



***Spirulina platensis*'ten FARKLI ORTAM
KOŞULLARINDA BİYOKÜTLE ve GAMA-LİNOLENİK
ASİT ÜRETİMİ**

**Oya Irmak
ŞAHİN CEBEÇİ**



***Spirulina platensis*'ten FARKLI ORTAM
KOŞULLARINDA BİYOKÜTLE ve GAMA-
LİNOLENİK ASİT ÜRETİMİ**

**Oya Irmak
ŞAHİN CEBECİ**



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Spirulina platensis*'ten FARKLI ORTAM KOŞULLARINDA BİYOKÜTLE
ve GAMA-LİNOLENİK ASİT ÜRETİMİ**

Oya Irmak ŞAHİN CEBECİ

Doç. Dr. Arzu AKPINAR BAYİZİT
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2015

TEZ ONAYI

Oya Irmak ŞAHİN CEBECİ tarafından hazırlanan “*Spirulina platensis*’ten Farklı Ortam Koşullarında Biyokütle ve Gama-Linolenik Asit Üretimi“ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Arzu AKPINAR BAYİZİT

Başkan:	Doç. Dr. Arzu AKPINAR BAYİZİT U.Ü. Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü	İmza
Üye:	Doç. Dr. Tülay ÖZCAN U.Ü. Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü	İmza
Üye:	Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	İmza
Üye:	Prof. Dr. F. Julide HIZAL YÜCESOY Y.Ü. Mühendislik Fakültesi, Kimya ve Süreç Mühendisliği Bölümü	İmza
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Deniz YAĞLIOĞLU D.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	İmza

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü

.././2015

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

30/07/2015

Oya Irmak ŞAHİN-CEBECİ

ÖZET

Doktora Tezi

Spirulina platensis'ten Farklı Ortam Koşullarında Biyokütle ve Gama-Linolenik Asit Üretimi

Oya Irmak ŞAHİN CEBECİ

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu AKPINAR BAYİZİT

Bu tez çalışmasında azot sınırlamasının (%25, %50, %75 ve %100 N konsantrasyonu) ve sıcaklık değişiminin (25°C ve 30°C) *Spirulina platensis* türünde biyokütle verimi, protein, lipid, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitesi ile yağ asidi profili üzerine etkisi araştırılmıştır.

Sıcaklık artışıyla genel anlamda biyokütle miktarı artarken kuru ağırlıkta azalma meydana gelmiştir. Bununla birlikte, en yüksek lipid miktarının elde edildiği 25°C %25 N konsantrasyonlu *Spirulina* besi ortamı örneklerinin dışında (A50_{Lipid}; %12,31±1,72) tüm örneklerde sıcaklığın 30°C'ye yükselmesi ile protein, lipid, toplam fenolik madde ve toplam karotenoid miktarları en yüksek düzeyde bulunmuştur. En yüksek protein C100: %80,0419; C75: %78,8284; C25: %77,8715, lipid C75: %4,3393; C25: %3,5714, toplam fenolik madde C25: 1,4717±0,30 mg g⁻¹ GAE; C75: 1,4536±0,07 mg g⁻¹ GAE, toplam karotenoid C75: 0,1194±0,02 mg g⁻¹; D75: 0,0953±3,35 mg g⁻¹ olarak 30°C'de geliştirilen örneklerde ulaşımlardır.

Bununla birlikte en yüksek PUFA değerleri D75: %42,6098; D100: %41,3657; D50: %36,3536 ile 30°C'de en yüksek değerlere ulaşırken, GLNA B100: %24,7354; B75: %23,7851; D75: %23,2055 ile hem 25°C'de hem de 30°C'de yüksek değerler vermiştir.

Anahtar kelimeler: *Spirulina platensis*, yağ asidi, GLNA, N sınırlaması, sıcaklık

2015, x + 82 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

Biomass and Gamma-Linolenic Acid Production by *Spirulina platensis* under Different Growth Conditions

Oya Irmak ŞAHİN CEBECİ

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu AKPINAR BAYİZİT

In this thesis, the limitation of nitrogen (25%, 50%, 75% and 100% N concentration) and temperature fluctuations (25°C and 30°C) on *Spirulina platensis* biomass yield, protein, lipids, total phenolic and antioxidant capacity with fatty acid profile were investigated.

The temperature increase has occurred in general decrease in the amount of biomass with an increase of dry weight. Besides the sample 25°C + 25% N *Spirulina* medium that gave the highest level of the lipid accumulation (A50 lipid; % 12,31 ± 1,72), for all growth trials, with rising the temperature to 30°C, protein, lipid, total phenolic and total carotenoid contents were also reached its highest value. The highest protein content was determined in samples C100: 80,0419%, C75: 78,8284% and C25: 77,8715%, with lipid in C75: 4,3393% and C25: 3,5714%; total phenolics in C25: 1,4717 ± 0,30 mg g⁻¹ GAE and C75: 1,4536 ± 0,07 mg g⁻¹ GAE; and total carotenoids in C75: 0,1194 ± 0,02 mg g⁻¹ and D75: 0,0953 ± 3.35 mg g at 30°C.

Consequently, the highest PUFA values were found in D75: 42,6098%, D100: 41,3657% and D50: %36,3536 at 30°C, whereas GLNA was in B100: 24,7354%, B75: 23,7851% and D75: 23,2055%. GLNA values were significantly high both during growth at both 25°C and 30°C.

Keywords: *Spirulina platensis*, fatty acid, GLNA, N limitation, temperature

2015, x + 82 pages

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca yanımda olan ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen çok sevgili danışman hocam Doç. Dr. Arzu AKPINAR BAYİZİT'e, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bana vakit ve emek harcayan hocam Prof. Dr. F. Jülide HIZAL YÜCESOY'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca hayatımın her evresinde bana inanarak maddi ve manevi destek ve güç veren sevgili ailem ile tez çalışmam boyunca yanımda olan eşime ve biricik kızım ÖYKÜ NEHİR'e ve lisansüstü eğitimimin bana kattığı en değerli varlık, sevgili arkadaşım Araş. Gör. Dr. Gökçen YILDIZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Oya Irmak ŞAHİN CEBECİ
30/07/2015

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	10
2.1. Algler	10
2.1.1. Alglerin sınıflandırılması.....	11
2.1.2. Genel özellikleri.....	11
2.1.3. Alglerin kullanım alanları ve alglerden elde edilen ürünler	14
2.1.4. <i>Spirulina platensis</i> 'in özellikleri	16
2.2. Önceki çalışmalar.....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1 Kültüre alınan tür	27
3.1.2. Kültür ortamları.....	28
3.1.3. Gelişim koşulları.....	29
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Kültür ortamlarının hazırlanması	30
3.2.2. Denemenin yürütülmesi.....	30
3.2.3. Optik yoğunluk.....	30
3.2.4. <i>S. platensis</i> 'in hasat edilmesi ve biyokütle miktarının belirlenmesi ...	31
3.2.5. Toplam protein analizi.....	31

3.2.6. Toplam yağ analizi	32
3.2.7. Yağ asitleri kompozisyonu analizi	33
3.2.8. Toplam fenolik madde analizi	34
3.2.9. Toplam karotenoid analizi.....	35
3.2.10. Antioksidan kapasite analizi	36
3.2.11. İstatistik analizi	37
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	38
4.1. <i>S. platensis</i> 'in Gelişimi	38
4.2. <i>S. platensis</i> 'in Kimyasal Özellikleri	43
4.2.1 Toplam protein değerleri.....	43
4.2.2 Toplam yağ değerleri	48
4.2.3 Toplam fenolik madde, toplam karotenoid ve antioksidan kapasite değerleri	50
4.2.4 <i>S. platensis</i> 'in yağ asitleri kompozisyonu	58
5. SONUÇLAR.....	66
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ.....	81

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Simgeler	Açıklama
Δ	Delta
ω	Omega
μ	Mikron
μL	Mikrolitre
L	Litre
mL	Mililitre
C	Karbon
Fe	Demir
N	Azot
P	Fosfor
g	Gram
M	Molar
mM	Milimolar
Pa	Pascal

Kısaltmalar

Açıklama

ABTS	2,2-azinobis-3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit
ACP	Açıl Taşıyıcı Protein
ALNA	Alfa Linolenik Asit
ARA	Araşidonik Asit
CO ₂	Karbondioksit
CoA	Koenzim A
DGLNA	Dihomo- γ -Linolenik Asit
DHA	Dokozahekzaenoik Asit
DPPH	Difenil Pikrilhidrizil
DW	Kuru Ağırlık
EFA	Esansiyel Yağ Asitleri
EPA	Eikozapentanoik Asit
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GLNA	Gama Linolenik Asit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LA	Linoleik Asit
LT	Lökotrien
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NaNO ₃	Sodyum Nitrat
NaOH	Sodyum Hidroksit
Nm	Nanometre
OD ₆₈₀	Optik Yoğunluk
OH	Hidroksil Grubu

PG	Fosfodigliserol
PHB	Polihidroksibütirat
PO ₄	Fosfat Grubu
PUFA Acids)	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (Polyunsaturated Fatty
SCO	Tek Hücre Yağı (Single Cell Oil)
SH	Sülfür Grubu
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
THY	Tek Hücre Yağı
UTEX	University of Texas
UV-Vis	Ultraviyole-görünür



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Lipidlerin sınıflandırılması	2
Şekil 1.2 Yağ asidi sentezinde başlangıç ve zincir uzama reaksiyonları	3
Şekil 1.3 Palmitik asitten diğer yağ asitlerinin sentezlenmesi	4
Şekil 1.4 <i>Spirulina platensis</i> (a) ve <i>Spirulina maxima</i> (b)'nin mikroskopik görüntüsü	8
Şekil 3.1 Denemede kullanılan <i>Spirulina platensis</i>	27
Şekil 3.2 Yürütülen çalışmanın görüntüleri	31
Şekil 3.3 Standart gallik asit eğrisi	35
Şekil 3.4 DPPH radikalinin Troloks standardına ait % inhibisyon eğrisi	36
Şekil 4.1 A grubuna ait OD ₆₈₀ değerleri	39
Şekil 4.2 B grubuna ait OD ₆₈₀ değerleri	39
Şekil 4.3 C grubuna ait OD ₆₈₀ değerleri	40
Şekil 4.4 D grubuna ait OD ₆₈₀ değerleri	40
Şekil 4.5 <i>Spirulina platensis</i> 'e ait kuru biyokütle (g L ⁻¹)-spesifik gelişme oranı (SGO) korelasyonu	41
Şekil 4.6 A grubu protein (%)-biyokütle (g L ⁻¹) korelasyonu	47
Şekil 4.7 B grubu protein (%)-biyokütle (g L ⁻¹) korelasyonu	47
Şekil 4.8 C grubu protein (%)-biyokütle (g L ⁻¹) korelasyonu	47
Şekil 4.9 D grubu protein (%)-biyokütle (g L ⁻¹) korelasyonu	47
Şekil 4.10 A grubu yağ (%)-biyokütle (g L ⁻¹) korelasyonu	51
Şekil 4.11 B grubu yağ (%)-biyokütle (g L ⁻¹) korelasyonu	51
Şekil 4.12 D grubu yağ (%)-biyokütle (g L ⁻¹) korelasyonu	51
Şekil 4.13 A grubu toplam karotenoid (mg g ⁻¹)-toplam fenolik madde (mg GAE g ⁻¹) korelasyonu	56
Şekil 4.14 B grubu toplam karotenoid (mg g ⁻¹)-toplam fenolik madde (mg GAE g ⁻¹) korelasyonu	56
Şekil 4.15 C grubu toplam karotenoid (mg g ⁻¹)-toplam fenolik madde (mg GAE g ⁻¹) korelasyonu	56
Şekil 4.16 D grubu toplam karotenoid (mg g ⁻¹)-toplam fenolik madde (mg GAE g ⁻¹) korelasyonu	56
Şekil 4.17 A grubu antioksidan kapasite (µM Troloks g ⁻¹)-toplam fenolik madde (mg GAE g ⁻¹) korelasyonu	57

Şekil 4.18 B grubu antioksidan kapasite (μM Troloks g^{-1})-toplam fenolik madde (mg GAE g^{-1}) korelasyonu	57
Şekil 4.19 C grubu antioksidan kapasite (μM Troloks g^{-1})-toplam fenolik madde (mg GAE g^{-1}) korelasyonu	57
Şekil 4.20 D grubu antioksidan kapasite (μM Troloks g^{-1})-toplam fenolik madde (mg GAE g^{-1}) korelasyonu	57



ÇİZELGELER DİZİNİ

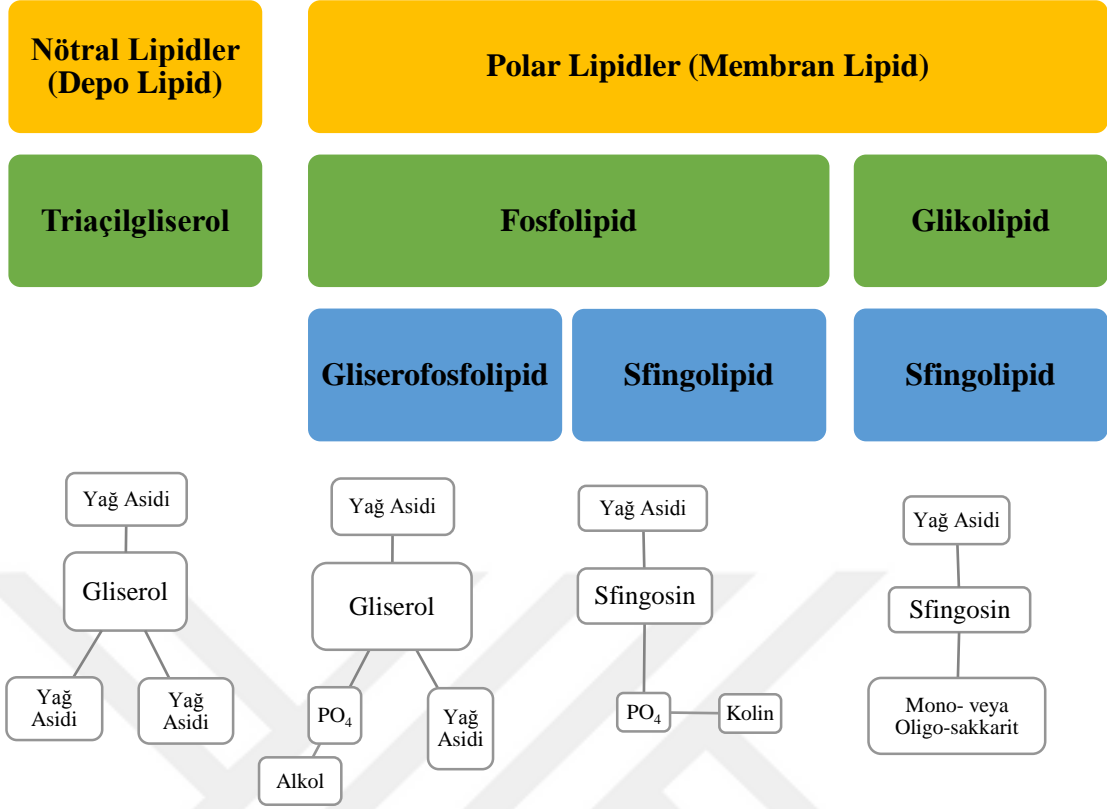
	Sayfa
Çizelge 1.1 Spirulina tozunun genel özellikleri	9
Çizelge 2.1 Alglerin sınıflandırılması	12
Çizelge 3.1 Spirulina besiyeri bileşimi	28
Çizelge 3.2 Zarrouk besiyeri bileşimi	29
Çizelge 3.3 Gelişim gruplarının adlandırılması	30
Çizelge 3.4 GC-FID çalışma koşulları	33
Çizelge 4.1 <i>S. platensis</i> 'e ait gelişim değerleri	38
Çizelge 4.2 <i>S. platensis</i> 'e ait kimyasal analiz sonuçları	44
Çizelge 4.3 Biyokütle ile protein korelasyonuna ait R tablosu	46
Çizelge 4.4 Biyokütle ile yağ korelasyonuna ait R tablosu	49
Çizelge 4.5 Protein, toplam fenolik madde, toplam karotenoid ve antioksidan kapasite korelasyonuna ait R tablosu	55
Çizelge 4.6 Farklı stres koşullarında geliştirilen <i>S. platensis</i> 'e ait yağ asitleri değişimleri	60
Çizelge 4.7 Doymuş yağ asitleri oranları (%)	63
Çizelge 4.8 Tekli doymamış yağ asitleri oranları (%)	64
Çizelge 4.9 Çoklu doymamış yağ asidi oranları (%)	65

1. GİRİŞ

Karbonhidratlar ve azotlu maddeler ile birlikte temel besin maddelerinin makro molekül grubu içinde yer alan lipidler (yağlar), yapılarında hidrojen, karbon, oksijen, azot, fosfor ve kükürt elementleri ile amid, fosfat esterleri, primer ve sekonder alkol grupları, serbest ya da esterleşmiş karboksil grupları ve amin grupları bulunan organik maddelerdir.

Lipidler, hücre yapısında ve dokularda bulunabildikleri gibi, bunların enerji gereksiniminin karşılanmasında da rol oynamaktadır. Yağların oksidasyonu için protein ve karbonhidrat gibi diğer organik maddelere göre daha fazla oksijenin harcanması gerekmekte ve böylece daha yüksek miktarda enerji açığa çıkmaktadır. Bu nedenle yağlar hayvansal organizmalar için önemli bir enerji kaynağı, bitkisel organizmalar için ise depo maddesi olarak değerlendirilmektedir (Gunstone 1997, O'Keefe 2008). Ayrıca yağda çözünebilen A, D, E ve K vitaminleri ile doğal ya da sentetik pigmentleri kapsayan diğer besin maddelerinin emilimi için taşıyıcı olarak görev yapmaktadırlar (Bilgüven 2002).

Canlı organizmalarda pek çok önemli rol oynayan lipidler iki ana grup altında toplanabilirler: nonpolar lipidler (açılgliceroller, steroller, serbest yağ asitleri, vakslar ve steril esterler) ve polar lipidler (fosfolipidler, glikolipidler) (Anonim 2013). Diğer bir sınıflandırmaya göre ise, basit (sabunlaşabilir/yağ asitlerinin esterleri: yağlar ve mumlar), bileşik (sabunlaşamaz/yağ asitlerinin yanı sıra alkol gibi gruplar içeren) ve türemiş (hidrokarbon ve buna bağlı hidrokarbon yan zinciri içeren) lipidler olarak isimlendirilmektedirler (Murray ve ark. 2006, Satyanarayana ve Chakrapani 2013) (bkz. Şekil 1.1). Bazı kaynaklar ise lipidleri nötral yağlar ve lipoidler (yağlarla birlikte bulunan ve yağa benzer özellikler gösteren maddeler) olarak gruplandırmaktadır (Culling 2013).

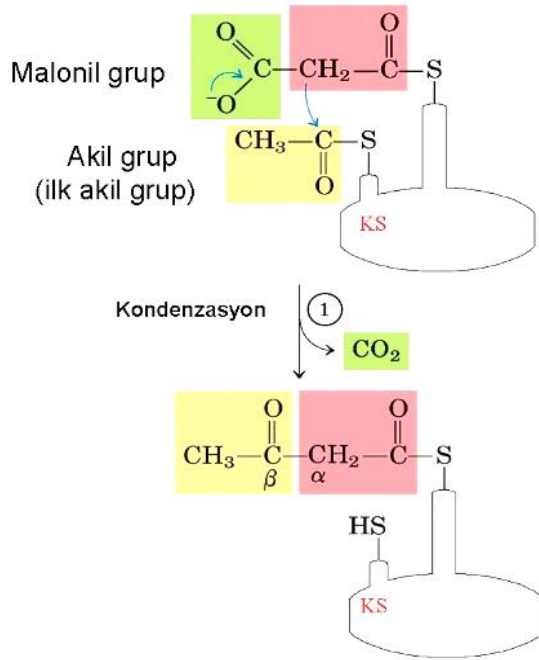


Şekil 1.1 Lipidlerin sınıflandırılması

Yağ asitleri serbest ya da triaçilgliseroller gibi daha karmaşık moleküllerde yağ asidi esterleri olarak bulunan ve 4'ten 36'ya kadar karbon içeren hidrokarbon yapılı karboksilik asitlerdir (Andersson ve Wynn 2001). Moleküllerindeki karbon sayısına göre; <6 karbon: "kısa", 6-10 karbon: "orta", >12 karbon: "uzun" zincirli yağ asitleri olarak adlandırılmaktadırlar. Hidrokarbon zincirindeki bağlara göre doymuş ve doymamış olmak üzere iki grupta altında da incelenebilirler (Nelson ve Cox 2013). Doymuş yağ asitlerinin yapısında hiç çift bağ bulunmazken, doymamış yağ asitleri en az bir ya da daha fazla çift bağ içermektedir (Kaya ve ark. 2004).

Yağ asitlerinin sentezinde ilk reaksiyon ACP-açiltransferaz tarafından katalize edilmektedir. Asetil-CoA'nın asetil grubu yağ asidi sentetaz sisteminin spesifik sistein amino asidine bağlanmaktadır. İkinci reaksiyon ise malonil-CoA'nın malonil grubu fosfopentatein'in sülfidril grubuna taşınmasıdır. Reaksiyon ACP-maloniltransferaz tarafından katalize edilmektedir. Kondenzasyon basamağına

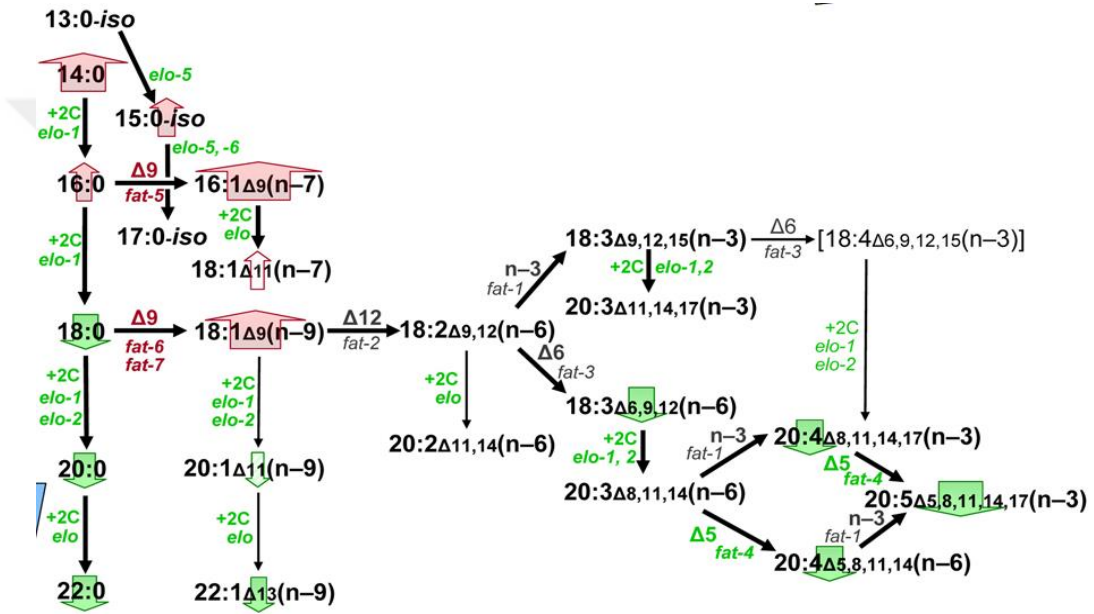
geçmeye hazır olan sistemde asetil grubu sisteinin -SH grubuna ve malonil grubu da fosfopentateinin -SH grubuna bağlı durumdadır (Şekil 1.2). Yedi malonil-CoA ve bir asetil CoA'nın reaksiyona girerek dört yağ asidi sentez basamağında yedi defa tekrar etmesi ile 16 C'lu palmitil-ACP sentezlenmektedir. Bazı organizmalarda yağ asidi sentezi zincir uzaması ile oluşan 16 C'lu palmitik asit ile son bulmaktadır. Sentez sonunda oluşan palmitil ACP, palmitil ACP deaçilaz enzimi aracılığı ile koparılmakta ve palmitik asit serbest kalmakta ve C zinciri uzamaya devam edebilmektedir (Tvrzicka ve ark. 2011).



Şekil 1.2 Yağ asidi sentezinde başlangıç ve zincir uzama reaksiyonları

Yağ asidi sentetaz sisteminin normal ürünü olan palmitik asit uzun zincirli yağ asitlerinin öncül (prekürsör) molekülüdür. Bu moleküle iki karbon daha ilave edilerek 18 karbonlu stearik asit, daha fazla karbon ilave edilerek de daha uzun zincirli yağ asitleri meydana gelebilmektedir. Yağ asidi zincir uzatma (elongaz) sistemi endoplazmik retikulum ve mitokondride bulunmaktadır. Palmitik ve stearik asit monoenoik yağ asitlerine de dönüşebilmektedir (Grashorn 1995).

Organizmanın birden fazla çift bağlı (polienoik) yağ asitlerine de ihtiyacı vardır. İnsan organizması için esansiyel yağ asitleri linoleik asit ve α -linolenik asittir (Watkins 1991). Organizma için gerekli diğer bir polienoik yağ asidi, prostaglandinlerin ön maddesi olan araşidonik asit ise linoleik asitten sentezlenebilmektedir. Bu biyosentez esnasında α -linolenik asit ara madde olarak meydana gelmektedir (Şekil 1.3). Sonuç olarak, insan organizması için gerçek anlamda esansiyel olan yağ asidi linoleik asit olarak karşımıza çıkmaktadır (Suddaby 1992, Ası 1996, Anonim 2006, Nelson ve Cox 2013).



Şekil 1.3 Palmitik asitten diğer yağ asitlerinin sentezlenmesi (Reis ve ark. 2011)

İnsan vücudu doymuş ve tekli-doymamış yağ asitlerini metabolizmasında sentezleyebildiği halde, sentezleyemediği uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerini besinler ile dışarıdan almak zorundadır. Bu durumda ortaya çıkan “esansiyel yağ asitleri (EFA)” kavramı vitamin gibi gıdalarla vücuda alınan, metabolizmada sentezlenemeyen nutrientler için kullanılmaktadır. Organizma için iki tane “temel esansiyel yağ asidi vardır. Bunlardan bir tanesi linoleik asit (LA; 18:2n-6; 9,12-oktadekadienoik asit), diğeri de α -linolenik asit (ALNA; 18:3n-3; 9,12,15-oktadekatrienoik asit)’tir. Desatüraz ve elongaz enzimleri ile bu iki yağ

asidinden daha uzun zincirli yağ asitleri ya da türevleri sentezlenebilmektedir (Suddaby 1992, Tvrzicka ve ark. 2011).

Ancak metabolizmada gözlenen bozulmalardan dolayı γ -Linolenik asit (GLNA; C18:3 Δ 6,9,12), araşidonik asit (ARA, C20:4 ω -6 Δ 5,8,11,14-eikozatetraenoik asit), eikozapentaenoik asit (EPA; C20:5 Δ 5,8,11,14,17) ile dokozahekzaenoik asit (DHA; C20:6 Δ 4,7,10,13,16,19) yeterli miktarda sentezlenememekte ve bu yağ asitleri “şartlı esansiyel yağ asidi” olarak nitelendirilmektedir (Suddaby 1992). Çoklu doymamış yağ asitleri karbon zincirlerinde iki ya da daha fazla çift bağ bulundurmakta ve metil uçtan başlayarak çift bağın olduğu ilk karbon atomuna göre “omega (ω -) 3” ve “omega (ω -) 6” yağ asitleri olarak da gruplandırılabilirler (Tvrzicka ve ark. 2011).

ω -3 yağ asitleri keten tohumu, ceviz, yeşil yapraklı sebzeler ve özellikle planktonlar ile yağlı balıklarda bol miktarda bulunmaktadır. Grubun en önemli yağ asitleri; EPA ve DHA kanın pıhtılaşmasını önlemede, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde, anne ve bebek sağlığını olumlu düzeye çıkarmada, kemik yapısının güçlendirilmesinde, beyin ve göz sağlığı üzerinde oldukça büyük etkileri vardır (Horrobin 1992, Drevon ve ark. 1993, Simopoulos 1999).

ω -6 grubunun temel yağ asidi “linoleik asit” olup, en önemlisi GLNA’dır. ω -6 grubunun vücutta 4 önemli rolü bulunmaktadır; i) hücre membran yapısının oluşturulması, ii) prostalandin (PG) ve leukotrien (LT) gibi eikozanoidlerin sentezlenmesi, iii) termoregülasyon sisteminin düzenlenmesi ile gastrointestinal sistem ve kan-beyin bariyerinde geçirgenliğin sağlanması, iv) kolesterol sentezi ve taşınımının regülasyonu (Horrobin 1992, Crawford 2000, Uauy ve Dangour 2006).

GLNA vücut için gerekli olan ω -6 çoklu doymamış bir karboksilik asit’tir. Yağ asitlerinin karaciğerde eikonazoidlerin öncü maddesi olan ARA metabolizasyonu sırasında, LA’dan Δ 6 desaturaz enziminin aktivasyonu ile oluşan ilk metabolit GLNA’dır. Boraj tohumu yağı, çuha çiçeği yağı ve siyah kuş üzümü yağında

yüksek miktarda bulunmaktadır. Dışarıdan alınan GLNA organizmada, elongaz enzimi ile dihomogama-linolenik asite (DGLNA) dönüştürülmektedir. Bu dönüşümün gerçekleşebilmesi için ise magnezyum, çinko ile C, B3 ve B6 vitaminlerinin organizmada yeterli miktarda bulunması gerekmektedir (Fan ve Chapkin 1998, El-Badry ve ark. 2007). GLNA atopik ekzema, diyabetik nöropati, romatoid artrit, kanser, yüksek tansiyon, menapozal semptomlar, egzema, viral enfeksiyonlar, osteoporoz, menopoz ve alkolizm gibi hastalıkların tedavisinde öneme sahiptir. Sağlık üzerine olumlu etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır, bu nedenle de ilgi yeni GLNA kaynaklarının belirlenmesi ve GLNA'nın saflaştırılmasına yönelik çalışmalar üzerinde yoğunlaşmaktadır (Horrobin 1992, Ehrlich 2011).

GLNA anne sütü dışındaki yiyeceklerde sadece küçük miktarlarda bulunmaktadır. Bu nedenle metabolizma için gerekli ve yeterli GLNA miktarının günlük beslenme alışkanlıkları ile gıda maddeleri ile karşılamak mümkün olmamaktadır. Kesinleşmiş bir günlük alım miktarı olmamasına rağmen, literatürde ortalama 90-270 mg, besin açısından faydalı bir katkı sağlamak için günlük en az 25-50 mg, iyileştirici katkı sağlamak amacıyla ise ortalama 100-150 mg GLNA'nın dışarıdan besin maddeleri ile alınması gerektiği bildirilmekte ve bu dozun 300 mg düzeyini aşmaması vurgulanmaktadır (Ehrlich 2011).

“Lipid” ve “yağ asidi” kaynağı olarak bitkilerin yanı sıra “mikroorganizmalar”ın kullanımı uzun yıllardır araştırılmaktadır. Mikrobiyel yağlar özellikle 1. ve 2. Dünya savaşları sırasında kıtlığa, geleneksel yağ hammaddelerinin azalmasına ve dünya nüfusunun artmasına karşı 19. yüzyıldan bu yana pek çok gelişmiş ülkede endüstriyel düzeyde araştırılmış olup bu araştırmalar uzun dönemler boyu gizlilikle sürdürülmüştür (Weete 1980, Becker 1994, Ratledge 2004, Ratledge 2006, Gunstone ve ark. 2007).

Mikroorganizmalardan elde edilen ve tek hücre yağı (THY, SCO: single cell oil) olarak adlandırılan mikrobiyel yağlar günümüzde endüstriyel üretimden çok içermiş oldukları terapötik ve nutrasötik özellikteki PUFA'lar nedeniyle tüm

dünyada yoğun ilgi görmektedir. Mikrobiyel yolla yağ eldesi prosesinin endüstriyel düzeyde “verimli” olarak değerlendirilebilmesi için sentezlenen yağ ve yağ asitlerinin yüksek verimlilikte ya da yüksek değerlilikte (PUFA bakımından zengin) olması gerekmektedir (Ratledge 2005, Ratledge ve Cohen 2008). Endüstriyel verimliliği etkileyen en önemli faktörler kuru biyokütle miktarı, kuru biyokütledeki yağ oranı ve yağın istenen yağ asidi kompozisyonunda olmasıdır (Griffiths ve Harrison 2009).

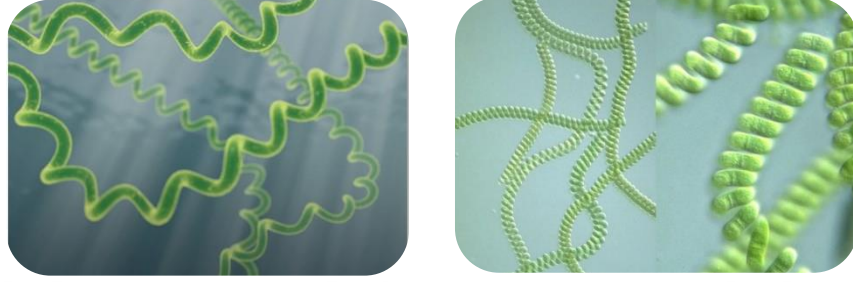
Pek çok mikroorganizma grubu (maya, küf, bakteri ve mikroalgler) belli bazı spesifik koşullar altında nötral yağ biriktirme özelliğine sahiptir. Bu mikroorganizmalar hücrelerinde %25 ya da daha fazla lipid biriktirebilmekte olup, “yağlı (olejinöz – oleaginous) olarak nitelenmektedir (Weete 1980, Ratledge 2006, Vance ve Vance 2008).

Algler, deniz ve tatlı su ortamları, çöl ortamı, kaplıcalar, buzul ortamları gibi pek çok farklı ekosistemde yaşayabilmektedir. Alglerin sistematiği farklı algal türlerde bulunan fotosentetik pigmentlerin çeşit ve bunların kombinasyonlarına göre belirlenmektedir. Bu sınıflandırmaya göre ökaryotik algler 2 ana grup altında incelenmektedir; birinci grup prokaryotlar olarak adlandırılan mavi-yeşil algler’dir ve klorofil a pigmentini içermektedir; ikinci grup ise klorofil a, klorofil b, β - ve α -karoten ile ksantofiller gibi birçok pigmente sahip olan yeşil algler’dir. (Tomaselli 2004).

Mavi-yeşil algler sınıfına ait olan *Spirulina* yetiştiriciliği yapılan en önemli mikroalg türlerinden birisidir. Özellikle *Spirulina platensis* ve *Spirulina maxima* ticari değere sahip ve araştırmalara en çok konu olan türlerdir (Richmond 1986).

Spirulina ipliksi mikroskobik bir alg türüdür. Adını filamentlerinin spiral yapısından almaktadır (bkz. Şekil 1.4). *Spirulina*’nın büyümesi için yüksek bazik ortam gerekmektedir (Zarrouk 1966). Kültür için optimum pH aralığı 8,5-11 arasındadır. Bu bazikliğin sebebi besi ortamında bulunan bikarbonat ve karbonatta mevcut olan CO₂’den kaynaklanmaktadır. Çok çeşitli sularda yaşayabilen

Spirulina kültürlerinin optimum gelişme sıcaklığı ise 30-35°C, minimum 18°C ve maksimum 39°C olarak belirlenmiştir (Richmond 1988, Richmond 1992, Fox 1996).



a

b

Şekil 1.4 *Spirulina platensis* (a) ve *Spirulina maxima* (b)'nin mikroskobik görüntüsü

Spirulina'nın dört yüz yıl kadar önce Aztek uygarlığında besin olarak değerlendirildiğine dair belgeler bulunmaktadır. Günümüzde Çad Gölü civarında yaşayan Kanembu kabilesi tarafında “kurutulmuş ekmek” olarak adlandırılan “dihe” şeklinde tüketilmektedir. Son 30 yıldır ise besin ve özel yem halinde ticari olarak üretilmektedir (Belay 2002). Spirulina'nın besin olarak güvenilirliği çok sayıda toksikolojik çalışma ve yüzyıllar boyu insanlar tarafından kullanılmasıyla kanıtlanmıştır (Chamorro 1980, Salazar ve ark. 1998).

Spirulina üzerinde çalışmaların yoğunlaşmasının nedeni içeriğinde bulunan protein, vitamin (özellikle B12 vitamini ve provitamin-A), esansiyel aminoasit, mineral maddeler (özellikle Fe) ve esansiyel yağ asitleri (özellikle GLNA) gibi gıda bileşenleri için zengin bir kaynak olmasıdır (bkz. Çizelge 1.1). Spirulina'nın kuru ağırlığının %60-70'i protein olup toplam yağın en az %20'si de GLNA'dan oluşmaktadır (Ötleş ve Pire 2001, Belay 2002, Colla ve ark. 2007)

Çizelge 1.1 Spirulina tozunun genel özellikleri (Fox 1996)

Fiziksel Özellikler		Kimyasal Özellikler	
<i>Kompozisyon</i>	<i>%100 Spirulina</i>	<i>Protein</i>	<i>%55-70</i>
<i>Görünüş</i>	<i>Saf toz</i>	<i>Karbonhidrat</i>	<i>%15-25</i>
<i>Renk</i>	<i>Koyu mavi-yeşil</i>	<i>Yağ</i>	<i>%6-8</i>
<i>Koku ve Tat</i>	<i>Hafif deniz yosunu</i>	<i>Kül</i>	<i>%7-13</i>
<i>Filament uzunluğu</i>	<i>64 µ</i>	<i>Lif</i>	<i>%8-10</i>

Spirulina'nın hücre duvarının %86'sı sindirilebilir polisakkaritlerden oluşmuştur. Bu nedenle insanlar tarafından sindirimi kolaydır ve Spirulina polisakkariti bağışıklık güçlendirici olarak kullanılabilir. Ayrıca biyokütleden ekstrakte edilebilen mavi renkli bir pigment olan fikosiyanın, kozmetik ve besinler için doğal bir renklendirici olarak değerlendirilmektedir (Li ve Qui 1997).

Günümüzde algal biyoteknoloji alanında yapılan pek çok çalışma, mikroalglerin endüstriyel ölçekte üretiminin gerçekleştirilmesine yöneliktir. Spirulina dış ortam koşullarında, özellikle sıcak ve güneşli iklimlerde yüksek biyokütle verimliliği ile yetiştirilebilmektedir. Üretim maliyeti, tüm mikrobiyel üretimlerde olduğu gibi Spirulina'nın da kullanımını sınırlamaktadır. Maliyeti oluşturan en önemli parametre besin girdileridir. Bu zamana dek yapılan çalışmalarda verimli üretim için kullanılacak besi ortamı kompozisyonları belirlenmiştir. Değişen besi ortamı kompozisyonlarında ve sıcaklıklarda geliştirme sonucubiyokütle verimi ve elde edilen metabolitlerin değişimi kaçınılmaz olmakta, bu nedenle hedef metabolite yönelik gelişme koşullarının tanınması ve optimizasyonu önem kazanmaktadır.

Bu tezin birincil amacı; iki farklı gelişme ortamı kullanılarak geliştirilen *Spirulina platensis*'in biyokütle ve yağ asidi kompozisyonunun, özellikle nutrasötik ve terapötik değeri olan GLNA'nın, belirlenmesidir. Çalışmada ikincil amaç biyokütle oranı ile yağ asidi kompozisyonu üzerine farklı azot konsantrasyonlarının ve sıcaklığın etkilerinin incelenmesidir. Bunun yanı sıra en düşük maliyetle ve en yüksek miktarda esansiyel yağ asidi içeren biyokütle üretiminin optimizasyonunu gerçekleştirmek de amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Algler

Algler morfolojik, sitolojik ve üreme çeşitlilikleri bakımından diğer bitkilerden farklılık göstermektedir. Ancak klorofil-a yapıları ve bu pigmentler yoluyla çalışan fotosentetik sistemleri, besin ihtiyaçları gibi basit biyokimyasal mekanizmalarının yüksek bitkilere benzer özelliktedirler.

Ekolojik olarak algler buzla kaplı alanlarda bulunabildikleri gibi 70°C ya da daha yüksek sıcaklıktaki kaynak suları ile karasal, sucul ve buzul alanlarda da aktivite gösterebilmektedir. Bazıları çok tuzlu su ortamlarında bile gelişebilirler. Göllerde ve denizlerde yüzeyden 100 m aşağıda ya da daha düşük ışık yoğunluğu ve yüksek basınç altında yaşayabilmektedirler (Elliot ve ark. 1992).

Algler su ortamında primer üretici canlılardır. Yapılarındaki pigmentleri sayesinde fotosentez yaparak karbondioksidi karbonhidratlara çevirme yeteneğine sahiptirler. Su ortamındaki besin değerinin ve çözülmüş oksijen oranının artmasını sağlayarak kendi gelişimleri için besin zincirinin ilk halkasını oluşturmaktadırlar.

Alglerin üretimleri ışık, sıcaklık ve ortamın besin konsantrasyonu gibi çevresel faktörlerle sınırlanmıştır. Bu sınırlayıcı faktörlerin iyileştirilmesi ile gelişim ve metabolit üretim düzeyleri artış göstermektedir. Ancak gelişim hızının belli bir düzeyi aşmasının doğal sonucu olarak çevresel dengeleri bozulmakta ve ötrofikasyon meydana gelmektedir. Ötrofik bir ortamda besin madde girdisinin fazlalığından dolayı, özellikle azotlu bileşikler ve fosfat gibi alglerin gelişimini arttıran bileşiklerin varlığında alg ve bakteri faaliyetleri sonucu gelişim ortamında bulanıklık artmakta ve ışığın suyun alt kısımlarına geçmesi engellenmektedir.

2.1.1 Alglerin sınıflandırılması

Algler için kabul edilebilir ve kolaylıkla tanımlanabilecek bir sınıflandırma sistemi oluşturmak, her geçen gün yeni tür ve sınıfların ortaya çıkması sebebiyle karmalıdır. Ancak polifiletik yapılarına göre taksonomide yer almışlardır. Barsanti ve Gualtieri (2006) algal grupları taksonomik olarak sınıflandırmaya çalışmışlardır (bkz. Çizelge 2.1).

2.1.2. Genel özellikleri

Algler, gerek yapısal olarak gerekse de dış görünüşleri bakımından oldukça farklıdır. Yapısal olarak ökaryotik (gelişmiş hücre tipi) ve prokaryotik (basit yapılı hücre tipi) olmak üzere iki büyük gruba ayrılırlar. Buna göre mavi-yeşil algler göstermiş oldukları hücre organizasyonları bakımından prokaryot hücre özelliği taşımaktadırlar. Belirgin bir hücre çekirdeğinin olmaması ve çok basit olan kromatofor yapısındaki pigmentlerin dağılımı diğer alglerden ayrılmaktadırlar (Barsanti ve Gualtieri 2006, Graham ve ark 2009).

Bugüne kadar değişik adlarla anılan Cyanobacteria, Archaeobacteria ile birlikte prokaryotları oluşturan Eubacteria grubuna bağlı olan algler önceleri mavi-yeşil algler, mavi-yeşil bakteriler ve Cyanophyta olarak isimlendirilen bu canlılar için son yıllarda Cyanobacteria adı önerilmiş ve kabul görmüştür. Cyanophyta ile Cyanobacteria bu mikroorganizmalar için eş anlamlı isimler olarak kullanılmaktadır (Van den Hoek 1995).

Cyanobacteria insanlar ve hayvanlar için protein, karbonhidrat, lipit, vitamin, enzim ve diğer biyoaktif bileşikler açısından önem arz etmektedir (Pinotti and Segato 1991). Bakterilere özgü olan bir polimer olan polimer poli- β -hidroksibütirat (PHB) besin maddesinin sınırlı olduğu durumlarda enerji depo maddesi olarak sentezlenmekte ve PHB ile depolanan enerji besin maddelerinin kısıtlandığı durumun devam etmesiyle lipid sentezine katkıda bulunmaktadır. Lipid biyosentezinde önem taşıyan PHB çok az sayıdaki Cyanobacteria türlerinde

belirlenmiş olup genel olarak Cyanobacteria'nın bu tür poliesterleri sentezleyebilme kabiliyetinde olduğu bildirilmiştir (Allen 1984, Philippis ve ark. 1992).

Çizelge 2.1 Alglerin sınıflandırılması (Barsanti ve Gualtieri 2006)

Alem	Şube	Sınıf
Prokaryota eubacteria	Cyanophyta (mavi-yeşil algler)	Cyanophyceae
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae
Eukaryota	Glaucophyta	Glaucophyceae
	Rhodophyta	Bangiophyceae
		Florideophyceae
	Heterokontophyta	Chrysophyceae
		Xanthophyceae
		Eustigmatophyceae
		Bacillariophyceae
		Raphidophyceae
		Dictyochophyceae
		Phaeophyceae
	Haptophyta	Haptophyceae
	Cryptophyta	Cryptophyceae
	Dinophyta	Dinophyceae
	Euglenophyta	Euglenophyceae
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae
	Chlorophyta (yeşil algler)	Prasinophyceae
		Chlorophyceae
Ulvophyceae		
Cladophorophyceae		
Bryopsidophyceae		
Zygnematophyceae		
Trentepohliophyceae		
Trebouxiophyceae		
Charophyceae		
Klebsormidiophyceae		
Dasycladophyceae		

Cyanobacteria antibiyotikler, algisitler, toksinler, farmasötik olarak aktif bileşikler ve bitki gelişimi düzenleyici gibi biyolojik aktiviteye sahip birçok bileşiği içermektedir (Metting 1986). 1970'li yıllardan başlayan incelemelerin sonucu bu alg grubunun antineoplastik, antimikrobiyal ve antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Patterson ve ark. 1994).

Cyanobacteria'nın Dünya üzerinde ilk oksijen oluşturan fototrofik organizmalar olduğu, bu sayede de dünyanın atmosferinin oksijensiz halden oksijenli hale geçtiği düşünülmektedir. Gerçek bir zarla çevrili çekirdekleri bulunmaması nedeni ile bakteri, fotosentetik özellikte olmaları nedeniyle de alg olarak sınıflandırılmaktadır. İpliksi ya da tek hücre halindeki formları mevcuttur. Hücre duvarlarının yapısı gram (-) bakterilerin hücre duvarına benzer, az miktarda peptidoglikan ile klorofil-a ve fikobilin denilen karakteristik pigment çeşidi içermektedirler. Fikobilinlerin, fikosiyanın adı verilen bir sınıfı mavi renklidir ve yeşil renkli klorofil pigmentleri ile birlikte bu canlılara mavi-yeşil renk vermektedir (Barsanti ve Gualtieri 2006).

Mikroalgler organik madde sentezini gerçekleştirmek için Karbon (C), Azot (N) ve Fosfor (P) gibi temel elementlerine gereksinim duyarlar (Davis 1977). N, C'dan sonra canlı kütle üretimi için en önemli besin maddesidir. Azot alg türlerine bağlı olarak kuru ağırlığın %1 ile %10'unu oluşturmaktadır.

Azotun bazı formları mikroalg kültürleri için uygundur. Kültürlerde hücreler tarafından kullanılabilen en önemli inorganik N kaynakları NO_3 (NO_3^- -N), NH_4 (NH_4^+ -N) ve üre ($(NH_2)_2CO$ -N)'dir (Gökpınar 1991). Fitoplankton büyümesini sınırlayan en önemli besleyici elementlerin özellikle doğada baskın halde bulunan NH_4^+ ve NO_3^- gibi inorganik N kaynakları olduğu saptanmıştır (Gökpınar 1991, Gökpınar 1994). Tüm N kaynakları hücrenin yapıtaşları olan aminoasitlerin ve dolayısıyla proteinlerin yapısına girmesinden dolayı yaşamsal değere sahiptir. Ayrıca N'un yağ asitleri üzerinde çok büyük etkisi olduğu bilinmektedir. N, enzim ve proteinlerin yapıtaşı olduğu için, yağ asitleri sentezi, algal hücrelerin protein fonksiyonları ve yapılaşmasında gereklidir. N kaynakları ve

konsantrasyonları, alg kültürlerinde büyüme ve biyokimyasal kompozisyonu etkilemekte ve özellikle yağ asitleri değerlerinde ve karotenoid miktarında değişikliklere neden olmaktadır. N sınırlaması hücrel yağ asitleri ve hücrel büyüme ile ilişkili olduğundan, biyokütlenin yağ asitleri bakımından zenginleştirilmesinde N sınırlaması önemlidir. Mikroalg kültürlerinde N sınırlaması, biyokütle ve klorofil-a miktarlarında azalmaya neden olurken, biyokimyasal yapısındaki yağlar gibi organik karbon bileşiklerini artırmaktadır (Shifrin ve Chisholm 1981, Sukenik ve ark. 1989).

2.1.3. Alglerin kullanım alanları ve alglerden elde edilen ürünler

Akuakültür, çok hızla büyüyen gıda üretim dallardan birisidir. Balıklar, krustaseler ve ticari olarak önemli yumuşakçaların gıdası olarak canlı ya da ölü mikroalgler akuakültür için kullanılmaktadır. Mikroalgler sadece gıda olarak değil ayrıca bakterilerle birlikte ortamdaki karbondioksit ve oksijen dengesinde de önemli rol oynamaktadırlar.

Mikroalgler kümes hayvanlarının, domuzların, ruminantların ve böceklerin beslenmesinde de yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Mikroalgler tarımda başlıca iki şekilde kullanılmaktadırlar. Gübre olarak, özellikle azot fikse eden siyanobakteriler pirinç tarımı yapılan bölgelerde kullanılmaktadır. Dünyanın birçok sahil yöresindeki yosunlar, fosfor, potasyum ve bazı iz elementlerin varlığından dolayı gübre olarak kullanılmaktadır. Toprak iyileştiricisi olarak ise, erozyonu azaltmak, havalandırmayı sağlamak, su hareketini kolaylaştırmak, kök gelişimini, toprağın sürülmesini kolaylaştırmak ve bitki gelişmesini düzenlemek gibi çeşitli fonksiyonları vardır.

Evsel ve endüstriyel kaynaklardan gelen atıklar, çözünmüş ya da askıdaki organik ve inorganik bileşiklerin arıtılmasında kullanılmaktadırlar. Bu atıkların temizlenme prosesleri oksijenli bir ortamda gerçekleşmekte ve bu oksijenlendirme bazı algler tarafından sağlanmaktadır. Ayrıca temizlenmesi güç olan azot ve fosfor

gibi bileşikler alglerin bulunduğu tanklara alınıp, algler tarafından besin kaynağı olarak kullanılmaları sağlanarak ortamdan uzaklaştırılabilmektedirler.

Bu kullanım faydalarının yanı sıra sentezledikleri vitaminler, pigmentler, polisakkaritler, farmasötikler ve diğer biyolojik aktif bileşikler endüstriyel çalışmalarda mikroalglerle olan ilgiyi arttırmaktadır. Mikroalglerin birçok vitamini özellikle, B₁₂ ve E vitamini, sentezleyebildiğini ve vitamin içeriklerinin bakteri ve mayalar ile rekabet edebilir miktarlarda olduğu bildirilmiştir.

Mikroalgler klorofil yanında fikobiliproteinler ve karotenoidler gibi pek çok pigment de sentezlerler. Bazı türlerde bu pigmentler primer pigmentlerden daha yüksek konsantrasyonda bulunabilir. A vitamini, β karoten, E, K ve K₂ vitaminlerinin sentezinde öncül madde olan fitoller sentezleyebilmektedirler.

Mikroalgler çok önemli bir protein kaynağıdır. Proteinlerinde genellikle sistein ve metionin yoktur ancak aminoasitlerin özellikle serbest aminoasitlerin kompozisyonu türler arasında çoğalma koşullarına ve fazına bağlı olarak değişmektedir.

Mikroalgler hem nişasta ve glikojen gibi depo ürünleri hemde gliserol, mannitol ve sorbitol gibi ozmotik düzenleyicileri üretebilmektedirler. Bunların potansiyel gıda kaynakları ya da etanol, metan üretimi için mikrobiyal substrat olmaları yanında en önemli uygulamaları yapay tatlandırıcılar üretiminde kullanılmalarıdır.

Mikroalglerin çoğu bileşimi bitkisel yağlara benzeyen katı ve sıvı yağlar içermektedir. Bu yağlar bazı koşullarda kuru ağırlıklarının %85'ini oluşturabilmektedir. Genellikle mikroalglerin ortalama lipid içerikleri kuru ağırlıklarının %20-40'ı arasında değişmektedir.

2.1.4. *Spirulina platensis*'in özellikleri

Spirulina platensis en fazla kültürü yapılan, kozmetik, tıp, insan ve hayvan gıdası gibi çeşitli sanayi alanlarında yaygın olarak kullanılan Cyanophyceae (Mavi-yeşil algler) sınıfından prokaryotik bir mikroalgdir (Khan ve ark. 2005).

Spirulina'nın kimyasal bileşimi protein, esansiyel yağ asitleri, karbonhidratlar, vitaminler, Ca, Mg, Fe, F, Zn gibi önemli mineraller, karotenler, fikosiyenin, klorofil a gibi yapılardan oluşur (Tokuşoğlu ve Ünal 2003).

Yüksek protein içeriği (%55-65) nedeniyle insan ve hayvan gıdası olarak kullanılan *Spirulina* gıda maddelerine besleyici değeri artıran destek materyal olarak da ilave edilmektedir. Bu içeriğin %10,9'unu lizin, %7,5'ünü valin ve %6,8'ini izolisin gibi esansiyel amino asitler oluşturmaktadır. Ekstraksiyon metodları ile elde edilen *Spirulina* tozundaki yüksek protein gıda maddelerinde katkı olarak kullanılmaktadır. Kuru ağırlığının %6-7 oranında lipit içeren *Spirulina*, linoleik asit (LA) ve γ -linolenik asit (GLNA) gibi esansiyel yağ asitlerini bünyesinde taşımaktadır. *Spirulina* en zengin mikroalgal GLNA kaynağı olarak bilinmektedir (Richmond 2004).

GLNA bazı hayvanlarda büyümeyi uyararak cilt ve saçlarda parlaklık ve yumuşaklık sağlamaktadır. GLNA'nın ayrıca bir antiinflamatuvar olarak işlev gösterdiği ve bazı eklem rahatsızlıklarının semptomlarını azalttığı bilinmektedir. Belay ve ark. (1993) *Spirulina*'nın kolesterolü düşürücü etki gösterdiği ve bunun da içerdiği GLNA'nın prostaglandin E (PGE) sentezini stimule ederek kolesterol düzeyini azaltmasından kaynaklandığı vurgulanmıştır.

Son 10 yıl içinde yapılan in vitro ve in vivo deneyler sonucunda, *Spirulina*'nın antikanser, antiviral, immun sistemi güçlendirici, antioksidan, radyasyona karşı koruyucu, kolestrol düşürücü etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Khan ve ark. 2005).

Ticari olarak Spirulina üreten ilk çiftlik, 1982 yılında Amerika'da Kalifornia eyaletinde kurulmuştur. Bugün, dünya üzerinde hektarlarca alanda Spirulina yetiştiren işletmeler ürünü değişik şekillerde işleyerek pazara sunmaktadır. Dünya üzerinde en yoğun üretime sahip ülke toplam 95 000 metrekare üretim alanı ve yılda 450 ton kuru ağırlık üretimi ile Amerika Birleşik Devletleri'dir. Bu ülkeyle birlikte Tayland, Japonya, Tayvan, Hindistan ve Meksika'da yoğun üretim yapılmaktadır.

Ülkemizde çoğunlukla ithal yolla temin edilen Spirulina konusunda üretim çalışmaları da başlamıştır. Bu bağlamda 2000 yılında Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi ile sanayi işbirliği olarak ilk Spirulina üretim işletmesi kurulmuştur. Sonraki yıllarda, İzmir'in Menderes ilçesinde Ecolife Spirulina olarak ikinci bir işletme kurulması ve bunu takip eden girişimlerin olması, Türkiye'de Spirulina üretiminin yaygınlaşması bakımından sevindirici gelişmelerdir. Günümüzde ticari Spirulina üretimi yıllık 150 milyon dolar gelire, birkaç ülkede kurulu şirketler vasıtasıyla yılda 3000 ton ve üzerinde üretimle devam etmektedir. Genel olarak tablet, kapsül ve kurutulmuş toz ürün şeklinde 70 ülkede eczanelerde, marketlerde, aktarlarda ve güzellik merkezlerinde tüketime sunulmaktadır. Spirulina'dan özütlenen ve ticari olarak "lima mavisii" olarak da adlandırılan protein yapısındaki fikosiyenin, gıda ve kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılan bir renklendiricidir. Bununla birlikte Spirulina sahip olduğu zengin protein, mineral ve vitamin içeriğinden dolayı besin olarak da tüketilmektedir (Güler ve Gülmez 2008).

2.2. Önceki çalışmalar

Mikroalgler farklı kimyasal ve biyolojik bileşikleri üretme özelliği nedeniyle önemli organizmalardır. Alg gelişmesini düzenleyen en önemli parametreler; besin kalitesi ve miktarı, ışık, pH, havalanma (türbülans), tuzluluk ve sıcaklıktır. Optimum parametreler ile tolerans aralıkları türe özgüdür (Kargın Yılmaz ve Duru 2011).

Işık miktarının artması ile fotosentetik organizmaların büyüme hızlarının arttığı, ancak belirli bir noktadan sonra, doygunluk seviyesine ulaşıldığı için gelişimin sınırlandığı, yüksek ışık seviyelerinin devam etmesi durumunda organizmanın üretilen yüksek miktarda enerji nedeniyle gelişmesinin inhibe olduğu (geri dönüşümsüz fotoinhibisyon) bildirilmiştir (Torzillo ve Vonshak 2003).

Geniş sıcaklık aralıklarında gelişebilen siyanobakterilerin metabolizmaları ve fizyolojik aktiviteleri doğrudan sıcaklık değişimlerinden etkilenmektedir. Bu nedenle, optimal sıcaklık aralığının belirlenmesi elde edilecek ürün/ürünlerin çeşit ve miktarı üzerinde etkili olmaktadır. Sıcaklık arttığında solunum hızı artarak, artan solunum biyokütle kayıplarını arttırmaktadır. Sıcaklık, mikroalglerin kimyasal kompozisyonları üzerinde de etkili olur. Torzillo ve ark. (1991) *Spirulina platensis* M2 suşu ile açık alanda termostatlı fotobiyoreaktörlerde yaptıkları çalışmada, sıcaklığın verimlilik ve kimyasal kompozisyon üzerinde etkili olduğunu belirtmişlerdir. Sıcaklık özellikle hücre solunumu üzerinde etkili olmakta; sıcaklığın artması solunum hızını artırmakta ancak biyokütle oluşumunu azaltmaktadır.

Havalandırma, mikroalg kültürlerinde, sıcaklık, ışık gibi parametrelerin ortamda optimum seviyelerde sağlanmasında en önemli rollerden birini üstlenmektedir. Havalanma, alglerin sedimentasyonunu önleyerek besi ortamında hücrelerin homojen olarak dağılması ile ışık ve besin maddelerinden eşit oranda yararlanmasına yardımcı olmaktadır. Hava içerisindeki CO₂ konsantrasyonu (%0,03), optimum gelişme ve yüksek biyokütle ya da ürün verimi için yeterli olmamaktadır. Bu nedenle *Spirulina* gelişimde ortama CO₂ ya da tuz formunda karbonat ve bikarbonat ilavesi yapılmalıdır (Becker 1994).

Mikroalgler organik madde sentezini gerçekleştirmek için karbon (C), azot (N) ve fosfor (P) gibi temel elementlere gereksinim duymaktadır (Davis 1977). Canlı kütle üretimi için azot, C'dan sonra en önemli besin maddesidir. Azot alg türlerine bağlı olarak kuru ağırlığın %1 ile %10'unu oluşturmaktadır. Alg gelişiminde hücreler tarafından kullanılabilen en önemli inorganik N kaynakları NO₃ azotu

(NO₃⁻-N), NH₄ azotu (NH₄⁺-N) ve üre azotu (NH₂)₂CO-N)'dur (Borowitzka 1999).

Alglerin gelişimde en önemli sınırlayıcı besin maddelerinin, özellikle doğada baskın halde bulunan, NH₄⁺ ve NO₃⁻ gibi inorganik azot kaynakları olduğu belirtilmiştir (Gökpınar 1991, 1994). Azot, aminoasit, enzim ve proteinlerin yapıtaşı olduğu için, yağ asitleri sentezi, algal hücrelerde protein fonksiyonları ve yapılanmasında mutlak gerekli olmaktadır. Bu nedenle, gelişme ortamındaki N kaynak ve konsantrasyonları, algal gelişmeyi ve biyokimyasal kompozisyonu etkilemekte, özellikle karbonhidrat, yağ asitleri ve karotenoid miktarında değişikliklere neden olmaktadır. N sınırlaması, biyokütle ve klorofil a miktarlarında azalmaya neden olurken, karotenoid ve yağlar gibi organik karbon bileşiklerinde artışa neden olmaktadır (Shifrin ve Chisholm 1981, Sukenik ve ark. 1989, Lubian ve ark. 2000).

Khozin-Goldberg ve ark. (2002) PUFA ve AA bakımından çok zengin olduğu bilinen *Chlorophyta* filumuna ait *Parietochloris incisa*'yı N eksikliğinin yapıldığı ortamda kültüre alarak yağ asitleri değişimine bakmışlardır. Azot açlığının olduğu ortamda yağ asitleri miktarı kuru ağırlıkta %35'in üstüne çıkmış, AA miktarı ise yağ asitleri içinde %60'a ulaşmıştır. Biyokütle miktarının artmasıyla birlikte hem yağ asitleri hem de AA miktarının arttığı belirlenmiştir.

Rousch ve ark. (2003) tarafından *P.tricornutum* ve *C.muelleri* türleri 2 saat boyunca 24°C, 30°C, 35°C, 40°C'lik; 24 saat boyunca 24°C, 30°C ve 35°C'lik ısıya maruz bırakılmış ve yağ asitleri değişimine bakılmıştır. 2 saatlik uygulama sonucunda *P.tricornutum*'da sıcaklık arttıkça PUFA oranında azalma (%55'den %49'a), doymuş yağ asitlerinde (SFA) artma (%27'den %32'ye) gözlenmiştir. Aynı durum *C.muelleri* için de geçerli olup; PUFA oranı %56'dan %38'e düşerken, SFA ise %19'dan %34'e yükselmiştir. 24 saatlik uygulama sonucunda *P.tricornutum*'da PUFA oranının %57'den %54'e ve *C.muelleri*'de ise %40'dan %35'e düştüğü belirlenmiş ve her iki uygulama sonucunda da yağ asitlerinin sıcaklık değişimlerinden etkilendiği saptanmıştır.

Koru ve Cirik (2003) yürüttükleri bir çalışmada laboratuvar koşullarında *S.platensis*'in 2000 lux. ışık şiddetinde ve 28-45°C arası sıcaklıklarda büyüme ve metabolizma etkilerini araştırmışlardır. Suyun sıcaklığı 43°C olduğunda, protein içeriğinde %20 gibi önemli bir azalma olduğu, 35°C'nin ise biyokimyasal yapı ve büyüme için en uygun olduğunu saptamışlardır.

Abd El Baky (2003) *S.platensis* ve *S.maxima*'yı farklı azot ve tuz oranları içeren besin ortamında kültüre almışlardır. Pigmentlerin kompozisyonu, tuz stresi ve azot içeriklerindeki değişimlere göre R-fikosiyanin %5,75'den %12,35'e, allofikosiyanin %2,53'den %6,11'e ve C-fikosiyanin %1,65'den %4,02'e değiştiği saptamışlardır. *Spirulina maxima* ve *Spirulina platensis*'de protein ve fikosiyanin içeriklerinin önemli derecede besi ortamındaki NaCl düzeylerinden etkilendiği ve her iki alg türünde de NaCl ve N eksikliği stresi altında fikosiyaninin en yüksek miktarının üretildiği bildirilmiştir.

Chojnacka ve Noworyta (2004) *Spirulina* sp.'nü fotoototrofik, heterotrofik ve mikсотrofik olarak geliştirmişler ve mikсотrofik koşullarda 2,5 g L⁻¹ glikoz ilavesinin yapıldığı koşullarda spesidik gelişme oranını 0,555 s⁻¹ olarak tespit etmişlerdir. *Spirulina*' da gerçekleşen mikсотrofik gelişimin tam anlamıyla fotoototrofik ve heterotrofik gelişimin bir kombinasyonu olmadığını, düşük ışık şiddetinde ve glikoz gibi substrat ilaveli gelişim koşullarında gelişim verilerini yükselttiğini bildirmişlerdir.

Costa ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada *S.platensis*'in üretim maliyetini azaltmak ve verimlilik elde edebilmek için alternatif besin kaynakları geliştirmişlerdir. Mangueira Lagününden aldıkları su ile besi ortamı yaratmışlar ve bu besi ortamına azot kaynağı olarak üre (0,9 g L⁻¹) ve karbon kaynağı olarak sodyum bikarbonat (16,8 g L⁻¹) ilave etmişlerdir. En yüksek biyokütle verimliliğini karbon kaynağı ilave edilmeden 1,125 g L⁻¹ azot kaynağı ilave edilen örneklerde elde edildiğini bildirmişlerdir.

Sánchez-Luna ve ark. (2004) *S. platensis*'i 25°C, 28°C ve 30°C'de 12-15-18 günlük sürekli ve kesikli üre ilavesi ile geliştirerek hücre kültürü konsantrasyonunu ve hücre kültürü verimliliğini incelemişlerdir. En iyi sonuçları 28°C'de 15 gün sürekli olarak üre ilavesinin yapıldığı örneklerde 1231±0,86 mg L⁻¹ hücre konsantrasyonu ve 69,5±5,1 mg L⁻¹ hücre verimliliği ile elde edilmiştir.

Mühling ve ark. (2005) Zarrouk besi ortamında 30°C'de 30 µmol foton m⁻² s⁻¹ ışık şiddetinde geliştirilen 35 *S. platensis* suşunda C₁₈ doymamış yağ asitlerini incelemişlerdir. Palmitik, linoleik ve γ-linolenik yağ asitlerinin, toplam yağ asitlerinin % 88-92'sini oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Suşa bağlı olarak, linoleik asit % 13,1-31,5, γ-linolenik asit % 12,9-29,4 ve palmitik asit % 42,3-47,6 arasında değişim gösterdiği bildirilmiştir. Mühling ve ark. (2005) sıcaklığın 30°C'den 20°C'ye düşürülmesi ya da 30°C'de ışık şiddetinin 70 µmol foton m⁻² s⁻¹ çıkarılması ya da heterotrofik koşullarda glikoz ilavesi ile karanlık koşullarda gelişimin C₁₈ çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttıracaklarını söylemişlerdir.

Zhila ve ark. (2005) *Botryococcus braunii* türünü %75 N miktarında, 10:14 gündüz:gece periyodu uygulayarak ve ortama %1 CO₂ vererek kültüre alarak; büyüme ve lipid kompozisyonunu gözlemişlerdir. Yirmi günlük çalışmanın sonunda kontrol ortamıyla kıyaslandığında, günlük biyokütle %6,8'den %2,9'a düşerken, lipid oranı ise %21'e yükselmiştir. Oleik asit miktarı %1,1-1,2'den %17,1-24,4'e yükselirken, toplam yağ asidi miktarı %52,8-57,2'den %19,5-24,7 değerlerine, polienoik asitlerin ise %64,1'den %6,8'e ciddi bir düşüş gösterdiğini saptamışlardır.

Khozin-Goldberg ve Cohen (2006) tatlı su algi *Monodus subterraneus*'a 175 µmol'den 52,5 µmol'e ve 175 µmol'den 0 µmol'e 2 farklı P sınırlaması uygulayarak kültüre almışlardır. Lipid ve yağ asitleri değişimi gözlemlendiğinde PUFA ve EPA oranlarında sırasıyla %28,2'den %20,8'e ve %19,4'den %15,5'e azalmalar olduğu ancak lipid oranında ve buna bağlı olarak da triaçilgliserol oranında artış saptamışlardır.

Colla ve ark. (2007) *S.platensis* ile yaptıkları çalışmada, farklı sıcaklık ve azot rejimlerinde biyokütle ile nutrosötik bileşenlerin üretimini incelemişlerdir. 1,875 ya da 2,5 gL⁻¹ sodyum nitrat içeren Zarrouk besi ortamında protein, lipid ve fenolik bileşikler üretiminde artış olduğu, en yoğun biyokütle konsantrasyonunun 30°C'de geliştiğini ve sıcaklığın direk olarak kimyasal kompozisyon üzerinde etkili olmadığını bildirmişlerdir. Bunun yanında en yüksek protein, lipid ve fenolik madde miktarını 35°C'de 1,875 g L⁻¹ NaNO₃ içeren besi ortamı örneklerinde sırasıyla, %70,15±0,82, %10,37±0,03 ve %4,99±0,37 olarak tespit etmişlerdir. 30°C'de ise, 2,500 g L⁻¹ NaNO₃'lı ortamda %8,16±0,23 ve %3,78±0,30 değerleri ile en yüksek yağ ve fenolik madde miktarı saptamışlardır.

Li ve ark. (2007) 23 mikroalg türünün antioksidan kapasitesi ve fenolik madde miktarını incelemişlerdir. Çalışma hegzan, etil asetat ve su çözümlerini içeren üç aşamalı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. En yüksek antioksidan kapasitesi sırasıyla, *Synechococcus* sp. FACHB 283 ve *Clamydomonas nivalis* suşlarında, sırasıyla 29,56±1,24 µmol Troloks g⁻¹ ve 24,13±0,47 µmol Troloks g⁻¹ olarak, toplam fenolik madde miktarını ise 60,35±2,27 mg GAE g⁻¹ ile *Nostoc ellipsosporum* CCAP 1453/17 ve 19,03±0,14 mg GAE g⁻¹ ile *Chlorella pyrenoidosa* #3 suşlarında tespit edilmiştir. Antioksidan kapasitesi ile fenolik madde miktarı arasında korelasyon ilişkisi incelenmiş ve birbirileri ile ilişkilendirilememiş, buna bağlı olarak antioksidan kapasitesini oluşturan major bileşiklerin fenolik bileşenler olmadığını bildirmişlerdir.

Silveira ve ark. (2007) Zarrouk besi ortamında ve açık havuzlarda geliştirdikleri *S.platensis*'in farklı çözümler kullanarak fikosiyanın içeriğindeki değişimi incelemişlerdir. Su, fosfat tamponu, asetat tamponu, NaCl ve CaCl₂ ile elde edilen ekstraktlarda sırasıyla, 3,73±0,12, 4,20±0,72, 1,84±0,23, 3,32±0,26 ve 3,48±0,74 mg mL⁻¹ fikosiyanın miktarı belirlemişlerdir. Asetat tamponu ile elde edilen ekstrakt dışında diğer çözümlerin etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Çözgen olarak su kullanımının maliyetsiz olduğu biyokütle: çözgen oranının 0,08

mg mL⁻¹ kullanıldığı 25°C'de 4 saatlik ekstraksiyonun ideal fikosiyanın ekstraksiyon metodu olduğu bildirilmiştir.

Kaushik ve ark. (2008) *Spirulina platensis*'i BG-11 besi ortamında geliştirdikten sonra yaş biyokütle üzerinden hegzan, etil asetat, diklorometan ve metanol kullanarak ekstraksiyon gerçekleştirmişler ve elde edilen ekstraktların in vitro koşullarda antibakteriyel aktivite varlığını araştırmışlardır. Tüm ekstraktların *Staphylococcus aureus*'a karşı aktivite gösterdiğini, bunun yanında yalnızca metanollü ekstraktların *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella typhi* bakterilerine karşı aktivite varlığını tespit etmişlerdir. Aynı zamanda besi ortamı atığının (spent media) da *E.coli*'ye karşı aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Çelekli ve ark. (2009) *Spirulina platensis*'i Schlösser besi ortamında, farklı fosfat konsantrasyonları (0,25-0,50-0,75,1,0 g L⁻¹) ve farklı pH düzeylerinde (pH 9,0-9,5-10,0) geliştirerek biyokütle üretimini etkisini araştırmışlardır. Fosfat konsantrasyonu değiştirilmeden 0,020 g L⁻¹ olan biyokütle miktarı değişen konsantrasyonlarda sırasıyla, 2,630, 2,213, 1,532 ve 0,797 g L⁻¹ olarak kaydedilmiştir. En yüksek biyokütle üretimi ise 0,50 g L⁻¹ fosfat konsantrasyonunda pH 10,0 seviyesinde 3,099 g L⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Bunun sonucunda biyokütle verimliliği için pH'ın 9,5 seviyesinin üzerinde ve N:P oranının düşük olduğu koşullarda elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Rodolfi ve ark. (2009) 30 farklı türü laboratuvar ortamında panel reaktörlerde N eksikliğinde biyokütle ve lipid oranını belirlemek amacıyla kültüre almışlardır. Lipid miktarı denizel mikroalglerden *Chaetoceros calcitrans CS178*'de %39,8 ve tatlı su mikroalglerinde *Scenedesmus sp. DM*'de %21,1 olarak kaydedilmiştir. Ancak denizel mikroalg türlerinden olan *Nannochloropsis sp.*'nin N eksiltmesi yapılan ortamda lipid üretkenliği diğer türlere göre daha fazla olmuş ve bu değer 60 mg L⁻¹ gün⁻¹ olarak belirlenmiştir. SFA ve MUFA içeriği yoğun olan bu türün biyodizel için uygun olduğu bildirilmiştir.

Damiani ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada *Haematococcus pluvialis*'i farklı stres koşulları altında (yüksek ışık, yüksek ışık-N eksikliği) kültüre aldıklarında, lipid oranının N eksikliği ve yüksek ışık yoğunluğunda %15'den %32,99'a yükseldiğini tespit etmişlerdir. N sınırlaması ya da ışık şiddeti gibi stres koşullarının lipid içeriğini arttırdığını ancak biyodizel olarak kullanımı için yeterli derecede lipid içeriğinin elde edilemediğini belirtmişlerdir.

Satoh ve ark. (2010) yeni bir mikroalg türü olan *Pseudochoricystis ellipsoidea* (Trebouxiophyceae)'yı 5-10 gün boyunca Zarrouk besi ortamında kültüre alarak maksimum hücre yoğunluğunu elde etmiş ve sonra N sınırlamasının olduğu ortamda 8 gün boyunca kültüre alarak lipid ve yağ asitleri değişimine bakmışlardır. Normal besi yerinde kültüre alınan türün lipid oranı %32, N sınırlaması yapılan ortamda ise %26 olduğunu ve aynı zamanda N sınırlaması yapılan ortamda hidrokarbon ve trigliserid miktarında artışlar olduğunu bildirmişlerdir.

Rodrigues ve ark. (2010) *Spirulina platensis* için NH_4Cl ve KNO_3 kullanarak besi ortamındaki azot kaynaklarının miktarını değiştirmişler ve bu değişikliğin biyokütle kompozisyonuna olan etkisini incelemişlerdir. Ortamda tek başına kullanılan amonyak bazlı azot kaynağının biyokütle miktarını olumsuz etkilediğini, en iyi klorofil-a, lipid ve protein değerlerinin NH_4Cl yanında KNO_3 kullanıldığı koşullarda elde edildiğini bildirmişlerdir. Kontrol grubu olarak değerlendirilen Zarrouk besi ortamı kullanılarak geliştirilen örneklerde 9,15 mg g^{-1} klorofil-a, %9,3 lipid ve %39,5 protein elde edilirken, NH_4Cl ve KNO_3 'ün eşit molaritede (15 nM) olarak kullanıldığı örneklerde 22,42-22,82 mg g^{-1} klorofil-a, %19,6-22,0 lipid ve %48,2-52,0 protein içeriği tespit etmişlerdir.

Bulut Mutlu ve ark. (2011) *C. vulgaris*'i laboratuvar koşullarında 5 farklı besi ortamında (%50 N eksilmesi, %100 N eksilmesi, %50 N-P eksilmesi, %50 P eksilmesi ve besin farklılığında kültüre alarak lipid, biyokütle ve protein miktarlarındaki değişimi incelemişlerdir. En yüksek lipid %35,6 ile %100 N eksilmesi uygulanan grupta bulunurken, en düşük protein de %13,01 ile bu

grupta ve en düşük biyokütle ise $0,12 \text{ gL}^{-1}$ ile NO_2 grubunda saptanmıştır. P eksiltmesinin yanı sıra N sınırlamasının klorofil miktarı ile lipid miktarının da arttırdığını ve bu verimliliğin heterotrofik gelişimde elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Uslu ve ark. (2011) *S.platensis*'i laboratuvar koşullarında %50 ve %100 N eksiltmesi yapılan ortamlarda kültüre alarak lipid, biyokütle ve protein değişimine bakmışlardır. %100 N eksiltmesi yapılan grupta en yüksek lipid %17,05 ile bulunurken; protein %5,6 ve biyokütle $1,00 \text{ g L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Azot sınırlamasının algal lipid miktarını arttırdığını ancak biyokütle miktarını önemli ölçüde değiştirmediğini bildirmişlerdir.

Sharathchandra ve Rajeshkhar (2011) Güney Karnataka habitatından izole ettikleri 13 tatlı su mikroalgini 26°C de BG-11 besi ortamında kültüre alarak toplam lipid ve yağ asidi kompozisyonunu incelemişlerdir. Toplam lipidin %60'ı PUFA olarak saptanırken C16:0 ve C18:2 yağ asitleri tüm türlerde saptanmıştır. En yüksek lipid oranı toksik bir tür olan *Microcystis aeruginosa*'da $28,15 \pm 0,21$ olarak belirlenmiş ve aynı zamanda α -linolenik asit ile γ -linolenik asitlerin saptandığı tek tür olmuştur.

Walter ve ark. (2011) ışık şiddetlerini değiştirerek *Spirulina platensis*'in fikosiyenin içeriğindeki değişimi gözlemlemişlerdir. En iyi biyokütle verimliliğini standart ışık altında $0,059 \text{ g L}^{-1} \text{ gün}^{-1}$ olarak tespit etmişler ve 1700 lux ışık şiddetinde fikosiyenin miktarını $0,237 \text{ mg mL}^{-1}$ olarak saptamışlardır.

Goiris ve ark. (2012) 32 farklı ökaryotik mikroalgal biyokütlenin fenolik ve karotenoid içeriklerini incelemişlerdir. Çoğu biyokütlenin karotenoid içeriği oldukça yüksek bulunurken, en fazla karotenoid *Isochrysis* türüne ait biyokütlerde saptanmıştır. *Isochrysis* ve *Phaeodactylum* biyokütleri fenolik içeriği en yüksek örnekler olarak bildirilmiştir.

Ronda ve ark. (2012) *S.platensis* suş 21.99'u bikarbonatla zenginleştirilmiş Spirit of Texas (SOT) besiyerinde üç farklı (%41,9, %88,4, %108) doygunluktaki havalandırılmış ortamda kültüre almışlardır. Havalandırma oranındaki 0,2-2,5 vvm artışın büyüme hızı ve GLA miktarını arttırdığı, 6 kat artışta ise GLA oranının %69,64 oranına kadar yükseldiğini saptamışlardır.

Tibbetts ve ark. (2014) farklı mikroalg türlerini optimum koşullarında geliştirerek kimyasal kompozisyon ve besleyici niteliklerini incelemişlerdir. Esansiyel olmayan aminoasitler aspartik ve glutamik asit miktarları türlerde baskın olarak saptanmış, bunun yanında esansiyel amino asit (EAA) profilinin de yüksek oranlarda (0,9-1,2 g 100g⁻¹ protein) olduğu bildirilmiştir. *Porphyridium aerugineum* lösin (11,9 g 100g⁻¹ protein), *Nannochloropsis granulata* lisin (8,5 g 100g⁻¹ protein) ve *Botryococcus braunii* arginin (20,5 g 100g⁻¹ protein) ile en yüksek EAA değerlerini göstermiştir. Ancak türlerden yalnızca *Tetraselmis chuii* 'de 20 mg GAE g⁻¹ ile yüksek toplam fenolik madde içeriği saptanmış, diğer türler oldukça düşük miktarda (6-13 mg GAE g⁻¹) fenolik içerik göstermiştir.

Choochate ve ark. (2014) *Chlorella* E53 ve ED53 suşlarının ham ekstraktlarını sıcak su ve etanol ile muamele ederek fenolik içerik ve antioksidan aktivite analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Etanollü ekstraktlarda *Chlorella* E53 35,5±0,14 mg GAE g⁻¹ ve %68,18±0,38 DPPH değeri ile en yüksek oranı vermiştir. *Chlorella* ED53 ise %47,78±1,48 ile en yüksek demir iyonu kenetleme aktivitesi ve %89,96±0,59 ile en yüksek lipid peroksidasyon inhibisyonunu göstermiştir.

Ali ve ark. (2014) 10 mikroalg türünün DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite, fenolik içerik ve karotenoid miktarı açısından incelemişlerdir. *Oscillatoria* türünün etanolik ekstraktı %69,1 ile en yüksek antioksidan aktiviteyi verirken, *Chlorella* türü en yüksek fenolik madde miktarını (39,1 mg GAE g⁻¹) göstermiştir. *Scenedesmus* türün de ise 3,73 mg L⁻¹ ile en yüksek karotenoid içeriği saptanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

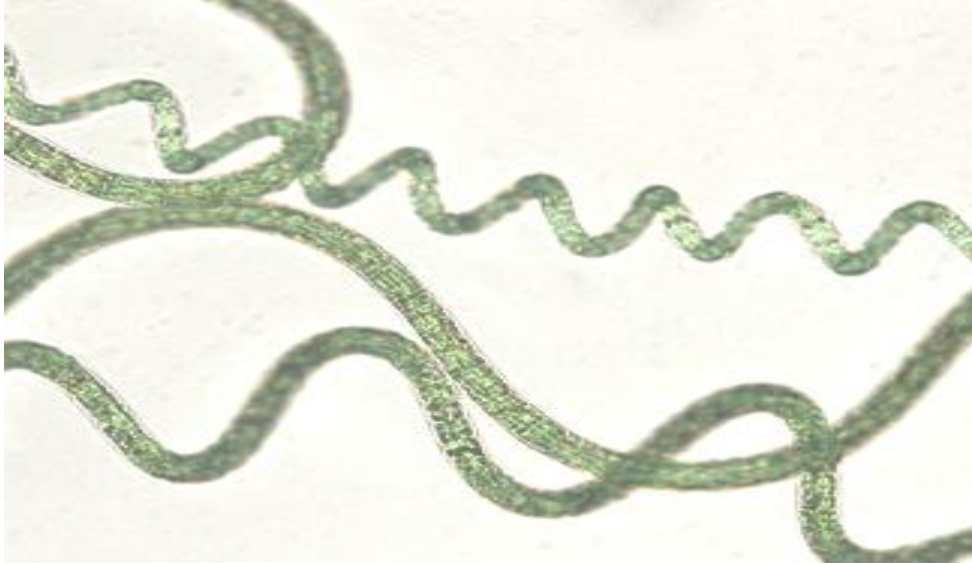
3.1. Materyal

3.1.1 Kültüre alınan tür

Spirulina platensis UTEX kültür koleksiyonu laboratuvarından temin edilmiştir.

Kullanılan türe (Şekil 3.1) ait sistematik sınıflandırma aşağıda verilmiştir.

Üst Alem	: Monera
Alem	: Prokaryota
Şube	: Cyanophyta
Sınıf	: Cyanophyceae
Takım	: Oscillatoriales
Aile	: Oscillatoriaceae
Cins	: <i>Spirulina</i> (<i>Arthrospira</i>)
Tür	: <i>platensis</i>



Şekil 3.1 Denemede kullanılan *Spirulina platensis*

3.1.2. Kültür ortamları

Denemede *Spirulina platensis* gelişimini değerlendirebilmek için daha önceki çalışmalarda yüksek biyokütle ve ürün veriminin gerçekleştiği “Spirulina besi ortamı” ile “Zarrouk besi ortamı” kullanılmıştır. Besi ortamlarında sınırlayıcı besin maddesi olarak azot ve azot kaynağı olarak da “NaNO₃” tercih edilmiştir. %100 N-kontrol grubu Spirulina besi ortamında (Çizelge 3.1) azot kaynağının konsantrasyonu 29,4 mM iken Zarrouk besi ortamında (bkz. Çizelge 3.2) 20,58 mM’dir.

Çizelge 3.1 Spirulina besi ortamı bileşimi

		g 500 mL⁻¹ dH₂O
<i>Solüsyon 1</i>	NaHCO ₃	13,61
	Na ₂ CO ₃	4,03
	K ₂ HPO ₄	0,5
	Distile Su	500 mL
<i>Solüsyon 2</i>	NaNO ₃	2,5
	K ₂ SO ₄	1
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
	EDTA	0,08
	Mikronutrient	5 MI
	Distile Su	500 mL
<i>Mikronutrient Solüsyonu</i>	g 100 mL⁻¹	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,1
	H ₃ BO ₃	0,2
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,02
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,02
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0005
	Distile Su	981 mL
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,7 g
	EDTA	0,8 g
	<i>B₁₂ vitamini</i>	5 x 10 ⁻⁶ g L ⁻¹

Çizelge 3.2 Zarrouk besi ortamı bileşimi

g 500 mL⁻¹ dH₂O	
NaHCO ₃	9,0
NaNO ₃	1,75
K ₂ HPO ₄	0,5
K ₂ SO ₄	1
NaCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005
Na ₂ EDTA	0,04
<i>Mikronutrient</i>	1 mL
<i>Distile Su</i>	500 mL
<i>Mikronutrient Solüsyonu</i>	
g 1000 mL⁻¹ dH₂O	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,80
H ₃ BO ₃	2,86
NH ₄ (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08

3.1.3. Gelişim koşulları

Alg kültürünün geliştirilmesi için iki farklı gelişme sıcaklığı, 25±2°C ve 30±2°C, kullanılmıştır. Denemeler süresince üretim tesisinin sıcaklığı iklimlendirme cihazı kullanılarak sabit tutulmuştur.

Bununla birlikte, denemeler 14:10 saat aydınlık-karanlık periyodu sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Işık kaynağı olarak floresan (Philips, TL-M Rapid Start Super 80) lambalar kullanılarak ve 32-40 µmol foton m⁻² s⁻¹ ışık şiddeti uygulanmıştır. Ortamın ışık şiddeti ışıkmetre (Licor, LI-250) ile ölçülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kültür ortamlarının hazırlanması

Gelişim grupları Çizelge 3.3'te belirtildiği şekilde tasarlanmıştır. Bu koşullar sağlanarak $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ olmak üzere iki farklı sıcaklık uygulaması ile gelişim incelenmiştir.

Çizelge 3.3 Gelişim gruplarının adlandırılması

	<i>%100 Azot Kaynağı İçeren</i>	<i>%25 Azot Kaynağı İçeren</i>	<i>%50 Azot Kaynağı İçeren</i>	<i>%75 Azot Kaynağı İçeren</i>
<i>25°C Spirulina Besiyortamı</i>	AKontrol	A25	A50	A75
<i>25°C Zarrouk Besiyortamı</i>	BKontrol	B25	B50	B75
<i>30°C Spirulina Besiyortamı</i>	CKontrol	C25	C50	C75
<i>30°C Zarrouk Besiyortamı</i>	DKontrol	D25	D50	D75

3.2.2. Denemenin yürütülmesi

UTEX laboratuvarından temin edilen *S. platensis* öncelikle 15 mL'lik tüplerde sırasıyla 500 mL, 1000 mL, 2000 mL'lik erlenlerde ve 10 L ile 30 L hacimli pleksi malzemeden yapılmış minyatür havuzlarda geliştirilmiştir. Deneme süresince her gün optik yoğunluk (OD_{680}) ve biyokütle miktarının belirlenmesi amacıyla kültür ortamından örnekler alınmıştır (bkz. Şekil 3.2).

3.2.3. Optik yoğunluk (OD_{680})

Deneme boyunca optik yoğunluğun ölçülmesi amacıyla günlük olarak kültürlerden steril koşullarda 3 mL örnek alınmıştır. Örnekler kuartz küvetlere konularak Optizen Pop UV-Vis Spektrofotometre'de 680 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.



Şekil 3.2 Yürütülen çalışmanın görüntüleri

3.2.4.S. *S. platensis*'in hasat edilmesi ve biyokütle miktarının belirlenmesi

Kültürler optik yoğunluğa göre logaritmik fazın bitimi ve duraklama fazının başlamasıyla birlikte 0,45 μ göz açıklığındaki Whatman membran filtre kağıtlarından vakumlu süzme düzeneği kullanılarak hasat edilmiştir. Elde edilen yaş biyokütleler Xianou XO 106 model liyofilizatörde -68°C'de 30-40 Pa basınç altında 18-24 saat kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından 0,0001 g hassasiyet ile tartılarak kuru biyokütle miktarı belirlenmiştir.

3.2.5. Toplam protein analizi

Örneklerin protein içeriği Kjeldahl metodu ile belirlenmiştir. Örnek (0,5 g) kjeldahl sindirim tüpleri içerisine yerleştirilerek, tüpler içerisine 1 adet Kjeldahl katalizör tableti ve 15 mL sülfürik asit (H_2SO_4) eklenmiştir. Kjeldahl tüpleri ilk önce 250°C de 30 dakika, ardından da 380°C de 75 dakika yakılmıştır. Behr S3

distilasyon ünitesinde distile su ve nötrale edilmiş %40'lik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile seyreltilmiştir. Örneklerdeki inorganik amonyum 25 mL doymuş ortoborik asit çözeltisine metilen kırmızısı ve yeşilinden oluşan indikatör eklenerek örneklerdeki inorganik amonyum toplanmıştır. Örnekler 0,1 M hidroklorik asit (HCl) ile pembe renk oluşana kadar titre edilmiştir. Analiz sonucunda kuru örneklerdeki azot miktarı aşağıda verilen formüle göre g 100 g⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Ham Azot Miktarı} = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times \text{meq}}{\bar{ö}} \times 100 \quad (3.1)$$

Burada;

V₁ = Titrasyonda harcanan HCl çözeltisi miktarı (mL)

V₀ = Kör deneme titrasyonunda harcanan HCl çözeltisi miktarı (mL)

N = Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin normalitesi (0,1 N)

meq = Azotun mili ekivalent ağırlığı

Ö = Alınan örnek miktarı (g)

Kjeldahl yöntemiyle belirlenen azot miktarının 6,25 faktör değeri ile çarpılmasıyla “g 100 g⁻¹” ham protein değeri hesaplanmıştır (AOAC 2005).

3.2.6. Toplam yağ analizi

Örneklerin yağ içeriklerinin belirlenmesi amacıyla Soxhlet metoduyla çalışan BEHR ED otomatik yağ tayin cihazından yararlanılmıştır. 3 gram kuru örnek kartuş içine tartılmıştır. Daha sonra etüvde kurutulup soğutulan balonların darası alınarak cihazın ayırıştırıcı kısmına konulmuştur. Örnekler petrol eteri ile sifonlama işlemine (150 mL, yaklaşık 1,5 sifon hacim) tabi tutularak petrol eteri yağ balonunda toplanmış ve yaklaşık 70 dakika sirkülasyon devam ettirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra yağ balonunda kalan çözelti buharlaşma yoluyla uzaklaştırılmış, yağ balonları sabit ağırlığa geldikten sonra ağırlık değişiminden “g 100 g⁻¹” olarak yağ miktarı hesaplanmıştır (AOAC 2005).

$$\text{Toplam Yağ Miktarı} = \frac{M}{\bar{O}} \times 100 \quad (3.2)$$

M = Balondaki yağ ağırlığı (g)

Ö = Kartuşa tartılan örnek miktarı (g)

3.2.7. Yağ asitleri kompozisyonu analizi

Liyofilize biyokütleden 0,5 g tartılarak 150 mL kloroform/metanol/asetik asit (2:1:1, v/v/v) karışımına aktarılmış ve 18 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda organik fazın ayrılması için filtrasyon gerçekleştirilmiştir. Filtre edilen karışım 500 mL'lik ayırma hunilerine aktararak ve iki defa 100 mL distile su ile yıkanmıştır. Her yıkama işleminin ardından anorganik faz ortamdaki uzaklaştırılmış, organik fazda kalan su, susuz MgSO₄ yardımı ile bağlandıktan sonra çözücü vakum altında buharlaştırılmıştır (Folch ve ark. 1957). Yağ ekstraksiyonu yapılan biyokütleyle IUPAC metoduna göre soğuk esterleştirme uygulanarak yağ asidi metil esterleri oluşturulmuş ve Gaz Kromatografi ile yağ asidi kompozisyonu belirlenmiştir. Yağ asidi kompozisyonlarının belirlenmesinde Agilent marka Gaz Kromatografisi, Alev İyonizasyon Dedektörlü (FID) kullanılmıştır. Çalışma koşulları çizelge 3.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.4 GC-FID çalışma koşulları

Kolon	DB WAX 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Kolon Sıcaklığı	220°C, izotermal
Akış Hızı	1 ml dk ⁻¹
Split Oranı	1/25
FID Sıcaklık	300°C
Enjektör Sıcaklığı	250°C
Enjeksiyon hacmi	1 µl

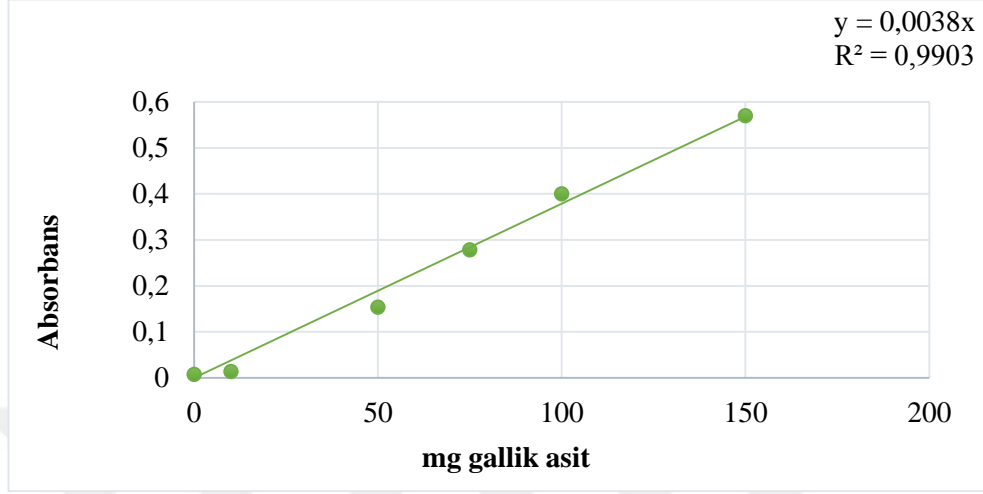
3.2.8. Toplam fenolik madde analizi

Toplam fenolik madde, karotenoid ve antioksidan kapasite için örnek hazırlama aşamaları aynıdır. Farklı sıcaklık ve azot rejimlerinde geliştirilmiş liyofilize *Spirulina platensis* biyokütlesinden 0,2 g tartılmış ve üzerine 2 mL etanol ile 2 mL su ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika çalkalandıktan sonra, 10 dakika boyunca 4 500 g hızında santrifüjlenmiş, bu işlem 2 kez tekrar edilmiş ve süpernatantlar birleştirilmiştir. Örnek filtre edildikten sonra toplam fenolik madde, karotenoid ve antioksidan aktivite tayinlerinde kullanılmıştır (Goiris ve ark. 2012).

Spirulina platensis ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı, Colla ve ark. (2007) tarafından bildirilen Folin–Ciocalteu kolorimetrik metoduna göre belirlenmiştir. Ortamda bulunan fenolik maddeler Folin–Ciocalteu ayıracını indirgemiş, kendileri oksitlenmiş forma dönüşmüştür. Reaksiyon sonunda indirgenmiş ayıracın oluşturduğu mavi renk spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 200 µL seyreltilmiş örnek üzerine 1:10 oranında seyreltilmiş 1 mL Folin–Ciocalteu reaktifi ilave edildikten 4 dakika sonra da 800 µL doymuş Na₂CO₃ (75 g L⁻¹) ilave edilmiştir. 2 saat süren inkübasyonun ardından 765 nm dalga boyunda absorbans değeri okunarak gallik asit kalibrasyon eğrisine göre değerlendirilmiştir.

Kalibrasyon eğrisini belirlemek için örnekler etanol/asetik asit çözeltisi (1:20, v/v) ile seyreltilmiştir. Etanol/asetik asit çözeltisi %2,5'lük sulu asetik asit ve %98'lik etanolün hacimsel olarak 10:90 oranında karıştırılmasıyla elde edilmiştir. 0,25 mL ekstraksiyon örneği kapaklı cam tüpe alınmış, üzerine 2,3 mL saf su ile 0,15 mL Folin–Ciocalteu (FC) ayıracı (1 birim FC : 5 birim saf su, v/v) eklenmiş ve karışım 15 saniye süreyle vorteks'te karıştırılmıştır. 5 dakika sonra üzerine 0,3 mL %35'lik Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilen tüp içeriği çalkalanmış ve karanlık ortamda 2 saat bekletilmiştir. Süre sonunda tüpten alınan örneğin absorbansı, ekstrakt yerine damıtık suyla hazırlanan tanık örneğe karşı 725 nm'de okunmuş ve sonuç 500 mg L⁻¹'lik stok gallik asit çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda hazırlanan

gallik asit kurvesi (Şekil 3.3) yardımıyla elde edilen formülden “mg GAE 100 g⁻¹ (mg gallik asit eşdeğeri 100 g⁻¹)” olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.3 Standart gallik asit eğrisi

3.2.9. Toplam karotenoid analizi

Hazırlanan ekstraktlardan 0,2 mL %90'luk metanolla 1:150 oranında seyreltilerek 470, 652 ve 665 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Sonuçlar Lichtenthaler denklemlerine göre değerlendirilmiştir (Lichtenthaler ve Buschmann 2001).

$$Ca = 16,82 \times A_{665} - 9,18 \times A_{652} \quad (3.3a)$$

$$Cb = 34,09 \times A_{652} - 15,28 \times A_{665} \quad (3.3b)$$

$$C(x + c) = 1000 \times A_{470} - 1,63 \times Ca - 14,96 \times Cb \quad (3.3c)$$

Denklemlerde;

Ca : Klorofil a

Cb : Klorofil b

$C(x + c)$: Ksantofil ve Karotenoid

A_{470} : 470 nm'deki absorbans değeri

A_{652} : 652 nm'deki absorbans değeri

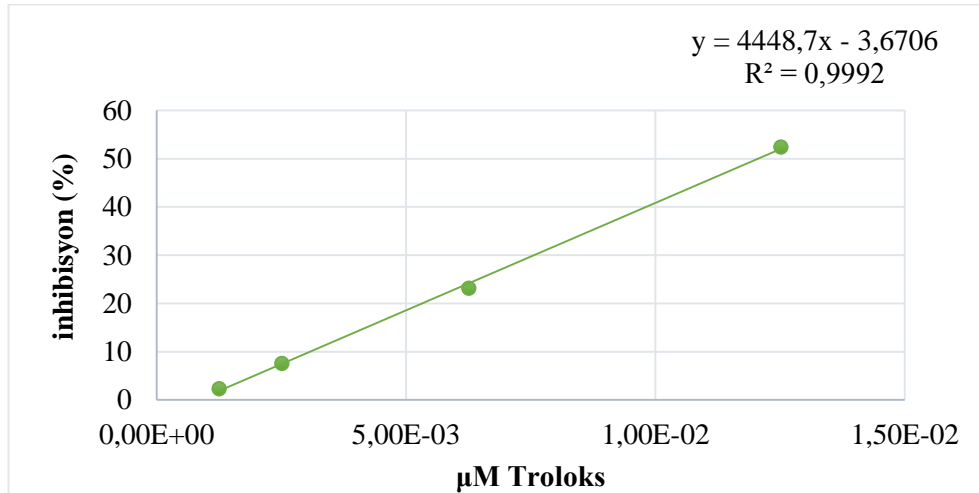
A_{665} : 665 nm'deki absorbans değerini ifade etmektedir.

3.2.10. Antioksidan kapasite analizi

Spirulina platensis ekstraktlarında antioksidan kapasite analizi Burit ve Bucar (2000)'ın belirttiği gibi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla elde edilen ekstraktlardan 0,2 mL alınarak 1 mL DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) reaktifi (% 0,002 (w/v) metanol) ile karanlık ortamda 30 dakika muamele edilmiştir. Ardından 515 nm'de radikalin ve örneğin okumaları yapılmıştır. Kararlı bir organik azot radikali olan DPPH olan, koyu menekşe renktedir ve maksimum absorpsiyonu 515 nm'de gerçekleşmektedir. Örnekte mevcut olan serbest radikallerin antioksidan maddeler tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi ile meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik olarak belirlenmesi DPPH radikal süpürme aktivite yönteminin temelidir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}}{Abs_{kontrol}} \times 100 \quad (3.4)$$

Yukarıda verilen denklem ile “% inhibisyon” değerleri hesaplanmıştır. Ekstraktların antioksidan aktiviteleri troloks kalibrasyon grafiğinden (Şekil 3.4) faydalanılarak “ $\mu\text{mol Troloks g}^{-1}$ ” olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.4 DPPH radikalinin Troloks standardına ait % inhibisyon eğrisi

3.2.11. İstatistik analizi

Araştırmada elde edilen verilere ait tanıtıcı istatistikler ve veriler arasındaki korelasyonlar JMP (Versiyon 7.0, SAS, Institute Inc. Comp., NC, USA) ile yapılmıştır. Sonuçlar 4 tekerrürlü ölçümlerin ortalaması \pm standart sapma olarak gösterilmiştir.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında Oscillatoriaceae familyasına ait *Spirulina platensis* mikroalginde GLNA içeriğinin farklı sıcaklık ve N kaynağı sınırlaması karşısında değişimi ile aynı zamanda bu mikroalg türüne ait biyoaktif bileşenlerin miktarlarındaki değişimler araştırılmıştır.

4.1. *S. platensis*'in Gelişimi

4 farklı grup şeklinde kültüre alınan *S. platensis*'te durağan faza ulaşıncaya dek optik yoğunluk (OD_{680}) ve kuru ağırlık (DW; 24 saatlik gelişim sonunda) analizleri gerçekleştirilmiştir. Durağan faza ulaşan kültürler hasat edildikten sonra kurutulmuş ve kuru biyokütle miktarları hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Gelişim süresince tüm gruplar için elde edilen optik yoğunluk değerleri Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'te ve örneklerle ait spesifik gelişme oranları grafiği Şekil 4.5'te verilmiştir.

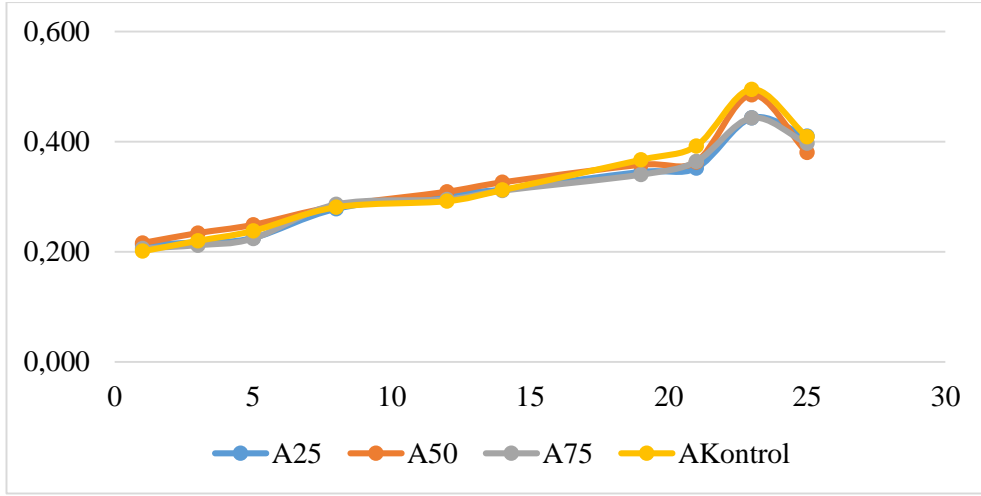
Çizelge 4.1 *S. platensis*'e ait gelişim değerleri

	OD_{son}	$OD_{maksimum}$	DW_{son} ($g L^{-1}.gün^{-1}$)	Biyokütle Miktarı ($g L^{-1}$)	Spesifik Gelişme Oranı (μ)
A Kontrol	0,409	0,495	1,3904	0,2522	0,1847
A25	0,410	0,443	1,4298	0,4152	0,3653
A50	0,380	0,485	1,4072	0,2842	0,2295
A75	0,397	0,443	1,3830	0,2053	0,1829
B Kontrol	0,979	1,043	1,3950	0,3138	0,1145
B25	0,848	0,988	1,4358	0,4182	0,2908
B50	0,747	0,942	1,3840	0,3685	0,0631
B75	0,936	1,073	1,3540	0,2177	0,0545
C Kontrol	0,609	0,714	1,3265	0,3877	0,1861
C25	0,641	0,688	1,3114	0,2830	0,0824
C50	0,655	0,740	1,3242	0,3967	0,1383
C75	0,614	0,717	1,2882	0,4462	0,3285
D Kontrol	1,365	1,471	1,2826	0,5112	0,4498
D25	1,033	1,185	1,3307	0,4281	0,2253
D50	1,036	1,151	1,3561	0,3322	0,3226
D75	1,265	1,365	1,3446	0,3031	0,1488

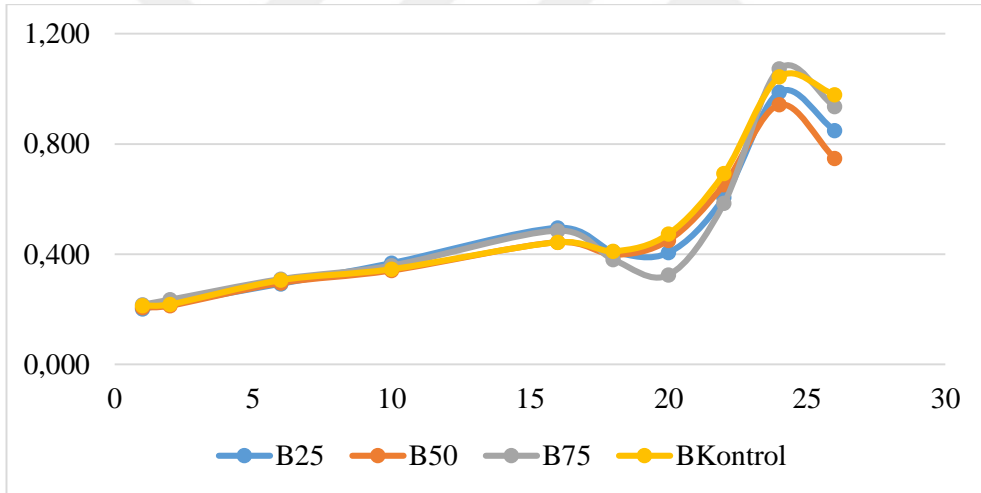
OD_{son} : hasat günündeki optik yoğunluk,

$OD_{maksimum}$: gelişim boyunca elde edilen maksimum optik yoğunluk,

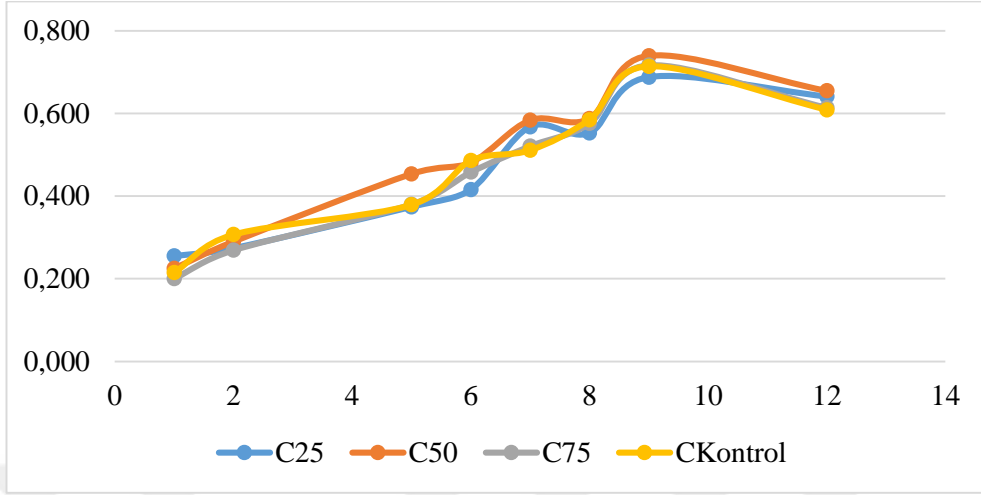
DW_{son} : hasat günündeki kuru ağırlık miktarını ifade etmektedir.



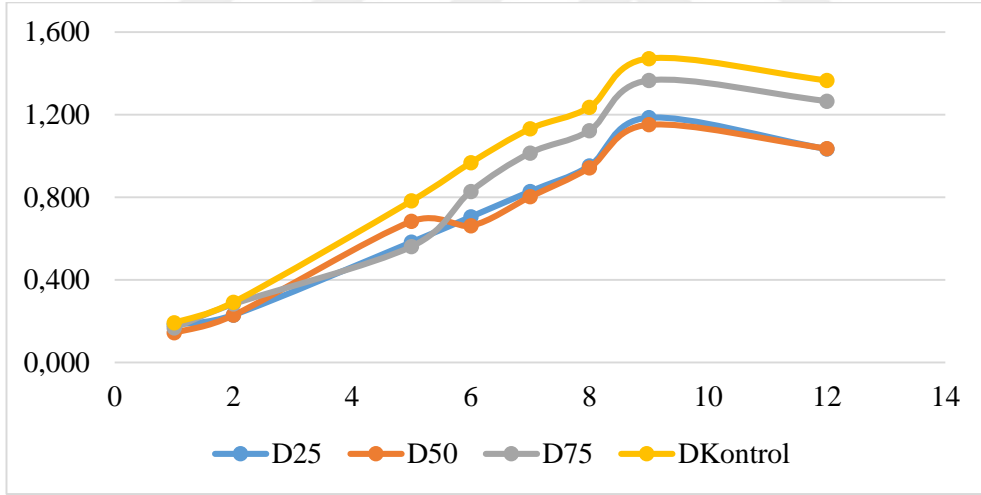
Şekil 4.1 A grubuna ait OD₆₈₀ değerleri



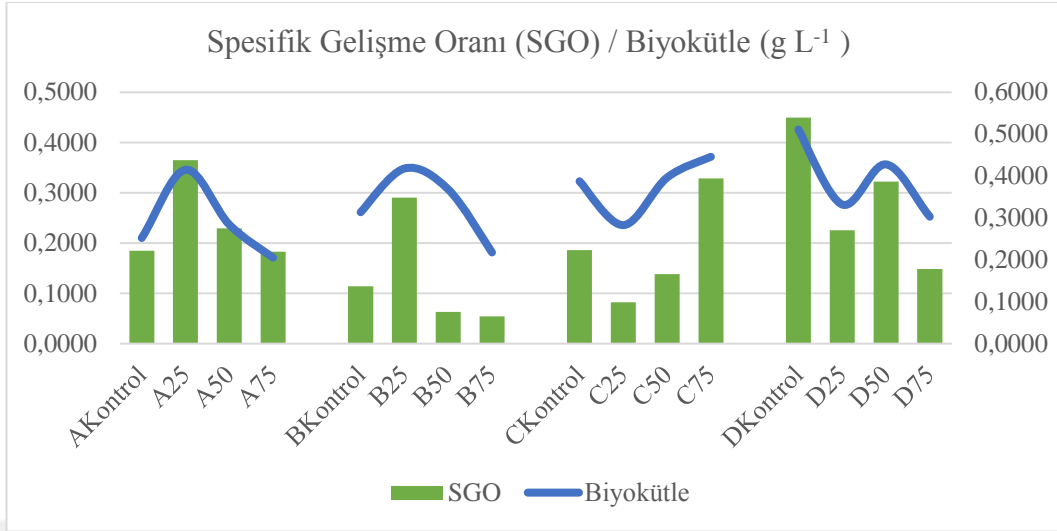
Şekil 4.2 B grubuna ait OD₆₈₀ değerleri



Şekil 4.3 C grubuna ait OD₆₈₀ değerleri



Şekil 4.4 D grubuna ait OD₆₈₀ değerleri



Şekil 4.5 *Spirulina platensis*'e ait kuru biyokütle (g L⁻¹) ve spesifik gelişme oranı (SGO) korelasyonu

Spirulina besi ortamında 25°C'de N oranındaki azalma ile optik yoğunluk değerlerinde artış gözlenirken (R=-0,4770), 30°C'de maksimum OD₆₈₀ değerinde düşüş olduğu saptanmıştır (R=0,5905). Zarrouk ortamında ise N oranındaki değişimler OD_{max} değerleri üzerinde etkisiz olmuştur (R_{25°C}=-0,2220, R_{30°C}=0,2550). Budiyona ve ark. (2013) *Spirulina platensis* için C:P:N oranlarının 76,3:11,7:1 olduğu besi ortamında en yüksek OD değerini kaydetmişler ve C ile N oranları azaldıkça elde edilen OD değerlerinin düştüğünü bildirmişlerdir. Bununla birlikte P oranı sabit olduğu halde C ve N oranlarının değişimi gelişimi etkilemiş ve spesifik gelişme oranı 0,005'ten 0,168'e kadar artış göstermiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda (Pandey ve ark. 2010, Pandey ve Tiwari 2010) *Spirulina*'ya ait kuru biyokütle miktarı 0,72 ile 0,78 g 500 mL⁻¹ değerleri arasında bulunmuştur. Colla ve ark. (2004) ise 30°C'de NaNO₃ miktarlarını değiştirerek gerçekleştirdikleri çalışmada, 2,5 g 500 mL⁻¹ NaNO₃ kullanılan Zarrouk besi ortamında spesifik gelişme oranını 0,074±0,005 olarak tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada farklı besi ortamlarında 30 günlük gelişme sonunda 0,362 g L⁻¹ değeri elde edilirken (Jitendra ve ark. 2012), Devanathan ve Ramanathan (2013) 30°C'de 0,81 g 250 mL⁻¹ değerini elde etmişlerdir. Bu gözlemler yürütülen çalışmada elde edilen gelişme verileri ile uygunluk göstermektedir. Biyokütle değerlerindeki sapmaların kullanılan ışık

şiddetinin (4 500 lux) diğer çalışmalarda uygulanan 5 000 lux değerinden düşük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Hasat sonrası biyokütle miktarlarına bakıldığında, Spirulina besi ortamında sıcaklık artışıyla spesifik gelişme oranında az miktarda düşme gözlenmekle birlikte, biyokütle miktarında artma olmuştur. 25°C’de en yüksek μ oranı 0,3653 ve kuru biyokütle miktarı 0,4152 g L⁻¹ olarak %25 N konsantrasyonuna sahip kültürde saptanmıştır. Sıcaklık 30°C’ye yükseltildiğinde ise, 0,3285 μ değeri ve 0,4462 g L⁻¹ kuru biyokütle miktarı ile %75 N konsantrasyonuna sahip kültür en iyi sonuçları vermiştir (bkz. Çizelge 4.1).

Zarrouk besi ortamında ise 25°C’de en yüksek μ oranı 0,2908 ve kuru biyokütle miktarı 0,4182 g L⁻¹ olarak %25 N konsantrasyonuna sahip kültürde saptanmış, 30°C’de ise 0,4498 μ değeri ve 0,5112 g L⁻¹ kuru biyokütle miktarı ile %100 N konsantrasyonuna sahip kontrol kültür grubu en iyi sonuçları vermiştir (bkz. Çizelge 4.1).

Besi ortamları sıcaklık bazında kıyaslandığında ise 25°C’de Spirulina ortamındaki kültür grupları daha yüksek SGO değerlerine ulaşmışlardır. Bununla birlikte, azot sınırlamasında aynı azot içeriğine sahip örneklerde Spirulina ortamında elde edilen μ değerleri Zarrouk ortamına göre daha yüksektir.

Sıcaklığın yükselmesiyle genel olarak biyokütle miktarının arttığı ve en yüksek değere Zarrouk ortamında ulaştığı belirlenmiştir (bkz. Çizelge 4.1). Besi ortamları ayrı ayrı değerlendirildiğinde sıcaklığın yükselmesiyle azot kullanımının ve dolayısıyla, biyokütle miktarının da yükseldiği görülmektedir. Spirulina ortamında en yüksek biyokütle 25°C + %25 N konsantrasyonu ile 30°C + %75 N konsantrasyonu koşullarında belirlenmiştir. Ancak *Spirulina platensis* gelişiminde en yüksek biyokütle 25°C + %25 N konsantrasyonu ile 30°C + %100 N konsantrasyonu koşullarına sahip Zarrouk besi ortamında gerçekleşmiştir.

Elde edilen gelişim verileri kıyaslandığında, sıcaklığın artması ile durağan faza ulaşma hızı ve hasat sonu kuru biyokütle miktarında (DW_{son}) artış olduğu gözlenmiştir. Her iki besi ortamında bileşimdeki maddeler benzer olmasına rağmen, Spirulina ortamında

temel nutrientlerin miktarlarının daha yüksek olması ve mikronutrientlerin daha çeşitli olması nedeniyle maliyet yükselmektedir. Bu besi ortamlarını karşılaştırdığımızda, Spirulina besi ortamındaki gelişmenin daha uygun maliyetli olan Zarrouk ortamına göre daha düşük olduğu saptanmıştır.

4.2. *S. platensis*'in Kimyasal Özellikleri

Hasat edilen yaş biyokütle dondurarak kurutma işlemine tabi tutularak “liyofilize kuru biyokütle” elde edilmiştir. Liyofilize edilmiş kuru biyokütlerde toplam protein, toplam yağ, toplam karotenoid, toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerlerinin yanı sıra yağ asidi profili de belirlenmiştir. Genel bileşim sonuçları Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

4.2.1 Toplam protein değerleri

Azot proteinler ve fikosiyanın gibi diğer hücresel bileşenlerin yapısında bulunan aminoasitlerin sentezi için gerekli olan bir elementtir. Bu nedenle besi ortamında yüksek miktarda bulunması ile protein sentezinin artması beklenmektedir. *S. platensis*'in farklı azot kaynakları üzerinde geliştirilmesi ile biyokütle ve kimyasal bileşenlerin değişimi üzerine etkisi farklı araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Costa ve ark. 2001, Danesi ve ark. 2002, Sassano ve ark. 2007, Rodrigues ve ark. 2010)

Uslu ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, laboratuvar koşullarında *S. platensis*'in %50 ve %100 azot eksikliğinde geliştirilmesinin protein ve lipid içeriği üzerine etkisini incelemiştir. Azot miktarının azalması hücre gelişimi üzerinde etkili bulunmazken, lipid içeriğinin arttığı ancak protein miktarının azaldığı saptanmıştır (Illman ve ark. 2000).

Çizelge 4.2 *S. platensis*'e ait kimyasal analiz sonuçları

	<i>Protein</i>	<i>Yağ</i>	<i>Fenolik Madde Miktarı</i>	<i>Toplam Karotenoid</i>	<i>Antioksidan Kapasite</i>
	%	%	mg GAE g ⁻¹	mg g ⁻¹	µM Troloks g ⁻¹
<i>AKontrol</i>	55,7584 ^d	0,9452 ^g	1,3384±0,02 ^{abc}	0,0812 ^{fg}	11,2589±0,18 ^{cde}
<i>A25</i>	55,0653 ^{de}	2,1779 ^{ef}	1,1363±0,08 ^{def}	0,0803±0,63 ^{fg}	10,1494±0,66 ^{fg}
<i>A50</i>	53,9848±0,4597 ^{ef}	12,3100±1,7243 ^a	1,3568±0,01 ^{ab}	0,0938±0,03 ^b	11,9897±0,05 ^{bc}
<i>A75</i>	53,1311±2,3315 ^f	2,9644 ^{cde}	1,1225±0,01 ^{def}	0,0824±3,71 ^{ef}	12,4875±0,32 ^b
<i>BKontrol</i>	56,1326 ^d	1,5905 ^{fg}	1,2357±0,14 ^{bcd}	0,0853±0,68 ^{de}	11,1986±0,02 ^{cde}
<i>B25</i>	70,1600±0,9412 ^c	3,5587 ^{bc}	1,3914±0,14 ^a	0,0841±0,22 ^{ef}	10,9985±0,07 ^{def}
<i>B50</i>	54,0895 ^{ef}	2,8846 ^{cde}	1,2032±0,04 ^{cde}	0,0894±0,08 ^c	11,1045±1,98 ^{cde}
<i>B75</i>	50,9493 ^g	3,7624 ^{bc}	0,9682±0,14 ^g	0,0776±0,05 ^g	10,7528±0,61 ^{defg}
<i>CKontrol</i>	80,0419 ^a	3,2819 ^{cd}	1,1764±0,07 ^{de}	0,0881±0,01 ^{cd}	10,6338±0,18 ^{defg}
<i>C25</i>	77,8715 ^b	3,5714 ^{bc}	1,4717±0,30 ^a	0,0722±0,16 ^h	10,3502±0,61 ^{efg}
<i>C50</i>	49,7915±0,9448 ^g	2,5974 ^{de}	1,0051±0,07 ^{fg}	0,0678±0,12 ⁱ	11,5430±0,44 ^{bcd}
<i>C75</i>	78,8284 ^{ab}	4,3393 ^b	1,4536±0,07 ^a	0,1194±0,02 ^a	10,9913±1,08 ^{def}
<i>DKontrol</i>	52,9898±1,5318 ^f	1,5598 ^{fg}	0,6062 ^h	0,0585±0,08 ^j	14,7877±0,47 ^a
<i>D25</i>	56,6889 ^d	3,1189 ^{cd}	1,0609±0,04 ^{efg}	0,0888±0,05 ^{cd}	9,8222±0,47 ^g
<i>D50</i>	49,7159±0,2253 ^g	0,9524 ^g	1,3754±0,04 ^{ab}	0,0833±0,21 ^{ef}	11,1170±0,22 ^{cde}
<i>D75</i>	53,9633 ^{ef}	1,4414 ^{fg}	1,0089±0,10 ^{fg}	0,0953±3,35 ^b	10,8195±0,09 ^{def}

Madkour ve ark. (2012) *S. platensis*'in endüstriyel düzeyde üretimi için maliyeti azaltılmış bir besiyeri geliştirmek üzere Zarrouk besi yerindeki azot miktarını değiştirmişlerdir. Azot miktarı ve kaynağının mikroalg gelişimini önemli düzeyde etkilediğini; inorganik azot kaynağının gelişme için tercih edildiğini; amonyum nitratın üreye göre daha etkin kullanıldığını, gelişmenin daha hızlı olduğunu ve biyokütle miktarının arttırdığını ve ürenin belirli düzeyden sonra toksik etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. İnorganik azot kaynağı olan nitrat ve amonyum iyonları *Spirulina platensis* gibi alkalofilik türlerde hücre içine pasif difüzyon ile alınmakta (Boussiba 1990, Baldia ve ark. 1991, Rodriguez ve ark. 1994) ve fotosentez ile meydana gelen enerji gelişme için kullanılabilir (Rhee ve Lederman 1983).

Fagiri ve ark. (2013) Zarrouk besi ortamındaki yüksek miktardaki NaNO_3 'ü üre ile değiştirerek farklı pH, sıcaklık ve ışıklandırma düzeylerinde *S. platensis*'in gelişimini inceledikleri çalışmada, üre ilave edilen besi ortamında gelişmenin kontrol (Zarrouk ortamı) ile NaNO_3 içeren ortamlara göre daha yavaş olduğu ve uzun sürdüğünü ifade etmişlerdir. Colla ve ark. (2007) ise Zarrouk ortamında NaNO_3 ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) miktarının biyokütle miktarı değişmeden azaltılabileceğini ve böylece endüstriyel boyutlu üretim için maliyetin azaltılabileceğini belirtmişlerdir. Ancak, protein miktarının azalan azot miktarı ile doğrusal olarak azaldığı saptanmıştır.

Schubert (1988) *S. platensis*'e ait protein oranının %40-60 ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ kuru ağırlık) arasında değişim gösterdiğini ifade ederken ortalama %51-68 olarak bildirilmektedir. Bu farklılıklar kültür gelişimi için kullanılan besi ortamlarının değişik olmasından ileri gelmektedir.

Sandeep ve ark. (2015) deniz suyunu besi ortamı olarak kullandıkları çalışmada, *S. platensis*'e ait protein oranını $55,70 \pm 0,82$ olarak saptamışlardır. Deniz suyundaki gelişme ile ilgili diğer çalışmalarda protein oranının %55,4 ile %59,4 arasında değiştiği ve protein oranının besi ortamındaki tuz konsantrasyonu arttıkça azaldığı görülmektedir. (Materassi ve ark. 1984, Vonshak 1997, Belay 2002, Henrikson 2009, Falquet 2012).

Oliviera ve ark. (1999) farklı sıcaklıklarda *S.platensis*'e ait protein oranını 25°C'de %68,04±3,82 olarak belirlerken 30°C'de %64,35±1,24 olarak tespit etmişlerdir. Colla ve ark (2007) ise, 30°C kùltüre aldıkları *S.platensis*'in kuru biyokùtledeki protein oranını %25 N konsantrasyonunda %59,76±2,07, %50 N konsantrasyonunda %57,36±1,13, %75 N konsantrasyonunda %60,82±1,88 ve %100 N konsantrasyonunda ise %57,61±1,16 olarak bildirmişlerdir.

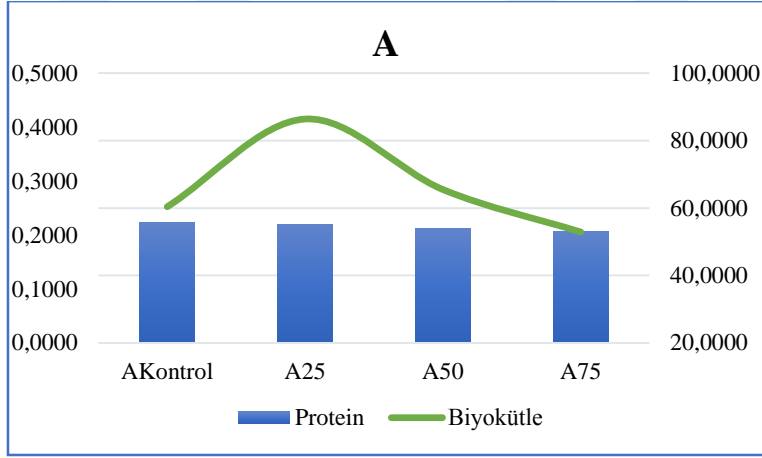
Kuru biyokùtle ile protein arasındaki ilişki grafikleri Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve 4.9'da verilmiştir. Besi ortamları karşılaştırıldığı zaman, en yüksek protein oranı 25°C + %25 N Spirulina besi ortamı (70,1600±0,9412) ile 30°C + %100 N Zarrouk besi ortamı (80,0419) gruplarında saptanmıştır (bkz. Çizelge 4.2).

Deneme grupları arasında değerlendirme yapıldığında, 30°C'de geliştirilen kùltürlere ait protein oranları 25°C'deki gelişmeye göre daha yüksek olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, N konsantrasyonunun sınırlanmasının protein değerleri üzerindeki etkisi farklı bulunmuştur (bkz. Çizelge 4.2).

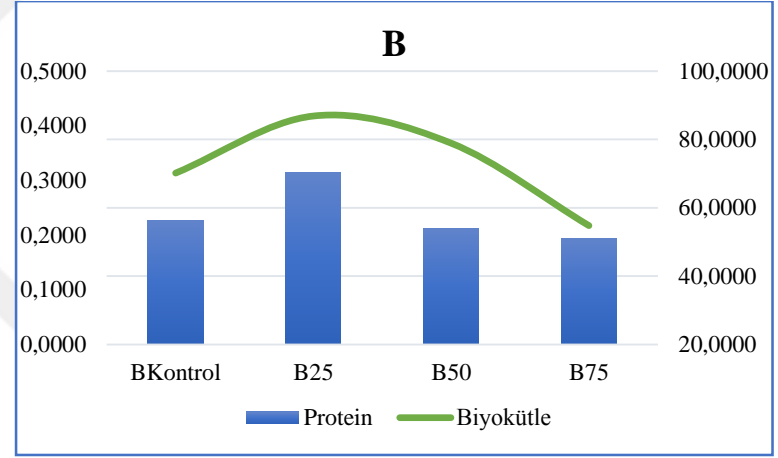
Biyokùtle ve protein arasındaki korelasyon katsayısı bulguları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Buna göre 25°C sıcaklık ve Zarrouk besi ortamı koşullarında biyokùtle ve protein arasında orta düzeyde ve pozitif yönde bir korelasyon bulunmuştur. Deneme grupları arasında yalnızca 30°C'de Zarrouk besi ortamı grubunun protein verileri değişen N konsantrasyonu ve elde edilen biyokùtle miktarları ile yüksek derecede ilişkilidir (R=0,897). *S.platensis*'e uygulanan sıcaklık ve besi ortamı konsantrasyonu değişimi istatistiksel olarak belirlenmiş ve farklılık olduğu tespit edilmiştir (p < 0,05).

Çizelge 4.3 Biyokùtle ile protein korelasyonuna ait R tablosu

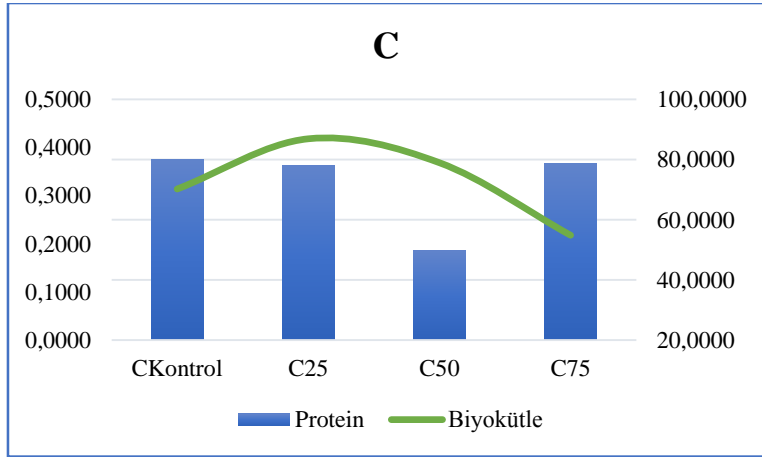
		<i>Biyokùtle / Protein (R)</i>
<i>Sıcaklık</i>	25°C	0,623
	30°C	-0,084
<i>Besi ortamı</i>	<i>Spirulina</i>	0,339
	<i>Zarrouk</i>	0,636



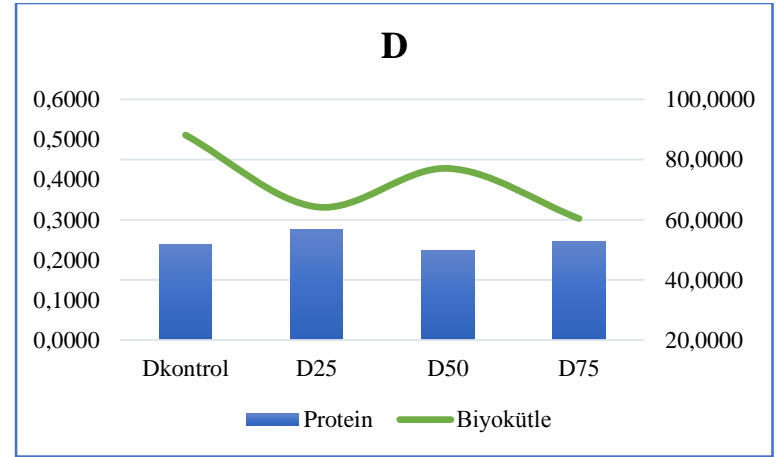
Şekil 4.6 A grubu protein (%) - biyokütle (g L⁻¹) korelasyonu



Şekil 4.7 B grubu protein (%) - biyokütle (g L⁻¹) korelasyonu



Şekil 4.8 C grubu protein (%) - biyokütle (g L⁻¹) korelasyonu



Şekil 4.9 D grubu protein (%) - biyokütle (g L⁻¹) korelasyonu

4.2.2 Toplam yağ değerleri

Mikrobiyal yağ üretiminde iki aşama gözlenmektedir. İlk aşama dengeli gelişmenin gözlendiği bütün besin elementlerinin ortamda yeterli miktarda bulunduğu süreçtir. Besin maddelerinin azalması özellikle de azot kısıtlamasının başladığı durumda ikinci aşama olarak mikroorganizmanın yağ sentezlemeye başladığı *lipogenik faz* başlamaktadır. Bu aşama lipid üretimi için gerekli olan tüm besin kaynakları tükenene dek devam etmekte ve ortama yeniden ilave edilen besin kaynakları ile lipogenik faz oldukça yüksek düzeyde devam etmektedir. Böylece biyokütleden yüksek verimli yağ eldesi mümkün olmaktadır. Mikroorganizmaların yağ sentezleme kapasiteleri bazı parametreler tarafından sınırlanmaktadır. Öncelikle lipid üretimi birincil besin maddelerinin varlığı ile doğrudan ilişkili olup, ortamdaki azot kaynağının azalması ile lipid üretimi indüklenmektedir. Benzer şekilde karbon kaynağı miktarındaki artış da lipid sentezini hızlandırarak miktarını artırmaktadır. Azot kaynağındaki azalma lipid sentezinde artışa neden olurken, protein ve nükleik asit sentezinde yavaşlamaya neden olmaktadır. Bu metabolizma faaliyetlerinde, azot esansiyel element olarak karşımıza çıkmakta ve azotun azalmasına bağlı olarak protein ve nükleik asit metabolizmasının durması sonucu hücre gelişimi sınırlanmaktadır (Ratledge 1978, Denli ve Tekin 2000, Ratledge ve Wynn 2002, Keskin 2005, Ratledge ve Cohen 2008, Ratledge 2008).

S. platensis'e ait yağ oranı 0,9452 ile 12,3100±0,4597 değerleri arasında tespit edilmiş olup ve en yüksek değer 25°C + %50 N Spirulina besi ortamı örneklerinde gözlenmiştir. *S. platensis*'in kuru biyokütlesinin %6,4 ile %14,3'ünü yağın oluşturduğu bildirilmektedir (Ortega-Calvo ve ark. 1993, Badzhanov ve ark. 2004, Kachroo ve ark. 2006). Bununla birlikte, yağ içeriği düşük olmakla birlikte ω-3 ve ω-6, özellikle de GLNA için iyi bir kaynak olduğu da ifade edilmektedir (Burtin 2003, Sánchez-Machado ve ark. 2004, Dawczynski ve ark. 2007, Habib ve ark. 2008, Polat ve Ozogul 2013).

Colla ve ark. (2007), 30°C ve 35°C’de 4 farklı N konsantrasyonunda geliştirdikleri *S. platensis* için yağ oranlarının %6,69±0,27 ile %10,37±0,63 arasında değiştiğini ve besi ortamında NaNO₃ konsantrasyonunun artması ile yağ birikiminin de arttığını bildirmişlerdir. Piorreck ve ark. (1984) ise siyanobakterilerde toplam lipid miktarının besi ortamındaki azot konsantrasyonuna bağlı olmadığını, azotu daha çok ökaryot alglerde lipid sentezini sınırlayıcı gelişme parametresi olarak belirtmişlerdir.

Yapılan yağ oranını optimize edici çalışmalarda %5,21±0,1 ile %18,02±0,4 arasında değişen değerler bulunmuştur (Xue ve ark. 2010, Uslu ve ark. 2011, Madkour ve ark. 2012, Azgın ve ark. 2014).

Griffiths ve ark. (2011)’nin 10 mikroalg ile yaptıkları çalışmada, N oranlarındaki azalma ile biyokütledeki yağ oranının artış gösterdiği bulunurken sadece *S. platensis* için yağ oranı değişiminin N içeriği ile orantılı olmadığı bildirilmiştir. Yapılan tez çalışmasında elde edilen veriler bu çalışma ile uyum göstermekte, yağ oranının değişen N konsantrasyonu, sıcaklık ve biyokütle miktarları ile ilişkisi net olarak belirlenememiştir (Çizelge 4.4). *S. platensis*’e uygulanan sıcaklık ve besi ortamı konsantrasyonu değişimi istatistiksel olarak belirlenmiş ve biyokütledeki yağ oranı verilerinde farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.4 Biyokütle ile yağ korelasyonuna ait R tablosu

		<i>Biyokütle/ Yağ (R)</i>
<i>Sıcaklık</i>	25°C	-0,105
	30°C	0,129
<i>Besi ortamı</i>	<i>Spirulina</i>	-0,113
	<i>Zarrouk</i>	-0,063

Mikrobiyel gelişimde sıcaklık düştükçe ve besi ortamında yüksek C varlığında N konsantrasyonu azaldıkça lipid miktarında artış olması beklenmektedir (Wynn ve Ratledge 2005, Rodolphi ve ark. 2009, Dean ve ark. 2010). Bu durumda en iyi lipid sentezi 25°C + %50 N *Spirulina* besi ortamında gerçekleşmiştir

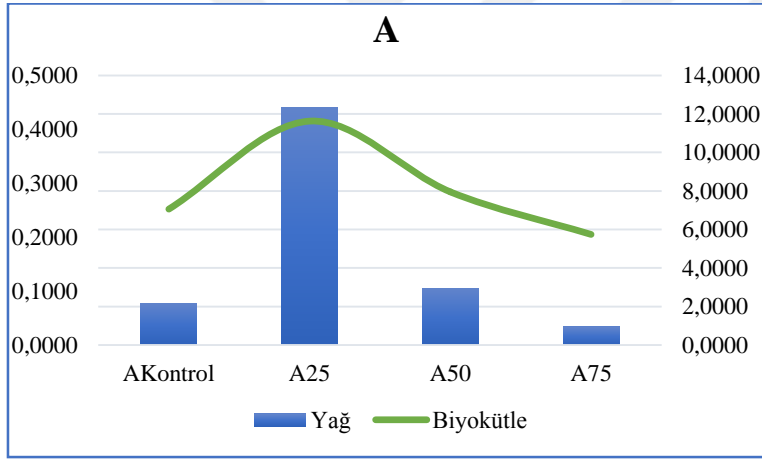
(%12,3100±1,7243, bkz. Şekil 4.10). Aynı sıcaklıktaki Zarrouk besi ortamında ise en iyi lipid değerini %75 N'lu ortam sağlamıştır (%3,7624, bkz. Şekil 4.11). Bu durumun Spirulina besi ortamındaki C konsantrasyonunun Zarrouk besi ortamından daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde 30°C'de iki besi ortamı karşılaştırıldığında, Spirulina ortamında lipid sentezinin daha yüksek olduğu görülmektedir (bkz. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).

4.2.3 Toplam fenolik madde, toplam karotenoid ve antioksidan kapasite değerleri

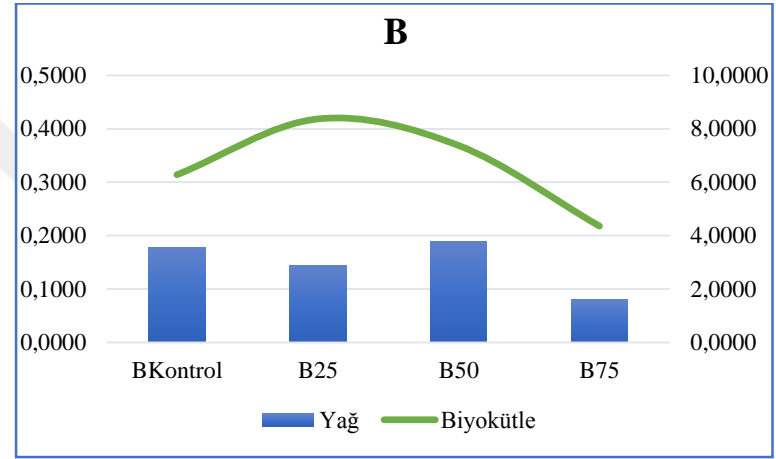
Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler, stres, çeşitli tıbbi tedaviler gibi birçok etken dış atomik orbitallerinde bir ya da daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu serbest radikaller stabil olmayan bileşiklerdir ve çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktiflik kazandırmakta, protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Sonuç olarak, yaşamsal yapılarda bütünlük bozulmakta ve patolojik olayların gelişmesi söz konusu olmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1990, Diplock 1998, Anderson 2007).

Antioksidan maddeler radikal metabolit üretiminin önlenmesi, oluşan radikallerin temizlenmesi (detoksifikasyon), hücre deformasyonunun onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının engellenmesi, endojen antioksidan kapasitesinin artırılmasını engellemekte ya da yavaşlatabilmektedir (Sarıkaya ve ark. 2008).

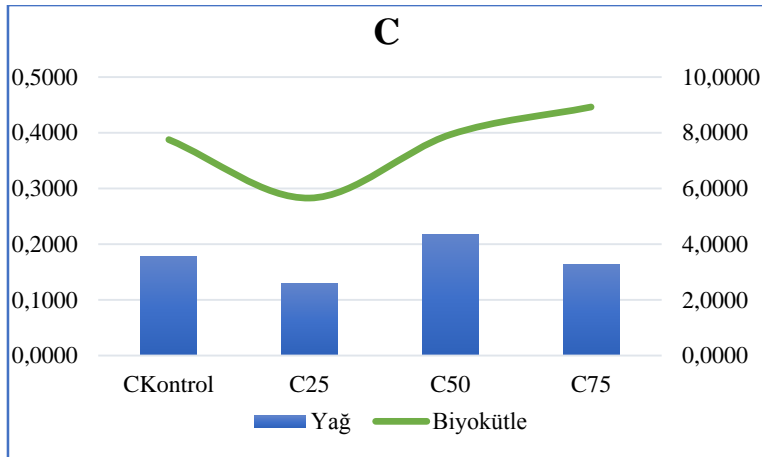
Meyve ve sebzeler başta olmak üzere tahıllar, kuru baklagiller, baharatlar ve çaylar gibi birçok bitkisel kaynaklı gıda askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi farklı miktar ve nitelikte antioksidan bileşenleri içermektedirler. Bu doğal antioksidatif bileşikler, tat, aroma ve renk oluşumu üzerinde de etkili olmaktadır (Kaur ve Kapoor 2001, Pellegrini ve ark. 2003,



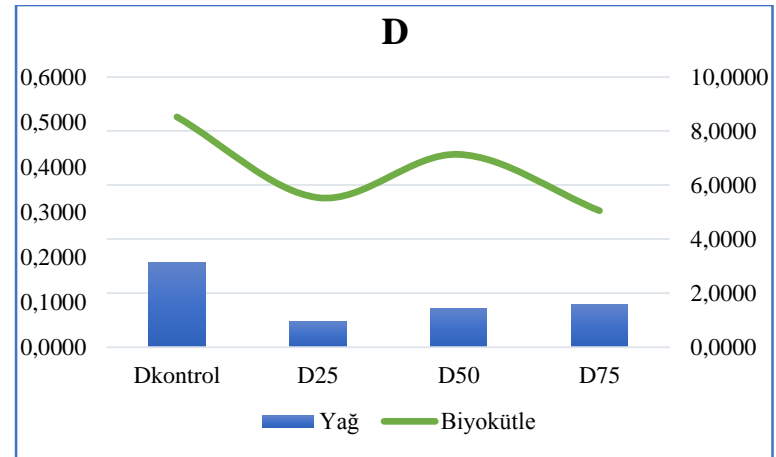
Şekil 4.10 A grubu yağ (%) - biyokütle (g L⁻¹) korelasyonu



Şekil 4.11 B grubu yağ (%) - biyokütle (g L⁻¹) korelasyonu



Şekil 4.12 C grubu yağ (%) - biyokütle (g L⁻¹) korelasyonu



Şekil 4.12 D grubu yağ (%) - biyokütle (g L⁻¹) korelasyonu

Kahlon ve Smith 2004, Tsao ve Deng 2004, Perera ve Yen 2007, Rop ve ark. 2012, Okan ve ark. 2013, Machu ve ark. 2015).

Bitkilerde sekonder metabolit olarak bulunan ve benzen halkası içeren organik maddeler “*Fenolik Bileşikler*” olarak adlandırılmaktadır. Genellikle tat, koku ve renk gibi önemli kalite özelliklerinin oluşumunda etkili olan fenolik bileşikler antioksidan ve antimikrobiyel özellikleri ile insan sağlığı üzerine de olumlu etkiler göstermektedir (Kraovicova ve Simko 2000, Naczek ve Shahidi 2004, Misurcova 2011, Thomas ve ark. 2011). Fenolik maddeler basit fenolik maddeler ve polifenoller olmak üzere iki ana gruba ayrılmakla beraber, fenolik asitler (hidroksibenzoik asit, hidroksisüsamik asit), flavonoidler (flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanononlar, flavanoller, kateşinler, antosiyaninler), izoflavonoidler (izoflavonlar, kumarinler), stilbenler, lignanlar ve fenolik polimerler (proantosiyanidinler/lökoantosiyanidinler, tanenler) gibi alt gruplara ayrılmaktadır (Ribéreau-Gayon ve ark. 2000, Manach ve ark. 2004, Vermerris ve Nicholson 2006, Giada 2013).

Fenolik bileşikler pek çok hastalığa karşı etkin olan flavonoid yapılar gibi yüksek antioksidan kapasitesi oluşturan bileşiklerdir (Wildman 2001, Casaburi ve ark. 2013). İkincil metabolit olarak fenolik bileşiklerin solunum, fotosentez ya da besin-besi ortamı değişiminden direk olarak etkilenmediği bildirilmektedir (Blumberg ve Block 1994, Wildman 2001).

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi yapısındaki fonksiyonel gruplar ile ilişkilidir ve OH grupları içeren fenoliklerin daha iyi antioksidan nitelik gösterdiği bildirilmiştir (Heijnen ve ark. 2001, Heim ve ark. 2002, Gee ve ark. 2002).

Fenolik bileşikler gibi karotenoidler de, moleküler yapılarında bulunan konjuge çift bağ nedeni ile serbest radikal reaksiyonlarının oluşmasını önleyici ve/veya üretilen serbest radikalleri ya da reaktif oksijen ürünlerini baskılayarak dokuları oksidatif ve fotooksidatif hasarlara karşı koruyucu özellik gösteren doğal antioksidan bileşiklerdir (Tee 1992, Ötleş ve Atlı 1997, Uylaşer 2000, Handelman 2001, Akdoğan ve ark. 2008). Karotenoidler hemen hemen tüm yüksek bitkilerde, mikroorganizmalar da, kırmızı ve

yeşil alglerde, fotosentetik bakterilerde, mantarlarda ve hayvanlar aleminin bütün familyalarında değişik miktarlarda bulunan ve onlara sarı-kırmızı renklerini veren pigmentlerdir (Goodwin ve Britton 1988, Delgado-Vergas ve ark. 2000, Mortensen 2006, Giuliano ve ark. 2008, Tanaka ve ark. 2008, Fiedor ve Burda 2014).

Spirulina ve ekstraktlarının insanlarda ve hayvanlarda kanser oluşumunu engellediği ya da önlediğine dair birçok çalışma bulunmaktadır. Spirulina'nın *in vitro* çalışmalarda hücre çekirdek enzim aktivitesini ve DNA hasarının onarılmasını destekleyici rol oynadığı belirlenmiştir (Qureshi ve ark. 1995, Qureshi ve Ali 1996, Pang ve ark. 1998). Ayrıca, humoral (vücut sıvıları) ve selüler (hücre sel) bağışıklık mekanizmalarının oluşumuna, T lenfosit hücrelerin fonksiyonlarının artmasına ve vücut savunma sisteminin güçlenmesine neden olduğu da bildirilmektedir (Qureshi ve ark. 1996, Estrada ve ark. 2001, Lu et al. 2006).

S.platensis'e ait bildirilen tüm bu özelliklerin nedeni olarak içerdikleri biyoaktif maddelerin varlığı gösterilmiştir. Biyoaktif bileşikleri üzerine pek çok çalışma yapılmış, Miranda ve ark. (1998) *S. maxima*'dan ekstrakte edilen fenolik bileşikleri (kafeik asit, trans-sinamik asit, klorojenik asit) antioksidan aktivitenin sorulduğu olarak ifade ederken, Estrada ve ark. (2001) Spirulina biyokütlesindeki fikobiliproteinler, fikosiyaninler ve allofikosiyaninleri antioksidan aktivitenin kaynağı olarak bildirmiştir.

S.platensis'e ait toplam fenolik madde değerleri 0,6062 ile 1,4717±0,30 mg GAE g⁻¹, toplam karotenoid değerleri 0,0585±0,08 ile 0,1194±0,02 mg g⁻¹ ve DPPH metodu ile antioksidan kapasite değerleri 0,00098±0,47 ile 0,00148±0,47 mg g⁻¹ arasında saptanmıştır (bkz. Çizelge 4.2).

Colla ve ark. (2007) farklı azot rejimlerinde geliştirdikleri *S. platensis* için fenolik madde değerlerinin 2,42±0,21 ile 4,99±0,29 mg GAE g⁻¹ arasında değiştiğini ifade etmektedir. Kepekçi ve Saygıdeğer (2012) ise, Schlösser besi ortamında ışıklandırma düzeyleri değiştirilerek oksidatif stres yaratılarak geliştirilen *S. platensis*'in fenolik madde içeriğini 49,83±5,56 mg GAE g⁻¹ değerine kadar arttırdığını bildirmişlerdir.

Fenolik bileşenlerin antioksidan aktivite üzerinde en önemli etken olduğu ve aralarında istatistiksel olarak %99 düzeyinde ($p < 0,01$) ilişki olduğunu gözlemlemiştir.

Salamatullah (2014) etanol, metanol, aseton, etanol+HCl, metanol+HCL ve aseton+HCl ile ekstrakte ettiği *S.platensis*'in toplam fenolik madde miktarının $0,25 \pm 0,01$ ile $8,61 \pm 0,44$ mg GAE g^{-1} değerleri arasında değiştiğini bildirmiştir. Aynı zamanda mevcut fenolik bileşiklerin apolar yapıda olması ya da polar bağdan yoksun olması nedeniyle aseton ekstraktlarının toplam fenol geri kazanımında daha etkili olduğunu ifade etmiştir. Antioksidan kapasite değerlerinin ise $1,17 \pm 0,05$ ile $61,92 \pm 7,63$ μ M Trolox g^{-1} arasında değiştiğini saptamıştır. Gözlenen değişimlerin kullanılan solventlerin farklı serbest radikal bağlama aktivitesi gösteren bileşenleri ekstrakte etmesinden kaynaklandığını belirtmiştir.

Cepoi ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, farklı etanol konsantrasyonları kullanarak ekstrakte ettikleri *S. platensis*'in TEAC yöntemi ile belirlediği antioksidan aktivite değerlerinin $1,28 \pm 0,06$ ile $2,82 \pm 0,08$ mM Trolox g^{-1} arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Etanol konsantrasyonunun antioksidan aktivite üzerinde etkili olmadığını, ancak biyokütleden hem suda hem de lipid içinde çözünebilir biyoaktif bileşiklerin etkin olarak ekstrakte edilmesini sağladığı için antioksidan aktivite analizlerinde kullanılmasını önermişlerdir.

Shlaby ve Shanab (2013), *S. platensis*'in su, metanol ve metanol+su (50:50, v/v) çözümlerini kullanarak toplam fenolik bileşen ile DPPH ve ABTS yöntemleriyle antiradikal ve antioksidan aktivitesini belirlemeye çalışmışlardır. En yüksek antiradikal aktivite fenolik miktarının en yüksek olduğu metanol ekstraktında saptanmış ve ABTS yöntemi ile %99,55 antiradikal ve antioksidan aktivite göstermiştir.

Abd El-Baky ve ark. (2009) *S.platensis*'e gelişme süresince H_2O_2 ile oksidatif stres uygulamışlar ve kontrol grubunda $4,61$ mg g^{-1} olarak saptanan toplam karotenoid değerini 8 mMol H_2O_2 içeren besi ortamı grubunda $35,25$ mg g^{-1} olarak bildirmişlerdir.

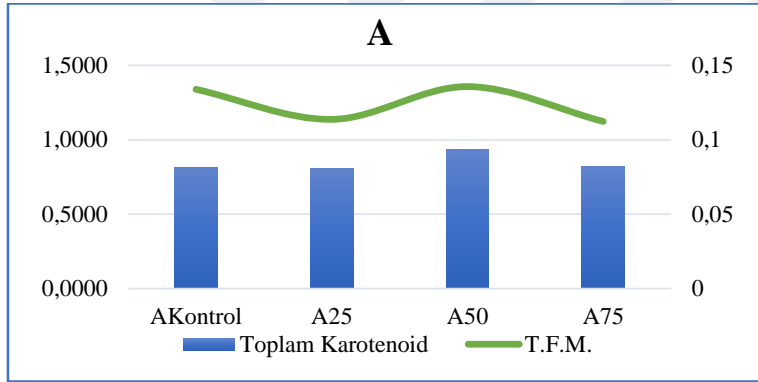
Toplam fenolik madde, toplam karotenoid ve antioksidan aktivite analiz sonucu verilerine ait korelasyon grafikleri Şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19 ve 4.20’de görülmektedir. Çizelge 4.5’te toplam fenolik madde ile toplam karotenoid arasında sıcaklık ve besi ortamı değişimi koşullarında orta düzeyde ve pozitif yönde bir korelasyon olduğu görülmektedir.

Besi ortamları karşılaştırıldığı zaman, en yüksek toplam fenolik madde değeri 30°C + %25 N Spirulina besi ortamı (1,4717±0,30 mg GAE g⁻¹)’nda belirlenmiştir. En düşük toplam fenolik madde (0,6062 mg GAE g⁻¹) ile toplam karotenoid (0,0585±0,08 mg g⁻¹) değerlerinin saptandığı 30°C + %100 N Zarrouk besi ortamında en yüksek antioksidan kapasite (0,00148 ±0,30 mg Troloks g⁻¹) gözlenmiştir (bkz. Çizelge 4.2).

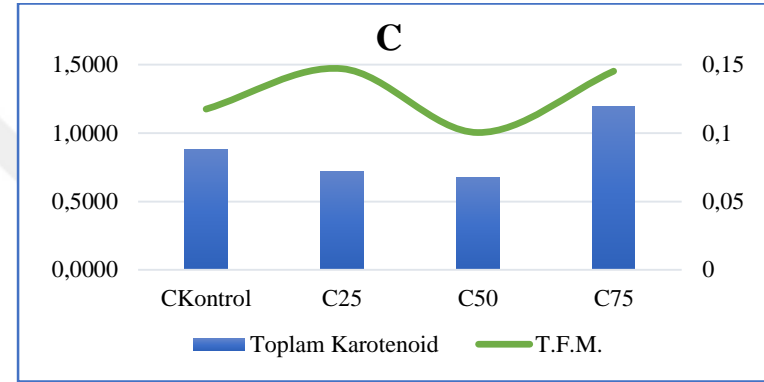
Sıcaklık ve azot miktarındaki değişimler toplam fenolik madde ve karotenoid miktarı üzerinde etkili olmaktadır. Antioksidan kapasite ise fenolik madde miktarı ile negatif yönde bir ilişki oluşturmaktadır; sıcaklık artışı ile antioksidan kapasite azalmaktadır.

Çizelge 4.5 Protein, toplam fenolik madde, toplam karotenoid ve antioksidan kapasite korelasyonuna ait R tablosu

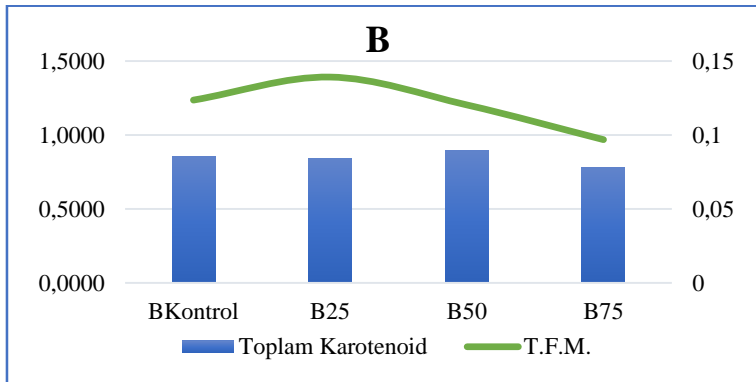
	<i>Protein / T.F.M</i>	<i>T.F.M / Toplam Karotenoid</i>	<i>T.F.M / Antioksidan Kapasite</i>
<i>Sıcaklık</i>			
25°C	0,646	0,583	0,219
30°C	0,528	0,552	-0,710
<i>Besi ortamı</i>			
<i>Spirulina</i>	0,573	0,504	-0,235
<i>Zarrouk</i>	0,121	0,645	-0,654



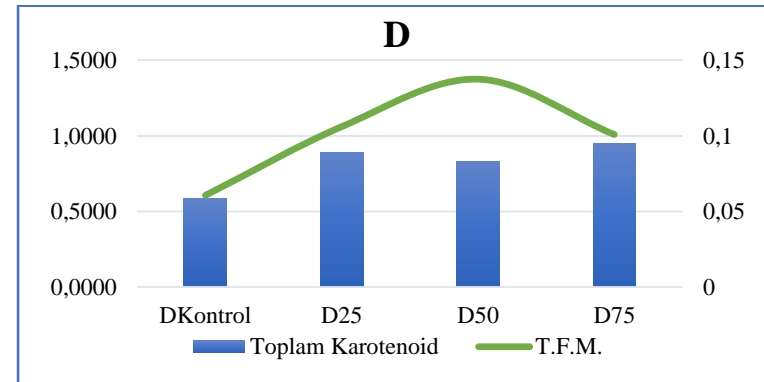
Şekil 4.13 A grubu toplam karotenoid (mg g⁻¹) – toplam fenolik madde (mg GAE g⁻¹) korelasyonu



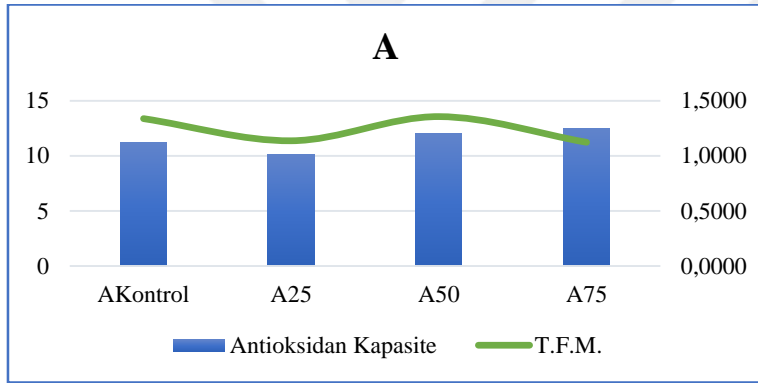
Şekil 4.15 C grubu toplam karotenoid (mg g⁻¹) – toplam fenolik madde (mg GAE g⁻¹) korelasyonu



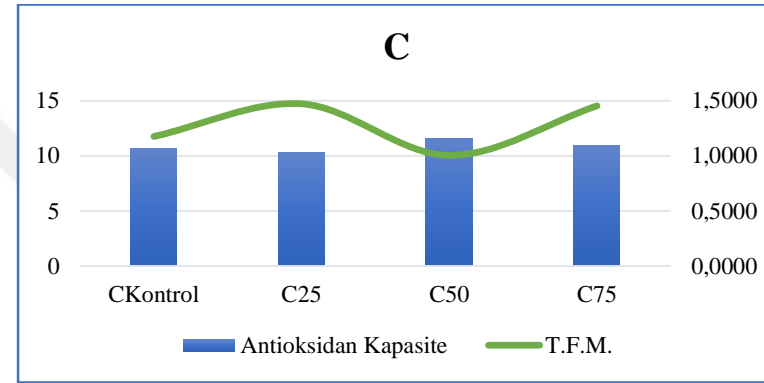
Şekil 4.14 B grubu toplam karotenoid (mg g⁻¹) – toplam fenolik madde (mg GAE g⁻¹) korelasyonu



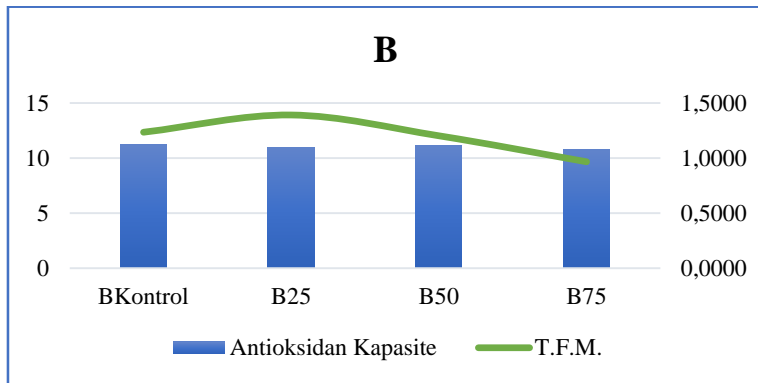
Şekil 4.16 D grubu toplam karotenoid (mg g⁻¹) – toplam fenolik madde (mg GAE g⁻¹) korelasyonu



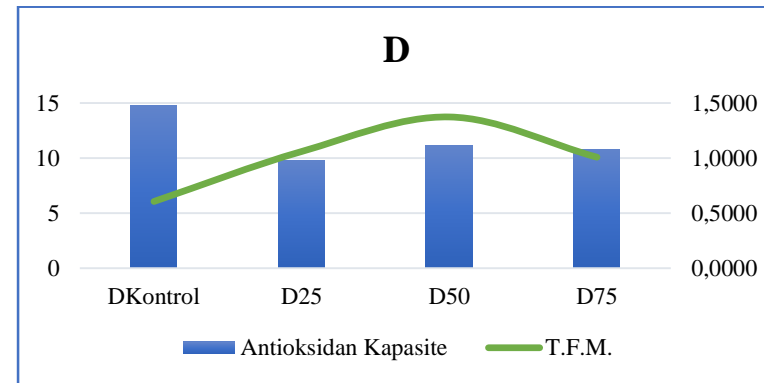
Şekil 4.17 A grubu antioksidan kapasite (μM Troloks g^{-1}) – toplam fenolik madde (mg GAE g^{-1}) korelasyonu



Şekil 4.19 C grubu antioksidan kapasite (μM Troloks g^{-1}) – toplam fenolik madde (mg GAE g^{-1}) korelasyonu



Şekil 4.18 B grubu antioksidan kapasite (μM Troloks g^{-1}) – toplam fenolik madde (mg GAE g^{-1}) korelasyonu



Şekil 4.20 D grubu antioksidan kapasite (μM Troloks g^{-1}) – toplam fenolik madde (mg GAE g^{-1}) korelasyonu

4.2.4 *S. platensis*'in yağ asitleri kompozisyonu

Sabunlaşabilen lipidlerin yapıtaşları olan yağ asitleri hücrelerde nadir olarak serbest halde bulunmaktadır. Çift sayıda karbon atomu içeren alifatik ve monobazik organik asitler olarak tanımlanmakla birlikte uçlarında –COOH grubu bulunan uzun zincirli hidrokarbonlar olarak da ifade edilmektedirler.

Yağ asitlerinin fiziksel, kimyasal ve beslenmedeki rollerini moleküldeki karbon atomu sayısı, doymuşluk derecesi, karbon atomları arasındaki çift bağ sayısı ve karbon atomlarına bağlı hidrojenlerin pozisyonu belirlemektedir. Besin kaynağı olarak yağ asitleri, doymuş yağ asitleri (SFA), tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) olarak sınıflandırılmaktadırlar. Organizma vücut içerisinde SFA ve MUFA sentezini gerçekleştirebilmekte ancak üçüncü ve altıncı karbon atomunda çift bağ bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini ya tamamen sentezleyememekte ya da yeterli miktarda sentezleyememektedir. Bu nedenle, insan beslenmesinde PUFA'lar esansiyel aminoasitlere benzer şekilde “esansiyel yağ asitleri” olarak ifade edilmektedir (Grofova 2010, Misurcova ve ark. 2012).

Alglerin insan beslenmesindeki önemi yapısında yüksek miktarlarda bulunan protein, vitamin, amino asit ve mineral maddelerden kaynaklanmaktadır (Southgate 1990, Lahaye 1991, Dawes 1998, Pal ve ark. 1998). Alg kültürlerinde biyokimyasal özellikler tür, yetiştiği bölge, mevsim, su sıcaklığı, ışık şiddeti ve ışıklanma süresi gibi parametrelere bağlı olarak değişim göstermektedir. Diğer deniz ürünleri ile karşılaştırıldığında alglerin yağ içerikleri düşük olup, genellikle %1–5 arasında değişmektedir (Aguilera-Morales ve ark 2005, Dawczynski ve ark. 2007, Polat ve Ozogul 2013). Yeşil alglerde yağ miktarı %0,6 ile %4,3 arasında değişiklik gösterirken, diğer mikroalgler için bu oran %2–12,3 olarak belirtilmektedir (Siron ve ark. 1989, Sallal ve ark. 1990, Wada ve Murata 1990, Chernova ve ark. 2001, Bigogno ve ark. 2002).

Türlere göre değişmekle birlikte, toplam yağ içinde EPA, ARA, ALNA ve GLNA'nın özellikle *S. platensis*'de oranları belirgin olarak yüksektir (Burtin 2003, Habib ve ark. 2008).

Son yıllarda alglerin önemi diğer bitkisel ve hayvansal kaynaklı yağ asitlerine benzer ya da alternatif olan esansiyel yağ asitleri bileşimi ile de ilişkilendirilmektedir (Darcy-Vrillon 1993, Vazhappily ve Chen 1998, de Swaaf ve ark 1999, Rosa ve ark 2005, Mendes ve ark 2007).

S. platensis'e ait yağ asitlerinin %17'si sabunlaşmayan nitelikte olan esansiyel pigmentler, parafin, sterol ve terpen alkollerden meydana gelmektedir (Hoseini ve ark. 2013). Toplam yağ asitlerinin yarısını oluşturan sterol yapıdaki ω -6 yağ asitleri algal hücre duvarlarının galaktolipid yapısında bulunmaktadır (Certik ve Shimizu 1999).

S. platensis yaklaşık olarak %49 GLNA içermektedir ve bu anne sütü ile çuha çiçeği ve boraj yağlarının ardından *Spirulina*'yı en iyi GLNA kaynağı yapmaktadır (Petkov ve Furnadzieva 1988).

Çizelge 4.6'da tüm deneme gruplarına ait kuru biyokütlerdeki yağ asitleri oranı verilmiştir. Buna göre SFA değerleri %24,24 ile 50,66 (bkz. Çizelge 4.7) arasında değişim göstermekte olup en baskın yağ asidi palmitik asit olarak gözlenmiştir.

Yalnızca 25°C'de *Spirulina* besi ortamında gelişen *S. platensis*'in SFA değerleri değişen N konsantrasyonu ile belirgin değişim göstermiştir. Diğer gruplarda ise sıcaklık ve azot konsantrasyonu değişimleri SFA değerleri üzerinde önemli düzeyde etkili bulunmamıştır. Çalışmada elde edilen SFA değerleri, Durmaz ve Gökpinar (2006)'ın 26°C'de geliştirdikleri kültüre ait %70,3 ve Ambrozova ve ark. (2014)'nın güneş ışığı altında fotobiyoreaktörde geliştirdikleri kültüre ait %63,18 değerlerinden daha düşük olarak tespit edilmiştir. Ötleş ve Pire (2001) piyasada satışa sunulan *Spirulina* tozlarına ait analiz sonuçlarında SFA oranlarını %55,72, %51,64 ve %51,96 olarak bildirmişlerdir.

Çizelge 4.6 Farklı stres koşullarında geliştirilen *S. platensis*'e ait yağ asitleri değişimleri

	<i>Biyokütle</i>	<i>Yağ</i>	<i>SFA</i>	<i>MUFA</i>	<i>PUFA</i>	<i>GLNA</i>	
	g L ⁻¹	%	%	%	%	%	PUFA
<i>AKontrol</i>	0,2522	0,9452 ^g	46,0174	18,4361	29,1027	17,5870	60,43
<i>A25</i>	0,4152	2,1779 ^{ef}	27,2406	36,4759	29,8142	0,5102	1,71
<i>A50</i>	0,2842	12,3100±1,7243 ^a	49,5632	29,9760	13,3895	2,9708	22,19
<i>A75</i>	0,2053	2,9644 ^{cde}	39,9265	20,2658	27,0313	14,8036	54,76
<i>BKontrol</i>	0,3138	1,5905 ^{fg}	47,2354	17,2283	33,8090	24,7354	73,16
<i>B25</i>	0,4182	3,5587 ^{bc}	49,1379	17,4337	30,4756	11,8786	38,97
<i>B50</i>	0,3685	2,8846 ^{cde}	43,7688	18,6664	35,2013	22,9781	65,27
<i>B75</i>	0,2177	3,7624 ^{bc}	50,6654	14,8445	34,4891	23,7851	68,96
<i>CKontrol</i>	0,3877	3,2819 ^{cd}	43,3146	20,0218	34,5266	17,5000	50,68
<i>C25</i>	0,2830	3,5714 ^{bc}	50,5795	14,5819	30,2302	12,2392	40,48
<i>C50</i>	0,3967	2,5974 ^{de}	49,9195	13,4685	34,1784	15,7208	45,99
<i>C75</i>	0,4462	4,3393 ^b	48,1816	21,1087	22,8356	9,3783	41,07
<i>DKontrol</i>	0,5112	1,5598 ^{fg}	46,7663	12,0572	41,3657	22,1429	53,53
<i>D25</i>	0,4281	3,1189 ^{cd}	50,0586	14,2326	35,7114	20,1894	56,53
<i>D50</i>	0,3322	0,9524 ^g	48,2824	15,3605	36,3536	19,1043	52,55
<i>D75</i>	0,3031	1,4414 ^{fg}	45,7287	11,6411	42,6098	23,2055	54,46

Yürütülen tez çalışmasında örneklerin MUFA değerleri (bkz. Çizelge 4.8) sıcaklık yükseldikçe birbirine yakın değerlere ulaşmıştır. Spirulina besi ortamında MUFA sentezinin hızlandığı yüksek sıcaklık ve düşük azot konsantrasyonunda GLNA birikimin oldukça düşük değerlerde olduğu tespit edilmiştir (bkz. Çizelge 4.9). Benzer sonuçlar Piorreck ve ark. (1984) ile Griffiths ve ark. (2012) tarafından da bildirilmiştir.

PUFA ve GLNA üretimi sıcaklık ve besin kaynağı dışında besi ortamında çözünmüş olarak bulunan oksijen varlığı ile de yakından ilişkilidir. Ronda ve ark. (2012) kış döneminde gerçekleştirilen algal gelişmede 10 mg L⁻¹ (%115 O₂ doygunluğu) olan O₂ çözünürlüğünü, yaz aylarında ise 30 mg L⁻¹ (%375 O₂ doygunluğu) olarak bildirmişlerdir. Çalkalama ve su sirkülasyonunun olmadığı ortamlarda O₂ doygunluğu %500 değerlerine ulaşabileceğini ve fotosentez ile alg gelişiminin inhibe olabileceğini ifade edilmektedir (Márquez ve ark. 1995, Singh ve ark. 1995, Vonshak 1997).

Sıcaklığın azalması ile PUFA veriminin artacağı Knothe (2005) tarafından bildirilmiştir. Ancak yürütülen çalışmada, 25°C + %75 N Spirulina besi ortamında gelişen örnekler dışında diğer alg gelişimlerinde sıcaklık 25°C'den 30°C'ye yükseldiği zaman PUFA veriminin arttığı gözlenmiştir. PUFA verimindeki bu artış özellikle Spirulina besi ortamında %50 N örneğinde daha belirgin olarak bulunmuştur (bkz. Çizelge 4.6).

Ramadan ve ark. (2008) 25±2°C'de 4 000 lux ışık şiddetinde 15 gün boyunca geliştirdikleri *S. platensis*'te GLNA (%23,4±0,07)'nin ardından %18,7±0,07 değeriyle LA'nın en baskın yağ asidi olduğunu ifade etmişlerdir. Ambrozova ve ark. (2014) fotobiyoreaktörde geliştirdikleri *S. platensis*'te %10,44 değeriyle GLNA ve %18,42 değeriyle LA olarak tespit etmişlerdir.

Olguin ve ark. (2001) *Spirulina* türünde gelişim boyunca 2 farklı ışık şiddeti uygulamışlar ve kimyasal kompozisyona etkisini incelemişlerdir. Buna göre 66 µmol foton m⁻²s⁻¹ ışık şiddetinde 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 18:3 yağ asitlerinin miktarı sırasıyla %43,98±0,96, %1,63±0,25, %6,32±0,28, %16,84±0,28 ve %31,20±0,74, 144 µmol foton m⁻²s⁻¹ ışık şiddetinde ise 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 18:3 yağ asitlerinin miktarını sırasıyla %43,17±3,14, %4,60±0,22, %5,33±0,75, %16,12±1,03 ve %30,69±4,67 olarak bildirmişlerdir.

Tüm örneklerde en baskın yağ asidi olarak palmitik asit ve GLNA saptanmıştır. Diğer araştırmalardan (Roughan 1989, Otle ve Pire 2001, Ramadan ve ark. 2008) farklı olarak LA yerine oleik asit üçüncü en baskın yağ asidi olmuş ve bu biyosentez değişikliğinin kullanılan besi ortamı ile N sınırlamaları ve sıcaklık uygulamalarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Piorreck ve ark. (1984) ile Griffiths ve ark. (2012) tarafından da belirtildiği üzere GLNA miktarının düşük olduğu gruplarda LA değerinin yükseldiği gözlenmiştir (bkz. Çizelge 4.9).

Durmaz ve Gökpınar (2006) GLNA sentezinin kültür sıcaklığından etkilenmediğini bildirirken, Colla ve ark. (2004) ise sıcaklığın yağ asidi sentezini direkt etkilediğini ve en iyi GLNA miktarının 30°C'de gelişim ile elde edilebileceğini ifade etmişlerdir.

GLNA değerleri 30°C'deki örneklerde 25°C'de gelişime göre daha yüksek bulunmuştur. En yüksek GLNA değeri toplam yağ asitlerinin %24,7354'i ve PUFA'nın %73,16'sı ile Zarrouk besi ortamı 25°C + %100 N örnek grubunda gözlenmiştir (bkz. Çizelge 4.9).



Çizelge 4.7 Doymuş yağ asitleri oranları (%)

	<i>C12:0</i>	<i>C13:0</i>	<i>C14:0</i>	<i>C16:0</i>	<i>C17:0</i>	<i>C18:0</i>	<i>C20:0</i>	<i>C22:0</i>
<i>AKontrol</i>	0,4156±0,001 ^b	0,7344±0,021 ^d	0,6025±0,004 ^{ab}	27,5579±0,057 ^{de}	0,7488±0,220 ^a	3,0678±0,007 ^c	12,2820±0,027 ^{ab}	nd
<i>A25</i>	nd	0,1442±0,020 ^{fg}	0,2463±0,011 ^{def}	11,1274±0,094 ^f	nd	7,3370±0,068 ^b	1,6920±0,066 ⁱ	2,6790±0,194 ^b
<i>A50</i>	0,1662±0,006 ^f	0,2267±0,033 ^{efg}	0,7143±0,413 ^a	22,4005±10,323 ^e	0,3079±0,061 ^b	9,1557±3,896 ^a	2,7182±2,335 ^{hi}	5,4460±2,880 ^a
<i>A75</i>	nd	1,0534±0,131 ^c	0,3049±0,006 ^{de}	22,7856±0,078 ^c	0,7447±0,254 ^a	2,3583±0,012 ^{cd}	12,6796±0,251 ^{ab}	nd
<i>BKontrol</i>	nd	0,4192±0,008 ^e	0,3862±0,008 ^{cd}	28,5784±0,480 ^{cde}	nd	2,4499±0,048 ^{cd}	14,5085±0,257 ^a	nd
<i>B25</i>	0,1695±0,002 ^f	0,2794±0,011 ^{ef}	0,2245±0,004 ^{def}	38,5876±0,049 ^a	0,2174±0,012 ^{bc}	2,2382±0,019 ^{cde}	6,7300±0,027 ^{efg}	0,4386±0,015 ^c
<i>B50</i>	0,1427±0,002 ^g	0,3484±0,019 ^{ef}	0,3833±0,002 ^{cd}	29,5209±0,06 ^{bcde}	0,3311±0,075 ^b	1,8594±0,009 ^{cde}	11,1831±0,027 ^{bc}	nd
<i>B75</i>	nd	0,3990±0,005 ^e	0,2096±0,002 ^{ef}	33,3785±0,005 ^{abcd}	0,2927±0,011 ^{bc}	1,8756±0,01 ^{cde}	14,5100±0,004 ^a	nd
<i>CKontrol</i>	0,0842±0,002 ⁱ	1,0013±0,027 ^c	0,2185±0,012 ^{def}	33,4864±0,234 ^{abcd}	0,1849±0,008 ^{bc}	2,2718±0,125 ^{cde}	5,7762±0,073 ^{fg}	nd
<i>C25</i>	0,0747±0,001 ^j	1,6892±0,093 ^b	0,1856±0,015 ^{ef}	39,8828±0,054 ^a	0,1670±0,032 ^{bc}	1,4567±0,017 ^{de}	6,7949±0,181 ^{efg}	0,3288±0,047 ^c
<i>C50</i>	0,0420±0,0003 ^k	1,1566±0,022 ^{cd}	0,1390±0,001 ^f	35,8443±0,081 ^{abc}	0,1857±0,012 ^{bc}	0,9839±0,004 ^e	11,5139±0,032 ^{abc}	nd
<i>C75</i>	0,1073±0,001 ^h	2,8443±0,193 ^a	0,1898±0,002 ^{ef}	36,9423±0,101 ^{ab}	0,1718±0,011 ^{bc}	1,8785±0,006 ^{cde}	4,9875±0,466 ^{gh}	0,3103±0,001 ^c
<i>DKontrol</i>	0,3107±0,0028 ^d	nd	0,2762±0,003 ^{def}	35,5616±0,103 ^{abc}	nd	1,8731±0,006 ^{cde}	8,7447±0,045 ^{de}	nd
<i>D25</i>	0,2660±0,005 ^e	nd	0,3524±0,003 ^{cde}	37,1778±0,082 ^a	0,5991±0,183 ^a	2,8622±0,013 ^{cd}	8,8011±0,018 ^{de}	nd
<i>D50</i>	0,4974±0,003 ^a	nd	0,5239±0,003 ^{bc}	35,3008±0,068 ^{abc}	nd	2,5257±0,0172 ^{cd}	9,4346±0,175 ^{cd}	nd
<i>D75</i>	nd	nd	0,3089±0,035 ^{de}	35,5360±0,099 ^{abc}	nd	1,9857±0,007 ^{cde}	7,4941±0,022 ^{def}	nd

Çizelge 4.8 Tekli doymamış yağ asitleri oranları (%)

		<i>C14:1</i>	<i>C15:1</i>	<i>C16:1</i>	<i>C17:1</i>	<i>C18:1</i>	<i>C22:1 n9</i>
<i>AKontrol</i>	AK	nd	nd	4,4701±0,0065 ^{cd}	nd	13,9660±0,0264 ^{def}	nd
<i>A25</i>	A25	0,5009±0,0243 ^a	nd	0,2986±0,0044 ^e	nd	35,0085±0,2768 ^a	0,6679±0,0130 ^a
<i>A50</i>	A50	0,3073±0,0582 ^b	0,1130±0,0657 ^a	1,0492±1,5065 ^e	0,0856±0,1482 ^c	19,7633±4,7544 ^b	0,6029±0,3482 ^b
<i>A75</i>	A75	nd	nd	3,8608±0,0013 ^d	nd	16,4050±0,0622 ^c	nd
<i>BKontrol</i>	BK	nd	nd	6,2278±0,1258 ^a	nd	10,9945±0,1535 ^{ghi}	nd
<i>B25</i>	B25	nd	nd	5,5135±0,0817 ^{abc}	0,3501±0,0071 ^a	11,5700±0,0245 ^{fgh}	nd
<i>B50</i>	B50	0,1687±0,0974 ^c	nd	5,6743±0,0148 ^{ab}	0,2123±0,0037 ^b	12,6112±0,1089 ^{efg}	nd
<i>B75</i>	B75	nd	nd	6,1133±0,0054 ^a	0,2285±0,0048 ^b	8,5028±0,0094 ^{ik}	nd
<i>CKontrol</i>	CK	nd	nd	4,7300±0,0354 ^{bcd}	0,2918±0,0074 ^{ab}	15,0000±0,1042 ^{cde}	nd
<i>C25</i>	C25	nd	nd	5,7795±0,3540 ^{ab}	0,3465±0,0074 ^a	8,4559±0,0141 ^{jk}	nd
<i>C50</i>	C50	nd	nd	5,1533±0,0125 ^{abc}	0,3461±0,0026 ^a	7,9691±0,0222 ^{ikl}	nd
<i>C75</i>	C75	0,1016±0,0055 ^d	nd	4,7425±0,0043 ^{bcd}	0,2951±0,0039 ^{ab}	15,9695±0,0534 ^{cd}	nd
<i>DKontrol</i>	DK	nd	nd	4,7483±0,1200 ^{bcd}	nd	7,3089±0,2361 ^{kl}	nd
<i>D25</i>	D25	nd	nd	5,1709±0,0262 ^{abc}	nd	9,0618±0,0306 ^{ijk}	nd
<i>D50</i>	D50	nd	nd	5,3605±0,0076 ^{abc}	nd	10,0000±0,1279 ^{hij}	nd
<i>D75</i>	D75	nd	nd	4,8240±0,0186 ^{bcd}	nd	6,8171±0,0252 ^{kl}	nd

Çizelge 4.9 Çoklu doymamış yağ asidi oranları (%)

		<i>C18:2 n6</i>	<i>C18:3 n6 (GLA)</i>	<i>C20:3 n6</i>	<i>C20:5 n3</i>	<i>C22:2</i>
<i>AKontrol</i>	AK	9,0845±0,0274 ^{ef}	17,5870±0,0412 ^{de}	nd	nd	2,4313±0,0385 ^c
<i>A25</i>	A25	25,2282±0,1134 ^a	2,9708±5,1456 ⁱ	nd	3,1143±0,0533 ^b	2,6053±0,0086 ^{bc}
<i>A50</i>	A50	4,7664±7,0257 ^g	0,5102±0,0025 ⁱ	nd	8,8343±4,8691 ^a	1,0989±0,1131 ^{fg}
<i>A75</i>	A75	8,6368±0,0932 ^{fg}	14,8036±0,0497 ^{fg}	nd	nd	3,5908±0,0419 ^a
<i>BKontrol</i>	BK	9,0736±0,1592 ^{ef}	24,7354±0,4245 ^a	0,8931±0,0191 ^a		nd
<i>B25</i>	B25	16,9192±0,0197 ^{bc}	11,8786±0,0131 ^{gh}	nd	0,3933±0,0061 ^c	1,2846±0,0143 ^c
<i>B50</i>	B50	10,6664±0,0295 ^{ef}	22,9781±0,0513 ^{ab}	0,5804±0,0069 ^b	nd	0,9765±0,1022 ^{gh}
<i>B75</i>	B75	10,7041±0,0073 ^{ef}	23,7851±0,0072 ^a	nd	nd	nd
<i>CKontrol</i>	CK	16,1395±0,1158 ^{bcd}	17,5200±0,1213 ^{de}	nd	nd	0,8671±0,0128 ^h
<i>C25</i>	C25	17,0183±0,0190 ^{bc}	12,2392±0,0133 ^{gh}	nd	nd	0,9727±0,0145 ^{gh}
<i>C50</i>	C50	17,5914±0,0503 ^b	15,7208±0,0472 ^{ef}	0,1187±0,0136 ^c	nd	0,7476±0,0136 ⁱ
<i>C75</i>	C75	12,2709±0,0418 ^{def}	9,3783±0,0290 ^{gh}	nd	nd	1,1865±0,0119 ^{ef}
<i>DKontrol</i>	DK	16,1299±0,2223 ^{bcd}	22,1429±0,0566 ^{abc}	nd	nd	3,0929±0,0170 ^b
<i>D25</i>	D25	15,5220±0,0244 ^{bcd}	20,1894±0,0294 ^{bcd}	nd	nd	nd
<i>D50</i>	D50	17,2487±0,0864 ^{bc}	19,1049±0,0269 ^{cd}	nd	nd	nd
<i>D75</i>	D75	17,6662±0,0393 ^b	23,2055±0,0623 ^{ab}	nd	nd	1,7382±0,2686 ^d

5. SONUÇLAR

Mavi yeşil alg grubundan olan *Spirulina platensis* türünün yağ ve GLNA içeriğinin artırılması amacıyla N eksikliği ve sıcaklık değişimi gibi stres koşullarında gelişimi laboratuvar ortamında çalışılmıştır.

S. platensis (UTEX-LB 2340) gelişiminde sıcaklık rejimi olarak 25°C, 30°C ve 35°C denenmiştir. 35°C'de *S. platensis* hızlı bir gelişim sergileyerek 72 saat sonunda ölüm fazına geçmiştir. Bu sebeple biyoaktif bileşen ve yağ asidi profili analizleri 25°C ve 30°C'de geliştirilen kültürlerde gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık rejimi ile birlikte *Spirulina* besi ortamı ile Zarrouk besi ortamları değerlendirilmiş ve azot kaynağı olan NaNO₃ %25, %50, %75 ve %100 oranlarında ayarlanarak kullanılmıştır. Bunun sonucunda;

1. En yüksek biyokütle miktarı Zarrouk besi ortamının 25°C + %100 N konsantrasyonunda geliştirilen örnekler, en düşük biyokütle miktarı ise *Spirulina* besi ortamında 25°C + %75 N konsantrasyonundaki örneklerde,
2. En yüksek spesifik gelişme oranı 25°C + %25 N konsantrasyonundaki Zarrouk besi ortamında, en düşük sonuç yine Zarrouk besi ortamında 30°C + %100 N konsantrasyonunda,
3. Protein sentezlenmesinde en yüksek miktar 25°C'de *Spirulina* besi ortamında %100 N konsantrasyonlu örneklerde, en düşük miktar 30°C + %50 N konsantrasyonlu Zarrouk besi ortamı örneklerinde,
4. En yüksek miktarda yağ eldesi 25°C + %50 N konsantrasyonundaki *Spirulina* besi ortamında, en düşük miktarda yağ eldesi 25°C + %100N konsantrasyonundaki *Spirulina* besi ortamında,
5. Toplam fenolik madde içeriği en yüksek *Spirulina* besi ortamında %25 N konsantrasyonunda ve 30°C'de elde edilirken, en düşük fenolik madde miktarı 30°C'de Zarrouk besi ortamında %100 N konsantrasyonundaki örneklerde,

6. Toplam karotenoid içeriği %75 N konsantrasyonlu Spirulina besi ortamında 30°C'de en yüksek miktarda bulunurken, en düşük karotenoid içeriği %75 N konsantrasyonunda Zarrouk besi ortamında 25°C'de,
7. Antioksidan kapasite ise en yüksek 30°C + %100 N konsantrasyonunda Zarrouk besi ortamında, en düşük ise Zarrouk besi ortamında 30°C + %25 N konsantrasyonunda,
8. PUFA değerleri en yüksek oranda Zarrouk besi ortamında 30°C + %75 N konsantrasyonunda elde edilirken, en düşük PUFA üretimi Spirulina besi ortamında 25°C + %50 N konsantrasyonunda,
9. GLNA sentezinin en yüksek oranda gerçekleştiği örnekler Zarrouk besi ortamında 25°C + %100 konsantrasyonda ve en düşük olarak Spirulina besi ortamında 25°C + %50 N konsantrasyonunda tespit edilmiştir.

Spirulina uzun yıllardır diyet takviyesi olarak insan beslenmesinde ve akuakültürde yüksek protein ve diyet lif içeriği nedeniyle kullanılmaktadır. Bununla birlikte son yıllarda içerdiği GLNA gibi esansiyel yağ asitleri nedeniyle de araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Spirulina'dan elde edilen metabolitlerde gerçekleştirilen analizlerde toksikolojik açıdan güvenilir olduğu aynı zamanda ekstrakte edilen protein ve yağın hiçbir alerjen etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Olejinöz mikroorganizmaların optimum gelişme sıcaklıklarının altında, N sınırlaması ve besi ortamında yüksek miktarda bulunan C kaynağı varlığında hücre içinde PUFA içeriği yüksek olan lipid birikimine yöneldiği bilinmektedir. Ancak yürütülen çalışmada bu mikroorganizmaların aksine N sınırlamasından bağımsız olarak biyokütlerdeki PUFA değerlerinin sıcaklık artışıyla yükseldiği gözlemlenmemiştir. Düşük sıcaklıklarda her iki besi ortamında algal gelişme yüksek sıcaklığa göre daha uzun sürmüştür (t_{25°C} : 25 gün, (t_{30°C} : 12 gün) ve oluşturulan metabolitler gelişim için kullanılmıştır.

25°C'deki gelişme sırasında fotosentez aktivitesi protein sentezinden ziyade karbonhidrat sentezine yönelmektedir. Yüksek sıcaklıklarda (>35°C) ise tam tersi gözlenmektedir. Karbonhidrat içeriği algal gelişim için kullanıldığından protein

sentezi hızlanmakta, aynı zamanda solunum hızı artarak biyokütle miktarında azalma gözlenmektedir. Yapılan çalışmada benzer şekilde yalnızca C kaynağının fazla (*Spirulina besi ortamı*) ve azot sınırlamasının yüksek olduğu (%25 N) koşullarda sıcaklık artışıyla biyokütle miktarı %50 oranında azalma gösterirken, protein ve yağ miktarı artış göstermiştir.

Besi ortamı kompozisyonunun yanı sıra ışık şiddeti, gelişme ortamındaki O₂,CO₂ ve tuz miktarının da β-karoten ve klorofil gibi pigmentler ile fenolik madde içeriğini etkilediği bilimektedir. Önceki çalışmalarda, fosfor sınırlaması altında geliştirilen alglerde fotosentezde rol oynayan tilakoid membranların işlevlerini uzun süre korudukları ancak N sınırlaması altında tilakoidlerin kısa sürede yok olması ile fotosentezin de sınırlandığı vurgulanmıştır. Yürütülen tez çalışmasında fenolik madde ve karotenoid miktarlarının literatürde belirtilen değerlere nazaran daha düşük çıkmasının sebebinin bu sınırlamadan kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte tilakoid membranın yok olmasıyla sentezlenen PUFA gibi metabolitlerin zarar görmesi ya da parçalanması söz konusu olmaktadır. 25°C'de 25 gün süren gelişmedeki örneklerin PUFA içeriklerinin düşük olmasının nedeninin de bu olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, *Spirulina platensis* pek çok biyoaktif bileşeni sentezleyebilmektedir. Gelişme koşulları ayarlanarak PUFA, protein ve esansiyel amino asitler, fenolik bileşik ve pigmentler gibi insan beslenmesinde ve gıda endüstrisinde kullanılabilir spesifik metabolitlerin yüksek miktarda elde edilmesi mümkündür. Bu çalışma baz alınarak ileride yapılacak araştırmalarda hedeflenen metabolitlerce, özellikle GLNA, zenginleştirilmiş gıda üretiminin gerçekleştirilmesi ve yeni üretilen gıdanın güvenilirliğinin belirlenmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Aguilera-Morales, M., Casas-Veldez, S., Carrilo-Domingez, S., Gonzalez-Acosta, B., Perez-Gil, F. 2005.** Chemical Composition and Microbiological Assays of Marine Microalgae *Enteromorpha* spp. as a Potential Food Source. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1): 79-88.
- Akdogan, E. K., Kerman, K., Abazari, M., & Safari, A. 2008.** Origin of High Piezoelectric Activity in Ferroelectric O₃ Ceramics. *Applied Physics Letters*, 92(11): 2908.
- Ali, H.E.A., Shanap, S.M.M., Abo-State, M.A.M., Shalaby, E.A.A., Demerdash, U.M.N.E., Abdullah, M.A. 2014.** Screening of Microalgae for Antioxidant Activities, Carotenoids and Phenolic Contents. *Applied Mechanics and Materials*, 625: 156-159.
- Allen, M.M. 1984.** Cyanobacterial Cell Inclusions. *Annual Reviews of Microbiology*, 38: 1-25.
- Ambrozova, J. V., Misurcova, L., Vicha, R., Machu, L., Samek, D., Baron, M. Jurikova, T. 2014.** Influence of Extractive Solvents on Lipid and Fatty Acids Content of Edible Freshwater Algal and Seaweed Products, the Green Microalga *Chlorella kessleri* and the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Molecules*, 19(2):2344-2360.
- Anderson, D.R. 2007.** Model Based Inference in the Life Sciences: A Primer on Evidence. *Springer Science & Business Media*, pp:181.
- Andersson, A.J., Wynn, J.P. 2001.** Microbial Polyhydroxyalkanoates, Polysaccharides and Lipids. In: C. Ratledge and B. Kristiansen (eds.) *Basic Biotechnology*, Cambridge University Press, Cambridge. pp.325-348.
- Anonim 2006.** www.mustafaaltinisik.org.uk/67-1-2-03.ppt
- Anonim 2013.** Lipid Chemistry, Biology, Technology & Analysis. Online at: www.lipidlibrary.co.uk
- AOAC International. 2005.** Official Methods of Analysis of AOAC International. *AOAC International*.
- Ası, T. 1996.** Lipidler: Tablolarla Biyokimya-1, Ed.: Ası,T., Dokuz Eylül Üniversitesi Ders Notları, pp: 129-199.
- Azgın, C., Işık, O., Uslu, L., Ak, B. 2014.** A Comparison the Biomass of Productivity, Protein and Lipid Content of *Spirulina platensis* Cultured in the Pond and Photobioreactor. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 8(24): 183-187.
- Badzhanov, A.S. Abdusamatova, N. Yusupova, F.M. Faizullaeva, N. Mezhlumyan, L.G. Malikova, M.K. 2004.** Chemical Composition of *Spirulina platensis* Cultivated in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds*, 40: 276-279.
- Baldia, S.F., Nishijima, T., Hata, Y. 1991.** Effects of Physico-Chemical Factors and Nutrients on the Growth of *Spirulina platensis* Isolated from Lake Kojima, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(3): 481-490.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2006.** *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, New York.
- Becker, E.W. 1994.** *Microalgae: Biotechnology and Microbiology (Vol.10)*: Cambridge University Press.
- Belay, A. 2002.** The Potential Application of *Spirulina (Arthrospira)* as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *The Journal of the American Nutraceutical Association*, 5(2): 27-48.
- Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., Shimamatsu, H. 1993.** Current Knowledge on Potential Health Benefits of *Spirulina*. *Journal of applied Phycology*, 5(2): 235-241.

- Bigogno, C., Khozin-Goldberga, I., Boussiba, S., Vonshaka, A., Cohena, Z. 2002.** Lipid and Fatty Acid Composition of the Green Oleaginous Alga *Parietochloris incisa*, The Richest Plant Source of Arachidonic Acid. *Phytochemistry*, 60: 497-503.
- Bilgüven, M. 2002.** Yemler bilgisi, Yem Teknolojisi ve Balık Besleme. Akademisyen Yayınevi, Mersin, 446 pp.
- Blumberg, J., Block, G. 1994.** The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Preventing Study in Finland. *Nutritional Reviews*, 52:242-245.
- Borowitzka, M.A. 1999.** Commercial Production of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes and Fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1): 313-321.
- Boussiba, S. 1990.** Nitrogen Fixing Cyanobacteria: Proceedings of the Fifth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non Legumes, Ed.: Polsinelli, M., Materassi, R., Vincenzini, M. Kluwer Academic Publishers, Florence, Italy, pp: 487-491.
- Budiyono, I.N., Syaichurrozi, I., Sumardiono, S. 2013.** Biogas Production from Bioethanol Waste: The Effect of pH and Urea Addition to Biogas Production Rate. *Waste Technology*, 1(1): 1-5.
- Bulut Mutlu, Y., Işık, O., Uslu, L., Koç, K., Durmaz, Y. 2011.** The Effects of Nitrogen and Phosphorus Deficiencies and Nitrite Addition on the Lipid Content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *African Journal of Biotechnology*, 10(3): 453-456.
- Burit, M., Bucar, F. 2000.** Antioxidant Activity of *Nigella sativa* Essential Oil. *Phytotherapy Research*, 14: 323-328.
- Burtin, P. 2003.** Nutritional Value of Seaweeds. *EJEAFChe*, 2(4): 498-503.
- Casaburi, I., Puoci, F., Chimento, A., Sirianni, R., Ruggiero, C., Avena, P., Pezzi, V. 2013.** Potential of Olive Oil Phenols as Chemopreventive and Therapeutic Agents Against Cancer: A Review of in vitro Studies. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(1): 71-83.
- Cepoi, L., Rudi, L., Miscu, V., Cojocari, A., Chiriac, T., Sadovnic, D. 2009.** Antioxidative Activity of Ethanol Extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* Measured by Various Methods. *Fascicula Biologie*, 16(2):43-48.
- Certik, M., Shimizu, S. 1999.** Biosynthesis and Regulation of Microbial Polyunsaturated Fatty Acid Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1):1-14.
- Chamorro, G. 1980.** Toxicological Research on the Alga *Spirulina*. Report: United Nations International Development Organization (UNIDO) UF: MEX/78/048.
- Chernova N.J., Kiselova, V.S., Chernov, N.M. 2001.** Nutritional Value of *Spirulina platensis*. *Russian Agricultural Science*, 6: 60-63.
- Chojnacka, K., Noworyta, A. 2004.** Evaluation of *Spirulina* sp. Growth in Photoautotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(5): 461-465.
- Colla, L.M., Bertolin, T.E., Costa, J.A.V. 2004.** Fatty Acids Profile of *Spirulina platensis* Grown Under Different Temperatures and Nitrogen Concentrations. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 59(1/2): 55-59.
- Colla, L.M., Oliveira Reinehr, C., Reichert, C., Costa, J.A.V. 2007.** Production of Biomass and Nutraceutical Compounds by *Spirulina platensis* Under Different Temperature and Nitrogen Regimes. *Bioresource Technology*, 98(7): 1489-1493.
- Colla, L.M., Reinehr, C.O., Reichert, C.J., Costa, A.V. 2007.** Production of Biomass and Nutraceutical Compounds by *Spirulina Platensis* Under Different Temperature and Nitrogen Regimes. *Bioresource Technology*, 98: 1489–1493.

- Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte, P.F. 2004.** Improving *Spirulina platensis* Biomass Yield a Fed-Batch Process. *Bioresource Technology*, 92: 237–241.
- Costa, J.A.V., Cozza, K.L., Oliveira, L., Magagnin, G. 2001.** Different Nitrogen Sources and Growth Responses of *Spirulina platensis* in Microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(5): 439-442
- Crawford, M. 2000.** Placental Delivery of Arachidonic and Docosahexanoic Acids: Implication of Preterm Infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71:275-284.
- Culling, C.F.A. 2013.** Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques: Including Museum Techniques. Butterworth-Heinemann, 693 pp.
- Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., Bozkurt, H. 2009.** Modeling of Biomass Production by *Spirulina platensis* as a Function of Phosphate Concentrations and pH Regimes. *Bioresource Technology*, 100:3625-3629.
- Damiani Cecilia, M., Popovich, C.A., Constenla, D., Leonardi, P.I. 2010.** Lipid Analysis in *Haematococcus pluvialis* to Assess Its Potential use a Biodiesel Feedstock. *Bioresource Technology*, 101(11): 3801-3807.
- Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.D.O., Carvalho, J.C.M.D., Sato, S. 2002.** An Investigation of Effect of Replacing Nitrate by Urea in the Growth and Production of Chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 23(4): 261-269.
- Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.O., Sato, S., Carvalho, J.C.M.D. 2011.** Growth and Content of *Spirulina platensis* Biomass Chlorophyll Cultivated at Different Values of Light Intensity and Temperature Using Different Nitrogen Sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1): 362-373.
- Darcy-Vrillon, B. 1993.** Nutritional Aspects of the Developing Use of Marine Microalgae for the Human Food Industry. *International Journal of Food Science*, 44: 23-55.
- Davis, A.R. 1977.** Principles of Oceanography. University of South Florida Aquafarms, Inc., Florida, 126p.
- Dawczynski, C., Schubert, R., Jahreis, G. 2007.** Amino Acids, Fatty Acids and Dietary Fibre in Edible Seaweed Products. *Food Chemistry*, 103(3): 891-899.
- Dawes, C. J. 1998.** *Marine botany*. John Wiley & Sons.
- de Swaaf, M.E., De Rijk, T.C., Eggink, G., Sijtsma, L. 1999.** Optimisation of Docosahexaenoic Acid Production in Batch Cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *Progress in Industrial Microbiology*, 35: 185-192.
- Dean, A.P., Sigee, D.C., Estrada, B., Pittman, J.K. 2010.** Using FTIR Spectroscopy for Rapid Determination of Lipid Accumulation in Response to Nitrogen Limitation in Freshwater Microalgae. *Bioresource Technology*, 101(12): 4499-4507.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. 2000.** Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains—Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3): 173-289.
- Denli, Y., Tekin, A. 2000.** Oil Production and Microorganisms. *Gıda Dergisi*, 25(4): 265-270.
- Devanathan, J., Ramanathan, N. 2013.** Research Article Utilization of Seawater as A Medium for Mass Production of *Spirulina platensis*—A Novel Approach. *International Journal of Recent Scientific Research*, 4:5, pp. 597-602.
- Diplock, A.T. 1998.** Defence Against Reactive Oxygen Species. *Free Radical Research*, 29(6): 463-467.
- Drevon, C.A., Baksaas, I., Krokan, H.E. 1993.** Omega-3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects. Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland.

- Durmaz, Y., Gökpınar, Ş. 2006.** α -tocopherol and Fatty acids of *Spirulina platensis* Biomass in Glass Panel Bioreactor. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9: 2901-2904.
- Ehrlich, S. 2011.** Omega-3 Fatty Acids. University of Maryland Medical Center: Complementary and Alternative Medicine Guide.
- El-Badry, A.M., Graf, R., Clavien, P.A. 2007.** Omega 3–Omega 6: What is right for the liver?. *Journal of Hepatology*, 47(5): 718-725.
- El-Baky, H.H.A. 2003.** Over Production of Phycocyanin Pigment in Blue Green Alga *Spirulina* sp. and It's Inhibitory Effect on Growth of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. *Journal of Medical Sciences*, 3(4): 314-324.
- Elliot, W., Stoching C.R., Barbour, M.G., Rost, T.L. 1992.** Botany, An Introduction to Plant Biology, 6nd ed., John Wiley and Sons, Singapore.
- Estrada, E., & Uriarte, E. 2001.** Recent Advances on the Role of Topological Indices in Drug Discovery Research. *Current Medicinal Chemistry*, 8(13):1573-1588.
- Fagiri, Y.M.A., Salleh, A., El-Nagerabi, S.A.F. 2013.** Impact of Physico-Chemical Parameters on the Physiological Growth of *Arthrospira (Spirulina platensis)* Exogenous Strain UTEXLB2340. *African Journal of Biotechnology*, 12(35): 5458-5465.
- Falquet, J. 2012.** The Nutritional Aspects of *Spirulina*. Antenna Technologies, http://antenna.ch/en/documents/AspectNut_UK.pdf.
- Fan, Y.Y., Chapkin, R.S. 1998.** Importance of Dietary γ -Linolenic Acid in Human Health and Nutrition. *The Journal of Nutrition*, 128(9): 1411-1414.
- Fiedor, J., Burda, K. 2014.** Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients*, 6(2):466-488.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. 1957.** A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Fox, D. 1996.** *Spirulina*: Production and Potential, La Calade. RN, 7, 13090.
- Gee, G. W., Or, D. 2002.** 2.4 Particle-size Analysis. *Methods of Soil Analysis. Part, 4*(598): 255-293.
- Giada, M.D.L.R. 2013.** Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases—A Role for Antioxidants, InTech, Rijeka, Croatia, 87-112.
- Giuliano, A. R., Tortolero-Luna, G., Ferrer, E., Burchell, A. N., de Sanjose, S., Kjaer, S. K., Bosch, F. X. 2008.** Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men, Cancers Other Than Cervical and Benign Conditions. *Vaccine*, 26, K17-K28.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., De Cooman, L. 2012.** Antioxidant Potential of Microalgae in Relation to Their Phenolic and Carotenoid Content. *Journal of Applied Phycology*, 24(6): 1477-1486.
- Goodwin, T. W., & Britton, G. 1988.** Plant Pigments p. 93. London: Academic Press.
- Gökpınar, Ş. 1991.** Akuakültürde Önemli Beş Deniz Flagellatının İnorganik N Alınımını Üzerine Sıcaklık Değişimlerinin Etkisi. Dokuz Eylül Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, *Doktora Tezi*, İzmir, 88p.
- Gökpınar, Ş. 1994.** *Nannochloris* sp. Butcher(Chlorophyceae)'de İnorganik Azot Kaynaklarını Kullanımı Üzerine Sıcaklık Değişimlerinin Etkisi. *E.Ü. Fen Fakültesi Dergisi*, 16(1): 1169-1178.
- Graham, J.E., Wilcox, L.W., Graham, L.E. 2009.** Algae. 2nd Ed. Benjamin Cummings.

- Grashorn, M.A. 1995.** Instrumental Methods for Measuring Meat Quality Features. XII European Symposium on Quality Poultry Meat, Zaragoza, Spain.
- 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.
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T. 2009.** Lipid Productivity as a Key Characteristic for Choosing Algal Species for Biodiesel Production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5): 493-507.
- Grofová, Z. 2010.** Fatty acids. *Medicina Pro Praxi*, 7: 388–390.
- Gunstone, F.D. 1997.** Fatty Acids and Lipid Structure: Lipid Technologies and Applications, Ed.: CRC Press, New York, pp: 1-18.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A.F. 2007.** The Lipid Handbook, 3rd ed. Taylor and Francis, Boca Raton, 793 pp.
- Güler, F., Gülmez, B. 2008.** *Spirulina* sp. ve Kullanım Alanları Üzerine bir Araştırma. Erzincan Üniversitesi Aqua Club Su Ürünleri Araştırma ve Geliştirme Bilim Kulübü, Kemaliye 5.Geleneksel Su Ürünleri Bilimsel ve Kültürel Platformu, 31 Mayıs-1 Haziran 2008, Erzincan, Kemaliye.
- Habib, M.A.B., Parvin, M., Huntington, T.C., Hasan, M.R. 2008.** A Review on Culture, Production and Use of *Spirulina* as Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations, p: 33.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. 1990.** Role of Free Radical and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview. *Methods in Enzymology*, 186: 1-85.
- Handelman, G. J., Walter, M. F., Adhikarla, R., Gross, J., Dallal, G. E., Levin, N. W., & Blumberg, J. B. 2001.** Elevated Plasma F2-Isoprostanes in Patients on Long-Term Hemodialysis. *Kidney International*, 59(5):1960-1966.
- Heijnen, C.G.M, Haenena, G.R.M.M, Vekemansb J.A.J.M, Aalt Basta A. 2001.** Peroxynitrite Scavenging of Flavonoids: Structure Activity Relationship. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Volume 10, Issue 4, Pages 199–206
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. 2002.** Flavonoids Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*.13: 572-584.
- Henrikson, R. 2009.** Earth Food Spirulina. Ronore Enterprises, Inc., Hawaii, <http://www.spirulinasource.com/PDF.cfm/EarthFoodSpirulina.pdf>
- Horrobin, D. 1992.** Nutritional and Medical Importance of Gamma-Linolenic Acid. *Progress in Lipid Research*, 31(2): 163-194.
- Hoseini, S. M., Khosravi-Darani, K., Mozafari, M. R. 2013.** Nutritional and Medical Applications of *Spirulina* Microalgae. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(8):1231-1237.
- Illman, A.M., Scragg, A.H., Shales, S.W. 2000.** Increase in *Chlorella* Strains Calorific Values when Grown in Low Nitrogen Medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 631-635.
- Jitendra, M., Priyanka, S., Madhulika, J., Mohsina, S., Komal, M., Neha, K. 2012.** Impacts of Different Physical and Chemical Environment for Mass Production of *Spirulina platensis*-An Immunity Promoter. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(6): 49-56.
- Kachroo, D., Singh Jolly, S.M., Ramamurthy, V. 2006.** Modulation of Unsaturated Fatty Acids Content in Algae *Spirulina platensis* and *Chlorella minutissima* in Response to Herbicide SAN 9785. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4):0-0.

- Kahlon, T.S., Smith, G.E. 2004.** Health Benefits of Grains, Fruits, and Vegetables and the USDA Food Guide Pyramid. *Cereal Foods World*, 49(5): 288-291.
- Kargın Yılmaz, H., Duru, M.D. 2011.** Syanobakteri *Spirulina platensis*'in Besin Kimyası ve Mikrobiyolojisi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(1): 31-43.
- Kaur, C., Kapoor, H.C. 2001.** Antioxidants in Fruits and Vegetables—the Millennium's Health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7): 703-725.
- Kaushik, P., Hauhan, A. 2008.** In vitro Antibacterial Activity of Laboratory Grown Culture of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3): 348-352.
- Kaya, A., Çiledag, A., Gulbay, B.E., Poyraz, B.M., Çelik, G., Sen, E., Savas, I. 2004.** The Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Sera of Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Respiratory Medicine*, 98(7): 632-636.
- Kepekçi, R. A., Saygideger, S.D. 2012.** Enhancement of Phenolic Compound Production in *Spirulina platensis* by Two-Step Batch Mode Cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 24(4):897-905.
- Keskin, A. 2005.** Tall Yağı Esaslı Biyodizel ve Yakıt Katkı Maddesi Üretimi ve Bunların Dizel Motor Performansı Üzerindeki Etkileri. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Khan, M.J., Castle, P.E., Lorincz, A.T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D.R., Rush, B.B., Glass, A.G., Schiffman, M. 2005.** The Elevated 10-year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women with Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. *Journal of the National Cancer Institute*, 97: 1072–1079.
- Khozin-Goldberg, I., Bigogno, C., Shrestha, P., Cohen, Z. 2002.** Nitrogen Starvation Induces the Accumulation of Arachidonic Acid in the Freshwater Green Alga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae). *Journal of Phycology*, 38: 991-994.
- Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. 2006.** Effect of Phosphate Starvation on Lipid and Fatty Acid Composition of *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67: 696-701.
- Knothe, G. 2005.** Dependence of Biodiesel Fuel Properties on the Structure of Fatty Acid Alkyl Esters. *Fuel Processing Technology*, 86(10):1059-1070.
- Koru, E., Cirik, S. 2003.** *Spirulina platensis* Mikroalginin Büyümesine ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerine Sıcaklığın Etkisi. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 20(3-4): 419-422.
- Kraovicova, J., Simko, P. 2000.** Determination of Synthetic Phenolic Antioxidants in Food by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 888: 271-281.
- Lahaye, M. 1991.** Marine Algae as Sources of Fibres: Determination of Soluble and Insoluble Dietary Fibre Contents in Some 'Sea Vegetables'. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(4):587-594.
- Li, A.H., Cheng, K., Wong, C., King-Wai, F., Feng, C., Yue, J. 2007.** Evaluation of Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Different Fractions of Selected Microalgae. *Food Chemistry*, 102: 771–776.
- Li, D., Qi, Y. 1997.** Spirulina Industry in China: Present Status and Future Prospects. *Journal of Applied Phycology*, 9: 25-28.
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. 2001.** Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterisation by UV–VIS: Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Inc., New York, F4.3.1-F4.3.8.
- Lubián, L.M., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, I.E., Sobrino, C.,**

- González-del Valle, M., Parés, G. 2000.** *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5): 249-255.
- Machu, L., Misurcova, L., Vavra Ambrozova, J., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., Jurikova, T. 2015.** Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products. *Molecules*, 20(1): 1118-1133.
- Madkour, F.F., Kamil, A.E.W., Nasr, H.S. 2012.** Production and Nutritive Value of *Spirulina platensis* in Reduced Cost Media. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 38(1): 51-57.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004.** Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5): 727-747.
- Materassi, R., Tredici, M., Balloni, W. 1984.** Spirulina Culture in Sea-Water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(6): 384-386.
- Mendes, A., Guerra, P., Madeira, V., Ruano, F., Da Silva, T.L., Reis, A. 2007.** Study of Docosahexaenoic Acid Production by the Heterotrophic Microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 Using Carob Pulp as a Promising Carbon Source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 1209-1215.
- Metting, B. 1986.** Biologically Active Compounds from Microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*, 8: 386-394.
- Miranda, M. S., Cintra, R. G., Barros, S. B. M., Mancini-Filho, J. 1998.** Antioxidant Activity of the Microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(8):1075-1079.
- Mišurcová, L. 2011.** Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology; John Wiley & Sons: Chichester, UK, pp. 173–192.
- Mišurcová, L., Škrovánková, S., Samek, D., Ambrožová, J., Machu, L. 2012.** 3 Health Benefits of Algal Polysaccharides in Human Nutrition. *Advances in Food and Nutrition Research*, 66, 75.
- Mortensen, A. 2006.** Carotenoids and Other Pigments as Natural Colorants. *Pure and Applied Chemistry*, 78(8):1477-1491.
- Murray, A.E., Grzymalski, J.J. 2006.** Diversity and Genomics of Antarctic Marine MicroOrganisms. *Philosophical Transactions B*, 362(1488): 2259-2271.
- Mühling, M., Belay, A., Whitton, B.A. 2005.** Screening *Arthrospira* (*Spirulina*) Strains for Heterotrophy. *Journal of Applied Phycology*, 17(2): 129-135.
- Naczek, M., Shahidi, F. 2004.** Extraction and Analysis of Phenolics in Food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1): 95-111.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2013.** CourseSmart International E-Book for Principles of Biochemistry. Palgrave Macmillan, 1159 pp.
- Okan, O. T., Varlıbaş, H., Mehmet, Ö.Z., Deniz, İ. 2013.** Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 13(1): 48-59.
- O'Keefe, S.J. 2008.** Nutrition and Colonic Health: The Critical Role of the Microbiota. *Current Opinion on Gastroenterology*, 24(1): 51-58.
- Olguín, E.J., Galicia, S., Angulo-Guerrero, O., Hernández E. 2001.** The Effect of Low Light Flux and Nitrogen Deficiency on the Chemical Composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) Grown on Pig Waste. *Bioresource Technology*, 77:19–24.
- Oliveira, M., Monteiro, M., Robbs, P., Leite, S. 1999.** Growth and Chemical

Composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* Biomass at Different Temperatures. *Aquaculture International*, 7(4): 261-275.

Ortega-Calvo, J. J., Mazuelos, C., Hermosin, B., Sáiz-Jiménez, C. 1993. Chemical Composition of *Spirulina* and Eukaryotic Algae Food Products Marketed in Spain. *Journal of Applied Phycology*, 5(4): 425-435.

Ötles, S., Atlı, Y. 2011. Karotenoidlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 3:(1).

Ötles, S., Pire, R. 2001. Fatty Acid Composition of *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae Species. *Journal of AOAC International*, 84(6): 1708-1714.

Pal, P. K., Samii, A., Calne, D. B. 1998. Manganese Neurotoxicity: A Review of Clinical Features, Imaging and Pathology. *Neurotoxicology*, 20(2-3):227-238.

Pandey, J.P., Pathak, N., Tiwari, A. 2010. Standardization of pH and Light Intensity for the Biomass Production of *Spirulina platensis*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 1(2): 93-102.

Pandey, J.P., Tiwari, A. 2010. Optimization of Biomass Production of *Spirulina maxima*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 1(2):, 20-32.

Pang, L., Close, M., Noonan, M. 1998: Rhodamine WT and *Bacillus subtilis* transport Through an Alluvial Gravel Aquifer. *Ground Water*, 36:112-122.

Patterson, G.M.L., Larsen, L.K., Moore, R.E. 1994. Bioactive Natural Products from Blue-Green Algae. *Journal of Phycology*, 29(39): 14.

Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. 2003. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different in vitro Assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9): 2812-2819.

Perera, C.O., Yen, G.M. 2007. Functional Properties of Carotenoids in Human Health. *International Journal of Food Properties*, 10(2): 201-230.

Petkov, G. D., Furnadzieva, S. T.1988. Fatty-Acid Composition of Acylolipids from *spirulina platensis*. *Dokladi Na Bolgarskata Akademiya Na Naukite*, 41(1):103-104.

Philippis, R.D., Ena, A., Guastini, M., Sili, G., Vincenzini, M. 1992. Factors Affecting PHB Accumulation in Cyanobacteria and Purple Non-Sulfur Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 103: 187-194.

Pinotti, M.H.P., Segato, R. 1991. Economic Importance of Cyanobacteria. *Semina Londrina*, 12(4): 179-211.

Piorreck, M., Baasch, K.H., Pohl, P. 1984. Biomass Production, Total Protein, Chlorophylls, Lipids and Fatty Acids of Freshwater Green and Blue-Green Algae under Different Nitrogen Regimes. *Phytochemistry*, 23(2): 207-216.

Polat, S., Ozogul, Y. 2013. Seasonal Proximate and Fatty Acid Variations of Some Seaweeds from the Northeastern Mediterranean Coast. *Oceanologia*, 55: 375–391.

Qureshi, A. A., Bradlow, B. A., Brace, L., Manganello, J., Peterson, D. M., Pearce, B. C., Elson, C. E. 1995. Response of Hypercholesterolemic Subjects to Administration of tTocotrienols. *Lipids*, 30(12):1171.

Qureshi, M. A., Ali, R. A. 1996. *Spirulina platensis* Exposure Enhances Macrophage Phagocytic Function in Cats. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 18(3):457-463.

Qureshi, M. A., Garlich, J. D., Kidd, M. T. 1996. Dietary *Spirulina platensis* Enhances Humoral and Cell-Mediated Immune Functions in Chickens. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 18(3):465-476.

Ramadan, M.F., Asker, M.H.S., Ibrahim, Z.K. 2008. Functional Bioactive

Compounds and Biological Activities of *Spirulina platensis* Lipids. *Czech Journal of Food Science*, 26: 211–222.

Ratledge, C. 1978. Degradation of Aliphatic Hydrocarbons. *Developments in Biodegradation of Hydrocarbons*, 1: 1-46.

Ratledge, C. 2004. Fatty Acid Biosynthesis in Microorganisms Being Used for Single Cell Oil Production. *Biochimie* 86: 807-815.

Ratledge, C. 2005. Single Cell Oils for the 21st Century. *Single Cell Oils*, 1-20.

Ratledge, C. 2006. Microbial Production of γ -Linolenic Acid: Handbook of Functional Lipids, Ed: Akoh, C.C. CRC Press, Boca Raton. pp:19-46

Ratledge, C. 2008. Microbial Lipids. *Biotechnology Set, Second Edition*, 133-197.

Ratledge, C., Cohen, Z. 2008. Microbial and Algal Oils: Do They Have a Future for Biodiesel or as Commodity Oils? *Lipid Technology*, 20(1): 55-60.

Ratledge, C., Wynn, J.P. 2002. The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 51:1-51.

Reis, R.S., Xu, L., Lee, H., Chae, M., Thaden, J.J., Bharill, P., Tazearslan, C., Siegel, E., Alla, R., Zimniak, Ayyadevara, S. 2011. Modulation of Lipid Biosynthesis Contributes to Stress Resistance and Longevity of *C. elegans* mutants. *AGING*, 3(2): 125-147.

Rhee, G., Lederman, T.C. 1983. Effects of Nitrogen Sources on P-Limited Growth of *Anabaena Flos-Aquae* 1. *Journal of Phycology*, 19(2): 179-185.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdiou, D., Doneche, B., Lonvaud, A. 2000. Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications, Vol. 1. Wiley, Sussex, England.

Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton.

Richmond, A. 1988. *Spirulina: Micro-algal biotechnology*, Ed.: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., Cambridge University Press, pp: 85-121.

Richmond, A. 1992. Open Systems for the Mass Production of Photoautotrophic Microalgae Outdoors: Physiological Principles. *Journal of Applied Phycology*, 4(3), 281-286.

Richmond, A. 2004. Handbook of Microalgal Culture; Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science, Oxford.

Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. 2009. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1): 100-112.

Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M. 2010. Fed-batch Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Potassium Nitrate and Ammonium Chloride as Simultaneous Nitrogen Sources. *Bioresource Technology*, 101(12): 4491-4498.

Rodriguez, R., Guerrero, M.G., Lara, C. 1994. Mechanism of Sodium/Nitrate Symport in *Anacystis nidulans* R2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1187: 250–254.

Ronda, S.R., Kethineni, C., Parupudi, L.C.P., Thunuguntla, V.B.S.C., Vemula, S., Settaluri, V.S., Kandala, C.V. 2012. A Growth Inhibitory Model with SO₂ Influenced Effective Growth Rate for Estimation of Algal Biomass Concentration Under Flue Gas Atmosphere. *Bioresource Technology*, 152: 283-291.

Rop, O., Balík, J., Řezníček, V., Juríková, T., Škardová, P., Salaš, P., Sochor, J., Mlček, J., Kramářová, D. 2011. Chemical Characteristics of Fruits of Some Selected Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Cultivars. *Czech Journal of Food Science*, 29, 65–73.

- Rosa, A. Deidda, D., Serra, A., Deiana, M., Dessi, M.A., Pompei, R. 2005.** Omega-3 Fatty Acid Composition and Biological Activity of Three Microalgae Species. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 3(2): 120-124.
- Roughan, P. G. 1989.** *Spirulina*: A Source of Dietary Gamma-Linolenic Acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 47(1): 85-93.
- Rousch, J.M., Bingham, S.E., Sommerfeld, M.R. 2003.** Changes in Fatty Acid Profiles of Thermo-Intolerant Marine Diatoms During Temperature Stres. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 295: 145-156.
- Salamatullah, A. 2014.** Characterization of Extraction Methods to Recover Phenolic-Rich Antioxidants from Blue Green Algae (*Spirulina*) Using Response Surface Approaches. *Yüksek Lisans Tezi, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, 2014.*
- Salazar, M., Martinez, E., Madrigal, E., Ruiz, L., Chamorro, G. 1998.** Subchronic Toxicity Study in Mice Fed *Spirulina maxima*. *Journal of Ethnopharmacology*, 62(3), 235-241.
- Sallal, A.K., Nimer, N.A., Radwan, S.S. 1990.** Lipid and Fatty Acid Composition of Freshwater Cyanobacteria. *Journal of Genetic Microbiology*, 136: 2043–2048.
- Sánchez-Luna, L.D., Converti, A., Tonini, G.C., Sato, S., de Carvalho, J.C. 2004.** Continuous and Pulse Feedings of Urea as a Nitrogen Source in Fed-Batch Cultivation of *Spirulina platensis*. *Aquacultural Engineering*, 31(3): 237-245.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P. 2004.** Fatty Acids, Total Lipid, Protein and Ash Contents of Processed Edible Seaweeds. *Food Chemistry*, 85:439–444.
- Sandeep, K.P., Shukla, S.P., Vennila, A., Purushothaman, C.S., Manjulekshmi, N. 2015.** Cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis* in Low Cost Seawater Based Medium for Extraction of Value Added Pigments. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 44(3):
- Sarıkaya, A.O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tuncel M., Kolayli, S. 2008.** Antioxidant Activity and Phenolic Acid Content and Chestnut Honey and Propolis, *Journal of Food Biochemistry*, 33: 470-481
- Sassano, C.E.N., Gioielli, L.A., Almeida, K.A., Sato, S., Perego, P., Converti, A., Carvalho, J.C.M. 2007.** Cultivation of *Spirulina platensis* by Continuous Process Using Ammonium Chloride as Nitrogen Source. *Biomass and Bioenergy*, DOI: 10.1016/j.biombioe.2007.04.001
- Satoh, A., Kato, M., Yamato, K., Ishibashi, M., Sekiguchi, H., Kurano, N., Miyachi, S., 2010.** Characterization of the Lipid Accumulation in a New Microalgal Species, *Pseudochoricystis ellipsoidea* (Trebouxiophyceae). *Journal of the Japan Institute of Energy*, 89: 909-913.
- Satyanarayana, U., Chakrapani, U. 2013.** Essentials of Biochemistry. Books and Allied Private Limited, Kolkata.
- Schubert, L.E. 1988.** The use of *Spirulina* (Cyanophyceae) and *Chlorella* (Chlorophyceae) as Food Sources for Animals and Humans: Progress in Phycological Research. *Ed.: Round, F.E., Chapman, V.J. pp: 237-254.*
- Sharathchandra, K., Rajashekhar, M. 2011.** Total Lipid and Fatty Acid Composition in Some Freshwater Cyanobacteria. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2: 83-97.
- Shifrin, N.S., Chisholm, S.W. 1981.** Phytoplankton Lipids: Interspecific Differences and Effects of NO₃, Silicate and Light-Dark Cycles. *Journal of Phycology*, 17: 374-384.
- Shlaby, E., Shanab, S. 2013.** Antioxidant Compounds, Assays of Determination and Mode of Action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10):528-539.

- Silveira, S. T., Burkert, J. F. M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V., Kalil, S.J. 2007.** Optimization of Phycocyanin Extraction from *Spirulina platensis* Using Factorial Design. *Bioresource Technology*, 98(8): 1629-1634.
- Simopoulos, A.P. 1999.** Essential Fatty Acids in Health and Chronic Disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3): 560-569.
- Singleton, V., Rossi, J. A. 1965.** Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.
- Siron, R., Giusti, G., Berland, B. 1989.** Changes in Fatty Acid Composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolacta* During Growth and Under Phosphorus Deficiency. *Marine Ecology Progress Series*, 55: 95–100.
- Southgate, D.A.T. 1990.** Dietary Fiber and Health: Dietary Fiber; Chemical and Biological Aspects, Ed.: Southgate, D.A.T., Waldron, K., Johnson, I.T., Fenwick, G.R., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp: 10-19.
- Suddaby, D. 1992.** Essential Fatty Acids—A Review of Their Biochemistry, Function, Interaction and Clinical Applications. Croda Universal, Hull, 230 pp.
- Sukenik, A., Carmeli, Y., Berner, T. 1989.** Regulation of Fatty Acid Composition by Irradiance Level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology*, 25: 686-692.
- Tanaka, Y., Teramoto, H., Inui, M., Yukawa, H. 2008.** Regulation of Expression of General Components of the Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase System (PTS) by the Global Regulator SugR in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2):309-318.
- Tee, E. S., Lee, C. Y. 1992.** Carotenoids and Retinoids in Human Nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31(1-2):103-163.
- Tibbetts, S.M., Milley, J.E., Lall, S.P. 2014.** Chemical Composition and Nutritional Properties of Freshwater and Marine Microalgal Biomass Cultured in Photobioreactors. *Journal of Phycology*, 27(3): 1109-1119.
- Tokuşoğlu, Ö., Ünal, M.K. 2003.** Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae : *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Isochrysis galbana*. *Journal Food Science*, 68(4)1144- 1148.
- Tomaselli, L. 2004.** The Microalgal Cell. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, 3.
- Torzillo, G., Sacchi, A., Materassi, R. 1991.** Temperature as an Important Factor Affecting Productivity and Night Biomass Loss in *Spirulina platensis* Grown Outdoors in Tubular Photobioreactors. *Bioresource Technology*, 38(2): 95-100.
- Torzillo, G., Vonshak, A. 2003.** Biotechnology of Algal Mass Cultivation. *Recent Advances in Marine Biotechnology*, 9: 45-77.
- Tsao, R., Deng, Z. 2004.** Separation Procedures for Naturally Occurring Antioxidant Phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812(1): 85-99.
- Tvrzicka, E., Kremmyda, L.S., Stankova, B., Zak, A. 2011.** Fatty Acids as Biocompounds: Their Role in Human Metabolism, Health and Disease—A Review. Part 1: Classification, Dietary Sources and Biological Functions. *Biomedical Papers*, 155(2): 117-130.
- Uauy, R. and A. D. Dangour. 2006.** Nutrition in Brain Development and Aging: Role of Essential Fatty Acids. *Nutritional Reviews*, 64(5 Pt 2):24–33.
- Uslu, L., Işık, O., Koç, K., Göksan, T. 2011.** The Effects of Nitrogen Deficiencies on the Lipid Contents of *Spirulina platensis*. *African Journal of Biotechnology*, 10(3): 386-

- Uylaşer, V. 2000.** Karotenoidler ve Bazı Özellikleri. *Gıda (Dünya Yayınları)*,6:(12), 79-84.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M. 1995.** Structure and Characteristics of the Cyanophyta. In: *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 24-32.
- Vance, J.E., Vance, D.E. 2008.** *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier. 639 pp.
- Vazhappilly, R., Chen, F. 1998.** Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Production Potential of Microalgae and Their Heterotrophic Growth. *JAOCS* 75(3): 393-397.
- Vermerris, W., Nicholson, R. 2006.** Families of Phenolic Compounds and Means of Classification. In: *Phenolic Compound Biochemistry.*, Springer Netherlands, pp: 1-34.
- Vonshak, A. 1997.** *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, Cell-biology and Biotechnology*. Taylor & Francis, London.
- Wada, H., Murata, N. 1990.** Temperature-Induced Changes in the Fatty Acid Composition of the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiology*, 92: 1062–1069.
- Walter, A., de Carvalho, J.C., Soccol, V.T., de Faria, A.B.B., Ghiggi, V., Soccol, C.R. 2011.** Study of Phycocyanin Production from *Spirulina platensis* Under Different Light Spectra. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4): 675-682.
- Watkins, B.A. 1991.** Importance of Essential Fatty Acids and Their Derivatives in Poultry. *The Journal of Nutrition*, 121(9):1475-85.
- Weete, J.D. 1980.** *Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms*. Plenum Press. London.
- Wildman, R.E.C. 2001.** Nutraceuticals; A Brief Review of Historical and Teleological Aspects: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, CRC Press, Boca Raton, FL. pp: 2-12.
- Wynn, J.P., Ratledge, C. 2005.** Oils from Microorganisms. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 3:5.
- Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Tan, T. 2010.** A New Strategy for Lipid Production by Mix Cultivation of *Spirulina platensis* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2): 498-503.
- Zarrouk, C. 1966.** Contribution a L'etude D'une Cianophycee: Influence de Divers Facteurs Physiques Et Chimiques Sur la Croissance Et la Photosynthese de *Spirulina Maxima* (Setch. Et Garndner) Geitler: Faculte des Sciences, Universite de Paris.
- Zhila, N.O., Kalacheva, G.S. Volova, T.G. 2005.** Effect of Nitrogen Limitation the Growth and Lipid Composition of the Green Algae *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52(3): 357-365.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Oya Irmak ŞAHİN CEBECİ
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 17.01.1985
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Bursa Gazi Anadolu Lisesi, 1995–2002
Lisans : Ege Üniversitesi, 2002–2007
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi, 2007–2010
Doktora : Uludağ Üniversitesi, 2011-2015

Çalıştığı Kurum : Yalova Üniversitesi, 2011-

İletişim : oyairmak@gmail.com, isahin@yalova.edu.tr

Yayınlar :

Aka Kayguluoglu, A., Akpınar Bayizit, A., Sahin Cebeci, O.I. 2014. Evaluation of physicochemical and sensory properties of green olive pastes. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 13(4): 654-658.

Sahin, O.I., Akpınar Bayizit, A., Canan, B. 2013. Determination of Fatty Acids from *Spirulina platensis* under Different Extraction Methods. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(1): 91-92.

Ozcan, T., Akpınar Bayizit, A., Sahin, O.I., Yılmaz Ersan, L. 2011. The Formation of Polycyclic Hydrocarbons during Smoking Process of Cheese. *Mljekarstvo*, 61(3): 193-198.

Yılmaz Ersan, L., Akpınar Bayizit, A., Ozcan, T., Sahin, O.I., Aydinol, P. 2011. Assesment of Some Microbiological and Chemical Properties of Pismaniye Sweet. *African Journal of Microbiology Research*, 5(9): 1119-1122.

Akpınar Bayizit, A., Ozcan, T. Sahin, O.I., Yılmaz Ersan, L. 2010. The Utilisation of Microbial poly-hydroxyalkanoates (PHA) in Food Industry. *Research Journal of Biotechnology*, 5 (3): 76-79.

Ozcan, T., Yılmaz Ersan, L, Akpınar Bayizit, A., Şahin, O.I., Aydınol, P. 2010. Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 in Rice Puding. *Mljekarstvo*, 60 (2): 135-144.

Şahin, O.I., Aka, A., Akpınar-Bayizit, A., Baltaş-Minas, E. 2010. Piyasada Satılan Yeşil Zeytin Ezmelerinin Kimyasal ve Duyusal Özellikleri. *U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24 (1): 11-24.

Aka, A., Şahin, O.I., Akpınar-Bayizit, A. 2009. Nanokompozit Filmlerin Gıda Sanayi Uygulamaları. *TMMOB Gıda Mühendisliği Dergisi*, 13 (29): 54-61.

