

IŞIK, SICAKLIK, BESİN EKSİKLİĞİ VE HAVALANDIRMANIN *Haematococcus pluvialis* FLOTOW'DA BÜYÜME VE ASTAKSANTİN MİKTARINA ETKİSİ

Müzeyyen Köksal, Oya Işık, Leyla Uslu*, Yasemin Mutlu

Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Adana

Özet:

Laboratuvar koşullarında kültüre alınan yeşil alg *Haematococcus pluvialis* vejetatif büyümesine ve kiste dönüşümüne, ışık, sıcaklık ve havalandırma etkisini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada 27 ve 48 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma ve % 2- 10 aşılama miktarlarının vejetatif gelişmeye önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Kist oluşumunun sağlanması için 177 ve 379 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma sağlanmış ve aynı zamanda besi ortamında azot eksilmesi yapılmıştır. Düşük hücre yoğunluğunda 27 ve 48 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddetleri büyümenin 11. gününde astaksantin birikimine neden olurken, yüksek hücre yoğunluğu ve azot eksik ortamda 177 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinin kist oluşumu için yeterli olmadığı saptanmıştır. En yüksek astaksantin miktarı %3.605 ile 379 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddetinde, 24 °C sıcaklıkta ve havalandırma uygulanan kültürlerde saptanmıştır. Çalışmada 35°C sıcaklığın ve 177 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanmanın hücrelerde ölüme sebep olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Haematococcus pluvialis*, Işık, Sıcaklık, Azot eksikliği, Astaksantin

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi BAP Birimi tarafından desteklenmiş ve Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

* Correspondence to: Leyla USLU, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Balcalı Kampüsü 01330 Adana -TÜRKİYE

Tel: (+90 322) 338 60 84/2065 Fax: (+90 322) 338 64 39

E-mail: hizarcil@cu.edu.tr

Abstract: The Effects of the Light, Temperature, Nutrient Deficiency and Aeration on the Growth and Astaxanthin Quantity of *Haematococcus pluvialis* Flotow

In the study carried out to determine the effects of light intensity, temperature, nitrogen deficiency and aeration on the vegetative growth and form of the cysts of the green alga *Haematococcus pluvialis* in the laboratory conditions, vegetative growth of the cultures were found similar at the light intensities of 27 and 48 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and % 2-10 inoculation amounts. *H. pluvialis* cultures were exposed to the 177 and 379 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensities and N-deficient condition to form cyst and accumulate astaxanthin. While 27 and 48 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensities caused the accumulation of astaxanthin at the low cell concentrations, 177 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ irradiance was insufficient to turn red the cells in the nitrogen-deficient medium and high cell densities. The highest astaxanthin content of % 3.605 was obtained from the cultures aerated, at the irradiance of 379 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and 24°C. In the study, it was observed that 35°C temperature and 177 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ irradiance caused the death of the cells.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, Light, Temperature, Nitrogen deficiency, Astaxanthin

Giriş

Sucul organizmaların ülkemizde besin olarak tüketilmesi bilinci giderek artmaktadır. Hücre içinde biriktirdikleri protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitamin, mineral pigmentler ve daha pek çok önemli ürün nedeniyle, insanlar tarafından başlıca, besin desteği olarak kullanılmaktadır. Besin olarak kullanımı ile birlikte mikroalglerden elde edilen metabolitler mikrobiyal teknolojinin birincil çalışma alanını oluşturmaktadır. Bu metabolitler, farmasötik ve nutrasötik olarak sağlıklı ürünler ve kozmetik alanında pazar bulmaktadır.

Karotenoid pigmentlerinden olan beta-karoten ve astaksantin kullanım amaçları benzer olsa da astaksantin daha üstün özelliklere sahiptir. Astaksantin kullanım alanlarını akuakültür çalışmalarında başta salmon ve alabalık olmak üzere çipura, mercan, karides ve kerevit gibi ekonomik değere sahip türlerin ve akvaryum balıklarının renklendirilmesinde, kümes hayvanları endüstrisinde yumurta sarılarının renklendirilmesinde, antioksidan etkisi sebebiyle insan sağlığında kullanımı (Gökpinar ve ark., 2006) şeklinde sıralamak mümkündür.

Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae), yüksek ışık, tuzluluk ilavesi, azot ve fosforun ortamdan çekilmesi gibi stres koşulları altında hücre içinde biriktirdiği astaksantin pigmenti ile mikroalgal biyoteknolojide son zamanlarda çok önemli bir konuma gelmiştir. Son yıllarda tüketicilerin bilinçlenmesi ve organik ürünlere olan talebin artması, daha pahalı ama doğal olan *Haematococcus* üretimini desteklemektedir (Trujman ve ark., 1997).

H. pluvialis ekonomik değere sahip olan mikroalglerden birisidir. Astaksantin, bıldırcın ve tavukların yumurta sarılarını renklendirmede ve sucul üretimde salmonidler ve karides yemlerinde besin destekleyicisi olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında astaksantin insanlar tarafından doğal destek gıda olarak ve kanser hastalarında (Mayne, 1996), deri hastalıklarında ve kalp rahatsızlığı gibi hastalıklarda kullanılmıştır (Querin ve ark., 2003). Astaksantince zengin mikroalgin kullanıldığı farelerle yapılan denemelerde başarılı olunmuş ve insanlardaki *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda uygulanmak üzere yeni bir tedavi stratejisi olarak önerilmiştir (Wang ve ark., 2003). Son yıllarda *H. pluvialis*'deki astaksantin pigmentinden insan sağlığında faydalanılması konusuna ilgi artmıştır (Querin ve ark., 2003).

H. pluvialis (Chlorophyceae), yüksek ışık, tuzluluk ilavesi, azot ve fosforun ortamdan çekilmesi gibi stres koşulları altında hücre içinde biriktirdiği astaksantin pigmenti ile mikroalgal biyoteknolojide son zamanlarda çok önemli bir konuma gelmiştir (Trujman, 1997). Bu amaç doğrultusunda bu çalışmada vejetatif evrede en uygun büyüme koşullarının belirlenmesi ve farklı sıcaklık, aydınlanma şiddeti ve besin eksikliği (azot eksikliği) faktörlerinin *H. pluvialis* hücrelerinde astaksantin birikimine olan etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılacak olan yeşil mikroalg *Haematococcus pluvialis* 34/12 saf kültürü İngiltere'den, CCAP (Kültür Koleksiyon Alg ve Protozoa) kültür koleksiyon merkezinden getir-

tilmiştir. Türün adaptasyonu algal biyoteknoloji laboratuvarında sağlanmış ve küçük hacimlerde kültüre alınarak daha büyük hacimlere çoğaltılmıştır. *H. pluvialis* tek hücreli, çift kamçılı, hücre büyüklükleri yaklaşık olarak 8-50 µm çapında, armutsu yapıya sahip bir tatlı su algidir. Bir çekirdek ve iki eşit uzunlukta kamçıya sahiptir (Boussiba, 1999). *H. pluvialis*'in 34/12 kültüründe, 3N-BBM (Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen) besi ortamı kullanılmıştır. Besin eksikliği çalışmasında besi ortamında bulunan tüm azot kaynakları ortamdaki çekilmiştir. Optimum koşulları oluşturmak için oda sıcaklığı iklimlendirme cihazıyla 23±2 °C'ye ayarlanmış ve kültürler 27 µmol photon m⁻²s⁻¹ ışık şiddetinde sürekli aydınlanmanın sağlandığı laboratuvar koşullarında tutulmuştur.

H. pluvialis ile vejetatif büyüme ve astaksantin birikiminin sağlandığı kistik evre denemeleri 4 aşamada yürütülmüştür.

1. Aşamada aydınlanma şiddeti (27 ve 48 µmol photon m⁻²s⁻¹) ve aşılama miktarının (%2 ve %10) *H. pluvialis*'in vejetatif gelişimine olan etkisi araştırılmıştır.
2. Aşamada, vejetatif gelişim ve vejetatif evrenin tamamlanmasının ardından kist oluşumunu sağlamak amacıyla stres oluşturmak üzere yüksek ışık yoğunluğu (177 µmol photon m⁻²s⁻¹) ve besin eksikliği (azot eksikliği) faktörleri denenmiştir.
3. Aşamada vejetatif *H. pluvialis* hücrelerinin kiste dönüşümü ve astaksantin üretimine azotsuz besi ortamı, yüksek ışık yoğunluğu (379 µmol photon m⁻²s⁻¹) ve havalandırmanın etkisi araştırılmıştır.
4. Aşamada ise, vejetatif evrede büyüme verimliliği belirlenmiş kültürlerde yüksek sıcaklık (35 °C) ve yüksek ışık yoğunluğunun (379 µmol photon m⁻²s⁻¹) kist oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır.

Denemeler süresince astaksantin (Boussiba ve ark., 1992), klorofil *a* (Parsons ve Strickland, 1963) ve biyomas miktarı (Vonshak, 1997) ile optik yoğunluk (OD 680nm; Kang ve ark., 2005) değerleri belirlenmiştir. Denemede uygulanan muamelelerden elde edilen verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ONE-WAY ANOVA) ve bu analizin sonucuna bağlı olarak farklılık oluşması durumunda farklılığı saptamak amacıyla Duncan çoklu karşılaştırma testi SPSSX

14.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır (Zar, 1999).

Bulgular ve Tartışma

H. pluvialis Flotow'da büyüme ve astaksantin miktarına olan etkisini belirlemek amacıyla dört farklı deneme uygulanmıştır.

Deneme (1)

Bu denemede iki farklı ışık yoğunluğu (27 ve 48 µmol photon m⁻²s⁻¹) ve iki farklı aşılama miktarının (% 2- 10) vejetatif büyümeye olan etkisi araştırılmıştır. % 2 aşılamanın yapıldığı denemede 27 ve 48 µmol photon m⁻²s⁻¹ ışık şiddetlerinde başlangıç optik yoğunluk değerleri 0.05±0.02 ve 0.05±0.02 olarak bulunurken, denemenin sonunda 0.11±0.02 ve 0.10±0.02 olarak bulunmuştur. Aşılama düzeyinin % 2 olduğu kültürlerde 27 ve 48 µmol photon m⁻²s⁻¹ ışık yoğunluklarının büyümeye olan etkisini belirlemek üzere en yüksek optik yoğunluk değerleri karşılaştırıldığında, aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur (p>0.05).

%10 aşılamanın yapıldığı denemede 27 ve 48 µmol photon m⁻²s⁻¹ ışık şiddetlerinde başlangıç optik yoğunluk değerleri 0.10±0.01 ve 0.09±0.01 olarak bulunurken denemenin sonunda 0.13±0.01 ve 0.12±0.01 olarak bulunmuştur. Aşılama düzeyinin % 10 olduğu kültürlerde 27 ve 48 µmol photon m⁻²s⁻¹ ışık yoğunluklarının büyümeye olan etkisini belirlemek üzere en yüksek optik yoğunluk değerleri karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur (p>0.05). Denemenin 11. gününde yeşil renkli kültürlerde kistleşmenin başladığı, vejetatif safhanın sonlandığı ve turuncu rengin oluştuğu gözlenmiştir. Yürütülen bu deneme koşullarında, 11 gün süren vejetatif büyümeden sonra 27 µmol photon m⁻²s⁻¹ ve 48 µmol photon m⁻²s⁻¹ aydınlanma ile kist oluşumunun sağlandığı belirlenmiştir.

Deneme (2)

İkinci denemede yüksek aşılama yoğunluğu (% 25) ve 0.25 optik yoğunluk ile kültüre başlanmış ve vejetatif safhada yüksek yeşil hücre yoğunluğu elde edilmiştir. Biyomas miktarı ilk gün 0.07 gL⁻¹ iken denemenin sonunda bu değer 0.21 gL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Vejetatif evre boyunca klorofil *a* değerlerinde artışlar gözlenmiş; 826.5'den 2425.6 µg⁻¹ye yükselmiştir. Vejetatif evrenin tamamlanmasının ardından kültürlerde yüksek ışık şiddeti (177 µmol m⁻²s⁻¹) ve besin eksikliği faktörleri uygulanarak stres oluşturulmuştur. Bu aşamada klorofil *a* değerlerinde

azalmalar belirlenirken astaksantin miktarında ise artışlar belirlenmiştir. Yüksek ışık şiddeti ve azot yokluğunda % 1.481 astaksantin bulunmuştur. Vejetatif evre sonunda hücre yoğunluğunun fazla olması ve uygulanan ışık şiddetinin ($177 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) astaksantin üretimi için yetersiz olmasından dolayı hücreler kistleşme evresini uzun sürede (19 gün) tamamlamıştır. Aynı zamanda bu denemede kültürlerde havalandırma uygulanmaması nedeniyle ortamda hücre dağı-

lımı homojen olmamış ve buna bağlı olarak da hücrelerde kist oluşumu ve astaksantin birikimi zayıf olmuştur.

%25 aşılama ve $27 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda vejetatif evrede belirlenen optik yoğunluk, biyomas ve klorofil *a* değerleri Tablo 1'de ve $177 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda kistik evrede belirlenen klorofil *a* ve astaksantin değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. %25 aşılama ve $27 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda vejetatif evrede belirlenen optik yoğunluk, biyomas ve klorofil *a* değerleri

Table 1. Optical density, biomass and chlorophyll *a* values determined in the vegetative stage under the conditions of 25% of inoculation and $27 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensity

Vejetatif evre	
OD ₆₈₀ ilk gün	0.25±0.009
OD ₆₈₀ son gün	0.42±0.09
Biyomas(g L^{-1}) _{ilk gün}	0.07±0.008
Biyomas(g L^{-1}) _{son gün}	0.21±0.01
Klorofil <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$) _{ilk gün}	826.5±22
Klorofil <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$) _{son gün}	2425.6±69

Tablo 2. $177 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu ve azot eksikliğinde kistik evrede belirlenen klorofil *a* ve astaksantin değerleri

Table 2. Astaxanthin and chlorophyll *a* values determined in the cystic stage under the conditions of $177 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and nitrogen deficiency

Kistik evre	
Klorofil <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$) _{ilk gün}	1852.28±67
Klorofil <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$) _{son gün}	40.55±2
Astaksantin (%) _{ilk gün}	0.545±0.04
Astaksantin (%) _{son gün}	1.481±0.2

Deneme (3)

Bu aşamada azotsuz besi ortamı, yüksek ışık yoğunluğu ($379 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ile havalandırmanın ve havalandırma uygulanmayan vejetatif yeşil hücrelerin kiste dönüşümleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Deneme sonunda her 2 gruptaki en yüksek astaksantin miktarı havalandırma uygulanan grupta $379 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık altında % 3.605 bulunurken, ilk gün belirlenen astaksantin miktarı ise % 0.350 olarak bulunmuştur. Havalandırma uygulanmayan grupta ise $379 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık altında en yüksek astaksantin miktarı % 1.515 bulunurken; ilk gün belirlenen astaksantin miktarı ise % 0.285 olarak bulunmuştur. Yürütülen bu denemede $379 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda havalandırma uygulanan ve havalandırma uygulanmayan kültürlerde astaksantin miktarları arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

$379 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunun ve havalandırmanın etkisinin biyomas, klorofil *a* ve astaksantin değerleri üzerine etkisi Tablo 3'de verilmiştir.

Denemenin kistik evresinde $379 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu altında havalandırma uygulanan balonlardaki kültürlerden elde edilen astaksantin miktarı, havalandırma uygulanmayan balonlardaki kültürlerden yaklaşık 2.5 kat daha fazla bulunmuştur. Bu denemeden, kistik evrede havalandırma uygulayarak kültürde homojen karışım sağlamanın, ışık geçirgenliğini arttırarak daha kısa zamanda hücrelerde stres yarattığı ve daha fazla astaksantin miktarı elde edilebileceği belirlenmiştir.

Tablo 3. $379 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunun ve havalandırmanın biyomas, klorofil *a* ve astaksantin değerlerine etkisi

Table 3. The effects of $379 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensity and aeration on the biomass, chlorophyll *a* and astaxanthin values

	Havalandırma uygulanan grup	Havalandırma uygulanmayan grup
Biyomas(gL^{-1}) _{ilk gün}	0.032±0.001 ^a	0.035±0.001 ^a
Biyomas(gL^{-1}) _{son gün}	0.175±0.001 ^a	0.1075±0.002 ^b
Klorofil <i>a</i> (μgL^{-1}) _{ilk gün}	1242.6±43 ^a	1345.3±18 ^a
Klorofil <i>a</i> (μgL^{-1}) _{son gün}	64.8±8 ^a	56.6±2 ^b
Astaksantin (%) _{ilk gün}	0.350±0.1 ^a	0.285±0.02 ^a
Astaksantin (%) _{en yüksek}	3.605±0.1 ^a	1.515±0.06 ^b

*Aynı satırda farklı harflerle ifade edilenler arasında $p < 0.05$ önem düzeyinde önemli bir fark vardır.

Deneme (4)

H. pluvialis mikroalginin vejetatif evredeki gelişiminde 27 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanmış ve kistik safhada yüksek sıcaklık (35°C) ile yüksek ışığın (177 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) etkisi araştırılmıştır. Astaksantin miktarını artırmak için oluşturulan stres koşulları altında, kistik safhanın ikinci gününde yüksek sıcaklıktan (35°C) dolayı yeşil hücre kültürlerinin kırmızı kistik hücrelere dönüşmeden beyazlaşarak öldüğü gözlemlenmiştir. Yeşil alg *H. pluvialis*'i kistletmek için, uygulanan yüksek sıcaklık değeri 35°C'nin uygun olmadığı belirlenmiştir.

Yeşil alglerden *H. pluvialis* (Chlorophyceae), uygun olmayan ortam koşullarında (yüksek ışık şiddeti, sıcaklık ve pH değerlerindeki dalgalanmalar, ortamda besin miktarının azalması vb.) biriktirdiği sekonder karotenoid astaksantin nedeniyle biyoteknolojik olarak öneme sahip bir türdür (Boussiba, 2000; Masojidek ve ark., 2000).Astaksantin pigmenti elde etmek için *H. pluvialis* kültürünün iki aşamalı bir üretim periyodu geçirmesi gerekmektedir. İlk aşama, vejetatif, kamçılı, yeşil hücrelerin çoğalmasını sağlayacak, optimum büyüme koşullarında büyümenin gerçekleştirildiği evredir. İkinci aşama, kültürde logaritmik evrenin tamamlandığı ve en yüksek biyomasın elde edildiği zamanda oluşturulan stres koşullarıyla hücrelerin astaksantin biriktirerek kist oluşumunun sağlandığı evredir. Bu tez çalışmasında her iki aşamanın da gerçekleştirildiği dört farklı deneme yürütülmüştür. Vejetatif evrede en uygun büyüme koşullarının belirlenmesi yanında farklı sıcaklık, aydınlanma şiddeti ve besin eksikliği (azot eksikliği) faktörlerinin *H. pluvialis* hücrelerinde astaksantin birikimine olan etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Yürütülen birinci denemede laboratuvar koşullarında sabit sıcaklıkta, 27 ve 48 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddeti ve % 2-10 aşılama yoğunluklarının vejetatif büyümeye önemli etkisi olmadığı belirlenmiş ve büyüme değerleri benzer bulunmuştur. Denemenin 11. günü vejetatif evre sonlanmış ve yeşil renkli kültürlerin kistleşmeye başlayarak turuncu renge dönüştüğü gözlemlenmiştir. Onbir gün süren vejetatif evrede muhtemelen başlangıç hücre yoğunluğunun düşük olması sebebiyle kültürlerde logaritmik evredeki büyüme yetersiz kalmış ve mevcut ışık şiddetleri stres oluşturarak kist oluşumuna neden olmuştur. Aşı miktarındaki azlık sebebiyle ışık geçirgenliği yüksek olan kültürlerde istenen biyomas artışı

sağlanamadığından hücreler kiste dönüşmüştür. Aydınlanma şiddetinin etkileri ile ilgili pek çok araştırma yapılmış ve 200 ile 800 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ değerleri arasında çalışılmıştır (Cifuentes ve ark., 2003; Kang ve ark., 2007; Ceron ve ark., 2006). Bu çalışmadaki aydınlanma değerleri kist oluşumu için yetersiz görülmeyle birlikte; hücre yoğunluğunun düşük olması hücrelerin kist oluşturmaya neden olmuştur.

İkinci denemede yüksek aşılama yoğunluğu (% 25) ve 0.25 optik yoğunluk ile kültüre başlanmış ve vejetatif safhada yüksek yeşil hücre yoğunluğu (OD=0.44±0.04) elde edilmiştir. Bu denemede 177 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlık şiddeti ve azot yokluğunda % 1.481 astaksantin bulunmuştur. Vejetatif evre sonunda hücre yoğunluğunun fazla olması ve uygulanan ışık şiddetinin (177 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) astaksantin üretimi için yetersiz olmasından dolayı hücreler kistleşme evresini uzun sürede tamamlamıştır. Aynı zamanda bu denemede kültürlerde havalandırma uygulanmaması nedeniyle ortamda hücre dağılımı homojen olmamış ve buna bağlı olarak da hücrelerde kist oluşumu ve astaksantin birikimi zayıf olmuştur. Yürütülen bir çalışmada *H. pluvialis*'in vejetatif kültürlerinde optimum ışık şiddeti aralığı ve büyüme performansının saptanması için 50, 100, 200, 400 ve 600 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'lik 5 farklı ışık şiddeti uygulanmıştır. Deneme gruplarında biyomas ve toplam karoten miktarları artan ışık şiddetleri ile doğru orantılı olarak artarken, toplam klorofil *a* miktarı 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'lik aydınlatmaya kadar artmıştır ve daha yüksek aydınlatma şiddetlerinde herhangi bir değişim görülmemiştir. Sonuç olarak 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'lik ışık şiddeti üzerindeki aydınlatmalarda astaksantin birikiminin tetiklendiği görülmüştür. Beş farklı ışık şiddetinin uygulandığı denemede hücrelerin vejetatif evrede kültüre edilebilmesi için optimum ışık şiddeti aralığı 50-200 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ olarak bulunmuş ve en iyi büyüme 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'lik ışık şiddetinde gerçekleşmiştir (Göksan ve Gökpınar 2005). Bu çalışmada yüksek aşı miktarı ve 48 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde bir önceki denemeye göre daha iyi bir büyüme gerçekleşmiş ancak 177 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinin kist oluşumu için yeterli olmadığı görülmüştür. Bu aşamada ışık düzeyinin yetersizliği yanında kültürde havalandırma yapılmadığından hücrelerin homojen olarak dağılmaması ve ışığın yeterli nüfuz edememesi nedeniyle kist oluşumunun uzun sürdüğü değerlendirilmiştir.

Yürütülen diğer denemede vejetatif evredeki kültürlerin gelişimine bakılmaksızın kiste dönüşüm koşulları araştırılmıştır. Bu aşamada vejetatif evrenin tamamlandığı kültürlerde kist oluşumunu sağlamak amacıyla azotsuz besi ortamı, yüksek ışık yoğunluğu ($379 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve havalandırmanın etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak daha yüksek ışık ($379 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve kültürlerde havalandırmanın astaksantin birikimine teşvik ettiği belirlenmiştir (% 3.605).

Havalandırmanın kültürlerde astaksantin birikimine olan etkisini belirlemek üzere yürütülen üçüncü denemede, azot eksikliği, $379 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve havalandırma uygulanmayan kültürlerde astaksantin % 0.891 bulunurken, havalandırma uygulanan kültürlerde ise % 2.190 olarak saptanmıştır. En yüksek astaksantin miktarı havalandırma uygulanan kültürlerde ortalama % 3.605 olarak bulunmuştur. Yüksek ışık yoğunluğu ve havalandırmanın astaksantin birikimine olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda ışık yoğunluğunun kist oluşumuna etkisinin kültür yoğunluğu ile yakın ilişkili olduğu saptanmıştır. Yapılan bir çalışmayla karşılaştırıldığında *Haematococcus* yeşil hücreleri BG-11 ortamında $100 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık uygulamasında astaksantin birikimine teşvik edilememiştir. Fosfat veya azot eksikliğinde $200 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ile strese maruz bırakıldığında kuru ağırlığında % 4'ün üzerinde astaksantin biriktirmiştir. Astaksantin birikimi azot azlığı altında daha hızlı gerçekleştiği bildirilmiştir (Boussiba ve ark., 1999).

Yapılan bir çalışmada *H. pluvialis* büyüme ve astaksantin üretiminde ışık yoğunluğu, havalandırma ve besleyici elementler gibi çevresel faktörlerin etkisi araştırılmıştır. *H. pluvialis*'in en iyi büyümesi BBM kültür ortamında, 28°C 'de, sürekli beyaz floresan ışık ($177 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) aydınlatması altında ve sürekli havalandırma ile (1.5 v.v.m) 3.5×10^5 hücre ml^{-1} bulunmuştur. En yüksek astaksantin üretimi ise BAR kültür ortamında sürekli aydınlatma ($345 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$), sodyum asetat ilavesi ve havalandırma ile 98 mg g^{-1} biyomas elde edilmiştir (Dominguez ve ark, 2003).

Aflalo ve ark. (2007) stres koşulları altında değerli kırmızı karotenoid üreten *H. pluvialis*'in ticari üretimi için iki aşama olduğunu belirtmişlerdir. İlk bölümünde biyomasın üretimi (yeşil evre) ve ikinci bölümünde pigment (sürekli stres, kırmızı evre) oluşumudur. Laboratuvar koşullarında daha zengin astaksantin üretimi (kuru bi-

yomasın % 4'ü) ile $11.5 \text{ mgL}^{-1} \text{ gün}^{-1}$ astaksantin üretimi elde edilmiştir.

Bu çalışmada $177 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddeti ve azot eksikliği uygulanan kültürlerde kistik evrenin başlangıcında ölçülen astaksantin miktarı düşük bulunurken klorofil *a* değerleri yüksek bulunmuştur. Denemenin sonunda ise strese giren kültürlerde astaksantin miktarı artarken klorofil *a* değerlerinde büyük bir düşüş gözlemlenmiştir. Kistik evrede kültürlerde oluşan stres sonucunda astaksantin pigmentinin artışı ile beraber klorofil *a* değerlerinin düştüğü belirlenmiştir. Yürütülen bir çalışmada güneş ışığı altında azot bakımından sınırlı kültürlerde astaksantin birikiminin teşviki ile birlikte klorofil molekülerinin yıkıma uğradığı rapor edilmiştir (Boussiba, 2000).

H. pluvialis mikroalginin vejetatif evredeki gelişiminde $27 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanmış ve kistik safhada yüksek sıcaklık (35°C) ile yüksek ışığın ($177 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) etkisi araştırılmıştır. Astaksantin miktarını artırmak için oluşturulan stres koşulları altında, kistik safhanın ikinci gününde yüksek sıcaklıktan (35°C) dolayı yeşil hücre kültürlerinin kırmızı kistik hücrelere dönüşmeden beyazlaşarak öldüğü gözlemlenmiştir. Yeşil alg *H. pluvialis*'i kistletirmek için, uygulanan yüksek sıcaklık değeri 35°C 'nin uygun olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç

Ticari öneme sahip kırmızı pigment astaksantin içeriği ile bilinen *H. pluvialis* kültürlerinde stres faktörlerinden yüksek ışık, yüksek sıcaklık ve besin eksikliği değerlerinin büyüme ve astaksantin miktarına olan etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, çevre koşullarından yüksek ışık şiddeti, azot eksikliği ve havalandırmanın *H. pluvialis* türündeki astaksantin pigmenti miktarına etkisi olduğu sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

Aflalo, C., Meshulam, Y., Zarka, A., Boussiba, S., (2007). On the Relative Efficiency of Two vs. One Stage Production of Astaxanthin by the Green Alga *Haematococcus pluvialis*, *Biotechnology Bioengineering*, **98**: 300-305.

doi: [10.1002/bit.21391](https://doi.org/10.1002/bit.21391)

Boussiba, S.L., Fan, Vonshak, A., (1992). Enhancement and Determination Astaxanthin

- Accumulation in Green Alga *Haematococcus pluvialis*, *Methods in Enzymology*, **213**: 386-391.
doi: [10.1016/0076-6879\(92\)13140-S](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)13140-S)
- Boussiba, S., Wang, B., Yuan, J.P., Zarka, A., Chen, F., (1999). Changes in Pigments Profile in the Green Alga *Haematococcus pluvialis* Exposed to Environmental Stresses, *Biotechnology Letters*, **21**: 601-604.
doi: [10.1023/A:1005507514694](https://doi.org/10.1023/A:1005507514694)
- Boussiba, S., (2000). Carotenogenesis in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular Physiology and Stress Response, *Physiologia Plantarum*, **108**(2): 111-117.
doi: [10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x](https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x)
- Ceron, M.C., Garcia-Malea, M.C., Rivas, J., Acien, F.G., Fernandez, J.M., Del Rio, E., Guerrero, M.G., Molina, E., (2006). Antioxidant Activity of *Haematococcus pluvialis* Cells Grown in Culture as a Function of Their Carotenoid and Fatty Acid Content, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**(5): 1112-1119.
doi: [10.1007/s00253-006-0743-5](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0743-5)
- Cifuentes, A.S., González, M.A., Vargas, S., Hoeneisen, M., González, N., (2003). Optimization of Biomass, Total Carotenoids and Astaxanthin Production in *Haematococcus pluvialis* Flotow Strain Steptoe (Nevada, USA) Under Laboratory, *Biological Research*, **36**(3-4): 343,357. DOI: [10.4067/S0716-97602003000300006](https://doi.org/10.4067/S0716-97602003000300006)
- Dominguez-Bocanegra, A.R., Guerrero Lagarreta, I., Martinez Jeronimo, F. and Tomasini Compocoso, F. (2004). Influence of Environmental and Nutritional Factors in the Production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, *Bioresource Technology*, **92**: 209-214.
doi: [10.1016/j.biortech.2003.04.001](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.04.001)
- Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., (2006). Algal antioksidanlar, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, **23**(1-1): 85-89.
- Göksan, T., Gökpinar, Ş., (2005). *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae)'un Farklı Işık Şiddetlerinde Vejetatif Büyüme Özellikleri, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, **22**(1-2): 21-24.
- Kang, C.D., Lee, J.S., Park, T.H., Sim, S.J., (2005). Comparison of Heterotrophic and Photoautotrophic Induction on Astaxanthin Production by *Haematococcus pluvialis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**: 237-241.
doi: [10.1007/s00253-005-1889-2](https://doi.org/10.1007/s00253-005-1889-2)
- Kang, C.D., Lee, J.S., Park, T.H., Sim, S.J., (2007). Complementary Limiting Factors of Astaxanthin Synthesis During Photoautotrophic Induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N and Light Intensity, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**(5): 987-994.
doi: [10.1007/s00253-006-0759-x](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0759-x)
- Masojidek, J., Torzillo, G., Kopecky, J., Koblizek, M., Nidiaci, L., Komenda, J., Lukavska, A., Sacchi, A., (2000). Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress, *Journal Applied Phycology*, **12**: 417-426.
doi: [10.1023/A:1008165900780](https://doi.org/10.1023/A:1008165900780)
- Mayne, S.T., (1996). β - Carotene, Carotenoids and Disease Prevention in Humans, *Faseb Journal*, **10**: 690- 701.
- Parsons, T.R., Strickland, J.D.H., (1963). Discussion of Spectrophotometric Determination of Marine Plant Pigments, with Revised Equations for Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids. *Journal of Marine Research*, **21**(3): 115-163.
- Querin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M., (2003). *Haematococcus* astaxantin: Applications for Human Health and Nutrition, *Trends Biotechnology*, **21**: 210-216.
doi: [10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7)
- Trujman, S.A., Wamer, W.G., Rong Rong Wei, Albert, R.H., (1997). Rapid Liquid Chromatographic Method to Distinguish Wild Salmon from Aquacultured Salmon Fed Synthetic Astaxanthin, *Journal of AOAC International*, **80**(3): 622-632.

- Wang, B., Zarka, A., Trest, A., Boussiba S., (2003). Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an Active Photoprotective Process Under High Irradiance, *Journal of Phycology*, **39**: 1116-1124.
doi:[10.1111/j.0022-3646.2003.03-043.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.03-043.x)
- Vonshak, A., (1997). Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*): The Basic Concept, In: L. Tomoselli (Ed), *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) *Physiology, Cell Biology and Biotechnology*, Taylor&Francis Ltd., 1-15. Great Britain.
- Zar, J.H.,(1999). *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River. Prentice Hall, New Jersey. 4th Edition. Cap 12, 231-272.