ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FULVİK VE HUMİK ASİDİN *Chlorella vulgaris* ve *Spirulina platensis* GELİŞİMİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Şebnem KURHAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2012

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FULVİK VE HUMİK ASİDİN *Chlorella vulgaris* ve *Spirulina platensis* GELİŞİMİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Şebnem KURHAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI

Bu çalışmada, kömür kökenli hümik ve fulvik asidin *Chlorella vulgaris* ve *Spirulina platensis* mikroalglerinin gelişimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmada, farklı konsantrasyonlarda hümik ve fulvik asit içeren BG-11 ve Zarrouk besi ortamlarında *Chlorella vulgaris* ve *Spirulina platensis* mikroalglerinin gelişme sürecinde; pH, hücre konsantrasyonu, protein miktarı ve ortak pigmentler olan klorofil-*a* ile karotenoid miktarı belirlenmiştir. Ayrıca *Spirulina platensis*'in sahip olduğu fikosiyanin miktarı da takip edilmiştir.

Zarrouk besi ortamında hümik ve fulvik asidin EDTA yerine kullanıldığı iki ayrı deneme kurulmuştur. *Spirulina platensis* hümik asit denemesinde en yüksek protein konsantrasyonuna 21.günde, EDTA içeren kontrol grubunda ulaşılmıştır. Diğer gelişme parametreleri olan klorofil-*a*, toplam karotenoid ve fikosiyanin miktarları protein miktarına paralel olarak aynı günde kontrol grubunda en yüksek değerlerine ulaşmışlardır. Fulvik asit içeren besi ortamında hümik asit denemesine benzer şekilde en yüksek gelişme değerleri 21. günde 250mg/L fulvik asit konsantrasyonunda elde edilmiştir. Her iki denemeden elde edilen sonuçlara göre fulvik asidin *Spriulina platensis* hücreleri tarafından hümik aside göre daha etkin bir şekilde kullanıldığı belirlenmiştir.

BG-11 besi ortamında da benzer şekilde EDTA yerine hümik ve fulvik asitler farklı konsantrasyonlarda eklenerek iki ayrı deneme kurulmuştur. *Chlorella vulgaris* 30 mg/L fulvik asit içeren ortamda, kontrol grubuna eş miktarda protein ve pigment konsantrasyonuna ulaşmıştır. *Chlorella vulgaris* fulvik asit denemesinde hücre bileşenlerinin en yüksek değerlerine ulaştığı gün 14.gün olarak belirlenmiştir. Hümik asit denemesinde de *Chlorella vulgaris* hücre kompozisyonu en yüksek değerlerine 14. günde ulaşmıştır. Bu denemede 20 mg/L hümik asit konsantrasyonunda *Chlorella vulgaris* protein ve klorofil-*a* miktarı kontrol grubuna göre önemli artış sağlamıştır. *Chlorella vulgaris* gelişiminin en yüksek olduğu 14.günde hümik asidin fulvik aside göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Temmuz 2012, 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, hümik asit, fulvik asit

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETERMINATION OF FULVİC AND HUMIC ACID ON *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* GROWTH

Şebnem KURHAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof.Dr. M. Lütfü Çakmakçı

The aim of this study is to determine the effect of humic and fulvic acids derived from coal on the growth of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* growth.

In this study, the pH changes, cell concentrations by optical density, protein and common pigment content were determined at different concentrations of humic and fulvic acid containing BG-11 and Zarrouk media during the *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* growth. Besides, phycocyanin content of *Spirulina platensis* was studied.

In two different experiments, humic and fulvic acid were used instead of EDTA in Zarrouk media. In the humic acid experiment of *Spirulina platensis*, the highest protein content was reached to 21st day of the incubation in the control group which contains EDTA. Likewise protein content, the other growth parameters chlorophyll-*a*, total carotenoids and phycocyanin content was reached the maximum level at the same day. The media with fulvic acid gave the highest yield of the cell content at 250mg/L fulvic acid concentration in the 21st day of the incubation. Results of both experiments showed that fulvic acid was used by *Spirulina platensis* more effective than humic acid.

In two different experiments, humic and fulvic acid were used instead of EDTA in BG-11 media. *Chlorella vulgaris,* in the media which contains 30 mg/L fulvic acid, has reached equivalent protein and pigment concentration which the control group has. In the fulvic acid experiment *Chlorella vulgaris* cell composition was attained the highest level at 14th day of the incubation. Also, in the humic acid trial *Chlorella vulgaris* reached the top value in the aspect of cell composition at 14th day. In the media which contains 20 mg/L humic acid, protein and chlorophyll-*a* amount of *Chlorella vulgaris* has significant increase when it's compared to the control group. Furthermore, the peak value of the progress of *Chlorella vulgaris* at the 14th day, it is observed that humic acid is more efficient than fulvic acid.

July 2012, 78 pages

Key Words: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, humic acid, fulvic acid

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca benden ilgi ve desteğini esirgemeyen, ihtiyaç duyduğum her an bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği A.B.D.), çalışmamın büyük bir kısmında laboratuvar imkânlarından yararlanmama olanak tanıyan değerli hocam Prof. Dr. Ertan ANLI'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği A.B.D.), çalışmamın liyofilizasyon aşamasındaki yardımlarından dolayı değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü), Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji laboratuvarı olanaklarından faydalanmamı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü),

Her ihtiyaç duyduğumda yanımda olduğunu hissettiren, laboratuvar deneyim ve birikimlerinden yararlandığım, çok şey öğrendiğim sevgili hocam Dr. Aylin AKOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarımda yardımını esirgemeyen sevgili meslektaşım Gülşah GÖKTAŞ'a, en içten teşekkürlerimi sunarım.

benim bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi her türlü imkanı sunan, her daim yanımda duran ve bana güç veren canım ailem. İyi ki varsınız. Her şey için çok teşekkürler.

Şebnem KURHAN
Ankara, Temmuz 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET…….. i
ABSTRACT…… ii
TEŞEKKÜR…… iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……..…….. vi
ŞEKİLLER DİZİNİ…..……..……... vii
ÇİZELGE DİZİNİ…….……. ix
1. GİRİŞ……...…… 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ…….……. 3
2.1 Mikroalgler…….……..... 3
2.1.1 Siyanobakteriler…….……... 3
2.1.2 Yeşil algler…….…… 5
2.2 Mikroalglerin Hücre Bileşimi…….…… 6
2.2.1 Protein……... 6
2.2.2 Yağ asitleri ..…….……. 7
2.2.3 Polisakkaritler…….…….. 8
2.2.4 Pigmentler……..…… 8
2.2.4.1 Klorofil……..…….. 9
2.2.4.2 Karotenoidler……..…… 12
2.2.4.3 Fikobiliproteinler…….…….. 15
2.2.5 Tokoferol ve streoller……..…….. 16
2.2.6 Vitaminler…….……. 16
2.2.7 Antioksidan maddeler……..……. 17
2.3 Metal Bağlama Özelliğine Sahip Maddeler……... 17
2.3.1 Sentetik metal bağlayıcılar…….…….. 17
2.3.2 Ligno sülfonatlar…….…….. 18
2.3.3 Organik asitler……..……. 18
2.3.4 Proteinler (Aminoasitler)……..…… 19
2.3.5 Hümik maddeler……..…….. 19
2.3.5.1 Hümik ve fulvik asitlerin hücrede kullanılması…….…. 22
3. MATERYAL ve YÖNTEM……..……..…….. 27
3.1 Materyal……..…….. 27
3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroalgler……..…. 27
3.1.2 Kültür ortamları……..…….. 27
3.1.3 Efektif doz denemesi…….… 27
3.1.4 Işık kaynağı……..…….. 28
3.1.5 Ekipman…….…… 28
3.1.6 Hümik asit çözeltisi…….. 28
3.1.7 Fulvik asit çözeltisi……... 28
3.2 Yöntem…….……. 28
3.2.1 Gelişme koşulları……..……. 28
3.2.2 Fulvik asit eldesi……..….. 29
3.2.3 Aşı kültürü hazırlanması……. 29
3.2.4 Hasat……..……. 29
3.2.5 Ekstraksiyon……...……... 30

3.2.6 Günlük yapılan analizler…….. 30
3.2.7 Haftalık analizler…….. 31
3.2.7.1 Kurumadde analizi…… 31
3.2.7.2 Protein analizleri……..... 31
3.2.7.2.1 Biüret yöntemiyle protein tayini……... 31
3.2.7.2.2 Lowry yöntemiyle protein tayini……..…….. 32
3.2.7.3 Klorofil-*a* ve toplam karotenoid miktarının belirlenmesi…….…… 34
3.2.7.4 Fikosiyanin miktarının belirlenmesi……..……... 36
3.2.8 İstatistiksel değerlendirme……..…….. 37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI……..…….. 38
4.1 Deneme Süresince pH'da Meydana Gelen Değişimin İncelenmesi……..… 38
4.2 Optik Yoğunluk Ölçümleri…..……..…….. 41
4.3 Hücre Bileşiminin Zamana Göre Değişimi…….…….…….. 46
4.3.1 Kurumadde miktarı…….…….…… 46
4.3.2 Protein miktarı…….…… 49
4.3.2.1 Lowry metodu ile toplam protein miktarı……... 49
4.3.2.2 Biüret metodu toplam protein miktarı……. 53
4.3.3 Klorofil-*a* miktarı…….. 55
4.3.4 Karotenoid miktarı…… 59
4.3.5 Fikosiyanin miktarı……... 60
5. SONUÇ…… 64
KAYNAKLAR…… 67
EKLER…… 73
EK 1 Deneme boyunca kullanılan kültür ortamlarının bileşimleri…….. 74
EK 2 Deneme süresince kullanılan ekipman listesi ……... 76
EK 3 Protein analizleri için kullanılan standart eğriler …… 77
ÖZGEÇMİŞ…… 78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AA	Araşidonik asit
BSA	Bovin serum albumin
BHT	Bütil hidroksi tolüen
C-PC	Fikosiyanin konsantrasyonu
DHA	Dokosahekzaenoik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ETS	Elektron taşıma sistemi
EPA	Eikosapentaenoik asit
FTS	Serum fizyolojik tuzlu su
GLA	Gama-linolenik asit
g	Gram
Kl-*a*	Klorofil-*a*
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
nm	Nanometre
PC	Fikosiyanin
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
s	Saniye
THP	Tek hücre proteini
TKİ	Türkiye Kömür İşletmeleri
W	Watt
α	Alfa
β	Beta
e^-	Elektron
γ	Gama
m^2	Metrekare
μ	Mikro

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1	Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamının pH değişimi (*Spirulina platensis*)……	44
Şekil 4.2	Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren Zarrouk besi ortamının pH değişimi (*Spirulina platensis*)……	44
Şekil 4.3	Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren BG-11 besi ortamının pH değişimi (*Chlorella vulgaris*)……	45
Şekil 4.4	Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren BG-11 besi ortamının pH değişimi (*Chlorella vulgaris*) ……	46
Şekil 4.5	Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis* hücrelerinin gelişimi (680,5 nm)……..	49
Şekil 4.6	Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis* hücrelerinin gelişimi (443,5 nm)……..	49
Şekil 4.7	Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis* hücrelerinin gelişimi (680,5 nm)……..	50
Şekil 4.8	Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis* hücrelerinin gelişimi (443,5 nm)……..	51
Şekil 4.9	Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris* hücrelerinin gelişimi (693 nm)……..	51
Şekil 4.10	1Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris* hücrelerinin gelişimi (739 nm)……..	52
Şekil 4.11	Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris* hücrelerinin gelişimi (693 nm)…….....	53
Şekil 4.12	Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris* hücrelerinin gelişimi (739 nm)……..	53
Şekil 4.13	Fulvik asit içeren besi ortamında gelişen *Spirulina platensis*'in kuru madde miktarı (mg/100mL)…….	54
Şekil 4.14	Hümik asit içeren besi ortamında *Spirulina platensis*'in kuru madde miktarı (mg/100mL)……	55
Şekil 4.15	Fulvik asit içeren besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in kuru madde miktarı (mg/100mL)……	56
Şekil 4.16	Hümik asit içeren besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in kuru madde miktarı (mg/100mL)……	57
Şekil 4.17	Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)……	58
Şekil 4.18	Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)……	58
Şekil 4.19	Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)……	59
Şekil 4.20	Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)……	59
Şekil 4.21	Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in protein verimi (mg/g)……...	60
Şekil 4.22	Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis'in* protein verimi (mg/g)……...	61

Şekil 4.23	Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein verimi (mg/g)……..	62
Şekil 4.24	Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein verimi (mg/g)……..	62
Şekil 4.25	Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)……	63
Şekil 4.26	Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)……	63
Şekil 4.27	Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)……	64
Şekil 4.28	Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in protein konsantrasyonu (mg/mL)……	64
Şekil 4.29	Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in klorofil-a konsantrasyonu (mg/mL)…….	65
Şekil 4.30	Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in klorofil-a konsantrasyonu (mg/mL)……	66
Şekil 4.31	Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in klorofil-a konsantrasyonu (mg/mL)…….	67
Şekil 4.32	Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in klorofil-a konsantrasyonu (mg/mL)…….	67
Şekil 4.33	Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in klorofil-a verimi (mg/g)……..	68
Şekil 4.34	Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in klorofil-a verimi (mg/g)……..	68
Şekil 4.35	Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in klorofil-a verimi (mg/g)……..	69
Şekil 4.36	Hümik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in klorofil-a verimi (mg/g)……..	69
Şekil 4.37	Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in karotenoid konsantrasyonu (mg/mL)……..	70
Şekil 4.38	Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in karotenoid konsantrasyonu (mg/mL)……..	70
Şekil 4.39	Fulvik asit içeren BG-11 besi ortamında *Chlorella vulgaris*'in karotenoid verimi (mg/g)…….	71
Şekil 4.40	Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in fikosiyanin konsantrasyonu (mg/mL)……..	72
Şekil 4.41	Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in fikosiyanin konsantrasyonu (mg/mL)……..	72
Şekil 4.42	Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in fikosiyanin verimi (mg/g)……	73
Şekil 4.43	Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'in fikosiyanin verimi (mg/g)……	74
Şekil 4.44	Fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'ten elde edilen fikosiyaninin saflık değerleri (A620/A280)……..	75
Şekil 4.45	Hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis*'ten elde edilen fikosiyaninin saflık değerleri (A620/A280)……..	75

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1 Alglerin genel kompozisyonu ve diğer besinlerle karşılaştırılması……. 6

1. GİRİŞ

Günümüzde mümkün olduğunca az işlem görmüş, besleyici değeri yüksek besin maddelerine rağbet artarak devam etmektedir. Bu amaçla dünyanın pek çok yerinde aslında yüzyıllardır yerli halk arasında devam eden gelenekler, bugün biraz şekil değiştirerek hızla küreselleşen dünyada daha fazla kişiye ulaşmaktadır.

Dünyanın pek çok yerinde mikroalgler uzun yıllardır insanların temel besin ve de geçim kaynaklarından biri olmuştur. Çad'da *Spirulina platensis*, Meksika'da *Spirulina maxima,* Güney Amerika ve Asya'nın pek çok bölgesinde *Nostoc* türleri yerli halk tarafından temel besin maddesi olarak tüketilmektedir.

Kuru ağırlığının %50-60'ı kadar protein içeren mikroalgler, doğadaki pek çok kaynaktan daha fazla esansiyel yağ asiti ve esansiyel amino asit bunun yanı sıra endüstride oldukça yaygın kullanım alanı bulan yoğun pigment (klorofil, kartenoidler, fikosiyanin, vb.) içermektedirler. Bu özellikleri ile mikroalgler tek hücre proteini olarak kullanılabileceği gibi, sahip oldukları fonksiyonel bileşenleri ayrı birer ürün olarak da elde edilmesi mümkündür. Bu özellikleriyle bilinen en zengin bitkisel protein kaynağı olan soyadan üstün özelliklere sahiptirler.

Hasat süresi normal bir bitkiye göre kısa olan mikroalgler ile fosil yakıtların bioyakıtlarla değişimi konusunda oldukça fazla çalışma yapılmaktadır. Özellikle bazı mikroalg türleri içerdikleri yüksek miktardaki yağ sayesinde bu değişimi mümkün kılmaktadır. Böylelikle besin kaynağı olan mısırdan etanol üretimi yerine alglerden etanol üretimi olanaklı hale gelecektir.

Toprağın hammaddesi olan humusun işlenmesiyle elde edilen hümik ve fulvik asitler tarımda verimsiz toprakların işlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek metal bağlama kapasiteleri, bitkinin metali kullanabilmesini kolaylaştırdığı gibi özellikle endüstriyel kirlenmenin yoğun olduğu bölgelerde toprağa karışan ağır metallerin uzaklaştırılmasında da önemli rol oynamaktadır.

Mikroalglerin besin olarak kullanılmalarının yanı sıra yoğun su kirliliğinin görüldüğü bölgelerde, ağır metalleri bünyelerinde tutabilme özellikleri nedeniyle su kirliliğinin azaltılması çalışmalarında da kullanım alanı bulmaktadırlar. Bunun yanı sıra mikroalglerin azot bağlama özellikleri sayesinde özellikle pirinç tarımı yapılan bölgelerde verimi arttırmak amacıyla doğal verim arttırıcı olarak da kullanılmaktadırlar.

Mikroalglerin gelişiminde sentetik metal bağlayıcılar yerine toprak bileşeni hümik ve fulvik asitlerin kullanılması, ortak özelliklerinin kombinasyonu ve toprak kalitesine olumlu etkileri nedeniyle inorganik gübreler için de iyi bir alternatif oluşturmaktadırlar.

Bu çalışmada ökaryot mikroalg olan *Chlorella vulgaris* ile prokaryot bir siyanobakteri olan *Spirulina platensis*'in farklı konsantrasyonlarda hümik ve fulvik asit varlığında gelişimleri ve hücre kompozisyonları, kontrol grubu olan sentetik bir metal bağlayıcı EDTA içeren besi ortamında gelişen hücreler ve hücre kompozisyonlarıyla karşılaştırılmıştır. Buna paralel olarak herhangi bir metal bağlayıcı madde içermeyen besi ortamında hücre davranışı irdelenmiştir. İnkübasyon süresi boyunca birer hafta aralıklarla hücrelerin sahip oldukları toplam protein, klorofil, karotenoid ve *Spirulina platensis*'in sahip olduğu fikosiyanin konsantrasyonları ile birim kuru maddelerindeki miktarları da belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Mikroalgler

Mikroalgler, fotosentetik prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmaları temsil eder. Önceleri mavi-yeşil algler olarak bilinen siyanobakteriler, diğer algal gruplar gibi ökaryot değil, prokaryottur. Fotosentetik olmaları nedeni ile üretim sistemleri mikroalglerle aynıdır (Dalay vd. 2008). *Chlorophyta* ise yeşil algler olarak da bilinen tek hücreli fotosentetik ökaryot algleri temsil etmektedir.

2.1.1 Siyanobakteriler

Cyanophyceae, bundan yaklaşık 3,5 milyar yıl önce, Pre-kambriyen çağda oluşan, içerisinde oldukça çeşitli prokaryotik organizmaları barındıran bir gruptur. Fosillerden elde edilen kayıtlara göre, ortaya çıkışlarından 1 milyar yıl sonra, yeryüzü atmosferinde biriken oksijenden sorumlu oldukları düşünülmektedir. Siyanobakterilerin yüksek sıcaklıklarda, yoğun ışık ve düşük CO_2 konsantrasyonlarında yaşamını devam ettirebilme yeteneğinde olması, sıcak su kaynaklarından buzlu Antarktik göllerine ve topraklarına, buradan aşırı tuzlu bölgelere kadar geniş habitatlara yayılmalarını sağlamıştır. Siyanobakterilerin çok azı açık okyanuslarda bulunmakta olup, geri kalan türler nehir ağızlarındaki balçık üstlerinde, sığlıklarda, ötropik tatlı su gölleri ve nehirlerde yer almaktadır (Gouveia vd. 2008).

Siyanobakterilerin çoğunluğu aerobik fotootoroflardır. Yaşamlarını devam ettirebilmek için sadece su, karbondioksit, inorganik maddeler ve ışığa ihtiyaç duyarlar. Fotosentez, enerji metabolizmalarının temel kaynağıdır. Fotosentetik yapılar içerisinde fotosistem-I ve fotosistem-II reaksiyon merkezleri bulunur. Yardımcı pigmentlerle birlikte klorofil-*a* ve karotenoidler farklı dalga boylarındaki ışığın etkin bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır (Anonymus 1999).

Siyanobakteriler, Gram-negatif bakterilerdeki 3 katlı membran yapısına benzer şekilde, bir dış membran, Gram-negatif bakterilerle karşılaştırıldığında daha kalın bir

peptidoglukan katman ve sitoplazmik membran içerirler (Colyer vd. 2005). Öbakterilerde olduğu gibi hücre duvarının belirgin, destek sağlayan peptidoglukan katmanı murein yapısındadır. Murein katmanı sitoplazma uzantılarını içeren küçük porlar içerir. Siyanobakteriyel hücre duvarları da öbakterilerdeki gibi lizozime karşı duyarlı olup, Gram-negatif bakterilerde olduğu gibi penisilin, murein tabakasının bütünlüğünü bozarak gelişimi inhibe etmektedir. Murein tabakası üzerinde çoğunluğu lipopolisakkaritlerden oluşmuş müsilaj kılıf yer almaktadır (Van den Hoek vd. 1995).

Siyanobakterilerde diğer bakterilerde olduğu gibi DNA protoplastın merkezinde yer alır. Bu bölge nükleozma olarak adlandırılır. Birçok mavi-yeşil alg küçük DNA parçaları olan plazmit de içerirler (Van den Hoek vd. 1995). 16S rRNA taşımaları ve moleküler biyolojisi nedeniyle bakteri özelliği gösterirler. Sirküler yapıda süper sarmal gene sahip olan en basit organizmalardır (Ishiura vd. 1998, Graham vd. 2004).

Karakteristik hücre içi membran yapıları olan tilakoidler hem fotosentez hem de solunum yapma yeteneğindedirler (Colyer vd. 2005). Bu yapıların üzerinde fikobilizomlar olarak adlandırılan, suda çözünebilir çok moleküllü proteinler, klorofil-*a* - protein kompleksleri, karotenoidler, fotosentetik tepkime merkezleri ve elektron taşıma sistemi (ETS) yer alır. Elektron taşınımında reaksiyonlar tilakoid zarlarda gerçekleşir. Yüksek bitkilerden farklı olarak, bu zarlar siyanobakterilerde organize bölgeler değillerdir. Bu reaksiyonlar yüksek bitkilerde kloroplast içinde gerçekleşirken siyanobakterilerde sitoplazma içinde oluşmaktadır. Tilakoidler klorofil-*a* içerirlerken klorofil-*b* ve -*c* bulundurmaz (Oğuz 2008). Siyanobakterilerde depo polisakkarit, glikojene benzer siyanofisin nişastasıdır. Siyanofisin nişastası, tilakoidler arasında bulunan küçük tanecikler olarak görülür (Van den Hoek vd. 1995).

Siyanobakteriler, fotosentez faaliyetleri sırasında, tıpkı bitkiler gibi hem organik karbon hem de oksijen üreten tek prokaryot grubudur. Fotosentez için gerek duydukları elektronları, alglerin ve bitkilerin yaptığı gibi, su molekülünü parçalayarak elde ederler (Graham vd. 2004). Gerçekleşen oksijenik fotosentez aşağıdaki eşitlikle özetlenebilir (Van den Hoek vd. 1995):

$$CO_2 + 2H_2O \longrightarrow [CH_2O]_x + H_2O + O_2$$

Fotosentez kapasitelerinin yanında biyosferdeki diğer önemli işlevleri, atmosferik azotu asimile ederek diğer organizmaların kullanabileceği mineral azota dönüştürebilmeleridir. Azot kullanabilme yeteneğindeki siyanobakteri türleri genelde iplik biçimindedir ve "heterosist" adı verilen az sayıda özelleşmiş hücre ile azot fiksasyonu yaparlar (Graham vd. 2004, Çakmakçı vd. 2008).

2.1.2 Yeşil algler

Chlorophyta (yeşil algler) dört grupta sınıflandırılırlar (Lee 1999):

- *Micromonadophyceae*
- *Charophyceae*
- *Ulvophyceae*
- *Chlorophyceae*

Chlorella vulgaris, *Chlorophyta* şubesinin dört sınıfından biri olan *Chlorophyceae* sınıfının, *Chlorococcales* takımında *Oocytaceae* familyasında yer almaktadır.

Chlorella, çapı 5-10 mikron olan küre görünümünde hücre yapısına sahiptir (Becker, 2007). Hücre duvarlarında bulunan temel polisakkarit selülozdur. Hücre duvarının bu yapısı nedeniyle hücre yapısı oldukça serttir.

Kloroplastlar ise kadehsi görünümdedirler. Kloroplast pigmentleri yüksek bitkilerde bulunan pigmentlerle benzerlik göstermektedir. Yüksek bitkilerde olduğu gibi yeşil algler de klorofil-*a* ve –*b* içermektedir. Azot yetersizliğinde karotenoidler kloroplast yüzeyinde birikerek alge turuncu-kırmızı renk verirler.

Chlorella hücreleri logaritmik büyüme evresinde yaklaşık %50 protein, %5 klorofil ve yüksek miktarda vitamin içermektedirler. Tek çoğalma şekilleri, ana hücreye bire bir benzeyen yavru hücrelerin oluştuğu eşeysiz üremedir.

Tek hücreli yeşil alglerden *Chlorella*, artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılayabilmek için üzerinde en çok araştırma yapılan alglerden biridir (Lee 1999) .

2.2 Mikroalglerin Hücre Bileşimi

Çizelge 2.1 Alglerin genel bileşimi ve diğer gıdalarla karşılaştırılması (Becker 2007, Gouveia vd. 2008)

ALG	**% Protein**	**% Karbonhidrat**	**% Lipit**
Anabaena cylindrica	43-56	25-30	2-7
Aphanizomenon flos-aquae	62	23	3
Chlamydomonas rheinhardii	48	17	21
Chlorella pyrenoidosa	57	26	2
Chlorella vulgaris	51-58	12-17	14-22
Dunaliella salina	57	32	6
Euglena gracilis	39-61	14-18	14-20
Porphyridium cruentum	28-39	40-57	9-14
Scenedesmus obliquus	50-56	10-17	12-14
Spirogyra sp.	6-20	33-64	11-21
Arthrospira maxima	60-71	13-16	6-7
Spirulina platensis	46-63	8-14	4-9
Synechococcus sp.	63	15	11
Ekmek mayası	39	38	1
Et	43	1	34
Yumurta	47	4	41
Pirinç	8	77	2
Soya	37	30	20

2.2.1 Protein

Mikroalglerin bileşiminde bulunan ana madde ham proteindir (Brown vd. 1997). Alg biyokütlesinin protein içeriği ise bulunduğu ortamdaki potasyum ve azot gibi besin kaynaklarının kullanılabilmesine bağlıdır. Bununla birlikte büyüme fazında alınan ışığın miktarı ve kalitesi de bu içerik üzerinde etkilidir (Gantar ve Svirćev 2008).

Spirulina platensis ile yapılan çalışmalar hasat zamanına göre protein miktarının değiştiğini göstermiştir. En yüksek protein sabah erken saatlerde elde edilmektedir. *Spirulina platensis*'in toplam protein ağırlığının %47'si esansiyel amino asitlerden

oluşmaktadır. Ancak kükürt içeren amino asitler (metiyonin ve sistein) bakımından yetersizdir. Diğer mikroorganizmaların tersine selüloz hücre duvarı içermediğinden proteinler yüksek sindirilebilirliğe sahiptir (Falquet 2006).

Gıda yetersizliği çeken toplumlarda *Spirulina* sp.'nin protein tamamlayıcı olarak kullanımı önemli avantajlar sunmaktadır. Aynı bölgede yetişen diğer tarım ürünleriyle karşılaştırıldığında, soyadan 20 kat daha fazla protein içeriğine sahiptir (Godoy Danesi vd. 2010).

Tek hücre proteini (THP) eldesinde mantarlar, mayalar ve bakterilerin yanında algler de önemli bir yere sahiptir. THP, tek hücreli canlıların oldukça yüksek protein içermesi, esansiyel amino asitler bakımından zengin, hızlı ve kolay üretilebilmeleri nedeniyle dikkatleri üzerine toplamaktadır (Katırcıoğlu ve Aksöz 2003). Ancak hücre duvarlarının parçalama ve sindirime dayanıklı olması, bunun yanında nükleik asitlerin varlığı THP'nin yaygın olarak kullanımını kısıtlamaktadır (Vananuvat ve Kinsella 1975). Diğer hücrelerde olduğu gibi THP'nin algal biyokütlenin tamamını içermesi hücre içerisindeki protein olmayan azot kaynaklarının da; nükleik asitler, aminler, glikozaminler ve hücre duvarı materyalleri ile birlikte tüketilmesine neden olmaktadır. Büyük ölçekli üretilen mikroalglerden *Scenedesmus obliquus* %12, *Spirulina* sp. %11,5 ve *Dunaliella* %6 protein olmayan azot içermektedir (Becker 2007).

2.2.2 Yağ Asitleri

Siyanobakteri olan *Spirulina* γ-linolenik asit (GLA, 18:3ω6), *Porphyridium* araşidonik asit (AA, 20:4ω6), *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Isochrysis*, *Diacronema* eikosapentaenoik asit (EPA, 20:5ω3) ve *Crypthecodinium*, *Schizochytrim* dokosahekzaenoik asit (DHA, 22:6ω3) sentezlemektedir. Bu çoklu doymamış yağ asitleri, yüksek bitkiler ve hayvanlar tarafından sentezlenemez (Gouveia vd. 2008). Esansiyel yağ asitlerinin önemli bir kaynağı olan mikroalgler, su ürünleri yetiştiriciliğinde yem olarak kullanılarak su ürünlerinin besleyici değerini de arttırırlar. Bitkisel yağdan biyoyakıt üretimi ekstra enerji ve büyük alanlara ihtiyaç duymaktadır. Eğer biodizel üretiminde bitkisel yağ kullanılırsa, toplam maliyetin %70-85'i

hammadde maliyetinden oluşacaktır. Bunun yanında mikroalgler tarımsal ve hayvansal yağlara alternatif oluşturabilecek kapasitededirler. Ayrıca mikroalg kültürlerinin verimliliği, bilinen en iyi yağlık tohumlardan elde edilen yağ veriminin çok üzerindedir. Açık havuzlarda üretilen mikroalgler ile kolza tohumundan elde edilen biyodizel verimleri sırasıyla 12 000 Litre/hektar ve 1190 Litre/hektar olarak belirtilmektedir (Chader vd. 2011).

2.2.3 Polisakkaritler

Polisakkaritler endüstride jelleştirici ve katılaştırma etmeni olarak kullanılmaktadır. Agar, aljinat ve karragenan gibi birçok ticari polisakkarit makroalglerden elde edilmektedir. Bunun yanında pek çok mikroalg de polisakkarit üretmekte, hızlı gelişme göstermeleri ve gelişmeleri sırasında çevre koşulları kontrol edilebildiği için bir kısmı endüstriyel ve ticari alanlarda kullanılmaktadır. Ticari anlamda en çok kullanılan kırmızı mikroalg *Porphyridium cruentum*'dur (Gouveia vd. 2008).

2.3.4 Pigmentler

Bütün fotosentetik organizmalar ışık enerjisini kullanabilmek için organik pigmentler içerirler. Siyanobakterilerde, klorofiller, karotenoidler ve fikobilinler olmak üzere temel olarak üç ana pigment sınıfı bulunmaktadır (Lorenz, 1998, Silveira vd. 2006,). Klorofiller (yeşil pigmentler) ve karotenoidler (sarı ve turuncu pigmentler) lipofilik olup alkol, dietil eter, benzen ve aseton içinde çözünürken, fikobilinler hidrofiliktirler ve suda çözünürler (Oğuz 2008).

Mavi-yeşil alglerde pigmentler protoplastın dış kısmında yoğunlaşmıştır. Kromatoplazma olarak adlandırılan bu bölgede yer alan tilakoidlerin, elektron mikroskop çalışmalarında hücre zarına paralel uzanan serbest sitoplazmik bileşenler olduğu görülmüştür. Tilakoid membranlar yağda çözünen klorofil-*a* ve karotenoidleri içerir. Suda çözünen fikobiliproteinler ise tilakoidlerin dış yüzeylerine tutunmuş küçük bölmelerde yer alırlar (Van den Hoek vd. 1995). Ayrıca tilakoid boşluklar içerisinde

silindir şeklindeki gaz vezikülleri bulunur. Bunlar *Spirulina*'ya yüzebilme özelliğini verir. Bunun dışında vezikül içermezler (Tomaselli, 1997).

2.2.4.1 Klorofil

Fotosentetik organizmalar bulundukları sınıflara göre farklı yardımcı (aksesuar) pigmentler içermektedirler (Tomitani vd. 1999). Klorofil-*a* tüm alglerde temel fotosentetik pigmenttir. Siyanobakteriler ve kırmızı algler (*Rhodophyta*) yalnızca klorofil-*a* bulundururken, yüksek bitkilerde olduğu gibi yeşil algler (*Chlorophyta*) ve öglena (*Euglenophyta*) klorofil-*a* yanında klorofil-*b* içerirler. Diğer deniz algleri ve tatlı su diyatomları ise klorofil-*a* ve -*b*'nin yanında klorofil-*c*, klorofil-*d* ve klorofil-*e* pigmentlerine de sahiptirler (Tunail 2009).

Klorofiller hücre kuru ağırlığının % 0.5-1.5'unu oluşturur (Gouveia vd. 2008).

Oksijenik fotosentez yapan organizmaların sahip oldukları klorofil-*a* miktarı, önemli bir gelişim parametresidir. Fitoplankton biyokütlesi, tüm fitoplankton hücrelerinin sahip olduğu fotosentetik pigment olan klorofil-*a* ile ölçülebilir (Newton, 2002). Klorofil-*a* veya toplam klorofil miktarı, fotosentez ve solunum oranlarını (mol O_2.mg/ Kl-*a*. saat) ve metabolik olarak aktif biyokütle ile karasal ve su ekosistemlerinin verimliliğini (gC./mg Kl-*a*. gün) hesaplamak için standart olarak kullanılır (Ritchie 2006).

Klorofil-*a*, fotosistem II'de yer alan klorofil-a_2 ve fotosistem I'de görev yapan klorofil-a_1'den oluşmaktadır (Govindjee 1966). Klorofil-*a* molekülleri absorbe ettiği mavi ve kırmızı ışığın enerjisini fotosistem I'in reaksiyon merkezindeki bu klorofil-*a* çiftine aktarır (Tunail 2009).

Klorofil-*a*, biri 432 diğeri 664 nm olmak üzere iki maksimum absorbans değerine sahiptir. Ancak ksantofiller, karotenoidler gibi pek çok yardımcı pigmentin de 400 nm'lerde ışığı absorblaması ve yalnızca klorofiller ile feo-pigmentlerin 600 nm dalga boylarında absorbans vermesi nedeniyle klorofillere ait optik yoğunluk (O.D)

okumaları ve bunların hesaplamaları 600 nm'deki absorbans değerleri ile yapılmaktadır (Newton 2002).

Kyler (2003), kırmızı ve yeşil alglerde bulunan fotosentetik pigmentler üzerine yaptığı çalışmasında, spektrum tarama sonuçlarına göre %90'lık aseton kullanarak hidrofobik pigmentler olan klorofil-*a*'nın 430 ve 663 nm'de, klorofil-*b*'nin 458 ve 654 nm'de, klorofil-*c*'nin 466, 584 ve 620 nm'de en yüksek absorbans oluşturduğunu göstermiştir. Hem hidrofobik hem de hidrofilik özellik gösteren ve bu nedenle çözücü olarak DMSO kullanılarak elde edilen ksantofillerin ise 450 nm'de en yüksek absorbans değeri verdiğini saptamıştır.

Siyanobakterilerdeki klorofil-*a* ve fikobiliprotein konsantrasyonları kültürün bulunduğu ortam koşullarına bağlıdır. Yüksek ışık yoğunluğunda yetişen kültürler ile düşük ışık yoğunluğunda yetişen kültürler karşılaştırıldığında, yüksek ışık yoğunluğunda hücre sayısı daha az, gelişim hızı normale göre 10 kat daha yavaş olup hücreler daha geniş kofullara (vakuollere) sahiptir. Bununla birlikte bu hücreler normalin 1/3'i kadar pigment içerirler. Yoğun beyaz ışıkta gelişen hücrelerde fotosentez oranı, düşük ışıkta gelişen hücrelere göre 1/2 oranında az iken, bu hücreler yine düşük yoğunlukta gelişen hücrelere göre 2 kat daha fazla solunum yaparlar.

Hücrelerin geliştiği ışık rengi fikosiyanin (PC)/klorofil-*a* (Kl-*a)* oranının saptanmasında önemlidir. Govindjee (1966), siyanobakteri olan *Anacystis nidulans*'ın farklı ışık rejimlerinde (farklı ışık yoğunluğu ve farklı ışık renklerinde) pigment miktarı ve pigmentler arası enerji aktarımı üzerine yaptıkları çalışmada algin yetiştiği ışık yoğunluğunun, fikosiyaninden klorofil-*a*'ya enerji aktarımında önemli olduğunu ortaya koymuştur. Denemelerinde yoğun beyaz ışıkta yetiştirilen kültürlerde (PC)/(Kl-*a*) oranı 0,74 olurken düşük yoğunluktaki beyaz ışıkta (PC)/(Kl-*a*) oranı 1,05 olmuştur.

Schagerl ve Müller (2006) ise, parlak ışık altında gelişen siyanobakterilerde zeakstantin/klorofil-*a* oranının arttığını belirtmişlerdir.

Ekstraksiyon yöntemi olarak genellikle sonikasyon, öğütme ve dondurma-çözdürme yöntemlerinden biri tercih edilir (Akoğlu 2012). Burada amaç, kloroplastın parçalanarak pigment kaybı olmadan renk maddelerinin çözücüye geçmesidir. Çözücü olarak ise genellikle pigment yapısına zarar vermeyen %90'lık aseton kullanılır. Hücreler parçalandıktan sonra tam ekstraksiyonun sağlanması ve yabancı maddelerin uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulanır. Santrifüjün ardından üstte kalan süpernatant çözünmüş saf pigment ekstraktı olarak kullanılır. Bu ekstrakt gerek florümetre (klorofil floresanının belirlenmesi için), gerek spektrofotmetre (klorofil absorbansının saptanması için), gerekse diğer fitoplankton pigmentlerinden klorofilin ayrılması için kromatografide kullanılabilir (Newton 2002).

Ekstraksiyon yönteminde kullanılan derişik HCl çözeltisi klorofil pigmentinin degredasyonuna yol açmaktadır. Yıkıma uğramış bu klorofil molekülleri (feo-pigmentler), hücrelerin asit ile hidrolizinin ardından spektrofotometrede 664.5, 606 ve 534 nm dalga boylarında en yüksek absorbans değerleri elde edilmektedir. Bu dalga boyları feofitinlere özgü dalga boylarıdır (Shan 1998, Newton 2002).

Klorofil-*a* ölçümlerinde yapılan hatanın temel kaynağı ortamda klorofil-*a* dışında klorofil pigmentlerinin olmasıdır. Özellikle klorofil-*b* bu hatanın asıl nedeni olarak gösterilmektedir Klorofil-*b*, klorofil-*a*'nın olduğundan daha az ölçülmesine ve feo-pigmentlerin ise olduğundan daha yüksek ölçülmesine neden olmaktadır (Newton 2002)

Kırmızı spektrum bölgesinde klorofil-*a* absorbsiyonu, klorofil-*b*, -c_2 ve (c_2+c_1) ile kuvvetli bir etkileşim göstermektedir (Ritchie 2006). Bu nedenle tüm hesaplamalarda 664 nm'deki optik yoğunluk bir sönümlenme katsayısı ile çarpıldıktan sonra diğer pigmentlerin etkileşimini düzeltmek için klorofil-*b*'nin 647 nm'deki absorbans değeri ve klorofil-*c*'nin 630 nm'deki absorbans değeri çıkarılır. Spektrofotometrede ölçüm yapıldıktan sonra klorofil konsantrasyonunun saptanması için pek çok eşitlik bulunmaktadır. Ancak her eşitliğin her organizma ve her çözücü için kullanımı doğru değildir. Örneğin, siyanobakteriler klorofil pigmentleri içerisinde yalnızca klorofil-*a* içerir. Bu nedenle siyanobakterilerde %90'lık metanol içerisindeki klorofil-*a* miktarı:

$$\text{Klrofil-}a\ (\mu g/mL) = 13.9 * A_{665}$$

eşitliği ile hesaplanır (Macias-Sanchez vd. 2005).

Yüksek bitki ve yeşil algler klorofil-*a* ve klorofil-*b* pigmentlerini içermektedirler. Bitki ve yeşil alglerdeki %90'lık aseton içerisinde çözünen klorofil-*a* ve -*b* miktarları:

$$\text{Klorofil-}a\ (\mu g/mL) = 11.93\ A664 - 1.93\ A647$$

$$\text{Klorofil-}b\ (\mu g/mL) = 20.36\ A647 - 5.50\ A664$$

ile hesaplanır (Mitchell ve Kiefer 1984).

2.2.4.2 Karotenoidler

Karotenoid maddeler 640'tan fazla tanımlanmış üyeye sahip olup, organizmalarda en yaygın bulunan pigmentlerdir (Schagerl ve Müller 2006). Kimyasal yapısı 40-karbon polien zincirinden türemiş olup, bu zincir molekülün temelini oluşturur. Polien sistem, karotenoid maddelere kimyasal ve ışık soğurma özelliklerini kazandırır. Bu zincir, halkasal yapılar ile sonlandırılabilir ya da oksijen içeren fonksiyonel gruplar ile tamamlanabilir. Hidrokarbon yapısındaki karotenoidler karoten olarak adlandırılırken, oksijenlenmiş türevleri ksantofiller olarak bilinir. Oksijen, -OH grubu olarak (lutein), -oksi grubu olarak (kantaksantin) ya da her ikisinin kombinasyonu olarak (astaksantin) yer alabilir (Higuera- Ciapara vd. 2006).

Karoten maddeler hücre içerisinde birçok görev üstlenmektedirler. Temel fonksiyonları hücreyi yoğun ışıktan korumaktır. Yeterli miktarda görünür ışığı alan ve ancak uzun süre doğrudan görünür ışığa maruz kalan hücreler ışıktan olumsuz etkilenirler. Fotoreaksiyonlar nedeniyle gerçekleşen bu olay, ışığı absorbe eden pigmentlerin uyarılması ve enerjiyi oksijen üzerine transfer etmesinden kaynaklanır. Oksijenin tek değerlikli O_2^- haline dönüşmesi ile son derece reaktif oksitleyici etken ortaya çıkar. İşte bu durumda karotenoidler devreye girerek oksijenin enerjisini absorblar. Bu

antioksidan özelliği sayesinde reaktif oksijenin zararlarını azaltarak, membran bütünlüğünün korunmasına yardımcı olurlar. Bu görevlerin yanında ışık toplama özelliği ile fotosistem-I ve -II'de fotokimyasal olaylara katılma ve fotosentez için kullanılan ışık dalga boylarının sınırlarını genişletme, tilakoid membran yapısını güçlendirme ile aşırı uyarılmış klorofil molekülünün enerjisini düşürme sayılabilir (Higuera-Ciapara vd. 2006, Schagerl ve Müller 2006, Bulda vd. 2008, Tunail 2009).

Fotosentez yapan dokularda karotenler, klorofil içeren pigment-protein kompleksleri olan tilakoid membranların tamamlayıcı (integral) bileşenleridir (Bulda vd., 2008). *Chlorophycean* familyasında temel karotenoidler kloroplast katmanları içerisinde, tilakoid membranların stromaya dönük kısımlarına yerleşmişlerdir (Gouveia 1996, Tunail 2009).

Mikroalglerin karotenoidleri sentezi türlere bağlı olup, algin yaşı da önemli bir etkendir. Bunun yanında çevresel koşulların değişmesi, örneğin normal tuz değerlerinden sapmalar, sıcaklık, ağır metal konsantrasyonu, ortamdaki azotun kullanılabilirliği ve ışık yoğunluğunda artışlar, hücreler üzerinde stres yaratarak karotenoid sentezinin artmasına neden olurlar (Gouveia 1996). Siyanobakterilerdeki karotenoid miktarı, baskın pigmentlerin miktarı sabit kalırken gelişme koşullarına göre değişkenlik gösterir (Schagerl ve Müller 2006). Elverişsiz kültür koşullarında, birçok mikroalg türünün yüksek miktarda astaksantin, kantaksantin ve ekinenon gibi sekonder karotenoidleri sentezlediği ortaya konmuştur (Orosa vd. 2000).

β- karoten, zaeksantin, ketokarotenoidler (ekinenon ve kantaksantin) ve glikozidli karotenoid miksoksantofil siyanobakterilerde bulunan karotenoid maddelerdir. Miksoksantofiller yalnızca siyanobakterilere özgü olup diğer alg gruplarında tespit edilememiştir (Schagerl ve Müller 2006).

Chlorophycean familyası ise, β-karoten, α-karoten, lutein, violaksantin, neoksantin, anteraksantin ve zeaksantin gibi yüksek bitkilerle aynı temel karotenoidleri içermektedir (Gouveia vd. 1996, Orosa vd. 2000). Bunların aksine, ekinenon, hidroksiekinenon, kantaksantin ve astaksantin gibi ikincil karotenoidler kendiliğinden

bulundukları gibi, temel karotenoidlerin farklı derecelerde esterleşmesiyle de oluşabilirler (Gouveia vd. 1996).

Goodwin (1957), 7 farklı mavi-yeşil alg ile yaptığı çalışmasında, mavi-yeşil algler tarafından β-karoten, ekinenon ve miksoksantofil olmak üzere 3 temel karotenoid sentezlendiğini tespit etmiştir. Zeaksantin ise çok az miktarda bulunmakta olup, toplam karotenoidlerin %30-60'ını β- karotenin oluşturduğunu bildirmiştir.

Orosa vd. (2000), 5 farklı mikroalg türü ile yaptığı çalışmada, azot yetersizliği ve yoğun ışığın *Haematococcus plusvalis*'te astaksantin sentezinin tetikleyicisi olduğunu belirlemişlerdir.

Siyanobakterilerin sahip olduğu toplam karotenoid miktarı %90'lık metanol içerisinde çözündürülerek,

$$\text{Toplam karoten}(\mu g/mL) = 4{,}5 * A_{475}$$

formülü ile hesaplanır (Zou and Richmond, 2000). Burada A %90'lık metanol içerisinde çözünmüş karotenoidlerin 475 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değeridir.

Yeşil mikroalglerde %90'lık aseton içerisinde çözünmüş toplam karoten miktarı ise,

$$\text{Toplam karoten}(\mu g/g) = \frac{A * V * D}{0{,}16 * KM}$$

formülü ile hesaplanır (Gu vd. 2008). Bu eşitlikte A %90'lık aseton içerisinde çözünmüş pigmentin 475nm dalga boyunda elde edilen absorbans değeri, V aseton hacmi (mL), D, seyreltme kat sayısı, KM ise gram cinsinden kurumadde ağırlığıdır.

2.2.4.3 Fikobiliproteinler

Siyanobakteri ve kırmızı alglerde tilakoid membranın sitoplazmaya dönük kısmına yerleşik özel yapılar olan fikobilizomlar, içinde fikobiliproteinleri bulunduran yardımcı pigmentlerdir. Fikobilinler fikoeritrobilin, fikosiyanobilin gibi protein olmayan bileşiklerin, proteinlerle birleşmesi ile meydana gelirler. Proteinin prostetik grubu olan fikobilinler, kovalent bağlı, dört pirol halka yapısının oluşturduğu doğrusal tetrapirol yapısında, parlak renkli suda çözünen proteinler arasında yer almaktadır (Abalde vd. 1998, Tunail 2009).

Fikobiliproteinlerin %75'ini fikosiyaninler, %12'sini allofikosiyaninler, %12'sini de fikoeritrinler ile pigmentsiz polipeptidler oluştururlar (Tunail 2009). Fikobilizomlar merkezinde allofikosiyanin bulunan, fikosiyaninle çevrilmiş olup ve (eğer varsa) en dış katmanda fikoeritrinden oluşurlar. Fikosiyanin temel bileşen olup, allofikosiyanin ise fikobilizomlar ve fotosentetik lameller arasında bağlayıcı pigment görevindedir (Sarada vd. 1999). Fikobiliproteinleri fikobilizoma ve fikobilizomları tilakoid membrana bağlama görevini renksiz polipeptidler üstlenirler (Abalde vd. 1998). Fikosiyaninler klorofillerin tersine, absorbladığı ışığı fotosistem I yerine fotosistem II'ye aktarırlar. Pigment–protein kompleksleri genellikle 550-650 nm dalga boyları arasındaki ışığı absorblar. Bu pigmentlerin amacı görünür ışığın daha geniş sınırlar arasında kullanılmasını sağlamaktır (Tunail 2009).

Fikobiliproteinler suda çözünen protein-pigment kompleksleri halinde kolaylıkla izole edilebilirler (Abalde vd. 1998). *Spirulina platensis*'te fikosiyanin miktarı hücre kuru ağırlığının %20'sini oluşturmaktadır (Chaiklahan vd. 2011).

Fikosiyanin özellikle Uzakdoğu'da gıda ve kozmetik sanayiinde geniş kullanım alanı bulmaktadır. Ancak fikosiyaninin ışığa ve sıcaklığa karşı duyarlı olması yaygın olarak kullanılmasını kısıtlamaktadır. Fikosiyanin kullanım alanını daraltan termal stabilitesinin düşük olması, ortama çeşitli karbonhidratların eklenmesi ile giderilebilmektedir (Furuki vd. 2003). Şekerler gibi polihidrik kosolventler protein

yapısını denatürasyona karşı korumakta ve hidrofobik etkileşimleri güçlendirmektedir (Chronakis 2001).

Bir siyanobakteri veya kırmızı algin sahip olduğu fikosiyanin konsantrasyonu,

$$C\text{-}PC\ (mg/mL) = (A_{620} - 0{,}47A_{652})/5{,}34$$

eşitliği ile hesaplanır (Moraes vd. 2011). Birim gramdan elde edilen fikosiyanin miktarını belirlemek amacıyla verim hesaplaması da;

$$Verim\ (mg/g) = (\ C\text{-}PC * V)\ /KM$$

formülü ile yapılır (Moraes vd. 2011) .

Fikosiyaninin kullanım alanını belirleyen saflık derecesi önemli bir parametredir. Saflık oranının belirlenmesi amacıyla fikosiyanine ait dalga boyu 620 nm'de elde edilen aborbans değerinin, 280 nm'de elde edilen toplam proteine ait absorbans değerine oranıdır (Moraes vd. 2011).

$$Saflık = A_{620} / A_{280}$$

2.2.5 Tokoferol ve steroller

Tokoferoller, fotosentetik (yapraklar vs.) ve fotosentetik olmayan (tohumlar vb.) bitkisel dokularda ve alglerde yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak maya, küf ve alg cinsleri arasında en yüksek tokoferol miktarına sahip olan bir mikroalg olan *Euglena*'dır (Gouveia vd. 2008).

2.2.6 Vitaminler

Mikroalg biyokütlesi esansiyel vitaminleri içeren değerli bir kaynaktır. B_{12} vitamini ve demirin yüksek miktarda bulunması mikroalgleri özellikle vejeteryan bireyler için

oldukça değerli kılmaktadır. Alglerin vitamin içerikleri genotiplerine, gelişme evreleri, algin besleyici durumu ve ışık yoğunluğuna bağlıdır. Ancak hücre içindeki vitamin içeriği çevresel faktörler, hasat yöntemi ve biyokütleyi kurutma metoduna göre dalgalanmalar gösterir (Gouveia vd. 2008).

2.2.7 Antioksidan maddeler

Fotootrof organizmalar olan mikroalgler yüksek oksijen ve radikal stresine maruz kalmaları nedeniyle, reaktif oksijen ve serbest radikallere karşı etkin koruyucu sistemlere sahiptirler. Bu nedenle mikroalglerden elde edilen doğal antioksidanlar kozmetikte (güneş kremi) ve fonksiyonel gıdalarda kullanım alanı bulmaktadır. Doğal bir antioksidan olan α- tokoferol ve yapay bir antioksidan olan BHT ile karşılaştırıldığında metanol ile ekstrakte edilmiş mikroalgal ham ekstraktlar daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (Gouveia vd. 2008).

2.3 Metal Bağlama Özelliğine Sahip Maddeler

Tarımda minerallerin bitkiler tarafından kullanılabilmesi için minerallerle karıştırılarak kullanılan 5 grup madde bulunmaktadır (Anonymus 2011):

- Sentetik metal bağlayıcılar
- Ligno sülfonatlar
- Hümik ve/veya fulvik asit
- Organik asitler
- Protein (Amino asitler)

2.3.1 Sentetik metal bağlayıcılar

Zirai mineral bileşimlerinde en sık kullanılanı EDTA'nın disodyum tuzudur. Sentetik şelat maddeleri arasında en yüksek metal bağlama kapasitesine sahiptir.

EDTA'nın oluşturduğu şelatlar oldukça kararlı yapıdadırlar. Mikrobiyal degradasyona karşı oldukça dayanıklı olduklarından toprakta bozunmadan uzun süre kalırlar. Ancak yaprak üzerine püskürtülerek uygulanan suni gübrelerde bitki ile minerali kullanmak için rekabete girerler. EDTA'nın özellikle kalsiyum iyonu ile yoğun birleşme eğiliminde olması bitkinin bu metali kullanmasını azaltır (Anonymus 2011).

2.3.2 Ligno sülfonatlar

Lignin yüksek bitkilerin odunsu bölgelerindeki temel polimerdir. Tekrarlanan fenil propan gruplarından oluşan lignin, odun kuru ağırlığının %20-30'unu oluşturur.

Ligno sülfonat, molekül yapısındaki uygun yalnızca 2-3 bölge ile gerçek anlamda şelat oluşturabilir. Molekül yapısının büyüklüğü düşünüldüğünde, yalnızca 2-3 bölge ile reaksiyon vermesi etkin bir şekilde şelat yapıcı madde olarak kullanılmasını sınırlandırmaktadır.
Lignin bazlı mineral karışımların en önemli avantajı maliyetlerinin çok düşük olmasıdır. Biyolojik olarak geri dönüştürülebilen polimer olması sayesinde toprak mikroorganizmaları tarafından kullanılabilir. Ayrıca ligno sülfonat toprak uygulamalarında yüzey gerilimini azaltır (Anonymus 2011).

Ligno sülfonatın kullanılmasını sınırlandıran en önemli dezavantajı ise yaprak yüzeyine gübre uygulamalarında molekülün büyük olması nedeniyle, yaprak tarafından kullanılamamasıdır. Ancak uygun sülfonatlama yöntemleriyle düşük molekül ağırlıklı lignin sülfonatlar oluşturulabilir.

2.3.3 Organik asitler

Organik asitler bitkilerde (+2) yüklü metallerin taşınmasında ve çözünmesinde rol alırlar. Negatif yüklü oldukları için anyonik organik asitler olarak bilinirler. Zirai uygulamalarda en çok bilineni ve kullanılanı sitrik asittir.

Yaprak üzerine uygulandıklarında bu anyonik organik asitler pozitif yüklü mineralleri nötralize ederek yaprakta tutunmalarını ve bitki metabolizmasına katılmalarını kolaylaştırırlar.

Sentetik ve bazı amino asit metal bağlayıcılarla karşılaştırıldığında, organik asitler minerallerle özellikle yüksek pH seviyelerinde zayıf bağ yaparlar (Anonymus 2011).

2.3.4 Proteinler (Aminoasitler)

Aminoasitler bitkilerin üretebildikleri, metallerin taşınması ile çözünebilirliğini sağlayan ikinci grup doğal maddelerdir. Bitkilerin dış yüzeyinde bulunan kutikula tabakasının geçirgenliğini arttırarak bitki dokusuna mineral taşınmasını sağlarlar.

Ancak enzimatik protein hidrolizi pahalı bir yöntem olduğundan zirai verim arttırıcılarda kullanılması yaygın değildir (Anonymus 2011).

2.3.5 Hümik maddeler

Topraktaki organik maddelerin ana içeriği humustur. Hümik asit, fulvik asit ve hümin temel hümik madde türevleri olup çoğu topraklarda hümik maddelerin yaklaşık olarak %50 hümin, %40 hümik asit ve %10 fulvik asit şeklinde dağıldığı tahmin edilmektedir (Chiou 1989).

Bitki ve hayvan kalıntılarının ayrışmasıyla meydana gelen hümik maddeler, proteinler, polisakkaritler ve polinükleotitler gibi bileşiklere dönüşmeyen polikondanse bileşiklerdir. Hümik maddeler, kolloidal yapıdaki heterojen makromoleküller olup topraktaki organik moleküllerin %60-70'lik kısmını teşkil etmektedirler (Prakash ve Rashid 1968). Hümik maddeler bir takım fizikokimyasal (sorpsiyon, koagülasyon, asit-baz etkileşimleri ve kompleksleşme reaksiyonları) ve kimyasal tepkimeler (redoks, hidroliz, ve fotokimyasal reaksiyonlar) ile çevresel kirleticilerin etkilerinin azaltılmasına yardımcı olur. Su sistemlerinde organik veya inorganik kirleticilerin

hümik maddeler tarafından bağlanması kirleticilerin hareketliliğini ve biyolojik kullanılabilirliğini değiştirebilir.

Hümik maddeler topraktaki minerallerin bitkiler tarafından alınmasını düzenler ve bitkinin vitamin değerini arttırırlar. Toprağın su tutma kapasitesini arttırarak kuraklığı önlemede yardımcı olur ve erozyonu azaltır. Pestisitlerin zararlı etkilerini azaltırlar (Kutluca 2007).

Hümik maddeler çözünürlüklerine göre dört gruba ayrılırlar (Prakash ve Rashid 1968),

- Hümin ve ulminler
- Hümik asitler
- Fulvik asitler
- Hematomelonik asitler

Hümin ve ulminler, herhangi bir pH değerinde çözünmezler. Kolloidal yapıdaki bu hümik maddelerin algler tarafından kullanılmaları imkânsızdır (Prakash ve Rashid 1968).

Hümik asit ise humusun en aktif maddesidir. Hümik asitler kararlı kümeler oluşturan doğal fenolik biyopolimerlerdir. Fenoller, kinonlar ve amino bileşenlerin kondensasyon ürünleridir. pH'sı 2'den küçük olan asidik özellikteki sularda çözünmezler. Moleküler ağırlığı fazla olup uzun zincir molekül yapısındadır. Rengi koyu kahverengi ile siyah arasındadır. Fulvik asitlere göre daha fazla azot, hidrojen, karbon ve kükürt içerirken daha az oksijen bulundururlar. Yapılarında önemli miktarda hidroksil ($-OH^-$) ve karboksil ($-COOH^-$) grupları bulunur (Anonim 2006, Karakaya 2007, Kutluca 2007, Anonim 2012).

Hümik asitin yapısında bulunan en önemli fonksiyonel grup –COOH gruplarıdır. Bu gruplar hümik asit molekülüne metallerle şelat yapabilme özelliği kazandırırlar. Şelat oluşturma özelliği ile metallerin çökmesi önlenebilir, metal iyonlarının canlılar tarafından metabolizmalarında kullanımı kolaylaşır ve ağır metallerin zehirleyici

etkileri azaltılabilir ve hatta yok edilebilir. Bu etkilerinin yanı sıra hümik asitler ultraviyole ve görünür bölge ışınlarının iletiminde de görev almaktadır (Kutluca 2007).

Hümik asitlerin yapılarında çok sayıda fonksiyonel grup bulunmaktadır. Sahip oldukları –COOH ve kısmen -OH grupları sayesinde iyon değişimi yaparak, -COOH, -OH, $-NR_2$, SH ve heterosiklik yapılar sayesinde kompleks oluşturarak, polar ve apolar kısımlar yardımıyla adsorbsiyon yaparak ve son olarak da kinon ve hidrokinon yapıları sayesinde redoks tepkimeleri vererek çevresinde bulunan maddelerle sürekli etkileşim halindedir (Karakaya 2007).

Fulvik asitler sarı-açık kahverengi renkte, hümik maddelerin herhangi bir pH değerinde suda çözünebilen bileşenidir. Hümik asitlerden daha polar karakterlidirler ve daha fazla –COOH ve $–OCH_3$ grubu içerirler. Molekül ağırlığı, hümik asitlere göre daha düşük olup, sahip oldukları fonksiyonel gruplar nedeniyle hümin ve hümik asitlere göre hidrofil karakterlidirler. Fulvik asitlerin toplam asitliği (900-1400meq/100g) hümik asitlerden (100-870 meq/100g) daha yüksektir (Karakaya 2007).

Fulvik asitler, hümik asitlere göre daha düşük molekül ağırlığına sahiptirler. Ancak hümik asitlere göre daha yüksek miktarda karboksil grubu içermeleri hidrofilik özelliklerini arttırmaktadır. Bu nedenle de hümik asitlerin çözünmediği düşük pH değerlerinde de çözünebilmektedir. Bu sayede metallerle iyi kompleks oluşturabilirken, hidrofob bileşenlere bağlanma kapasitesi düşüktür. Öte yandan yüksek molekül ağırlıklı, hidrofobik çekirdek ve hidrofil gruplardan oluşan uzun zincir (misel) yapısındaki hümik asit, bu farklı gruplar yardımıyla organik hidrofob kirleticilerin adsorbe edilerek yüzeyde tutulmalarını sağlarken, absorbsiyonunu da yapabilmektedir (De Paolis ve Kukkonen 1997).

Fulvik asit hümik aside göre daha küçük bir moleküler yapıya sahip olduğundan kalıcılığı daha azdır ve daha kolay parçalanır. Ancak yaprak uygulamalarında bitkiye giriş hızı daha yüksektir. Hümik asit ise toprakta uzun süre kalır ve zaman içerisinde yavaş parçalanır. Genel olarak toprak organik madde miktarını arttırmada uzun süreli etkilerinden dolayı hümik asitlerden faydalanılır. Çevre koşullarına bağlı olarak fulvik

asitlerin yarı ömrü 10-50 yıl arasında değişirken, hümik asitlerin yarı ömrü ise yüzyıl olarak ölçülür (Anonim 2006).

Hümik asitler, toprağın katyon değişim kapasitesini en yüksek seviyeye çıkartırlar. Kimyasal olarak aktif bir karaktere sahip olduklarından topraktaki çeşitli metaller ve mineraller ile çözünebilir veya çözünemez kompleksler oluşturma yeteneği vardır. Bu şelatlama özelliği bitkinin besinleri kolay ve sürekli almasını sağlar. Demir eksikliğini gidermeye yardımcı olurlar. Topraktaki kireç içerisindeki karbondioksiti serbest duruma getirerek, fotosentezde kullanılmasını sağlar. Topraktaki azot, fosfor, potasyum, demir, çinko ve iz elementler gibi gerekli besinlerin bitki tarafından daha etkin bir şekilde kullanılmasını sağlar (Anonim 2006).

Hümik asit biyokimyasal özelliği ile toprakta mevcut olan kurşun, cıva, kadmiyum ve diğer zararlı ve radyoaktif elementlerin, endüstriyel atıkların, zehirlerin ve çevre için zararlı kimyasal maddelerin çözünebilir durumdan, çözünemez duruma geçmelerini sağlar. Böylece, bunların bitki tarafından emilmelerini önler. Bunların zamanla dibe çökmesi sonucu toprak temizlenir (Anonim 2006).

2.3.5.1 Hümik ve fulvik asitlerin hücrede kullanılması

Hümik ve fulvik asitler, mineral katkılı zirai gübrelere eklendiklerinde maliyeti düşürürler. Eğer bitkide taşınıma katılabilecek kadar küçük partiküller halinde ise bitki kimyasallarının öncül formlarını oluştururlar. Fulvik asit, minerallerin bitki dokularında kullanılmasında veya hareketinde doğrudan görev almaz. Daha çok bitki gelişimini teşvik edici ve bitki hormonlarının öncüllerinin sentezlenmesinde rol oynar İz metal çözeltilerinde hümik moleküller, molekül büyüklükleri ve düşük pH'da zayıf çözünmeleri nedeniyle çökelme eğilimindedirler. Ayrıca büyük moleküller halinde olması nedeniyle verimsiz topraklarda mikrobesin elementlerinin bitkiye püskürtülerek verildiği durumlarda bu besin elementlerinin kullanılma miktarını düşürürler (Anonymus 2011).

Fulvik asit, mineral ve metallerin sudaki çözünürlüklerini arttırarak biyokimyasal aktifliklerini sağlar. Fulvik asit kompleksleri ve şelatları hücre duvarı gibi yarı geçirgen membranlardan geçerek besin maddelerinin iletilmesine yardımcı olur. Fulvik asit hücre gereksinimine göre hem elektron (e^-) alıcısı hem de elektron vericisi olarak davranır. Fulvik asit çözeltisi içerisinde bulunan iz metaller de fulvik asidin bu redoks tepkimelerinde elektrot görevi üstlenirler (Anonymus 2006).

Prakash ve Rashid (1968), hümik asidin demir ile kompleks oluşturduğunu ve algin hücre içine demiri almasını teşvik ettiği ve gelişimini desteklediğini bildirmiştir.

Lange (1970), Zhender-Graham besi ortamında EDTA ve sitratın yerine fulvik asit ekleyerek *A.circinalis*, *Gloeotrichia echinulata*, *Microcystis aeruginosa* ve *Nostoc muscorum* hücre sayılarında önemli artış tespit etmiştir. Fulvik asidin bu etkisinin demiri ve diğer iz elementleri bağlayarak bunların kullanılabilirliğini arttırmasından ileri geldiğini belirtmiştir (Lange 1970).

Birçok mavi-yeşil alg, yapay metal bağlayıcı maddelerin yokluğunda, yüksek pH değerlerinde yaşamlarını devam ettirmelerini sağlayan kendi doğal şelat maddelerini oluşturabilir. Siyanobakterilerle yapılan çalışmada yapay şelat maddesi içermeyen ortamdaki gelişmelerinin algden alge değişme gösterdiği tespit edilmiştir (Lange 1974). Çok düşük hümik asit konsantrasyonlarında *Chlorella vulgaris* ortamda metal bağlayıcı madde yokmuş gibi davranmakta ve gelişimi geç safhalarda hızlanmaya başlamaktadır. Bu da algin, şelat yapıcı madde içermeyen ortamda gelişebilmesi için kendi şelat maddesini sentezlemekte olduğu düşüncesini desteklemektedir (Hoeffner ve Manahan 1980)

Hoeffner ve Manahan (1980), kömürden elde ettikleri hümik asidin *Chlorella vulgaris* gelişimine etkisini araştırmışlardır. Değişen miktarlarda, ayrı ayrı EDTA ve hümik asit içeren besi ortamlarında gelişen *Chlorella vulgaris* için düşük hümik asit derişimleri alg gelişimini teşvik ettiği ancak düşük dozlarda EDTA içeren besi ortamlarının değişken sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Derişimin yavaş yavaş arttırılarak algin ortama alıştırıldığı durumda optimum hümik asit konsantrasyonu 75 mg/L, algin hümik

asite alıştırılmadan doğrudan hümik asit içeren besi ortamında gelişime bırakıldığı durumda ise optimum hümik asit konsantrasyonu 55 mg/L olarak belirlenmiştir.

Ohkubo vd. (1998), Kasumigaura gölünden (Japonya) izole ettikleri hümik ve fulvik asitler ile yaptıkları çalışmada, 1 mg/L hümik asitin kontrol grubuna göre *Microcystis aeruginosa* hücre konsantrasyonunu arttırdığını ve 51mg/L ile en yüksek hücre konsantrasyonuna 20mg/L hümik asit içeren besi ortamında ulaştığını ifade etmiştir. Fulvik asit içeren besi ortamında ise 10 mg/L ve daha az fulvik asit konsantrasyonlarında fulvik asidin etkisi gözlenmemiştir. Bu konsantrasyonlarda hücre gelişimi benzerlik göstermiş ve asıl artış, 20 mg/L fulvik asit içeren besi ortamında 20 mg/L hücre konsantrasyonuna ulaşılmasıyla gerçekleşmiştir. Bu sonuçlara göre her iki asidin de alg gelişimini teşvik ettiği ancak hümik asidin fulvik aside göre şelat oluşturma yeteneğinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Bakırın, EDTA ve fulvik asit içeren besi ortamlarında *Scendesmus suspicatus* 86.81 SAG mikroalginde birikimi ve alg gelişiminin inhibisyon miktarı incelenmiştir. Hem EDTA hem fulvik asit, bakırın alg hücre duvarı tarafından adsorbe edilmesini önleyerek bakırın toksik etkisinin azaldığı belirlenmiştir (Ma vd. 2003).

Pouneva (2005), Biomin (düşük kaliteli linyit kömürünün işlenmesiyle elde edilmiş, organik maddesinin %90'ı hümik asitlerden oluşan bitki büyüme düzenleyicisi) ilave edilmiş besiyerlerinde iki ökaryotik mikroalg (*Scenedesmus* ve *Chlorella*) ve iki siyanobakterinin (*Nostoc* ve *Anabaena*) gelişmelerini karşılaştırmıştır. 1-10 mg/L düzeyinde eklenen Biomin, protein ve klorofil-*a* sentezini hızlandırarak biyokütle artışı sağlamıştır. Etkisinin siyanobakterilerden daha çok yeşil alglerde yüksek olduğu görülmüştür. Pouneva bu etkininin, hümik maddelerin bitkilerde sentezlenen giberellin ve sitokinin gibi büyüme hormonlarına benzer öncül yapıların, alglerdeki sentezini arttırmasıyla gerçekleştiğini öne sürmektedir.

Sun vd. (2005), farklı konsantrasyonlarda demir ve hümik asit içeren kesikli kültür ortamlarında, alg patlamasına neden olan *Anabaena circinalis* siyanobakterisi ile çalışmışlardır. Bu çalışmada *A.circinalis* gelişimi için gereken demir konsantrasyonu

eşik değeri 10^{-8}-10^{-7} M olarak belirlenmiştir. Hümik asit ise toksik etki göstermiştir. Hümik asit, demirin metabolizmada kullanımını azalttığı için hücre çoğalmasını yavaşlatmış ve hücre sayısının en yüksek değere ulaşmasını engellemiştir.

Besi ortamı içerisinde Lantan ve EDTA'nın *Microcystis aeruginosa* ve *Scenedesmus quadricauda*'nın hem gelişimi hem de birbirleriyle olan rekabeti üzerine etkisi araştırılmıştır. Lantan eklenmemiş, yüksek miktarda EDTA (>13,4 µmol/L) içeren besi ortamının *M.aeruginosa* gelişimini inhibe ettiği, bu nedenle de *S.quadricauda*'nın baskın hale geldiği görülmüştür. Lantan ile birlikte orta miktarda (2,69-13,4 µmol/L) EDTA içeren besi ortamında, lantanın *M.aeruginosa*'ya inhibisyon etkisinin azaldığı ve böylelikle ortamdaki baskın türün *M.aeruginosa* olduğu belirtilmiştir (Jin vd. 2009).

Mostafa ve Ali (2010) pirinç samanından elde edilmiş hümik ve fulvik asit çözeltilerini sentetik Zarrouk besi ortamına ekleyerek *Spirulina platensis* gelişimine etkisini araştırmışlardır. 80-100 mL/L hümik asitin pigment miktarı ve gelişimi arttırdığını, fulvik asitin tüm konsantrasyonlarında gelişimin kontrol grubunun altında kaldığı, ancak fulvik asit içeren kültürlerin hümin içeren kültürlere göre daha iyi gelişme gösterdiğini belirlemişlerdir.

Prakash vd. (2011), *Spirulina platensis* üretiminde hümik asidin etkisini gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri bulgular, %0,2 hümik asit içeren Zarrouk besi ortamında, hümik asit içermeyen kontrol grubuna göre kuru madde, protein, klorofil ve yağ asitleri miktarının daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Hümik maddelerin fotosentetik sistemler üzerindeki etkilerini araştırmak için iki ökaryot yeşil alg (*Pseudokirchneriella subcapitata* Hindák ve *Monoraphidium braunii*) ve iki siyanobakteri (*Synechocystis* sp. ve *Microcystis aeruginosa)* farklı konsantrasyonlarda hümik madde içeren sentetik besi ortamlarında geliştirilmişlerdir. Yeterli ışık alan kültürlerin tamamında hümik maddeler alg gelişimini desteklemiştir. Ancak her iki ökaryot algde de artan hümik madde konsantrasyonunda hücre boyutlarını küçültmüştür. Hücre boyutlarının küçülmesi nedeniyle, hücre sayısı artmasına rağmen toplam kuru madde miktarı da azalmıştır. Aynı sonucun

siyanobakterilerde gözlenmediği görülmüştür. *Synechocystis* sp.'te bu durumun aksine (kuru madde):(hücre sayısı) oranı artış göstermiştir. Absorbe edilen ışığın hücrede kullanım etkinliği hümik madde konsantrasyonu arttıkça artış göstermiştir (Bährs ve Steinberg 2012) .

Daha önce yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda yüksek miktarda hümik asit içeren kültürlerde gelişimin yavaşladığı veya durduğu rapor edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki hümik asitin bu toksik etkisi, ortamdaki metallerin büyük çoğunluğunu bağlayarak algin metabolizmasında kullanacağı iyonları etkisiz hale getirmesinden kaynaklanmaktadır. Şelat oluşturma tepkimeleri dışında, yüksek miktarda hümik asit ve ışık, hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumu için uygun koşullar yaratır. H_2O_2, alg metabolizmasında CO_2 kullanınımı inhibe ederek gelişimin durmasına neden olur (Mostafa ve Ali 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroalgler

Bu çalışmada kullanılan *Spirulina platensis* strain Pacifica, Cyanotech (Hawaii) Şirketinin Türkiye satış sorumlusu Alg-Biotek firmasından ücretsiz olarak temin edilmiştir. Tezde kullanılan diğer bir alg olan *Chlorella vulgaris* ise Gazi Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nden sağlanmıştır.

3.1.2 Kültür ortamları

Spirulina platensis strain Pacifica için *Spirulina* (Zarrouk) besiyeri, *Chlorella vulgaris* için BG-11 besiyeri kullanılmıştır. 900 mL olarak hazırlanan besiyerleri 121°C'de 20 dk sterilize edilmiştir.

Besiyerlerinin bileşimleri Ek 1'de verilmiştir.

3.1.3 Efektif Doz Denemesi

Hümik asitin *Spirulina platensis* ve *Chlorella vulgaris*'in gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, EDTA içermeyen *Spirulina* (Zarrouk) ve BG-11 besiyerine sırasıyla 20, 40 ile 60 mg/L hümik asit ve 20, 40, 60 ile 80 mg/L hümik asit çözeltisi ilave edilmiştir.

Fulvik asitin *Spirulina platensis* ve *Chlorella vulgaris*'in gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla da EDTA içermeyen *Spirulina* (Zarrouk) ve BG-11 besiyerine sırasıyla 25, 50, 150 ile 250 mg/L ve 30, 60, 120 ile 180 mg/L fulvik asit çözeltisi ilave edilmiştir.

Efektif doz denemesinde kullanılan değerler yapılan ön denemeler sonucunda belirlenmişlerdir.

3.1.4 Işık Kaynağı

Deneme süresince ışık kaynağı olarak Philips marka 36 W/530 gün ışığı lambalar kullanılmıştır.

3.1.5 Ekipman

Denemeler süresince kullanılan alet ve ekipmanlar Ek 2'de verilmiştir.

3.1.6 Hümik asit çözeltisi

Her bir besiyerine eklenecek olan hümik asit (Sigma-Aldrich, İsviçre), istenen miktarda tartılarak 3mL 0,1 M NaOH içerisinde çözüldükten sonra besiyerine ilave edilmiştir. Böylelikle, hümik asidin besi ortamı içerisinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır.

3.1.7 Fulvik asit çözeltisi

Denemeler süresince kullanılan fulvik asit, TKİ Hümas'ın (TKİ, Türkiye) işlenmesiyle elde edilmiştir. Liyofilize fulvik asit, istenen miktarda tartılıp ardından 3 mL 0,1 N HCl çözeltisinde çözülerek besi ortamına ilave edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Gelişme koşulları

Kültürler 24°C±2'de, 60 µmolfoton/m^2.s ışık yoğunluğunda (3245 lüks), 18:6 (aydınlık:karanlık) ışık çevriminde, *Chlorella vulgaris* sabit, *Spirulina platensis* ise 100 devir/dakika'da çalışan çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. *Chlorella vulgaris* kültürünün çökmesini önlemek amacıyla günde bir kez elle çalkalanmıştır. Hacim küçük olduğu için ayrıca havalandırma yapılmamıştır.

3.2.2 Fulvik asit eldesi

50 g Hümas beher içerisine tartıldıktan sonra üzerine 500 mL 0,5 M NaOH eklenmiştir. 24 saat süreyle karıştırıcıda karıştırılarak, Hümas'ın alkali içerisinde tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Ardından 850x*g*'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda süpernatant toplanarak 6N HCl ile süpernatant pH'ı 2'ye ayarlanmıştır. Asitte çözünmeyen hümik asit ağırlıklı kısım 850x*g*'de 30 dakika santrifüj edilerek ayrılmış ve ham fulvik asit içeren süpernatant liyofilize edilip, sonra tuzların uzaklaştırılması amacıyla diyaliz edilip kurutulmuş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir (Ohkubo vd., 1998). Bu çalışmanın liyofilizasyon aşaması Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Aşı kültürü hazırlanması

Çalışmada kullanılacak kültürlerin aynı özellikte olması deneylerin güvenilirliği bakımından önem taşımaktadır. Bu nedenle deneylerde kullanılan aşı kültürlerin sabit koşullarda hazırlanmıştır.

Deneme kurulmasından 1 hafta önce %10 oranında alg aşılanmış besiyerleri denemenin yürütüleceği koşullarda gelişmeye bırakılmış ve süre sonunda hazırlanmış besiyerlerine başlangıç optik yoğunlukları eşit olacak şekilde aşılama yapılmıştır.

3.2.4 Hasat

Ökaryotik mikroalg olan *Chlorella vulgaris*'in hasadı 20000x*g*'de 20 dakika santrifüj edilip süpernatantın uzaklaştırılması ile yapılmıştır.

Spirulina platensis hasadı ise sahip olduğu hava vezikülleri (Becker,1994) nedeniyle santrifüj işleminin yetersiz kalması, pelet oluşturmaması nedeniyle 1,6 µm gözenek açıklığına sahip filtre kağıdından (FilterLab, 47 mm, İspanya) vakum pompası yardımıyla süzülerek yapılmıştır. Ardından filtrat, alınan örnek hacmi kadar (1:1) 0.1

M sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile filtre kağıdının üzerinde hiç hücre kalmayıncaya kadar yıkanmış ve ekstraksiyona hazır hale getirilmiştir.

3.2.5 Ekstraksiyon

Hemiselüloz ve sakkaritlerden oluşan hücre duvarına sahip ökaryotik bir mikroalg olan *Chlorella vulgaris* hücresini parçalamak amacıyla hasat edilmiş örnek, 4 M HCl çözeltisi ile alüminyum folyo ile kaplanmış falcon tübünde 30 dakika süresince hidrolize edilmiş, ardından asit çözeltisi santrifüj yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Zheng vd. 2011, Gu vd. 2008). Yapılan ön denemeler neticesinde HCl uygulanmış hücrelerde pigment izolasyonu yapılabildiği ancak toplam protein miktarının dondurma çözme metodu ile daha yüksek oranda elde edilebildiği görülmüş olup, bu nedenle toplam protein tayini ve toplam klorofil ile karotenoid miktarlarının belirlenmesinde farklı yöntemler tercih edilmiştir. Dondurma-çözme metoduyla parçalanmış hücreler aseton içerisinde çözüldükten sonra yapılan spektrum taramasında karotenoidlere özgü spesifik dalga boyu saptanamamıştır. Bu nedenle *Chlorella vulgaris* hücrelerinden protein elde etmek için, santrifüj yardımıyla hasat edilmiş ve 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile sulandırılmış örneklere -21ºC'de dondurma, ardından, 95°C'deki su banyosunda 2 dakika süreyle çözme işlemi arka arkaya 5 kez tekrarlanarak hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır.

Prokaryot bir siyanobakteri olan *Spirulina platensis*'in peptidoglukan yapısındaki hücre duvarının parçalanması için yukarıda belirtilen, 5 tekrarlı dondurma (-21ºC), çözdürme (95 ºC'de 2 dakika) işlemi uygulanmıştır.

3.2.6 Günlük yapılan analizler

Deneme süresince gün aşırı pH, optik yoğunluk, sıcaklık ve ışık şiddeti ölçülmüş ve ölçümlerin aynı saatlerde olmasına dikkat edilmiştir.

Optik yoğunluk ölçümü her bir mikroorganizma için deneme başında spektrum taraması yapılarak elde edilmiş dalga boylarında yapılmıştır. Deneme süresince

Chlorella vulgaris gelişimi 693 nm ve 739 nm'de, *Spirulina platensis* gelişimi ise 680,5 ve 443,5 nm'de takip edilmiştir.

3.2.7 Haftalık analizler

Hücre bileşimindeki değişiminin takibi için her iki mikroalgde kuru madde, protein, klorofil-*a* ve karoten analizleri yapılmış, bunun yanında *Spirulina platensis*'te fikosiyanin miktarı da belirlenmiştir.

3.2.7.1 Kurumadde analizi

Örneklerin kuru biyokütle ağırlığını belirlemek amacıyla, 25 mL örnek alındıktan sonra, önceden kurutulup darası alınan filtre kağıdından (FilterLab, 47 mm, İspanya) süzülmüş ve 80ºC'de 24 saat kurutulduktan sonra, kurutulmuş biyokütleden filtre kağıdının darası çıkarılarak kuru madde miktarı belirlenmiştir (Madhyastha ve Vatsala 2007).

3.2.7.2 Protein analizleri

Falcon tüpleri içinde hücre duvarı parçalanmış örnekler parçalama işlemi bittikten sonra 1 gece +4 derecede bekletilmiş ve hücre bileşenlerinin tampona geçmesi sağlanmıştır. Bu difüzyon işlemi sona erdikten sonra örnekler vorteks yardımıyla beşer dakika karıştırılmış ve dibe çökmüş hücre lizatlarının tampon içerisinde homojen olarak dağılması sağlandıktan sonra protein analizleri için örnek alınmıştır.

3.2.7.2.1 Biüret yöntemiyle protein tayini

1-20 mg/ml hassasiyetle çalışan bu yöntemin prensibi, alkali koşullar altında iki değerlikli bakır iyonlarının amonyum, aminoasitler, peptidler ve proteinler gibi amonyumlu bileşiklerle mavi-mor renkli bileşik oluşturması esasına dayanır (Anonim 2011).

Çözeltiler:

%10'luk Na-deoksikolat

%0,9'luk Serum Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Biüret Çözeltisi

Biüret Çözeltisi Hazırlanışı

1. 0,15 g $CuSO_4.5H_2O$ } 50mL saf suda çözülür
   0,6 g Na-K tartarat }
2. 30 mL %10'luk NaOH çözeltisi hazırlanır.
3. 100 mL'lik balon jojede 1 ve 2 no'lu çözeltiler birleştirilip saf su ile hacme tamamlanır.

Oluşan rengin sabitlenmesi için, tercihen karanlıkta, 30 dakika beklenir. 540 nm'ye ayarlı spektrofotometrede 1 no'lu kör tüpe karşı absorbans değeri okunur (Anonim, 2011).

$$y= 0,0913x+0,0033 \quad (R^2=0,9967)$$

Formülü ile örneğin protein miktarı (mg/ml) hesaplanmıştır.

Burada kullanılan serum fizyolojik tuzlu suda tuzun iyonlarına ayrışmasıyla ortaya çıkan Na^+ ve Cl^- iyonları, protein molekülünün dış yüzeyinde bulunan ve dış etkilere açık hidrofilik kısımların stabilizasyonunda görev alırlar (Anonim 2011) .

3.2.7.2.2 Lowry yöntemi ile protein tayini

Alkali koşullarda iki değerlikli bakır iyonu, proteinlerdeki peptid bağları ile bileşik oluşturur ve tek değerlikli bakır iyonuna indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan tirozin, trifptofan ve sistein aminoasitleri Folin reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Yöntemin ilkesi proteinlerin alkali ortamda bir fenol ayıracı ve bakır ile interaksiyonu sonucu oluşan mavi rengin 700-750 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanır (Cemeroğlu 2007).

Çözeltiler:

Çözelti 1: $CuSO_4.5H_2O$ çözeltisi, %1

Çözelti 2: Na-K-tartarat çözeltisi, %1

Çözelti 3: Na_2CO_3 çözeltisi, %2 (0.1 M NaOH çözeltisinde çözündürülerek hazırlanır.)

Çözelti 4: Folin-Ciocaltau, 1N.

Çözelti 1 ve 2'den 1'er mL alınarak 100 mL'lik balon jojeye aktarılır ve Çözelti 3 ile hacme tamamlanır **(Çözelti A)**

Folin ayıracı genellikle 2N olarak hazır bulunduğundan, 1:1 oranında seyreltilerek **Çözelti B** hazırlanır.

Konsantrasyonu bilinmeyen protein çözeltisinden 0,2 mL alınır üzerine 2,1 mL Çözelti A ilave edilir. 10 dakika kendi haline bırakılan karışım üzerine 0,2 mL Çözelti B ilave edilir ve hızla karıştırılır. Bu aşamadan sonra örnekler oluşan rengin sabitlenmesi amacıyla karanlıkta 1 saat bekletilir. Süre sonunda şahit örneğe karşı 750 nm'deki absorbansı okunur. BSA ile hazırlanmış standart eğriden elde edilen formülde yerine koyularak protein miktarı µg/mL olarak hesaplanır. Bu çalışmada toplam protein konsantrasyonunun hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$y=0,0021x-0,015 \ (\mu g/ml)$$

Protein konsantrasyonunun hesaplanmasının sonrasında birim gramdan elde edilen protein miktarını belirlemek amacıyla,

$$\text{Verim (mg/g)} = \frac{x * V}{K.M * 1000}$$

eşitliği kullanılmıştır. Burada x, ilk eşitlikten hesaplanan protein konsantrasyonu, V tampon hacmi (mL), K.M kuru madde ağırlığı (g) ve 1000 "x" protein konsantrasyonunu mg/mL'ye çevirmek için kullanılmıştır.

Lowry protein tayin metodunun çalışma hassasiyeti, biüret protein tayin metoduna göre 50-100 kat daha fazladır. Lowry protein tayininde, reaksiyonun iki basamaktan oluşması (1.aşama, bakırın amid bağları tarafından indirgenmesi, 2. Aşama Folin ayıracının tirozin ve triptofan amino asitleri ile tepkimeye girerek indirgenmesi) analizin hassasiyetini artırmıştır.

3.2.7.3 Klorofil-*a* ve toplam karotenoid miktarının belirlenmesi

Besi ortamlarında aktif biyokütleinin ölçülmesi için haftalık klorofil-*a* miktarları takip edilmiştir.

Chlorella vulgaris hücresinin sahip olduğu pigment miktarının belirlenmesi amacıyla, 25 mL örnek hasat edildikten sonra ışık geçirmez kaplarda 115 devir/dakika'daki çalkalayıcıya konularak HCl ile parçalanmış, santrifüj işlemi ile asit uzaklaştırılmış ve pelet örnek ile aynı hacimde %90'lık aseton içerisinde çözülmüştür. Işık geçirmez kaplarda 30-45 dakika süreyle 115 devir/dakika'da çalışan çalkalayıcıda pigmentlerin asetona geçmeleri sağlanmış ve süre sonunda örnekler tekrar 20000x*g*'de 20 dakika süreyle +4°C'de santrifüj edilerek renksiz hale gelen hücreler ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Spektrofotometrede her ölçüm öncesinde, kontrol grubu örneklere spektrum taraması yapılarak pigmentlerin en yüksek absorbans oluşturduğu dalga boyları belirlenmiş, böylelikle formülde verilen dalga boyları doğrulanmıştır. Klorofil ve karotenlere özgü dalga boylarında elde edilen absorbans değerlerinden 750 nm'de elde edilen absorbans değeri çıkarılarak bulanıklık düzeltmesi yapılmıştır.

Chlorella vulgaris'in sahip olduğu klorofil-*a* ve toplam karoten miktarını belirlemek amacıyla aşağıdaki formül kullanılmıştır (Mitchell ve Kiefer, 1984, Gu vd. 2008):

$$\text{Klorofil-}a\ (\mu g/mL) = (\ 11{,}93 * A_{664}) - (1{,}93 * A_{647})$$

Bu formülde belirtilen A664, klorofil-*a*, A647 ise klorofil-*b*'ye ait spesifik dalga boyu olup, her iki dalga boyunda okunan absorbans değerlerinden 750 nm'deki absorbans değeri çıkarılmıştır.

$$\text{Toplam karoten } (mg/g) = (A*D*V)/(0{,}16*W)$$

Formülde verilen A karotene ait 475 nm'deki absorbans değeri, D dilüsyon oranı, V kullanılan asetonun hacmi (L), W ise gram cinsinden kurumadde ağırlığıdır.

Spirulina platensis hücrelerinin sahip olduğu klorofil-*a* ve toplam karoten miktarının belirlenmesi amacıyla dondurma çözdürme metodu ile parçalanmış, santrifüj yardımıyla fikosiyanin içeren süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet, alınan örnek hacmi ile aynı miktarda %90'lık metanol ile çözülmüştür. 70°C'ye ayarlanmış su banyosunda 7-10 dakika bekletildikten sonra örnekler hızla soğutulmuş, ve 20000x*g*'de santrifüj edilerek hücreler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen berrak süpernatantın spektrofotometrede 665 nm ve 480 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür.

Siyanobakterilerin sahip olduğu temel pigmentler fikosiyanin, klorofil ve karotenlerdir. *Spirulina platensis*'in klorofil pigmentleri içerisinde yalnızca klorofil-*a* içerir (Lorenz, 1998). Klorofil-*a* miktarının doğru bir şekilde hesaplanabilmesi için fikosiyaninlerin ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir (Becker 1994). Santrifüj sonrasında,yeterli parçalanmamış hücrelerde kalan fikosiyanin pelet oluşturarak ortamda ayrılmaktadır.

Spirulina platensis'in sahip olduğu klorofil-*a* ve karoten miktarları aşağıdaki eşitlikler ile hesaplanmıştır (Macias-Sanchez vd., 2005).

$$\text{Klorofil-a}\ (\mu g/mL) = 13{,}9 * A_{665}$$

$$\text{Karoten } (\mu g/mL) = (4{,}5 * A_{480})$$

3.2.7.4 Fikosiyanin miktarının belirlenmesi

Spirulina platensis yaş biyokütlesinin (25 mL) hasat edilmesinin ardından, ardı ardına 5 kez -21°C'de dondurma ve 95°C'deki su banyosunda çözdürme işleminden sonra fikosiyaninin 0,1 M sodyum fosfat (pH 7) tamponunda çözünmesi amacıyla +4°C' de 18-20 saat süreyle bekletilen örnekler santrifüj edilmiş ve berrak, mavi süpernatantın fikosiyanin içeriği spektrofotometrede ölçülmüştür. Bu amaçla yapılan spektrum taramasında fikosiyanine ait en yüksek absorbansın saptandığı dalga boyu 620 nm olarak belirlenmiştir.

Fikosiyanin konsantrasyonu (C-PC) (mg/mL) 652 ve 620 nm'deki optik yoğunluk değerlerini kullanarak aşağıdaki eşitlikle hesaplanır (Moraes vd. 2011)

$$\text{C-PC (mg/mL)} = (A_{620} - 0{,}47A_{652})/5{,}34$$

Bu denklemde A_{620} fikosiyanine özgü dalga boyundaki absorbans değerini, A_{652} ise fikoeritrine ait spesifik dalga boyunda oluşturduğu absorbans değerini ifade etmektedir. Saflık faktörü, fikosiyaninin 620 ve 280 nm'deki absorbans değerlerinin birbirine oranı (A_{620}/A_{280}) ile belirlenmiştir (Abalde vd. 1998). Faktörün hesaplanmasında, 620 nm fikosiyanin konsantrasyonunu gösterirken, 280nm çözeltideki toplam protein konsantrasyonunu ifade etmektedir.
Birim gram *Spirulina platensis* kuru maddesinin sahip olduğu fikosiyanin miktarının mg/g cinsinden belirlemek için,

$$\text{Verim (mg/g)} = (\text{C-PC} * V) /KM$$

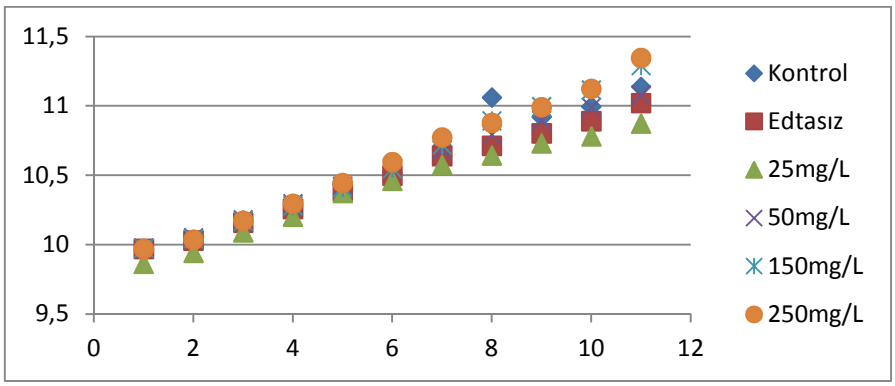
eşitliği kullanılmıştır (Moraes vd. 2011). Bu eşitlikte C-PC fikosiyanin konsantrasyonunun mg/mL olarak değerini, V kullanılan tampon hacmini (mL) ve KM gram olarak kuru madde ağırlığını belirtmektedir.

3.2.8 İstatistiksel değerlendirme

Çalışma süresince elde edilen veriler Mini-Tab (Versiyon 15.1, ABD) paket programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir.

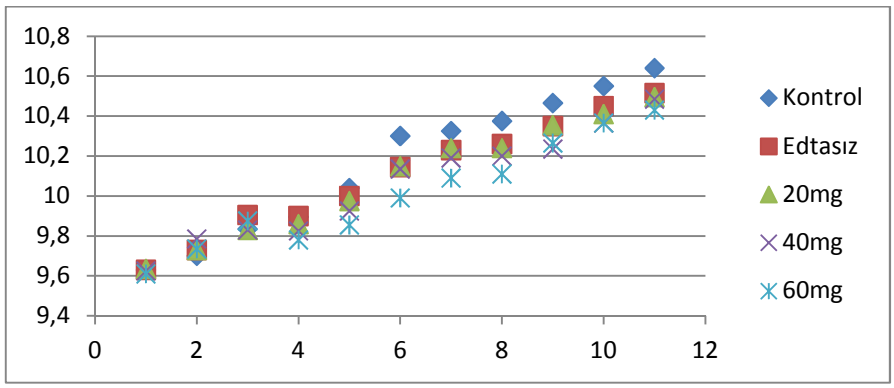
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Deneme Süresince pH'da Meydana Gelen Değişimin İncelenmesi



Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren Zarrouk besi ortamının pH değişimi (*Spirulina platensis*)

Fulvik asit kullanılan deneme süresince en yüksek pH değerine 21.günde 250 mg/L fulvik asit konsantrasyonunda ulaşılmıştır (pH 11.34).

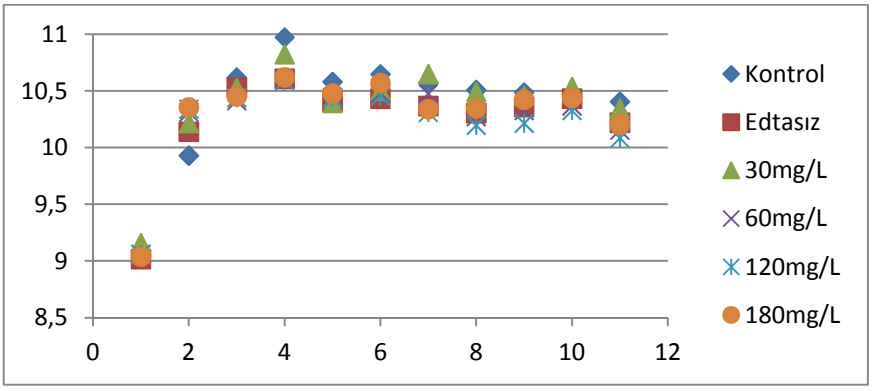


Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren Zarrouk besi ortamının pH değişimi (*Spirulina platensis*)

Hümik asit içeren denemede ise pH değerleri fulvik asitte olduğu gibi aşırı yükselmemiştir. En yüksek pH değeri 10.64 olarak belirlenmiştir.

Sabit koşullarda yetiştirilen *Chlorella vulgaris* ve 100 devir/dakika hızda çalışan çalkalamalı inkübatörde *Spirulina platensis*'in pH değerleri karşılaştırıldığında,

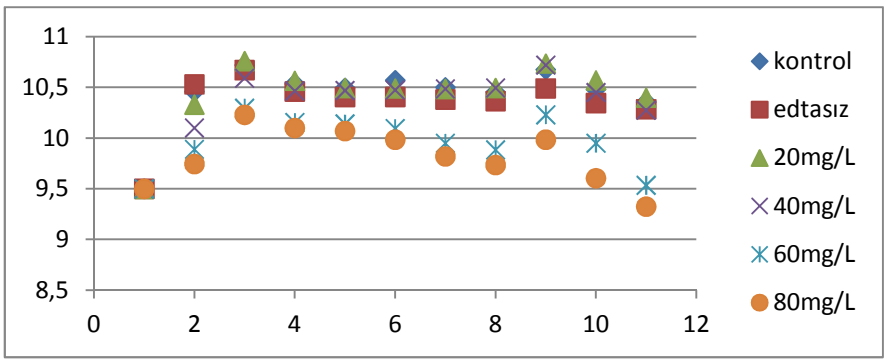
çalkalama ile hava girişi sağlanan *Spirulina platensis* kültüründe pH değerlerinin daha kararlı ve artışlarının doğrusal olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlarda fulvik asit içeren BG-11 besi ortamının pH değişimi (*Chlorella vulgaris*)

Ancak sabit kültürde gelişen *Chlorella vulgaris*'in hem hümik hem de fulvik asit denemesinde pH değerlerinin değişken ve değerlerde, günler arasında dalgalanmalar olduğu görülmektedir.

Spirulina platensis ve *Chlorella vulgaris* kültürlerinin ikisinde de yüksek pH değerlerinde, kültürün sahip olduğu canlı hücre sayısının da yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlarda hümik asit içeren BG-11 besi ortamının pH değişimi (*Chlorella vulgaris*)

Spirulina platensis alkali koşullarda daha iyi gelişim gösteren bir mikroalg olduğu için gelişmesi için en uygun pH aralığı 9-10 arasındadır (Belkin ve Boussiba 1991, Rodrigues vd. 2010). Zheng ve arkadaşları (2012), *Spirulina platensis* için, pH 7-11 aralığında 5 farklı pH değerinde besi ortamının, *Spirulina platensis* gelişimine etkisini araştırmışlar ve en yüksek gelişmenin 3,1g/L ile pH 9 olan kontrol grubu örnekte olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yeh vd. (2010), *Chlorella vulgaris*'in farklı ışık ve karbon kaynaklarında gelişimini incelemişlerdir. Burada $NaHCO_3$'ün, Na_2CO_3'e göre biyokütle verimini daha fazla arttırdığı ve pH 5 ile 10 arasında biyokütle artışıları arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir.

Gelişim sürecinde pH yükselmesinin nedenlerinden biri, azot kaynağı olarak kullanılan NO_3^-'ın amonyağa dönüştürülme sürecidir. *Spirulina platensis* hücrelerinin NO_3^-'ı kullanabilmeleri için öncelikle amonyağa indirgemeleri gerekmektedir. Çünkü amonyak alg hücresi tarafından, enerji harcanmadan (difüzyon) hücre içine alınarak metabolizma faaliyetlerinde doğrudan kullanabilmektedir (Rodrigues vd. 2010, Zheng vd. 2012).

pH yükselmesinin bir diğer nedeni de HCO_3^- iyonunun hücre içerisine taşınmasıyla CO_2 ve CO_3^- iyonuna dönüşmesidir. Bu dönüşüm sonucu oluşan ürünler fotosentezde karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. CO_2 beslemesi yapılan kültürlerde pH değerleri, CO_2 beslemesi yapılmayan kontrol grubuna göre daha düşük seviyede olup pH profili daha stabildir. Ayrıca CO_2'in besi ortamında karbonik asit olarak çözünmesi mikroalg gelişimi ile pH yükselişini kontrol etmektedir (Zheng vd. 2012).

Alava vd. (1997), toplam karbon konsantrasyonu 0,1 ve 0,2 M olan NaOH ile pH'sı yükseltilmiş iki farklı Zarrouk besi ortamında, CO_2 tutulma miktarını araştırmışlardır. Düşük pH'da CO_2'in besi yerinde tutulması azalırken, yüksek pH'da atmosfer CO_2'inin besi ortamı içerisinde daha iyi çözündüğünü göstermişlerdir.

Gelişme ortamlarından BG-11'in başlangıç pH değerleri 8 civarındadır. Hümik asit denemesinde bu pH değeri, sterilizasyon sonunda çöken hümik asitin yeniden çözünmesi için yeterli değildir. Ancak alg faaliyeti sonucunda (solunum+fotosentez) yükselen pH değeri ve algin hümik asiti kullanmaya başlaması ilerleyen günlerde çöken hümik asit yeniden çözünür duruma geçmesi sağlanmıştır. Sterilizasyon sonrası çöken hümik asit, 0. gün analizlerinde karotenoid miktarının doğru bir şekilde saptanmasını önlemiştir.

Başlangıç pH değeri 9 olan Zarrouk besiyerinde ise hümik asit çökmemiş, ayrıca kültürün çalkalamalı inkübatörde gelişmesi nedeniyle de herhangi bir sorun teşkil etmemiştir.

4.2 Optik Yoğunluk Ölçümleri

Deneme başlangıcında örnek gelişimlerinin takip edilebilmesi için, *Chlorella vulgaris* ve *Spirulina platensis* örneklerinin kontrol gruplarında spektrum taraması yapılmış ve *Chlorella vulgaris* için 693 ile 739 nm, *Spirulina platensis* için 680,5 ve 443.5 nm dalga boyunda en yüksek absorbans değerleri elde edilmiştir. Bundan sonraki her denemede bu dalga boyları kullanılmıştır. Optik yoğunluk okumaları, denemede kullanılan her örneğe ait, aşılama yapılmadan ayrılmış boş besiyerleri kontrol olarak kullanılmıştır.

Farklı derişimlerde fulvik ve hümik asit içeren Zarrouk ve BG-11 besi ortamında *Spirulina platensis* ve *Chlorella vulgaris*'in kültürdeki yoğunlukları zamana bağlı olarak artış göstermiştir.

Zarrouk besi ortamında *Spirulina platensis* hücre yoğunluğu, ölçümlerin devam ettiği süre içerisinde artmaya devam etmiştir. Hücre bölünmesinin yavaşladığı, iki ölçüm arasındaki farkın azaldığı saptandığından, ölçümler 21.günde, durağan faza ulaşılması nedeniyle inkübasyona ve haftalık analizlere son verilmiştir. Ancak BG-11 besiyerinde *Chlorella vulgaris* hücre yoğunluğu ortam pH'sına bağlı olarak dalgalanmalar göstermiştir. Besi ortamı içindeki koşulların değişmeye başlaması, besin yetersizliği,