becker, 1994; Morris, Almarales, Carrillo ve Bermúdez, 2008; Safi vd., 2013) ve büyüme koşullarına göre bu oran değişebilir (Safi vd., 2014). *Chlorella vulgaris*, protein içeriğinin yüksek olması nedeniyle besin ve besin takviyesi (Fradique vd., 2010) olarak tüketilmektedir ve literatürde insanlar için sağlıklı besin kaynağı olarak bilinir. Ayrıca, akuakültürler için besin değeri yüksek yem olarak kullanılır (Yamaguchi, 1996).

Chlorella, tüm mikroalg türleri arasında endüstriyel olarak en yaygın olanlarından bir tanesidir (Sydney, Novak, de Carvalho ve Soccol, 2014). Japon araştırmacılar, *Chlorella*'dan çorbalar, toz yeşil çay, erişte, ekmek, kurabiyeler ve dondurma gibi çeşitli deneme gıda ürünleri geliştirmişlerdir. *Chlorella*'dan yapılan plankton çorbası cüzzam hastalarının tedavisinde kullanılmış ve içeriğindeki yüksek enerji sayesinde hastalarda iyileşme sağlamıştır (Safi vd., 2014; Sathasivam vd., 2019). *Chlorella* insan sağlığı için de hayli önemli bir mikroalgtir. Örneğin, hemoglobin konsantrasyonunu artırabilir, kan şekeri seviyelerini düşürebilir ve yetersiz beslenme ve etiyonin

intoksikasyonu sırasında hipokolesterolemik ve hepatoprotektif (karaciğeri koruyan) ajanlar olarak hareket edebilir (Kim, Rajapakse ve Shahidi, 2008; Sathasivam vd., 2019). *Chlorella*'daki en önemli madde; aktif bir immünostimülatör olan, serbest radikal temizleyici ve kan lipitlerini azaltan β-1,3-glukan'dır (Sathasivam vd., 2019).

İçeriğindeki değerli metabolitleri sayesinde dünyada 70 den fazla şirket *Chlorella*'nın üretimi için yatırım yapmıştır (Sathasivam vd., 2019). En büyük üreticisi yılık 400 ton kuru biyokütle üretimi yapan Tayvan'daki TCMC (Taiwan *Chlorella* Manufacturing Company) şirketidir. *Chlorella*'nın dünyadaki yıllık ticaretinin ise 38 milyar Amerikan dolarını aştığı bildirilmektedir (Yamaguchi, 1996).

1.5. *Chlorella vulgaris* Pigment İçeriği

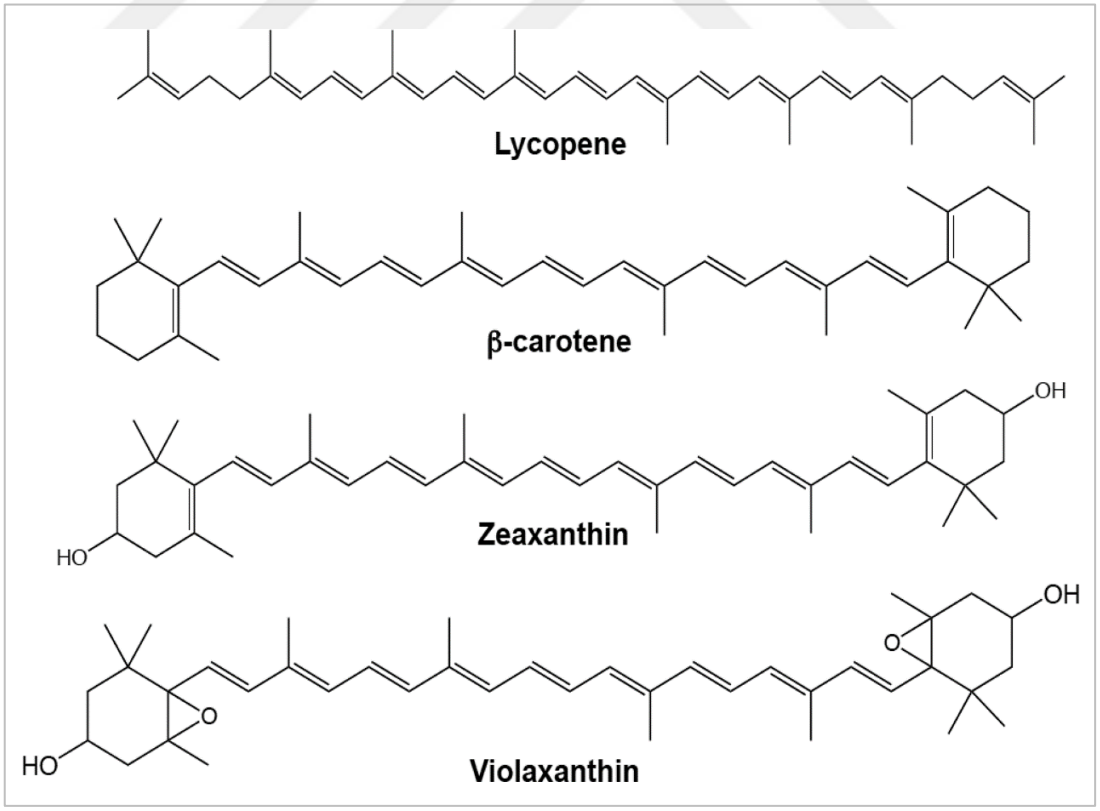
Tüm fotosentetik organizmalar, ışık enerjisini regüle eden organik pigmentler içerir. Klorofiller, karotenoidler ve fikobilinler olmak üzere üç ana pigment sınıfı vardır. Klorofiller (yeşil pigmentler) ve karotenoidler (sarı veya turuncu pigmentler) lipofiliktir ve klorofil-protein kompleksleriyle ilişkilidir, fikobilinler ise hidrofiliktir.

Klorofil molekülleri, merkezi bir magnezyum atomu ve uzun zincirli bir terpenoid alkol içeren bir tetrapirol halkasından oluşur (Sydney vd., 2014). Yapısal olarak, tetrapirol halkasının yan gruplardaki atomların yer değiştirerek farklılık göstermesi ile klorofil *a, b, c* ve *d* olarak adlandırılır. Tüm klorofil moleküllerinin: 450-475 nm de mavi veya mavi-yeşil ve 630-675 nm de kırmızı olmak üzere iki ana absorpsiyon bandı vardır (Engström, 2012).

Chlorella vulgaris'te en bol bulunan pigment, %1-2 kuru ağırlığa ulaşabilen ve tilakoidlerde bulunan klorofildir. Ayrıca *Chlorella* fotosentez sırasında ışığı yakalayarak organizmayı ışığın zararlı etkilerinden koruyan, önemli miktarda karotenoid pigmentini içerir (Safi vd., 2014). Bunlardan beta-karoten kloroplasttaki lipit damlacıkları ile ilişkilidir, ışık enerjisini yakalayarak fotosisteme aktaran birincil karotenoidler isetilakoidlerdeki klorofil ile ilişkilidir. Bununla birlikte, radyasyona ve oksijene güçlü maruz kalma sırasında karotenoidler klorofil moleküllerini koruyarak degredasyonunu önler (Safi vd., 2014; Sydney vd., 2014).

1.6. Karotenoidler

Karotenoidler, yüksek yapılı bitkilerde, mikroalglerde ve fotosentetik olmayan organizmalarda meydana gelen izoprenoid yapılara sahip lipofilik pigmentlerdir (Del Campo, García-González ve Guerrero, 2007; Takaichi, 2011). Sekonder metabolitler olarak bilinen, yaşamımızın hemen her aşamasında yer alan ve insan sağlığı için önemli olan karotenoidler; bitkiler, algler, fotosentetik ve fotosentetik olmayan bazı bakteriler, mantarlar ve böcekler tarafından sentezlenen izoprenoid pigmentlerdir (Yabuzaki, 2017). Kırk karbonlu konjuge çift bağlardan oluşan izoprenoid yapı pek çok organizmada önemli biyolojik fonksiyonlar sergiler (Simpson, 1985). Karotenoidler iki gruba ayrılır. Zeaksantin, lutein ve violaksantin gibi oksijen içerenler ksantofiller olarak isimlendirilirken, likopen ve beta-karoten gibi oksijen içermeyenler ve sadece hidrokarbondan oluşanları ise karotenler olarak isimlendirilirler (Şekil 1.3). Ksantofiller yapılarında en az bir OH grubu içermekte olup, karotenlere göre daha fazla polarite göstermektedirler (Krinsky ve Johnson, 2005; Giuffrida, Donato, Dugo ve Mondello, 2018). Karotenoidlerin 40 karbonlu izoprenoid yapısı, doğada yaygın



Şekil 1.3. Karotenlerden likopen ve β-karoten, ksantofillerden zeaksantin ve violaksantinin yapısı (Giuffrida vd., 2018)

olarak all-*trans* formunda bulunur. Pek çok araştırmada bu yapının ısı, ışık gibi faktörlerin etkisiyle izomerizasyona uğrayarak *cis* ve/veya *trans* formuna dönüştüğü (Murakami vd., 2018; Xiao vd., 2018) ve bu izomer yapıların toplam karotenoid içeriğindeki dağılımının ise türler arasında farklılık gösterdiği (Aluç vd., 2018) belirtilmiştir. Bazı çalışmalarda *trans* izomerlerinin *cis* izomerlerine göre daha kararlı ve yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu gösterilmiştir (Agarwal vd., 2001).

Ayrıca karotenoidler; doğada yaygın olarak bulunan renkli pigmentlerdir. Bitkiler, algler ve bakteriler tarafından sentezlenen yağda çözünen moleküllerdir. Klorofilli organizmalarda fotosentez için olmazsa olmaz olan, ışığı soğurarak yıkıcı ışık oksidasyonlarına karşı koruyucu görev yapan renk pigmentleridir. Oksijenli ortamda fotosentez karotenoidler olmadan gerçekleşmez. Yani bitkilerin ve alglerin fotosentezinde elzem moleküllerdir (Sun vd., 2018).

Karotenoidlerin çoğu, organizmaları oksidatif strese karşı koruyan güçlü antioksidan etkiye sahip, anti-inflamatuar ve antikanser aktiviteleri de olan terapötik değere sahip sağlık sektöründe yaygın olarak kullanılan bileşiklerdir. Ayrıca karotenoidler, biyoaktif bileşikler olarak, gıda, kozmetik ve yem katkı maddesi gibi birçok sektörde talep edilmeleri nedeniyle yüksek ticari değere sahiptirler (Poojary vd., 2016). Bu nedenle, mikroalgler tarafından sentezlenen karotenoidler en çok ekonomik değere sahip sekonder metabolitlerdir ve bu bileşiklerin mikroalg biyokütlesinde araştırılması ve geliştirilmesi konusundaki çalışmalar artarak hızla devam etmektedir.

Kimyasal sentez yoluyla yapılan sentetik karotenoidlerin 2010 yılındaki üretim hacminin yaklaşık piyasa değeri 1,2 milyar ABD dolarına ulaşmıştır (Sathasivam vd., 2019). Canlı organizmalarda tanımlanmış 600'den fazla karotenoid vardır (Fachet, 2017). Bunlar arasında beta-karoten ve astaksantin'in ticari boyutu lutein, zeaksantin ve likopen'e göre daha fazladır (Spolaore, Joannis-Cassan, Duran ve Isambert, 2006).

Mikroalgler; asetilenik karotenoidler, ketokarotenoidler ve glikozilat karotenoidler gibi meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunanlardan çok farklı yapısal özelliklere sahip karotenoidleri sentezler (Rodrigues vd., 2014; Poojary vd., 2016).

İnsan vücudundaki biyokimyasal işleyiş sırasında oluşan reaktif oksijenin (oksijen iyonu veya peroksil radikalleri) lipit, protein ve nükleik asitler gibi temel ve önemli biyolojik birimler ile etkileşime girerek onların fizyolojik fonksiyonlarını bozduğu bilinmektedir (Agarwal vd., 2001; Halliwell, 1996). Oksidasyon neticesinde oluşan bu

serbest radikaller, kanser, arterosiklerosis, kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma ve buna bağlı makuler dejenarasyon vb. gibi kronik hastalıkların tetikleyicisi olabilmektedir. Son yıllarda artarak devam eden çalışmalarla birlikte karotenoidlerin sahip oldukları özellikler neticesinde yukarıda belirtilen hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde, insanlar için sağlık koşullarının düzenlenmesinde önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir (Guedes vd., 2011). Bu özelliklerin başında, oksidasyon esnasında, yüksek doymamışlıkları nedeniyle diğer moleküllere göre daha etkili ve istekli antioksidan görevini üstleniyor olmaları gelmektedir. Karotenoidlerin sözkonusu antioksidan etki mekanızması, bir molekülün konjuge haldeki çift bağlarının sayısı ve karetonoid molekülündeki uç gruplar ya da karetoneidlerdeki siklik uç grupların özelliklerine bağlı olarak gelişen singlet oksijen ve serbest radikalleri bağlama yeteneklerine dayalı olarak oluşturulmaktadır (Britton, 1995; Stahl ve Sies, 1996).

Sıcaklık, ışık, tuzluluk, besin tuzu eksikliği ve fazlalığı gibi stres koşullarının mikroalglerin kimyasal bileşimini etkilediği ve biyosentez mekanizmalarını değiştirdiği bilinmektedir. Işık yoğunluğu ve sıcaklığın mikroalglerin biyo kütle üretimini etkilediği pek çok araştırmada ortaya konmuştur (Kaczor ve Baranska, 2016). Bunun yanında bazı mikroalg türlerinin farklı stres koşullarında daha fazla karotenoid ürettiği belirlenmiştir. Özellikle karotenidlerden bazılarının sadece stres koşullarında sentezlendiği görülmüştür. Mikroalglerden yüksek değerlikli metabolitlerinin senteziyle ilgili olasılıkları ortaya koymak için farklı stres koşullarına verdikleri tepkiyi bilmek ayrıca önem arz etmektedir (Skjånes vd., 2013). Mikroalglerde karotenoid sentezi beslenme ve çevre koşullarına bağlıdır. Işık şiddeti ve türü, sıcaklık ve özellikle N ve P olmak üzere besin açlığına bağlı olarak karotenoid sentezi etkilenebilir (Garbayo vd., 2008).

1.7. Karotenoid Biyosentezi

Fotosentetik organizmalarda karotenoid biyosentezi, ya sitozolik mevalonat yolu ya da plastidyal metileritriol fosfat (MEP) yolu ile gerçekleşir. Bununla birlikte, yeşil mikroalglerde sitozolik mevalonat yolunun bulunduğuna dair herhangi bir kanıt yoktur (Lichtenthaler, 1999; Fachet, 2017). Metabolitler; izopentil pirofosfat (IPP) ve dimetilalil pirofosfat (DMAPP), fotosentetik organizmalarda karotenoid sentezi için öncülerdir. Başlangıçta, geranil pirofosfat (GPP) oluşturmak üzere bir yoğuşma

reaksiyonu yoluyla, bir molekül IPP ve DMAPP bağlanır. Geranilgeranil pirofosfat sentaz enzimi tarafından katalize edilen iki molekül IPP'nin GPP'ye bir başka yoğunlaştırma reaksiyonu, geranilgeranil pirofosfatın (GGPP) oluşumuna yol açar. GGPP, diterpenlerin sentezi için yapı taşıdır. Daha sonra, enzim fitoten sentaz (PSY) tarafından katalize edilen fitoen oluşumu, iki GGPP molekülünün yoğunlaştırılması yoluyla gerçekleşir. Fitoen, tetraterpenlerin sentezinin öncülüdür ve karotenoid yolundaki ilk lipofilik bileşiktir. Fitoenin bir dizi desatürasyon reaksiyonu, ζ-karoten ve likopen oluşumuyla sonuçlanır. Daha sonra karotenoid yol iki dala ayrılır. Birinci dal, sarı renkli ksantofil pigment luteinin oluşumuna yol açar. İkinci dal, turuncu renkli β-karoten oluşumuna yol açar. β-karoteni zeaksantine dönüştüren enzimatik reaksiyon, β-karoten hidroksilaz tarafından katalize edilir ve violaksantin döngüsünün bir parçasıdır. Violaksantin döngüsü, mevcut ışık koşullarına bağlı olarak fotosistem II'nin (PSII) anteninin tersine çevrilebilir bir geçişine izin veren bir fotokoruyucu mekanizmadır. Sonuç olarak, violaksantin iki aşamalı bir de-epoksidasyon reaksiyonunda zeaksantine dönüştürülür ve ara ürün olarak antheraksantin oluşur (Jahns, Latowski ve Strzalka, 2009; Fachet, 2017).

1.8. Karotenoidlerden Bazıları

1.8.1. Beta-karoten

Provitamin A aktivitesine sahip olduğu için multivitaminlerin ve sağlıklı gıda ürünlerinin hazırlanmasında katkı maddesi olarak kullanılan, en önemli karotenoidlerden biridir. Bu pigmentin doğal formu, sentetik formuna göre daha güçlü bir etkiye sahiptir ve vücut tarafından kolayca emilebilir (Chen, Chuang, Lin ve Chiu, 1993). Beta-karoten'in gıda, yem, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde çeşitli uygulamaları vardır. Doğal karotenoidlere artan talep, mikroalgler gibi farklı doğal kaynaklardan beta-karoten ekstraksiyonuna olan ilginin artmasına neden olmuştur. Örneğin *Dunaliella salina*, alg kuru ağırlığının %10-14'üne kadar yüksek konsantrasyonlarda beta-karoten üreten yeşil, halofilik, biflagellatlı bir mikroalgtir (Sathasivam, Kermanee, Roytrakul ve Juntawong, 2012; Sathasivam ve Juntawong, 2013). Yüksek ışık yoğunluğu, yüksek tuzluluk, aşırı sıcaklık ve besin takviyesi, beta-karoten üretimini artırmada önemli bir rol oynamaktadır (Henley, Major ve Hironaka, 2002; Raja, Anbazhagan, Lakshmi ve Rengasamy, 2004). Optimal besiyeri ortamı ve çevresel koşulları beta-karotenin ve izomerlerinin ticari üretimi için faydalıdır

(Borowitzka, 2013). Beta-karotenin doğal 9-*cis* izomeri, hücreyi oksidatif hasardan koruyarak serbest oksijen radikallerini söndürmede önemli bir rol oynar (Borowitzka, 1992). Beta-karotenin *trans* formu, A vitamini oluşumunda *cis* formundan iki kat daha aktiftir ve Avustralya, İsrail, ABD ve Çin'deki birçok endüstri *trans* formunu üretmektedir (Leon, Martín, Vigara, Vilchez ve Vega, 2003; García- González, Moreno, Manzano, Florencio ve Guerrero, 2005).

Algal beta-karoten, hem farelerde hem de insanlarda ateroskleroza (damar sertliği) karşı koruyucu etkiler göstermiştir. Beta-karoten bakımından zengin *Dunaliella* tedavisi, düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu inhibe eder ve plazma trigliseritlerini, kolesterolü ve yüksek yoğunluklu lipoprotein seviyelerini etkiler (Shaish vd., 2019). Birçok epidemiyolojik çalışma (Leon vd., 2003), beta-karoten açısından zengin bir diyetle beslenen insanların ortalama serum seviyelerinin korunduğunu ve çeşitli kanser ve dejeneratif hastalık türlerinin sıklığını azalttığını göstermektedir. Beta-karoten'e ek olarak, *Dunaliella*'dan elde edilen fitoen ve fitofluen gibi diğer karotenoidlerin de erken yaşlanmaya ve diğer rahatsızlıklara yol açan UV ve oksidatif hasara karşı koruma sağladığı bilinmektedir (Ben-Amotz, 1993). Ayrıca, beta-karoten genellikle belirli kanserlere neden olan ilişkili olan zararlı oksi-radikalleri temizlemek için güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir. Beta-karoten'in oral yolla tüketimi UV kaynaklı ciltte meydana gelen kızarıklıkları önleyebilir (Heinrich vd., 2003).

1.8.2. Astaksantin

Mikroalglerden ikinci önemli karotenoid sentezi astaksantin'dir. Bu pigment, tatlı su yeşil mikroalgi *Haematococcus pluvialis* tarafından üretilen bir keto-karotenoiddir (Cysewski ve Lorenz, 2004). Bu mikroalg genellikle iki aşamalı bir süreçte kültürlenir: ilk adım, 'yeşil' hareketli mikroalg biyokütle aşamasının oluşturulmasını içerir, ardından astaksantin içeren aplanosporların üretildiği astaksantin biriktirme aşaması gelir (Sathasivam vd., 2019). Astaksantin'in (3R, 3´R), (3R, 3´S) ve (3S, 3´S) olmak üzere üç tip stereoizomeri vardır, sentetik astaksantin yaklaşık 1:2:1 oranında bu stereoizomerleri içerir. Dolayısıyla, *H. pluvialis* serbest ve esterlenmiş koşullarda sadece (3S,3´S) stereoizomeri üretir (Grung, D'Souza, Borowitzka ve Liaaen-Jensen, 1992). Astaksantin, su ürünleri yetiştiriciliğinde, gıda, yem ve nutrasötik endüstrilerinde kullanılır. Astaksantin'in dünya çapında yıllık su ürünleri pazarı 200 milyon Amerikan doları değerinde olup, ortalama fiyatı kilogram başına 2500 dolardır

(Hejazi ve Wijffels, 2004). Piyasada astaksantin, kapsül şeklinde nutrasötik olarak satılmaktadır. Astaksantin açısından zengin *Haematococcus*, insan tüketimi için bir besin takviyesi olarak pazarlanır (Lorenz ve Cysewski, 2000). Astaksantin, alfa-tokoferolden 100 kat daha yüksek güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir (Higuera-Ciapara, Felix-Valenzuela ve Goycoolea, 2006). Astaksantin üretimi için kullanılan bir diğer mikroalg ise *Chlorella zofingiensis*'tir ve üretim hızı *H. pluvialis* daha azdır. Bu mikroalg, astaksantin üretimini nitrojen sınırlaması ve ışık stresi altında arttırmıştır (Pelah, Sintov ve Cohen, 2004). Stres koşulları sırasında, *C. zofingiensis* astaksantin üretiminde artışa neden olan hidroksil radikalleri üretir (Ip ve Chen, 2005).

Astaksantin, fotooksidasyona ve UV ışığın zararlı etkisine karşı mikoalgi korur. Güçlü serbest radikal temizleme aktivitesi gösterir, lipit peroksidasyonuna ve LDL kolesterolü, hücre zarlarını, hücreleri ve dokuları oksidatif hasara karşı koruma sağlar. Birçok çalışma, astaksantin'in kanserler, inflamatuar hastalıklar, metabolik sendrom, diyabet, diyabetik nefropati, nörodejeneratif hastalıklar ve göz hastalıkları gibi hastalıklara karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir (Yuan, Peng, Yin ve Wang, 2011).

1.8.3. Kantaksantin

Kantaksantin, gıda boyası olarak kullanılan, yumurta sarısına ve tavuk derisine renk veren bir karotenoid türüdür. Kümes hayvanları için diyet takviyelerine dahil edildiğinde, karaciğerin artan E vitamini içeriği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sathasivam vd., 2019).

1.8.4. Lutein

Lutein, gıdalarda ve insan serumunda bulunan en önemli karotenoidlerden biridir. Retina ve göz merceğindeki makula luteada (veya sarı nokta) bulunan pigmentin önemli bir bileşenidir. Lutein, kozmetik ve gıda ürünlerinde renklendirici (Jin, Polle, Lee, Hyun ve Chang, 2003) olarak kullanılırken, balık ve kümes hayvanlarında pigmentasyondan sorumludur. Bu nedenle yem katkı maddesi olarak satılmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, luteinin şu anda çok çeşitli insan hastalıklarını önlemek için etkili bir ajan olarak kabul edildiğini ortaya koymuştur. Optimum sıcaklığın mikroalg hücrelerinde daha yüksek lutein birikimine neden olduğu bildirilmiştir (Del Campo vd., 2000; Del Campo vd., 2007).

1.9. Çalışmanın Çerçevesi ve Amacı

Önceki bölümlerde verilen açıklamalardan da anlaşılacağı üzere, mikroalgler üzerinde yapılan bilimsel çalışmaların özellikle son çeyrek yüzyılda hızlı bir şekilde uygulamaya aktarıldığı, bunun sonucunda da, sanayi ve teknolojik ürünlere dönüştürülen mikroalglerin küresel ekonomik bir değer haline geldiği anlaşılmaktadır. Mikroalglerin önemli bir biyokütle hammaddesi olarak kabul edilmesini sağlayan ve kıymetli sanayi ürünü haline getiren gelişmeler aslında daha genel bir yaklaşımın parçasıdır. Bu genel yaklaşım, dünyada halihazırda hakim olan petrol ve türevlerine dayalı bir yaşam şeklinin organik-kökenli (biobased) bir yaşam şekline dönüştürme gayret ve çabalarını ifade etmektedir. İnsan gündelik yaşamının en ince detaylarında bile kullanımları sıradan hale gelen kimyasal kökenli ürünler, ortaya çıkardığı olumsuz sonuçları yüzünden sürdürülebilir niteliklerini kaybetmeye yüz tutmuşlardır. Bu nedenledir ki, alternatif kaynakların acil bir şekilde insan yaşamında yerini alabilmesi için küresel çabaların artan bir şekilde gündemde kaldığı, gelecek plan ve stratejilerine yön verdiği bilinen bir gerçektir. Avrupa Birliği'nin 13 Şubat 2012 tarihinde yürürlüğe koyduğu "Biyoekonomi Stratejisi" buna örnek olarak verilebilir (Anonymous[b], 2012). 2018 yılında güncel hale getirilen bu strateji, sürdürülebilir ve döngüsel (Sustainable and Circular: Bioeconomy the European Way) kavramlarını esas alarak, fosil kaynakların dışındaki hayvan, bitki, mikroorganizmalar ve bunlardan üretilen biyokütle ve hatta organik atıklar gibi biyolojik kaynaklara dayalı sektörler, sistemler ve onların işleyiş ve prensiplerini hayata geçirmeyi esas almaktadır. Daha açık bir deyişle, enerjiden, tıp, eczacılık, tarım hayvancılık, gıda ve kozmetik gibi tüm alanlarda organik kökenli ürünlerin eldesi ve döngüye katılabilmesini neticesinde, küresel iklim değişikliğinin durdurulması, kirlilik problemleri ve sağlık sorunlarının giderilerek sürdürülebilir bir yaşamın tesis edilmesini amaçlar. Bu amaçlar, bir bakıma fosil kaynaklar öncesine fakat teknolojik bir yaklaşımla dönüşü ifade etmektedir (Anonymous[c], 2018).

Sürdürülebilirlik ve döngüsellik kavramlarının hayata geçirilmesine yardımcı olacak farklı alanlar ve kullanılan farklı ajanlar (Örneğin: güneş enerjisi vb. gibi) bulunmakla birlikte, biyokütle üretimine dayalı araştırma ve uygulamalar özel bir önem taşımaktadır. Çünkü, fosil hammaddesinden enerji temini dışında, elde edilen binlerce sayıda kimyasal ürünün organik olanlarıyla değiştirilmesi biyokütle veya (yeşil kimya) teknolojisiyle mümkün olabilecektir (Anonymous[d], 2017). Avrupa Birliği

biyoekonomi stratejisi roporunda, Avrupa'nın biyo-ekonomik faaliyet ve üretiminin yıllık 674 milyar Euro olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, biyo-temelli biyo-kütle yaklaşımının sadece Avrupa'da değil diğer kıtalarda da eşdeğer veya daha fazla yoğunlukta benimsendiği not edilmelidir. Aslında, bu yaklaşımın öncüsü ve tarihi temeli güçlü uygulamaları olan kıtanın Uzak Doğu-Asya olduğu belirtilmelidir.

Sürdürülebilirlik ve döngüsel ekonomi gibi daha geniş bir çerçeveden bakıldığında, mikrolagler üzerindeki biyokütle yaklaşımlı bilimsel çalışmaların ve uygulamadaki girişimlerin ülkemiz açısından önemi daha iyi anlaşılabilmektedir. Henüz, dünyadaki örneklerinin oldukça gerisinde olduğu bilinmekle birlikte, önemli pilot ölçekli çalışmaların ülkemizde de başlamış ve rekabet edebilir hale getiren çabaların artmış olduğu gözlenmektedir. Bu yaklaşım kapsamındaki ülkemiz çabalarına katkı sağlıyacağı düşünülen bu tez çalışmasında;

Halen dünyada sanayi ürünü hammaddesi olarak üretimi yapılan az sayıdaki mikroalg türlerinden biri olan ve bu haliyle model organizma niteliği taşıyan *Chlorella vulgaris*'in büyümesi (üretim) ve dolayısıyla hedef bileşiklerin (karotenoidler) artırılması amaçlanmıştır. Bu amaca bağlı olarak,

- Stres faktörü olarak literatürde yer almayan yeni bir yöntem (Elektriksel Doğru Akım) kullanılmıştır.
- Doğru akımın büyüme üzerindeki etkisi, büyüme parametreleri (Hücre sayısı, Optik Yoğunluk ve Fotosentez Pigmentleri) ve aralarındaki ilişkinin zamana bağlı dinamik değişimleri incelenerek ortaya konulmuştur.
- Fotosentezde kullanılan mekanızmaların (Fotosistem I ve II) büyümedeki rolü ve etkisi, klorofil floresans parametreleri kullanılarak incelenmiştir.
- Doğru akım elektrik uygulamalarındaki farklılıkların, son üründeki karotenoid bileşiklerinin miktar ve kompozisyonunda neden olduğu değişiklikler belirlenmiş ve izomerizasyona bağlı bilgiler ışığında değerlendirilmiştir.
- Doğru akım elektrik uygulamalarındaki farklılıkların hücre makromoleküllerinde meydana getirdiği değişiklikler ortaya konulmuş ve bu bileşiklerin karotenoidlerle olan kimyasal bağlantıları ışığında değerlendirilmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Analitik Terazi (SHIMADZU ATX-224)
- Çalkalayıcı İnkübatör (Kuhner-Climo-Shaker ISF1-X)
- Çok Kanallı Otomatik Pipet (BRAND Transferpette, 10-100 µL)
- Derin Dondurucu (GFL Ultra Low Freezer, -80 ºC)
- Derin Dondurucu (Arçelik Buz Dolabı, -20 ºC)
- Dijital Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (WiseStir MSH-20D)
- Dikey Otoklav (Raypa)
- Distile Su Cihazı (Milipore/Direct-Q3UV)
- Elisa Cihazı (AMR-100 Microplate Reader)
- Etüv (Binder)
- Evaporatör (BUCHI, B491, F-100, R-210, V-700, V-850)
- FT-IR cihazı (Bruker Vertex 70V marka model)
- Hassas Terazi (METTLER TOLEDO XP6)
- Hassas Terazi (Sartorius CP224S)
- Işık Mikroskobu (Nikon YS100)
- İklimlendirme Kabini (Nüve TK 600 Test Kabini)
- İnverted Mikroskop (Leica DM-IL)
- Likit Kromatografi Cihazı (SHIMADZU HPLC LC-20A Serisi)
- Liyofilizatör (ALPHA 1-2 LD plus)
- Mikrobiyolojik Güvenlik Kabini (Steril Kabin, Mikrotest MLF 120)
- Optik Yoğunluk Ölçüm Cihazı (AquaPen-C AP-C 100)
- Otomatik Pipet (BRAND Transferpette, Ayarlanabilir 10-100 µL)
- Otomatik Pipet (BRAND Transferpette, Ayarlanabilir 20-200 µL)
- Otomatik Pipet (BRAND Transferpette, Ayarlanabilir 100-1000 µL)

- Otomatik Pipet (BIOHIT PROLINE, Ayarlanabilir 1-5 mL)
- pH Metre (Sartorius Professional Meter PP-25)
- Santrifüj (Digicen 20 R)
- Santrifüj (Hettich ROTINA 380 R)
- Sonikatör (BD ProbeTec™ ET)
- Tüp Karıştırıcı (Vortex, DRAGONLAB MX-S)
- UV-VIS Spektrofotometre (SpektroScan 80DV)
- Voltmetre (UNI-T UTP3315TFL 0-30V 0-5A)
- Zetasizer Cihazı (Malvern)

2.1.2. Kullanılan Araçlar

- Alüminyum Folyo
- Balon Jojeler (10 mL, 20 mL, 50 mL ve 100 mL)
- Beherler (30 mL, 50 mL, 100 mL ve 500 mL)
- Eldiven (Lateks ve Nitril Gloves)
- Ependorf Tüpler (1,5 mL ve 2 mL)
- Erlenmayerler (100 mL, 150 mL, 250 mL, 500 mL ve 1000 mL)
- Falkon Deney Tüpleri (15 mL ve 50 mL)
- Gazlı Bez
- Havlu Kağıdı
- Laboratuvar Gözlüğü
- Laboratuvar Önlüğü
- Makas
- Mezürler (50 mL, 100 mL, 250 mL ve 500 mL)
- Mikropipet Uçları
- Pamuk
- Parafilm
- Pisetler
- Spektrofotometre Küvetleri (2 mL ve 4 mL)

2.2. Yöntem

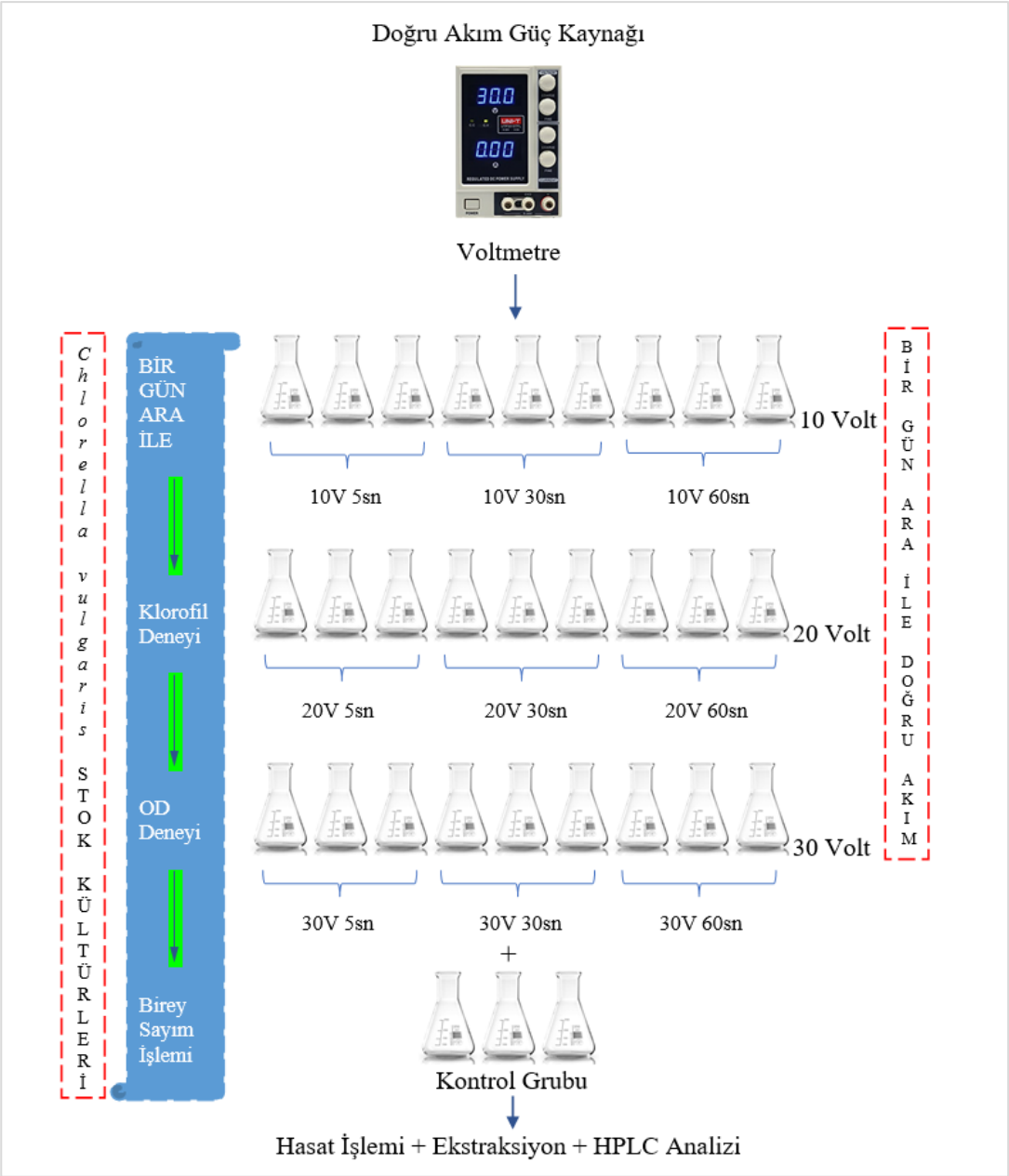
2.2.1. Deney Yaklaşımı ve Modeli

Doğru akım uygulamasının *Chlorella vulgaris* türünün büyümesi, karotenoid içeriği ile miktarı ve biyomolekülleri üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda; *Chlorella vulgaris* türünün laboratuvar koşullarında Tris-Asetat-Fosfat (TAP) sıvı besiyerinde kültürü yapıldı. Kültür ortamına voltmetre ile 10V, 20V ve 30V olmak üzere üç farklı voltajda ve her voltaj için 5sn, 30sn ve 60sn olmak üzere üç farklı sürede doğru akım uygulandı (Şekil 2.1). Farklı voltajda ve farklı sürede uygulanan doğru akımın karotenoid miktarı ve yapısında değişikliğe neden olup olmadığı, özellikle de karotenoid izomerlerinde farklılık oluşturup oluşturmadığı araştırıldı.

Ayrıca kültür koşullarına uygulanan doğru akımın, *Chlorella vulgaris* türünün büyümesi üzerine etkisinin olup olmadığı, büyüme parametrelerinin takip edilmesiyle belirlendi.

Bu çalışma sayesinde; insan sağlığı, gıda, yem katkı maddesi, kozmetik ve biyodizel üretimi gibi yüksek ticari boyutta farklı kullanım imkânları olan *Chlorella vulgaris* türünün büyümesi ve karotenoid pigment içeriği üzerine yeni bir uygulamanın etkisi ortaya koyuldu.

Karotenoidlerin, özellikle doğada yaygın olarak all-*trans* formunda bulunan 40 karbonlu izoprenoid yapısının doğru akım uygulamasıyla izomerizasyona uğrayarak *cis* ve/veya *trans* formuna dönüşüp dönüşmediği araştırıldı. Karotenoid izomerleşmesinde yeni bir yöntem olacağı değerlendirilen doğru akım uygulamasının; Dünya üzerinde uygulamaları devam eden diğer yöntemler, bu yöntemler sayesinde alg metabolitleri üzerinde oluşan büyük bir ekonomi ve bunu destekleyen araştırma potansiyeli içerisinde yer alacağı değerlendirilmektedir. Ayrıca uygulanan yöntem ve elde edilen sonuçlar; son yıllarda bütün dünyada yoğun olarak yapılan elektroteknolojik (Geada vd., 2018) çalışmalara katkıda bulunacak orijinallik taşımakta olup, özellikle sağlık (tıp ve eczacılık), gıda ve benzeri birçok alanda kullanıma yönelik girişimlere izin verecek niteliktedir.



Şekil 2.1. Deneyin şematik özeti (Toplam 30 adet stok kültür; 30*150=4500 mL TAP besiyeri + 5'er mL *Chlorella vulgaris* inokülasyonu)

2.2.2. Deneyin Yapılışı

Steril koşullarda; içerisinde 150 mL TAP besiyeri olan 250 mL lik erlenmayerler içerisine daha önce kültürü yapılan ve OD_{680} nm=0,2 olan *Chlorella vulgaris* kültüründen 5'er mL ekim yapıldı.

Ekim işleminin yapıldığı gün, 1. gün olarak isimlendirildi. Aynı gün optik yoğunluk (OD) deneyi, klorofil ekstraksiyon deneyi ve birey sayım işlemi için her kültürden 2 mL örnek alınarak deneylere başlandı. Ekim işleminin yapılmasından bir gün sonrası (3. gün); *Chlorella vulgaris* türünün besiyeri ortamına alışma evresinin (lag fazı)

tamamlanması kabul edilerek saat:12.00-13.00 arası kültür ortamına ilk defa voltmetre ile doğru akım uygulandı (Şekil 2.1). İkilenme süresinin tamamlanması beklendi ve doğru akım uygulamasının yapıldığı günün akşamı saat:18.00 den sonra her kültürden 2 mL örnek alınarak deneyler yapıldı. Bu deneysel işleme kültivasyon süresince birer gün arayla aynı zaman dilimi içerisinde hasat zamanına kadar devam edildi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Ekim işlemi, örneklerin alınması ve doğru akım uygulamasının yapıldığı UV steril kabin

Optik yoğunluk (OD) deneyi, klorofil ekstraksiyon deneyi ve birey sayım işlemi ile büyüme evrelerinin takibi yapılan stok kültürler, ölüm evresine geçtiği zaman (Şekil 2.3) hasat işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 2.3. Hasat zamanı 20V deneyi stok kültürleri

2.2.3. Stok Kültür Ortamı

Chlorella vulgaris mikroalginin kültürünü yapmak için Tris-Asetat-Fosfat (TAP) sıvı besiyeri (Harris, 2009) hazırlandı. Doğru akım şiddeti, doğru akım şiddetine maruz bırakma süresi ve kontrol grubu için 3'er tekrarlı olarak hazırlanan 150 mL lik TAP sıvı besiyeri ortamına, OD_{680} nm=0,2 olan *Chlorella vulgaris* stok kültüründen 5'er mL ekim yapıldı. Ekimi yapılan örnekler iklimlendirme kabinine alınarak; 25±1°C sıcaklıkta ve 16:8 saat aydınlık-karanlık döngüsünde 4000 lux ışık yoğunluğunda (cool-white fluorescent) inkübe edildi. Ayrıca doğru akım uygulamalarının tam

etkisini belirlemek amacıyla stok kültürler inokülasyondan sonra kendi haline bırakılarak karıştırma işlemi yapılmadı, stok kütürler deneyler için numune almadan önce karıştırıldı (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. İklimlendirme kabinindeki kültivasyon ortamı

2.2.4. TAP Besiyeri İçeriği ve Hazırlanışı

Tuz Çözeltisi 50 mL/L:

NH_4Cl : 2 g

$MgSO_4.7H_2O$: 0,5 g

$CaCl_2.2H_2O$: 0,25 g

250 mL dH_2O

Fosfat Çözeltisi 25 mL/L:

K_2HPO_4 : 2,88 g

KH_2PO_4 : 1,44 g

100 mL dH_2O

Tris Çözeltisi 3,75 mL/L:

Tris : 0,484 g

Glasial Asetik Asit : 0,2 mL

10 mL dH_2O

Trace Çözeltisi 1 mL/L:

1. $ZnSO_4.7H_2O$: 2,2 g/10 mL dH_2O
2. H_3BO_3 : 1,14 g/20 mL dH_2O
3. $MnCl_2.2H_2O$: 0,575 g/5 mL dH_2O

4. $CoCl_2.6H_2O$: 0,161 g/5 mL dH_2O
5. $CuSO_4.5H_2O$: 0,157 g/5 mL dH_2O
6. $(NH_4)6Mo7O_{24}.4H_2O$: 0,110 g/5 mL dH_2O
7. $FeSO_4.7H_2O$: 0,499 g/5 mL dH_2O
8. EDTA disodium salt : 5 g/25 mL dH_2O
9. KOH : 2 g/10 mL dH_2O

Trace çözeltisi hazırlanırken; EDTA hariç tüm çözeltiler tek tek hazırlanarak tamamen eritildi ve 100 mL lik bir balon joje içerisinde sırayla ısıtılarak iyice karıştırıldı. Çözelti rengi turuncu hale geldi. 80°C ye kadar soğutulan çözeltiye 25 mL dH_2O'da eritilen EDTA eklendi ve karıştırıldı, çözelti rengi koyu yeşil oldu. Son olarak balon joje içerisindeki karışıma %20'lik 8,5 mL sıcak KOH eklendi. Son hacim 100 mL olacak şekilde çözeltiye dH_2O eklendi ve hazırlanan trace çözeltisi TAP besiyeri hazırlamak üzere karanlık ortamda +4°C de saklandı.

TAP Besiyeri Hazırlarken;

- 921 mL dH_2O
- 50 mL Tuz Çözeltisi
- 3,75 mL Tris Çözeltisi
- 1 mL Trace Çözeltisi
- 25 mL Fosfat Çözeltisi

Çözeltiler belirtilen oranlarda sırayla 1 L lik erlenmayer içerisinde karıştırıldı. pH=5,8 olarak ayarlandı, pH ayarlaması için fosforik asit (H_3PO_4) ve potasyum hidroksit (KOH) tamponları kullanıldı. Hazırlanan 1 L TAP besiyerinden kültivasyon deneylerinde kullanmak üzere; 250 mL litrelik erlenmayerler içerisine 150'şer mL kondu, ağızları gazlı bez ve pamukla yapılan tapayla kapatılarak alüminyum folyo ile sarıldı. Sonra sterilizasyon için, 121°C de 20 dakika otoklavlandı.

2.2.5. Doğru Akım Uygulaması

Steril koşullar altında, kültivasyon süresince bir gün arayla UNI-T UTP3315TFL 0-30V 0-5A marka model voltmetre kullanılarak stok kültürlerin her birine 10V, 20V, 30V olmak üzere üç farklı voltajda ve her voltaj için 5sn, 30sn ve 60sn olmak üzere üç farklı sürede doğru akım uygulandı (Şekil 2.1). Voltmetreye katot ve anot materyali olarak, PVC izole 0,5 mm çapta iletken bakır kablo bağlandı. Bu kabloyla stok kültür

ortamına doğru akım verildi. Kablonun kültür ortamına doğru akım verilen uçları korozyonu önlemek için her kullanımdan önce yenilenerek %70'lik etanolle steril hale getirildi.

2.2.6. Klorofil ve Karotenoid Deneyleri

Ekim işleminden itibaren gün aşırı her kültürden 2 mL örnek alınarak ependorf tüplerine konuldu. Örnekler 15000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek sıvı kısmı döküldü. Sonra 2 mL dH_2O eklenip vortekslendi ve tekrar 15000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Sıvı kısımları dökülen örnekler sonra 2 mL %90'lık aseton ile muamele edildi ve vortekslendi. Vortekslenen örnekler 15 dakika 80 ˚C'de etüv edilip hiç beklemeden 15000 rpm de 5 dk santrijüf edildi. Santrifüjün ardından örneklerin sıvı kısımları UV-vis spektrofotometre'de (Şekil 2.5) %90'lık aseton körüne karşı 750 nm, 664 nm, 647 nm, 630 nm ve 470 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülerek deney sonlandırıldı (Jeffrey ve Humphrey, 1975).

Klorofil ve karotenoid hesaplamaları aşağıdaki formüllere göre yapıldı.

Klorofil-*a* = $11{,}93*A_{664} - 1{,}93*A_{647}$

Klorofil-*b* = $20{,}36*A_{647} - 5{,}50*A_{664}$

Toplam Karotenoid = $(1000*A_{470}) - (2{,}77*\text{Klo-}a)/213$



Şekil 2.5. UV-vis spektrofotometre ve numuneler

2.2.7. pH Ölçümü

Deneylere başlamadan önce hazırlanan TAP besiyerinin pH değeri, fosforik asit (H_3PO_4) ve potasyum hidroksit (KOH) tampon çözeltisi kullanılarak 5,8 olarak sabitlendi. Besiyeri 121°C de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyon işlemi yapıldı ve ekim işlemi gerçekleştirilerek deneylere başlandı. Deneyler sonlandırılmaya karar

verildiğinde, hasat işlemine başlamadan önce stok kültürlerin hepsinin pH değerleri yeniden ölçüldü. Sonra stok kültürler 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek hasat işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası ortamdan uzaklaştırılan TAP besiyerinden, her örnek için 25'er mL alındı ve pH değerleri yeniden ölçüldü (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. pH metre ve hasat sonrası besiyeri pH ölçümü

2.2.8. Birey Sayım İşlemi

Deney süresince bir gün ara ile örnekleme yapılan *Chlorella vulgaris* stok kültürünün lügol solüsyonuyla sedimantasyonu sağlanarak, Leica DM-IL marka inverted mikroskopta sayım işlemi gerçekleştirildi (Tundisi vd., 2015). Sayım için özel hazırlanan sayım aparatına (Şekil 2.7) 5 µL örnek alındı ve 1 mL ye seyreltme işlemi yapıldı. Alınan örneğin homojen dağılıp dağılmadığını belirlemek için sedimantasyon tüpünün tabanında alan taraması yapıldı, homojen dağıldığına karar verilen örnekte yaklaşık 15-20 görüntü alanındaki birey sayıları belirlendi ve ortalamaları alındı.



Şekil 2.7. Birey sayım işlemi için özel tasarlanan sedimantasyon tüpleri ve kültürler

2.2.9. Optik Yoğunluk Ölçümü



Şekil 2.8. Optik yoğunluk ölçüm cihazı ve küvetleri

Steril koşullarda AquaPen-C AP-C 100 marka cihaz (Şekil 2.8) kullanılarak Optik Yoğunluk (OD) değerleri ölçüldü (AquaPen Operation Manual). Deneyler süresince; steril kabin içerisinde birer gün arayla, doğru akım uygulandığı günün akşamı, her stok kültürden 2'şer mL örnek alındı. 2 mL lik küvetlere konulan örnekler en az 10 dakika karanlık odada bekletilerek karanlık uyumlu hale getirildi. TAP sıvı besiyeri ile kalibre edilen optik yoğunluk ölçüm cihazı ile sırasıyla OD_{680} nm, OD_{720} nm, QY ve OJIP değerleri ölçüldü.

2.2.10. Ekimi Yapılan Örneklerin Hasat İşlemi

Ölüm fazına geçen örnekler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek sıvı kısımları döküldü (Şekil 2.9). Distile su eklenerek tekrar santrifüj edilen örneklerden besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrası çöküntü kısım 1,33 Pa altında -83ºC'de 48 saat boyunca liyofilize edilerek deneylerde kullanmak üzere -80ºC'de saklandı (Richmond, 2004).



Şekil 2.9. Hasat işleminin yapıldığı santrifüj cihazı, kültürler ve muhafaza edilen biyokütle

2.2.11. Alg Ekstraktlarının Hazırlanması

Ekstraksiyon işlemi, Chen vd. (1991) tarafından bildirilen yönteme göre yapılmıştır. Tüm numunelerden 0,0250 g alg örneği tartıldı ve 10 mL lik balon jojeler içerisine konuldu. Numuneler üzerine 3 mL Hekzan–Etanol–Aseton–Toluen (10:6:7:7, v/v) karışımı eklendi. Karışım 25ºC'de 90 rpm karıştırma hızında 1 saat çalkalayıcı etüvde karıştırıldı. Karışımda saponifikasyonu sağlamak için; 25ºC'de karanlık ortamda %40'lık 2 mL methanolik KOH ilave edilerek 16 saat süreyle 90 rpm karıştırma hızında çalkalayıcı etüvde karıştırıldı. Sonra 3 mL hekzan ilave edilerek karotenoidlerin ayrışması sağlandı. Solüsyon 1 dk kadar çalkalandıktan sonra %10'luk 2 mL sodyum sülfat solüsyonu ilave edildi. Bu karışım iki faz birbirinden ayrılıncaya kadar bekletilerek, üstte kalan ve karotenoid içeren kısım mikropipet yardımıyla alındı. Kalan tortu üzerine tekrar 3 mL hekzan ilave edilerek karotenoid kalmayıncaya kadar aynı ekstraksiyon işlemi tekrarlandı. Elde edilen ekstrakt 40ºC'de evaporatör ile kurutularak ağızları parafilm ile ayrıca tüm yüzeyleri alüminyum folyo ile kapatılarak -20ºC'de saklandı. Bütün ekstraksiyon işlemi kısık ışık ortamında yapılmış olup, karotenoidlerin izomerizasyonunu ve degredasyonunu önlemek için ortama nitrojen gazı verildi. Karotenoid ekstraktları 1 mL mobil fazda çözündürülüp 0,2 µm'lik PTFE filtreden süzüldükten sonra HPLC cihazına enjekte edildi.

2.2.12. Karotenoid Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Ekstra Sentez firmasından temin edilen karotenoid standartların hepsi 1000 ppm olarak hazırlandı. Bunun için; Çizelge 2.1'de belirtilen miktarlarda tartılan standartlar ependorf tüplerine kondu. Üzerlerine tartılan mg miktar kadar µL diklorometan+methanol çözücüsü (1:1, v/v) eklenerek sonike edildi. Hazırlanan herbir standart çözeltiden; 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 20 ppm ve 10 ppm standart serileri hazırlandı. 200 ppm hazırlamak için; 1000 ppm hazırlanan karotenoid standart çözeltilerin her birinden 200 µL alındı ve üzerlerine 800 µL diklorometan çözücüsü eklenerek sonike edildi. Sonra seyreltilen standart çözelti enjektörle filter edilerek viallere konuldu (Çizelge 2.2). Viallere konulan 35 adet standart serisi HPLC cihazı çalışması için -20ºC'de muhafaza edildi.

Çizelge 2.1. Karotenoid standart ve çözücü miktarları

Karotenoid Standardı	Miktar (mg)	Miktar Çözücü (µL)
Zeaksantin	0,657	0,657
Kapsantin	1,009	1,009
Apokarotenal	0,868	0,868
Beta-kriptoksantin	0,247	0,247
Lutein	0,693	0,693
Beta-karoten	1,06	1,06
Astaksantin	0,774	0,774

Çizelge 2.2. Karotenoid standart solusyon oranları

Karotenoid Standardı	Miktar (ppm)
Zeaksantin	200, 100, 50, 20, 10
Kapsantin	200, 100, 50, 20, 10
Apokarotenal (Internal)	10
Beta-kriptoksantin	200, 100, 50, 20, 10
Lutein	200, 100, 50, 20, 10
Beta-karoten	200, 100, 50, 20, 10
Astaksantin	200, 100, 50, 20, 10

Karotenoid izomer stadartlarını hazırlamak için; 1000 ppm olarak hazırlanan tüm standartlardan belirli hacimlerde alınarak cam şişelere konuldu. 25°C'de 3000 lux ışıkta (20 wattlık 4 tane flüoresan lamba) 24 saat boyunca inkübe edildi. Filtre edilen standart serisi HPLC cihazı çalışması için -20ºC'de muhafaza edildi.

Ayrıca tüm numunelere 10 ppm lik internal standart Apokarotenal eklendi. 200 µL, 100 µL, 50 µL, 20 µL ve 10 µL standart serilerinden 100'er µL alınarak üzerine 300 µL çözücü eklendi ve 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2 ppm ve 1 ppm olmak üzere miks standart hazırlandı. Kontrol numunesine 200 ppm lik tüm standartlardan 10'ar µL eklendi. Geri kazanım için yapılan bu işlemde kontrole tüm standartlardan 2 ppm konulmuş oldu.

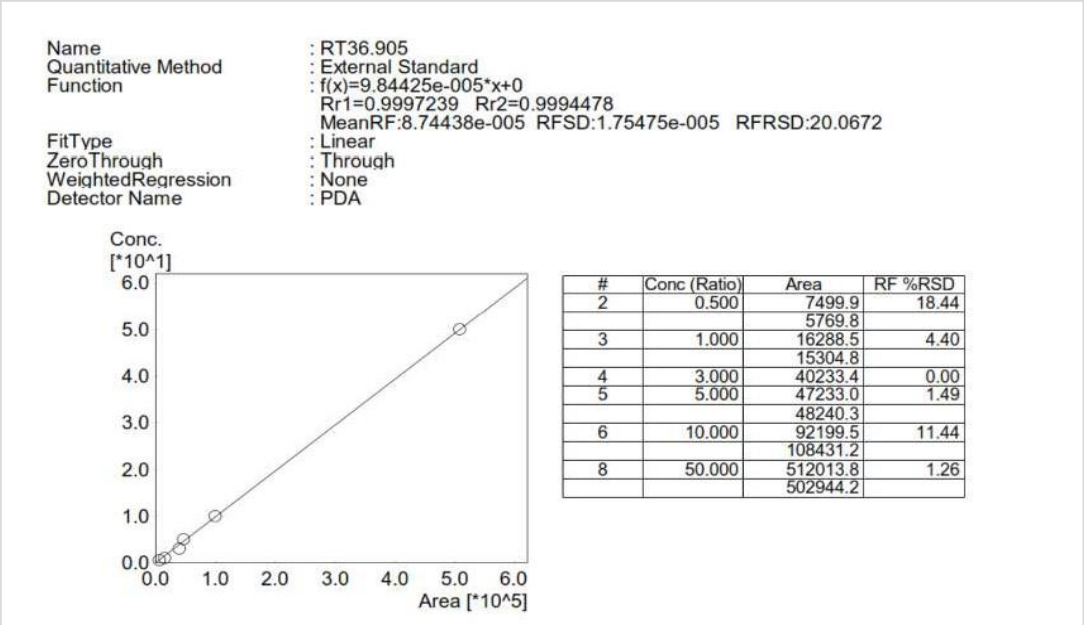
2.2.13. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi

Karotenoid profilini belirlemek için HPLC analizi yapıldı (Inbaraj, Chien ve Chen, 2006; Aluç vd., 2018). HPLC sistemi; biri 3 kanallı (DGU-20A5) olmak üzere darbesiz çözücü iki pompa, SPD-M20A foto diyot dizi dedektörü ve LabSolutions System kromatografi bilgisayar programından oluşmaktadır (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

Karotenoidlerin ayrımı için develosil marka, C30-UG fazlı, 140 Ångström (1 ångström=santimetrenin yüz milyonda biri) gözenek boyutlu, 250 mm uzunluğunda 4,6 mm çapında LC Kolonu (Develosil® 5 µm C30-UG 140 Å, LC Column 250 x 4.6 mm) kullanılmıştır. Akış hızı 0,6 mL/dk olan mobil fazlar; (A)-metanol-asetonitril-su (84:14:2, v/v/v) ve (B)-metilen klorid'ten (%100) oluşmaktadır. %100 A fazı ve %0 B fazı olan başlangıçtaki gradyan çözücü sistemi; 8 dakikada %95 A'ya, 25 dakikada %75 A'ya, 30 dakikada %72 A'ya, 50 dakikada %45 A olarak azalarak 52 dakikada %100 A'ya dönmüş olup 8 dakika süreyle muhafaza edilmiştir. Ekstrakt enjeksiyon hacmi 10 µL olup piklerin yanıtı 450 nm'de belirlenmiştir.

2.2.14. Karotenoid Hesaplanması ve HPLC Piklerinin Tanımlanması

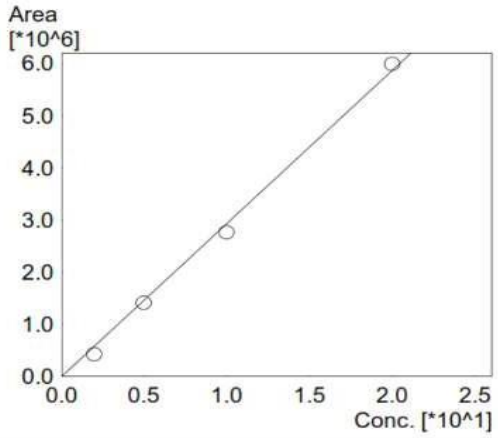
Hazırlanan karotenoid standart ve numunelerinin hepsinin HPLC cihazına okutulmasıyla elde edilen kromatogramlardaki piklerin gelme zamanlarının karşılaştırılması, örneklere standart maddelerin ilave edilmesi suretiyle ortaya çıkan sonuçların karşılaştırılması ve literatürdeki spektral karakterlerinin karşılaştırılması yöntemiyle karotenoid tanımlaması yapılmıştır. Karotenoid madde miktarları ise standart karotenoid maddelerden hazırlanan çalışma solüsyonları kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır.



#	Conc (Ratio)	Area	RF %RSD
2	0.500	7499.9	18.44
		5769.8	
3	1.000	16288.5	4.40
		15304.8	
4	3.000	40233.4	0.00
5	5.000	47233.0	1.49
		48240.3	
6	10.000	92199.5	11.44
		108431.2	
8	50.000	512013.8	1.26
		502944.2	

Şekil 2.10. All-*trans*-β-karoten kalibrasyon grafiği

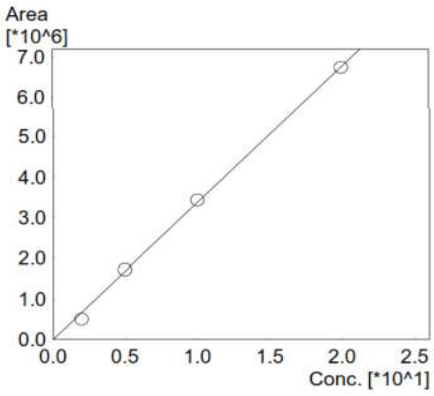
Name : LUTEIN
Quantitative Method : External Standard
Function : f(x)=293806*x+0
Rr1=0.9994036 Rr2=0.9988075
MeanRF:268260 RFSD:37205.3 RFRSD:13.8691
FitType : Linear
ZeroThrough : Through
WeightedRegression : None
Detector Name : PDA



#	Conc (Ratio)	Area	RF %RSD
2	2.000	428984.9	0.00
3	5.000	1413909.3	0.00
4	10.000	2760354.4	0.00
5	20.000	5994614.3	0.00

Şekil 2.11. All-*trans*-lutein kalibrasyon grafiği

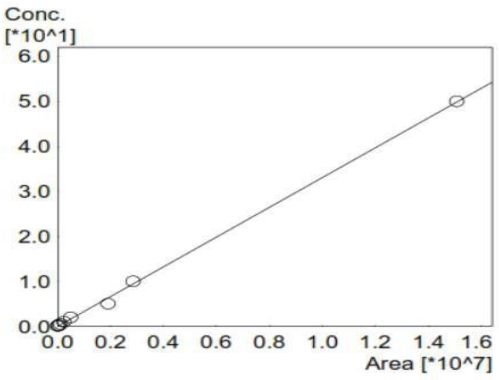
Name : ZEAX
Quantitative Method : External Standard
Function : f(x)=338015*x+0
Rr1=0.9994610 Rr2=0.9989223
MeanRF:319515 RFSD:43350.4 RFRSD:13.5676
FitType : Linear
ZeroThrough : Through
WeightedRegression : None
Detector Name : PDA



#	Conc (Ratio)	Area	RF %RSD
2	2.000	509249.1	0.00
3	5.000	1714173.8	0.00
4	10.000	3433974.0	0.00
5	20.000	6744039.1	0.00

Şekil 2.12. Zeaksantin kalibrasyon grafiği

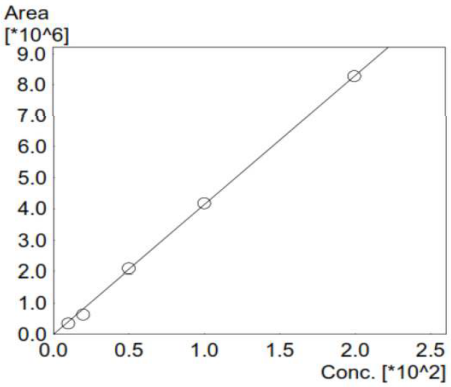
Name : All-trans-beta cryptoxanthin
Quantitative Method : External Standard
Function : f(x)=3.31206e-006*x+0
Rr1=0.9994484 Rr2=0.9988970
MeanRF:3.67413e-006 RFSD:5.09031e-007 RFRSD:13.8544
FitType : Linear
ZeroThrough : Through
WeightedRegression : None
Detector Name : PDA



#	Conc (Ratio)	Area	RF %RSD
2	0.050	14212.6	1.59
		13782.6	
		13887.5	
3	0.100	22988.9	6.16
		25559.2	
		22868.5	
4	0.250	64531.7	2.48
		67759.0	
		66552.2	
5	0.500	121002.9	3.24
		126661.4	
		128763.7	
6	1.000	225565.0	9.37
		256639.6	
		269613.9	
7	2.000	466966.3	5.02
		497644.1	
		515178.7	
8	5.000	1754218.3	8.27
		1961450.3	
		2056068.8	
9	10.000	2594791.9	8.75
		2936887.9	
		3061362.9	

Şekil 2.13. β-kriptoksantin kalibrasyon grafiği

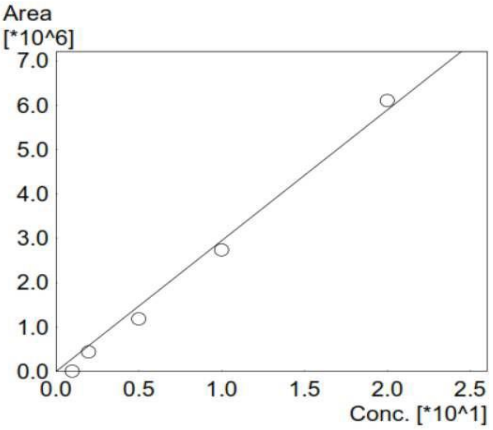
Name : CAPX
Quantitative Method : External Standard
Function : f(x)=41340.8*x+0
Rr1=0.9997104 Rr2=0.9994209
MeanRF:38190 RFSD:4748.28 RFRSD:12.4333
FitType : Linear
ZeroThrough : Through
WeightedRegression : None
Detector Name : PDA



#	Conc (Ratio)	Area	RF %RSD
1	10.000	345500.9	0.00
2	20.000	633464.7	0.00
3	50.000	2084045.1	0.00
4	100.000	4170316.4	0.00
5	200.000	8268517.3	0.00

Şekil 2.14. Kapsantin kalibrasyon grafiği

Name : ASTAX
Quantitative Method : External Standard
Function : f(x)=294618*x+0
Rr1=0.9991126 Rr2=0.9982259
MeanRF:208520 RFSD:116868 RFRSD:56.0466
FitType : Linear
ZeroThrough : Through
WeightedRegression : None
Detector Name : PDA



#	Conc (Ratio)	Area	RF %RSD
1	1.000	7975.6	0.00
2	2.000	440163.3	0.00
3	5.000	1180976.1	0.00
4	10.000	2732824.4	0.00
5	20.000	6101304.4	0.00

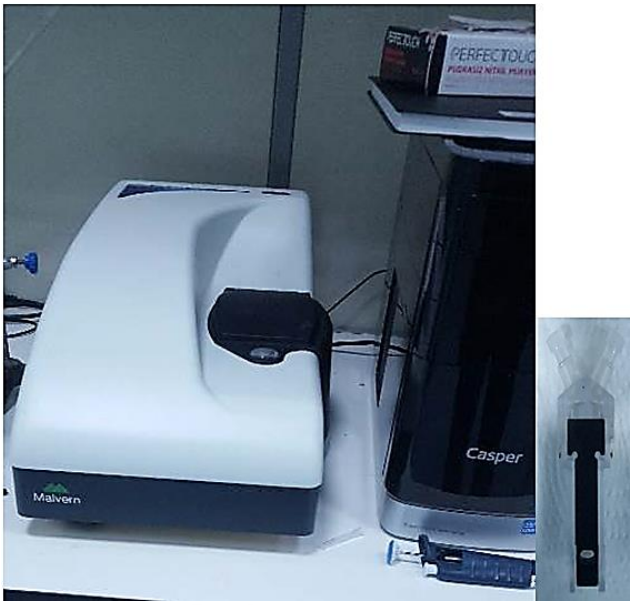
Şekil 2.15. Astaksantin kalibrasyon grafiği

2.2.15. FT-IR Analizi

Kızıl ötesi (IR) radyasyonu absorbsiyonu ile kimyasal bağların titreşimlerinin ölçülmesi prensibine dayanan bu yöntemde Bruker Vertex 70V marka model FT-IR cihazı kullanılmıştır. Yaklaşık olarak 5 mg kurutulmuş alg örneği cihazın ATR ataşmanına yerleştirilmiş ve 4000-400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında (MIR bölge) ölçülen absorbans sonuçları sayesinde biyomoleküller tanımlanmıştır (Stuart, 2004).

2.2.16. Zeta Potansiyeli ve Zeta Size Ölçümü

Malvern marka Zetasizer cihazı kullanılarak Zeta Potansiyeli ve Zeta Size ölçümü yapıldı. Kültivasyon deneyleri sırasında 30 µL hacimde alınan numuneler, cihaza ait 1 mL hacimdeki özel küvet içerisinde distile ile seyreltildi ve cihazda ölçüldü.



Şekil 2.16. Zetasizer cihazı ve küveti

2.2.17. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Çalışması İçin Numune Hazırlama

Hasat öncesi alınan numuneler lugol solusyonuyla sabitlendi. 5'er µL alınan numuneler karbon kaplı yüzey üzerinde oda sıcaklığında kurutuldu. Altınla kaplanan yüzeydeki numunelerin JSM5600LV 30kV lık Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) fotoğrafları çekildi.



Şekil 2.17. Taramalı elektron mikroskobu ve numune hazırlama aparatı

2.3. İstatistik Yöntemler

Çalışmada kullanılan tasarım çerçevesinde yapılan deneylerde üçerli örnekler kullanılmış ve sonuçlar bunların ortalamalarına göre değerlendirilmiştir. Doğru Akım uygulamalarında, 3X3 faktörlü olarak yapılan deneylerden elde edilen veriler normallik testine tabi tutulmuştur. Normal dağılım göstermedikleri belirlenen veriler parametrik olmayan (Kruskal-Wallis) testler kullanılarak analiz edilmiş ve gruplar arası farklılıklar %95 güven aralığında ortaya konulmuştur.

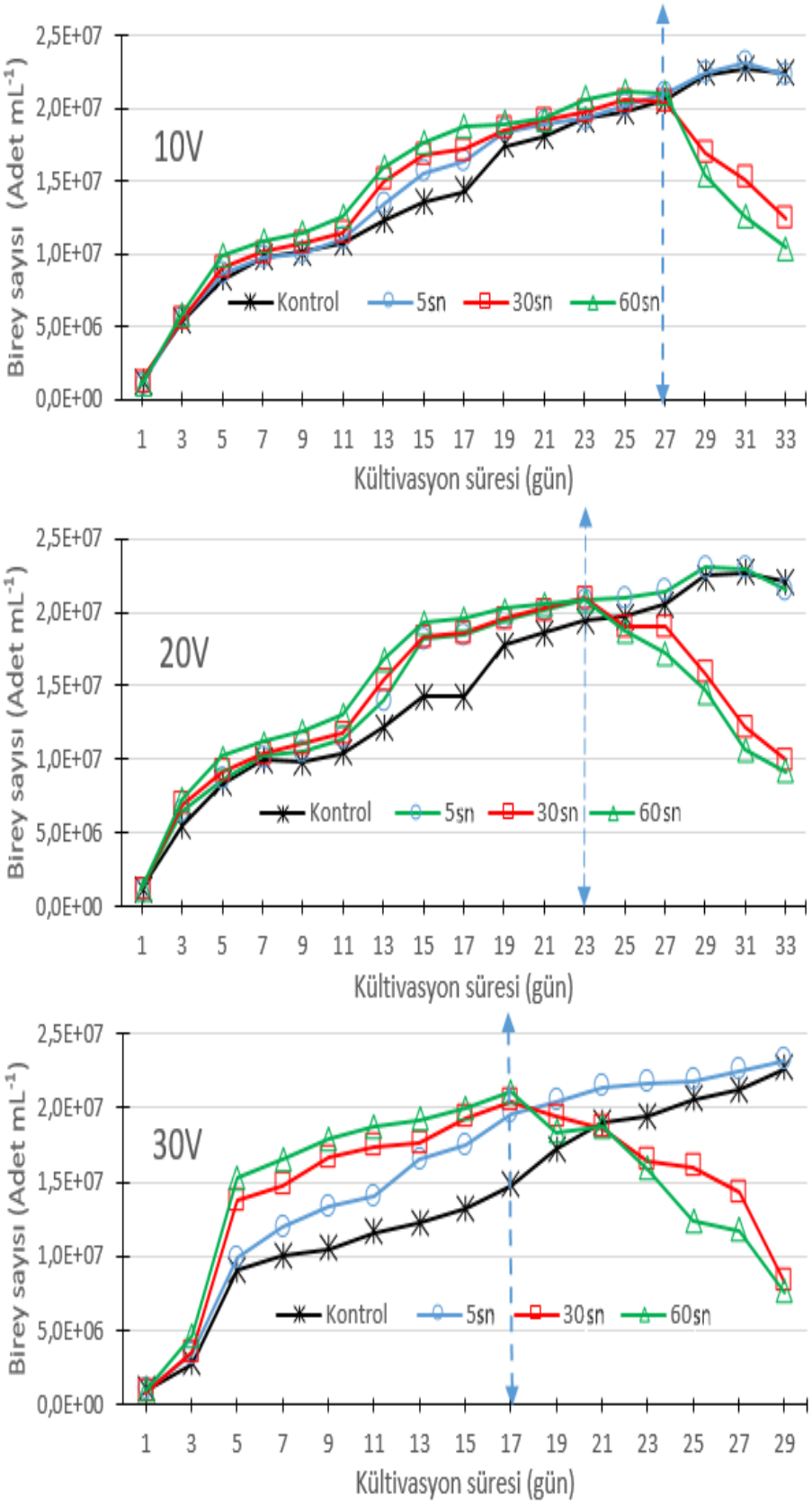
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Büyüme Parametreleri; Birey Sayısı, Optik Yoğunluk (OD) ve Klorofil-*a*

Kültivasyon süresi boyunca 10V, 20V ve 30V olmak üzere üç farklı voltajda ve her voltaj için 5sn, 30sn ve 60sn olmak üzere üç farklı maruz bırakma süresinde uygulanan doğru elektrik akımının, *Chlorella vulgaris* mikroalginin büyümesi üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Doğru akımın büyüme üzerindeki bu etkisi genel ifadeyle iki şekilde belirgin haldedir; ilki, voltaj şiddeti ve maruziyet süresiyle ilgili bütün uygulamaların, kontrol (K) grubuna ait büyüme sonuçlarından farklılık göstermesi şeklinde ortaya çıkmıştır. İkincisi ise, farklı voltaj şiddeti (VŞ) ve voltaj maruziyet süresine (VS) sahip doğru akım uygulaması sonuçlarının kendi aralarında da farklılıkların ortaya çıkması şeklinde gelişmiştir. Bilindiği üzere, büyüme, ya doğrudan biyokütle, biyohacim, hücre sayıları veya hücreye ait alt birimlerin (Klorofil-*a*, *b*, karotenoid vb.) miktarının doğrudan belirlenmesiyle (birim hacimdeki kütle, hacim, sayı) ya da belirlenen bu miktarların zamana bağlı değişimi olarak (spesifik büyüme) ifade edilir. Bu çalışmada, doğru akım uygulamalarının sebep olduğu farklılıklar, mikroalg büyümesinin belirlenmesinde kullanılan bazı parametreler üzerinden ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Chlorella vulgaris'in kültivasyon süresi boyunca takip edilen birey sayılarının dağılımları (Şekil 3.1) incelendiğinde aşağıdaki sonuçların ortaya çıktığı görülmektedir;

a) 10V şiddetindeki doğru akım uygulaması neticesinde artışların gözlemlendiği, ancak bu artışların uygulanan maruz bırakma sürelerine göre 27. gün örneklemelerinden sonra değişiklik gösterdiği gözlemlendi. Bu değişiklik özellikle 30sn ve 60sn maruz bırakma sürelerinde doğru akım uygulanan örneklerde kontrol ve 5sn maruz bırakma süresinin aksine ani ve doğrusal düşüşler olarak belirlendi.



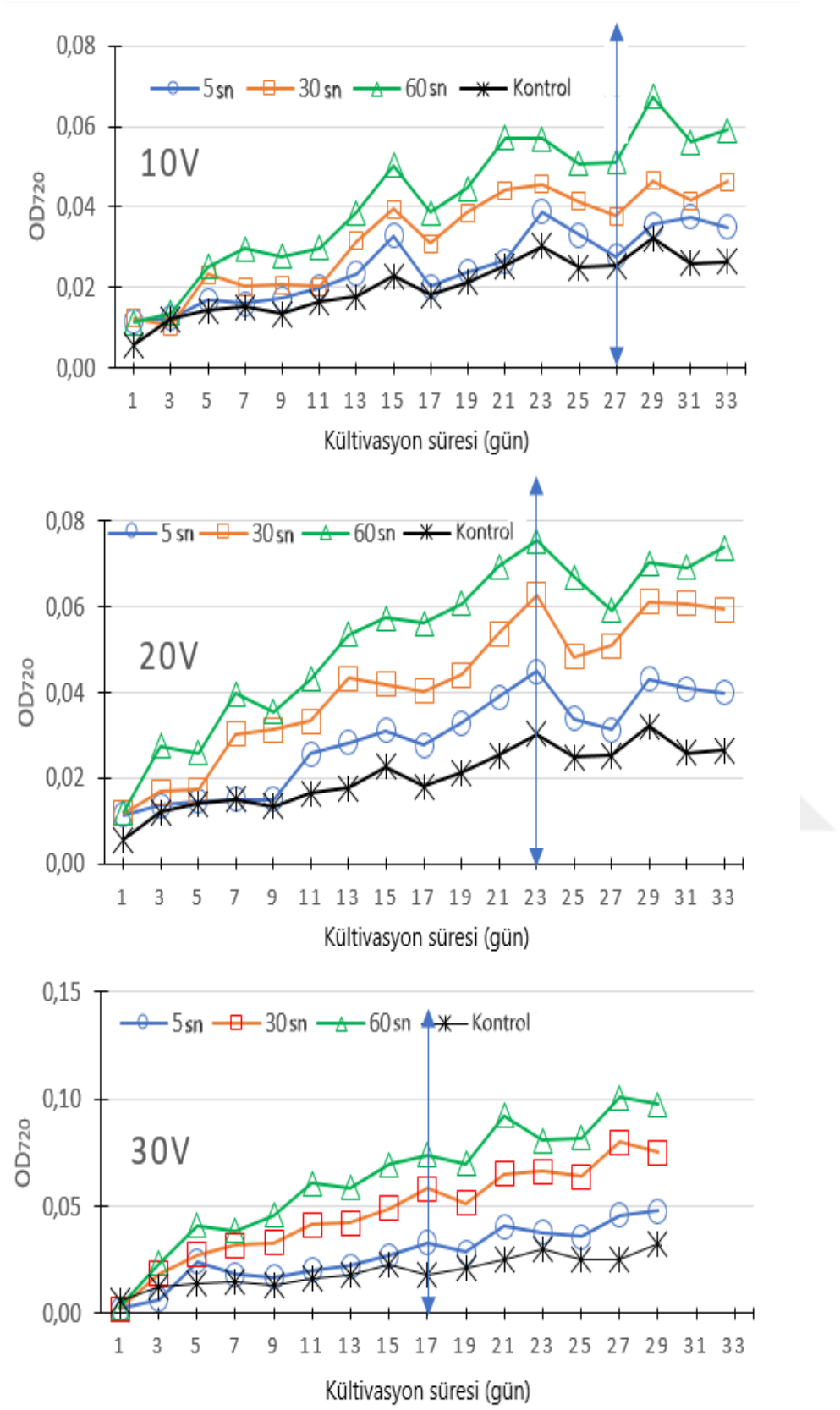
Şekil 3.1. Kültivasyon süresi boyunca doğru akım uygulanan kültürlerdeki birey sayılarının değişimi.

b) Hücre sayılarına göre belirlenen büyüme eğrisi 20V doğru akım uygulamasında da benzer bir şekilde ortaya çıktı; 30sn ve 60sn süreyle doğru akıma maruz bırakılan örnekler kontrol ve 5sn doğru akım uygulanan örneklere göre düşüşler gösterdi. Ancak bu düşüşler 10V doğru akım uygulamalarının aksine daha önce kültivasyonun 23. gün örnekleri sonrası başladı.

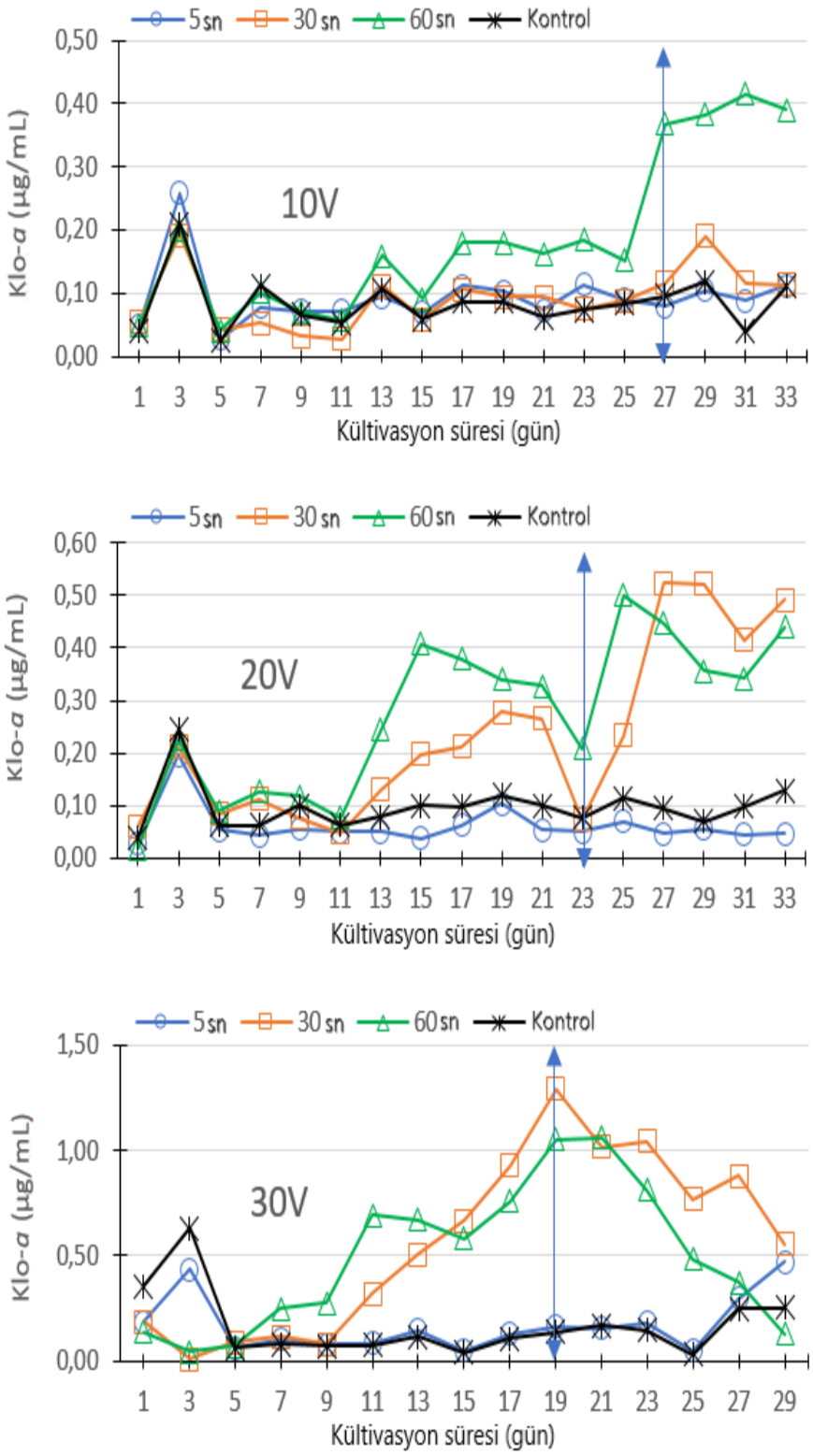
c) 30V şiddetindeki doğru akım uygulamalarında ise bu değişim, 17. gün örneklemelerini takiben görülmeye başlandı.

Birey sayısındaki sonuçlara benzer olarak, kültivasyon süresi boyunca OD_{720} değerlerinde de voltaj şiddeti ve maruz bırakma sürelerindeki artışlara paralel olarak kademeli artışların ortaya çıktığı görülmüştür. Her bir voltaj şiddetinde maruziyet süresi arttıkça OD_{720} değerlerinin de daha yüksek farklılıklar ortaya koyduğu ve böylece birey sayısındakine göre daha belirgin olduğu söylenebilir. Ancak, kültivasyonun geç döneminde birey sayısında görülen keskin düşüşlerin, OD_{720} değerlerinde ortaya çıkmadığı farkedilmiştir (Şekil 3.2).

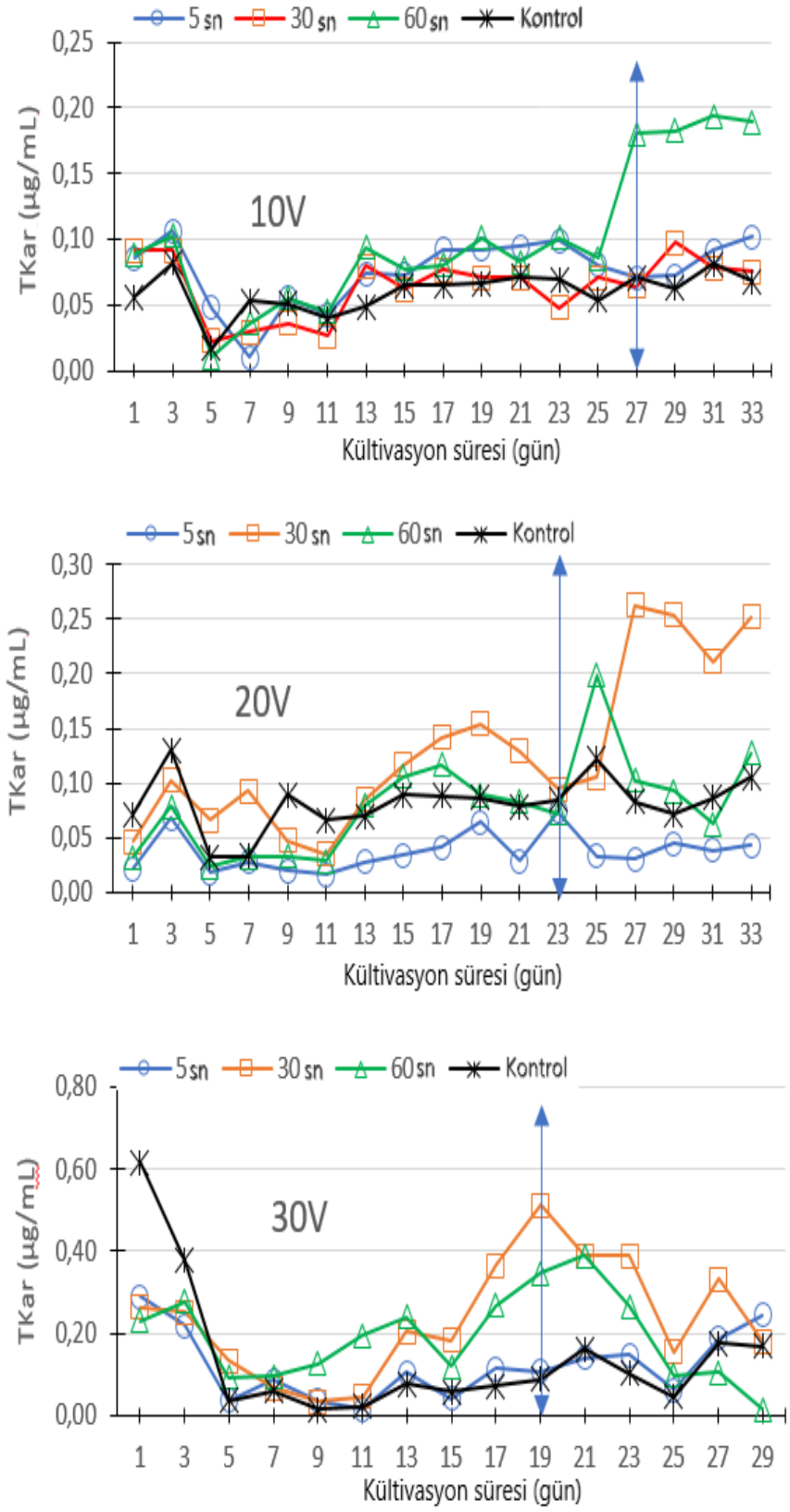
Klorofil-*a* değerlerinin dağılımları, doğru akım uygulamalarının hepsinde farklılık gösterdi (Şekil 3.3). Doğru akım uygulamasının şiddeti arttıkça klorofil-*a* değerleride artarak 30sn ve 60sn maruz bırakma sürelerinde en yüksek değerlerine ulaştı. 10V doğru akım uygulamaları arasındaki klorofil-*a* değerleri; 60sn maruz bırakma süresinde 27. günden sonraki günlerde en yüksek değerine ulaşırken, 30sn maruz bırakma süresindeki değerleri 60 sn maruz bırakma süresindeki değerlere göre biraz daha düşüktü, K ve 5sn maruz bırakma sürelerinde ise en düşük değerlerle temsil edildi. Hem 20V hem de 30V doğru akım uygulamalarının 30sn ve 60sn maruz bırakma sürelerindeki klorofil-*a* değerleri, 10V doğru akım uygulamasına göre benzer ancak dahanet ayrımlara sahipti. Bu ayrımlar sırasıyla 20V için 25. günde artan değerle, 30V içinise 19. günde azalan değerle daha belirgindi. İkincisi, tüm doğru akım uygulamalarının 5sn maruz bırakma sürelerindeki klorofil-*a* değerleri ya K'ye çok yakın (10V ve 30V) ya da daha düşüktü (20V). Kontrol kültürüyle kıyaslayınca 10V 5sn ve 20V 5sn doğru akım uygulamaları hariç, doğru akımın şiddeti ve süre arttıkça büyüme fazlarının (5. Günden itibaren 11 örneklemenin yapıldığı kültivasyon süreci) ortalama klorofil-*a* değerlerinin arttığı görüldü.



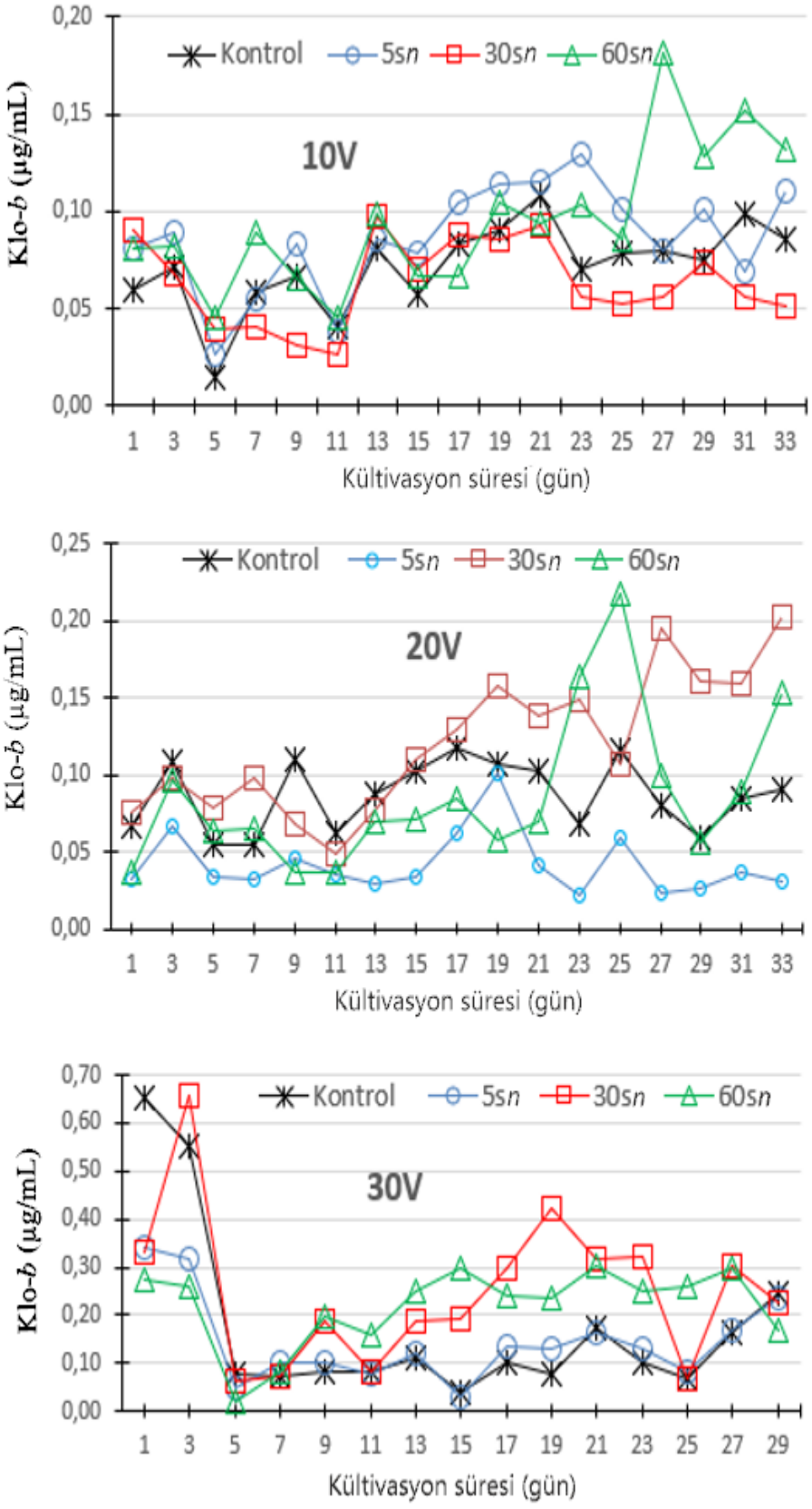
Şekil 3.2. Kültivasyon süresi boyunca *C. vulgaris* kültürlerine ait OD_{720} değerlerinin voltaj ve maruz bırakma süresine göre değişimleri



Şekil 3.3. Kültivasyon süresi boyunca kültürlere ait Klorofil-*a* değerlerinin voltaj şiddeti ve maruz bırakma sürelerine göre değişimleri



Şekil 3.4. Kültivasyon süresi boyunca kültürlere ait toplam karotenoid değerlerinin voltaj şiddeti ve maruz bırakma sürelerine göre değişimleri



Şekil 3.5. Kültivasyon süresi boyunca kültürlere ait Klo-*b* değerlerinin voltaj şiddeti ve maruz bırakmasürelerine göre değişimleri

Klorofil-*a* değerleri doğru akıma maruz bırakma sürelerinde 5sn<K<30sn<60sn olarak, doğru akım uygulamalarının şiddetinde ise K<10V<20V<30V olarak sıralanmıştır.

Bu çalışmada, büyüme parametreleri olarak ele alınan, Birey Sayısı, OD_{720} ve Klo-*a* (ilave olarak da Klo-*a* ile ilişkili olduğu bilinen Klo-*b* ve TKar)'ya ait kültivasyon süresince ölçülen değerlerin (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3), uygulanan doğru akım şiddet ve süresine bağlı ortaya koyduğu farklı sonuçları istatistiki olarak test edilmiştir. Söz konusu parametrelere ait verilerin, logaritmik düzeltme yapılmasına rağmen normal dağılım göstermemesi nedeniyle parametrik olmayan (İki yönlü) Kruskall-Wallis testi uygulanmıştır. Çizelge 3.1, aynı maruziyet süresindeki farklı voltaj şiddeti arasındaki farklılıkları, Çizelge 3.2 ise, her bir voltaj şiddetinin farklı süre uygulamaları arasındaki farklılıkları göstermektedir. Buna göre, doğru akımın, hem VŞ hem de VS uygulamalarına bağlı olarak birey sayısında ortaya çıkardığı "gözlemlenen farklılıkların" önemlilik derecesi (P>0.05) istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. OD_{720} değerlerinde; 30sn ve 60sn VS'lerinin her birinde, 10V-30V arası fark istatistiki olarak önemliyken, aynı VŞ'ne ait 30sn ve 60sn uygulamalarının K ve 5sn uygulamalarından (genel itibariyle) farkının istatistiki olarak önemlilik (P<0.05) derecesine sahip olduğu görülmüştür. Klo-*a*, *b* ve TKar değerleri üzerinde elde edilen istatistiki sonuçlar, genel olarak, 30V şiddetinin ve 30sn, 60sn süre uygulamalarının diğer uygulamalardan farklılaştığını doğrular nitelikte bulunmuştur.

Çizelge 3.1. Kültivasyon süresince, her bir maruziyet süresince uygulanan farklı voltaj şiddetine göre büyüme parametrelerinin farklılık testi [10V, 20V ve 30V için sırasıyla, HS: İki yönlü, Kruskall-Wallis H (2, N= 43) =0.72 p =0.69; H (2, N= 43) =0.16, p =0.91; H (2, N= 43) =0.12, p =0.94. Klo-*a*: H (2, N= 43) =17.06 p =0.00; H (2, N= 43) =18.48 p =0.00; H (2, N= 43) =12.19 p =0.00. Klo-*b*: H (2, N= 43) =19.59 p =0.00; H (2, N= 43) =18.57 p =0.00; H (2, N= 43) =15.16 p =0.00; TKar: H (2, N= 43) =14.73 p =0.00; H (2, N= 43) =14.62 p =0.00; H (2, N= 43) =8.67 p =0.00. OD_{720}: H (2, N= 43) =1.49 p =.47; H (2, N= 43) =8.79 p =0.012; H (2, N= 43) =12.13 p =0.00]. Logaritma (Log 10) dönüşümlü veriler kullanılmıştır.

	HS ad./ml			Klo-*a* µg/ml			Klo-*b* µg/ml			TKar µ/ml			OD_{720}	
5sn	*10V*	*20V*		*10V*	*20V*		*10V*	*20V*		*10V*	*20V*		*10V*	*20V*
20V	1.00			**0.01**			**0.00**			**0.00**			0.84	
30V	1.00	1.00		0.98	**0.00**		0.72	**0.00**		1.00	**0.00**		0.92	1.00
30sn														
20V	1.00			**0.04**			**0.01**			0.02			0.16	
30V	1.00	1.00		**0.00**	0.18		**0.00**	0.69		**0.00**	0.97		**0.01**	0.89
60sn														
20V	1.00			0.89			1.00			1.00			0.13	
30V	1.00	1.00		**0.00**	**0.04**		**0.00**	**0.00**		0.06	**0.01**		**0.00**	0.38

Çizelge 3.2. Kültivasyon süresince, büyüme parametrelerinin her bir voltaj şiddetinde uygulanan süre maruziyetleri arasındaki farklılık testi [10V, 20V ve 30V için sırasıyla, HS: İki yönlü, Kruskall-Wallis- H (3, N= 60) =0.64 p =0.88; H (3, N= 60) =2.37 p =.49; H (3, N= 52) =2.79 p =0.42. Klo-*a*: H (3, N= 60) =13.02 p =0.00; H (3, N= 60) =37.53 p =0.00; H (3, N= 52) =22.31 p =.00. Klo-*b*: H (3, N= 60) =10.28 p =0.016; H (3, N= 60) =28.91 p =0.00; H (3, N= 52) =12.44 p =0.00. TKar: H (3, N= 60) =11.07 p =0.01; H (3, N= 60) =26.26 p =.00; H (3, N= 52) =11.41 p =0.00. OD720: H (3, N= 60) =26.42 p =0.00; H (3, N= 60) =34.93 p =0.00; H (3, N= 52) =35.37 p =0.00]. Logaritmik (Log 10) dönüşümlü veriler kullanılmıştır. HS: Hücre sayısı

	HS ad./ml				Klo-*a* µg/ml				Klo-*b* µg/ml				TKar µ/ml				OD_{720}		
10V	*K*	*5sn*	*30sn*		*K*	*5sn*	*30sn*		*K*	*5sn*	*30sn*		*K*	*5sn*	*30sn*		*K*	*5sn*	*30sn*
5sn	1.00				1.00				1.00				0.21				1.00		
30sn	1.00	1.00			1.00	1.00			1.00	0.08			1.00	0.70			0.01	0.32	
60sn	1.00	1.00	1.00		**0.01**	**0.03**	0.06		0.51	1.00	**0.02**		0.02	1.00	0.09		**0.00**	**0.00**	0.69
20V																			
5sn	0.93				0.07				**0.00**				**0.01**				0.39		
30sn	1.00	1.00			0.12	**0.00**			0.69	**0.00**			0.33	**0.00**			**0.00**	0.14	
60sn	1.00	1.00	1.00		**0.02**	**0.00**	1.00		1.00	**0.00**	0.27		1.00	**0.01**	0.27		**0.00**	**0.00**	1.00
30V																			
5sn	0.72				1.00				1.00				1.00				0.74		
30sn	1.00	1.00			**0.00**	**0.01**			0.13	0.34			**0.02**	0.14			**0.00**	0.06	
60sn	1.00	1.00	1.00		**0.00**	**0.01**	1.00		**0.02**	0.05	1.00		0.11	0.49	1.00		**0.00**	**0.00**	1.00

Bu çalışmada, özellikle birey sayılarının takibi neticesinde elde edilen sonuçlar, elektrik uygulaması içeriğine bağlı olarak ortaya çıkan büyüme eğrilerinin tipik mikroalg büyüme eğrisinden farklı olarak ele alınması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Böylece, hücre ölümlerinin başlangıcı olarak teşhis edilen ve voltaj şiddetine göre kültivasyonun farklı örneklemelerinde ortaya çıkan tarihlerin "öncesi" ve "sonrası" dönemler, karşılaştırmalı olarak incelenerek büyümeye ilişkin değişiklikler yorumlanmıştır. Buna göre; 10V uygulamasında 27. gün, 20V uygulamasında 23. gün, 30V uygulamasında ise 19. günün "öncesi ve sonrası" sırasıyla, "büyüme evresi (BE)" ve "post büyüme evresi (PBE)" şeklinde ifade edilmiştir. Böylelikle, büyüme öncesi ve sonrası evrelerin farklı voltaj ve süre uygulamalarındaki davranışları, mikroalg hücre kültürünün büyümesine dair yorumların daha doğru ve sağlıklı yapılabilmesine imkan tanımıştır. Ayrıca, her bir voltaj için ayırt edici özellikte ortaya çıkan bu tarihlerin, spesifik büyüme hızlarındaki (negatif değerlerle temsil edilen) düşüşlerin başlangıç tarihi olarak da teyit edildiği söylenebilir (Çizelge 3.3).

Büyüme evrelerine göre (ortalama) birey sayısındaki (Çizelge 3.3) değişimler incelendiğinde;

a) 10V, 20V ve 30V olmak üzere her bir voltaj uygulamasının büyüme periyodu esnasında tespit edilen "ortalama hücre sayıları" kontrol grubu ortalamasına göre daha yüksek olduğu, kontrol grubuna göre doğru akım uygulamalarındaki farklılığın yanı sıra, voltaj şiddetinde olan artışlar ve her bir voltajın uygulama süresindeki artışlar da hücre sayısı (biyokütle) artışına sebep olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, büyüme evresindeki ortalama hücre sayıları, elektrik uygulamalarına göre, K<10V<20V<30V ve (20V 30sn hariç) K<5sn<30sn<60sn şeklinde bir sıralama sergilemiştir.
b) Büyüme evresine ait ortalama spesifik büyüme oranlarında da benzer şekilde (K<10V<20V<30V) bir sıralama ortaya çıkmıştır. Bu evrede, özellikle 30V'un 30sn ve 60sn uygulamalarında ortalama hücre sayılarının diğer uygulamalara göre çok daha belirgin bir şekilde yüksek olduğu, ortalama spesifik büyüme oranlarının da 30V'un 5sn, 30sn ve 60sn uygulamalarında aynı derecede yüksek bulunduğu not edilmiştir.
c) Post-büyüme evresinde ise, ortalama hücre sayılarının doğru akım şiddetine göre ortaya çıkan sıralaması büyüme evresindekinin tersi yönde olup, K>10V>20V>30V ve K>/<5sn>30sn>60sn şeklinde ortaya çıkmıştır.

d) Yine post büyüme evresinde, K ve 5sn'ye ait ortalama hücre sayıları büyüme evresindeki ortalamalardan çok daha yüksek olmasına ragmen, bu uygulamalardaki spesifik büyüme oranları belirgin bir şekilde (büyüme evresinden) daha düşüktür. Her bir voltaj şiddetindeki süre uygulamalarının tümünde (5sn, 30sn, 60sn), ortalama spesifik büyüme oranları negatif ve (10V-60sn hariç) birbirine yakın değerler sergilemiştir.

e) 20V 5sn uygulaması, büyüme evresinde en yüksek pozitif ortalama spesifik büyümeye sahip iken, post-büyüme evresinde en düşük değerle temsil edilmiştir.

Çizelge 3.3. Büyüme periyodu ve post büyüme periyodundaki ortalama birey sayıları ve spesifik büyüme oranları

	BÜYÜME EVRESİ					
	Ortalama Birey Sayısı (Adet/mL)			**Ortalama Spesifik Büyüme Oranı**		
	10V	**20V**	**30V**	**10V**	**20V**	**30V**
Kontrol	1.45E+07	1.351E+07	1.162E+07	0.042	0.047	0.041
5sn	1.52E+07	1.520E+07	1.469E+07	0.040	0.049	0.126
30sn	1.57E+07	1.496E+07	1.713E+07	0.037	0.046	0.124
60sn	1.65E+07	1.638E+07	1.840E+07	0.034	0.040	0.108
	K<10V<20V<30V			**K<10V<20V<30V**		
	POST BÜYÜME EVRESİ					
Kontrol	2.25E+07	2.15E+07	1.99E+07	0.015	0.013	0.035
5sn	2.26E+07	2.20E+07	2.18E+07	0.010	0.003	0.014
30sn	1.49E+07	1.57E+07	1.55E+07	-0.083	-0.074	-0.076
60sn	1.28E+07	1.41E+07	1.41E+07	-0.117	-0.082	-0.085
	K>10V>20V>30V			**K>10V>20V>30V**		

Biyokütle ölçümünde kullanılan diğer bir parametre de optik (OD) yoğunluk ölçümleridir. Sağlıklı kültürlerde ve alg hücre kültürü kullanılan deneylerde başlangıç konsantrasyonunun kolay ve hızlı şekilde belirlenmesinde kullanıla gelmektedir.

Bu tez çalışmasında iki dalga boyunda ölçülen optik yoğunluğun 720 nm'deki değerleri biyokütleye, 680 nm değerleri ise klorofil-*a* ya duyarlıdır. Bu nedenle 720 nm deki değerleri hücre sayısı ile, 680 nm'deki değerleri ise klorofil-*a* değerleriyle ilişkilendirilerek yorumlanmıştır.

a) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doğru akım uygulaması yapılan bütün hücre kültürlerinde 720 nm değerleri deney süresi boyunca daha yüksek bulunmuştur.
b) Kontrole göre olan bu artışların, hem doğru akım şiddetindeki hem de her bir doğru akım uygulamasının maruz bırakma süresindeki artışlara göre kademeli şekilde artışlar olarak ortaya çıktığı belirlenmiştir. Buna göre, kültivasyon süresinin tamamı dikkate alındığında, akım şiddetinde K<10V<20V<30V ve süresinde K<5sn<30sn<60sn şeklindeki sıralama ortaya çıkmıştır.
c) OD_{720} değerlerinde, hücre sayımında gözlemlenen ve hücre kültürünün ileriki safhalarında görülen ani düşüşler gözlemlenmemiştir. Bu durumun, OD ölçümlerinde hücre kültürü içerisindeki kolloit yapıdaki bütün partiküllerin ışık absorbsiyonunu kullanması neticesinde ölçüme dahil edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Başka deyişle, OD, bir çeşit turbidite ölçümüdür. Oysa, hücre sayımında, mikroskop altında gözlenen sadece sağlıklı hücreler ölçüm değerlerine yansımaktadır. Bu nedenle, bütün hücre kültürlerinde, hücre sayımında tespit edilen ölüm fazlarına ilişkin bir dönemin ortaya çıkması doğal bir sonuç olarak değerlendirilmelidir. Ancak, her bir voltaj şiddeti ve sürelerine ait uygulama için hesaplanan OD_{680}/OD_{720} değerleri incelendiğinde (Çizelge 3.4), büyüme fazlarına ait ortalamaların post büyüme fazı evresine göre daha büyük çıktığı görülmektedir. Bu sonuç, post büyüme fazında canlı hücre sayılarında ortaya çıkan azalma nedeniyle klorofil-*a* miktarlarındaki düşüşü, buna mukabil biyokütle turbiditesinde aynı oranda azalma gerçekleşmediğinin işareti olarak değerlendirilmektedir.

Çizelge 3.4. *C. vulgaris*'e ait kültürlerin iki büyüme evresinde doğru akım uygulamalarına göre hesaplanan ortalama OD_{720} ve OD_{680}/OD_{720} oranı değerleri BE: Büyüme Evresi

	OD_{720}		**OD_{680}/OD_{720}**	
	BE	Post BE	BE	Post BE
Kontrol			4.665	4.589
10V				
5sn	0.025	0.036	4.010	3.901
30sn	0.033	0.045	3.153	**2.915**
60sn	0.042	0.061	2.677	**2.374**
20V				
5sn	0.027	0.038	3.730	3.423
30sn	0.040	0.056	2.738	***2.435***
60sn	0.052	0.068	2.273	***2.059***
30V				
5sn	0.017	0.027	3.863	3.395
30sn	0.023	0.039	2.558	**2.041**
60sn	0.040	0.067	2.162	**1.610**

Kavramsal olarak elektroteknolojik uygulamalar (Geada vd., 2018); kültivasyon süresi boyunca büyüme ortamı özelliklerindeki değişikliklerle etkileşimli olarak meydana gelen mikroalgal hücrelerin metabolizması üzerindeki dinamik değişiklikleri indükleyen fiziksel bir stres faktörü olarak düşünülebilir (Sun vd., 2018). Bu nedenle, birçok stres uygulamasında olduğu gibi, bu tez çalışmasında da kültür ortamına doğru akım uygulaması yaparak, biyokütle ve ilgilenilen bileşiğin eşzamanlı üretimini maksimize eden iç içe geçmiş iki amaca ulaşılması hedeflenmiştir. Öte yandan, elektroteknolojik uygulamaların hepsinin; pH (Chen vd., 2017), artan tuzluluk (Liu ve Yildiz, 2018), karbon kaynağı ve konsantrasyonu (Paliwal vd., 2017), ışık yoğunluğu (Fan, Chen, Zhang, Ji ve Cao, 2020) ve besin yoksunluğu (Shi vd., 2017) gibi diğer stres faktörlerinden potansiyel olarak farklılaşan kendi dinamiklerine (Geada vd., 2018; Guo vd., 2019) sahip olduğu belirtilmelidir. Elektroteknolojik uygulamalar, kültivasyonun hasat edilmesinden önceki veya sonraki aşamalarında hücre zarını parçalayarak hücre içi bileşiklerin sulu ekstraksiyonunu elde etmek veya homojenizasyonu sağlamak için yaygın olarak kullanılırken (Wang, Wang, Su ve Gao, 2007; Pucihar, Miklavcic ve Kotnik, 2009; Buchmann vd., 2019), bu tez çalışmasında ise büyüme ve karotenoid bileşimi üzerindeki etkisini araştırmak için kullanılmıştır. Bu bağlamda büyüme verilerinin yorumlanmasıyla; hücre yıkımının ölüme etkisini

ayırmak için uygulamalardaki büyüme periyotlarının daha iyi incelenmesi gerektiği sonucu ortaya koyulmuştur.

Birey sayımı verileri ve kültürlerin morfolojik olarak incelemesi neticesinde; hücre ölümlerinin (negatif büyüme hızı) başladığı ve doğru akım uygulamaları ile bu ölümlerin devam ettiği belirlendi. İlk olarak, kültürlerin büyüme verileri olan birey sayımı, optik yoğunluk ve klorofil-*a* değerlerine bakıldığında mikroalgal biyokütlenin artması üzerine doğru akım uygulamalarının açık bir etkisinin olduğu kanıtlandı. İkinci olarak ise birey sayımı verilerine dayanarak, özellikle 30sn ve 60sn maruz bırakma sürelerindeki doğru akım uygulamasında birey sayılarındaki belirgin düşüşlerin başlangıcı, önce 30V doğru akımda 17. günde, ardından sırasıyla 20V doğru akımda 23. günde ve 10V doğru akımda 27. günde meydana gelirken, yine bu sonuçlarla büyüme üzerine doğru akım uygulamasının etkisi kanıtlanmış oldu. Ayrıca bu veriler, renk değişimini aynı sıralı olarak yansıtan kültürler üzerinde yapılan morfolojik gözlemlerle de desteklendi. Kim vd. (2018) tarafından *Haematococcus pluvialis* mikroalginin büyümesi üzerine yapılan bir çalışmada doğru akım uygulamaları araştırılmış ve sonuç olarak, 15V ve 30V doğru akım uygulamasına kıyasla en yüksek oranda 25V doğru akımın uygulamasında biyokütlenin 1,2 kat arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, önceden doğru akım uyguladıkları besiyeri ortamında kültivasyon yaparak, kontrol kültürleriyle doğru akım uyguladıkları kültürlerin klorofil-*a* değerlerini karşılaştırmışlar ve klorofil-*a* arasında bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlarıyla (Kim vd., 2018), besiyeri ortamında meydana gelen değişikliklerden ziyade, doğru akım uygulamalarının hücreler üzerinde doğrudan etkiye sahip olduğunu kanıtlamışlardır. Bununla birlikte, literatürde besiyeri ortamının olumlu etkisi ile ilgili karşıt sonuçlar da bulunmaktadır. Örneğin, Chang vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada kültivasyondan önce çeşitli doğru akım (3.25, 16.25, 32.50 ve 48.75 mA/cm^2) uygulamalarıyla ön işleme tabitutulmuş ters ozmoz konsantresinden (ROC) nutrientleri (özellikle yüksek serbest amonyak azotu) uzaklaştırmak için mikroalgler kullanılmıştır. Doğru akım uygulanmış ROC besiyerinde, 3.25 mA/cm^2'lik düşük akım şiddetinin, NH_4^+ ve NO_3^- ün giderilmesini sırasıyla %36.2 ve %66.5'ten %88.4 ve %90.3'e yükselttiğini bulmuşlardır (Chang vd., 2020). Daha yüksek voltajlarda ise uzaklaştırma verimliliğinin daha da yüksek olduğu, ancak yukarıda bahsedilen inorganik bileşiklerin degredasyonu sonucu ROC besiyeri

ortamında meydana gelen besin sınırlaması nedeniyle büyümenin azaldığı bildirilmiştir (Chang vd., 2020).

Bu tez çalışmasında kültüler durağan fazdayken klorofil-*a* değerleri birey sayısında olduğu gibi bir düşüş göstermeyerek, aksine daha çok aynı değişimleri takip eden yükselme (10V 60sn ve 20V 30sn, 60sn) ya da azalma (30V 30sn, 60sn) sergilemiştir. Bilindiği gibi geleneksel olarak klorofil tayini, kloroplast zarlarının lipoproteinlerini çözmek için organik bir çözücünün hücre zarından geçtiği ekstraksiyon işlemine dayanır (Hosikian, Lim, Halim ve Danquah, 2010). Ekstraksiyon verimi, optimal bir organik çözücü ile, hücre bozulması olmaksızın potansiyelin dörtte birine kadar azaltılabilir (Simon ve Helliwell,1998). Ayrıca mikroalg hücreleri, ışık, oksijen, CO_2, sıcaklık, asidik, bazik koşullar vb. gibi aşırı miktarda büyüme kontrol faktörlerine maruz kaldığında degredasyon ürünleri oluşabilir (Wright, Jeffrey ve Mantoura, 2005; Cubas, Lobo ve González, 2008). Bu nedenle, hücre zarı parçalanması önlendiği zaman, bu çalışmadaki doğru akım uygulamaları yoğunluğu ve süresinin, farklı klorofil-*a* değerleri senaryolarıyla sonuçlanan klorofil pigmentinin ekstraksiyonuna doğal olarak katkıda bulunacağı düşünülebilir. Sonuç olarak, büyüme fazı sırasında büyümeyi etkileyen diğer faktörlerin yanı sıra, esas olarak hücre zarının bozulma derecesi; hücreler ve ortam arasında artan besin taşınmasını içeren mekanizma ile büyümeye artan bir şekilde katkıda bulunurken (Spears, 1988; Humphrey, 2004; Chang vd., 2020), büyüme sonrası fazda hücre ölümleri ve hücrelerin degredasyon ürünleri, özellikle 30V 30sn ve 60sn doğru akım uygulamalarında düşük klorofil-*a*, OD_{680} nm ve birey sayısı değerlerinde de yansıtıldığı gibi ortama salınmıştır (Wright vd., 2005; Cubas vd., 2008).

Bu çalışmada sırasıyla klorofil-*a* ve biyokütle bulanıklığı olarak kullanılan 680 nm ve 720 nm dalga boyundaki OD ölçümleri de (Çizelge 3.4) yukarıdaki sonuçları desteklemektedir (Griffiths, Garcin, van Hille ve Harrison, 2011). Büyüme fazı sonrası aşamalardaki OD_{720} nm değerleri, tüm doğru akım uygulamaları için her zaman OD_{680} nm eşdeğerlerinden daha yüksekti, bu durum büyüme aşamalarına kıyasla daha yüksek biyokütle bulanıklığını gösterir. Ayrıca, 30V 30sn ve 30V 60sn doru akım uygulamaları için tespit edilen en düşük OD_{680} nm/OD_{720} nm oranı, büyüme fazı sonrası aşamada düşüş gösteren klorofil-*a* değerleri ile örtüşmüştür (Çizelge 3.4 ve 3.5). Ne olursa olsun, kültivasyon periyodu boyunca uygulama yapılmamış kontrol kültürüne kıyasla OD_{720} nm deki önemli artış, elektrik uygulamasıyla indüklenen bir

elektroporasyon etkisinin hücre içi bileşiklerin salınmasını arttırdığını göstermektedir. (Carullo vd., 2018).

Sonuç olarak, bu çalışmada iyonik veya iyonik olmayan karakterde olabilen hücre içi bileşiklerin içeriği tanımlanmamasına rağmen, büyüme parametrelerinin tüm doğru akım uygulamalarında sürekli bir artış sergilemesi, doğru akım uygulamalarının sonucu olarak oluşan elektroporasyon sayesinde hücrelerin kısmen hasarlı yapısının bileşiklerin kütle aktarım hızını belirgin şekilde artırdığını iddia edebiliriz.

Hücre zarlarının tersine çevrilebilirliği, herhangi bir elektrik uygulamasını kapsayan çalışmada önemlidir. Hücre zarı geçirgenliği üzerine elektrik uygulamalarının (elektriksel alan ve doğru akım gibi elektroteknolojik uygulamalar) etkisini kapsayan ve esasen zarların tersine çevrilebilirliği hakkındaki verileri sunan çok sayıda çalışmada, doğrudan değerli molekülleri hedefleyen ekstraksiyon verimliliğini araştırmak amaçlanmıştır (Lai, Parameswaran, Li, Baez ve Rittmann, 2014; Coustets vd., 2015; Luengo, Martínez, Bordetas, Álvarez ve Raso, 2015; Pataro vd., 2017; Guo vd., 2019). Bu tez çalışmasında kullanılan doğru akım şiddetinin, ekstraksiyon verimliliği çalışmalarında genel olarak uygulanan aralıktan (30-300kV) oldukça düşük olduğu belirtilmelidir. Düşük ve periyodik doğru akım uygulamasıyla oluşturulan porların işlemden sonra yeniden kapanmış (tersinir elektroporasyon) olması (Luengo vd., 2014) muhtemeldir.

Klorofil-*b*'deki değişimler klorofil-*a*'daki değişimlerle birlikte değerlendirilmiştir, çünkü fotosentetik yapıyı dinamik olarak değişen ışık (Ferreira, Pinto ve Sant'Anna, 2016; Maroneze, Zepka, Lopes, Pérez-Gálvez ve Roca, 2019) ve/veya besin (Zhang, Wu, Yuan, Li ve Li, 2019) koşullarına adapte etmek için fotosentez sırasında sürekli olarak karşılıklı dönüşümleri gerçekleşir. İnokülasyondan sonra tüm kültürler başlangıçta, bu fotosentetik pigmentlerde keskin bir artış (3. gün) ile temsil edilen lag fazına sahipken, ardından tüm doğru akım uygulamalarında değişen üstel büyüme fazını (logaritmik faz) başlatmak için stabilize bir duruma ulaşan bir düşüş (5. gün) gerçekleşmiştir (Şekil 3.3 ve 3.5).

Deneyin başlangıcında gözlemlenen lag fazı (besiyeri ortamına alışma fazı), bazı durumlarda bilinen ışık sınırlı büyüme modellerine uymayan ve tahminin dışında bırakılabilen bir olgudur ve bu durum bizim sonuçlarımızı açıklayabilir (Blanken, Postma, de Winter, Wijffels ve Janssen, 2016).

Beşinci günden itibaren toplam karotenoid'teki küçük istisnalar dışında tüm fotosentetik pigmentler, kültüvasyon süresince neredeyse benzer pikler ve ani düşüşler gösterdi (Şekil 3.3, 3.4 ve 3.5). Yine de özellikle klorofil-*a* ve klorofil-*b*'de beklenen artışların kapsamı ve başlangıç zamanı, doğru akım uygulamalarının yoğunluğuna ve süresine göre farklılık gösterdi. Bu pigmentler için pikler, doğru akım yoğunluğu arttıkça daha yüksek oluştu ve piklerin başlangıcı, azalan voltajlarla daha sonraki günlerde en erken 7.gün 30V 30sn ve 30V 60sn uygulamalarında ve daha sonra 11. gün 10V 60sn ve 20V 30sn ve 60sn de gerçekleşti. En göze çarpan bulgu, tüm voltajların kontrol ve 5sn süresi kültivasyon periyodu boyunca belirgin şekilde daha düşük klorofil-*a, b* değerleri göstermesiydi; bu durum hücrelerin, doğru akımın etkisi olmadan veya nispeten az doğru akım etkisi ile uygun kültür koşulları altında iyi bir şekilde büyütülmediğini ve karıştırmanın dikkate alınması gereken en şüpheli faktör olabileceğini göstermektedir. Carvalho vd. (2006) tarafından karıştırmanın; hem hücrelerin homojen dağılımını hem de kültürdeki başlıca besinler, gazlar ve ısı dahil olmak üzere büyüme ile ilgili özellikleri sağlamak için hayati öneme sahip olduğunu bildirildi (Carvalho, Meireles ve Malcata, 2006). Ayrıca karıştırma (Grobbelaar, 2000) ışık rejimini de etkiler ve böylece mikroalg kültürlerinin spesifik büyüme hızlarındaki ve üretkenliklerindeki değişiklikler tetiklenir (Eriksen, 2008). Bu ilişki, açık hava kültürlerinde daha kritik hale gelir, çünkü ışık yoğunluğu için günlük değişimlere bağımlılık, optimal büyümeyi daha duyarlı hale getirir (Richmond, 2008). Bu çalışmadaki, doğru akım uygulamalarının etkisini ön plana çıkaracak, çalışmanın amaçlarına yönelik deneysel tasarımında karıştırma işlemi sürekli olmayıp örnek alınan alternatif günlerde uygulanmıştır. Bu nedenle, teknik sorunlar nedeniyle titiz karıştırmanın olmaması, doğru akım uygulamalarından elde edilen sonuçların kontrol gruplarına karşı referans olarak değerlendirilmesinde önemli bir etkiye sahip olmayabilir.

Klorofil-*a/b* oranları klorofil-*a*'nınkine benzer değişimler göstermiş ve yine 10V, 20V ve 30V uygulamaları için sırasıyla 27., 23. ve 17. örnekleme günlerine kadar (Büyüme evresi) nispeten daha düşük değerlerle temsil edilmiştir. Büyüme fazında (5.

günden itibaren) klorofil-*a/b* oranları tüm uygulamalarda sırasıyla düşüktü. Hücrelerin, yüksek ışınım altında aşırı ışıktan kaçınmak için anten komplekslerini azaltması tipikti ve böylece en aza indirilmiş reaktif oksijen türleri (ROS) tercih edildi. Işık miktarı her doğru akım uygulaması için yukarıda belirtilen zaman noktalarında aşırı hale geldiğinde anten kompleksleri azaldı, klorofil-*b* konsantrasyonu azaldı ve buna bağlı olarak klorofil-*a/b* oranı arttı. Önceki çalışmalarda *Dunaliella* ve *Chlorella* için benzer bulgular sunuldu (Falkowski, 1980). Sonuç olarak, büyüme ve durağan fazlar sırasında klorofil pigmentlerinin ciddi desenleri benzerdi ancak, pigmentlerin aktivitesi üzerinde farklı etkiler gösteren doğru akım uygulamalarının yoğunluğu ve süresi ile pigmentlerde farklı değişimler meydana gelmiştir (Çizelg 3.5).

Çizelge 3.5. Büyüme evresi ve post büyüme evresindeki Klo-*a*/Klo-*b* ve Klo-*a*/TKar oranları

Doğru Akım	**Klo-*a*/Klo-*b***		**Klo-*a*/TKar**	
	BE	Post-BE	BE	Post-BE
10V				
Kontrol	1.041	1.115	1.338	1.170
5sn	1.054	1.077	1.402	1.647
30sn	1.176	**2.213**	1.946	**2.104**
60sn	1.609	**2.677**	1.402	1.338
20V				
Kontrol	0.088	0.090	1.904	1.817
5sn	0.051	0.043	1.640	1.742
30sn	0.128	**0.263**	**3.378**	**3.257**
60sn	0.142	**0.249**	1.288	1.184
30V				
Kontrol	0.083	0.161	2.028	1.339
5sn	0.098	0.194	2.898	3.214
30sn	**0.344**	**0.550**	**3.253**	**3.661**
60sn	**0.482**	**0.413**	2.079	1.226

3.2. Klorofil Floresans Değişimlerinin Pigmentler ve Büyüme ile Olan İlişkisi

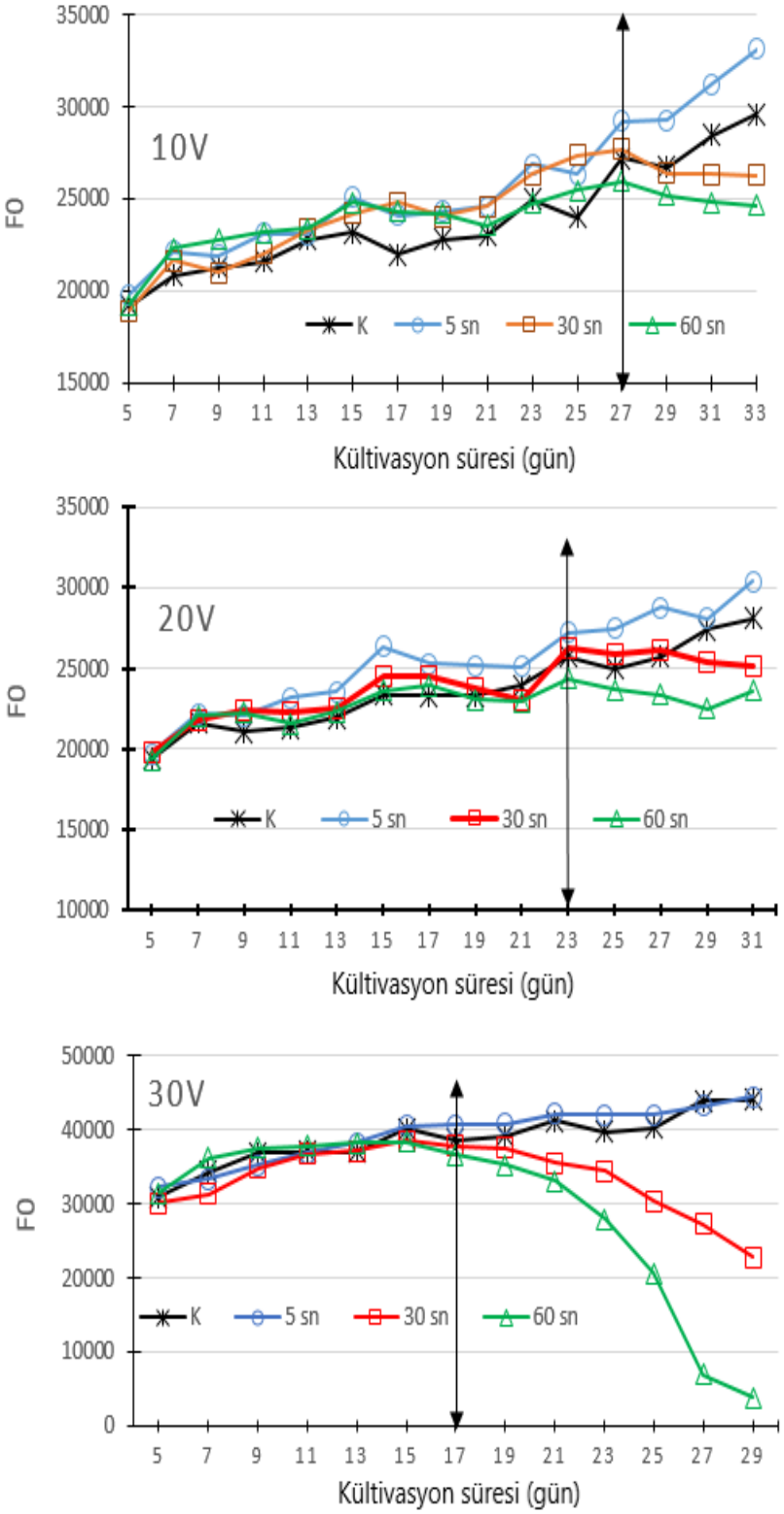
Mikroalglerin kültivasyonu sonunda ulaşılan biyokütle ve bu biyokütlede bulunan hedef bileşikler (karotenoidler), kültivasyon süresince gelişen fizyolojik olayların bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu fizyolojik cevapların ortaya çıkmasında, besi ortamındaki elementlerin miktar ve oransal kompozisyonu, ışık yoğunluğu ve niteliği, pH, sıcaklık, tuzluluk vb. gibi çok sayıda faktör aynı anda etkileşimli olarak etki ederek

son ürüne karar vermektedir. Söz konusu faktörlerden bir veya daha fazlasının değişmesi, hücre büyümesinin herhangi bir safhasında da farklı fizyolojik cevapların oluşmasına ve böylelikle son ürün ve son üründeki bileşiklerin kompozisyonunun değişmesine yol açabilecektir (Negi vd., 2020; Hupp, McCoy, Millgan ve Peers, 2021).

Bu çalışmada, büyümeyi kontrol eden faktörlerden sadece ışık ve ışığın kültür ortamında zamana bağlı ve kendiliğinden gelişerek farklılaşan davranışlarının ortaya çıkardığı bazı fizyolojik gelişmelerin, *Chlorella vulgaris* kültürlerinden elde edilen toplam nihai biyokütle ve içerik kompozisyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Böylelikle, farklı (şiddet ve maruz bırakma süresi) elektrik uygulamalarına bağlı olarak, (diğer faktörler sabit tutulduğunda) ışığın büyüme sırasında ortaya çıkardığı fizyolojik cevapların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Genel itibariyle, klorofil florasansla ilgili ölçülen parametrelerin, daha önce konu edilen büyüme parametrelerinde olduğu gibi, direk elektrik şiddeti ve maruziyet süresi değişikliklerine bağlı olarak farklı cevaplar ortaya koyduğu söylenmelidir. Bu cevaplar, ışığın fotosentez sırasında yol açtığı tanımlı bazı fizyolojik gelişmeleri yorumlamak üzere atanan F_0 ve Fv/Fm parametreleri üzerinde, kültivasyon süresi boyunca gerçekleştirilen ölçümlerine dayandırılmıştır.

İlk olarak, elektrik şiddeti ve süresindeki farklı uygulamalara bağlı olarak F_0 değerlerinde ortaya çıkan salınımların, hücre sayısındaki değişikliklere benzer bir şekilde ortaya çıktığı gözlenmiştir (Şekil 3.6).

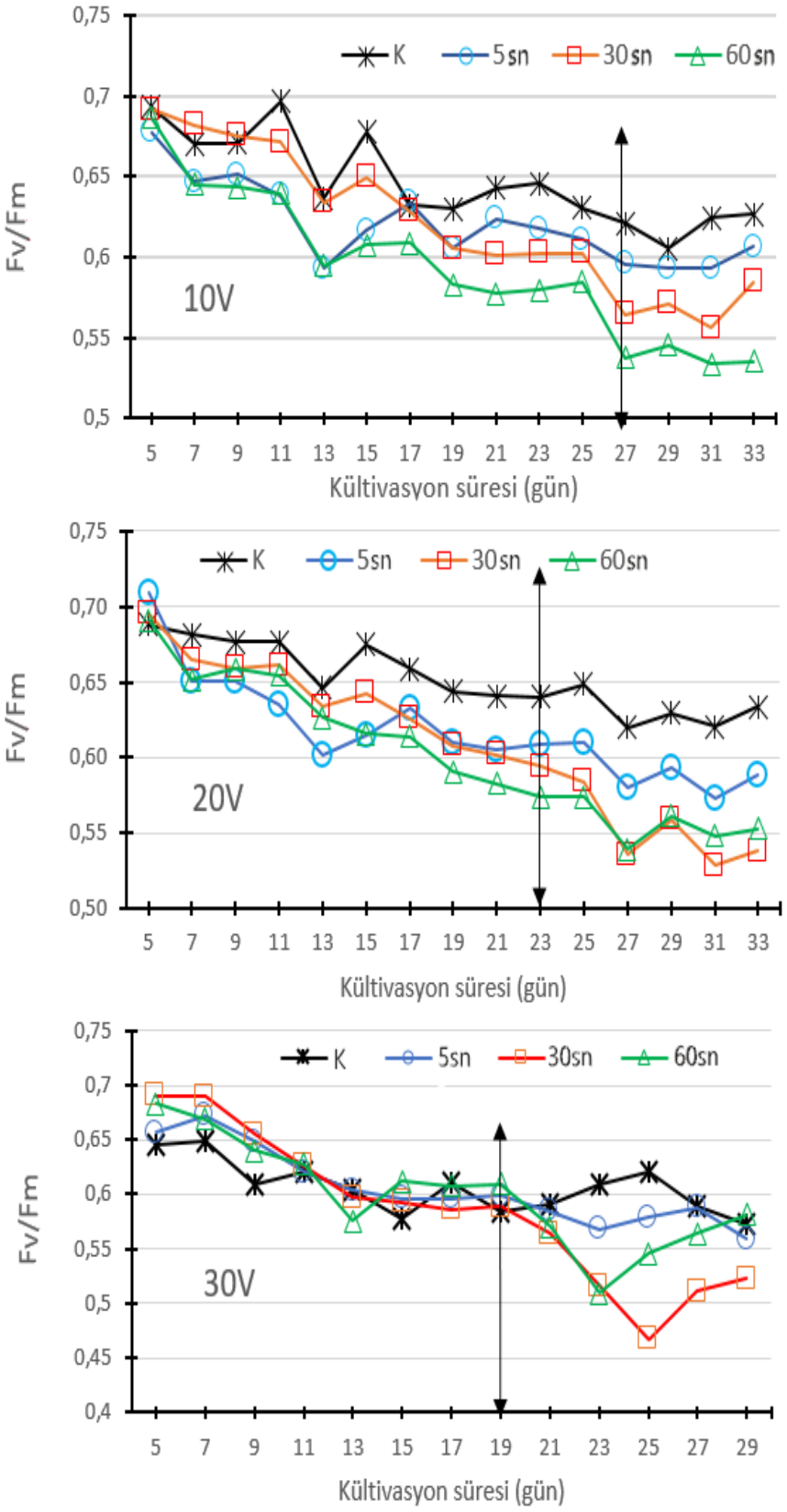


Şekil 3.6. Kültivasyon süresi boyunca kültürlerin F0 değerlerinin değişimi.

Bu salınımlar incelendiğinde, sırasıyla, 10V uygulamasında 27. gün, 20V uygulamasında 23. gün ve 30V uygulamasında ise 19. günü takiben elektrik maruziyet süresine bağlı değişiklikler halinde geliştiği tespit edilmiştir. Bu değişikliklerin,

başlıca olarak, her bir voltaja ait 30sn ve 60sn uygulamalarında aşağı yönde eğilimler ile temsil edildiği görülmektedir. Söz konusu eğilimler, hücre sayımındaki değişiklilerde görüldüğü şekliyle, tipik büyüme eğrisinin tamamlanmasından sonra ortaya çıkan *büyüme* şeklidir. Bu nedenle bu evreye post-büyüme adı verilmiştir. 30V uygulamasında 19. günden sonra 10 gün, 20V uygulamasında 23. ünden sonra 9 gün ve 10V uygulamasında 27. günden sonra 6 gün süreyle devam ettirilen kültürlerdeki hücre miktarının aşağı yönde değişmesiyle, hayatta kalarak bölünmeye devam eden hücrelerin bu dönemdeki mevcut şartlara bağlı yeni bir fotosentez desenine girdiği açıktır. Aslında, kültürlerin voltaja göre farklı günlerine tekabül eden bu değişim başlangıçlarında, hücre sayılarının çok yakın olduğu görülmektedir. Hemen hemen aynı hücre sayılarıyla değişim evresine girilmesine rağmen, 30sn ve 60sn uygulamalarındaki daha hızlı hücre kayıpları nedeniyle bu evredeki hücre sayıları kontrol ve 5sn'dekilere göre belirgin bir şekilde daha düşük bir minimuma inmiştir, yani seyrelme daha fazla olmuştur. Daha fazla seyrelmenin etkisi olarak ortaya çıkan yeni şartların başında ışık geldiği söylenebilir. Çünkü, özellikle daha fazla hücre ölümü nedeniyle kontrol ve 5sn kültürlerine göre daha fazla seyreltilmiş hale gelen 30sn ve 60sn kültürlerindeki hücrelerin daha fazla ışığa maruz kaldığı kuvvetle muhtemeldir. F_0, alg hücrelerinin karanlık ortamda fotosenteze kapalı hale gelmesinden sonra uygulanan zayıf ışığın ölçtüğü minimum floresan olarak tanımlanır (Qiu vd., 2013; Zhang vd., 2019; Yustinadiar, Manurung ve Suantika, 2020). O halde, hücre sayılarının az ya da çok oluşuna göre oluşacak olan F_0 minimum floresans değeri, bu çalışmanın 30sn ve 60sn uygulamalarında gözlemlenen daha düşük F_0 değerlerini de açıklar mahiyettedir (García-Cañedo vd., 2016; Rabouille vd., 2021). Bunun yanısıra, post büyüme evresinde takip edilen Fv/Fm değerlerinde, mevcut düşüşte azalma (10V ve 20V'un 30sn ve 60sn uygulamaları) veya belli bir noktadan sonra yükselme (30V 30sn ve 60sn uygulamaları) eğilimi şeklinde gelişen iyileşmelerin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.7). Özellikle bu bahsedilen elektrik uygulamalarına ait klo-*a* değerleri, diğer (5sn ve kontrol grubu) uygulamalardaki klo-*a* değerlerine göre (bu evrede) belirgin bir şekilde yüksek olduğu (Şekil 3.3) göz önüne alınırsa, fotosentetik faaliyetin yeniden yükselmeye başladığının işareti olarak kabul edilmelidir. Fv/Fm değerlerinde, özellikle 30V, 30sn ve 60sn'de görülen nispi yükselmeler de bunu destekler mahiyettedir (Zhang vd., 2019). Qiu vd. (2013) yaptıkları çalışmada, farklı ışık ve nutrient şartlarında yetiştirilen *Chattonella antiqua* (Raphidophyte) türünün büyüme ve Fv/Fm değerlerinin pozitif bir korelasyon

ortaya koyduğunu ileri sürmüşlerdir (Qiu vd., 2013). Başka bir çalışmada (Ahn ve Glibert, 2022) ise, dinoflagellat *Karenia mikimotoi* ve *Karenia brevis* türleri ile yapılan kültürlerin ölüm (düşüş) evresinde nispeten yüksek Fv/Fm değerlerinin tespit edildiği ve bunun kültür ortamındaki (fotosentezde fonksiyon yapmayan) ölü hücrelerden kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir. Bu endişelere, büyümeyi sınırlayıcı nutrient şartlarına adaptasyon geliştirebilen bazı mikroalg türleri için fizyolojik değişimlerini ortaya koymak amacıyla Fv/Fm ölçümlerinin iyi bir indikator olamayacağını kaydeden çalışmalar da eklenebilir (Mirkovic, Ostroumov, Anna, Van Grondelle ve Scholes, 2017). Ancak, bu tez çalışmasında kullanılan yöntem nedeniyle, yukarıda ifade edilen belirsizlikler ortaya çıkmamıştır. Çünkü, farklı elektrik uygulamalarında yetiştirilen mikroalg kültürlerinin hücre kaybı tespit edilenlerinin bazılarında her iki yönde (artış-azalış) eğilim gösteren Fv/Fm değerleri saptanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Kültivasyon süresi boyunca Fv/Fm değerlerinde meydana gelen değişiklikler

Mikroalg yetiştiriciliğinde asıl amaç olan biyokütle ya da molekül artışını ya da optimizasyonunu sağlamak üzere, klorofil floresans parametrelerinin yoğun ve

detaylı bir şekilde incelendiği çalışmalar son yıllarda hızlı bir artış göstermiştir. Bu çalışmaların çoğunluğundaki genel yaklaşım, fotosistem I ve II elemanlarının (PI/PII Oranı, Elektron Taşıma Sistemi, Reaksiyon Merkezi, Anten Pigmentleri, Anten Proteinleri, Anten Kompleksi Optik Çapı, Oksijen Evolusyonu, ATP, NADPH vs.), fotosentez sırasında enerji verimliliğini artırmak üzere seçtiği denge stratejilerinin (rate limited) aydınlatılması üzerine kurulmaktadır. Aslında, doğada, ışığın günlük değişimlerine göre bitkiler ve algler tarafından hayatta kalmak ve fotosentez verimliliğini artırmak üzere başvurduğu stratejilerin (fotosentezin aydınlık karanlık reaksiyonları) temel bilgisi kullanılarak, mikroalglerin kontrollü ortamlarda kitle üretimlerinde bazı manipulatif müdahaleler ile amaca uygun ürün hedeflenmesi bu kurguların temel dayanağını oluşturmaktadır. Örneğin, gün içinde ışığın en yoğun olduğu durumda, alglerin ışığı başlangıçta adsorbe eden (PSII'deki) antenna kompleksi tarafından tutulan ışık miktarı elektron taşıma sistemindeki miktarın 10 kat üzerine çıkabilmektedir. Fotosistem tarafından en başta sisteme dahil olup anten pigmentleri tarafından anten kompleksinin merkezindeki klo-*a* yı uyaracak ışık (eletron) miktarı (yoğunluğu) ETS tarafından işlenebilecek seviyeden fazla olduğunda, üretken olmayan fazla ışık enerjisi floresans veya ısı enerjisi olarak sistemden uzaklaştırılır ve bu arada hücre hasarı oluşturma potansiyeli olan reaktif oksijen ortaya çıkar (Berman, Nesterov, López ve Sayre, 2015). Fotosistemlerde enerjinin, üretim dışı (floresans ve ısı) kayıplarını azaltmak üzere başvurulan stratejilerden birisi, ışığı absorbe eden anten kompleksinin optik çapının azaltılmasıdır. Bunu sağlamak için başvurulan yöntemler ise, hücre başına düşen total anten alt ünitelerinin (proteinler) yoğunluğunun düşürülmesi, (sadece anten pigmentlerinin yer aldığı) periferal anten ünitesinin optik çapının azalmasına dolaylı olarak yol açacak olan seçici klo-*b* miktarının azaltılmasıdır (Beckmann vd., 2009; Cazzaniga vd., 2014; Friedland vd., 2019). Bu tür çalışmalarda genetik yöntemler kullanılmaktadır (Negi vd., 2020). Bu tez çalışmasında ise, farklı elektrik uygulaması neticesinde her bir kültürde ortaya çıkan fotosentetik gelişmelerin karşılaştırılması suretiyle değerlendirilmiştir (Çizelge 3.6).

Buna göre;

a) Post-Büyüme evresinde, hücre başına düşen pigment (Klo-*a*, *b* ve karotenoid) miktarlarının, her bir voltaj şiddetine ait 30sn ve 60sn uygulamalarında kontrol ve 5sn uygulamalarına göre belirgin bir şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür

(Çizelge 3.6). Büyüme evresinde 10V uygulamasının dışında (20V ve 30V) durum yine aynı şekildedir.

b) Ancak, Post-Büyüme evresinde, pigment başına iş yapma kabiliyeti ya da fotosentetik verimlilik (a'da belirtilenin aksine) 30sn ve 60sn uygulamalarında (kontrol ve 5sn'ye uygulamalarına göre) oldukça düşük çıkmıştır. Büyüme evresinde de durum yine aynı şekildedir.

c) Yine, hücre başına düşen pigment miktarları karşılaştırıldığında ise, özellikle 30sn ve 60sn uygulamalarının post-büyüme evresinde büyüme evresine göre çarpıcı bir şekilde yüksek olduğu kaydedilmiştir.

d) Ancak, 30sn ve 60sn uygulamalarının pigment (Klo-*a, b* ve karotenoid) başına iş yapma kabiliyeti ya da fotosentetik verimliliği kontrol ve 5sn uygulamalarına (c'de belirtilen sonucun aksine) göre daha düşüktür.

e) Yukarıdaki sonuçlara, 20V 5sn uygulamasında, (kuvantum ürünü/pigment) fotosentetik verimliliğin, (post büyüme evresi öne çıkmasına ragmen) her iki büyüme evresinde de diğer voltaj ve süre uygulamalarına göre çok yüksek olması en önemli sonuç olarak değerlendirilmektedir.

Bütün bu sonuçlar, fotosistem I ve II de gelişmesi muhtemel fizyolojik olaylara göre değerlendirildiğinde;

a) Elektrik uygulamaları, kültür sistemlerinde doğrudan (hücre zarları üzerindeki etkisi) veya dolaylı (zarlardaki değişim sonucu hücrelerin besin ortamıyla etkileşimini değiştirmek), ve bunların total etkisi olarak ışığın hücreler tarafından büyümeye ve fotosenteze entegre bir şekilde kullanımını etkilemiştir (a ve c).

b) Kültürlerin, hücre ölümleriyle başlayan yeni bir evreye girdiklerinde fotosentezde kullanılan PSI ve II sistemlerinde gelişen olayların yeni stratejilerle fotosentetik verimliliği (rate limitasyon ile) artırma (dengeleme) yönüne gittikleri tahmin edilmektedir (d). Miktarları yüksek olmasına ragmen, pigmentlerin iş yapma kabiliyetlerinin düşük olması, anten komplekslerine gelen ışığın elektron taşıma sistemine aktarılamayıp floresan ve ısı enerjisi olarak kaybedildiği anlamına gelebilir (Negi vd., 2020; Oukarroum, 2016).

c) Farklı elektrik uygulamaları arasında sadece 20V 5sn uygulamasının fotosentetik verimliliğinin çarpıcı bir şekilde yüksek çıkması, elektrik uygulama yönteminin optimizasyonu için önemli bir basamaktır. Büyüme amaçlı elektrik uygulamasının

literatürde son derece sınırlı sayıda sadece 1 çalışma (Kim vd., 2018) bulunduğu göz önüne alınırsa, original bir sonuç olarak kaydedilmelidir.

Çizelge 3.6. Her bir büyüme evresinde birey başına düşen ortalama pigment miktarları (100picog/hücre) ve pigment başına üretilen kuvantum ürünü. QY: Kuvantum ürünü, Klo-*a*: Klorofil-*a*; TKar: Toplam karotenoid; Klo-*b*: Klorofil-*b*; BE: Büyüme Evresi

	Klo-*a*/hücre		**TKar/hücre**		**Klo-*b*/hücre**	
	BE	Post-BE	BE	Post-BE	BE	Post-BE
10V						
Kontrol	0.553	0.398	0.392	0.312	0.477	0.383
5sn	0.557	0.449	0.452	0.391	0.551	0.417
30sn	0.472	**0.932**	0.341	**0.565**	0.391	**0.409**
60sn	0.852	**3.171**	0.453	**1.508**	0.531	**1.099**
20V						
Kontrol	0.663	0.474	0.540	0.439	0.665	0.403
5sn	0.411	0.220	0.225	0.173	0.300	0.161
30sn	0.991	**2.770**	0.615	**1.555**	0.680	**1.183**
60sn	1.285	**2.945**	0.383	**0.856**	0.439	**0.925**
30V						
Kontrol	0.688	0.818	0.410	0.612	0.705	0.685
5sn	0.642	0.996	0.413	0.670	0.607	0.689
30sn	2.084	**6.018**	0.822	**2.089**	0.868	**1.851**
60sn	2.746	**4.212**	0.855	**1.244**	0.930	**1.883**
	QY/Klo-*a*		**QY/TKar**		**QY/Klo-*b***	
10V						
Kontrol	1.328	1.248	1.750	2.008	1.541	1.633
5sn	1.196	1.346	1.707	1.556	1.214	1.501
30sn	1.474	**0.642**	1.959	**1.038**	1.771	**1.435**
60sn	0.833	**0.180**	1.767	**0.380**	1.256	**0.523**
20V						
Kontrol	1.042	1.411	1.316	1.524	1.069	1.690
5sn	*1.698*	*2.806*	*3.045*	*3.580*	*2.562*	*4.253*
30sn	0.731	**0.240**	1.156	**0.475**	0.997	**0.568**
60sn	0.559	**0.200**	1.857	**0.756**	1.610	**0.801**
30V						
Kontrol	0.977	0.677	1.906	1.254	1.041	1.003
5sn	1.064	0.592	2.106	1.026	1.271	0.943
30sn	0.519	**0.092**	1.183	**0.303**	0.828	**0.465**
60sn	0.369	**0.166**	0.774	**0.974**	1.247	**0.279**

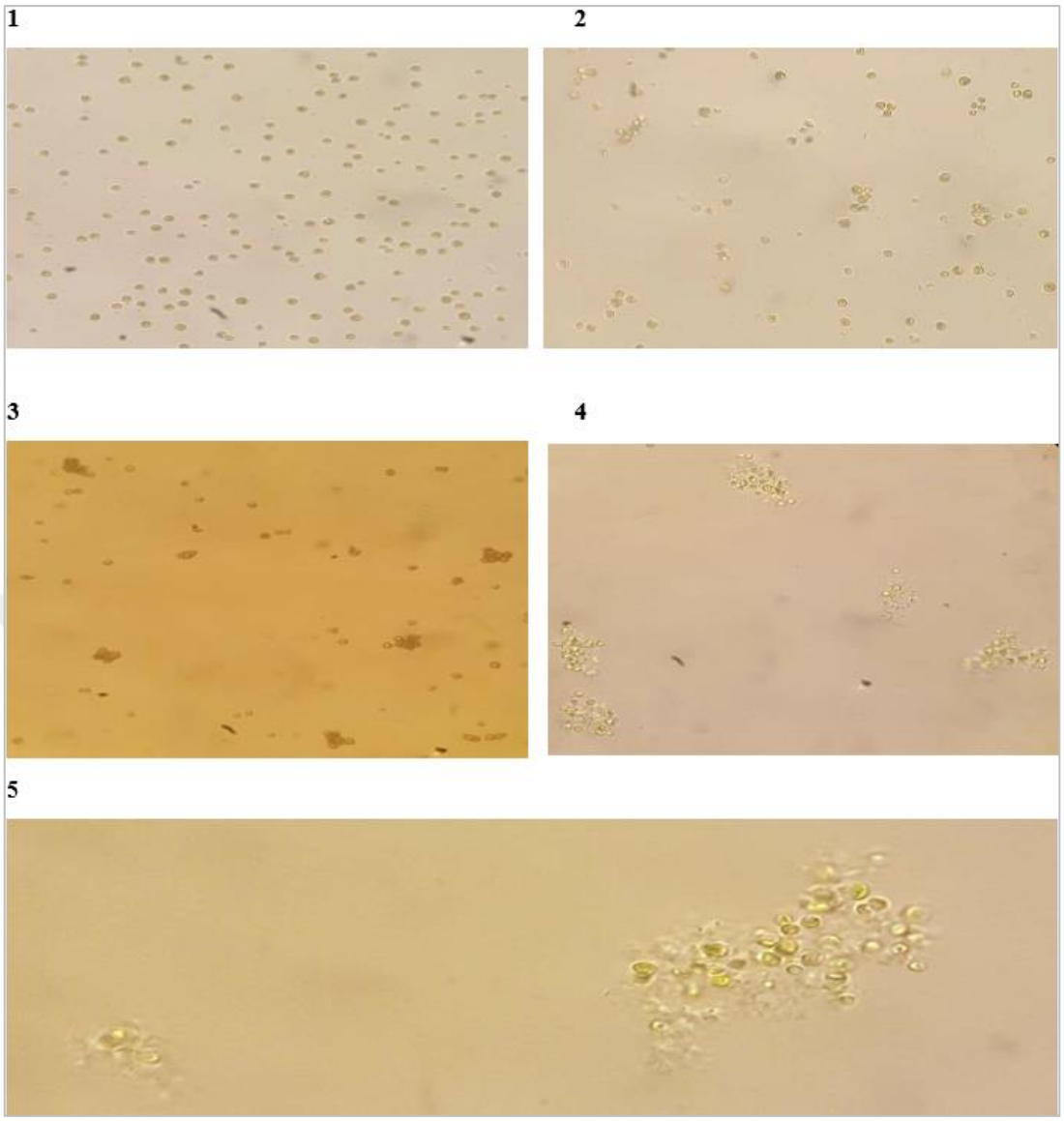
3.3. Deneyler Sırasında Yapılan Morfolojik Gözlemler ve Mikroskobik İnceleme

Kültivasyon süresi boyunca doğru akım uygulanan kültürlerde bazı morfolojik değişikliklerin olduğu gözlemlendi. Bu morfolojik değişiklikler her deney grubunda kültivasyonun farklı günlerin de gerçekleşti. Morfolojik değişikliklerin gerçekleşme zamanını, doğru akım uygulamalarının yoğunluğu ve süresi belirledi. Özellikle her voltajda ve maruz bırakma süresinde, inokülasyondan itibaren belirli bir güne kadar kültürler arasında bir fark yoktu (Şekil 3.8). Hasat zamanına kadar geçen sürede, 30sn ve 60sn maruz bırakma sürelerinde belirli bir günden sonra kültürlerde bazı değişikliklerin olduğu görülürken (Şekil 3.9 ve 3.10.), 5sn (30-1) maruz bırakma sürelerinde herhangi bir değişiklik görülmedi (Şekil 3.8 ve 3.10).



Şekil 3.8. 30V deneyi kültürlerinin görünümü

Başlangıçta birbirlerine benzeyen 30V deneyi kültürlerinin mikroskobik olarak incelenmesi neticesinde; mikroalg hücrelerinin kültür içerisinde askıda ve homojen olarak iyi bir şekilde dağıldığı belirlendi (Şekil 3.9-1. fotograf). İlk defa 30V 60sn doğru akım uygulanan kültürlerin 7. gününde alınan numunelerin mikroskop incelemesinde, mikroalg hücreleri arasında kümelerin oluştuğu görüldü (Şekil 3.9-2. fotograf). Şekil 3.9 da 30V 60sn deneyi kültürlerinde 7. günde başlayarak 17. güne



Şekil 3.9. (-1., -2., -3., -4., -5.) 30V deneyi kültürlerinde kümeleşmenin başlamasını ve devamını gösteren mikroskop (x40) görüntüsü fotoğrafları

kadar devam eden kümeleşmeyi gösterir mikroskop (x40) görüntüsü fotoğrafları görülmektedir. Fotoğraflarda soldan sağa doğru; 1. fotoğrafta, inokülasyondan itibaren 7. güne kadar kümeleşmenin olmadığı, kültürlerin kolloidal yapıda olduğu ve mikroalg hücrelerinin kültür içerisinde homojen olarak dağıldığı görülmektedir. 2. fotoğraf, kümeleşmenin başladığını gösteren 7. gün örneklerinin mikroskop görüntüsünün fotoğrafıdır. 3. ve 4. fotoğraf ise, sırasıyla 11. gün ve 19. gün kültürlerinin mikroskop görüntüsü fotoğrafları olup, mikroalg kümelerindeki birey sayısının arttığı görülmektedir.

5. fotoğrafta ise, hasat zamanı 29. gün fotoğrafı olup, ölüm fazına geçen kültürlerdeki mikroalg hücrelerinin oluşturduğu kümelerde ölümle birlikte birey sayısının azaldığı görülmektedir (Şekil 3.9-5. fotoğraf).

Başlangıçta az sayıdaki (3 ila 10 arası) mikroalg hücresinin bir araya toplanıp kümeleşmesi (Şekil 3.9-2. fotoğraf), kültürün kararlı ve homojen yapısının bozulmasına neden olmuştur (Şekil 3.10). Kültivasyon süresi boyunca 7. günden 19. güne kadar mikroalg kümelerinin birey sayısı ve kümeleşme artmıştır. Kümeleşme ile askıdaki mikroalg hücrelerinin bir araya gelmesi, mikroalg hücrelerinin besiyerinden ayrılmasına ve erlenmayer tabanına çökmesine neden olmuştur (Şekil 3.10). Bu durum 17. günde 30V 60sn (36-1) kültürlerinin tamamen flokülasyonuyla sonuçlanmıştır (Şekil 3.10). Kontrol kültürü (K1) ve 30V 5sn (30-1) doğru akım uygulanan kültürün kolloidal yapısının bozulmadığı hücrelerin kültür içerisinde askıda olduğu ve flokülasyonun gerçekleşmediği görülmektedir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. 30V deneyi kültürlerindeki flokülasyonun fotoğrafları (Kontrol=K1, 5sn=30-1, 30sn=33-1 ve 60sn=36-1)

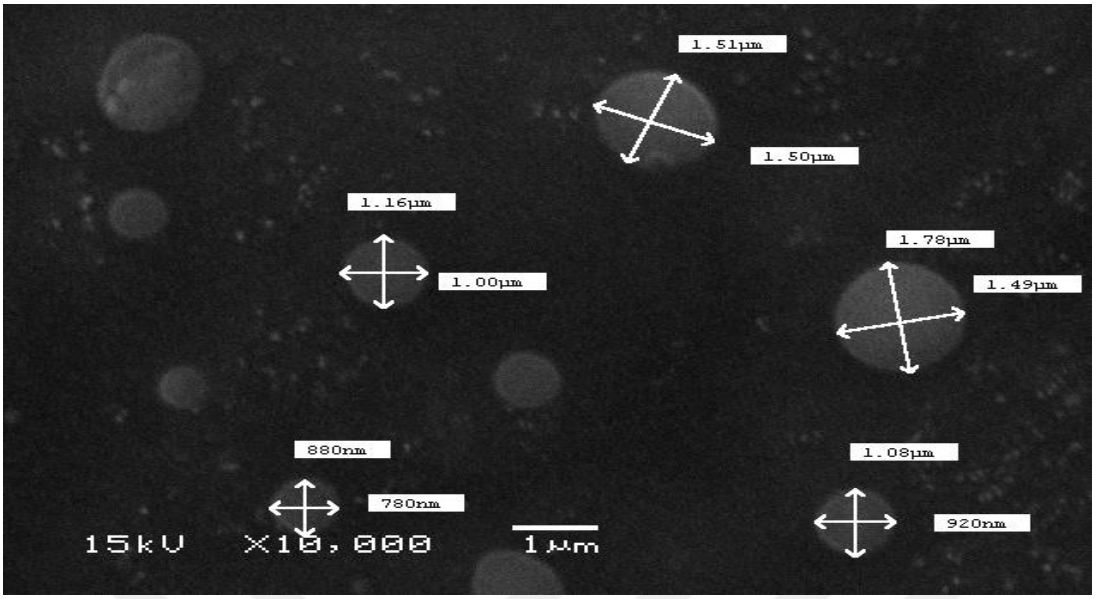
30V deneyi için yukarıda anlatılan süreç 20V ve 10V deneyleri için de benzer şekilde gerçekleşmiştir. Ancak 30V deneyinde 7. günde başlayan kümeleşme, 20V deneyi 60sn maruz bırakma süresinde 9. günde, 10V deneyi 60sn maruz bırakma süresinde ise 11. günde başlamıştır. 30V 60sn deneyinde 17. gündeki flokülasyon, 20V 60sn deneyinde 23. günde, 10V 60sn deneyinde ise 27. günde kültürlerin ölüm fazına geçmesiyle tam olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.11).



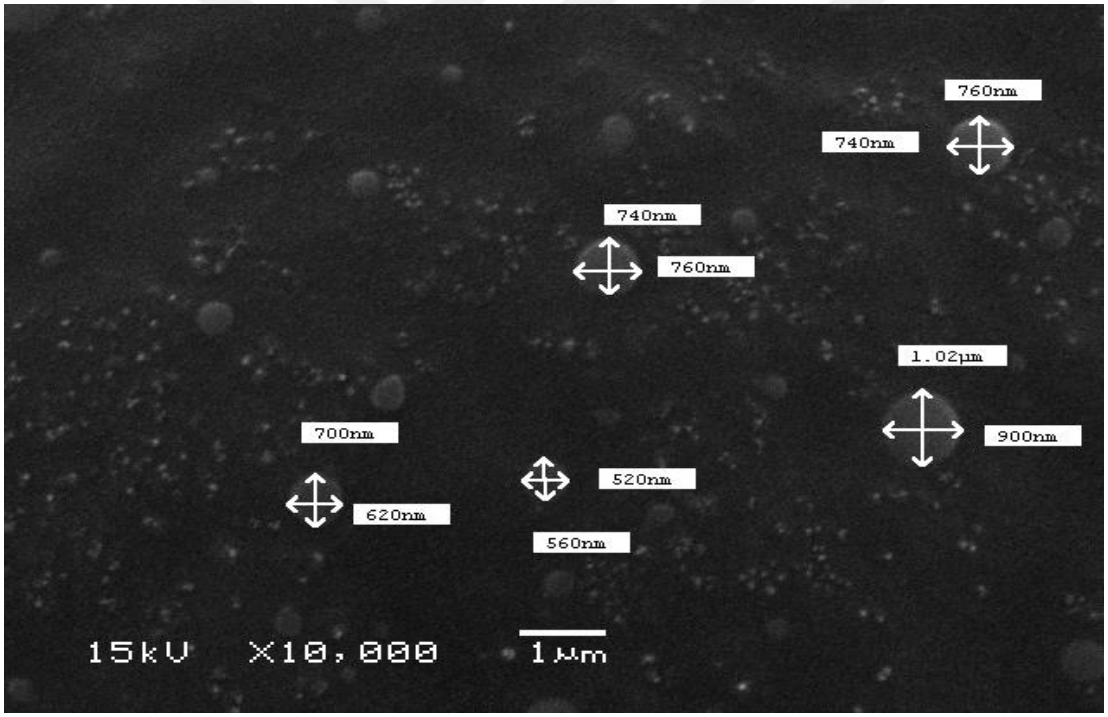
Şekil 3.11. 10V ve 20V deneyi 30sn ve 60sn kültürlerindeki flokülasyonun fotoğrafları

20V ve 10V deneyleri için günleri farklı olmakla birlikte gerçekleşen kümeleşme ve fokülasyon sürecini ortaya koymak için, 20V deneyinin büyüme fazı başlangıcı olan 5. gün örneklerinin (Şekil 3.12) ve flokülasyonun tam olarak gerçekleştiği hasat zamanı örneklerinin (Şekil 3.13) taramalı elektron mikroskobu fotoğrafları (SEM) çekilmiştir. Kültivasyonun 5. gününde, 20V 60sn kültürlerindeki bireylerin kontrol kültüründeki bireylere göre hücre boyutunun küçüldüğü (Şekil 3.12), 20V 60sn kültürünün kontrol kültürü gibi kolloidal yapıda olduğu ve hücreler arasında kümeleşmenin olmadığı görülmektedir (Şekil 3.12). Nitekim inverted mikroskopta gerçekleştirilen birey sayım işleminde 20V deneyi kültürlerinde ilk defa kümeleşmenin 60sn uygulamasında kültivasyonun 9. gününde başladığı ve 23. gününde ise tam olarak gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 3.11). Bu durumda SEM görüntüleriyle inverted mikroskop görüntüleri birbiriyle örtüştüğü görülmektedir (Şekil 3.9-1. fotoğraf ve 3.12). Hasat zamanı 20V 60sn kültürü SEM görüntüsünde ise kontrol kültürüne kıyasla hücre boyutunun büyüdüğü, hücrelerin morfolojik olarak şeklinin değiştiği ve hücrelerin bir araya gelerek kümeler oluşturduğu birbirine yapıştığı görülmektedir (Şekil 3.13).

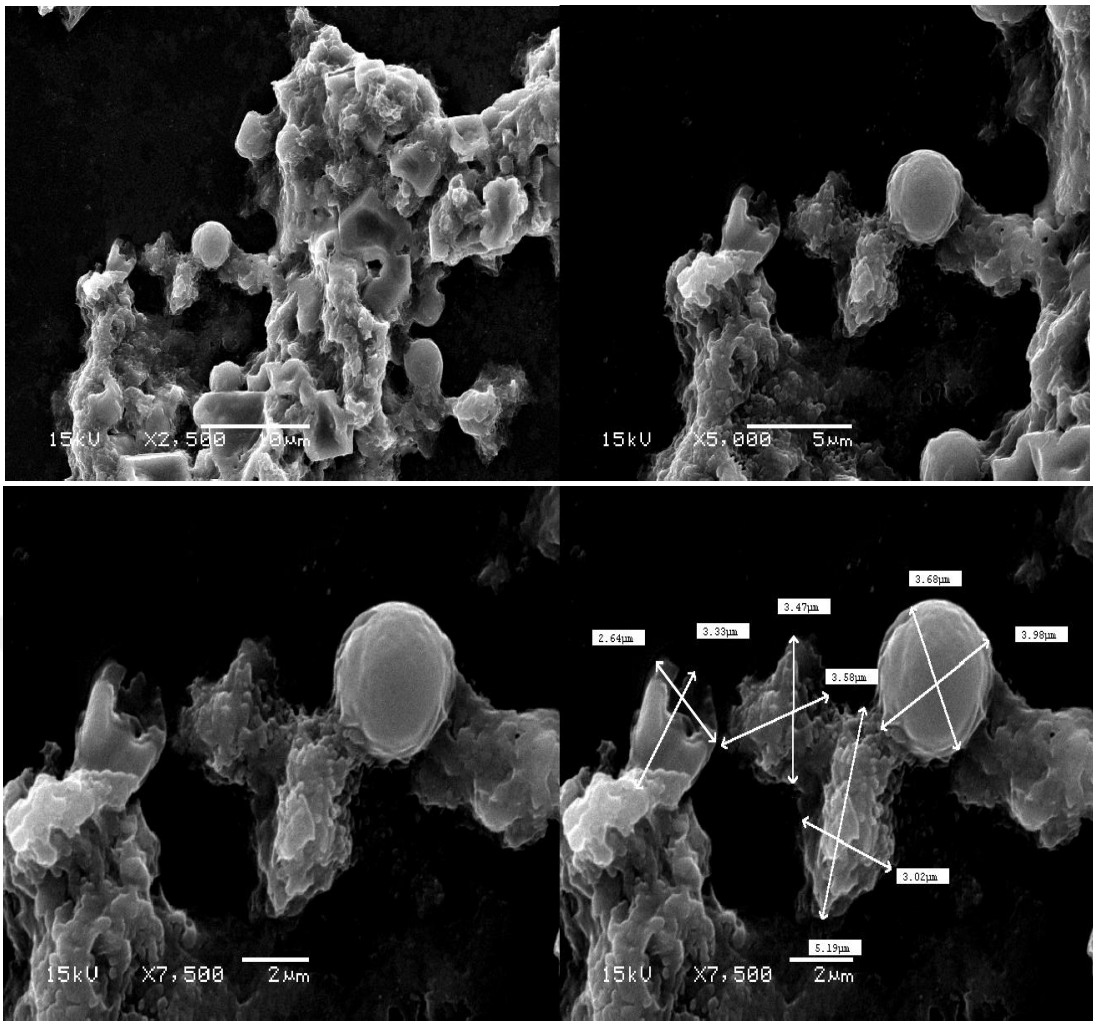
KONTROL (5. GÜN)



20V 60sn (5. GÜN)



Şekil 3.12. *Chlorella vulgaris* mikroalginin kontrol kültürü ve 20V 60sn doğru akım uygulanan kültürünün taramalı elektron mikroskobu fotoğrafı



Şekil 3.13. *Chlorella vulgaris* hücrelerinin hasat zamanı 20V 60sn kültürlerinin taramalı elektron mikroskop fotoğrafı

Sonuç olarak doğru akım uygulamalarının kültürler üzerine morfolojik etkilerini şöyle sıralayabiliriz.

- Kültürlerdeki mikroalg hücreleri bir araya gelerek kümeler oluşturmuş ve kültürlerin flokülasyonuna neden olmuştur.
- Kültürlerdeki bireylerin kümeler oluşturması ve büyüme fazı sonunda gerçekleşen flokülasyon işlemi doğru akım uygulamalarının yoğunluğuna ve süresine bağlı olarak günleri farklı olmakla birlikte belirli bir süreçte gerçekleşmiştir.

Geliştirilmiş XDLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) teorisinde (Ji vd., 2021; Khosravi Zadeh, 2021); kolloidal bir dispersiyonun stabilitesinin çekici kuvvetler ve itici kuvvetler ile belirlenebileceği bildirilmiştir. Dispersiyonun stabil hale gelmesi için itici kuvvetlerin dominant olması gerekir (Ji vd., 2021; Krishnamoorthy vd., 2021). Bu durum bu çalışma için şöyle açıklanabilir; inokülasyondan sonra uyum fazında,

besiyeri ortamında homojen olarak yayılan mikroalg kültür dispersiyonunda, mikroalg hücrelerinin negatif yüzey yükleri sayesinde oluşan dominant itici kuvvet etkisiyle kültürün kolloidal kararlılığı korunmuştur. Ortamda uyum fazının tamamlayan kültürlere, inokülasyondan sonra 3. günden itibaren uygulanan doğru akımın etkisiyle oluşan elektrik yükünün tek yönlü akışı (Geada vd., 2018), kültürdeki yüklü mikroalg hücrelerinin zıt kutuplu elektrota doğru elektroforetik hareketine neden olmuştur (Pearsall vd., 2011). Elektroforetik hareketin kültür sistemleri üzerine yapacağı etki, elektrik uygulamasının şiddetine ve uygulamanın besiyeri ortamındaki iyonlara etkisine bağlı olarak belirlenir (Luengo vd., 2014; Geada vd., 2018; Zhang vd., 2021). Elektroforetik hareketin etkisi ilk defa 30V 60sn kültürlerinde 7. günde görülmüştür. 30V 60sn doğru akım, 7. günde kültürü etkilemiş ve mikroalg hücrelerinin itici negatif yükünün kaybolmasına (Pearsall vd., 2011; Khosravi Zadeh, 2021) ve mikroalg hücrelerinin birbirine yapışarak küçük kümeler oluşturmasına (Şekil 3.9-2. fotoğraf) neden olmuştur. Dağılma kararlılığını etkileyen iki adet temel mekanizmadan biri olan yük etkisiyle itme (Ji vd., 2021; Khosravi Zadeh, 2021), mikroalg hücreleri arasında kümeleşmeyi tetiklemiştir. Normalde mikroalg hücrelerinin yüzey yükleri kültürlerin kolloidal yapıda olmasına neden olmaktadır. Partikül yüzeyindeki yük dağılımının sistemde bulunan partiküller arası etkileşime etkisi olan yük stabilizasyonu, 30V 60sn maruz bırakma süresinde doğru akım uygulanan kültürde 7. güne kadar kendisini korumuştur (Şekil 3.9-1. fotoğraf). Bu durum doğru akım uygulamasının şiddetinin ve süresinin düşük olmasıyla açıklanabilir. Nitekim 30V 60sn maruz bırakma süresi kültürlerinde 7. günde başlayan kümeleşme, 20V kültürleri 60sn maruz bırakma süresinde 9. günde, 10V kültürleri 60sn maruz bırakma süresinde 11. günde başlamıştır. Doğru akımın şiddeti azaldıkça kültürdeki mikroalg hücreleri arasındaki kümeleşmenin başlaması gecikerek kültürlerin kararlılığı belirli bir güne kadar korunmuştur. Hatta 5sn kültürlerinin kültür kararlılığının korunmasını ve herhangi bir değişikliğin olmamasının nedeni doğru akımın şiddeti ve süresinin az olması ile açıkanabilir.

Pearsall vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada, bir DC ile indüklenen elektroforetik hareketin hücreleri kültür ortamından ayıracağı bildirilmiştir. Mikroalgler net negatif yüke sahip olduğunda ve besiyeri ortamı tek değerli sodyum ve potasyum iyonları açısından zengin olduğunda, besiyeri ortamı DC'ye (Pearsall vd., 2011) maruz bırakılırsa mikroalg hücreleri anoda doğru hareket eder. Bu durum, negatif yüklü

hücrelerin yüklerini kaybederek bir araya toplanıp yığın haline gelmesine ve flokülasyonuna neden olur (Uduman vd., 2010). Bu çalışmada benzer bir şekilde, ilk defa 7. günde 30V 60sn kültürlerindeki negatif yüke sahip mikroalg hücrelerinin yüklerini kaybederek bir araya gelmesi kümeleşmeye ve flokülasyona neden olmuştur. 17. güne kadar gün aşırı uygulanan doğru akım askıdaki mikroalg hücrelerinin yığın halinde bir araya gelmesine, besiyeri ortamından hücrelerin ayrılmasına (Şekil 3.9, 3.10 ve 3.11) ve flokülasyonuna neden olmuştur. Bu süreç, süresi farklı ve uzun olmakla birlikte doğru akım uygulamasının şiddetine bağlı olarak 20V ve 10V uygulamaları içinde benzer şekilde gerçekleşmiştir.

DC uygulamasıyla mikroalg kültürlerinin floküle olması literatürde elektroflokülasyon (Krishnamoorthy vd., 2021) olarak tanımlanır ve düşük maliyetli olması nedeniyle mikroalglerin hasat edilmesi için umut verici bir teknik olarak kabul edilmektedir. Hasat prosedürlerinin çoğu, bir elektrottan diğerine tek yönlü bir şekilde elektrik yüklerinin akışını sağlayan yüksek voltajdaki doğru akım (HVED) uygulamasını içerir (Shuman vd., 2016; Ghernaout, 2019). Bu çalışmadaki DC uygulamalarının şiddeti ise, hasat teknikleri arasında yer alan diğer elektrik uygulamalarının şiddetine kıyasla oldukça düşüktür (Krishnamoorthy vd., 2021). Bu durum kültürlerdeki kümeleşme ve flokülasyon sürecinin geç başlaması ve flokülasyonun kademeli bir şekilde kültürlerin ölüm fazına girinceye kadar devam etmesi ile izah edebilir. Bu çalışmada uygulanan doğru akım neticesinde gerçekleşen elektroflokülasyon işleminde, literatürde bildirilen (Krishnamoorthy vd., 2021) diğer doğru akım uygulamalarına kıyasla akım şiddetinin düşük olması; uygulamadaki maliyeti azaltmakla birlikte tercih edilebileceği gibi, flokülasyon sürecinin uzun olması nedeniyle tercih edilmeyebilir. Ancak, kümeleşme ve neticesinde flokülasyonun düşük akım şiddetine bağlı olarak büyüme fazı boyunca belirli bir süreçte ve kademeli bir şekilde gerçekleşmesi sonucunun, büyüme fazındaki flokülasyon sürecinde mikroalgal metabolitlerdeki değişikliğin araştırılması hususundaki çalışmalara katkı sağlayacağı ön görülmektedir. Ayrıca daha düşük voltajdaki akım şiddetinin diğer hasat tekniklerine kıyasla daha az maliyet ve yenilenemeyen enerjinin daha az kullanımı nedeniyle tercih edilebileceği değerlendirilmektedir.

3.4. Zeta Potansiyeli ve pH

Deneyler sırasında yapılan morfolojik gözlemler ve mikroskobik incelemeler neticesinde; doğru akım uygulamalarının şiddeti ve süresine bağımlı olarak belirli bir günden başlayarak kültürlerin kolloidal yapısının bozulduğu ve kültürlerin floküle olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.9, 3.10 ve 3.11). Mikroalgal kültürlerin zeta potansiyeli ile hasat etkinliğini etkileyen pH arasında doğrudan bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Shurair, Almomani, Bhosale, Khraisheh ve Qiblawey, 2019; Ahmad vd., 2021). Kolloidal bir kültürün flokülasyonu veya kararlılığının kültürdeki iyonların konsantrasyonun değiştirilmesi ile gerçekleşleşeceği (Midekessa vd., 2020; de Lima Barizão, de Oliveira,Gonçalves ve Cassini, 2021) ve kolloidal parçacıklar arasındaki etkileşimi göstergesi olan zeta potansiyelinin (Midekessa vd., 2020; Ahmad vd., 2021), koloidal sistemlerin kararlılığını değerlendirmek için ölçüldüğü bilinmektedir (Salopek, Krasic ve Filipovic, 1992). Bu çalışmada hasat zamanı zeta potansiyeli sonuçlarında, kontrol kültürüne kıyasla doğru akım uygulanan kültürlerin kolloidal yapısının ve kararlılığının bozulduğu görülmektedir (Çizelge 3.7). Hatta doğru akım uygulamalarının şiddeti ve süresi artıkça kültürlerin zeta potansiyeli değerlerininde arttığı, sıfır noktasına (izoelektrik nokta) (de Lima Barizão vd., 2021) yaklaştığı ve yüklü mikroalg hücrelerinin nötralleştiği (de Lima Barizão vd., 2021; Krishnamoorthy vd., 2021), kültürlerin kararlılığının (Krishnamoorthy vd., 2021) korunamadığı (Çizelge 3.7) ve flokülasyon işleminin gerçekleştiği görülmektedir.

Çizelge 3.7. Hasat zamanı kültürlerin zeta potansiyeli ve pH sonuçları

HASAT ZAMANI	10V		Zeta Potansiyeli (mV)	pH	Besiyeri pH
	33. GÜN	K	-47,85	6,05	5,8
		5sn	-26,67	6,06	5,8
		30sn	-21,15	6,14	5,8
		60sn	-17,13	6,23	5,8
	20V		**Zeta Potansiyeli (mV)**	**pH**	**Besiyeri pH**
	33. GÜN	K	-47,85	6,07	5,8
		5sn	-26,23	6,12	5,8
		30sn	-14,47	6,32	5,8
		60sn	-11,37	6,52	5,8
	30V		**Zeta Potansiyeli (mV)**	**pH**	**Besiyeri pH**
	29. GÜN	K	-47,85	--	5,8
		5sn	-23,4	--	5,8
		30sn	-5,31	--	5,8
		60sn	-6,76	--	5,8

Özellikle 30V 30sn ve 60sn kültürlerinin zeta potansiyeli değerlerinin sıfır değerine yaklaşması (Çizelge 3.7) kültürlerin izoelektrik noktaya (Ji vd., 2021; Liu vd., 2021) en yakın olduğunu ve en kararsız yapıda olduğunu göstermektedir. Bir süspansiyonun izoelektrik noktada olması; zeta potansiyeli değerinin sıfır olması (Matho vd., 2019) ve pH=7 olması, yani bir süspansiyondaki partiküllerin nötral yapıda olmasıyla (de Lima Barizão vd., 2021) ifade edilir. Bu durum bu çalışma için doğru akım uygulamasının etkisiyle oluşan elektroforetik hareketin mikroalg hücrelerinin yüzey yüklerini kaybederek bir araya gelmesi, kümeler oluşturması ve flokülasyon işleminin gerçekleşmesi şeklinde izah edilebilir. Literatürde yük nötralizasyonun negatif yüklü mikroalg hücrelerinin yüzeyine yüklü hidroksit çökeltilerinin yapışmasıyla (Krishnamoorthy vd., 2021) gerçekleşeceği bildirilmiştir. Ayrıca bu durumun izoelektrik nokta etrafında oluşan zeta potansiyeli varyasyonlarıyla belirleneceği bildirilmiştir (Krishnamoorthy vd., 2021). Anlatılan bu durum bu çalışmadaki biyokütle artışını da açıklar niteliktedir. Nitekim hasat zamanı mikroalgal yaş biyokütle ve kuru biyokütle sonuçları zeta potansiyeli sonuçlarıyla uyumludur. Özellikle 30V 30sn ve 60sn uygulamalarında biyokütlenin en fazla olduğu ve zata potansiyeli değerlerinin sıfıra yakın olduğu ve hatta bu kıyaslamanın doğru akım uygulamalarının yoğunluğu ve şiddetine bağlı olarak gerçekleştiği görülmektedir (Çizelge 3.7 ve 3.8). Bu çalışma için mikroalg hücrelerinin yüzey yüklerini kaybederek besiyeri ortamındaki iyonları alması, biyokütleki artışının gerçekleşmesi ve kültür ortamının kararlılığının korunamaması ve sonucunda flokülasyon işleminin

gerçekleşmesi olasılığını, hasat zamanı zeta potansiyeli ve biyokütle sonuçları destekler niteliktedir.

3.5. Hasat İşlemi ve Elde Edilen Biyokütle Üzerindeki Analizler

3.5.1. Hasat İşlemi ve Elde Edilen Biyokütle

Ölüm fazına geçen kültürlerin (Şekil 3.1 ve 3.2) hasat edilmesiyle kültivasyon deneyleri sonlandırılmıştır. Hasat işlemi kültülerin santrifüj edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası sıvı kısımları dökülen kültürlerin yaş ağırlıkları tartılarak yaş biyokütle (Çizelge 3.8), yaş biyokütlenin liyofilize edilmesiyle elde edilen numune tartılarak kuru biyokütle hesaplanmıştır (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Hasat işlemi sonrası elde edilen yaş ve kuru biyokütle

Mikroalg Yaş Biyokütlesi (g/L)	**10V**	**20V**	**30V**
K	0,8069	0,8069	0,8069
5sn	1,0233	0,9174	0,7952
30sn	1,3950	3,5141	7,0759
60sn	2,1527	7,3198	9,9857
Mikroalg Kuru Biyokütlesi (g/L)	**10V**	**20V**	**30V**
K	0,0919	0,0919	0,0919
5sn	0,1026	0,0962	0,0603
30sn	0,1073	0,1722	0,2650
60sn	0,1507	0,2441	0,2519

Bu çalışmada elde edilen yaş ve kuru biyokütle sonuçlarından, doğru akım uygulamalarının biyokütleyi artırdığı belirlenmiştir (Çizelge 3.8). Biyokütledeki artışın doğru akımın şiddetine ve maruz bırakma süresine bağımlı olarak tedrici bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir (Çizelge 3.8). Kontrol grubuna göre doğru akım uygulamasının şiddeti ve süresi arttıkça biyokütle miktarınında daha fazla arttığı belirlenmiştir. Biyokütle artışının en fazla 30V şiddetindeki doğru akım uygulamasının 30sn ve 60sn maruz bırakma sürelerinde gerçekleştiği görülmektedir (Çizelge 3.8).

Chlorella vulgaris mikroalgi ile yapılan çalışmalarda, farklı stres koşullarında veya değişik uygulamalar içeren deneylerde farklı miktarlarda biyokütle üretimi gerçekleştiği bildirilmiştir (Wang vd., 2015; Leong vd., 2022; Sheng vd., 2022).

Bunun yanında *Chlorella vulgaris* mikroalginin optimal büyüme koşullar araştırılmış ve 3,43 g/L (Daliry, Hallajisani, Mohammadi Roshandeh, Nouri ve Golzary, 2017) biyokütle elde edildiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında olduğu gibi doğru akım uygulamalarının *Chlorella vulgaris* mikroalginin biyokütlesi ve büyümesi üzerine etkisi konusunda literatürde herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Sadece Kim vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada 25V doğru akımın *Haematococcus pluvialis* mikroalginin biyokütlesini 1,2 kat artırdığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında ise 30V 60sn doğru akım uygulanan kültürlede yaş biyokütle kontrole göre 12,37 kat artarken, kuru biyokütle ise 2,74 kat artmıştır. Bu oranlar 30V 30sn doğru akım uygulanan kültürlede ise yaş biyokütlede kontrole göre 8,77 kat, kuru biyokütlede ise 2,88 kat olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca bu çalışmada 20V şiddetinde uygulanan doğru akımda sırasıyla 5sn maruz bırakma süresinde 1,05 kat, 30sn maruz bırakma süresinde 1,79 kat ve 60sn maruz bırakma süresinde ise 2,66 kat kuru biyokütle artışı gerçekleşmiştir. Kim vd. (2018) tarafından yapılan çalışmaya göre bu çalışmada uygulanan voltajın daha düşük olması, buna rağmen biyokütle artışının yüksek olması durumu; her milroalg türünün kendine özgü kültür ve büyüme koşulları ile izah edilebilir. Sonuç olarak bu çalışmadaki doğru akım uygulamaları *Chlorella vulgaris* mikroalginin biyokütlesini artırmıştır.

3.5.2. Hasat Sonrası Elde Edilen Biyokütlede Ekstrakte Edilen Karotenoid Miktarları

Hekzan–Etanol–Aseton–Toluen çözücüleriyle (Chen vd., 1991) gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde; elde edilen ekstrakt evapore edilerek tartılmış ve toplam karotenoid miktarı hesaplanmıştır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. *Chlorella vulgaris* mikroalginde ekstrakte edilen toplam karotenoid miktarları

Karotenoid miktarı (mg/g)	K	5sn	30sn	60sn
10V	62,41	35,70	33,22	12,32
20V	62,41	**212,33**	22,93	29,79
30V	62,41	25,19	15,28	9,69

Ekstraksiyon işlemi sonrası kantrol kültürüne göre 20V 5sn doğru akım uygulanan kültürlerde 212,33 mg/g miktarla toplam karotenoid miktarının 3,4 kat arttığı belirlenmiştir (Çizelge 3.9).

3.5.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analiz Sonuçları

Doğru akım uygulamalarının hem yoğunluğunun hem de süresinin çapraz kombinasyonlarına dayalı olarak tasarlanan kütivasyon deneylerinde, büyüme sırasında doğru akımın etkisine bağlı olarak ortaya çıkan bazı fizyolojik değişikliklerin karotenoid kompozisyonu ve izomerleşmesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Doğru akım uygulamalarının her voltaj ve maruz bırakma süresinde *Chlorella vulgaris* mikroalginin karotenoid profili ve kütlesi üzerine farklı etkilerinin olduğu yapılan Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizi ile ifade edilmiştir. HPLC cihazı kullanılarak yapılan analizler neticesinde teşhisi yapılan karotenoidler; all-*trans*-lutein, *cis*-lutein, neoksantin, *cis*-neoksantin, zeaksantin, *cis*-zeaksantin, all-*trans*-β-karoten, *cis*-β-karoten, kapsantin ve astaksantin'dir.

Çizelge 3.10. HPLC analizi sonucu hesaplanan karotenoid miktarları

Toplam karotenoid (mg/g)	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,7472	0,5055	0,0959	0,0218
20V	0,7472	**1,3544**	0,0296	0,0420
30V	0,7472	0,1205	0,0156	0,0026
Toplam ksantofil (mg/g)	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,6952	0,4699	0,0897	0,0214
20V	0,6952	**1,3165**	0,0286	0,0410
30V	0,6952	0,1177	0,0163	0,0026
Toplam karoten (mg/g)	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,0520	0,0356	0,0061	0,0004
20V	0,0520	0,0379	0,0010	0,0010
30V	0,0557	0,0107	0,0004	0,0000
Toplam all-*trans*-ksantofil (mg/g)	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,6534	0,4421	0,0799	0,0196
20V	0,6534	**1,2032**	0,0286	0,0394
30V	0,6534	0,1098	0,0152	0,0026
Toplam *cis*-ksantofil (mg/g)	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,0418	0,0278	0,0098	0,0018
20V	0,0418	**0,1134**	0,0000	0,0016
30V	0,0418	0,0078	0,0010	0,0000

Çizelge 3.11. HPLC analizi sonucu hesaplanan karotenoid bileşikleri miktarları.

All-*trans*-β-karoten (mg/g)	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,0425	0,0298	0,0048	0,0003
20V	0,0425	0,0301	0,0008	0,0008
30V	0,0425	0,0083	0,0003	0,0000
***Cis*-β-karoten (mg/g)**	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,0095	0,0059	0,0014	0,0001
20V	0,0095	0,0077	0,0002	0,0002
30V	0,0095	0,0024	0,0001	0,0000
All-*trans*-lutein (mg/g)	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,6042	0,3954	0,0712	0,0177
20V	0,6042	**0,9926**	0,0264	0,0364
30V	0,6042	0,0998	0,0140	0,0026
Toplam-*cis*-lutein (mg/g)	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,0269	0,0169	0,0035	0,0011
20V	0,0269	**0,0791**	0,0000	0,0016
30V	0,0269	0,0046	0,0009	0,0000
Zeaksantin (mg/g)	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,0427	0,0408	0,0073	0,0016
20V	0,0427	**0,1600**	0,0022	0,0025
30V	0,0427	0,0091	0,0010	0,0000
***Cis*-zeaksantin (mg/g)**	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,0096	0,0072	0,0032	0,0000
20V	0,0096	**0,0343**	0,0000	0,0000
30V	0,0096	0,0003	0,0000	0,0000
Kapsantin (mg/g)	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,00432	0,0041	0	0
20V	0,00432	**0,0506**	0	0,0006
30V	0,00432	0	0,0001	0
Astaksantin (mg/g)	**K**	**5sn**	**30sn**	**60sn**
10V	0,0004	0,0002	0,0000	0,0001
20V	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000
30V	0,0004	0,0002	0,0000	0,0000

Doğru akım uygulamaları içerisinde; 20V 5sn süreyle doğru akım uygulanan kültürlerde kontrol kültürlerine göre toplam karotenoid miktarının, toplam all-*trans*-karotenoid miktarının ve toplam *cis*-karotenoid miktarının arttığı belirlenmiştir (Çizelge 3.10). Bu artışlarda 20V 5sn doğru akım uygulamasının toplam karotenoid kütlesi içerisinde ksantofil karotenoid kütlesi üzerine etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.16). Ayrıca 20V doğru akım uygulamasının 30sn ve 60sn maruz bırakma sürelerinde, kontrole göre toplam karotenoid miktarı, toplam all-*trans*-karotenoid miktarını ve toplam *cis*-karotenoid miktarı azalmıştır (Çizelge 3.10). 10V ve 30V doğru akımın uygulamalarının ise 5sn, 30sn, 60sn olmak üzere tüm maruz bırakma

sürelerinde, kontrole göre toplam karotenoid miktarı, toplam all-*trans*-karotenoid miktarı ve toplam *cis*-karotenoid miktarının azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 3.10).

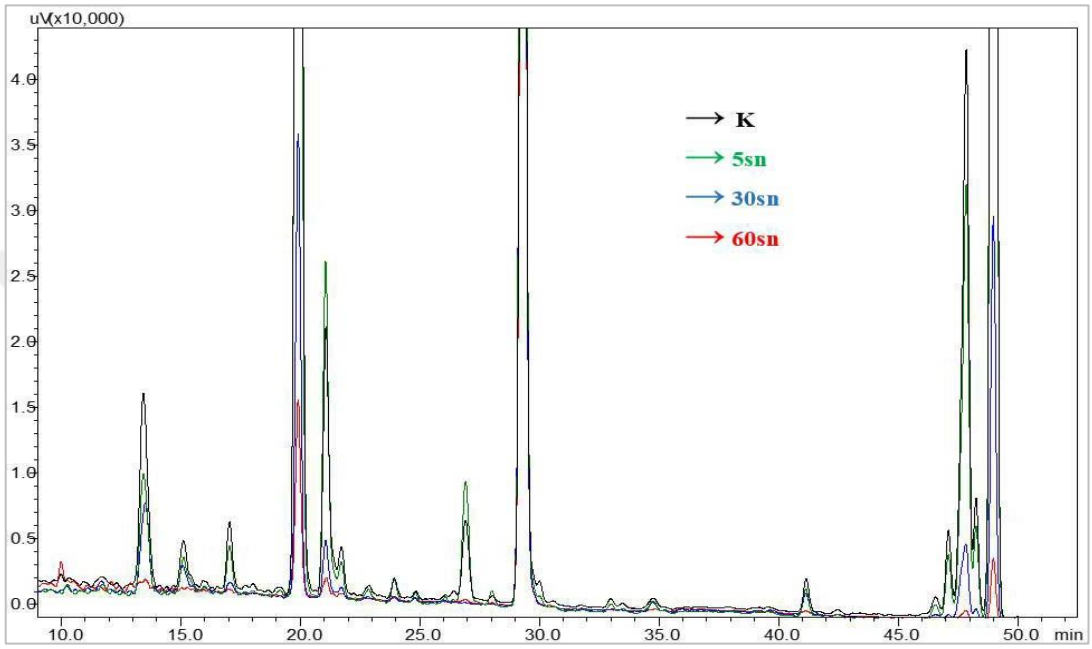
Çizelge 3.12. *Chlorella vulgaris* mikroalgi ile yapılan farklı çalışmalardaki karotenoid miktarları

Kaynaklar	Karotenoid (mg/g)
(Goodwin, 1954)	0,15-2,04
(Czerpak, Piotrowska, Dobrzyń, Tatur ve Marczuk, 2003)	2,749
(Luengo vd., 2014)	1
(Safi vd., 2014)	4-13
(Paliwal vd., 2016)	0,75-6,14
(Damergi vd., 2017)	0,094-0,417
(Patias vd., 2017)	1,977
(Aluç vd., 2018)	3,5
(Ali, El-fayoumy, Rasmy, Soliman ve Abdullah, 2021)	0,00437
(Georgiopoulou vd., 2022)	4,12
(Suchithra vd., 2022)	0,261

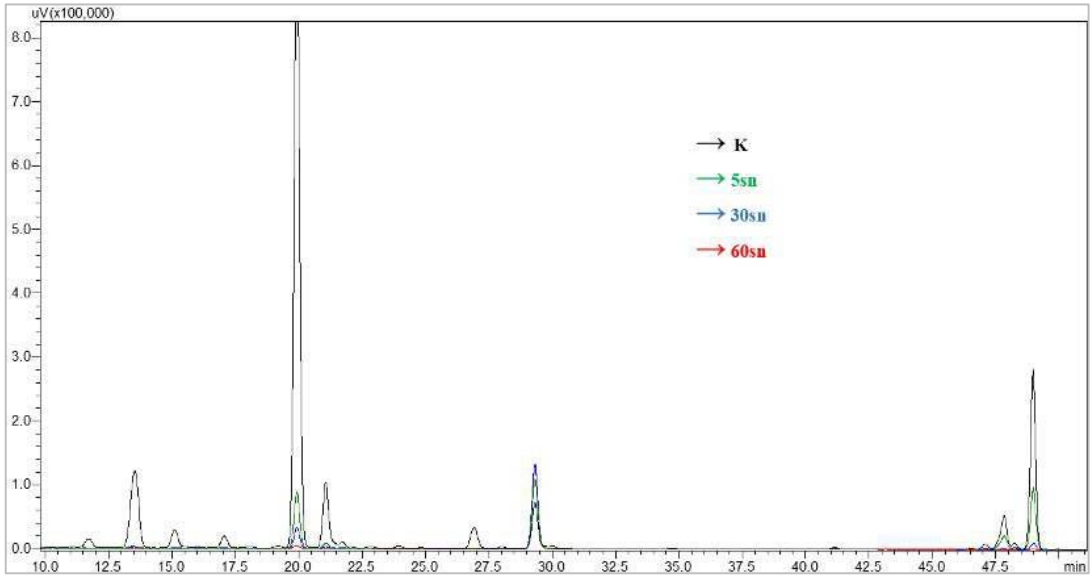
Chlorella vulgaris mikroalgi ile yapılan farklı çalışmalarda elde edilen karotenoid miktarı Çizelge 3.12'de verilmiştir. Bu tez çalışmasında ise karotenoid mitarı en fazla 20V 5sn uygulamasında 1,3544 mg/g olarak elde edilmiştir (Çizelge 3.10).

Bu sonuçlarda, 20V 5sn doğru akımın karotenoid izomer kütlesinin artışına neden olduğu görülmektedir. Karotenoidlerin 40 karbonlu izoprenoid yapısı, doğada yaygın olarak all-*trans* formunda bulunurken, yüksek oranda doymamış yapıları nedeniyle ısı, ışık, oksijen, katalizörler ve diğer faktörlere maruz kalmanın neden olabileceği oksidasyon, izomerizasyon ve bozunmaya eğilimlidir (Pesek ve Warthesen, 1988). Bu çalışmada uygulanan 20V 5sn doğru akım all-*trans* yapıda izomerizasyona neden olmuştur. Pek çok araştırmada ısı, ışık gibi abiyotik faktörlerin etkisiyle karotenoidlerin izomerizasyona uğrayarak *cis* ve/veya *trans* formuna dönüştüğü (Murakami vd., 2018; Xiao vd., 2018) ve bu izomer yapıların toplam karotenoid kompozisyonu içeriğindeki dağılımının ise türler arasında farklılık gösterdiği (Aluç vd., 2018) belirtilmiştir. Abiyotik stres koşullarının mikroalglerin kimyasal bileşimini etkilediği ve biyosentez mekanizmalarını değiştirdiği bilinmektedir (Honda vd., 2019). Bunun yanında bazı mikroalg türlerinin farklı stres koşullarında daha fazla karotenoid ürettiği belirlenmiştir. Özellikle karotenidlerden bazılarının sadece stres koşullarında sentezlendiği bildirilmiştir (Honda vd., 2019). Bu tez çalışmasındaki doğru akım uygulaması ise, izomerizasyona neden olan abiyotik stres faktörlerinden tamamen farklı bir uygulama olup, toplam karotenoid miktarının artışına neden olmasıyla hem

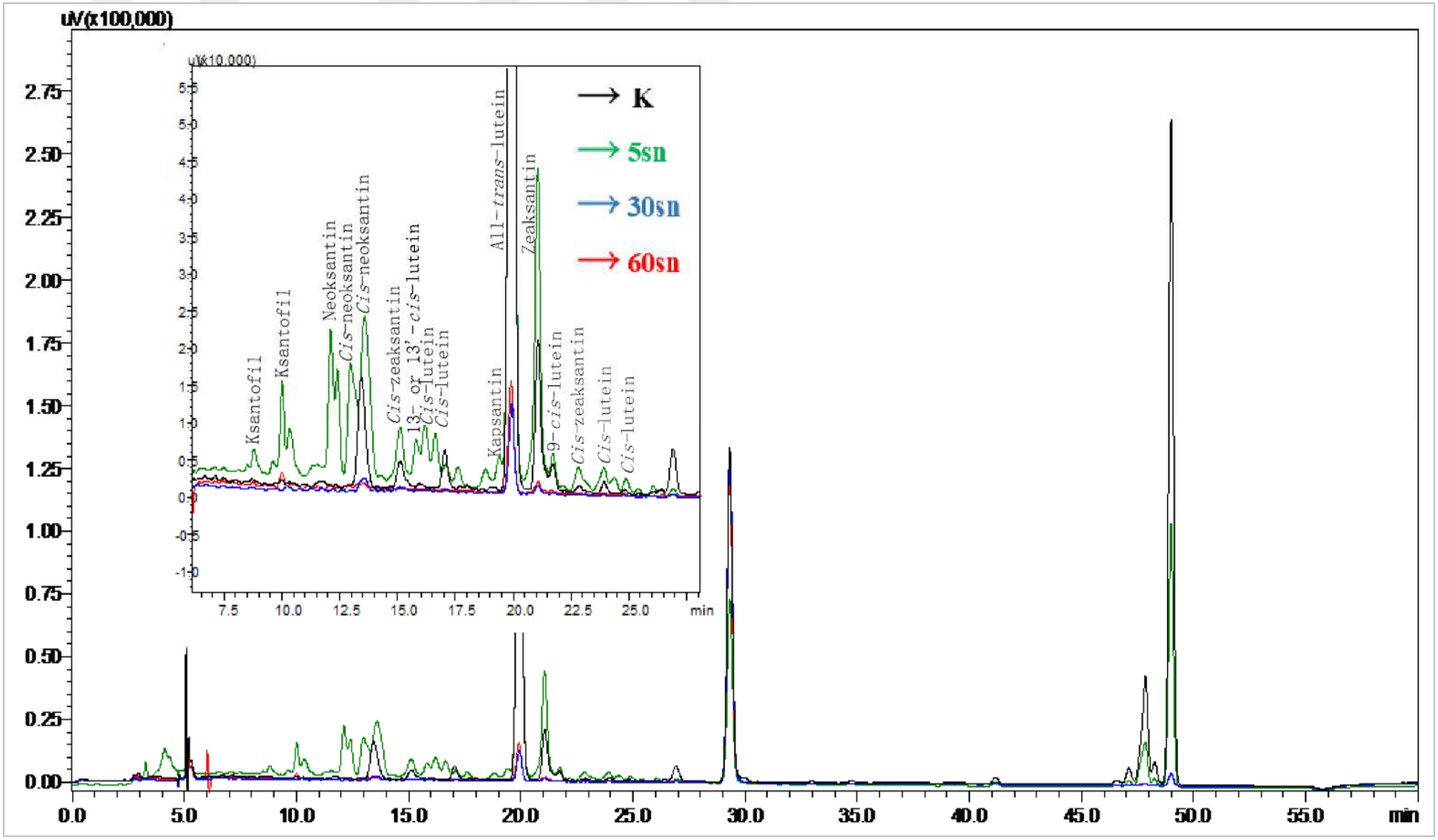
karotenoid sentezini tetiklemiş, hemde toplam all-*trans*-karotenoid ve toplam *cis*-karotenoid miktarını artırmasıyla karotenoid izomer kütlesinin artışına, dolayısıylada karotenoid izomerleşmesine neden olmuştur (Şekil 3.16). Bu sonuçlarla her şiddet ve süredeki doğru akımın izomerizasyona neden olmadığı gerçeğide ortadadır. Diğer doğru akım uygulamalarının karotenoid kütlesini azalttığı görülmektedir (Şekil 3.14 ve 3.15).



Şekil 3.14. 10 volt HPLC kromatogramı



Şekil 3.15. 30 volt HPLC kromatogramı



Şekil 3.16. 20 volt HPLC kromatogramı

Mikroalglerde karotenoid sentezi beslenme ve çevre koşullarına bağlıdır. Işık şiddeti ve türü, sıcaklık ve özellikle N ve P olmak üzere besin açlığına bağlı olarak karotenoid sentezi etkilenebilir (Garbayo vd., 2008). Mikroalglerden yüksek değerlikli metabolitlerinin senteziyle ilgili olasılıkları ortaya koymak için farklı stres koşullarına verdikleri tepkiyi bilmek ayrıca önem arz etmektedir (Skjånes vd., 2013). Bu çalışmadaki sonuçlarda, elektroteknolojik çalışmalar içerisinde yer alan doğru akımın (Geada vd., 2018; Kim vd., 2018) karotenoid sentezi ve izomerleşmesi konularında literatürde bilinen abiyotik stres faktörleri ve diğer karotenoid izomerleşme metodları içerisinde yer alacağı öngörülmekte olup, karotenoid sentezi ve izomerleşmesine konularındaki çalışmalara yeni bir bilimsel yaklaşım getireceği değerlendirilmektedir. Literatürde karotenoid izomerleşmesi konusunda; ısıl işlem, mikrodalga işlemi, ışık ışıması, elektroliz işlemi ve katalitik işlem gibi yöntemler *cis* izomerizasyon metodları olarak bildirilmiştir (Murakami vd., 2018; Honda vd., 2019; Honda vd., 2021). Bu tez çalışmasındaki sonuçlarda doğru akım (20V 5sn) uygulamasının *cis* izomerlerini artırmasıyla, izomerleşme metodları arasında yeni bir yöntem olarak yerini alması olasıdır. Sonuçların hasat zamanı örnekleri üzerinden ortaya koyulması, mikroalgal büyümenin geç durgunluk ve ölüm fazlarında hasat işleminin gerçekleştirilmesi gerçeği ve diğer büyüme fazlarındaki sonuçların nasıl olacağının bilinmesinin gerektiğide ayrıca önem arz etmekte olup, karotenoid profili ve izomerleşmesinin büyümenin diğer fazlarındada araştırılması önceliğini desteklemektedir. Bu sayede doğru akım uygulamaları hakkında, karotenoid sentezi ve izomerleşmesi konularında metodsal olarak bir sonuç elde edilebileceği değelendirilmektedir. Bu güne kadar karotenoid senteziyle ilgili sadece Kim vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada doğru akımın astaksantin miktarını artırdığı bildirilmiştir, bunun yanında karotenoid sentezi ve izomerleşmesi konularında doğru akımla ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez çalışmasında ise 3 farklı voltaj ve 3 faklı maruz bırakma süresinde uygulanan doğru akımdan sadece 20V 5sn süreyle uygulanan doğru akımın hem toplam karotenoid miktarının artmasına hem de karotenoid sentezine ve izomerleşmesine neden olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda karotenoid izomerleşmesi konusunda yapılacak çalışmalara katkı sağlayacak orjinallikte olup yeni bir uygulamanın etkisinin ortaya koyulmasıyla da önemlidir.

Yağda çözünen doğal pigmentler olarak bilinen karotenoidler; kanser ve damar sertliği gibi çeşitli hastalıkları önleme potansiyelleri ve güçlü antioksidan kapasiteleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Agarwal vd., 2001; Honda vd., 2019). Özellikle doymamış yapıları nedeniyle izomerizasyona eğilimleri, izomerlerinin birbirinden farklı olan fonksiyonları ve izomerizasyonunun karotenoidlerin fonksiyonel değişiklikleri üzerindeki etkisinin tam olarak anlaşılması için pek çok araştırma yapılmıştır (Li, Xiao, Zhang ve Liu, 2015; Murakami vd., 2018; Honda vd., 2021). Bu noktada bu tez çalışması, yeni bir uygulamanın etkisinin bildirilmesi konusunda bilimsel orjinallik taşımaktadır. Karotenoidler doğada yaygın olarak all-*trans* formunda bulunmaları ve bu yapılarının hem yüksek kristallenme derecesine hem de düşük çözünürlüğe sahip olmasıyla karakterize edilirler. Karotenoidlerin izomerizasyon ile *cis* formuna dönüşmeleri, fizikokimyasal özelliklerinde değişikliğe neden olur, izomerleşen karotenoidlerin çözünürlüğü çarpıcı biçimde iyileşir ve "kristal halden" "yağlı (amorf) duruma" dönüşürler (Honda vd., 2019). Örneğin, likopen *cis* izomerlerinin etanol içindeki çözünürlüğü, all-*trans* izomerinden 4000 kat daha fazladır. Karotenoidlerin izomerlerinin fonksiyonel işlevini anlamak için pek çok çalışmada biyolojik olarak kullanılabilirlikleri arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir (Cooperstone vd., 2015; Honda vd., 2019; Honda vd., 2021). Karotenoidlerin *cis* izomerlerinin *trans* izomerlerine kıyasla; özellikle likopen, β-karoten ve lutein için, *cis* izomerleriyle zengin diyetlerle beslenmenin, plazma ve dokulardaki hasarı iyileştirmede daha etkili olduğu bildirilmiştir (Honda vd., 2021). Karotenoid *cis* izomerlerinin, potansiyel tüm *trans* izomerinden daha yüksek antioksidan aktiviteye ve biyolojik etkilere sahip olduğu ve *cis* izomerlerince zengin gıdaların alımının, canlılar için kayda değer sağlık yararları sağlayacağı bildirilmiştir (Honda vd., 2019; Honda vd., 2021). Şu anda, piyasada bulunan market değere sahip karotenoid ürünleri, tamamen *trans* izomerleriyle formüle edilmiş ve literatürde *cis* izomerlerine hitap eden hiçbir ürün bulunmadığı bildirilmiştir (Honda vd., 2021). Yukarıda anlatılan *cis* izomerlerinin önemi ve ticari boyutu bu çalışmadaki sonuçları ayrıca değerli kılmaktadır. Bu çalışmada hem toplam karotenoid miktarının, hem de all-*trans*-karotenoid miktarının, özelliklede *cis*-karotenoid miktarının artması, *cis* izomerince zengin karotenoid ürünler üzerinde araştırma ve geliştirmenin başlatılmasını tetiklemesi ve bunların gelecekte pratik kullanımına imkan sağlaması açısından oldukça önemlidir.

Genel bir bilgi olarak karotenoidler ksantofiller ve karotenler olmak üzere iki gruba ayrılır (Rivera Vélez, 2016). Lutein ve zeaksantin gibi oksijen içerenler ksantofiller olarak isimlendirilirken, β-karoten ve likopen gibi sadece hidrokarbondan oluşan ve oksijen içermeyenler ise karotenler olarak isimlendirilirler. Bu çalışmada 20V 5sn uygulanan doğru akım toplam karotenoid miktarı içerisinde toplam ksantofil miktarını artırırken, toplam karoten miktarı azaltmaktadır (Çizelge 3.10).

Karotenlere göre daha fazla polarite gösteren ksantofiller yapılarında en az bir OH grubu içermektedir (Krinsky ve Johnson, 2005; Giuffrida vd., 2018). Ksantofillerden lutein ve zeaksantin insan maküler pigmentleridir (Bone, Landrum ve Tarsis, 1985). Makula, gözün arka tarafında detayları görmemizi sağlayan bölgedir. Çok sayıda epidemiyolojik çalışma, lutein ve zeaksantin açısından zengin gıdaların düzenli olarak tüketilmesinin yaşa bağlı makula dejenerasyonunu, kataraktları ve diğer kronik göz hastalıklarını önleyebileceğini göstermiştir (Hankinson vd., 1992; Lyle, Mares-Perlman, Klein, Klein ve Greger, 1999; Schalch vd., 2007). Bu çalışmadaki sonuçlarda toplam lutein miktarı, all-*trans* lutein miktarı ve özelliklede *cis* lutein miktarının atması kayda değer sonuç olarak değerlendirilmektedir (Çizelge 3.11). Hidroksil ve karbonil gruplarını ihtiva eden lutein bu özelliği sayesinde hayvan dokularında yüksek çözünürlüğe sahiptir. Özellikle lutein'in *cis* izomerlerinin biyolojik olarak kullanımı *trans* formlarına göre daha etkili olduğu bildirilmiştir (Honda vd., 2021). Bu tez çalışması ise *cis* izomerlerinin miktarının artmasıyla önemlidir. Etkili A vitamini öncüleri olan β-karoten ve β-kriptoksantin, serbest radikalleri temizleyebilir ve insan bağışıklık sistemini güçlendirebilir (Abnet vd., 2003; Wu vd., 2013). Krotenoidlerin biyolojik işlevleri veçekici renkleri, özellikle lutein, zeaksantin ve β-karoten için diyet takviyeleri ve katkı maddeleri olarak artan bir kullanıma yol açmıştır (Akhtar ve Bryan, 2008).

3.5.4. Biyomoleküllerde Meydana Gelen Değişiklikler

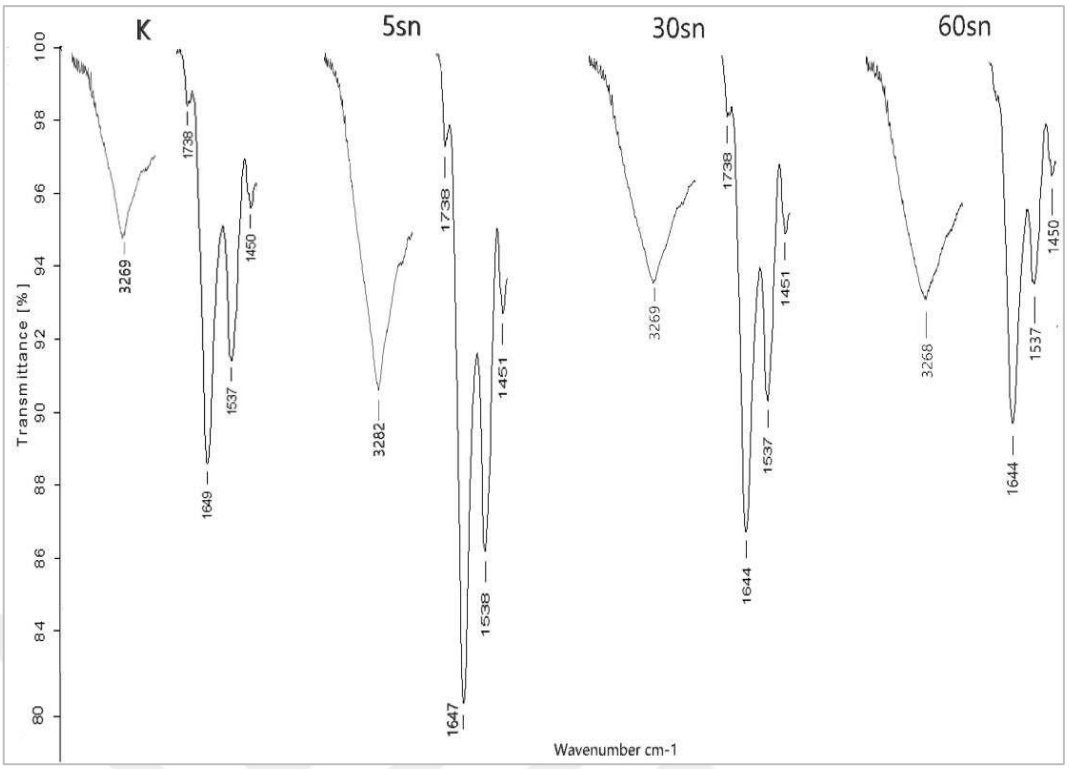
İnokülasyondan sonra 3. günden itibaren başlayarak hasat zamanına kadar geçen sürede gün aşırı kültür ortamına uygulanan doğru akım neticesinde; *Chlorella vulgaris* mikroalginin biyomoleküllerinde meydana gelen değişiklikler FT-IR analiziyle ortaya konmuştur. FT-IR, mikroalg hücrelerinin biyokimyasal bileşimini kısa sürede analiz etmeye yardımcı olan etkili bir teknik olarak bilinir (Murdock ve Wetzel, 2009). FT-IR analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki titreşim batlarına

bakılarak biyomoleküller tanımlanır ve kromatogramlardaki % geçirgenlik (transmittance) oranına göre miktarsal değişimler yorumlanır (Stuart, 2004). % Geçirgenliğin azalması biyomolekül miktarının artması, % geçirgenliğin artması ise biyomolekül miktarının azalması şeklinde ifade edilir (Stuart, 2004). Titreşim bantları esas alındığında; 1740- 1542 cm^{-1} ve 3300-3100 cm^{-1} aralığındaki titreşimin protein molekülünü, 3015-2854 cm^{-1} aralığı ve 1738 cm^{-1} civarındaki titreşimin lipit molekülünü, 1080 cm^{-1} civarındaki titreşimin karbonhidrat molekülünü ve 1240 cm^{-1} civarınındaki titreşimin ise nükleik asit molekülünü işaret ettiği bilinir (Stuart, 2004).

Bu çalışmadaki FT-IR analizi sonuçları değerlendirilmiş ve doğru akım uygulamalarının *Chlorella vulgaris* mikroalginin biyomoleküllerinde meydana getirdiği değişiklikler aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır.

1) 10V doğru akım uygulamasının protein molekülüne etkisi;

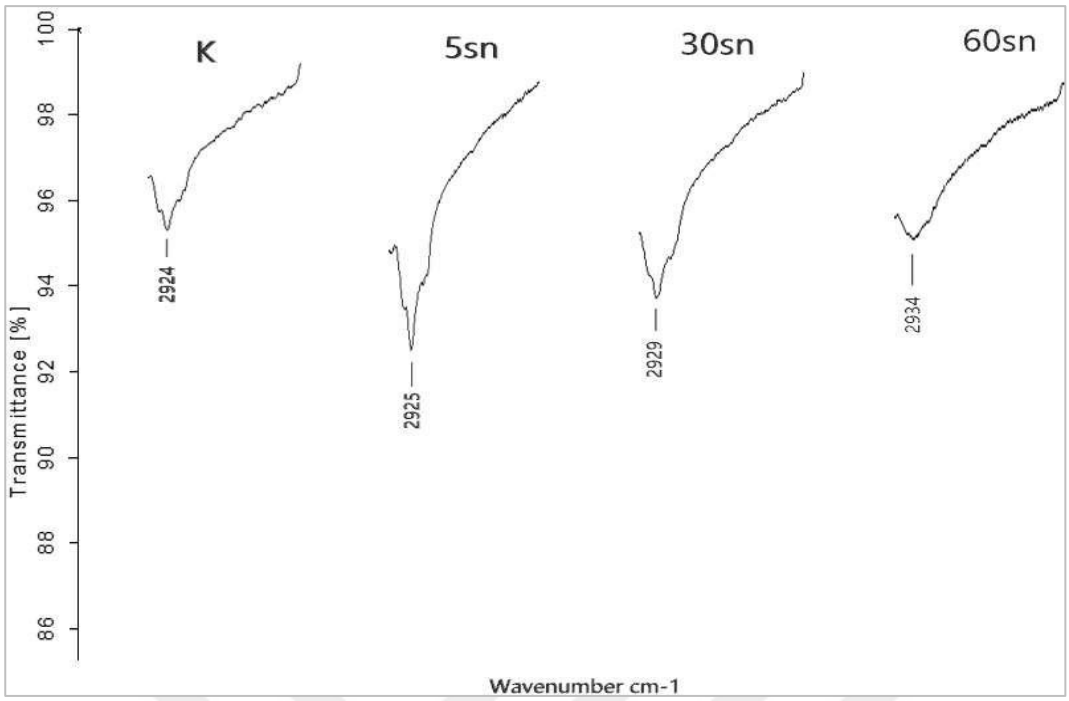
Protein molekülünü tanımlayan titreşim bantlarına bakıldığında 3300-3100 cm^{-1} aralığındaki titreşim bandına karşılık gelen protein molekülünün miktarı 10V doğru akım uygulamasının maruz bırakma sürelerinin hepsinde kontrole göre artmıştır (Şeki 3.17). 1740-1542 cm^{-1} aralığındaki titreşim bandına karşılık gelen protein molekülünün miktarı 10V 5sn ve 10V 30sn doğru akım uygulamasında kontrole göre artarken, 10V 60sn doğru akım uygulamasında ise azalmıştır. 10V şiddetindeki doğru akım uygulamasında protein molekülünün miktarının arttığı ve bu artışın en fazla 5sn maruz bırakma süresinde gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. 10V protein molekülü FT-IR kromatogramı

2) 10V doğru akım uygulamasının lipit molekülüne etkisi;

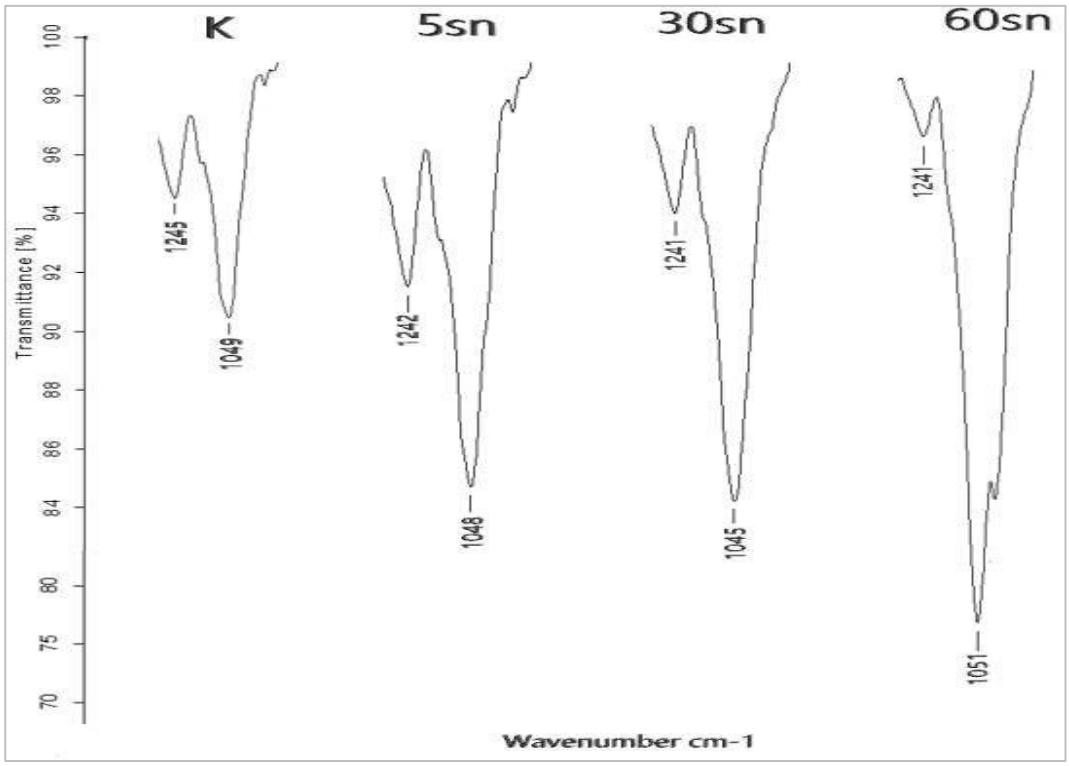
Lipit molekülünü tanımlayan titreşim bantlarına bakıldığında 3015-2854 cm^{-1} aralığında titreşim bandına karşılık gelen lipit molekülünün miktarı 10V 5sn, 10V 30sn ve 10V 60sn doğru akım uygulamalarının hepsinde kontrole göre artmıştır. Bu artışın en fazla 5sn maruz bırakma süresinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.18). 1738 cm^{-1} civarındaki titreşim bandındaki lipit molekülünün miktarı ise 10V 5sn ve 10V 30sn doğru akım uygulamasında artarken 10V 60sn doğru akım uygulamasında pik gelmemiştir (Şekil 3.17). FT-IR kromatogramında pik olmaması durumu, 10V 60sn doğru akım uygulanan kültürde 1738 cm^{-1} titreşime karşılık gelen lipit molekülünün olmadığını ifade etmektedir.



Şekil 3.18. 10V lipit molekülü FT-IR kromatogramı

3) 10V doğru akım uygulamasının karbonhidrat molekülüne etkisi;

Karbonhidrat molekülünü tanımlayan titreşim bantlarına bakıldığında 10V doğru akım uygulamalarının karbonhidrat miktarını artırdığı görülmektedir (Şekil 3.19).



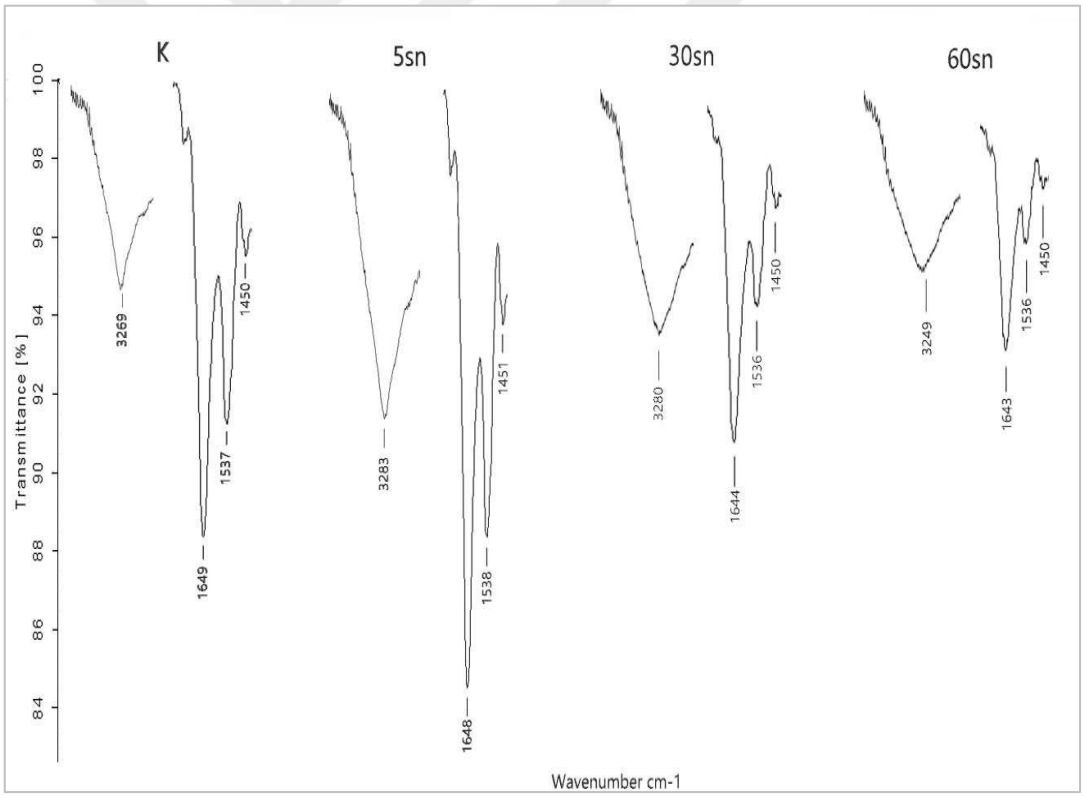
Şekil 3.19. 10V karbonhidrat molekülü FT-IR kromatogramı

4) 10V doğru akım uygulamasının nükleik asit molekülüne molekülüne etkisi;

Nükleik asit molekülünü tanımlayan titreşim bantlarına bakıldığında 10V 5sn ve 10V 30sn doğru akım uygulaması kontrol kültürüne göre nükleik asit miktarını artırırken, 10V 60sn doğru akım uygulamasının nükleik asit miktarını azalttığı görülmektedir (Şekil 3.19).

5) 20V doğru akım uygulamasının protein molekülüne etkisi;

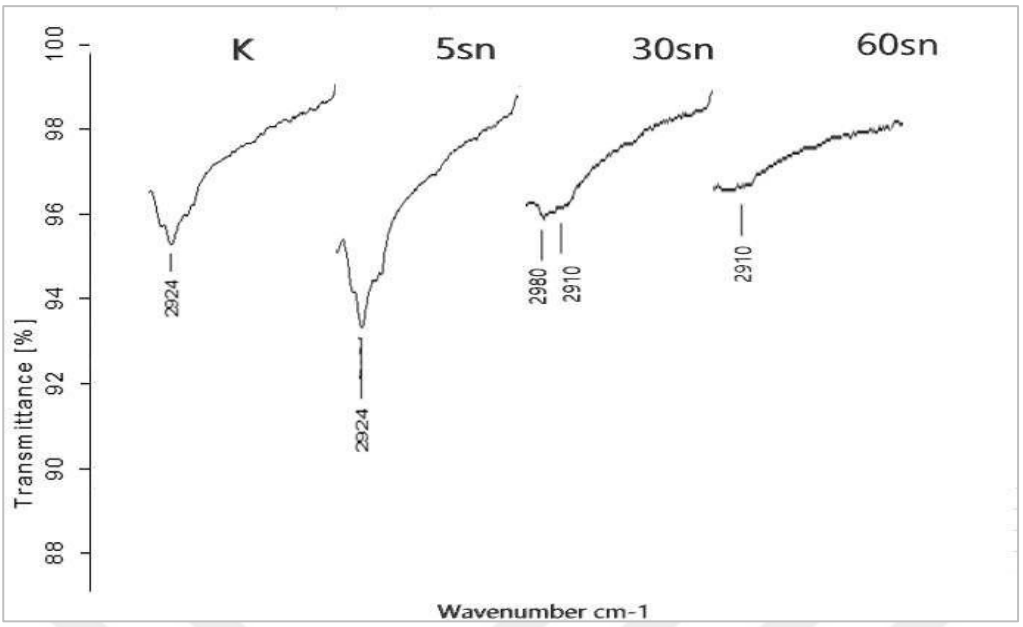
Protein molekülünü tanımlayan titreşim bantlarına bakıldığında 3300-3100 cm^{-1} aralığındaki titreşim bandına karşılık gelen protein molekülünün miktarı 20V doğru akım uygulamasının maruz bırakma sürelerinin hepsinde kontrole göre artmıştır. 1740-1542 cm^{-1} aralığındaki titreşim bandına karşılık gelen protein molekülünün miktarı 20V 5sn doğru akım uygulamasında artarken, 20V 30sn ve 20V 60sn doğru akım uygulamalarında azaldığı görülmektedir (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. 20V protein molekülü FT-IR kromatogramı

6) 20V doğru akım uygulamasının lipit molekülüne etkisi;

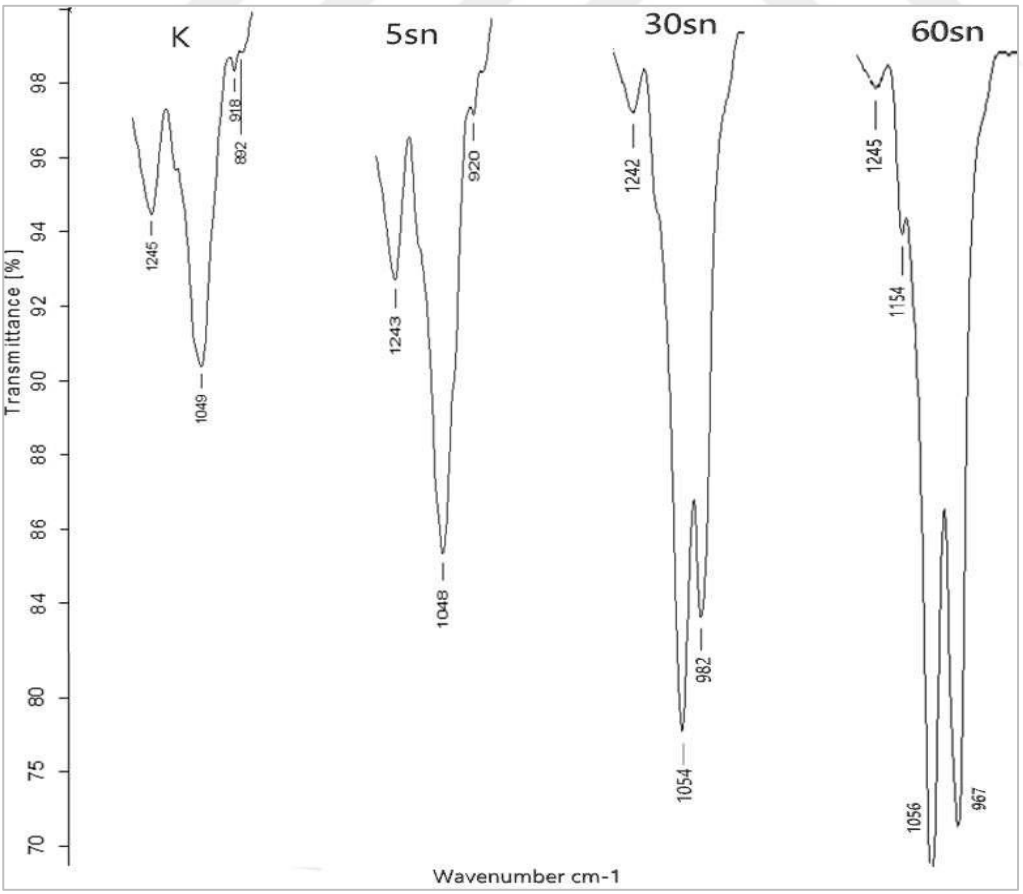
Lipit molekülünü tanımlayan titreşim bantlarına bakıldığında 20V 5sn doğru akım uygulamasının kontrole göre lipit miktarını artırdığı, 20V 30sn ve 20V 60sn doğru akım uygulamasının ise lipit miktarını azalttığı görülmektedir (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. 20V lipit molekülü FT-IR kromatogramı

7) 20V doğru akım uygulamasının karbonhidrat molekülüne etkisi;

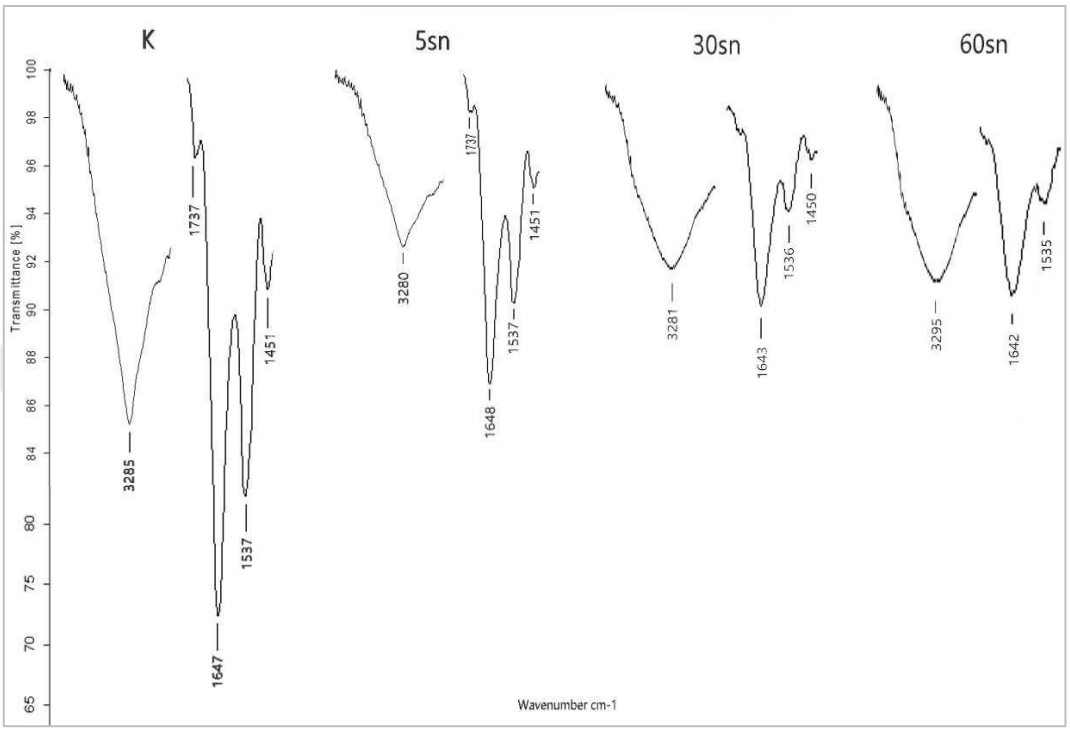
Karbonhidrat molekülünü tanımlayan titreşim bantlarına bakıldığında 20V doğru akım uygulamalarının karbonhidrat miktarını artırdığı görülmektedir (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. 20V karbonhidrat molekülü FT-IR kromatogramı

8) 30V doğru akım uygulamasının protein molekülüne etkisi;

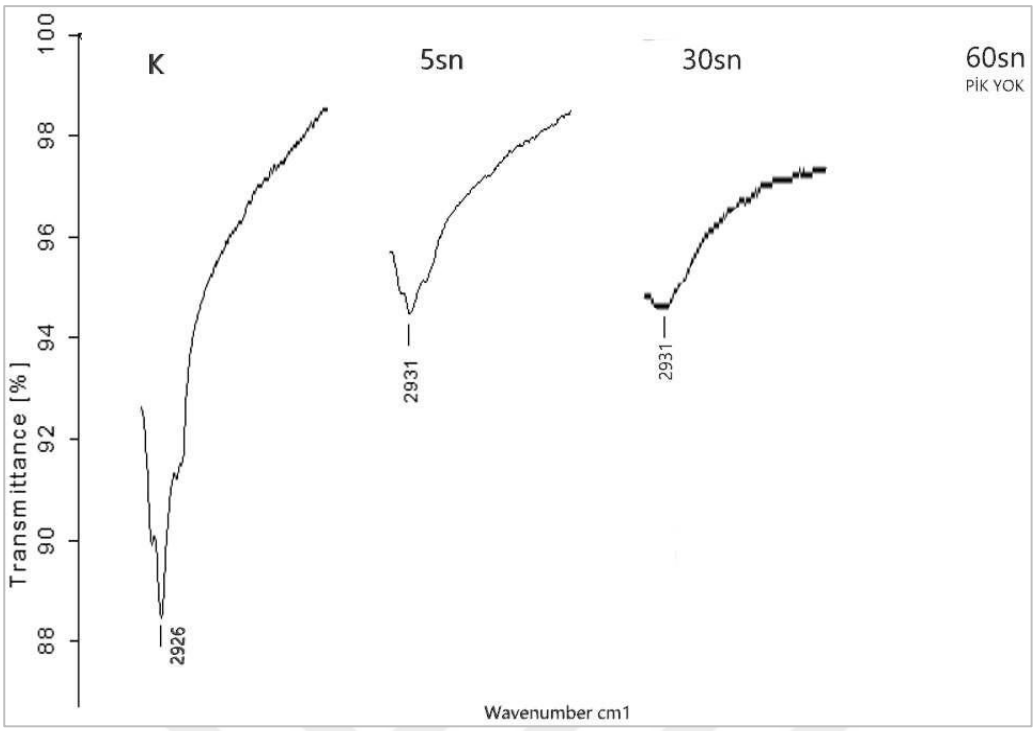
Protein molekülünü tanımlayan titreşim bantlarına bakıldığında 30V doğru akım uygulamalarının hepsinin kontrol kültürüne göre protein miktarını azalttığı görülmektedir (Şekil 3.23).



Şekil 3.23. 30V protein molekülü FT-IR kromatogramı

9) 30V doğru akım uygulamasının lipit molekülüne etkisi;

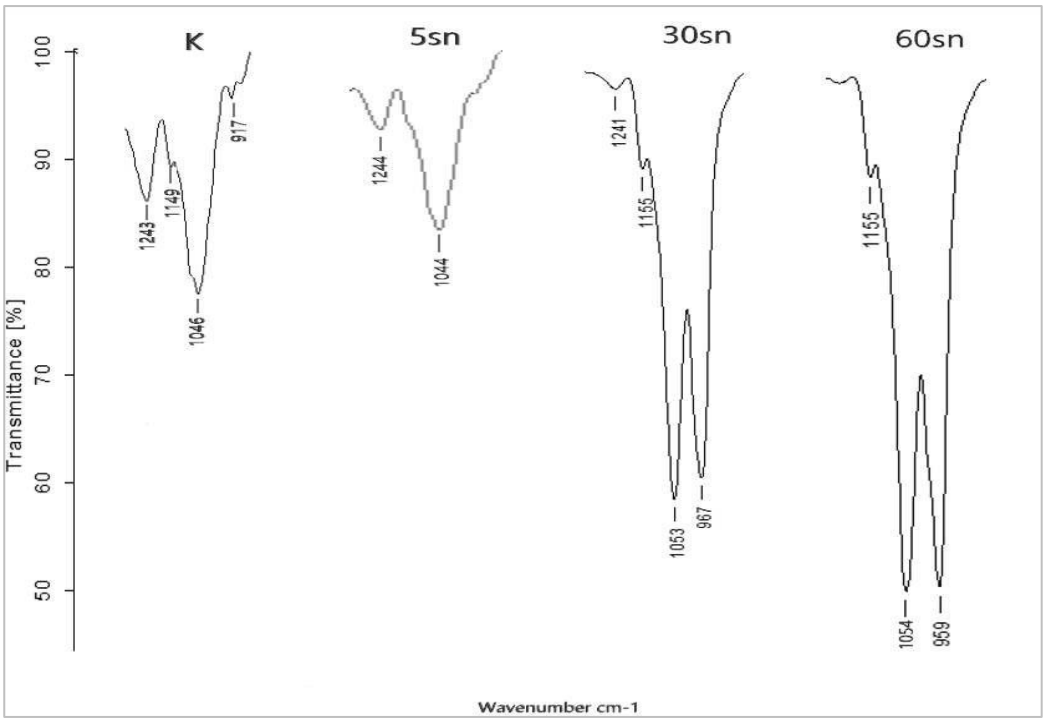
Lipit molekülünü tanımlayan titreşim bantlarına bakıldığında 30V doğru akım uygulamalarının kontrol kültürüne göre lipit miktarını azalttığı görülmektedir (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. 30V lipit molekülü FT-IR kromatogramı

10) 30V doğru akım uygulamasının karbonhidrat molekülüne etkisi;

Karbonhidrat molekülünü tanımlayan titreşim bantlarına bakıldığında 30V doğru akım uygulamaları 5sn maruz bırakma süresi hariç karbonhidrat miktarını artırdığı görülmektedir (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. 30V karbonhidrat molekülü FT-IR kromatogramı

Bu tez çalışmasıda ilk defa hasat zamanı *Chlorella vulgaris* mikroalginin biyomolekülleri üzerine doru akım uygulamalarının etkisinin nasıl gerçekleştiği ortaya konmuştur. Günümüzde, modern yaşam tarzı nedeniyle insanlar obezite, kalp hastalıkları, şeker hastaları gibi sağlık problemleriyle karşılaşmaktadır. Ayrıca dünya genelinde yaşanan gıda temini sorunu ve gelecekte bu durumlarla ilgili karşılaşılacak problemler insan sağlığını tehdit etmektedir. Sağlıklı bir yaşam için, proteinler, vitaminler, mineraller gibi tüm besin maddelerini içeren iyi bir diyet gerektiği bilinmektedir. Bu kapsamda, mikroalgler doğal bir besin kaynağı olarak, bilimsel araştırmaları halen devam ettiği değerli besin maddesi içeriğine sahip canlılardır (Sathasivam vd., 2019). Mikroalglerden bazılarında proteinler, lipitler ve karbonhidratlar gibi besleyici değerli bileşenlerin bol olduğu bilinmektedir (Becker, 2004; Sathasivam vd., 2019). Örneğin *Chlorella vulgaris* mikroalginin toplam protein içeriğinin biyokütle kuru ağırlığının %42-58'ini oluşturduğu bildirilmiş (Becker, 1994; Morris vd., 2008; Safi vd., 2013) ve büyüme koşullarına göre bu oran değişebileceği rapor edilmiştir (Safi vd., 2014). Bu çalışmadaki doğru akım uygulamalarından 10V 5sn ve 30sn ile 20V 5sn uygulaması protein içeriğinin artırdığı, 30V uygulamalarının ise azalttığı görülmektedir (Şekil 3.17, 3.20 ve 3.23) *Chlorella vulgaris* mikroalgi protein içeriğinin yüksek olması ile besin takviyesi (Fradique vd., 2010) olarak tüketilmekte ve insanlar için sağlıklı besin kaynağı olarak bilinmektedir. Ayrıca, akuakültürler için besin değeri yüksek yem olarak kullanılmaktadır (Yamaguchi, 1996).

Önemli biyomoleküllerden biyoyakıt hammadesi olan lipit molekülünün (Parra-Saldivar vd., 2014) eldesi ve miktarının artırılması için çalışmalar hız kesmeden devam etmektedir (Leong vd., 2022; Sheng vd., 2022). Örneğin mikroalgal biyokütleden elde edilen ve biyoyakıtlardan bir tanesi olan biyodizel (Parra-Saldivar vd., 2014; Derakhshandeh, Atici, Tezcan Un ve Valorization, 2021), çevre dostu ve sürdürülebilir bir enerji kaynağı olarak bilinmektedir. Bu çalışmadaki elektrik uygulamaları içersinde 10V uygulamalarıyla 20V 5sn uygulaması lipit miktarını artırmıştır. 30V uygulaması ise azaltmıştır.

Mikroalglerdeki karbonhidrat molekülü ile ilgili yapılan son çalışmalarda, kültür ortamdaki N (azot) ve P (fosfat) miktarının tükenmesi durumunun, mikroalglerde enerji depolama olarak karbonhidrat birikimini uyardığı vurgulamaktadır (Solís-Salinas vd., 2021; Chu vd., 2022). Bu durumun bu tez çalışmasındaki sonuçlarda da

benzer bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 3.19, 3.22 ve 3.25). Büyüme periyodu boyunca doğru akım uygulamalarının düşük voltajdan yüksek voltaja tedrici olarak biyokütleyi artırması durumu; doğru akımın etkisiyle besiyeri ortamında başlangıç miktarı belirli olan N ve P gibi besin tuzlarının mikroalg hücreleri tarafından alınarak, büyümenin hızlanması ve biyokütlenin artması ve de hasat zamanına kadar geçen sürede ortamda besin tuzu miktarının azalması ve tükenmesi durumuna bağlı olarak karbonhidrat birikiminin uyarılması olasılığını desteklemektedir.

4. DEĞERLENDİRME

- Doğru akım uygulamalarının biyokütleyi artırdığı belirlenmiştir. Biyokütledeki bu artışın, doğru akımdaki hem şiddet hem de maruz bırakma süresindeki artışlara paralel bir şekilde tedrici olarak gerçekleştiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, ilk olarak çalışmada kullanılan elektrik uygulamasının, hücrenin fiziki yapısında (elektroporlaşma) değişikliklere sebep olduğunu, buna bağlı olarak çevresiyle olan (özellikle, besin ve ışık) etkileşimlerinin de değişmesi suretiyle farklı büyüme deseni ortaya koyduğunu göstermiştir. Önceki çalışmalarda, elektrik akımının, biyokütle hasadı yapıldıktan sonra hücreleri parçalama maksadıyla (ekstraksiyon-hücre içinin boşaltılması) başvurulan ve 30kV-300kV gibi çok yüksek voltajlı ve kısa süreli (saniye) yöntemler olarak uygulanmasının aksine, bu tez çalışmasında, son derece düşük şiddetteki (fakat nispeten uzun süreli) elektriğin, hücreleri öldürmeksizin bazı değişlikliklere yol açması sağlanmış ve oluşan bu değişikliklerin de büyüme ve ürün eldesi maksimizasyonunda kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu yöntemin daha önce kullanılmamış olması ve çalışmadaki büyümeye ilişkin hipotezin doğrulanması yeni bir sonuç olarak kabul edilebilir.
- Doğru akımın süresi ve şiddeti artıkça kültivasyon süresinin kısaldığı ve 30V 60sn uygulama yapılan kültürlerin diğer uygulamalara göre daha erken ölüm fazına girdiği belirlenmiştir. Bu durum, hücrelerde oluşan fiziki değişiklikler neticesinde, çevreleriyle olan besin alış verişinin daha hızlandığını ve populasyonun erken logaritmik ve ardından durgunluk ve ölüm evresine geçtikleri söylenebilir. Ancak, yeni bir deney kurgusu yapılarak, hücrelerin besi ortamındaki nutrient alış verişindeki farklılıklarını ölçme ve bunun üzerinden açıklığa kavuşturma ihtiyacı bulunmaktadır.
- Doğru akım uygulamalarından; 20V 5sn süreyle uygulanan doğru akımın toplam karotenoid miktarını artırdığı, karotenoid yapısında izomerleşmeye neden olduğu, hem all-*trans* hem de *cis* izomer kütlesini artırdığı belirlenmiştir. Diğer doğru

akım uygulamalarının ise karotenoid miktarını azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada, çapraz kombinasyonlarda yapılan elektrik uygulamalarının arasında, büyüme ve karotenoid miktarı artması açısından optimum olarak 20V 5sn'nin bulunması, ilerde yapılacak optimizasyon çalışmalarında öncü nitelikteki bir bulgu olarak değerlendirilmektedir.

- Doğru akım uygulamalarının hepsi karbonhidrat miktarını, 10V uygulamalarıyla 20V 5sn uygulaması lipit miktarını, 10V 5sn ve 10V 30sn ile 20V 5sn uygulamasının ise protein miktarını artırdığı belirlenmiştir. Makromoleküller ile karotenoidler arasında metabolik ilişkiler, hasat örneği (son biyomas) üzerinden değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ancak bu ilişkilerin büyüme esnasında belirli evreleri de temsil edecek ve ortamdaki nutrientlerle bağlantısını ortaya koyacak şekilde genişletilmesinin daha güvenilir sonuçlar ortaya koyabileceği kanaati ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

Abnet, C. C., Qiao, Y.-L., Dawsey, S. M., Buckman, D. W., Yang, C. S., Blot, W. J., Dong, Z.-W., Taylor, P. R., & Mark, S. D. (2003). Prospective study of serum retinol, β-carotene, β-cryptoxanthin, and lutein/zeaxanthin and esophageal and gastric cancers in China. *Cancer Causes Control,* 14(7), 645-655.

Acien, F. G., Gomez-Serrano, C., Morales-Amaral, M. M., Fernandez-Sevilla, J. M., & Molina-Grima, E. (2016). Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? *Appl Microbiol Biotechnol,* 100:9013–22.

Agarwal, A., Shen, H., Agarwal, S., & Rao, A. (2001). Lycopene content of tomato products: its stability, bioavailability and in vivo antioxidant properties. *Journal of medicinal food,* 4(1), 9-15.

Ahmad, S., Kothari, R., Singh, H. M., Tyagi, V. V., Singh, B., & Sari, A. (2021). Experimental investigation of microalgal harvesting with lowcost bottom ash: Influence of temperature and pH with zeta potential and thermodynamic function. *Environmental Technology & Innovation*, 22, 101376.

Ahn, S. H. S., & Glibert, P. M. (2022). Shining Light on Photosynthesis in the Harmful Dinoflagellate Karenia mikimotoi–Responses to Short-Term Changes in Temperature, Nitrogen Form and Availability. *Phycology,* 2(1), 30-44.

Akhtar, M. H., & Bryan, M. (2008). Extraction and quantification of major carotenoidsin processed foods and supplements by liquid chromatography. *Food Chemistry,* 111(1), 255-261.

Ali, H. E. A., El-fayoumy, E. A., Rasmy, W. E., Soliman, R. M., & Abdullah, M. A. (2021). Two-stage cultivation of *Chlorella vulgaris* using light and salt stress conditions for simultaneous production of lipid, carotenoids, and antioxidants. *Journal of Applied Phycology,* 33(1), 227-239.

Aluç, Y., Başaran Kankılıç, G., & Tüzün, İ. (2018). Determination of carotenoids in two algae species from the saline water of Kapulukaya reservoir by HPLC. *Journal ofLiquid Chromatography and Related Technologies,* 41(2), 93-100.

Ambati, R. R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R. G., Ravi, S., Bikkina, P. N., Bo, L., & Yuepeng, S. (2019). Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical reviews in food science nutrition,* 59(12), 1880-1902.

Anonymous[a]. http://www.corbion.com/biochemicals/personal-care/brands/algapur (accessed March 18, 2020).

Anonymous[b]. (2012). Directorate-General for Research and Innovation (European Commission) A bioeconomy for Europe Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe. Isbn 978-92-79-25376-8. Doi 10.2777/6462, pp.64.

Anonymous[c]. (2018). Biomass production, supply, uses and flows in the European Union: First results from an integrated assessment. (Eds.): European Commissions, JRC Science for Policy Report. Publications Office of the European Union. 978-92-79-77237-5 (pdf). DOI: 10.2760/181536 (print).

Anonymous[d]. (2017). Position paper on Bioeconomy Strategy and Action Plan Review and Revision. Link: https://ec.europa.eu/docsroom/documents/25042. Pp. 13. Document date: 14/08/2017-Created by GROW.DDG1.D.1-Publication date: 21/08/2017.

Atici, T., Katircioglu, H., & Akin, B. (2008). Sensitivity of freshwater microalgal strains (*Chlorella vulgaris* Beijerinck and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kutzing) to heavy metals. *Fresenius Environmental Bulletin*, 268-274.

Barros, A., Pereira, H., Campos, J., Marques, A., Varela, J., & Silva, J. (2019). Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae. *Sci Rep*, 9:1–7.

Becker, E. W. (1994). Microalgae: *biotechnology and microbiology* (Vol. 10): Cambridge University Press.

Becker, W. (2004). 18 microalgae in human and animal nutrition. In handbook of microalgal culture*: biotechnology and applied phycology* (Vol. 312): Wiley Online Library.

Beckmann, J., Lehr, F., Finazzi, G., Hankamer, B., Posten, C., Wobbe, L., & Kruse, O. (2009). Improvement of light to biomass conversion by de-regulation of light- harvesting protein translation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of biotechnology*, 142(1), 70-77.

Ben-Amotz, A. (1993). Production of β-carotene and vitamins by the halotolerant alga *Dunaliella*. *In Pharmaceutical and bioactive natural products* (pp. 411-417): Springer.

Berman, G. P., Nesterov, A. I., López, G. V., & Sayre, R. T. (2015). Superradiance transition and nonphotochemical quenching in photosynthetic complexes. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(39), 22289-22296.

Bhalamurugan, G. L., Valerie, O., & Mark, L. (2018). Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: a review. *Environ Eng Res* 23:229–41.

Blanken, W., Postma, P. R., de Winter, L., Wijffels, R. H., & Janssen, M. (2016). Predicting microalgae growth. *Algal research*, 14, 28-38.

Bone, R. A., Landrum, J. T., & Tarsis, S. L. (1985). Preliminary identification of the human macular pigment. *Vision research*, 25(11), 1531-1535.

Borowitzka, M. (1992). Comparing carotenogenesis in *Dunaliella* and *Haematococcus*: implications for commercial production strategies. *Profiles on Biotechnology*, 301-310.

Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743-756.

Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558.

Buchmann, L., Frey, W., Gusbeth, C., Ravaynia, P. S., & Mathys, A. (2019). Effect of nanosecond pulsed electric field treatment on cell proliferation of microalgae. *Bioresource technology*, 271, 402-408.

Bule, M. H., Ahmed, I., Maqbool, F., Bilal, M., & Iqbal, H. M. (2018). Microalgae as a source of high-value bioactive compounds. *Front. Biosci*, 10, 197-216.

Carullo, D., Abera, B. D., Casazza, A. A., Donsì, F., Perego, P., Ferrari, G., & Pataro, G. (2018). Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenization on the aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Algal research*, 31, 60-69.

Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress*, 22(6), 1490-1506.

Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., Szaub, J., Scibilia, L., Ballottari, M., Purton, S., & Bassi, R.(2014). Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. *Biotechnology for Biofuels Biochemical Journal*, 7(1), 1-13.

Chang, H., Hu, R., Zou, Y., Quan, X., Zhong, N., Zhao, S., & Sun, Y. (2020). Highly efficient reverse osmosis concentrate remediation by microalgae for biolipid production assisted with electrooxidation. *Water research*, 174, 115642.

Chaudhary, A., Gustafson, D., & Mathys, A. (2018). Multi-indicator sustainability assessment of global food systems. *Nature communications Bioresource technology*, 9(1), 1-13.

Chen, B., Chuang, J., Lin, J., & Chiu, C. (1993). Quantification of provitamin A compounds in Chinese vegetables by high-performance liquid chromatography. *Journal of food protection*, 56(1), 51-54.

Chen, B., Wan, C., Mehmood, M. A., Chang, J.-S., Bai, F., & Zhao, X. (2017). Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products–a review. *Bioresource technology*, 244, 1198-1206.

Chen, B., Yang, S., & Han, L. (1991). Characterization of major carotenoids in water convolvulus (Ipomoea aquatica) by open-column, thin-layer and high-

performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 543, 147-155.

Chu, R., Hu, D., Zhu, L., Li, S., Yin, Z., & Yu, Y. (2022). Recycling spent water from microalgae harvesting by fungal pellets to re-cultivate *Chlorella vulgaris* under different nutrient loads for biodiesel production. *Bioresource technology*, 344, 126227.

Cooperstone, J. L., Ralston, R. A., Riedl, K. M., Haufe, T. C., Schweiggert, R. M., King, S. A., Timmers, C.D., Francis, D. M., Lesinski, G.B., Clinton, S. K., & Schwartz, S. J. (2015). Enhanced bioavailability of lycopene when consumed as *cis*-isomers from tangerine compared to red tomato juice, a randomized, cross-over clinical trial. *Molecular nutrition food Research International*, 59(4), 658-669.

Coustets, M., Joubert-Durigneux, V., Hérault, J., Schoefs, B., Blanckaert, V., Garnier, J.-P., & Teissié, J. (2015). Optimization of protein electroextraction from microalgae by a flow process. *Bioelectrochemistry*, 103, 74-81.

Cubas, C., Lobo, M. G., & González, M. (2008). Optimization of the extraction of chlorophylls in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by N, N-dimethylformamide using response surface methodology. *Journal of Food Composition Analysis*, 21(2), 125-133.

Cysewski, G., & Lorenz, R. T. (2004). Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-species of high potential. *Handbook of microalgal culture: biotechnology applied phycology*, 281.

Czerpak, R., Piotrowska, A., Dobrzyń, P., Tatur, A., & Marczuk, M. (2003). The effect of biochanin A on the chlorophylls and carotenoids content in the alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Acta physiologiae plantarum*, 25(3), 271-278.

Damergi, E., Schwitzguébel, J.-P., Refardt, D., Sharma, S., Holliger, C., & Ludwig, C. (2017). Extraction of carotenoids from *Chlorella vulgaris* using green solvents and syngas production from residual biomass. *Algal research*, 25, 488-495.

Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi Roshandeh, J., Nouri, H., & Golzary, A. (2017). Investigation of optimal condition for Chlorella vulgaris microalgae growth. *Global J. Environ. Sci. Manage.*, 3(2): 217-230,

Darvehei, P., Bahri, P. A., & Moheimani, N. R. (2018). Model development for the growth of microalgae: A review. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 97, 233-258.

de Lima Barizão, A. C., de Oliveira, J. P., Gonçalves, R. F., & Cassini, S. T. (2021). Nanomagnetic approach applied to microalgae biomass harvesting: advances, gaps, and perspectives. *Environmental Science Pollution Research*, 28(33), 44795-44811.

Del Campo, J. A., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology biotechnology,* 74(6), 1163-1174.

Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M. A., Rivas, J., & Guerrero, M. G. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in Muriellopsis sp.(Chlorophyta). *Journal of biotechnology,* 76(1), 51-59.

Derakhshandeh, M., Atici, T., & Tezcan Un, U. (2021). Evaluation of wild-type microalgae species biomass as carbon dioxide sink and renewable energy resource. *Waste and Biomass Valorization,* 12(1), 105-121.

Difusa, A., Talukdar, J., Kalita, M. C., Mohanty, K., & Goud, V. V. (2015). Effect of light intensity and pH condition on the growth, biomass and lipid content of microalgae *Scenedesmus* species. *Biofuels,* 6(1-2), 37-44.

Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., Slegers, P. M., Brentner, L. B., Roy, A., Barbosa, M. J., et al. (2013). Food commodities from microalgae. *Curr Opin Biotechnol,* 24:169–77

Engström, N. (2012). Cultivation of seven different species of marine microalgae using simulated flue gas mimicking effluents from paper mills as carbon source. Master of Science Thesis, Chalmers University of Technology.

Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M., & Sijtsma, L. (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe.

Eppink, M. H. M., Olivieri, G., Reith, H., van den Berg, C., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2019). From current algae products to future biorefinery practices: a review. *Adv Biochem Eng Biotechnol*,166:99–123.

Eriksen, N. T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology letters,* 30(9), 1525-1536.

Fachet, M. (2017). Systematic analysis of carotenogenesis in microalgae for model-based process design. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg,

Falkowski, P. G. (1980). Light-shade adaptation in marine phytoplankton. *In Primary productivity in the sea* (pp. 99-119): Springer.

Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., & Taylor, F. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science,* 305(5682), 354-360.

Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (1997). Aquatic photosynthesis. *Oxford: Blackwell Science.*

Fan, J., Chen, Y., Zhang, T. C., Ji, B., & Cao, L. (2020). Performance of *Chlorella sorokiniana*-activated sludge consortium treating wastewater under light-limited heterotrophic condition. *Chemical Engineering Journal,* 382, 122799.

Ferreira, V., Pinto, R., & Sant'Anna, C. (2016). Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of applied microbiology*, 120(3), 661-670.

Fernandez-Sevilla, J. M., Acien Fernandez, F. G., Molina Grima, E. (2010). Biotechnological production of lutein and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86:27–40.

Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2010). Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal of the Science ofFood Agriculture*, 90(10), 1656-1664.

Friedland, N., Negi, S., Vinogradova-Shah, T., Wu, G., Ma, L., Flynn, S., Kumssa, T., Lee, C.-H., & Sayre, R. T. (2019). Fine-tuning the photosynthetic light harvesting apparatus for improved photosynthetic efficiency and biomass yield. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.

Garbayo, I., Cuaresma, M., Vílchez, C., & Vega, J. M. (2008). Effect of abiotic stress onthe production of lutein and β-carotene by *Chlamydomonas acidophila*. *Process biochemistry*, 43(10), 1158-1161.

García-Cañedo, J. C., Cristiani-Urbina, E., Flores-Ortiz, C. M., Ponce-Noyola, T., Esparza-García, F., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2016). Batch and fed-batch culture of *Scenedesmus* incrassatulus: effect over biomass, carotenoid profile and concentration, photosynthetic efficiency and non-photochemical quenching. *Algal research*, 13, 41-52.

García-González, M., Moreno, J., Manzano, J. C., Florencio, F. J., & Guerrero, M. G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-β-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of biotechnology*, 115(1), 81- 90.

Geada, P., Rodrigues, R., Loureiro, L., Pereira, R., Fernandes, B., Teixeira, J. A., Vasconcelosb, V., & Vicente, A. A. (2018). Electrotechnologies applied to microalgal biotechnology– Applications, techniques and future trends. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 94, 656-668.

Georgiopoulou, I., Tzima, S., Pappa, G. D., Louli, V., Voutsas, E., & Magoulas, K. (2022). Experimental Design and Optimization of Recovering Bioactive Compounds from *Chlorella vulgaris* through Conventional Extraction. *Molecules*, 27(1), 29.

Ghernaout, D. (2019). Electrocoagulation and electrooxidation for disinfecting water: New breakthroughs and implied mechanisms. *Applied Engineering*, 3(2), 125-133.

Giuffrida, D., Donato, P., Dugo, P., & Mondello, L. (2018). Recent analytical techniques advances in the carotenoids and their derivatives determination in various matrixes. *Journal of agricultural food chemistry*, 66(13), 3302-3307.

Goh, B. H. H., Ong, H. C., Cheah, M. Y., Chen, W.-H., Yu, K. L., & Mahlia, T. M. I. (2019). Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. *Renewable Sustainable Energy Reviews,* 107, 59-74.

Goodwin, T. (1954). Some observations on carotenoid synthesis by the alga *Chlorella vulgaris*. *Experientia,* 10(5), 213-214.

Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of industrial microbiology biotechnology bioengineering,* 36(2), 269-274.

Gouveia, L., Batista, A. P., Sousa, I., Raymundo, A., & Bandarra, N. M. (2009). Microalgae in novel food products. *Nova Science Publishers*, Inc.

Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of microbiological methods,* 85(2), 119-123.

Grobbelaar, J. U. (2000). Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology,* 12(3), 201-206.

Grung, M., D'Souza, F. M., Borowitzka, M., & Liaaen-Jensen, S. (1992). Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3 S, 3′ S)-astaxanthin esters. *Journal of Applied Phycology,* 4(2), 165-171.

Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs,* 9(4), 625-644.

Guo, B., Yang, B., Silve, A., Akaberi, S., Scherer, D., Papachristou, I., Freyb, W., Hornunga, U., & Dahmen, N. (2019). Hydrothermal liquefaction of residual microalgae biomass after pulsed electric field-assisted valuables extraction. *Algal research,* 43, 101650.

Gupta, P. L., Lee, S.-M., & Choi, H.-J. (2015). A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World Journal of Microbiology Biotechnology bioengineering,* 31(9), 1409-1417.

Gusbeth, C. A., Eing, C., Göttel, M., & Frey, W. (2013). Boost of algae growth by ultra short pulsed electric field treatment. Paper presented at the 2013 Abstracts IEEE international conference on plasma science (ICOPS).

Halliwell, B. (1996). Cellular stress and protection mechanisms. *Biochem Soc Trans,* 24,1023-1027.

Hamann, C. H., Hamnett, A., & Vielstich, W. (2007). Electrocatalysis and reaction mechanisms. *Electrochemistry*: John Wiley & Sons.

Hankinson, S. E., Stampfer, M. J., Seddon, J. M., Colditz, G. A., Rosner, B., Speizer, F. E., & Willett, W. C. (1992). Nutrient intake and cataract extraction in women: a prospective study. *British Medical Journal,* 305(6849), 335-339.

Harris, E. H. (2009). The *Chlamydomonas* Sourcebook*:* Introduction to *Chlamydomonas* and Its Laboratory Use: Volume 1 (Vol. 1): Academic press.

Heinrich, U., Gärtner, C., Wiebusch, M., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H., & Stahl, W. (2003). Supplementation with β-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *The Journal of nutrition,* 133(1), 98-101.

Hejazi, M. A., & Wijffels, R. H. (2004). Milking of microalgae. *Trends in biotechnology,* 22(4), 189-194.

Henley, W. J., Major, K. M., & Hironaka, J. L. (2002). Response to salinity and heat stress in two halotolerant chlorophyte algae1. *Journal of phycology,* 38(4), 757-766.

Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical reviews in food science nutrition,* 46(2), 185-196.

Hoek, C., Mann, D., Jahns, H. M., & Jahns, M. (1995). Algae: an introduction to phycology: Cambridge university press.

Honda, M., Kageyama, H., Hibino, T., Zhang, Y., Diono, W., Kanda, H., Yamaguchi, R., Takemura, R., Fukoya, T., & Goto, M. (2019). Improved carotenoid processing with sustainable solvents utilizing Z- isomerization-induced alteration in physicochemical properties: A review and future directions. *Molecules,* 24(11), 2149.

Honda, M., Takasu, S., Nakagawa, K., & Tsuda, T. (2021). Differences in bioavailability and tissue accumulation efficiency of (all-E)-and (Z)-carotenoids: A comparative study. *Food Chemistry,* 361, 130119.

Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., & Danquah, M. K. (2010). Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International journal of chemical engineering*.

Humphrey, A. (2004). Chlorophyll as a color and functional ingredient. *Journal of food science,* 69(5), C422-C425.

Hussein, G., Nakamura, M., Zhao, Q., Iguchi, T., Goto, H., Sankawa, U., et al. (2005). Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biol Pharm Bull,* 28:47–52.

Hupp, J., McCoy, J. I., Millgan, A. J., & Peers, G. (2021). Simultaneously measuring carbon uptake capacity and chlorophyll a fluorescence dynamics in algae. *Algal research,* 58, 102399.

Inbaraj, B. S., Chien, J., & Chen, B. (2006). Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Chromatography A,* 1102(1-2), 193-199.

Ip, P.-F., & Chen, F. (2005). Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Process biochemistry,* 40(11), 3491-3496.

Jahns, P., Latowski, D., & Strzalka, K. (2009). Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimicaet Biophysica Acta -Bioenergetics,* 1787(1), 3-14.

Jeffrey, S. T., & Humphrey, G. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und physiologie der pflanzen,* 167(2), 191-194.

Ji, C., Zhou, H., Deng, S.-K., Chen, K.-Y., Dong, X.-Y., Xu, X.-H., & Cheng, L.-H. (2021). Insight into the adhesion propensities of extracellular polymeric substances (EPS) on the abiotic surface using XDLVO theory. *Journal of Environmental Chemical Engineering,* 106563.

Jin, E.-S., Polle, J. E., Lee, H.-K., Hyun, S.-M., & Chang, M. (2003). Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *Journal of microbiology biotechnology bioengineering,* 13(2), 165- 174.

Kaczor, A., & Baranska, M. (2016). Carotenoids: Nutrition, analysis and technology: John Wiley & Sons.

Khosravi Zadeh, N. (2021). Experimental and theoretical studies on microalgal cell adhesion and interactions on membranes. Electronic Theses and Dissertations from 2009, Lakehead University.

Kim, J. Y., Lee, C., Jeon, M. S., Park, J., & Choi, Y.-E. (2018). Enhancement of microalga *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical treatment. *Bioresource technology*, 268, 815-819.

Kim, S., Rajapakse, N., & Shahidi, F. (2008). Marine Nutraceuticals and Functional Foods. 183-194.

Krauss, R. W., & Shihira, I. (1965). *Chlorella*, physiology and taxonomy of forty-one isolates. University of Maryland.

Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular aspects of medicine,* 26(6), 459-516.

Krishnamoorthy, N., Unpaprom, Y., Ramaraj, R., Maniam, G. P., Govindan, N., Arunachalam, T., & Paramasivan, B. (2021). Recent advances and future prospects of electrochemical processes for microalgae harvesting. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 105875.

Lai, Y. S., Parameswaran, P., Li, A., Baez, M., & Rittmann, B. E. (2014). Effects of pulsed electric field treatment on enhancing lipid recovery from the microalga, *Scenedesmus*. *Bioresource Technology*, 173, 457-461.

Lee, E., Jalalizadeh, M., & Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: a review. *Algal research*, 12, 497-512.

Leon, R., Martín, M., Vigara, J., Vilchez, C., & Vega, J. M. (2003). Microalgae mediated photoproduction of β-carotene in aqueous-organic two phase systems. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 177-182.

Leong, W. H., Saman, N. A. M., Kiatkittipong, W., Assabumrungrat, S., Najdanovic-Visak, V., Wang, J., Khoo, K. S., Lam, M. K., Mohamad, M., &. Lim, J. W. (2022). Photoperiod-induced mixotrophic metabolism in *Chlorella vulgaris* for high biomass and lipid to biodiesel productions using municipal wastewater medium. *Fuel*, 313, 123052.

Leonhardt, L., Käferböck, A., Smetana, S., de Vos, R., Toepfl, S., & Parniakov, O. (2020). Bio-refinery of *Chlorella sorokiniana* with pulsed electric field pre-treatment. *Bioresource technology*, 301, 122743.

Li, D., Xiao, Y., Zhang, Z., & Liu, C. (2015). Light-induced oxidation and isomerization of all-trans-β-cryptoxanthin in a model system. *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology*, 142, 51-58.

Lichtenthaler, H. K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 50(1), 47-65.

Liu, J., Fan, Y., Sun, Y., Wang, Z., Zhao, D., Li, T., Dong, B., & Tang, C. Y. (2021). Modelling the critical roles of zeta potential and contact angle on colloidal fouling with a coupled XDLVO-collision attachment approach. *Journal of Membrane Science*, 623, 119048.

Liu, Y., & Yildiz, I. (2018). The effect of salinity concentration on algal biomass production and nutrient removal from municipal wastewater by *Dunaliella salina*. *International Journal of Energy Research*, 42(9), 2997-3006.

Lorenz, R. T., & Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in biotechnology*, 18(4), 160-167.

Luengo, E., Condón-Abanto, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2014). Effect of pulsed electric field treatments on permeabilization and extraction of pigments from *Chlorella vulgaris*. *The Journal of membrane biology*, 247(12), 1269-1277.

Luengo, E., Martínez, J. M., Bordetas, A., Álvarez, I., & Raso, J. (2015). Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris*. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 29, 15-22.

Lyle, B. J., Mares-Perlman, J. A., Klein, B. E., Klein, R., & Greger, J. L. (1999). Antioxidant intake and risk of incident age-related nuclear cataracts in the Beaver Dam Eye Study. *American journal of epidemiology*, 149(9), 801-809.

Maroneze, M. M., Zepka, L. Q., Lopes, E. J., Pérez-Gálvez, A., & Roca, M. (2019). Chlorophyll oxidative metabolism during the phototrophic and heterotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Antioxidants,* 8(12), 600.

Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable sustainable energy reviews,* 14(1), 217-232.

Matho, C., Schwarzenberger, K., Eckert, K., Keshavarzi, B., Walther, T., Steingroewer, J., & Krujatz, F. (2019). Bio-compatible flotation of *Chlorella vulgaris*: Study of zeta potential and flotation efficiency. *Algal Research* 44, 101705.

McClinton, K. J., Aliani, M., Kuny, S., Sauve, Y., & Suh, M. (2019). Differential effect of a carotenoid-rich diet on retina function in non-diabetic and diabetic rats. *Nutr Neurosci.*

McHugh, D. J. (2003). A guide to the seaweed industry. *FAO Fisher*.

Metsoviti, M. N., Papapolymerou, G., Karapanagiotidis, I. T., & Katsoulas, N. (2019). Comparison of growth rate and nutrient content of five microalgae species cultivated in greenhouses. *Plants,* 8(8), 279.

Metsoviti, M. N., Papapolymerou, G., Karapanagiotidis, I. T., & Katsoulas, N. (2020). Effect of light intensity and quality on growth rate and composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants,* 9(1), 31.

Midekessa, G., Godakumara, K., Ord, J., Viil, J., Lattekivi, F., Dissanayake, K., Kopanchuk, S., Rinken, A., Andronowska, A., Bhattacharjee, S., Rinken, T., & Fazeli, A. (2020). Zeta potential of extracellular vesicles: toward understanding the attributes that determine colloidal stability. *Acs Omega,* 5(27), 16701-16710.

Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in microbiology,* 7, 546.

Mirkovic, T., Ostroumov, E. E., Anna, J. M., Van Grondelle, R., & Scholes, G. D. (2017). Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. *Chemical reviews,* 117(2), 249-293.

Morone, J., Alfeus, A., Vasconcelos, V., Martins, R. (2019). Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals-a new bioactive approach. *Algal Res,* 41.

Morris, H. J., Almarales, A., Carrillo, O., & Bermúdez, R. C. (2008). Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresource Technology,* 99(16), 7723-7729.

Murakami, K., Honda, M., Takemura, R., Fukaya, T., Kanda, H., & Goto, M. (2018). Effect of thermal treatment and light irradiation on the stability of lycopene with high Z-isomers content. *Food Chemistry*, 250, 253-258.

Murdock, J. N., & Wetzel, D. L. (2009). FT-IR microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(4), 335-361.

Negi, S., Perrine, Z., Friedland, N., Kumar, A., Tokutsu, R., Minagawa, J., Berg, H., Barry, A. N., Govindjee, G., & Sayre, R. (2020). Light regulation of light-harvesting antenna size substantially enhances photosynthetic efficiency and biomass yield in green algae. *The plant journal*, 103(2), 584-603.

Okada, T., Nakai, M., Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Miyashita, K. (2008). Suppressive effect of neoxanthin on the differentiation of 3T3-L1 adipose cells. *J Oleo Sci*, 57:345–51.

Oukarroum, A. (2016). Change in photosystem II photochemistry during algal growth phases of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. *Current microbiology*, 72(6), 692-699.

Pagels, F., Pereira, R. N., Vicente, A. A., & Guedes, A. (2021). Extraction of Pigments from Microalgae and Cyanobacteria-A Review on Current Methodologies. *Applied Sciences*, 11(11), 5187.

Paliwal, C., Ghosh, T., George, B., Pancha, I., Maurya, R., Chokshi, K., Ghosh, A., & Mishra, S. (2016). Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. *Algal research*, 15, 24-31.

Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource technology*, 244, 1216-1226.

Parra-Saldivar, R., Cuellar-Bermudez, S., Romero-Ogawa, M., & Rittmann, B. (2014). Algae biofuels production processes, carbon dioxide fixation and biorefinery concept. *Pet Environ Biotechnol*, 5, 1-8.

Pataro, G., Goettel, M., Straessner, R., Gusbeth, C., Ferrari, G., & Frey, W. (2017). Effect of PEF treatment on extraction of valuable compounds from microalgae *C. vulgaris*. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 67-72.

Patias, L. D., Fernandes, A. S., Petry, F. C., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2017). Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxyl radical scavenger capacity. *Food Research International*, 100, 260-266.

Pearsall, R. V., Connelly, R. L., Fountain, M. E., Hearn, C. S., Werst, M. D., Hebner, R. E., & Kelley, E. F. (2011). Electrically dewatering microalgae. *IEEE Transactions on Dielectrics Electrical Insulation*, 18(5), 1578-1583.

Pelah, D., Sintov, A., & Cohen, E. (2004). The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limitedlight intensity. *World Journal of Microbiology Biotechnology,* 20(5), 483-486.

Pesek, C., & Warthesen, J. (1988). Characterization of the photodegradation of β-carotene in aqueous model systems. *Journal of food science,* 53(5), 1517-1520.

Poojary, M. M., Barba, F. J., Aliakbarian, B., Donsì, F., Pataro, G., Dias, D. A., & Juliano, P. (2016). Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine drugs,* 14(11), 214.

Prescott, G. P., & Gross, W. (1973). Algae of the western great lakes area. Michigan: C. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology biotechnology,* 65, 635-648.

Pucihar, G., Miklavcic, D., & Kotnik, T. (2009). A time-dependent numerical model of transmembrane voltage inducement and electroporation of irregularly shaped cells. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering,* 56(5), 1491-1501.

Qiu, X., Shimasaki, Y., Tsuyama, M., Yamada, T., Kuwahara, R., Kawaguchi, M., Honda, M., Gunjikake, H., Tasmin, R., & Shimizu, M. (2013). Growth-phase dependent variation in photosynthetic activity and cellular protein expression profile in the harmful raphidophyte *Chattonella antiqua*. *Bioscience, biotechnology, biochemistry,* 77(1), 46-52.

Rabouille, S., Campbell, D. A., Masuda, T., Zavřel, T., Bernát, G., Polerecky, L., & Stephan, S. (2021). Electron & Biomass Dynamics of Cyanothece Under Interacting Nitrogen & Carbon Limitations. *Frontiers in microbiology,* 12, 620.

Raja, R., Anbazhagan, C., Lakshmi, D., & Rengasamy, R. (2004). Nutritional studies on *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) under laboratory conditions. *Seaweed Resources Utilization,* 26, 127-146.

Richmond, A. (2004). Handbook of microalgal culture:. *Biotechnology applied phycology*, 125-177.

Richmond, A. (2008). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*: John Wiley & Sons.

Rivera Vélez, S. M. (2016). Guide for carotenoid identification in biological samples. *Journal of natural products,* 79(5), 1473-1484.

Rodrigues, D. B., Flores, É. M., Barin, J. S., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2014). Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International,* 65, 144-148.

Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P.-Y. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein

extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology,* 25(2), 523-529.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable sustainable energy reviews, 35*, 265-278.

Salopek, B., Krasic, D., & Filipovic, S. (1992). Measurement and application of zeta-potential. *Rudarsko-geolosko-naftni zbornik,* 4(1), 147.

Sathasivam, R., & Juntawong, N. (2013). Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *African Journal of Biotechnology,* 5, 67-73.

Sathasivam, R., Kermanee, P., Roytrakul, S., & Juntawong, N. (2012). Isolation and molecular identification of β-carotene producing strains of *Dunaliella salina* and *Dunaliella bardawil* from salt soil samples by using species-specific primers and internal transcribed spacer (ITS) primers. *African Journal of Biotechnology*,11(102), 16677-16687.

Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2019). Microalgaemetabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi journal of biological sciences,* 26(4), 709-722.

Schalch, W., Cohn, W., Barker, F. M., Köpcke, W., Mellerio, J., Bird, A. C., Robson, A. G., Fitzke, F. F., & van Kuijk, F. J. (2007). Xanthophyll accumulation in the human retina during supplementation with lutein or zeaxanthin–the LUXEA (Lutein Xanthophyll Eye Accumulation) study. *Archives of biochemistry biophysics,* 458(2), 128-135.

Shaish, A., Horari, A., Kamari, Y., Cohen, H., Schonfeld, G., & Harats, D. (2019). Application of *Dunaliella* in atherosclerosis. In *The Alga Dunaliella* (pp. 475-494): CRC Press.

Shelknanloymilan L., Atici, T., & Obal, O. (2012). Removal of nitrogen and phosphate by using Choleralla vulgaris on synthetic and organic materials waste water. *Biological Diversity and Conservation,* 89-94.

Sheng, Y., Mathimani, T., Brindhadevi, K., Basha, S., Elfasakhany, A., Xia, C., & Pugazhendhi, A. (2022). Combined effect of CO_2 concentration and low-cost urea repletion/starvation in *Chlorella vulgaris* for ameliorating growth metrics, total and non-polar lipid accumulation and fatty acid composition. *Science of The Total Environment,* 808, 151969.

Shi, K., Gao, Z., Shi, T.-Q., Song, P., Ren, L.-J., Huang, H., & Ji, X.-J. (2017). Reactive oxygen species-mediated cellular stress response and lipid accumulation in oleaginous microorganisms: the state of the art and future perspectives. *Frontiersin microbiology,* 8, 793.

Shuman, T. R., Mason, G., Reeve, D., Schacht, A., Goodrich, A., Napan, K., & Quinn, J. (2016). Low-energy input continuous flow rapid pre-concentration of

microalgae through electro-coagulation–flocculation. *Chemical Engineering Journal,* 297, 97-105.

Shurair, M., Almomani, F., Bhosale, R., Khraisheh, M., & Qiblawey, H. (2019). Harvesting of intact microalgae in single and sequential conditioning steps by chemical and biological based-flocculants: effect on harvesting efficiency, water recovery and algal cell morphology. *Bioresource Technology,* 281, 250-259.

Simon, D., & Helliwell, S. (1998). Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. *Water research,* 32(7), 2220-2223.

Simpson, K. L. (1985). Chemical changes in natural food pigments. *In Chemical changes in food during processing* (pp. 409-441): Springer.

Skjånes, K., Rebours, C., & Lindblad, P. (2013). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical reviews in biotechnology,* 33(2), 172-215.

Solís-Salinas, C. E., Patlán-Juárez, G., Okoye, P. U., Guillén-Garcés, A., Sebastian, P., & Arias, D. M. (2021). Long-term semi-continuous production of carbohydrate- enriched microalgae biomass cultivated in low-loaded domestic wastewater. *Science of The Total Environment,* 798, 149227.

Spears, K. (1988). Developments in food colourings: the natural alternatives. *Trends in Biotechnology,* 6(11), 283-288.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 101(2), 87-96.

Stahl, W., & Sies, H. (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Archives of biochemistry biophysics,* 336(1), 1-9.

Stange, C. (2016). Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation and function (Vol.79): Springer.

Stuart, B. H. (2004). Infrared spectroscopy: fundamentals and applications: John Wiley & Sons.

Suchithra, M., Muniswami, D. M., Sri, M. S., Usha, R., Rasheeq, A. A., & Preethi, B. A.(2022). Effectiveness of green microalgae as biostimulants and biofertilizer through foliar spray and soil drench method for tomato cultivation. *South AfricanJournal of Botany*, 146, 740-750.

Sun, X.-M., Ren, L.-J., Zhao, Q.-Y., Ji, X.-J., & Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for biofuels,* 11(1), 1-16.

Sydney, E. B., Novak, A. C., de Carvalho, J. C., & Soccol, C. R. (2014). Respirometric balance and carbon fixation of industrially important algae. *In Biofuels from algae* (pp. 67-84): Elsevier.

Takaichi, S. (2011). Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine drugs*, 9(6), 1101-1118.

Tredici, M. R., Bassi, N., Prussi, M., Biondi, N., Rodolfi, L., Chini Zittelli, G, et al. (2015). Energy balance of algal biomass production in a 1-ha "Green Wall Panel" plant: how to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. *Appl Energy*, 154:1103–11.

Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D. P., Kaul, S., Garg, M. O. (2015). Algae based biorefinery-how to make sense?, vol. 47. Elsevier Ltd.

Tundisi, J. G., Matsumura-Tundisi, T., Tundisi, J. E. M., Faria, C., Abe, D., Blanco, F., Filho, R., Campanelli, L., Teixeira-Silva, V., Degani, R., Soares, F. S., & Gatti Junior, P. (2015). Estudo limnológico e da biota aquática no Rio Xingu na área de influência de UHE Belo Monte: metodologia e abordagens. *Brazilian Journal of Biology*, 75(3), 16-29.

Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M., & Hoadley, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of renewable sustainable energy*, 2(1), 012701.

Wang, C., Wang, Y., Su, Q., & Gao, X. (2007). Transient expression of the GUS gene in a unicellular marine green alga, *Chlorella* sp. MACC/C95, via electroporation. *Biotechnology Bioprocess Engineering*, 12(2), 180-183.

Wang, Y., Yang, Y., Ma, F., Xuan, L., Xu, Y., Huo, H., Zhou, D., & Dong, S. (2015). Optimization of *Chlorella vulgaris* and bioflocculant- producing bacteriaco-culture: enhancing microalgae harvesting and lipid content. *Letters in applied microbiology*, 60(5), 497-503.

Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., & Eppink, M. H. (2010). Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioproducts Biorefining: Innovation fora sustainable economy*, 4(3), 287-295.

Wright, S., Jeffrey, S., & Mantoura, R. (2005). Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods: Unesco Pub.

Wu, C., Han, L., Riaz, H., Wang, S., Cai, K., & Yang, L. (2013). The chemopreventive effect of β-cryptoxanthin from mandarin on human stomach cells (BGC-823). *Food Chemistry*, 136(3-4), 1122-1129.

Xiao, Y., Huang, W., Li, D., Song, J., Liu, C., Wei, Q., Zhang, M., & Yang, Q. (2018). Thermal degradation kinetics of all-trans and cis-carotenoids in a light- induced model system. *Food Chemistry*, 239, 360-368.

Yabuzaki, J. (2017). Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. *Database*, 2017.

Yamaguchi, K. (1996). Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *Journal of Applied Phycology,* 8(6), 487-502.

Ylönen, K., Alfthan, G., Groop, L., Saloranta, C., Aro, A., & Virtanen, S. M. (2003). Dietary intakes and plasma concentrations of carotenoids and tocopherols in relation to glucose metabolism in subjects at high risk of type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study[1–3]. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77, 1434–4.

Yuan, J. P., Peng, J., Yin, K., & Wang, J. H. (2011). Potential health- promoting effects of astaxanthin: a high- value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular nutrition food research,* 55(1), 150-165.

Yustinadiar, N., Manurung, R., & Suantika, G. (2020). Enhanced biomass productivityof microalgae Nannochloropsis sp. in an airlift photobioreactor using low- frequency flashing light with blue LED. *Bioresources Bioprocessing,* 7(1), 1-15.

Zhang, R., Gu, X., Xu, G., & Fu, X. (2021). Improving the lipid extraction yield from *Chlorella* based on the controllable electroporation of cell membrane by pulsed electric field. *Bioresource technology,* 330, 124933.

Zhang, Y., Wu, H., Yuan, C., Li, T., & Li, A. (2019). Growth, biochemical composition, and photosynthetic performance of *Scenedesmus acuminatus* during nitrogenstarvation and resupply. *Journal of Applied Phycology,* 31(5), 2797-2809.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Osman KÖK
Doğum Tarihi :
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu : (Kurum ve Yıl)
Lisans : Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü-2003
Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı- 2005

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar: Emniyet Genel Müdürlüğü
İstanbul İl Emniyet Müdürlüğü/2007-2010
Kırıkkale Polis Meslek Yüksekokulu Müdürlüğü/2010-2014
Bayburt Polis Meslek Eğitim Merkezi Müdürlüğü/2014-2018
Kırıkkale Polis Meslek Yüksekokulu Müdürlüğü/2018-Devam ediyor.

Yayınları (Diğer): Yaşar ALUÇ, Osman KÖK, İlhami TÜZÜN. Profiling the Carotenoids of Microalga (*Scenedesmus Obliquus*) Extract by HPLC and its Antioxidant Capacity. Journal of Applied Biological Sciences, E-ISSN: 2146-0108, 2022.