

Su Ürünleri Dergisi J.Fish.Aquat.Sci.	Cilt No.18/1 Vol.18/1	Özel Sayı Suppl.	79 - 86 79 - 86	İzmir - Bornova 2001 İzmir - Bornova 2001
--	--------------------------	---------------------	--------------------	--

Bir *Dunaliella* Türünün Gelişimine ve β -karoten Üretimine pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi

Abuzer Çelekli

Gönül Dönmez

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06100, Beşevler, Ankara, Türkiye.

Abstract : *Effect of pH and Salt Concentrations on Growth and β -carotene Accumulation by *Dunaliella* sp.* The growth and β -carotene accumulation of *Dunaliella* sp. which was isolated from Lake Tuz (Konya-Turkey) was studied in batch culture under different pH values and varying concentrations of NaCl (10, 15 and 20 %) in Johnson Medium. These changes have a significant effect on cell count and β -carotene accumulation. A comparison of its growth in four different pH values ranging from 6 to 9 revealed a higher growth at pH 9. In all of the tested NaCl concentrations, maximum cell numbers of $1.2-4.4 \times 10^6$ ml⁻¹ were reached at this pH value. The strain grows optimally at 15 % NaCl concentration. The cellular β -carotene content increased in parallel with increasing salt concentrations. At high salt concentrations, the maximum amount of β -carotene (5,381 μ g per cell) was accumulated.

Key Words : *Dunaliella* sp., halophile, β -carotene, Lake Tuz.

Özet : Tuz Gölü'nden (Konya-Türkiye) izole edilen bir *Dunaliella* türünün gelişimi ve β -karoten üretimine farklı pH ve tuz konsantrasyonlarının (% 10, 15 ve 20) etkisi, Johnson besiyerinde kesikli kültürlerde çalışılmıştır. pH ve tuz konsantrasyonlarındaki değişimin hücre sayısı ve β -karoten üretimini önemli oranda etkilediği belirlenmiştir. *Dunaliella* türünün dört farklı pH (6, 7, 8 ve 9)'daki gelişimleri kıyaslandığında, en yüksek hücre konsantrasyonuna pH 9'da ulaşıldığı belirlenmiştir. Denenen tüm tuz konsantrasyonlarında en fazla hücre sayısı ($1.2-4.4 \times 10^6$ ml⁻¹) bu pH'da elde edilmiştir. Optimum çoğalması için %15 NaCl'a gereksinim duyan *Dunaliella* hücrelerindeki β -karoten birikiminin artan tuz konsantrasyonları ile birlikte arttığı belirlenmiştir. En yüksek β -karoten birikiminin (hücre başına 5,381 μ g) yüksek tuz konsantrasyonlarında olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler : *Dunaliella* sp., halofil, β -karoten, Tuz Gölü.

Giriş

Kuru ağırlıklarının yaklaşık %10'u oranında β -karoten üreten *Dunaliella* türlerinin ilk kez 1970'lerin sonunda Ölü Deniz'den (İsrail) izole edilmesi mikrobial yolla β -karoten üretimine olan ilgiyi arttırmıştır. β -karoten, 1950'li

yıllardan beri kimyasal olarak sadece all-trans izomeri halinde elde edilmektedir. Mikrobial yolla üretilen β -karoten'de ise hem all-trans hem de 9-ciss β -karoten izomerleri hemen hemen eşit oranda bulunmaktadır. 9-ciss β -karoten, all-trans β -karotene göre hayvansal yağlarda daha çok eridiğinden hayvan dokularında etkili

biçimde biriktirilmektedir (Leach ve ark., 1998; Ben-Amotz, 1988; Borowitzka ve ark., 1992).

β -karoten, ortada doymamış bir zincir ve bunun iki ucunda bulunan iki halkadan meydana gelmiştir. β -karoten besinlerle birlikte canlılar tarafından alındığı zaman ortadan kesilerek iki molekül A vitaminine dönüştürülür. Bu nedenle β -karoten'e provitamin-A da denilmektedir. β -karoten serbest radikalleri toplamada, hücreyi zararlı ışınlarla karşı korumada bağışıklığın düzenlenmesinde ve özellikle potansiyel bir antioksidant olarak kanserin engellenmesinde iş görmektedir (Margalith, 1999; Ben-Amotz, 1991; Leach ve ark., 1998; Amnon ve ark., 1990; Wilson ve ark., 1997).

Gıda sektöründe β -karoten, besinlerin renklendirilmesinde ve meyve sularının renklerinin korunmasında kullanılmaktadır. 1989 yılında dünyada bu amaçla 100 tondan fazla β -karoten kullanılmıştır. Ayrıca, β -karoten balık çiftliklerinde salmon, alabalık, kabuklu deniz ürünlerinin ve kümes hayvanlarının etlerinin ve yumurta sarılarının renklendirilmesi amacıyla yemlere de karıştırılmaktadır (Margalith, 1999; Borowitzka ve ark., 1990; Schlipalius, 1991).

Dunaliella tek hücreli, kamçılı, çıplak, ökaryot bir algdır (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*). Bu cins ilk kez 1905'te Teodoresco tarafından tanımlanmıştır. Teodoresco *Dunaliella*'yı ilk tanımlandığından beri çok geniş habitat dizisinde çok sayıda türü tanımlayarak bu güne kadar 29 *Dunaliella* türü teşhis edilmiştir (A. Borowitzka ve ark., 1992). *Dunaliella* türleri tatlı sulardan ($<0.1M$ NaCl) yüksek miktarda tuz içeren ($>5M$

NaCl) ortamlara kadar olan çeşitli çevrelerde yaşamaktadır. Bazı türleri tuzlu ortamlarda dominant olarak bulunmaktadır (Jimenez ve ark., 1991; Borowitzka ve ark., 1992; Ginzburg ve ark., 1993).

Dunaliella cinsinin en önemli morfolojik özelliği *Volvocales* ordosunun diğer cinslerinden farklı olarak sert hücre duvarlarından yoksun olmalarıdır. *Dunaliella* morfolojik olarak *Chlamydomonas*'a benzemektedir ancak hücre duvarının bulunmaması ile *Chlamydomonas*'tan farklılık göstermektedir. *Dunaliella* cinsinin *Chlamydomonas*'tan daha çok *Asteromonas*'a benzediği belirlenmiştir (Borowitzka ve ark., 1992). *Dunaliella* türlerinin hücreleri elastik bir plazma membranı ile çevrilmiştir. Bu durum hücre şeklinin değişmesinde ve osmotik değişimlere uymada bir avantaj sağlamaktadır. Hücre dışı osmotik basınca karşı hücre içindeki gliserol konsantrasyonunu artırarak osmoregülasyon sağlamaktadır (Borowitzka ve ark., 1992; Jimenez ve ark., 1991).

Günümüzde *Dunaliella* türlerinden β -karotenin ticari üretimi İsrail, ABD, Avusturalya, İspanya ve Çin'de yapılmaktadır (Ben-Amotz, 1991). Endüstriyel öneme sahip β -karoten ve gliserol üreten bu organizmanın biyolojisi ile ilgili çok sayıda çalışma yürütülmüştür (Jimenez ve ark., 1991). Türkiye'de ise özellikle endüstriyel amaçlarla mikrobiyal yolla β -karoten üretimine yönelik çalışmalar yok denecek kadar azdır. Ülkemiz ekonomisine çok önemli katkıları olan Tuz Gölü'nde bulunan *Dunaliella* türlerinin endüstriyel amaçlarla yine göl sularında üretimi gölün kullanım potansiyelini artıracaktır. Ancak öncelikle gölde bulunan *Dunaliella*

türlerin izole edilip saflaştırılması ve β -karoten üretim kapasitelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla planlanan bu çalışmada, Tuz Gölü'nden izole edilen bir *Dunaliella* türünün farklı tuz ve pH lardaki β -karoten üretimi belirlenmiştir.

Materyal ve Yöntem

İzolasyon: Tuz Gölü'nden alınan toprak ve su örnekleri seyreltilerek sıvı ve katı Johnson besiyerine ekilmiştir. Johnson besiyeri aşağıdaki maddeleri içermektedir: NaCl %10-20 g/l; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,5 g/l; KCl 0,2 g/l; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,2 g/l; $NaNO_3$ 1,5 g/l; $NaHCO_3$ 0,043 g/l; KH_2PO_4 0,035 g/l; Fe Solusyonu 10 ml/l (Na_2EDTA 189 mg/l; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 244 mg/l); eser element solusyonu 10 ml/l (H_3BO_3 61.0 mg/l; $(NH_4)Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 38.0 mg/l; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 6.0 mg/l; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 5.1mg/l; $ZnCl_2$ 4.1mg/l; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 4.1mg/l); distile su 980 ml/l (Borowitzka ve ark., 1992). Johnson besiyerindeki kimyasallar ayrı ayrı hazırlanıp otoklav ile sterilize edilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri $20 \pm 2^\circ C$ 'de sürekli ışık altında iki hafta boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası gerek sıvı besiyerinden pastör pipeti ile mikroskop altında alınan tek hücreler gerekse agarlı besiyerlerinde sürme metoduyla elde edilen tek koloniler, tekrar katı besiyerlerine aktarılarak saflaştırılmıştır.

İdentifikasyon: Saflaştırılan tek koloniler % 25 g NaCl içeren sıvı Johnson besiyerinde geliştirilmiştir. Mikroskopik inceleme sonucu kültürler morfolojik

yapılarına ve renklerine göre teşhis edilmiştir.

β -karoten üretim koşulları: İzolatlar arasından seçilen *Dunaliella sp.*, 250 ml'lik erlenler içinde 100 ml, pH'sı 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmış ve % 10, 15 ve 20 g NaCl içeren Johnson besiyerlerine ekilmiştir. Hazırlanan erlenler $20 \pm 2^\circ C$ 'de ve sürekli ışık altında (flöresan ışık 2000 lüks) 39 gün boyunca inkübe edilmiştir.

Analiz Yöntemleri: İnkübasyon süresi boyunca erlenlerden alınan örneklerdeki hücre sayısı Thoma lamı ile belirlenmiştir. Belirlenen hücre sayısına eş zamanlı olarak β -karoten miktarı saptanmıştır. Kültürden 2ml örnek alınarak 4000 rpm'de 12 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen çökeltideki β -karoten miktarı %80'lik aseton ile ekstrakte edildikten sonra 455 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Shimatzu 2001) olarak belirlenmiştir (Ben-Amotz ve Avron, 1983).

Bulgular

Çalışmada elde edilen 14 izolat arasından değişik şekildeki (oval, elipsoid yada armut şeklinde) hücrelere sahip, büyük fincan şeklinde bir kloroplastı olan, iki uzun eşit flagellalı ve % 25 g NaCl içeren besiyerinde sarı-kırmızı renkte gelişen bir izolat seçilerek *Dunaliella sp.* olarak teşhis edilmiştir.

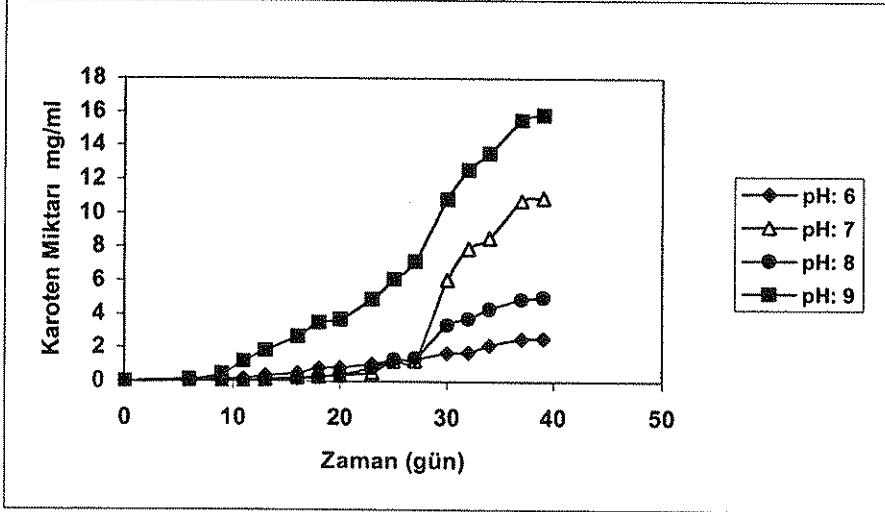
Dunaliella türünün %10, 15 ve 20 g NaCl konsantrasyonundaki Johnson besiyerindeki gelişmesi ve β -karoten üretimi üzerine pH'nın etkisi tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Farklı tuz ve pH' larda inkübasyon süresi sonunda (39. gün) belirlenen hücre sayısı ve β -karoten miktarı.

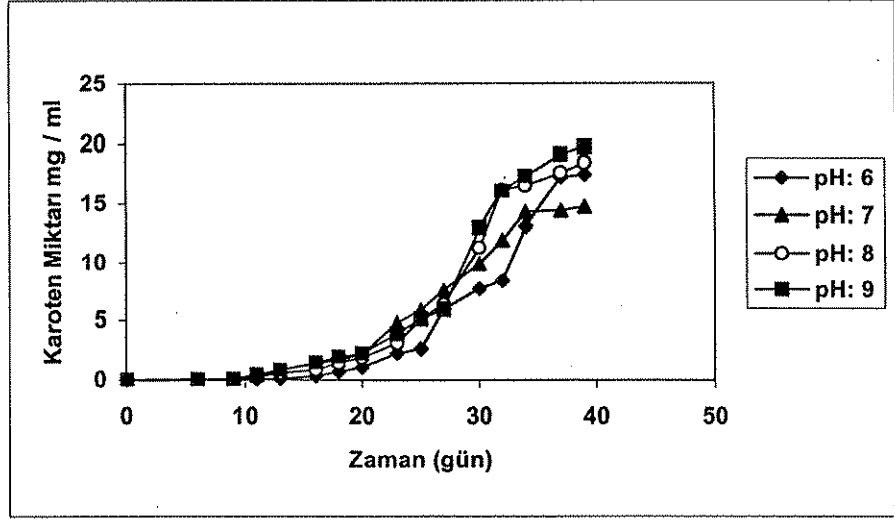
% NaCl	10		15		20	
	Hücre Sayısı Adet/ml	β -Karoten miktarı mg/ml	Hücre Sayısı Adet/ml	β -Karoten miktarı mg/ml	Hücre Sayısı Adet/ml	β -Karoten miktarı mg/ml
pH 6	$1,2 \times 10^6$	3,043	$4,1 \times 10^6$	17,548	$3,5 \times 10^6$	13,652
pH 7	$3,1 \times 10^6$	10,913	$3,6 \times 10^6$	14,739	$3,0 \times 10^6$	14,239
pH 8	$1,7 \times 10^6$	4,956	$4,1 \times 10^6$	18,500	$3,1 \times 10^6$	12,130
pH 9	$4,0 \times 10^6$	15,783	$4,2 \times 10^6$	19,783	$4,1 \times 10^6$	22,062

Tablo 1'de görüldüğü gibi hem en fazla hücre sayısı hem de en fazla β -karoten miktarı üç tuzda da pH 9'da elde edilmiştir. Bu pH'da tuzluluk arttıkça β -karoten miktarı artmıştır. *Dunaliella sp*'de hücrede β -karoten birikiminin artması ile kültür sarımsı turuncu renkler

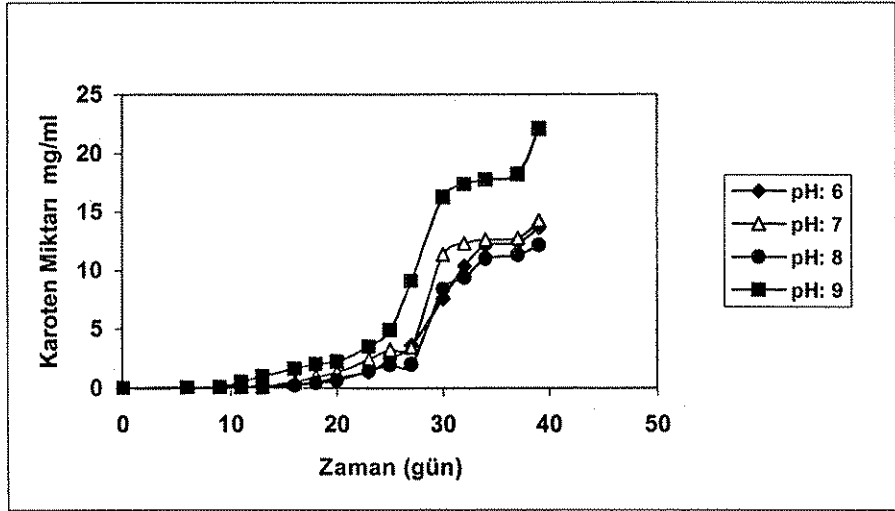
almıştır. En fazla hücre %15 NaCl içeren besiyerinde ve pH 9'da sayılmıştır. pH 7'de %15 ve %20 NaCl içeren ortamlarda birbirine yakın oranlarda (sırasıyla 14,739-14,239 mg/ml) β -karoten üretilmiştir.



Şekil 1. %10 NaCl'lik Johnson besi yerinde pH'ın *Dunaliella sp.* türünde β -karoten üretim kapasitesine etkisi.



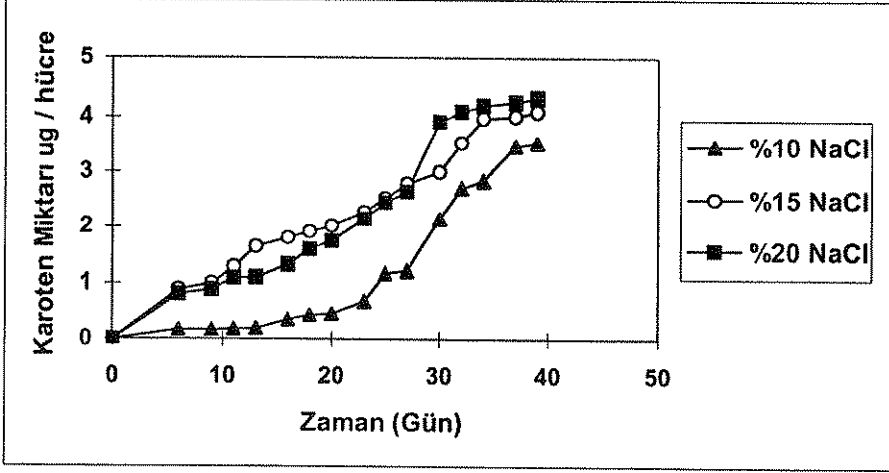
Şekil 2. %15 NaCl'lik Johnson besi yerinde pH'ın *Dunaliella sp.* türünün β -karoten üretim kapasitesine etkisi.



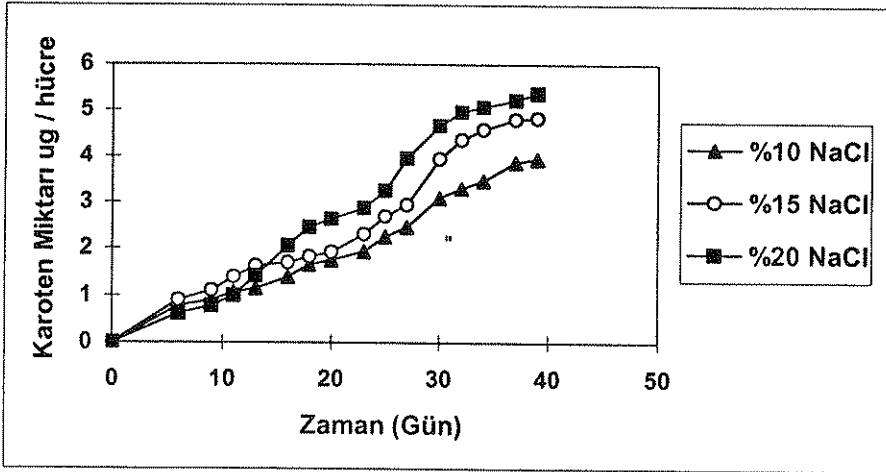
Şekil 3. %20 NaCl'lik Johnson besi yerinde pH'ın *Dunaliella sp.* türünün β -karoten üretim kapasitesine etkisi.

Şekillerde inkübasyon periyodu boyunca üretilen β -karoten miktarları şekil 1 2 3'de gösterilmiştir. Şekillerde görüldüğü gibi, 16. günden sonra β -karoten miktarında artış olmuş ve 20. günden itibaren bu artış daha da belirginleşmiştir.

Ancak en fazla β -karoten üretimi, tüm denemelerde de 30. günde olmuştur. %10 ve %20 NaCl içeren ortamlardan farklı olarak %15 NaCl'lik ortamlarda tüm pH'larda β -karoten miktarı benzer değerler göstermektedir.



Şekil 4. Johnson besiyerinde pH 7'de tuz konsantrasyonlarının *Dunaliella sp.* türünün hücre başına β -karoten üretim kapasitesine etkisi.



Şekil 5. Johnson besiyerinde pH 9'da tuz konsantrasyonlarının *Dunaliella sp.* türünün hücre başına β -karoten üretim kapasitesine etkisi.

En fazla β -karoten'in üretildiği pH 9 ve 7'de, hücre başına üretilen β -karoten miktarına tuz konsantrasyonlarının etkisi Şekil 4 ve 5'de gösterilmiştir. Bu pH'larda hücre başına en fazla β -karoten miktarı %20 NaCl içeren ortamlarda elde edilmiştir. Her iki pH'da da tuzluluk

artıkça hücre başına üretilen β -karoten miktarı artmıştır. β -karoten miktarındaki en büyük artış ise her iki pH'da da 30. günde olmuştur.

Tartışma ve Sonuç

Yüksek tuz konsantrasyonlarında *Dunaliella salina* Teodoresco türünün sarı-kırmızı renkli kültürler oluşturduğu ve fazla miktarda β -karoten ürettiği bilinmektedir. Benzer özellikler gösteren *Dunaliella bardawil* Teodoresco da *D. salina* türü içinde değerlendirilebileceği bu konuda yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Borowitzka ve ark., 1992). Bu çalışmada ise morfolojik özellikleri ve pigmentasyon durumuna göre teşhis edilerek denemelerde kullanılan *Dunaliella* türünün, *D. salina*'nın özelliklerine benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, göl sularından izole edilen bu türün en yüksek hücre sayısına pH 9'da ve %15 NaCl içeren Johnson besi yerinde ulaştığı en yüksek β -karoten'in ise 22,062 mg/ml olarak yine pH 9'da ve %20 NaCl'de elde edildiği belirlenmiştir. Çalışmanın

yapıldığı şartlarda ilk 20 günlük inkübasyon süresinde gelişmenin çok az olduğu daha sonraki yaklaşık yirmi günlük inkübasyon periyodunda ise hücre sayısının ve buna paralel olarak da β -karoten miktarının arttığı saptanmıştır.

Yapılan gözlemler sonucu Tuz Gölü'nde yaz aylarında buharlaşma nedeniyle tuz konsantrasyonunun arttığı ve bu şartlarda tuz toleransı yüksek olan *Dunaliella* türlerinin yoğun olarak gelişip gölün renginin sarı-kırmızı tonlarında görülmesini sağladığı belirlenmiştir. Benzer gözlemler İsrail Ölü Deniz'de de yapılmıştır (Ben-Amotz, 1982; Borowitzka ve ark., 1992).

Yüksek miktarda tuzun bulunduğu yaz aylarında, izole ettiğimiz *Dunaliella* türünün, yüksek tuzluluk nedeniyle kontaminasyon problemi olmaksızın, göl sularında endüstriyel amaçlarla üretiminin uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

Kaynakça

- Amnon L., Y. Biener, and A. Zamir. 1990. Photoinduction of β -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 93:389-395.
- Ben-Amotz A., A. Katz, M. Avron. 1982. Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). J. Phycol 18:529-537.
- Ben-Amotz, A., M. Avron. 1983. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. Ann. Rev. Microbiol.37:95-119.
- Ben-Amotz, A., L. Anon, and M. Avron. 1988. Stereoisomers of β -carotene and phytoene in the algae *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 86, 1286-1291.
- Ben-Amotz, A. 1991. The Biotechnology of Cultivating *Dunaliella* for production of β -carotene Rich Algae. Bioresource Technology 38: 233-235.
- Borowitzka, M. A. and L. J. Borowitzka. 1992. *Dunaliella* p. 27-58. In M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka (eds.). Microalgal Biotechnonology Cambridge University Press.
- Jimenez, C. and F. X. Niell. 1991. Growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco: effect of salinity, temperature and nitrogen concentration. Journal of Applied Phycology. 3, 319-327.
- Schlipalius, L. 1991. The extensive commercial cultivation of *Dunaliella salina*. Bioresource Technology. 38, 241-243.
- Leach, G., G. Oliveira and R. Morais. 1998. Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a β -carotene rich powder. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 20:82-85.
- Borowitzka, M. A., L. J. Borotwitzka and D. Kessly. 1990. Effect of salinity increase on carotenoid accumulation in the green algae *Dunaliella salina*. Journal of Applied Phycology. 2: 111-119.
- Margalith, P. Z. 1999. Production of ketocarotenoids microalgae. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:431-438.
- Wilson, P., M. Hilton, C. Waspe, D. Steer and D. Wilson, 1997. Production of C-labelled β -carotene from *Dunaliella salina*. Biotechnology Letters. 19, 5, 401-405.