

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HALOFİL *Dunaliella* TÜRLERİNİN GLİSEROL ÜRETİM KAPASİTESİNİN  
BELİRLENMESİ

Aşkın KAÇKA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA  
2003

Her hakkı saklıdır.

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ danışmanlığında, Aşkın KAÇKA tarafından hazırlanan bu çalışma 01/08/2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Olcay OBALI

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Prof. Dr. Yeşim SAĞ

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Metin OLGUN**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### HALOFİL *Dunaliella* TÜRLERİNİN GLİSEROL ÜRETİM KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ

Aşkın KAÇKA

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Gönül DÖNMEZ

Bu çalışmada Tuz Gölü (Konya-Türkiye)'nden izole edilmiş dört adet *Dunaliella* suşu kullanılmıştır. Bu suşların gelişmesine ve gliserol üretimine farklı pH (6, 7, 8 ve 9), NaCl konsantrasyonu (%10, %15, %20 ve %25) ve farklı başlangıç inokülüm miktarlarının (1, 2, 5 ve 10 milyon hücre) etkisi standart Johnson sıvı besiyeri kullanılarak araştırılmıştır. Farklı pH ve NaCl konsantrasyonlarının hem hücre sayısını hem de üretilen gliserol miktarlarını değiştirdiği saptanmıştır. pH'ın en önemli etkisinin hücreleri sayısal olarak arttırmak olduğu bulunmuştur. En yüksek hücre sayısına *Dunaliella* sp. T-4 suşunun pH 9'da ve %15 NaCl konsantrasyonunda ( $15,3 \times 10^6$  hücre/ml) ulaştığı belirlenmiştir. Hücre sayısı ile orantılı olarak da gliserol üretiminde, klorofil miktarında, kuru ağırlık miktarında ve yağ ağırlık miktarında da artış olmuştur. NaCl konsantrasyonu etkisi denemesinde ise hücre başına en fazla gliserolü *Dunaliella* sp. T-1 suşu pH 6'da ve %25 NaCl konsantrasyonunda ( $55,08 \mu\text{g}/10^6$  adet hücre) üretmiştir. Besi ortamında ise en yüksek gliserol düzeyine *Dunaliella* sp. T-4 suşu pH 9'da ve %15 NaCl konsantrasyonunda ( $375,48 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) ulaşmıştır. *Dunaliella* suşlarının optimum çoğalması için pH'ın 6 yada 9 olması gerektiği ve en yüksek gliserol veriminin de %15 ile %20 NaCl konsantrasyonunda elde edildiği saptanmıştır. Başlangıç inokülüm miktarı denemesinde 2 milyon hücrenin en uygun olduğu belirlenmiştir.

**2003, 48 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Gliserol üretimi, Tuz Gölü, *Dunaliella*

## ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF GLYCEROL PRODUCTION POTENTIAL OF HALOPHILIC

*Dunaliella* sp.

Aşkın KAÇKA

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Four different *Dunaliella* sp. who were isolated from Salt Lake (Konya-Turkey) were studied. The effect of growth and glycerol production of four *Dunaliella* sp. were studied in standart Johnson growth medium under different pH values (6, 7, 8 and 9) in different NaCl concentrations (10%, 15%, 20% and 25%) and different inoculum quantities (1, 2, 5 and 10 milion cell). It has been realized that different pH values and NaCl concentrations had significant effects on growth and glycerol production. The most important effect of pH values were to the growth of cell quantities in the medium. The maximum cell number was reached by *Dunaliella* sp. T-4 in pH 9 ( $15,3 \times 10^6$  cell/ml). The chlorophyll weight, wet weight, dry weight and glycerol production was proportional to reached cell number. In the NaCl concentration effect studies was found that maximum glycerol production per cell unit( $10^6$  cell) was obtained by *Dunaliella* sp. T-1 in pH 6 and 25 % NaCl ( $55,08 \mu\text{g}/10^6$  cell). The maximum glycerol production per mililiter growth medium was obtained by *Dunaliella* sp. T-4 in pH 9 and 15% NaCl ( $375,48 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). It was found that optimum growth of *Dunaliella* sp. was in pH 6 and pH 9 values and the maximum glycerol production was between 15 - 20 % NaCl concentration. The best results with initial inoculum quantities research was obtained with 2 milion cell.

**2003, 48 pages**

**Key Words:** Glycerol production, Salt Lake, *Dunaliella*.

## TEŞEKKÜR

Özellikle hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen ve benim için her zaman zamanını ayıran danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her zaman motivasyon kaynağım olan sevgili aileme teşekkür ederim. Hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen bölüm arkadaşlarıma ve Fen Bilimleri Enstitüsü öğrenci işleri çalışanlarına da teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Aşkın KAÇKA

Ankara, Ağustos 2003

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>3</b>
2.1 Gliserol Elde Etmede Kullanılan Mikroorganizmalar.....	3
2.2 Gliserol Metabolizması.....	4
2.2.1 Osmoregülasyon ve gliserol üretimi.....	5
2.2.2 Gliserol sentezi ve depolanması.....	6
2.2.3 Gliserol ve nişasta metabolizması.....	7
2.3 <i>Dunaliella</i> Türlerinin Gelişmesi İçin Gerekli Olan Hammaddeler.....	8
2.3.1 Karbon.....	8
2.3.2 Azot.....	9
2.3.3 Fosfor.....	10
2.3.4 Magnezyum ve Kalsiyum.....	10
2.3.5 Sodyum.....	10
2.3.6 Klor ve Sülfür.....	11
2.3.7 Demir.....	11
2.3.8 İz elementler.....	11
2.3.9 Vitaminler.....	12
2.4 <i>Dunaliella</i> Türlerinin Gliserol Üretimine Çevresel Faktörlerin Etkisi.....	12
2.4.1 Işık.....	12
2.4.2 pH.....	12
2.4.3 Sıcaklık.....	13
2.4.4 Ozmotik basıncı sağlayan madde.....	14
2.4.5 Besi ortamı kompozisyonu.....	14

2.5 Gliserolün Endüstride Kullanım Alanları.....	14
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>17</b>
3.1 İzolasyon.....	17
3.2 Teşhis.....	18
3.3 Analiz Yöntemleri.....	18
3.3.1 Gliserol analizi.....	18
3.3.2 Optik yoğunluğun belirlenmesi.....	20
3.3.3 Hücre sayısının belirlenmesi.....	20
3.3.4 Kuru ağırlığın belirlenmesi.....	21
3.3.5 Yaş ağırlığın belirlenmesi.....	22
3.3.6 Klorofil (a+b) miktarının belirlenmesi.....	23
3.4 Gliserol Üretimini Etkileyen Faktörler.....	23
3.4.1 pH'ın etkisi.....	23
3.4.2 Tuz konsantrasyonunun etkisi.....	24
3.4.3 Başlangıç inokülüm miktarının etkisi.....	24
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>25</b>
4.1 İzolasyon ve Teşhis.....	25
4.2 <i>Dunaliella</i> Suşlarının Gelişimini ve Gliserol Üretimini Etkileyen Faktörler.....	25
4.2.1 <i>Dunaliella</i> suşlarının gelişmesine ve gliserol üretimine pH'ın etkisi.....	26
4.2.2 <i>Dunaliella</i> suşlarının gelişmesine ve gliserol üretimine NaCl konsantrasyonunun etkisi.....	32
4.2.3 Başlangıç inokülüm miktarının gelişime ve gliserol üretimine etkisi.....	42
<b>5. SONUÇ.....</b>	<b>45</b>
KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	48

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Gliserolün yapısal formülü.....	5
Şekil 3.1 Gliserol standart eğrisi.....	20
Şekil 3.2 Hücre sayısı standart eğrisi.....	19
Şekil 3.3 Kuru ağırlık standart eğrisi.....	21
Şekil 3.4 Yaş ağırlık standart eğrisi.....	22
Şekil 4.1 <i>Dunaliella</i> sp. T-1 suşunun farklı pH'lardaki gelişimi (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15).....	26
Şekil 4.2 <i>Dunaliella</i> sp. T-2 suşunun farklı pH'lardaki gelişimi (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15).....	26
Şekil 4.3 <i>Dunaliella</i> sp. T-3 suşunun farklı pH'lardaki gelişimi (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15).....	27
Şekil 4.4 <i>Dunaliella</i> sp. T-4 suşunun farklı pH'lardaki gelişimi (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15).....	27
Şekil 4.5 <i>Dunaliella</i> suşlarının farklı pH'lardaki hücre sayıları (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15).....	29
Şekil 4.6 <i>Dunaliella</i> suşlarının farklı pH'lardaki gliserol üretim miktarları (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15).....	32
Şekil 4.7 Farklı NaCl konsantrasyonlarının <i>Dunaliella</i> sp. T-1 suşunun gelişimine etkisi (pH 6, Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22 °C).....	33
Şekil 4.8 Farklı NaCl konsantrasyonlarının <i>Dunaliella</i> sp. T-2 suşunun gelişimine etkisi (pH 6, Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22 °C).....	33
Şekil 4.9 Farklı NaCl konsantrasyonlarının <i>Dunaliella</i> sp. T-3 suşunun gelişimine etkisi (pH 9, Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22 °C).....	34
Şekil 4.10 Farklı NaCl konsantrasyonlarının <i>Dunaliella</i> sp. T-4 suşunun gelişimine etkisi (pH 9, Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22 °C).....	34
Şekil 4.11 <i>Dunaliella</i> suşlarının farklı farklı NaCl konsantrasyonlarındaki hücre sayıları (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C).....	37



Şekil 4.12 <i>Dunaliella</i> suşlarının gliserol üretimine %10 NaCl konsantrasyonun etkisi (Lüx:1000, sürekli floresan ışık, T:20-22 °C).....	38
Şekil 4.13 <i>Dunaliella</i> suşlarının gliserol üretimine %15 NaCl konsantrasyonun etkisi (Lüx:1000, sürekli floresan ışık, T:20-22 °C).....	39
Şekil 4.14 <i>Dunaliella</i> suşlarının gliserol üretimine %20 NaCl konsantrasyonun etkisi (Lüx:1000, sürekli floresan ışık, T:20-22 °C).....	39
Şekil 4.15 <i>Dunaliella</i> suşlarının gliserol üretimine %25 NaCl konsantrasyonun etkisi (Lüx:1000, sürekli floresan ışık, T:20-22 °C).....	40
Şekil 4.16 Farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>Dunaliella</i> suşlarının hücre başına gliserol üretimleri (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, pH 6, T: 20-22°C).....	42
Şekil 4.17 Farklı başlangıç inokülüm miktarlarında <i>Dunaliella</i> suşlarının gliserol üretimleri (Lüx: 1000, sürekli flöresan ışık, pH 6, T:20-22 °C).....	43

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Gliserol üretiminde kullanılan başlıca mikroorganizmalar.....	4
Çizelge 3.1 Johnson besiyerinin bileşimi.....	17
Çizelge 4.1 <i>Dunaliella</i> suşlarının gelişme parametreleri ve gliserol üretim kapasitelerine farklı pH'ların etkisi (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T:20-22 °C).....	30
Çizelge 4.2 <i>Dunaliella</i> suşlarının gelişme parametreleri ve gliserol üretim kapasitelerine farklı NaCl konsantrasyonlarının etkisi (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T:20-22 °C).....	36
Çizelge 4.3 <i>Dunaliella</i> sp. T-1 suşunun gelişme parametrelerine ve gliserol üretimine başlangıç inokülüm miktarının etkisi (Lüx: 1000, sürekli flöresan ışık, T:20-22 °C).....	44

## 1. GİRİŞ

Geçmişte yaşanan birinci ve ikinci dünya savaşında ham maddelerin kullanımı ile ilgili birçok yöntem geliştirilmiştir. Örnek olarak, gliserol ve aseton/butanol fermentasyonunun silah üretimi için geliştirilmesi ve infeksiyonlara karşı olarak penisilin geliştirilmesini verebiliriz.

Daha sonraki yıllarda ise gliserol petrol türevlerinden elde edilmeye başlanmıştır. Fakat günümüzde bu durumun farklı bir boyut aldığı görülmektedir. Petrol rezervlerinin hızla tüketilmesi, fiyatların sabit olmaması, bu ham maddenin elde edilmesinde bizleri alternatif arayışlara yönlendirmiştir. Bunun en iyi tarafı da yenilenebilir yöntemlerin gelişmesi olmuştur. Birçok çalışmada ilgili kimyasal ham maddelerin içinde gliserolün önemli bir yer oluşturduğu ispatlanmıştır.

Gliserolün endüstride birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Dünyada üretilen gliserolün üçte biri alkid reçinelerin üretiminde kullanılmaktadır. Diğer üçte ikisinin büyük bir kısmı ilaç yapımında ve tütün endüstrisinde kullanılmaktadır. Bunlardan başka, kozmetikte, besinlerin korunmasında, patlayıcı üretiminde, biyolojik besi ortamlarının hazırlanmasında, deri sanayinde, tekstil endüstrisinde vs. endüstrilerde kullanılmaktadır.

Mikrobiyel yolla gliserolün ekonomik olarak üretilebilmesi için bazı temel şartların yerine getirilmesi gerekmektedir. Bunlar; uygun bir mikroorganizmanın seçimi, ucuz ve uygun ham maddelerin bulunması, yüksek düzeyde gliserol veriminin elde edilmesi, uygun biyoreaktör seçimi, ortamdan biyogliserolün etkili bir şekilde geri kazanımı olarak sayılabilir.

Mikroorganizmaların çoğu izledikleri farklı metabolik yollarla hücrelerinde gliserol üretmektedir. Gliserol üreten mikroorganizmalar arasında yer alan halofil ökaryot bir mikroalg olan *Dunaliella* türleri, yüksek miktarda tuz içeren ortamlarda geliştiklerinde ozmotik basıncı düzenlemek için hücre içlerinde gliserol biriktirmektedirler. Diğer gliserol üreten mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında fotosentez yaptığı için üretimleri oldukça ekonomik olan *Dunaliella* türlerinin yüksek kapasite ile hücrelerinde gliserol biriktirdiği belirlenmiştir.

Tez çalışmasında Tuz Gölü (Konya – Türkiye)’nden izole edilen olan *Dunaliella* türlerinin gliserol üretim kapasitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Denemelerde yüksek oranda gliserol üreten türler seçilerek, bu türlerin gliserol üretim kapasitelerini etkileyen faktörler belirlenmiştir.

Tez çalışmasının sonunda izole edilen gliserolün yanında yüksek miktarda  $\beta$ -karoten de üretebilen *Dunaliella* türlerinin Tuz Gölü’nde üretimi planlanmaktadır. Göl sularına adapta olmuş, gliserol üretim kapasitesi belirlenen *Dunaliella* türlerinin elde edilmesi bu çalışmanın başlangıcını oluşturmaktadır. *Dunaliella* türlerinin endüstriyel amaçlarla göl sularında üretiminin, ülkemiz ekonomisine çok önemli katkıları olan göl sularının kullanım potansiyelini de arttıracığı düşünülmektedir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Gliserol Elde Etmede Kullanılan Mikroorganizmalar

Mikrobiyel yolla gliserol üretilmesinde çok farklı mikroorganizma türleri kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalar bakteriler, funguslar ve tek hücreli alglerdir. Gliserolün bira ve şarap mayası fermentasyonunun bir yan ürünü olduğu ilk defa Pastör tarafından bildirilmiştir. Bundan başka diğer polihidroksi alkollerle birlikte gliserolün de birçok mikroorganizma tarafından yan ürün olarak üretildiği bulunmuştur.

Chlorophyceae sınıfına ait tek hücreli alglerden *Dunaliella* sp. ve *Chlamydomonas* sp. cinsine ait olan türlerin gliserol üretiminde kullanım potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir. Hücrelerinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda gliserol biriktiren *D. salina*, *D. viridis*, *D. parva*, *D. bardawil*, *D. tertiolecta* ve *D. parva* türleri, herhangi bir C (Karbon) kaynağına gerek duymadan diğer mikroorganizmalardan farklı olarak fotosentetik olarak gliserol üretmektedirler ( Grizeau ve Navaro 1986, Ahmed ve Zidan 1987, Jimenes ve Niell 1991, Miyasoka ve Ikeda 1997, Thakur ve Kumar 1997).

Yapılan araştırmalarda bakterilerin potansiyel gliserol üreticileri olabileceği belirtilmiştir. Fakat verimin düşük olması bu mikroorganizmaları ekonomik yapmamaktadır (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988).

Yapılan birçok araştırmada mayaların gliserol üretiminde kullanılabilecekleri gösterilmiştir. *Saccharomyces* sp., *Candida* sp. cinsine ait bazı türler ve *Pichia farinosa* türleriyle gliserol üretim çalışmaları yapılmıştır (Bisping ve Rehm 1986, Vijaikishore ve Karanth 1986, Blagica Petrovska et al. 1999).

Küflerle yapılan bazı araştırmalarda bu mikroorganizma grubunun da gliserol üretmede kullanılabileceği bildirilmiştir. Ravji et al.(1988)'in çalışmasında *Aspergillus niger*, *Penicilium italicum*, *Rhizopus nigricans* ve *Botrytis cinera*'nın gliserol üretmede kullanılabileceği gösterilmiştir. Bundan başka Zohri (2000)'nin yaptığı çalışmada *Aspergillus meleus*, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus sclerotiroum*'un da gliserol

ürettiği bildirilmiştir. Gliserol üreten mikroorganizmalar toplu halde çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Gliserol üretiminde kullanılan başlıca mikroorganizmalar

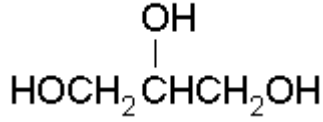
<b>Algler</b>	<i>Dunaliella salina</i> <i>Dunaliella viridis</i> <i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Dunaliella bardawil</i> <i>Chlamydomonas sp.</i>
<b>Funguslar</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccaromyces rouxii</i> <i>Candida boidinii</i> <i>Candida stellata</i> <i>Pichia farinosa</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicilium italicum</i> <i>Rhizopus nigricans</i>
<b>Bakteriler</b>	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>

## 2.2 Gliserol Metabolizması

Memelilerdeki gliserol, yağların (triaçil gliserollerin), gliserofosfolipidlerin, diaçilgliserollerin ve monoaçilgliserollerin bel kemiğini oluşturmaktadır. Gliserolün serbest hale geçmesi yağların ve fosfolipidlerin metabolik olarak parçalanması ile olmaktadır. Karaciğerdeki gliserol kinaz enzimi ile fosforile edilerek gliserol-3-fosfata dönüşmekte ve glikolitik yola girmektedir. Bu daha sonra dihidroksi aseton fosfata (DHAP) metabolize olmaktadır. DHAP ise glikolizis, glukoneogenesis ve fosfolipid sentez yollarının ana molekülünü oluşturmaktadır. Serbest gliserolün olduğu bir diğer yol ise fosfatidil gliserolden kardiyolipin sentezinin yapıldığı yoldur (Mathews et al. 2000).

Gliserol (şekil 2.1.)’ün üç boyutlu yapısı incelendiğinde 1. ve 3. karbon atomlarının aynı özellikte olmadığı belirlenmiştir. Enzimler bu iki C arasındaki farkı kolaylıkla ayırt ederek sadece birini tanırlar. Örneğin: gliserol kinaz enzimi gliserolün her zaman 3 numaralı C atomuna fosfat grubunu aktarmaktadır. Bu reaksiyonda hiçbir zaman 1

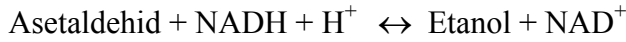
numaralı C atomuna fosfatın aktarımıyla oluşan gliserol-1-fosfat meydana gelmemektedir(Mathews et al. 2000).



Şekil 2.1. Gliserolün yapısal formülü

Gliserol üretiminde kullanılan algler gelişmeleri için inorganik karbon kaynaklarına ve ışığa ihtiyaç duymaktadırlar. Algler gliserolü fotosentezin bir yan ürünü olarak üretmektedirler (Becker 1994).

Gliserol üretiminde kullanılan mayalar ise genel olarak fermentasyon yapmaktadırlar. Anaerobik glikoliz sonucu pirüvat önce asetaldehide ve CO<sub>2</sub>'ye parçalanır. Bundan sonra da alkol dehidrojenaz enzimi ile asetaldehid etanole indirgenmektedir.



Sülfid ve bisülfidlerin besi ortamına eklenmesi asetaldehidin etanole dönüşümünü engellemekte ve metabolik yolu gliserol sentezi yönüne doğru çevirmektedir. Bu sayede gliserol verimi daha da artmaktadır (Blagica Petrovska et al. 1999).

### 2.2.1 Osmoregülasyon ve gliserol üretimi

*Dunaliella* türleri farklı tuzluluk aralıklarında yaşamlarını devam ettirebilmektedirler. Böylece bu türler tatlı sulardan denize, tuz doyumluğu gösteren tuz göllerinden buharlaşmanın yoğun olduğu gölcüklere kadar geniş alanlarda yaşayabilmektedirler. *D. salina* türünün %1 ila %35 NaCl konsantrasyonlarında geliştikleri tespit edilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise besiyeri NaCl ile doyumluğa (satürasyona) ulaşmaktadır ve bu koşullarda *D. salina*'nın diğer birçok ökaryot ve prokaryot mikroorganizmadan daha iyi bir gelişim gösterdiği görülmüştür.

*Dunaliella* türlerinin bu yüksek tuz konsantrasyonlarına tolerans yeteneği veya değişen tuz konsantrasyonlarına uyumunu, içinde biriktirdiği uygun bir çözünen madde ile, yani gliserol ile sağlanmaktadır. Burada gliserol, osmoregülasyonu sağlayan çözünmüş bir ajan olarak görev yapmaktadır. Gliserol çok fazla çözünen bir polihidrik alkol olup, diğer çözünen polihidroksi alkollerle karşılaştırıldığında, metabolik olayları en az inhibe eden alkol olarak karşımıza çıkmaktadır (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988).

### 2.2.2 Gliserol sentezi ve depolanması

Araştırılmış tüm *Dunaliella* türlerinde, hücreiçi gliserol konsantrasyonunun kültür ortamında çözünen maddelerin nitelik ve niceliklerine bağlı olduğu ispatlanmıştır (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'e göre Ben Amotz ve Avron 1973). *Dunaliella* türlerinin doğal olarak geliştiği birçok ortamda NaCl'nin temel bir çözünmüş madde olarak rol oynadığı bilinmektedir. NaCl yerine sükroz kullanılan besiyerlerinde de hücredeki gliserol konsantrasyonunun besiyerindeki çözünen madde konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'e göre Borowitzka et al. 1977).

Hücreiçi gliserol konsantrasyonunun dönüşümü (yapım ve yıkım olayları) eşit bir şekilde yapılmaktadır. Fakat hücreiçi gliserolün yıkım veya yapımındaki dengenin değişmesi besiyerindeki maddelerin konsantrasyonlarının değişmesine bağlıdır. Hücrelerden pasif sızıntıyla veya aktif salgılamayla dışarı çıkan gliserol *Dunaliella* türlerinin normal olan osmoregülatör cevaplarının bir sonucudur (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988).

Çözünmüş halde bulunan gliserole genelde hücre membranları çok geçirgendir. *Dunaliella* sp. hücreleri  $10^4$  : 1 gradiyentinden yüksek konsantrasyonlardaki ortama karşın bile gliserolü muhafaza edebilirler. Bu durum tuzluluk derecesi yüksek olan ortamlarda osmoregülasyonun sağlanması için gereklidir. Strese maruz kalmamış *Dunaliella* sp. popülasyonlarında genel olarak sınırlı bir oranda gliserol sızıntısı görülmektedir. Bazı sızıntılar yaşlı ve ölü hücrelerden de kaynaklanmaktadır.



Gliserolün, *Dunaliella salina*'da, lipit veziküllerinde ve domuz eritrositlerinde sızdırılma kapasitesi yani gliserol difüzyon permeabilitesi NMR(Nükleer Magnetik Rezonans) ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *D.salina* hücre zarlarının gliserole düşük permeabilite gösterdiği tespit edilmiştir. 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda membran permeabilitesi değişmekte, gliserol hızlı bir şekilde ortama sızdırılmakta ve hücreler ölmektedir (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988).

### 2.2.3 Gliserol ve nişasta metabolizması

Gliserolün yıkım ve yapım olayları hem ışıkta hem de karanlıkta olmaktadır. Bu denge, ortamda meydana gelebilecek bir değişikliğe bağlı olarak yaklaşık 90 dakika içinde oluşabilmektedir. Osmoregülasyon hayat kurtarıcı bir fonksiyon olarak bilinmektedir. Gliserolün yapım ve yıkımı için ATP gerekliliğine karşın protein sentezi gerekli değildir. Ortamdaki çözünen madde konsantrasyonunun azalması, ışıkta ve karanlıkta gliserol içeriğinin de azalmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla azalan gliserole karşın her iki durumda da nişasta içeriği artmaktadır. *D. tertiolecta* ve *D. viridis*'teki solunum, seyreltme stresine de bağlıdır. Gliserolün yıkımı nişasta oluşması ile olduğu görülmüştür. Bu olayda ATP kullanılmaz ve bu proste hücreler için gerekli olan indirgenmiş karbon komponentleri korunmaktadır. Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'e göre birçok araştırmacının bulgularını inceleyen Gimmler ve Müller (1981), *Dunaliella* sp.'daki metabolik reaksiyonların kloroplast ve sitoplazmada olduğunu göstermişlerdir. Diğer alglerle karşılaştırıldığında *Dunaliella* sp.'nin fotosentetik işlemlerde herhangi bir farklılığının olmadığı belirlenmiştir. *Dunaliella* sp.'nin diğerlerinden en önemli farkı enzim sistemlerinin gliserol üretiminde çok etkili olmasıdır. Gliserol ve nişasta arasındaki karbon dağılımını etkileyen en önemli faktörlerden birinin hücre içindeki fosfat olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bunların hangi sinyalleri alarak ekstrasellüler tuzluluğa veya su aktivitesine uyum sağladıkları bilinmemektedir. Bu sinyalin enzim prosesleri de bilinmemektedir.

## 2.3 *Dunaliella* Türlerinin Gelişmesi İçin Gerekli Olan Hammaddeler

*Dunaliella* türlerinin gelişimi için birçok inorganik maddenin gerekli olduğu bilinmektedir. Bu konuyla ilgili de birçok araştırma yapılmıştır (Johnson et al. 1968, Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'e göre, Van Aucken ve Mc Nulty 1973, Salagenau 1979, Spectrova et al. 1982). *Dunaliella* türlerinin çoğalması ve gelişmesi için gerekli olan bu maddeler aşağıda belirtilmiştir.

### 2.3.1 Karbon

Tüm *Dunaliella* türleri fototrof oldukları için inorganik bir karbon kaynağı olan CO<sub>2</sub>'ye ihtiyaç duyarlar. CO<sub>2</sub> alımı tatlı su türleri için pek bir problem oluşturmaz. Fakat halofilik türleri için önemli bir problem oluşturur. Çünkü bu tür sularda CO<sub>2</sub> konsantrasyonu çok düşüktür. İnorganik karbon miktarı ve farklı pH değerlerindeki fotosentez hızı (indirekt olarak) birçok araştırma ile ölçülmüştür. Yapılan araştırmalar sonucunda *D.tertiolecta* ve *D.salina* türlerinin (muhtemelen diğer *Dunaliella* türleri de) hem CO<sub>2</sub>'yi hem de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'ü inorganik karbon kaynağı olarak kullandığı tespit edilmiştir. İnorganik karbon verimliliği, halofilik olan *D.salina* için muhtemelen sınırlayıcı bir etken olmaktadır. Eğer büyüme ortamında çok fazla tuz varsa ve sıcaklık yüksek ise karbon çözünürlüğü azalmaktadır. Halbuki yaklaşık olarak %3 NaCl içeren deniz suyunda ise inorganik karbon çözünürlüğü < %50'dir. Yüksek tuzluluk ve pH'ta *D.salina* inorganik karbon kaynağı olarak CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>'u kullanır. Örnek olarak; %25'lik tuzlulukta, 25 °C'de, pH 9'da inorganik karbonun %99,9'u CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>'dan sağlanır ki bu da ortamdaki HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in oranını göstermektedir. Bundan başka *D.salina* düşük CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarına da adapte olmaktadır. Böyle bir durumda Karbonik Anhidraz enziminin aktivitesi artmaktadır. Düşük CO<sub>2</sub>'li ortamlarda yetişen hücrelerin yüzeyinde karbonik anhidraz düzeyi artmakta ve ayrıca intrasellüler karbonik anhidraz aktivitesi de artmaktadır. *Dunaliella* sp.'nin gelişme ortamına inorganik karbon kaynağı (CO<sub>2</sub> veya NaHCO<sub>3</sub> gibi) eklenmesi *Dunaliella* sp.'nin gelişmesini teşvik etmektedir. Yalnız ortamdaki karbonatların çökmemesi (presipitasyonu) gerekmektedir. CO<sub>2</sub>'nin teşvik edici etkisi, üfleyerek ortama hava verildiğinde görülür. Bu olay pH'ı düşürerek besiyerindeki CO<sub>2</sub> konsantrasyonunu artırır. İnorganik karbonun verilmesi bazı

*Dunaliella* türlerinin yüksek ışığa ve sıcaklığa toleranslarını artırmaktadır (Becker 1994, Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988).

### 2.3.2 Azot

*D.salina*, *D.viridis* ve *D.tertiolecta* için en iyi azot kaynağı  $\text{NaNO}_3$ 'tür (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'e göre Milko, 1962; Grant,1968). Nitrit ve nitratların hücre tarafından alınması için ışık (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'e göre Grant,1967) ve tampon sistem gereklidir. Diğer amonyum tuzları, örneğin; amonyum asetat, amonyum nitrat, amonyum sitrat ve amonyum klorid genel olarak daha düşük azot kaynakları olarak bilinmektedir. Bunların yüksek konsantrasyonlarda (>2,5 M) bulunması durumunda letal etki yapmaktadırlar. Nitrit ve nitratın hücreler tarafından alınması ortamın alkalinizasyonuna sebep olurken, besi ortamına amonyum eklenmesi ise asidifikasyona sebep olmaktadır. Tamponlanma yapılmamış sistemlerde ortam pH'ının kendi kendine değişmesi, alg büyümesini önemli oranda etkilemektedir (Becker 1994).

Organik azot kaynaklarından olan üre ve glutamin ise, inorganik azot kaynakları kadar etkili değildir. Laboratuarda yapılan denemeler sonucunda en iyi organik azot vericisinin üre olduğu belirlenmiştir (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'e göre Milko 1962, Pristavu ve Wegman 1978).

Açık hava *Dunaliella sp.* kültürlerinde ürenin N kaynağı olarak kullanılmasıyla yüksek biyomas elde edildiği bildirilmiştir. *D.tertiolecta*'nın gelişmesi için, N sınırlaması sabit tutulan uzun süreli kültürlerde, nitrat. amonyum ve ürenin aynı miktarda kullanıldığı ve her üçüyle de elde edilen verimin aynı olduğu belirlenmiştir (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'e göre Goldman ve Reavey 1979).

Son zamanlarda bazı araştırmacılar, nitrat asimilasyonunun yetersiz olduğu bazı mutant *D.tertiolecta* türlerini izole etmişlerdir. Bunların bazılarında nitrat redüktaz aktivitesi tespit edilmemiştir ve dolayısıyla bu suşlar nitratlı ortamlarda gelişmemektedirler. Diğer

bazı suşlar ise hem nitrit hem de nitrat redüktaz aktivitesi göstermediklerinden dolayı büyümeleri için mutlaka  $\text{NH}_4^+$ ya ihtiyaç duymaktadırlar (Becker 1994).

### 2.3.3 Fosfor

*D.salina* ve *D.viridis*'in gelişmesi için gerekli olan optimum fosfat konsantrasyonu yaklaşık olarak  $0,02 - 0,025 \text{ g l}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 'tür (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Gibor 1956; Milko 1962). Yüksek fosfat konsantrasyonu ise gelişmeyi inhibe etmektedir ( $> 5 \text{ g l}^{-1}$ ). Eğer *D.tertiolecta*'nın gelişme ortamına fosfat yerine gliserofosfat eklenirse gelişme belirgin bir şekilde azalmaktadır (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Mc Lachlan 1964).

### 2.3.4 Magnezyum ve Kalsiyum

Tüm diğer algler gibi *Dunaliella* türleri de büyümeleri için bu katyonlara gereksinim duymaktadırlar (Becker 1994). *Dunaliella* türleri  $\text{Ca}^{++}$  ve  $\text{Mg}^{++}$  katyonlarının değişiklik gösterdiği ortamlarda da bulunabilmektedirler. *Dunaliella viridis*'te ise  $\text{Ca}^{++} : \text{Mg}^{++}$  oranı 0,8 ila 20 arasında değişebilir ve bu değişiklikler büyümeye etki etmemektedirler. Bu gibi değişiklikler deniz suyunun buharlaşması ile de olmaktadır. Denizde yaşayan *Dunaliella tertiolecta* için optimum  $\text{Ca}^{++} : \text{Mg}^{++}$  oranı 4'tür ve yüksek  $\text{Mg}^{++}$  konsantrasyonlarında büyüme inhibe edilmektedir (Becker 1994, Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Bass – Becking 1930).

### 2.3.5 Sodyum

Yapılan birçok araştırmada *Dunaliella*'nın birçok türlerinin gelişmeleri için sodyuma ihtiyaç duydukları belirlenmiştir (Becker 1994). Yapılan bir araştırmada *D. primolecta* ve *D.tertiolecta* türlerinin gelişme ortamına NaCl yerine  $\text{MgSO}_4$  eklenmesinin bu türlerin gelişmesinde herhangi bir engel oluşturmadığı belirlenmiştir. (Borowitzka A. Michael ve Borowitzka J. Lesley 1988'a göre So Fujii et al. 1983). Eğer ortama  $\text{MgCl}_2$  veya LiCl gibi tuzlar eklendiğinde, her ne kadar fotosentez devam etse de büyüme gözlemlenmemiştir.

*D. tertiolecta* ve *D. viridis*'in gelişme ortamına NaCl yerine sükroz konulduğunda büyümenin engellenmediği görülmüştür.

### 2.3.6 Klor ve Sülfat

*Dunaliella sp.* için gerekli anyonlar hakkında elimizde çok az bilgi bulunmaktadır. Klor ve sülfat eksikliğinde *D. salina*'nın gelişmesi inhibe edilmektedir. Eğer  $SO_4^{2-}$  yerine  $Cl^-$  eklenirse  $\beta$ -karoten akümülyasyonu teşvik edilmiş olacaktır. Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Massyuk (1965)'un bulgularında *D. salina*'nın büyümesi için gerekli olan optimum  $Cl^- : SO_4^{2-}$  oranı 3,2'dir. Maksimum  $\beta$ -karoten birikimi için ise gerekli olan oran 8,6'dır. Dolayısıyla buradan da anlaşıldığına göre anyon ve katyonların besiyerindeki oranları ve kalitesi alglerin büyümesini etkilemektedir. Örneğin:  $MgSO_4$  *Dunaliella spp.*'lerin gelişmesini hızlandırırken,  $MgCl_2$  hızlandırmamaktadır.

### 2.3.7 Demir

*Dunaliella sp.*'nin büyümesi için demirin düşük konsantrasyonlarda bulunması gerekmektedir. Tuzla doymuş bazı ortamlarda demir sınırlayıcı etken olabilmektedir. Kellatlaşmış demir kaynakları; demir sitrat, demir klorit ve demir sülfitten daha etkilidir (Becker 1994). *D. salina* ve *D. viridis* için gerekli olan optimum demir konsantrasyonu  $1,25 - 3,75 \text{ mg l}^{-1}$ 'dir. Yüksek demir konsantrasyonları ise büyümeyi engellemektedir. Besiyerine kellat ajan olarak Na-EDTA eklenmesi demirin hücre tarafından alınmasını sağlamaktadır. (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Milko 1962)

### 2.3.8 İz elementler

Her ne kadar birçok değişik iz elementler, örneğin, Zn, Cu, Mo ve V gibileri *Dunaliella sp.*'nin büyüme ortamına eklense de bu elementlerin gerekliliği hakkında hiçbir bilgiye sahip değiliz. Yapılan bir araştırmada *D. tertiolecta*'nın büyümesi için gerekli olan optimum Mn konsantrasyonu 0,105 ppm olarak belirlenmiştir. Bunun altındaki değerler büyümeyi engellediği gibi yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstermektedir

(Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988). Becker (1994)'e göre Kobalt'ın B<sub>12</sub> vitaminine bağlanması birçok alg için gereklidir.

### 2.3.9 Vitaminler

*Dunaliella* türleri ve birçok alg türünün gelişmesi için vitamine gerek olmadığı bildirilmiştir (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Gibor 1956, Mc Lachlan 1959).

## 2.4 *Dunaliella* Türlerinin Gliserol Üretimine Çevresel Faktörlerin Etkisi

### 2.4.1 Işık

Işığın etkisi ancak *Dunaliella* sp. ve *Chlamydomonas* sp. gibi fotosentetik olarak gliserol üreten mikroorganizmalar için önem arz eder. Ben-Amotz ve Avron (1987) 'un yaptığı çalışmalarda *D. bardawil*'e ışığın etkisi ve besin sınırlamasından oluşan etkiler araştırılmıştır. Işıklandırma amacıyla farklı ışıklandırma gücüne sahip tungsten lambaları (5 ila 500 Wm<sup>-2</sup>) kullanılmıştır. Sonuçta ışık yoğunluğu arttıkça gliserol üretim yeteneğinin arttığı, düşük ışık yoğunluklarında azot eksikliğinin gliserol miktarını arttırdığı, yüksek ışık yoğunluğunda ise sınırlayıcı maddelerin eksikliğinin gliserol üretimini düşürdüğü gözlemlenmiştir.

### 2.4.2 pH

Alglerin bulunduğu ortamın pH'ı alglerin gelişmesine etki ettiği gibi metabolizmalarını da etkilemektedir. Bir deniz türü olan *D. tertiolecta*'nın optimum büyümesi için gerekli olan pH 6'dır. Halofilik türler olan *D. salina* ve *D. tertiolecta*'nın optimum büyümesi yaklaşık olarak pH 9'da gerçekleşmektedir.

Optimum pH'ta ise genel olarak fotosentez düşüktür. Örnek olarak, Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Wegmann ve Metzner (1971)'in yaptığı araştırmada *D. tertiolecta*'nın optimum olarak büyümesi için gerekli olan pH'ın 6,

fotosentez için ise gerekli olan pH'nın 5 olduğu görülmüştür. Birçok *Dunaliella* türü ise çok geniş pH aralıklarına toleranslı olabilmektedir. Thakur et al.(2000) tarafından yapılan denemelerde pH'nın *Dunaliella salina* türünün gelişimine etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonunda en iyi gelişmenin pH 8'de olduğu görülmüştür.

### 2.4.3 Sıcaklık

*Dunaliella* türleri geniş sıcaklık aralıklarına toleranslıdır. Halofilik bir tür olan *D.salina*'nın -35 °C'den (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Teodoresko 1906, Massyuk 1966) yaklaşık olarak 40 °C'ye kadar (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Wegman, Ben-Amotz ve Avron 1980) hayatta kalabildiği rapor edilmiştir. Utah'taki Büyük Tuz Gölündeki *D.viridis* ve *D.salina*'nın -3 °C'de değişmeden kalabildiği fakat -18 °C'de hareketini kaybettiği görülmüştür (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Post 1977). Yapılan bir araştırmada *D.salina*'nın fotosentezi -8 °C'de aktif bir şekilde azalmaktadır. Obligat psikrofilik olan *Dunaliella* spp. Antarktika'da da bulunmuştur (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Bunt, 1968). *D.parva* ve *D.tertiolecta*'nın sıcaklığa bağlı olan toleransının, bulunduğu ortamdaki NaCl konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmüştür (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Eppley ve Mocins 1963, Gimmler, Kühnl ve Carl 1978). Yüksek tuzluluğa adapte olmuş hücrelerin sıcaklığa direnç gösterdiği ve bunu da muhtemelen intrasellüler gliserol konsantrasyonunu artırarak proteinleri korumakla yaptığı sanılmaktadır. İntrasellüler gliserolün yüksek düzeyde biriktirilmesi yeteneği de sıcaklığa bağlıdır. 40 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda ise tuzluluğa toleranslı olan *Dunaliella* türleri ve deniz türü olan *D.tertiolecta* gliserolü dışarıya sızdırarak kaybetmeye başlarlar. Bu olay muhtemelen plazma membran komponentlerinin konformasyonel değişikliğine bağlı olabilir (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Wegmann et al. 1980). Türe bağlı olarak *D.salina*'nın optimum sıcaklık aralığı 20 °C ila 40 °C olduğu rapor edilmiştir . Yapılan bir araştırmada *D.viridis* için optimum yaşama sınırı 14°C - 30°C olduğu ve hayatta kalabilmesi için en üst limitin ise 35 °C olduğu tespit edilmiştir (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'a göre Gibor 1956, Borowitzka 1981).

#### 2.4.4 Ozmotik basıncı sağlayan madde

Tuzluluk veya ekstraselüler tuzluluğun yarattığı osmotik basınç genel olarak mikroorganizmaların hücre içerisinde gliserol veya diğer polihidroksi alkolleri depolamasına sebep olmaktadır. Gliserol üretiminde ekstraselüler basıncın belirleyici özelliği çok fazladır. Jimenez et al.(1991)'ın yaptıkları araştırmada NaCl konsantrasyonunun *D.salina*'daki gliserol üretimine etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. 1M, 2M ve 3M NaCl konsantrasyonu içeren besi ortamları kullanılmış ve sonuçta hücre başına en yüksek gliserol veriminin 3M'de elde edildiği bulunmuştur.

Diğer taraftan Miyasaka ve İkeda (1997)'nin *Chlamydomonas* sp. üzerinde yaptıkları araştırmalarda artan ekstraselüler osmotik basıncın intraselüler gliserol miktarını artırdığı bulunmuştur. Fakat burada dikkat edilmesi gereken noktalardan biri de dış basınca karşın hücre içi gliserol miktarı artarken popülasyondaki büyümenin azalmasıdır.

#### 2.4.5 Besi ortamı kompozisyonu

Besi ortamı kompozisyonu, kültürlerde en önemli fenomenlerden biridir. Thakur et al. (2000)'ın yaptıkları araştırmalarda NaHCO<sub>3</sub>'ün değişik konsantrasyonlarının *D. salina* üzerine etkisi incelenmiştir. Sonuçta en iyi büyüme, fotosentez ve solunumun 4 mM NaHCO<sub>3</sub>'te olduğu bulunmuştur.

### 2.4 Gliserolün Endüstride Kullanım Alanları

Gliserol genel olarak birçok endüstri dalında kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde, tıpta ve kozmetikte kullanılan gliserol insan ile doğrudan temasta olduğu için nontoksik olmalıdır. Gliserol, çözücü olarak kullanıldığı gibi, kaliteli ekmek yapımında nemlendirici ajan olarak da kullanılmaktadır. Viskozitesi sayesinde ürünün yapısını etkiler. Bonbone ve pasta kremalarında şekerlerin kristalize olmasını önlemek için gliserol kullanılmaktadır. Dondurmacılıkta ise yapıya etki ederek daha az şeker kullanılmasını sağlar.



Tıpta ise gliserol birçok tentür, boya ve iksirin bileşimine girmektedir. Nişastanın gliserollenmesi birçok peltede kullanıldığı gibi, merhem yapımında da kullanılmaktadır. Gliserol ayrıca öksürük şuruplarının hazırlanmasında ve anestetiklerde kullanılır. Kulak tedavisi ilaçlarında kullanıldığı gibi birçok bakteriyel besi ortamının hazırlanmasında da kullanılmaktadır. Kozmetikte kullanılan gliserolün en önemli özelliği ise cildi yumuşatmasıdır. Bu sebepten dolayı da gliserol birçok krem ve tıraş sabun ile köpüğünde kullanılmaktadır. Diş macunlarında macunların pürüzsüz olmasını ve istenen viskozitede kalması için gliserol kullanılır.

Tütüncülükte, sigaralar hazırlanıp paketlenmeden önce üzerlerine koruyucu solüsyon olarak gliserol püskürtülmektedir. Çiklet şeklindeki tütünlerde gliserol tat vermek için kullanılır. Dehidrasyonu önleyici madde olarak kullanıldığı gibi sigara kağıtlarının plastik hale gelmesini sağlayan bir ajan olarak da kullanılmaktadır.

Gliserol, besin saklanması ve yağlı ile şeffaf kağıtların üretilmesinde kullanılmaktadır. Plastik sanayinde ürünün esnek veya sert olması için de gliserol kullanılmaktadır. Gliserol temel ürün maddelerinin korunmasında önemli rol oynar, çünkü ürün tarafından absorbe edilir ve kristalize olmadığı gibi uçucu da değildir.

Sıvı yağların olmadığı yerlerde gliserol yağlayıcı madde olarak kullanılmaktadır. Oksijen kompresörü olarak kullanılır çünkü oksidasyona karşı mineral yağlardan daha dirençlidir. Gliserol gıda, kozmetik ve eczacılıkta diğer yağların yerini yavaş yavaş almaya başlamıştır. Tekstil endüstrisinde ise gliserol sıklıkla tekstil yağları ile birlikte iplik yapımında, trikotajda ve dokumacılıkta kullanılmaktadır.

Gliserolün en önemli kullanım alanlarından biri de üretan polimerler yapımında kullanılan polieterlerin yapı maddelerini oluşturmasıdır. Gliserol temelli polimerler sert üretan köpüklerin yapımında kullanılmaktadır.

Gliserol otomatik püskürtücülerde ve diğer bazı aletlerde antifriz olarak kullanılmaktadır. Cam buzlarında buz eritici olarak kullanıldığı gibi elbiselerin daha canlı gözükmesi için elektrolitik sıvılarda kullanılır. Yıldırım tutucularında, çimento yapımında gliserol kullanılır. Gliserol ayrıca, asit-korrozyon koruyucusu olarak,

lehimlemede, yüksek basınç altında yapılan baston ve çubuklarda, hava frenlerinde yağlayıcı olarak, cıva termometrelerinin yapımında, elektrik ekipmanında, sıvı yağ rafinerisi ekipmanında, tahniçilik sıvısında, eldiven yapımında, sabunlarda, deterjanlarda, balmumu emülsiyon ajanı olarak ve endüstride derileri koruyucu olarak kullanılmaktadır. Laboratuvar ve araştırma çalışmalarında kullanılan biyolojik ve kimyasal reagentlerin yapımında, temel boyalarda, çeşitli kimyasallarda ve insektisitlerde, asfalt yapımında, katranları seyreltmede, seramik yapımında, fotoğraf ürünlerinde, ateş engelleyici olarak, deri ve köselelerde, killerde ve tutkallarda kullanılır. Gliserol ayrıca yoğun olarak askeri sanayisinde kullanılmaktadır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. İzolasyon

Çalışmada Tuz Gölü'nden (Konya-Türkiye) alınan örnekler sıvı ve %1,5 Agar içeren %20 NaCl (Carlo Erba Reagent) ve pH 7,5 değerlerine sahip Johnson besi ortamına ekilmiştir. Johnson besiyerinin bileşimi çizelge 3.1'de verilmiştir. Gölden alınan su örneklerindeki *Dunaliella* türlerinin kullanılan besiyerine adapte olması ve sayılarının artması için örnekler, 250 ml'lik erlenlerdeki 100 ml Johnson besiyerinde geliştirilmiştir. İnkübasyon 20-22 °C'de sürekli olarak 1000 lüks floresan ışık altında 60 gün boyunca yapılmıştır. Gerek Johnson besiyerinde üretilen sıvı kültürler gerekse direk su örnekleri agarlı besiyerine ekilerek tek koloniler elde edilmiştir. Katı besiyerinde tekrarlanan çizgi ekimlerle saflaştırılan koloniler yatık agarlı tüplerde 3 ay süre ile +4°C'de korunmuştur.

Çizelge 3.1. Johnson besiyerinin bileşimi Johnson et al. (1968)

Maddeler	Miktar
NaCl	% 10-30
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1,5 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
KCl	0,2 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,2 g/l
KNO <sub>3</sub>	1,0 g/
NaHCO <sub>3</sub>	0,043 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,035 g/l
Fe Solüsyonu	10 ml
Eser Elementler Solüsyonu	10 ml
Distile su	980 ml

#### Fe Solüsyonu (Bir litre için)

Maddeler	mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA	189
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	244

#### Eser Elementler Solüsyonu(Bir litre için)

Maddeler	mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61
(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O	38
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	6
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	5,1
ZnCl <sub>2</sub>	4,1
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	4,1

## 3.2 Teşhis

Saflaştırılan tek koloniler %20 NaCl içeren Johnson sıvı besiyerine ekilmiştir. İnkübasyon sonucu yapılan mikroskobik incelemelerde kültürler morfolojik yapılarına göre identifiye edilmiştir (Jimenes ve Niell 1991, Thakur ve Kumar 1997).

## 3.3 Analiz Yöntemleri

### 3.3.1 Gliserol analizi

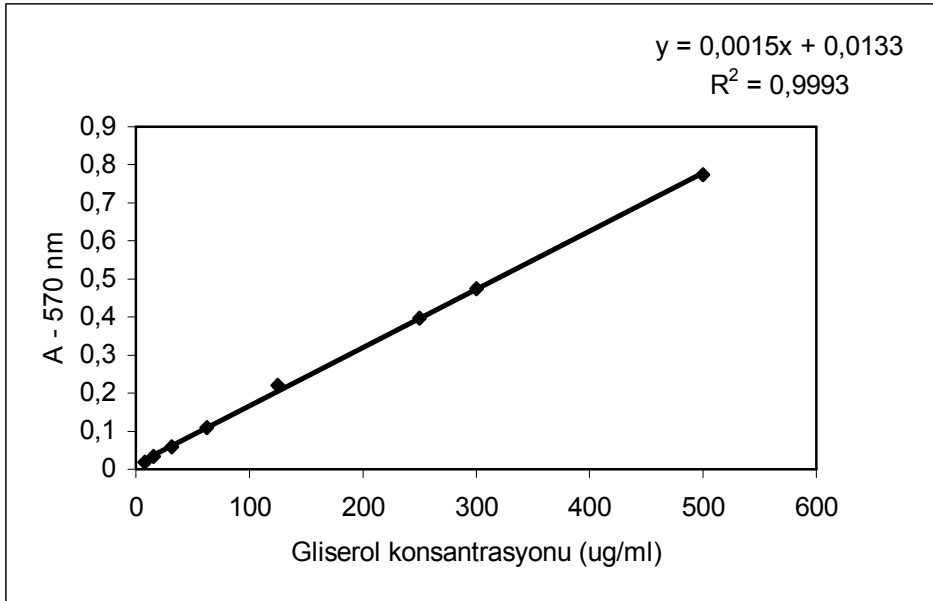
İnkübasyon süresi boyunca belirli zaman aralıklarında alınan örnekler (2 ml) konik santrifüj tüplerine konarak 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj(Hettich zentrifugen EBA 12 model) edilmiştir. Üst sıvı dikkatli bir şekilde boşaltıldıktan ve oluşan çökelek iki defa 0,005 M fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra çökelek 1 ml 0,015 M fosfat tamponu (2 mM MgCl<sub>2</sub> ve uygun NaCl konsantrasyonu içeren) ile süspanse edilip oda sıcaklığında yaklaşık olarak 1000 lüks floresan ışık altında 1 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra tüplerin tekrardan 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmesi sonucu elde edilen çökelek 1ml distile su ile süspanse edildikten sonra üzerine 100 µl %30'luk Trikloro asetik asit (Merck) eklenerek gliserolün hücrelerden ekstraksiyonu sağlanmıştır. Hücre artıklarının uzaklaştırılması amacıyla tüpler tekrar 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Gliserol analizinde üst sıvı kullanılmıştır.

Gliserol analizi Roy J. Sturgeon ve ark. (1979)'nın belirlediği yöntem temel alınarak aşağıda belirtilen bazı değişiklikler yapılmıştır.

Önceden hazırlanmış her standart ve ekstraksiyonu yapılmış her örnekten 200 µl alınarak 16x100 mm'lik cam tüplere pipetlenmiştir. Bunun üzerine 100 µl %1'lik NaIO<sub>4</sub> (Merck) eklenerek iyice karıştırılmıştır ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Bundan sonra aynı tüplere %5'lik Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Merck) eklenmiştir ve tüpler 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu karışımdan 100 µl alınarak yeni bir cam tüpe pipetlenmiştir ve bunun üzerine %10'luk taze hazırlanmış kromotropik asit(Merck) çözeltisinden 50 µl eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra tüplere 500 µl konsantre

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Carlo Erba Reagent) yavaşça eklenmiştir. Ağız sıkıca kapatılarak karıştırılan tüpler kaynayan su kabının içine dik vaziyette konularak 10 dakika kaynatılmıştır. Bu süreden sonra tüpler çıkartılarak soğumaya bırakılmıştır. Tüplerin ağız açılarak önce 500 µl sonra da 5 ml dH<sub>2</sub>O eklenip karıştırılmıştır. Çözeltinin optik yoğunluk değeri 570 nm dalga boyunda (Shimadzu UV – 1201V Spektrofotometre) okunarak ve her ölçüm zamanında yeni olarak hazırlanan standartlardan bir standart eğri oluşturularak örneklerdeki gliserol miktarı hesaplanmıştır.

Gliserol standartının hazırlanmasında Merck'in gliserolü kullanılmıştır. Öncelikle distile su ile 1000 µg/ml gliserol içeren stok standart hazırlanmıştır. Bundan sonra uygun bir standart eğri elde edebilmek için seri seyreltmeler yapılmıştır. Böylece 0 – 500 µg/ml arasında bir gliserol standart eğrisi hazırlanmıştır. Belirli zaman aralıklarında yapılan her gliserol ölçümü için standart eğri oluşturulmuştur (şekil 3.1.). Bunlardan bir tanesi örnek olarak aşağıda verilmiştir.



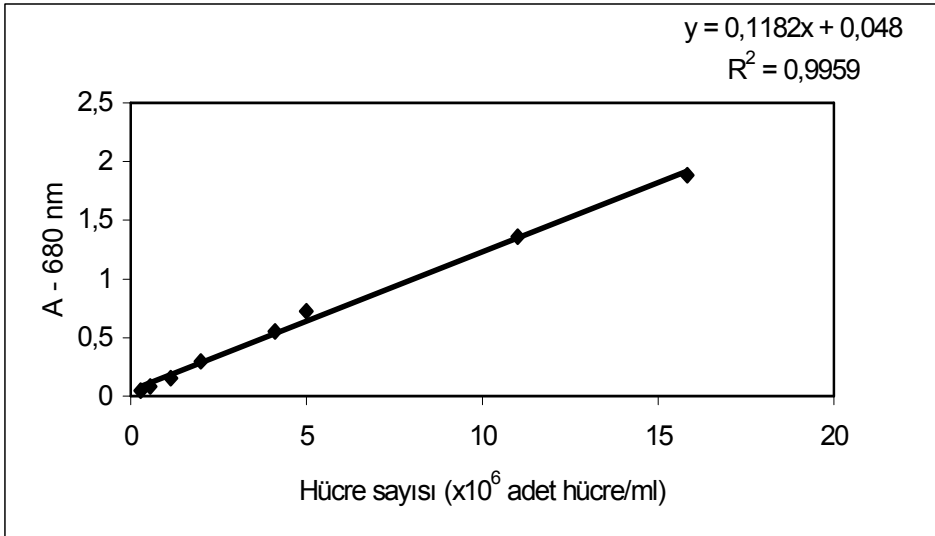
Şekil 3.1. Gliserol standart eğrisi

### 3.3.2 Optik yoğunluğun belirlenmesi

Kültürden alınan örneklerden yapılan inceleme sonucunda maksimum absorbansın 680 nm'lik dalga boyunda olduğu saptanmıştır. İnkübasyon süresi boyunca Johnson sıvı besiyerinde kültürlerin gelişmesi belirli aralıklarla bu dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Ayrıca optik yoğunluk değerleri hücre sayısının belirlenmesi, kuru ağırlık ve yaş ağırlığın belirlenmesinde kullanılan standart eğrilerin hazırlanmasında da kullanılmıştır.

### 3.3.3 Hücre sayısının belirlenmesi

Farklı optik yoğunluk değerlerindeki sayısının belirlenmesi için optik yoğunluğu yaklaşık 2 olan sıvı alg kültürü seri seyreltmelere tabi tutulmuştur. Her seyreltilmiş örneğin optik yoğunluk değeri belirlendikten sonra üç defa Thoma lamı ile sayım yapılarak hücre sayısının ortalaması alınmıştır. Seyreltilmiş bu örneklerden elde edilen optik yoğunluk değerlerine karşılık belirlenmiş olan ortalama hücre sayıları ile şekil 3.2'de gösterilen bir standart eğri oluşturulmuştur.

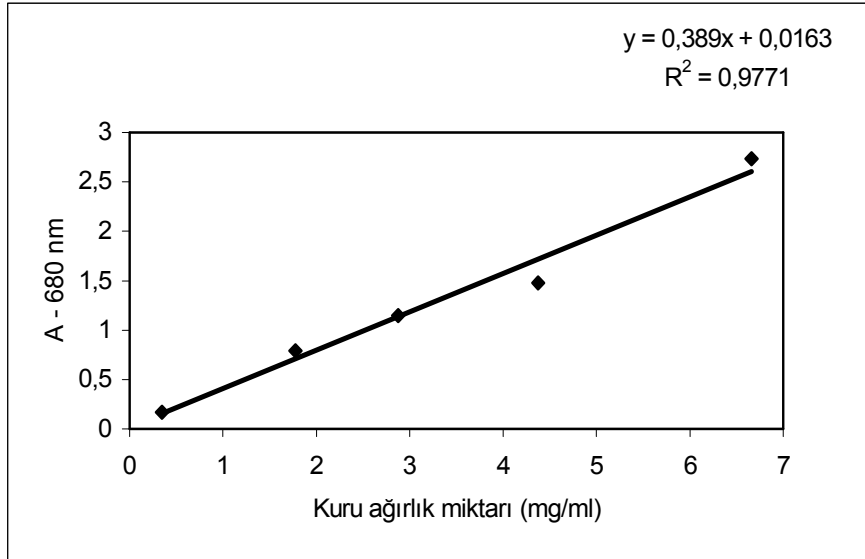


Şekil 3.2. Hücre sayısı standart eğrisi

Bundan sonra bu standart eğri kullanılarak optik yoğunluk değerleri bulunan örneklerin hücre sayıları belirlenmiştir.

### 3.3.4 Kuru ağırlığın belirlenmesi

Kuru ağırlığın belirlenmesinde de optik yoğunluğu yaklaşık 2 olan sıvı alg kültürü seyreltmelere tabi tutularak her seyreltilmiş örneğin optik yoğunluk değeri ölçülmüştür. Bu şekilde hazırlanan 4 ml örnek 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve üst sıvı dikkatli bir şekilde boşaltılmıştır. Tüplerin üzerine tekrardan 4 ml distile su eklenip örnekler tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır. Örnekler önceden hazırlanmış ve tartılmış olan alüminyum folyolara boşaltılarak 80 °C'de (Etüv Nüve FN 400 model) 3 saat kurutulmuştur. Bundan sonra da 20 saat kadar 50 °C'de tutulmuştur. Kurutulmuş olan örnekler tartılarak optik yoğunluk değerlerine karşılık gelen miktarlar ile standart bir eğri elde edilmiştir. Bu eğri şekil 3.3'de verilmiştir.

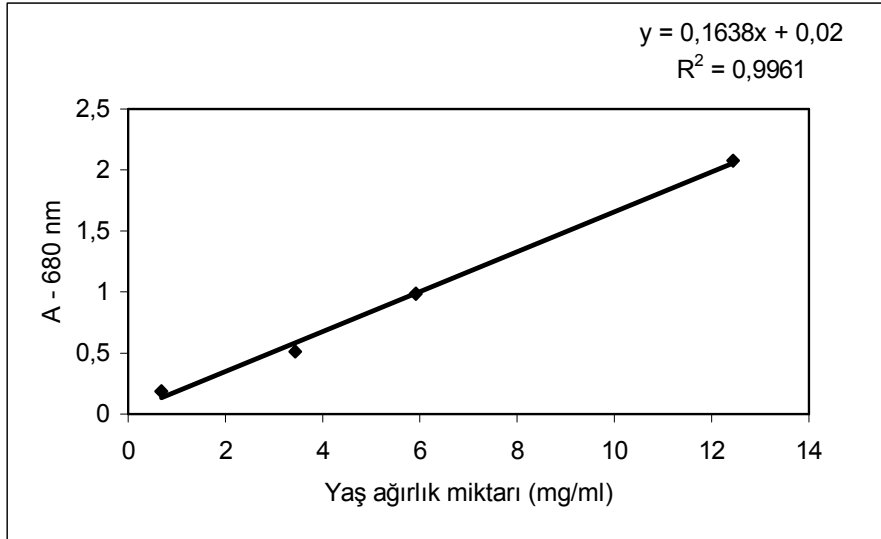


Şekil 3.3. Kuru ağırlık standart eğrisi

Bu eğri kullanılarak inkübasyon süresi boyunca optik yoğunlukları belirlenen örneklerin kuru ağırlık miktarları hesaplanmıştır.

### 3.3.5 Yaş ağırlığın belirlenmesi

Yaş ağırlığın belirlenmesinde de optik yoğunluğu yaklaşık 2 olan sıvı alg kültürü seri seyreltmelere tabi tutularak her seyreltilmiş örneğin optik yoğunluk değeri ölçülmüştür. Bu şekilde hazırlanan 4 ml örnek önceden tartılmış olan konik santrifüj tüplerine konmuştur. Tüpler 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve üst sıvı dikkatli bir şekilde boşaltılmıştır. Aynı tüpler tekrardan tartılmıştır ve yaş ağırlık miktarları mg cinsinden belirlenmiştir. Böylece örneklerin optik yoğunluklarına karşılık gelen miktarları ile şekil 3.4'de standart bir eğri elde edilmiştir.



Şekil 3.4 Yaş ağırlık standart eğrisi

Bu eğri kullanılarak inkübasyon süresi boyunca belirlenen optik yoğunluk değerleriyle yaş ağırlık miktarları hesaplanmıştır.



### 3.3.6 Klorofil (a+b) miktarının belirlenmesi

Örneklerden klorofil (a+b) miktarının belirlenmesi R.J.Porra ve ark. (1989)'nın tanımladığı yönteme göre yapılmıştır. Örnekler %80'lik sulu aseton (Merck) çözeltisi ile muamele edilmiştir. Bu çözelti ayrıca 2,5 mM sodyum fosfat pH 7,8 tamponunu da içermektedir. Bu sayede klorofilin faeofitinlere dönüşümü minimize edilmektedir. Klorofil miktarı belirlenecek 2,5 ml'lik alg kültürü 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelek üzerine %80'lik sulu aseton çözeltisinden 5 ml eklenmiştir. Örnekler iyice ezilerek klorofilin maksimum bir şekilde ekstrakte edilmesi sağlanmıştır. Hücre artıklarını uzaklaştırmak amacıyla tüpler tekrardan 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve üst sıvı klorofil tayini için kullanılmıştır. Üst sıvının optik yoğunluk değeri 646,6 nm ve 663,6 nm'lik dalga boylarında okutularak µg klorofil / ml örnek cinsinden aşağıdaki formüle göre klorofil miktarları hesaplanmıştır:

$$\text{Klorofil (a+b)} = 17,76 \cdot A^{646,6} + 7,37 \cdot A^{663,6}$$

Başta kullanılan örnek miktarı hesaplama yapılırken dikkate alınmıştır.

### 3.4 Gliserol Üretimini Etkileyen Faktörler

Gliserol üretimine etkili faktörlerin belirlenmesi çalışmalarında *Dunaliella* türlerinin gliserol üretimine pH, tuz konsantrasyonları ve başlangıç inokülüm miktarlarının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla farklı pH ve tuz konsantrasyonlarında 250 mililitrelik erlenlerde 100 ml olarak hazırlanan Johnson sıvı besiyeri kullanılmıştır. *Dunaliella* kültürleri 1000 lüks sürekli floresan ışık altında, 20 – 22 °C'de 60 gün boyunca inkübe edilmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

#### 3.4.1 pH'in etkisi

İzole edilen *Dunaliella* türlerinin gliserol üretim kapasitelerine pH'ın etkisini araştırmak için, %15 NaCl içeren pH'ı 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmış Johnson besi ortamı kullanılmıştır. pH ayarlamalarında (Consort P500 pH metre) 1 N NaOH (Merck) kullanılmıştır.

Başlangıç inokülümü olarak dört farklı pH'da hazırlanan besiyerinde üçer kez aktifleştirilen kültürler her besi ortamına 1 milyon hücre olacak şekilde ekilmiştir.

### **3.4.2 Tuz konsantrasyonunun etkisi**

*Dunaliella* türlerinin gliserol üretimine etkili NaCl konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan denemeler, her suşun optimum geliştiği pH'da ve %10, 15, 20 ve 25 NaCl konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir.

### **3.4.3 Başlangıç inokülüm miktarının etkisi**

Birim hücre başına en çok gliserol üreten suşla yapılan denemelerde başlangıç inokülüm miktarının gliserol üretimine etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla pH'sı 6'ya ayarlanmış %25 NaCl içeren 100 ml'lik Johnson besiyerine, başlangıç inokülümü olarak aynı besiyerinde üç kez aktifleştirilmiş kültürlerden 1, 2, 5 ve 10 milyon hücre ekilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1 İzolasyon ve Teşhis

Tuz Gölü'nden (Konya-Türkiye) alınan örneklerden Johnson besiyerinde gelişebilen 7 adet saf kültür izole edilmiştir. Bunların arasında koloni yapısı ve gelişme özellikleri birbirinden farklı olan 4 adet izolat çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir.

İzole edilen suşların mikroskopik incelemelerinde bunların tek hücreli, yeşil renkte, kamçılı olup *Dunaliella* cinsine ait oldukları tespit edilmiştir. Bu izolatlar *Dunaliella* sp. T-1, *Dunaliella* sp. T-2, *Dunaliella* sp. T-3 ve *Dunaliella* sp. T-4 olarak adlandırılmıştır. *Dunaliella* türlerinin Tuz Gölü gibi yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda gelişebildiği ve dış basınca karşın iç basınçlarını hücrelerinde gliserol biriktirerek ayarlayabildikleri önceden yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir (Borowitzka Michael ve Borowitzka Lesley 1988'e göre Ben Amotz ve Avron 1973, Borowitzka et al. 1977).

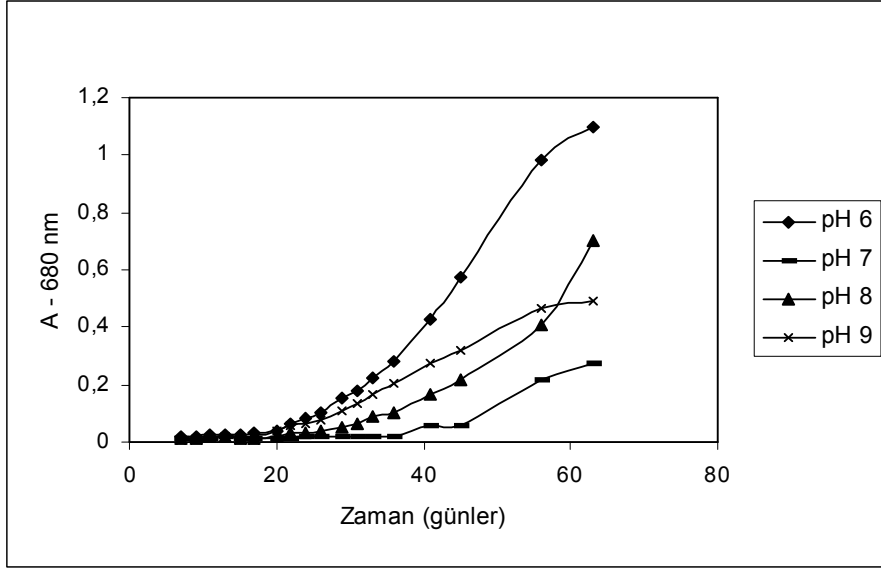
### 4.2 *Dunaliella* Suşlarının Gelişimini ve Gliserol Üretimini Etkileyen Faktörler

Çalışmada izole edilen dört *Dunaliella* suşunun gelişimi ve gliserol üretimi üzerinde pH, NaCl konsantrasyonu ve başlangıç hücre konsantrasyonunun etkisi belirlenmiştir. Denemeler farklı pH ve NaCl konsantrasyonlarında hazırlanan Johnson sıvı besiyerinde sürekli flöresan ışık altında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *Dunaliella* suşlarının üretiminde flöresan ışık kullanılmıştır. Flöresan ışığının *Dunaliella* türlerinin gelişmesi için en uygun ışık olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Thakur ve Kumar 1997).

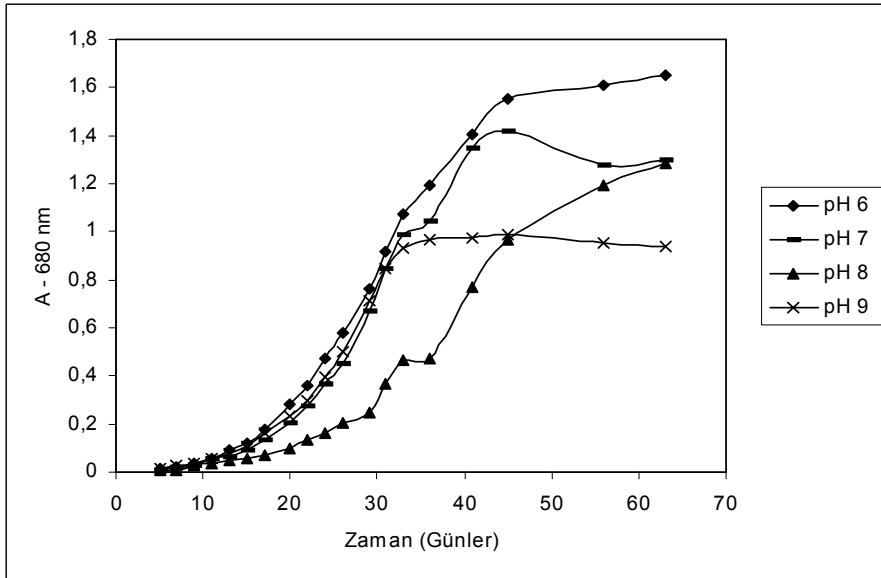
Yaklaşık 60 günlük bir inkübasyon süresi boyunca çeşitli zamanlarda alınan örneklerden *Dunaliella* suşlarının gelişmesi optik yoğunluğun belirlenmesiyle, gliserol üretimi ise spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Kültürlerin hücre sayısı, klorofil (a+b) miktarı, kuru ve yaş ağırlıkları ise optik yoğunluk değerlerine karşılık çizilen standartlardan hesaplanmıştır.

#### 4.2.1 *Dunaliella* suşlarının gelişmesine ve gliserol üretimine pH'ın etkisi

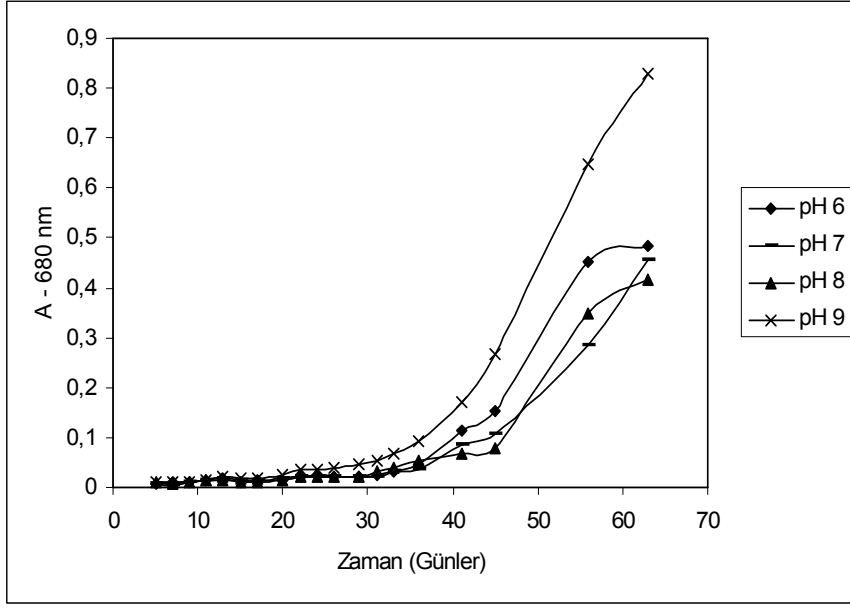
Dört farklı pH'da yapılan denemeler daha önce bir ön denemeye belirlenmiş olan %15 NaCl içeren Johnson sıvı besiyerinde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon periyodu boyunca dört farklı pH'da *Dunaliella* suşlarının gelişmeleri şekil 4.1. - 4.4.'de gösterilmiştir.



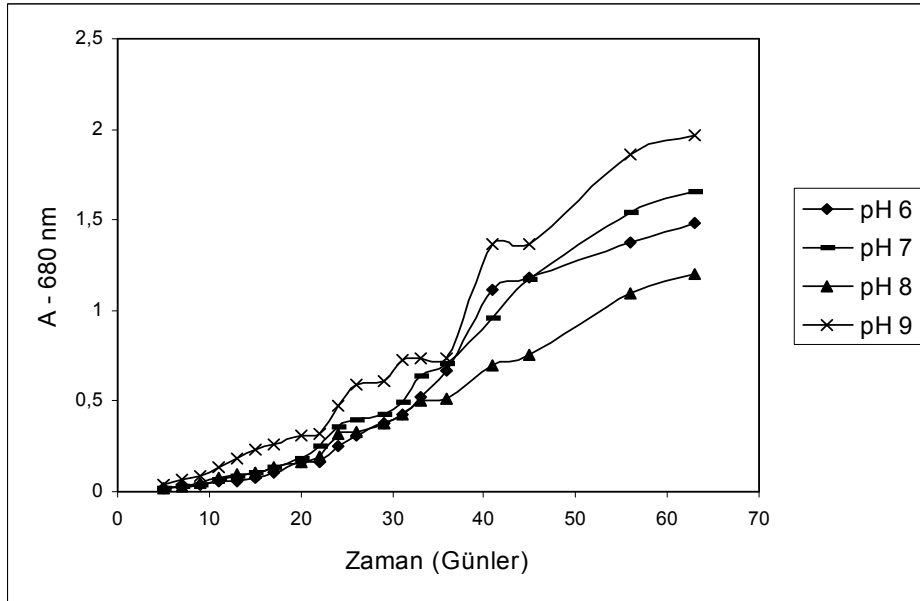
Şekil 4.1. *Dunaliella* sp. T-1 suşunun farklı pH'lardaki gelişimi (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15).



Şekil 4.2. *Dunaliella* sp. T-2 suşunun farklı pH'lardaki gelişimi (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15).



Şekil 4.3. *Dunaliella* sp. T-3 suşunun farklı pH'lardaki gelişimi (Lüks:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15).



Şekil 4.4 *Dunaliella* sp. T-4 suşunun farklı pH'lardaki gelişimi (Lüks:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15).

*Dunaliella* sp. T-1 suşu ile yapılan denemelerde, inkübasyonun ilk 20 günü kültürlerin lag fazda buldukları, sonraki 35 günde logaritmik faza geçtikleri 60. günde ise gelişmelerinde bir duraklamanın olduğu belirlenmiştir (şekil 4.1.) Bu suş en iyi gelişmeyi pH 6'da gerçekleştirirken en zayıf gelişmesini pH 7'de yapmıştır. Daha yüksek pH'larda (pH 8 ve 9'da) benzer oranda gelişme göstermiştir.

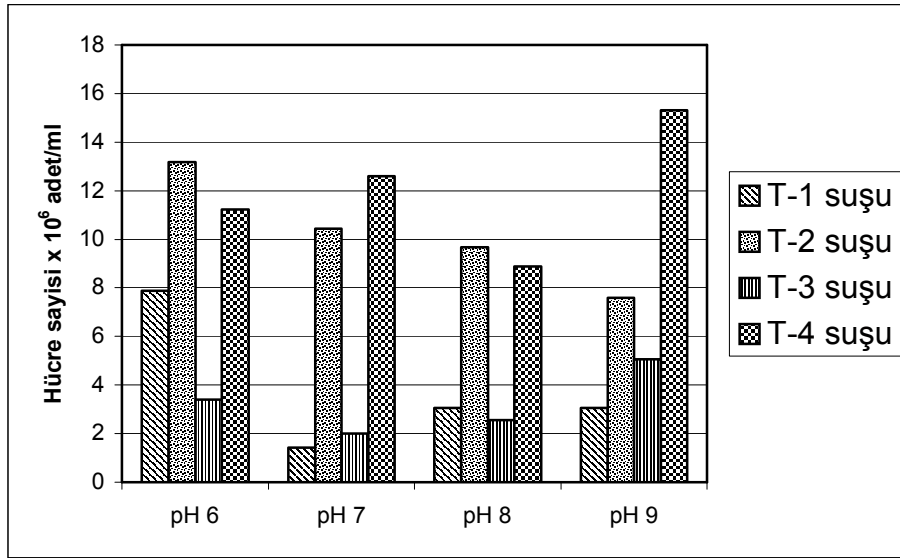
*Dunaliella* sp. T-2 suşu inkübasyonun yaklaşık 10. gününde lag periyodunu tamamlayıp, yaklaşık 30 gün süren logaritmik gelişme evresine geçmiştir (şekil 4.2.). Bu suşun, pH 6, 7 ve 9'da yaklaşık 30-40 gün sonra duraklama evresine geçtiği, pH 8'de yapılan denemelerde ise yaklaşık olarak 60. günde gelişmesinin yavaşladığı görülmüştür. En yüksek gelişme oranlarına *Dunaliella* sp. T-1 suşunda olduğu gibi pH 6'da ulaşan bu suş en düşük gelişme oranını pH 9'da göstermiştir.

*Dunaliella* sp. T-3 suşu ile yapılan denemeler şekil 4.3.'de verilmiştir. Oldukça uzun, yaklaşık 30 gün, bir lag periyodu gösteren bu suş diğer suşlardan daha düşük yoğunluklarda gelişerek yaklaşık 60 günde pH 6 ve 8'de gelişmesini yavaşlatmıştır. İnkübasyon süresi boyunca pH 9'da diğer pH'lardaki gelişme oranlarında belirgin bir fark gösteren *Dunaliella* sp. T-3 suşu, 60. günde de pH 9'da gelişmesine devam etmiştir.

Şekil 4.4.'de *Dunaliella* sp. T-4 suşunun dört farklı pH'da gelişme özellikleri verilmiştir. Yaklaşık 10 günlük bir lag periyodundan sonra inkübasyon süresinin sonuna kadar logaritmik gelişmesine devam eden bu suş yaklaşık 60 günde denenen tüm pH'larda gelişmesini yavaşlatmıştır. En yüksek gelişmeyi *Dunaliella* sp. T-3 suşu gibi pH 9'da gerçekleştiren *Dunaliella* sp. T-4 suşu, en düşük gelişmeyi pH 8'de göstermiştir.

Yapılan pH denemeleri sonucunda en yüksek hücre sayısına *Dunaliella* sp. T-1 ve T-2 suşları pH 6'da T-3 ve T-4 suşları ise pH 9'da ulaştığı belirlenmiştir. Suşlar birbiriyle kıyaslandığında ise inkübasyon periyodu sonunda en yüksek hücre sayısını *Dunaliella* sp. T-4 suşunun pH 9'da oluşturduğu, bunu *Dunaliella* sp. T-2 suşunun pH 6'da  $13,19 \times 10^6$  adet/ml hücre sayısı ile izlediği şekil 4.5.'de gösterilmiştir. Her iki *Dunaliella* suşu

da test edilen tüm pH'larda diğer iki suştan daha yüksek hücre sayısına ulaşmıştır. İnkübasyon periyodu sonunda benzer hücre sayılarına ulaşan *Dunaliella* sp. T-1 ve T-3 suşları arasında en yüksek hücre sayısını T-1 suşunun pH 6'da oluşturduğu saptanmıştır. *Dunaliella* suşlarının dört farklı pH'da inkübasyon süresi sonunda gelişme parametreleri ve gliserol üretim kapasiteleri çizelge 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. *Dunaliella* suşlarının farklı pH'lardaki hücre sayıları (Lüx:1000, sürekli floresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15).

Çizelge 4.1. *Dunaliella* suşlarının gelişme parametreleri ve gliserol üretim kapasitelerine farklı pH'ların etkisi  
(Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T:20-22 °C)

NaCl (%)	Suş	pH	Hücre Sayısı x10 <sup>6</sup> /ml	Klorofil (a+b) µg/ml	Kuru Ağırlık mg/ml	Yaş Ağırlık mg/ml	Gliserol Konsant. µg/ml	Gliserol µg/10 <sup>6</sup> hücre
15	T-1	6	7,88	19,11	2,48	5,86	195,52	24,94
		7	1,42	3,43	0,51	1,197	33,41	23,53
		8	3,05	7,39	1,01	2,37	73,64	24,11
		9	3,06	8,62	1,16	2,74	83,61	27,36
	T-2	6	13,19	31,99	4,09	9,69	185,61	14,07
		7	10,43	25,29	3,25	7,7	152,92	14,66
		8	9,68	23,47	2,94	7,15	151,9	15,69
		9	7,59	18,39	2,39	5,65	110,5	14,56
	T-3	6	3,41	8,25	1,12	2,63	113,4	33,26
		7	2,01	4,86	0,7	1,62	63,94	31,81
		8	2,55	6,18	0,86	2,01	80,39	31,53
		9	5,06	12,27	1,62	3,82	167,18	33,04
	T-4	6	11,24	27,27	3,5	8,28	253,59	22,55
		7	12,61	30,57	3,91	9,27	306,28	24,29
		8	8,87	21,52	2,78	6,57	226,55	25,54
		9	15,3	37,12	4,73	11,21	375,48	24,53

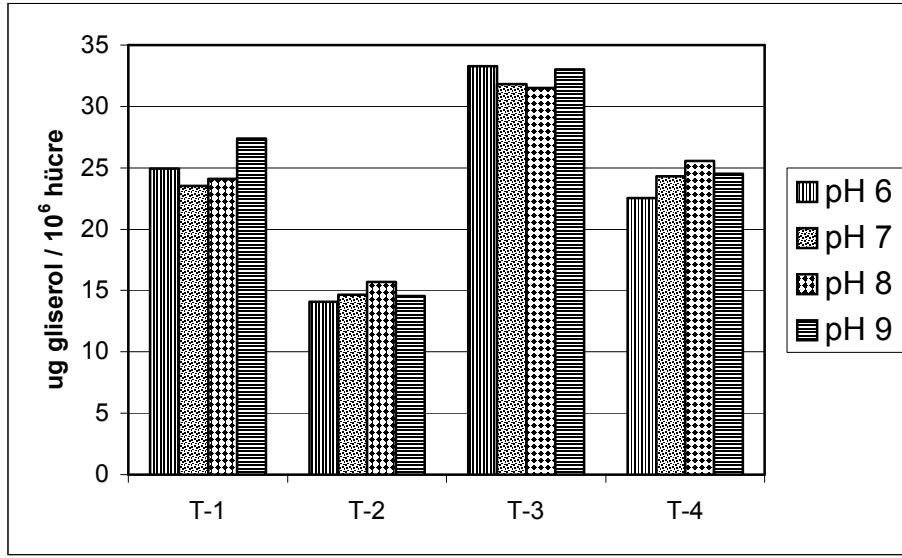
Çizelgeden de görüleceği gibi, suşlar arasındaki farklılıklar her parametrede göze çarpmaktadır. Farklı pH'lar hücrelerin sayısal olarak gelişmesi üzerinde etkili olmuştur. Çizelgede hücre sayısı artışıyla, klorofil (a+b) miktarı, kuru ağırlık ve yaş ağırlık miktarlarında paralel olarak arttığı görülmektedir.



Farklı pH'larda bir mililitre besiyerinde elde edilen gliserol miktarları bakımından suşlar karşılaştırıldığında, her suş için en yüksek hücre sayısına ulaşılan pH'da en yüksek gliserol miktarının elde edildiği görülmüştür (çizelge 4.1.). İnkübasyon süresi sonunda besiyerinden elde edilen en yüksek gliserol miktarı *Dunaliella* sp. T-4 suşunda pH 9'da 375,48 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu suş hücre sayısı bakımından diğer suşlarla karşılaştırıldığında ise besiyerinde en yüksek hücre sayısına ulaştığı görülmüştür.

*Dunaliella* sp. T-2 suşu ise hücre sayısı bakımından ikinci sırada olmasına rağmen 185,61 µg/ml gliserol üretim kapasitesiyle, 195,52 µg/ml gliserol üreten T-1 suşundan sonra gelmiştir. En az gliserol üretimi *Dunaliella* sp. T-3 suşunda (167,18 µg/ml) olmuştur. Ancak hücre sayısı başına suşların gliserol üretim kapasiteleri hesaplandığında bu suşun hücre başına en yüksek gliserol üreten suş olduğu sonucuna varılmıştır.

Suşlar arasında  $10^6$  adet hücre başına üretilen gliserol miktarlarının suşlar arasında farklı olduğu çizelge 4.1'de görülmektedir. Fakat aynı suş içinde farklı pH'larda da birim hücre başına benzer gliserol miktarlarının elde edilmesi pH'ın gliserol üretimini etkilemediğini göstermektedir. Örnek olarak *Dunaliella* sp. T-1 suşunu ele aldığımızda, pH 6'da 24,94; pH 7'de 23,53; pH 8'de 24,11 ve pH 9'da 27,36 µg gliserol / $10^6$  adet hücre ürettiği belirlenmiştir. Diğer suşlarda da durum aynı şekildedir.  $10^6$  hücrede en yüksek gliserol miktarı *Dunaliella* sp. T-1'de pH 9'da 27,36 µg, *Dunaliella* sp. T-2'de pH 8'da 15,69 µg, *Dunaliella* sp. T-3'de pH 6'da 33,27 µg ve *Dunaliella* sp. T-4'de pH 8'da 25,54 µg gliserol / $10^6$  adet hücre olarak belirlenmiştir. Buradan da görüleceği gibi birim hücre başına en yüksek gliserol miktarını *Dunaliella* sp. T-3 suşu pH 6'da üretmiştir (şekil 4.6.).



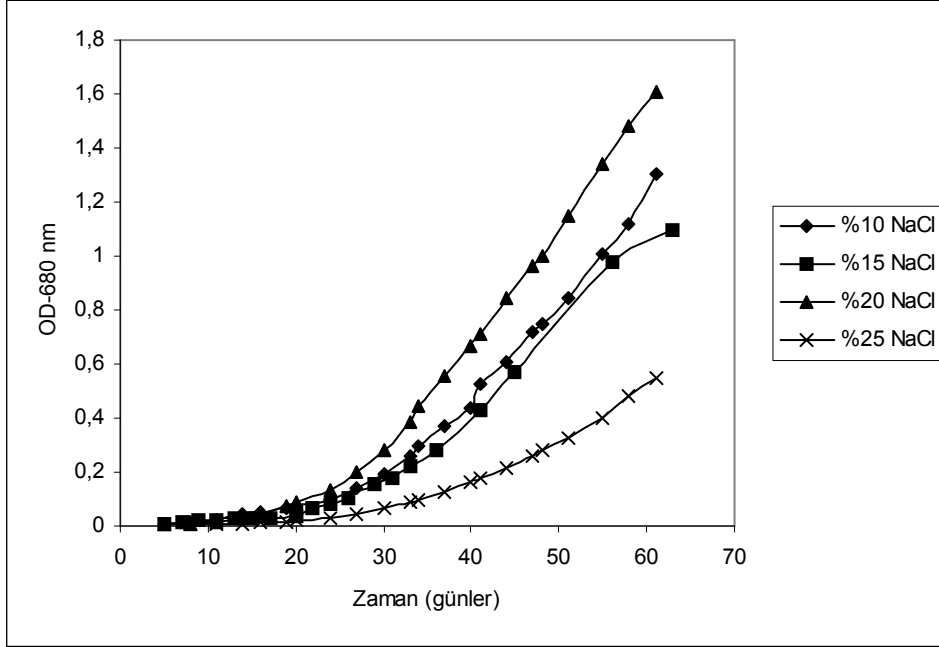
Şekil 4.6. *Dunaliella* suşlarının farklı pH'lardaki gliserol üretim miktarları (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T: 20-22°C, NaCl: %15)

Yapılan pH denemelerinde, pH'ın besi ortamında doğrudan hücre sayısını artırma etkisinin bulunduğu saptanmıştır. pH'ın hücre sayısına olan etkisi her suş için farklılık göstermektedir. Genel olarak en iyi gelişmenin pH 6 ve pH 9'da olduğu tespit edilmiştir. pH denemesindeki en yüksek hücre sayısına *Dunaliella* sp. T-4 suşu pH 9'da ulaşmıştır. Bununla doğru orantılı olarak da besiyerinde üretilen gliserol miktarlarında artış olmuştur. Benzer denemeler Thakur ve ark. (1997,1999, 2000) tarafından yapılmıştır ve hücre sayısındaki en fazla artışın pH 8'de olduğu bulunmuştur. Tuz Gölü'nden izole edilen *Dunaliella* türlerinin β-karoten üretim kapasitelerinin belirlendiği bir çalışmada ise *Dunaliella* türlerinin en yüksek hücre sayısına pH 9'da ulaştığı bildirilmiştir (Çelekli 2002).

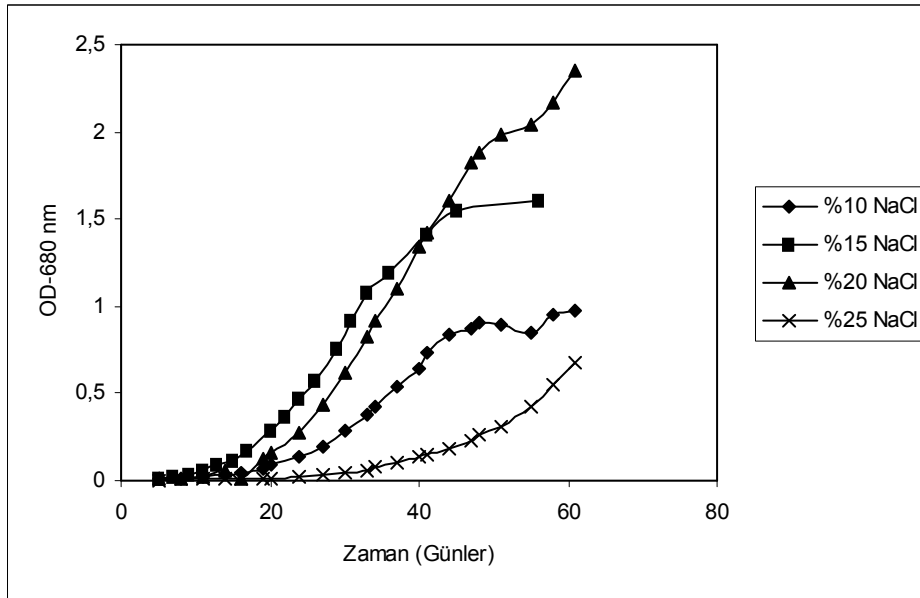
#### 4.2.2 *Dunaliella* suşlarının gelişmesine ve gliserol üretimine NaCl konsantrasyonunun etkisi

Bir önceki çalışmada suşların gelişimi ve besiyerinde en fazla gliserol ürettiği pH değerleri belirlendikten sonra, bu suşlar üzerinde tuz konsantrasyonlarının etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma için %10, %15, %20 ve %25 NaCl içeren Johnson sıvı besiyeri kullanılmıştır. Dört farklı NaCl konsantrasyonunda yapılan denemeler Johnson

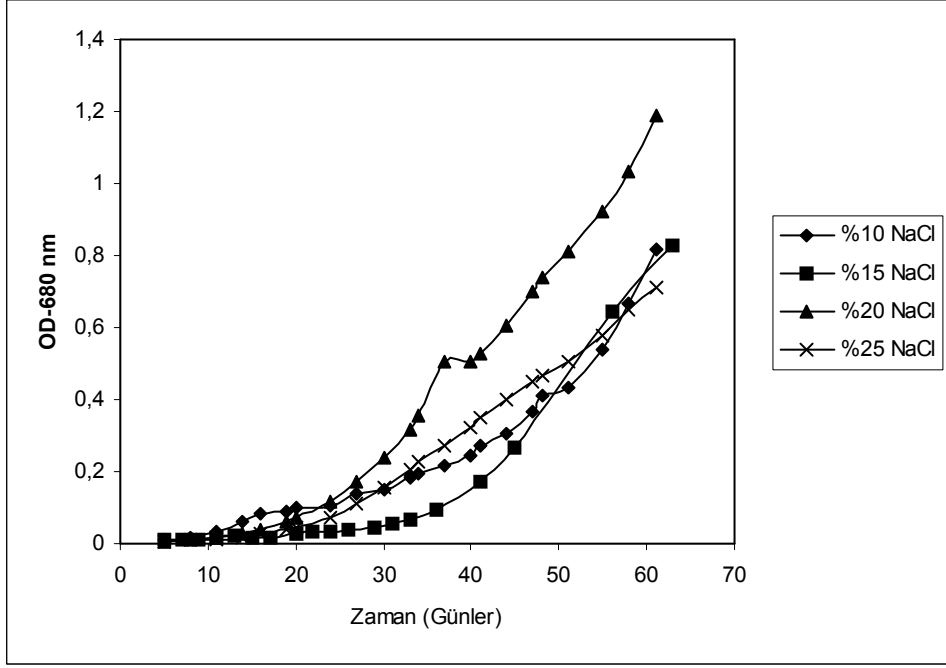
sıvı besiyerinde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon periyodu boyunca dört farklı NaCl konsantrasyonunda *Dunaliella* türlerinin gelişimleri şekil 4.7. - 4.10.'da gösterilmiştir.



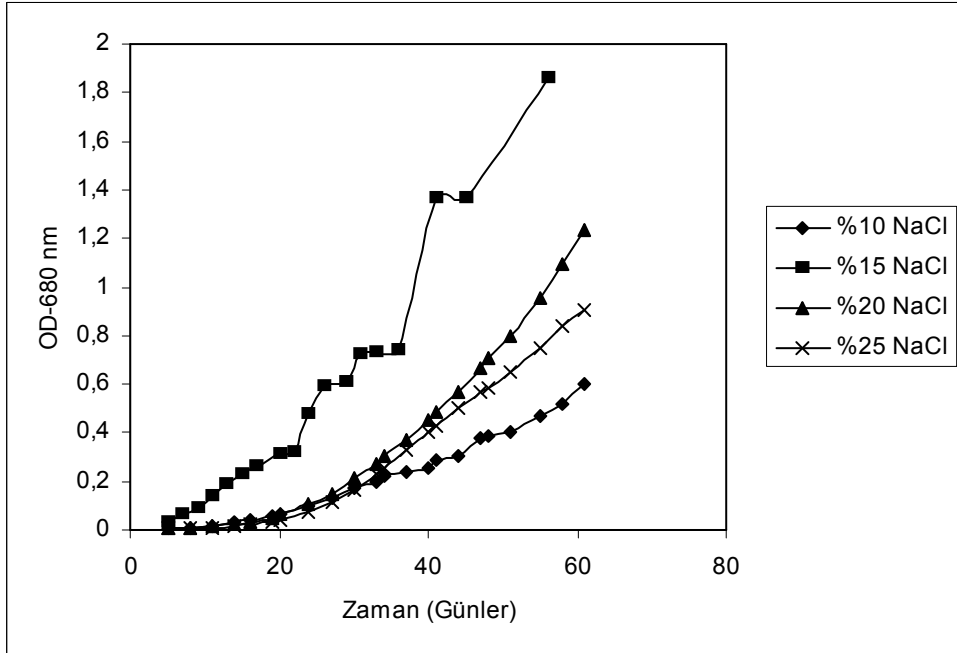
Şekil 4.7. Farklı NaCl konsantrasyonlarının *Dunaliella* sp. T-1 suşunun gelişimine etkisi (pH 6, Lüks:1000, sürekli föresan ışık, T: 20-22 °C)



Şekil 4.8. Farklı NaCl konsantrasyonlarının *Dunaliella* sp. T-2 suşunun gelişimine etkisi (pH 6, Lüks:1000, sürekli föresan ışık, T: 20-22 °C)



Şekil 4.9. Farklı NaCl konsantrasyonlarının *Dunaliella* sp. T-3 suşunun gelişimine etkisi (pH 6 Lüks:1000, sürekli föresan ışık, T: 20-22 °C)



Şekil 4.10. Farklı NaCl konsantrasyonlarının *Dunaliella* sp. T-4 suşunun gelişimine etkisi (pH 9, Lüks:1000, sürekli föresan ışık, T: 20-22 °C)

*Dunaliella* sp. T-1 suşu ile yapılan denemelerde inkübasyonun ilk 25 günü kültürlerin lag fazda buldukları, %10, %15, %20 ve %25 NaCl içeren besiyerinde kültürlerin sonraki 35-40 günde logaritmik faza geçtikleri ve inkübasyon periyodunun sonunda bile logaritmik fazda gelişmeye devam ettikleri, buna karşın %15 NaCl içeren kültürlerin ise 55. günden itibaren duraklama fazına geçtiği belirlenmiştir. Bu suş en iyi gelişmeyi %20 NaCl'de gerçekleştirirken en zayıf gelişmesini de %25 NaCl'de göstermiştir (şekil 4.7).

*Dunaliella* sp. T-2 suşunun farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişmeleri incelendiğinde %10 ve %20 NaCl içeren kültürlerin inkübasyonun ilk 15 günü lag fazda buldukları, %20 NaCl içeren ortamda sonraki 45 gün boyunca (inkübasyon periyodunun sonuna kadar) mikroalgin logaritmik fazda gelişmeye devam ettiği, %10 NaCl içeren ortamda ise 45. günden itibaren duraklama evresine girdiği belirlenmiştir. Bunlardan farklı olarak %25 NaCl konsantrasyonunda kültürün oldukça uzun bir lag fazından sonra, yaklaşık 35 gün, logaritmik faza geçtiği ve inkübasyon periyodunun sonuna kadar logaritmik fazda gelişmesine devam ettiği bulunmuştur. *Dunaliella* sp. T-1 suşunda olduğu gibi en düşük gelişmeyi %25 NaCl'de gerçekleştiren bu suş, en yüksek gelişmesini %20 NaCl'de yapmıştır (şekil 4.8.).

*Dunaliella* sp. T-3 suşu ile yapılan denemeler şekil 4.9.'da verilmiştir. Denemelerde %10, %15, %20 ve %25 NaCl konsantrasyonlarında kültürlerin yaklaşık 20 günlük bir lag periyodundan sonra logaritmik faza geçtikleri ve kültürlerin inkübasyon periyodunun sonuna kadar gelişmelerine devam ettikleri belirlenmiştir. En iyi gelişme %20 NaCl konsantrasyonunda olurken, %10, %15 ve %25 NaCl konsantrasyonlarında benzer gelişme eğrileri elde edilmiştir.

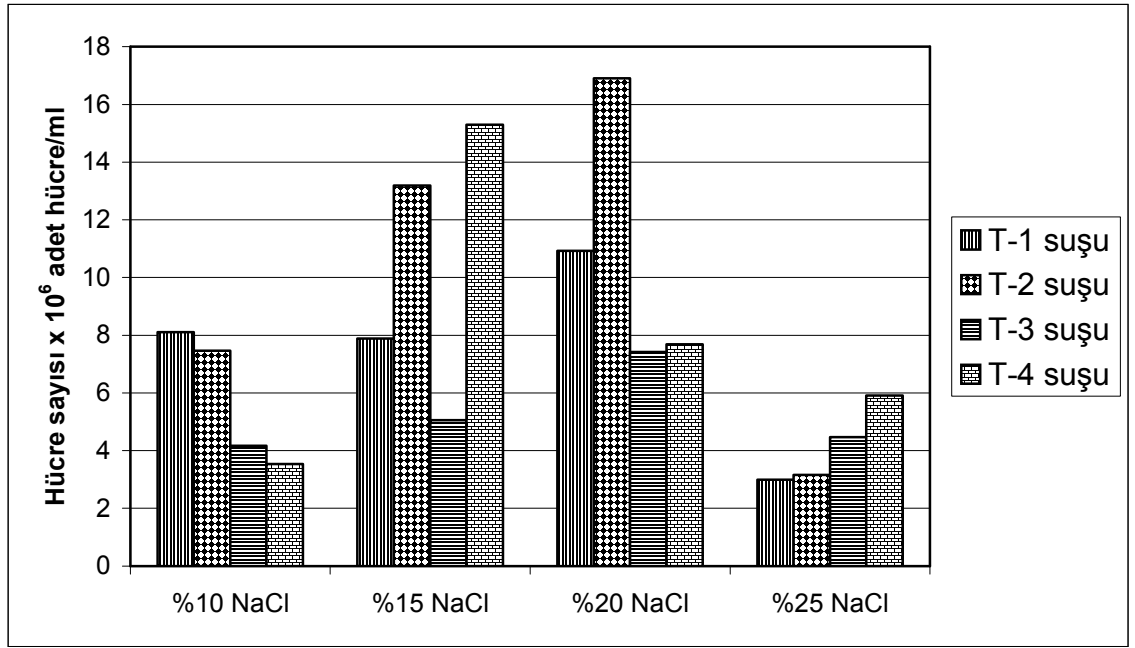
Şekil 4.10.'da *Dunaliella* sp. T-4 suşunun dört farklı NaCl konsantrasyonunda gelişme özellikleri verilmiştir. Bu suşun %10, %20 ve %25 NaCl konsantrasyonlarında 20 günlük bir lag fazından sonra logaritmik faza geçtiği, bunlara karşın %15 NaCl konsantrasyonunda inkübasyon periyodunun başlamasından çok kısa bir süre sonra (5 günlük lag fazından sonra) hızlı bir şekilde logaritmik faza geçtiği belirlenmiştir. Diğer

suşların aksine T-4 suşu en iyi gelişmeyi %15 NaCl konsantrasyonunda, en düşük gelişmeyi %10 NaCl konsantrasyonunda gerçekleştirmiştir.

*Dunaliella* suşlarının dört farklı NaCl konsantrasyonunda inkübasyon süresi sonunda gelişme parametreleri ve gliserol üretim kapasiteleri çizelge 4.2. ve şekil 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2.*Dunaliella* suşlarının gelişme parametreleri ve gliserol üretim kapasitelerine farklı NaCl konsantrasyonlarının etkisi  
(Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, T:20-22 °C)

Suş	pH	NaCl (%)	Hücre Sayısı x10 <sup>6</sup> /ml	Klorofil (a+b) µg/ml	Kuru Ağırlık mg/ml	Yaş Ağırlık mg/ml	Gliserol Konsant. µg/ml	Gliserol µg/10 <sup>6</sup> hücre
T-1	6	10	8,11	19,65	2,54	6,02	181,03	22,34
		15	7,88	19,11	2,48	5,86	195,52	24,94
		20	10,93	26,51	3,4	8,06	375,03	34,31
		25	2,99	7,22	0,99	2,33	164,47	55,08
T-2	6	10	7,46	16,34	2,13	5,04	94,17	12,62
		15	13,19	31,99	4,09	9,69	185,61	14,07
		20	16,91	41,02	5,22	12,37	360,81	21,34
		25	3,16	7,64	1,01	2,45	80,64	25,55
T-3	9	10	4,17	10,1	1,35	3,18	97,08	23,28
		15	5,06	12,27	1,62	3,82	167,18	33,03
		20	7,42	17,98	2,33	5,53	265,44	35,77
		25	4,47	10,82	1,44	3,39	22,42	50,19
T-4	9	10	3,54	8,58	1,16	2,73	77,72	21,95
		15	15,3	37,12	4,73	11,21	375,48	24,53
		20	7,69	18,64	2,42	5,72	263,7	34,29
		25	5,91	14,33	1,88	4,44	237,79	40,23



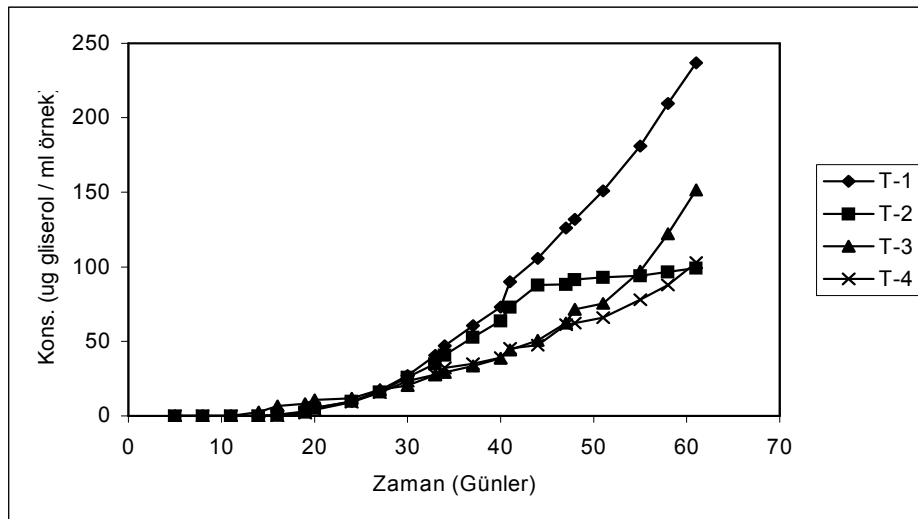
Şekil 4.11. *Dunaliella* suşlarının farklı farklı NaCl konsantrasyonlarındaki hücre sayıları (Lüx:1000, sürekli floresan ışık, T: 20-22°C)

Çizelgeden de görüldüğü gibi NaCl konsantrasyonunun artmasıyla birlikte hücre başına üretilen gliserol miktarının da arttığı saptanmıştır. Ayrıca farklı NaCl konsantrasyonları hücrelerin sayısal olarak gelişmesi üzerine de etkili olmuştur. İnkübasyon periyodu sonunda en yüksek hücre sayısına T-2 suşu %20 NaCl konsantrasyonunda ( $16,91 \times 10^6$  adet hücre/ml) ulaşırken, en düşük hücre sayısını ise T-1 suşu %25 NaCl konsantrasyonunda sağlamıştır ( $2,99 \times 10^6$  adet/ml). T-1, T-2 ve T-3 suşları en yüksek hücre sayısına %20 NaCl konsantrasyonunda ulaşırken T-4 suşu %15 NaCl konsantrasyonunda ulaşmıştır (Şekil 4.11). T-1 suşu %20 NaCl konsantrasyonunda  $10,93 \times 10^6$  hücre/ml, T-2 suşu %20 NaCl konsantrasyonunda  $16,9 \times 10^6$  hücre/ml, T-3 suşu %20 NaCl konsantrasyonunda  $7,42 \times 10^6$  hücre/ml ve T-4 suşu %15 NaCl konsantrasyonunda  $15,3 \times 10^6$  hücre/ml hücre sayısına ulaşılmıştır. Hücre sayısına paralel olarak da klorofil (a+b), kuru ağırlık ve yaş ağırlık miktarlarında da artış söz konusudur. Çizelge 4.2.'de de görüldüğü gibi hücre sayısı artışıyla birlikte klorofil (a+b) miktarı, kuru ağırlık miktarı ve yaş ağırlık miktarları da paralel olarak artmıştır.

NaCl konsantrasyonunun artmasıyla birlikte hücre başına üretilen gliserol miktarlarının da paralel olarak arttığı çizelge 4.2.'de görülmektedir. Hücre başına en yüksek gliserol miktarını T-1 %25 NaCl konsantrasyonunda üretmiştir(55,08  $\mu\text{g}/10^6$  hücre). Bunu, 50,19  $\mu\text{g}/10^6$  hücre ile %25 NaCl konsantrasyonunda T- 3; 40,23  $\mu\text{g}/10^6$  hücre ile %25 NaCl konsantrasyonunda T- 4 ve 25,55  $\mu\text{g}/10^6$  hücre ile %25 NaCl konsantrasyonunda T-2 takip etmektedir. Denenen tüm tuzlarda en yüksek gliserol verimi 55,08  $\mu\text{g}/10^6$  hücre ile T-1 suşu ile sağlanırken en düşük gliserol verimini 12,62  $\mu\text{g}/10^6$  adet hücre ile T-2 suşu sağlamıştır.

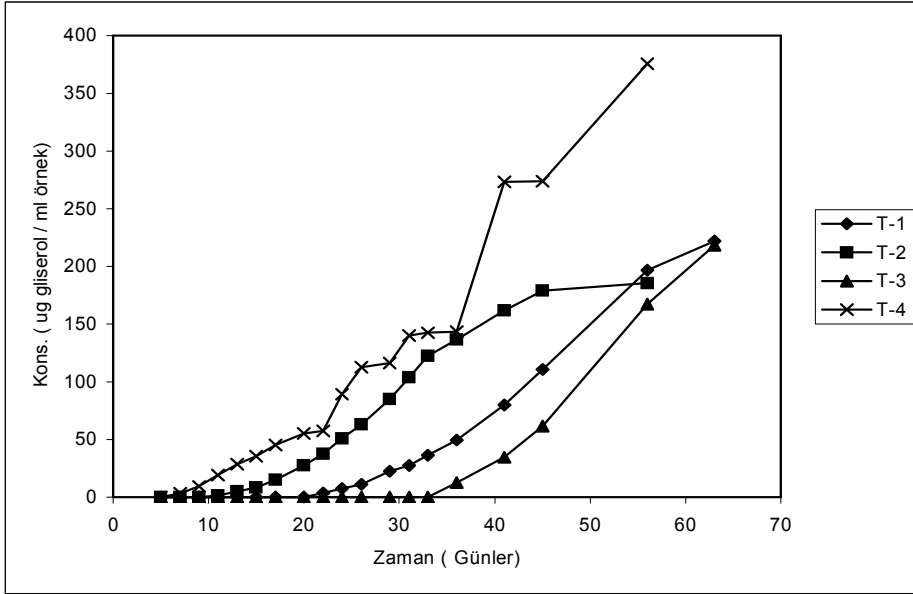
Bir mililitre besi ortamındaki üretilen gliserol miktarlarına baktığımızda, birim zamanda üretilen hücre sayısı etkisinin büyük olduğu görülmektedir. Böylece T-1 suşu en yüksek gliserolü %20 NaCl konsantrasyonunda (375,03  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ), T-2 suşu %20 NaCl konsantrasyonunda (360,81  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ), T-3 suşu %20 NaCl konsantrasyonunda (265,44  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) ve T-4 suşu %15 NaCl konsantrasyonunda (375,48  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) üretmiştir. Dolayısıyla en yüksek gliserolü 375,48  $\mu\text{g}/\text{ml}$  besi ortamı ile T-4 suşu, en düşük gliserol miktarını da 22,42  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ile T-3 suşu üretmiştir.

*Dunaliella* suşlarının dört farklı NaCl konsantrasyonunda bir mililitre besiyerinde ürettikleri gliserol miktarları şekil 4.12. - 4.15.'de gösterilmiştir.

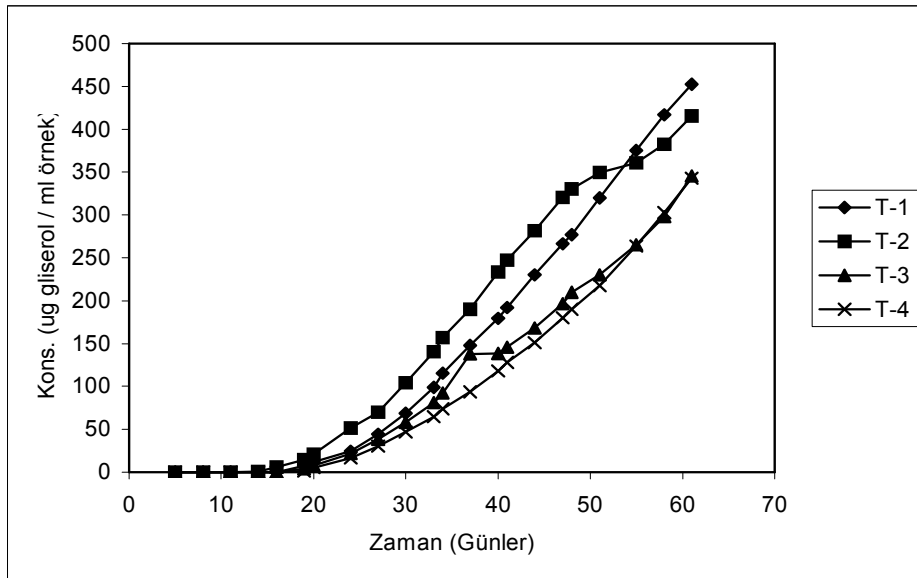


Şekil 4.12. *Dunaliella* suşlarının gliserol üretimine %10 NaCl konsantrasyonunun etkisi (Lüx:1000, sürekli floresan ışık, T:20-22 °C)

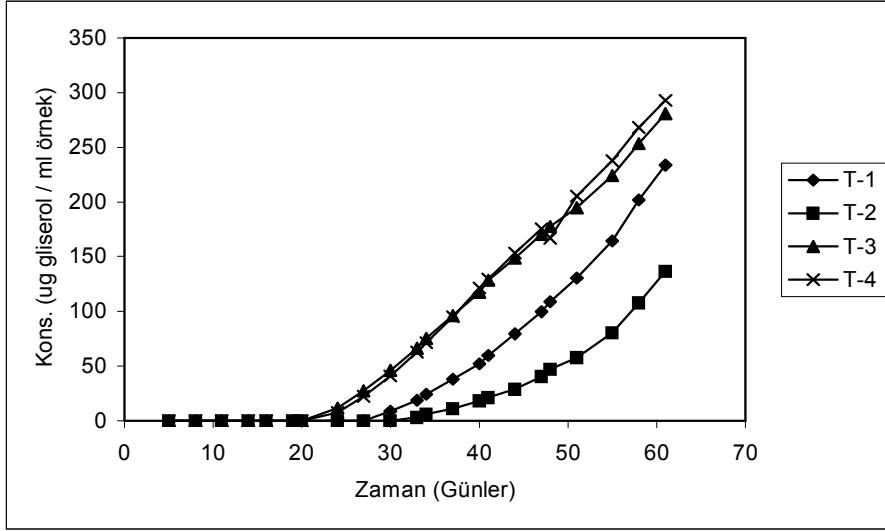




Şekil 4.13. *Dunaliella* suşlarının gliserol üretimine %15 NaCl konsantrasyonunun etkisi (Lüx:1000, sürekli floresan ışık, T:20-22 °C)



Şekil 4.14. *Dunaliella* suşlarının gliserol üretimine %20 NaCl konsantrasyonunun etkisi (Lüx:1000, sürekli floresan ışık, T:20-22 °C)



Şekil 4.15. *Dunaliella* suşlarının gliserol üretimine %25 NaCl konsantrasyonunun etkisi (Lüx:1000, sürekli floresan ışık, T:20-22 °C)

%10 NaCl'de tüm suşlarda gliserol ancak inkübasyon periyodunun 20. gününde belirlenmeye başlanmıştır ve inkübasyonun 40. gününden itibaren ise anlamlı bir düzeye ulaştığı Şekil 4.12.'de verilmiştir. İnkübasyon periyodu sonunda en yüksek gliserol verimini *Dunaliella* sp. T-1 suşu sağlarken bunu T-3 suşu takip etmektedir. Bu iki suştan sonra en düşük gliserol miktarı T-2 ve T-4 suşu tarafından elde edilmiştir.

Şekil 4.13.'de ise %15 NaCl konsantrasyonunda suşların ürettikleri gliserol miktarları verilmiştir. En yüksek gliserol üretimi T-4 suşu tarafından sağlanırken en düşük gliserol üretimi T-2 suşu tarafından gerçekleştirilmiştir. T-1 ve T-3 suşunda gliserol 25-30 günden sonra belirlenmesine rağmen inkübasyon periyodu sonunda T-2 suşundan daha fazla gliserol üretmiştir.

*Dunaliella* suşları %20 NaCl konsantrasyonunda %10 NaCl konsantrasyonunda olduğu gibi 20. günden itibaren gliserol üretmeye başlamıştır. Gliserol üretimi inkübasyon periyodunun 35. gününden sonra hızla artış göstermiştir. İnkübasyon periyodu sonunda T-1 ve T-2 suşu hemen hemen aynı gliserol miktarlarını üretirken T-3 ve T-4 suşu ise

tamamiyle aynı gliserol miktarlarını üretmişlerdir. En yüksek gliserol verimi T-1 suşu tarafından sağlanmıştır (şekil 4.14.).

%25 NaCl konsantrasyonunda bir mililitre besiyerinde suşların ürettikleri gliserol miktarı şekil 4.15.'de verilmiştir. T-1, T-3 ve T-4 suşunda gliserol inkübasyon periyodunun 20. gününde belirlenmeye başlanırken T-2 suşunda 35 günden itibaren belirlenmeye başlanmıştır. İnkübasyon periyodunun sonunda en yüksek gliserol verimi T-4 suşunda en düşük gliserol verimi ise T-2 suşunda elde edilmiştir.

Yukarıdaki şekillerden de görüldüğü gibi gliserol miktarı genel olarak 20. günden itibaren ölçülebilmekte ve besi ortamındaki anlamlı bir gliserol miktarına 40. günden itibaren ulaşılabilir. Ortalama olarak tüm besi ortamlarında en yüksek gliserol üretimi %20 NaCl'de olmuştur.

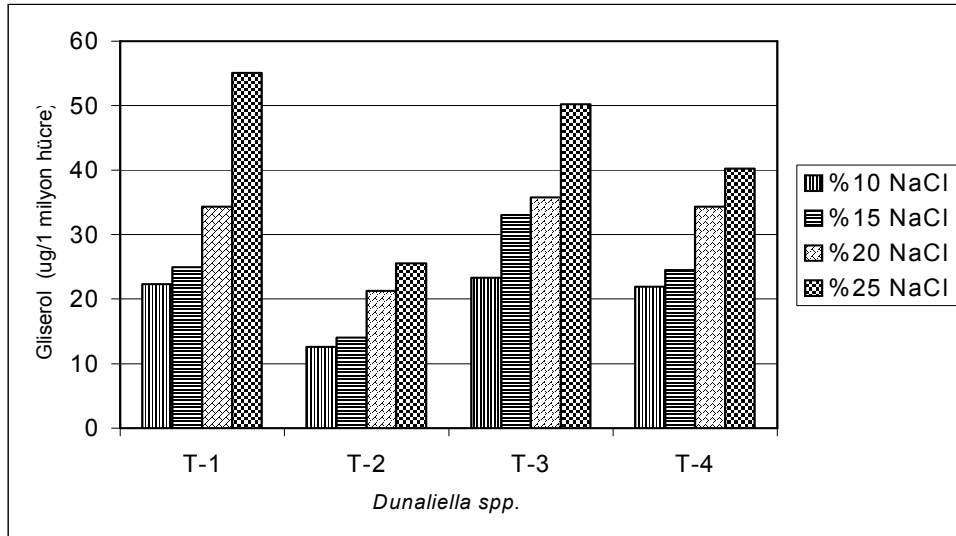
Tuz konsantrasyonunun etkisinin belirlendiği denemelerde, gliserol üretiminin tuz konsantrasyonu artışıyla doğru orantılı olarak arttığı ancak besi ortamı tuz doygunluğuna (%25 NaCl ve üzeri) yaklaşmaya başladığında hücre sayısındaki azalmayla birlikte besi ortamındaki gliserol miktarının da azaldığı belirlenmiştir. Hücre başına ( $10^6$  hücre) düşen gliserol oranının ise artan NaCl konsantrasyonu ile doğru orantılı bir şekilde arttığı saptanmıştır. Hücre başına en fazla gliserolü T-1 suşunun pH 6'da %25 NaCl konsantrasyonunda ( $55,08 \mu\text{g}/10^6$  hücre) ürettiği saptanmıştır. Bir mililitre besi ortamında ise en yüksek gliserol üretimini suş 4 pH 9'da ve %15 NaCl'de ( $375,48 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) sağlamıştır. Hücre içi gliserolün birikmesi bir osmoregülasyon mekanizmasının sonucu olduğu ve *Dunaliella* hücrelerinin ekstrem dış koşullarda (ozmotik basıncı yüksek olan ortamlar) hücrelerinde biriktirdiği gliserol ile hayatta kalabildiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda gliserolün diğer polihidroksi alkollere göre metabolik olayları en az inhibe ettiği bulunmuştur. Benzer çalışmalar Vijaikishore ve Karanth (1986), Ahmed ve Zidan (1987), Ben-Amotz (1987), Lustigman et al. (1987), Miyasoka ve Ikeda (1997), Chitlaru ve Pick (1990) tarafından yapılmış ve benzer sonuçlar bulunmuştur.

#### 4.2.3 Başlangıç inokülüm miktarının gelişime ve gliserol üretimine etkisi

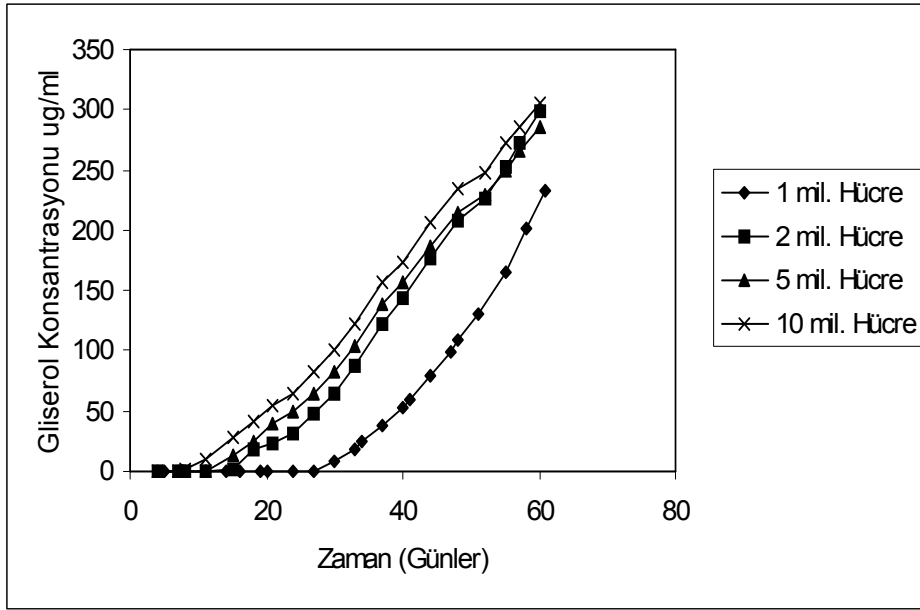
*Dunaliella* türlerinin gliserol üretimine pH ve NaCl konsantrasyonlarının etkisinin belirlendiği denemelerde, her suş için bulunan optimum pH değerlerinde besiyerinde NaCl konsantrasyonu arttıkça gliserol üretiminin arttığı, ancak alg gelişiminin azaldığı saptanmıştır (şekil 4.16. ve çizelge 4.3.). Artan hücre sayısının besiyerinde üretilen gliserol miktarlarını ne kadar yükselteceğini belirlemek amacıyla, hücre başına en yüksek gliserol üretiminin olduğu *Dunaliella* sp. T-1 suşu ile başlangıç inokülüm miktarı artırılarak denemeler yapılmıştır.

*Dunaliella* sp. T-1 suşu, şekil 4.16.'da görüldüğü gibi hücre başına en fazla gliserol üretimini pH 6'da %25 NaCl içeren besiyerinde ( $55,08 \mu\text{g}/10^6$  adet hücre) yapmıştır. Bu besiyerinde 60 günlük inkübasyon süresinin sonunda hücre sayısının ancak  $2,99 \times 10^6$  adet/ml olduğu belirlenmiştir. Aynı suşun en yüksek hücre sayısına ( $10,93 \times 10^6$  adet/ml) %20 NaCl konsantrasyonunda ulaştığı çizelge 4.2.'de görülmektedir.

Başlangıç inokülüm miktarı olarak 100 ml besiyerine 1 milyon, 2 milyon, 5 milyon ve 10 milyon *Dunaliella* sp. T-1 suşuna ait hücrelerin ekilmesiyle yapılan deneme sonuçları şekil 4.17.'de verilmiştir.



Şekil 4.16. Farklı NaCl konsantrasyonlarında *Dunaliella* suşlarının hücre başına gliserol üretimleri (Lüx:1000, sürekli flöresan ışık, pH 6, T: 20-22°C)



Şekil 4.17. Farklı başlangıç inokülüm miktarlarında *Dunaliella* suşlarının gliserol üretimleri (Lüx: 1000, sürekli flöresan ışık, pH 6, T:20-22 °C)

Denemelerde en yüksek hücre sayısı ve gliserol üretimine 10 milyon hücrede ulaşıldığı belirlenmiştir. Başlangıç hücre sayısının fazla olması lag periyodunu kısaltmıştır. Bir milyon hücre ile yapılan denemelerde 30 gün süren bu dönem, 2, 5 ve 10 milyon hücre ile yapılan denemelerde 10-15 gün sürmüştür. İnkübasyon süresi boyunca 10 milyon hücre ile yapılan denemelerde yüksek gelişme oranları elde edilse de 2 ve 5 milyon hücre ile yapılan denemelerde 10 milyon hücreye benzer veriler elde edilmiştir.

Başlangıç inokülüm miktarının inkübasyon süresi sonundaki gelişme parametrelerine ve gliserol üretimine olan etkisi çizelge 4.3.'de verilmiştir. İnokülüm miktarı arttıkça hücre sayısının ve buna paralel olarak da klorofil (a+b), kuru ağırlık ve yaş ağırlık miktarlarının da arttığı çizelgede görülmektedir. Denemelerde bir mililitre besiyerinden elde edilen gliserol miktarlarının da en fazla 271,98 µg'a yükseldiği, hücre başına üretilen gliserol miktarlarının ise önceki denemelerde olduğu gibi yaklaşık benzer oranlarda kaldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. *Dunaliella* sp. T-1 suşunun gelişme parametrelerine ve gliserol üretimine başlangıç inokülüm miktarının etkisi  
(Lüx: 1000, sürekli flöresan ışık, T:20-22 °C)

NaCl (%)	Suş	pH	İnokülüm Miktarı x 10 <sup>6</sup> hücre/100 ml besi ortamı	Hücre sayısı x10 <sup>6</sup> hücre/ml	Korofil (a+b) µg/ml	Kuru Ağırlık mg/ml	Yaş Ağırlık mg/ml	Gliserol µg/ml	Gliserol µg/10 <sup>6</sup> hücre
25	T-1	6	1	2,99	7,23	1,01	2,33	164,47	55,08
			2	4,91	11,91	1,57	3,72	253,38	51,55
			5	4,42	10,72	1,42	3,36	250,97	56,72
			10	4,98	12,07	1,59	3,77	271,98	54,58

*Dunaliella* sp. T-1 suşunun üretimine başlangıç inokülümü olarak 2 milyon hücre kullanımının gerek hücre sayısı gerekse gliserol miktarlarının artması nedeniyle uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

## 5. SONUÇ

Denemeler sonucunda, *Dunaliella* suşlarının Tuz Gölü gibi yüksek tuzluluk oranına sahip göl sularında üretilebileceği, çünkü bu gibi sularda ekstrem koşulların mevcudiyetinden kontaminasyon problemi yaşanmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca üretilecek *Dunaliella* biyomasının gliserol ile birlikte, geliştirilecek veya mevcut olan yöntemlerle  $\beta$ -karoten ve diğer yararlı moleküllerin de saflaştırılıp endüstriyel olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

*Dunaliella* hücrelerinin optimum koşullarda (özellikle pH'da) sayısal olarak çok fazla arttığı ve gliserolün de stres koşullarının artmasıyla doğru orantılı olarak arttığı bulunmuştur. Dolayısıyla, en yüksek gliserol veriminin, *Dunaliella* suşlarının öncelikle uygun başlangıç inokülüm miktarları ile optimum koşullarda çoğaltılıp daha sonra stres koşullarına maruz bırakarak elde edilebileceği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Ahmed A.M. and Zidan M.A. 1987. Glycerol Production by *Dunaliella bioculata*. J. Basic Microbiol. 27:419 – 425.
- Ben - Amotz A. 1987. Effects of Irradiance and Nutrient Deficiency on the Chemical Composition of *Dunaliella bardawil* Ben - Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta). J. Plant Physiol. 131:479 - 487.
- Becker E.W. 1994. Microalgae biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press.
- Bisping B. and Rehm H.J. 1986. Glycerol production by cells of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in sintered glass. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 174 - 179.
- Borowitzka A. Michael and Borowitzka J. Lesley. 1988. Micro-Algal Biotechnology. Cambridge University Press. pp. 27 - 58.
- Chitlaru E. and Pick U. 1991. Regulation of Glycerol Synthesis in Response to Osmotic Changes in *Dunaliella*. Plant Physiol. 96: 50 - 60.
- Çelekli A. 2002. Tuz Gölünden (Konya-Türkiye) İzole Edilen *Dunaliella* Türlerinin  $\beta$ -Karoten Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. pp. 47 - 48.
- Grizeau D. and Navaro J.M. 1986. Glycerol Production by *Dunaliella tertiolecta* Immobilized with Ca-Alginate Beads. Biotechnology Letters. 8: 261 - 264.
- Johnson M.K., Johnson E.J., McErloy R.D., Speer H.L. and Bruff B.S. 1968. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. J. Bact. 95: 1461 - 1468.
- Jimenes C. and Niell Xavier F. 1991. Influence of Temperature and Salinity on Carbon and Nitrogen Content in *Dunaliella viridis* Teodoresco Under Nitrogen Sufficiency. Biosource Technology. 38: 91 - 94.
- Lustigman B., McCormick J.M., Dale G. And McLaughlin J.J.A. 1987. Effect of Increasing Copper and Salinity on Glycerol Production by *Dunaliella salina*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 38: 359 - 362.
- Mathews, van Holde and Ahern. 2000. Biochemistry, Third Edition. Wesley Longman
- Miyosaka H. and Ikeda K. 1997. Osmoregulation mechanism of the halotolerant green alga *Chlamydomonas*, Strain HS-5. Plant Science. 127: 91 - 96.



- Petrovsa B., Winkelhausen E. and Kuzmanova S. 1999. Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress. *Can. J. Microbiol.* 45: 695 - 699.
- Porra R.J., Thompson W.A. and Kreidemann P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica and Biophysica Acta.* 975: 384 - 394.
- Ravji R.G. et al. 1988. Glycerol production by four common grape molds. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 77 - 82.
- Roy J. Sturgeon, Robert L. Deamler and Harry A. Harbison. 1979. Improved Method. Spectrophotometric Determination of Glycerol and Its Comparison with an Enzymatic Journal of Pharmaceutical Sciences. 68: 1064 - 1066.
- Thakur A. and Kumar H. D. 1997. Effects of pH, light quality and various carbon sources on glycerol production by the brackish water alga *Dunaliella salina*. *Cytobios.* 90: 95 - 102.
- Thakur A. and Kumar H. D. 1999. Effects of different nitrogen sources on growth and glycerol production by *Dunaliella salina*. *Cytobios.* 97: 79 - 86.
- Thakur A. and Kumar H. D. 1999. Use of Natural Polymers as Immobilizing Agents and Effects on the Growth of *Dunaliella salina* and its Glycerol Production. *Acta Biotechnol.* 19: 37 - 44.
- Thakur A. et al. 2000. Effect of pH and inorganic carbon concentration on growth, glycerol production, photosynthesis and dark respiration of *Dunaliella salina*. *Cytobios.* 102: 69 - 74.
- Vijaikishore P. and Karanth N.G. 1986. Glycerol Production by Immobilised Cells of *Pichia farinosa*. *Biotechnology Letters.* 8: 257 - 260.
- Vijaikishore P. and Karanth N.G. 1986. Glycerol Production By Fermentation. *Process Biochemistry.* pp. 54 - 57.
- Zohri A.A. 2000. Glycerol Production From Cheese Whey by Selected Fungal Cultures. *J. Food Sci. Technol.* 35: 533 - 538.

## ÖZGEÇMİŞ

Prizren’de (Kosova-Yugoslavya) 1977 yılında doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini Prizrende tamamladı. 1996 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Bölümü’nden 2000 yılında mezun oldu. Ekim 2000 – Temmuz 2003 yılları arasında Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Biyoteknoloji üzerine Yüksek Lisans öğretimini tamamladı. Ağustos 2000 – Şubat 2003 yılları arasında özel bir medikal şirkette ürün müdürü olarak çalıştı. Şubat 2003’ten bu yana immünoagnostik kitlerini üreten başka bir medikal şirkette üretim müdürü olarak görev yapmaktadır.