

Su Ürünleri Dergisi J.Fish.Aquat.Sci.	Cilt No.18/1 Vol.18/1	Özel Sayı Suppl.	225 - 232 225 - 232	İzmir – Bornova 2001 İzmir – Bornova 2001
------------------------------------------	--------------------------	---------------------	------------------------	----------------------------------------------

Tuz Gölü'nden (Konya-Türkiye) İzole edilen *Dunaliella* Türlerinin Gliserol Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi

Ülküye Dudu Evren Çiğdem Kanlıtepe Ceren Çıracı Gönül Dönmez

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

Abstract : *The Determination of Glycerol Production in Dunaliella spp. Isolated from Lake Tuz (Konya-Turkey).* Some *Dunaliella spp.*, green unicellular halophilic algae, were isolated from some water and mud samples of Lake Tuz, a salt lake in Konya-TURKEY. The effect of pH and NaCl concentrations on cell growth and glycerol production of *Dunaliella spp.* were determined. Isolated *Dunaliella spp.* incubated in Johnson Medium at NaCl concentrations varying between 10-20 % and at pH values between 6-9, under continuous illumination (1500 lux) at 20 ± 2 °C for 40 days. According to results, one of the *Dunaliella spp.* (strain 7) produced maximum glycerol (376,4 mg/l) at pH 8 and 20 % NaCl contained Johnson medium.

Key Words : *Dunaliella sp.*, Isolation, Tuz Gölü, Glycerol Production.

Özet : Tuz Gölü'nden (Konya-Türkiye) alınan toprak ve su örneklerinden, tek hücreli halofilik bir alg olan *Dunaliella* türleri izole edilmiştir. İzole edilen *Dunaliella* türlerinin çoğalması ve gliserol üretimi üzerine pH ve NaCl konsantrasyonlarının etkisi belirlenmiştir. *Dunaliella* türleri, %10 – 20 arasında değişen NaCl konsantrasyonlarında ve 6 ila 9 arasında değişen pH'lardaki Johnson besiyerinde 20 ± 2 °C'de sürekli ışık altında (1500 lüks) 40 gün süre ile inkübe edilmiştir. Sonuçlara göre, *Dunaliella* türlerinden birisinin (7 numaralı türün) pH 8'de ve %20 NaCl içeren besiyerinde en fazla gliserol ürettiği (376,4 mg/l) bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler : *Dunaliella sp.*, İzolasyon, Tuz Gölü, Gliserol Üretimi

Giriş

Chlorophyceae sınıfına ait olan *Dunaliella* türleri, yüksek oranda tuz içeren ortamlarda en fazla bulunan ökaryotik mikroorganizmalardır. Bu ortamlarda *Dunaliella salina*, *D. bardawil*, *D. minuta*, *D. parva* ve *D. viridis* olmak üzere başlıca beş *Dunaliella* türü bulunmaktadır. Fototrof, aerob, tek hücreli, hareketli, çift kamçılı ve hücre duvarı bulunmayan bu

mikroalgler, yüksek tuz konsantrasyonlarında hücre içinde gliserol biriktirmektedirler (Ben-Amotz, 1987; Benemann, 1990; Borowitzka, 1992; Schlipalius, 1991).

İlk olarak Craigie ve Mc Lachlan (1964) *Dunaliella* türlerinde önemli bir fotosentez ürünü olarak gliserolün bulunduğunu göstermişlerdir. Yüksek konsantrasyonlarda herhangi bir toksik etkisi bulunmayan gliserol, enzim ve

membran fonksiyonları için uygun bir solüsyondur. Düşük moleküler ağırlıklı, yüksüz bir bileşiktir. Yüksek gliserol konsantrasyonları *Dunaliella* hücrelerinin su kaybetmesini önlemektedir.

Endüstride halofil *Dunaliella* türleri, provitamin A , gıda boyası ve antioksidan olarak kullanılan beta karoten yanında gliserol üretiminde de kullanılmaktadır. Halofil olmaları kontaminasyon riski olmaksızın büyük havuzlarda üretimlerini kolaylaştırmaktadır . Beta karoten ve gliserol elde edildikten sonra kalan biyomas, protein bakımından zengin olduğu için, insan gıdası ve hayvan yemi olarak da kullanılmaktadır (Borowitzka,1992).

Bu çalışma, endüstride pek çok kullanım alanı olan *Dunaliella* türlerinin ülkemiz tuz üretimine önemli katkıları olan Tuz Gölü'nden izolasyonu ve gliserol üretim kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem

İzolasyon ve Teşhis: Tuz Gölü'nden alınan toprak ve su örneklerinden gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra Johnson besiyerinde tek koloniler elde edilmiştir (Borowitzka,1992). İzole edilen tek kolonilerin saflık kontrolleri yapıldıktan sonra, koloni morfolojileri farklılık gösterenler mikroskop altında morfolojik özelliklerine göre teşhis edilmiştir.

Gelişme Koşulları : *Dunaliella* türleri (3, 5 ve 7 numaralı), farklı tuz (%10, %15, %20 w/v NaCl) konsantrasyonlarında ve pH'da (6, 7, 8, 9), 150 ml'lik erlenlerdeki 50 ml'lik Johnson besiyerinde , 20±2 °C de ve sürekli ışık (1500 lüks) altında geliştirilmiştir.

***Dunaliella* türlerinin gelişimine pH'nın Etkisi:** *Dunaliella* türleri %10g NaCl içeren pH 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmış Johnson besiyerlerinde 30 gün geliştirilmiştir.

Gliserol Üretimi : *Dunaliella* türlerinin ürettiği gliserol miktarlarının belirlenmesi için türler %10, %15 ve %20 g NaCl içeren pH 8'deki Johnson besiyerlerinde 49 gün inkübe edilmiştir . İnkübasyon için sayım yapılarak aynı sayıda hücre içeren 0,1 ml'lik aktif kültür (1x10⁷ adet/ml) kullanılmıştır.

Analiz Yöntemi : Denemelerde inkübasyon süresi boyunca *Dunaliella* türlerinin gelişimi Thoma lamı ile yapılan mikroskopik sayımla belirlenmiştir. Gliserol miktarının belirlenmesi için kültürlerden 2 ml alınıp, santrifüj edilerek (1500g 10') 5mM fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama sonucu elde edilen çökelek 15 mM fosfat tamponu ile 1ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 1,5 saat 5000 lüks'de bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda üstüne %30'luk 0,1ml Triklorasetik asit konulup santrifüj edilmiştir. Süpernetanta 0,1ml 10N sülfirik asit ve 0,5ml 0,1M sodyum periodate ilave edilip, karıştırılarak 10 dakika bekletilmiştir. Üstüne 0,4ml 1M sodyum arsenit konulup, 10 dakika bekletilip, üstüne 5ml kromotropik asit ilave edilmiştir. Hazırlanan örnekler yarım saat kaynatıldıktan sonra spektrofotometrede (Shimatzu 2001) 570nm dalga boyunda okunmuştur (Ben-Amotz ve Avron, 1973).

Bulgular

İzolasyon çalışmaları sonucu elde edilen, koloni morfolojileri ve renkleri farklılık

Tuz Gölü'nden İzole Edilen Dunaliella Türlerinin Gliserol Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi

gösteren üç organizmanın *Dunaliella* cinsinin özelliklerini gösterdiği belirlenmiştir. Mikroskopik incelemeler sonucu, yeşil tonlarında koloniler oluşturan bu organizmaların oval yada elipsoid yapıda değişken hücre şekilli ve eşit uzunlukta iki flagellaya sahip olduğu saptanmıştır.

Dunaliella türlerinin en iyi geliştiği pH'nın belirlenmesi amacıyla kültürler %10 NaCl içeren dört farklı pH'daki Johnson besiyerlerinde 30 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültürlerdeki hücre sayıları Thoma lamıyla yapılan direk sayım sonucu belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Farklı pH'da gelişen *Dunaliella* kültürlerinin hücre sayıları (adet/ml)

%10NaCl				
pH	6	7	8	9
3 nolu suş	2.08×10^7	2.48×10^7	3.13×10^7	1.34×10^7
5 nolu suş	2.2×10^7	2.84×10^7	6.4×10^7	4×10^7
7 nolu suş	9.8×10^6	1.8×10^7	2.2×10^7	2.25×10^7

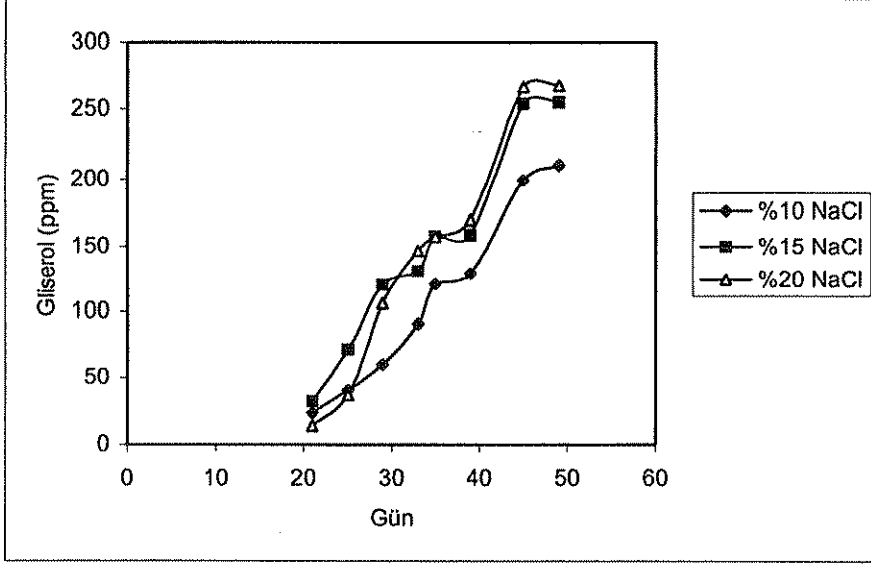
Sonuçlar incelendiğinde, %10 gram tuz içeren besiyerlerinde denenen üç türün pH 8'de en iyi gelişim gösterdiği belirlenmiştir.

Dunaliella türlerinin gliserol üretim kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla, kültürler %10, %15 ve %20 g NaCl içeren pH 8'deki Johnson besiyerinde

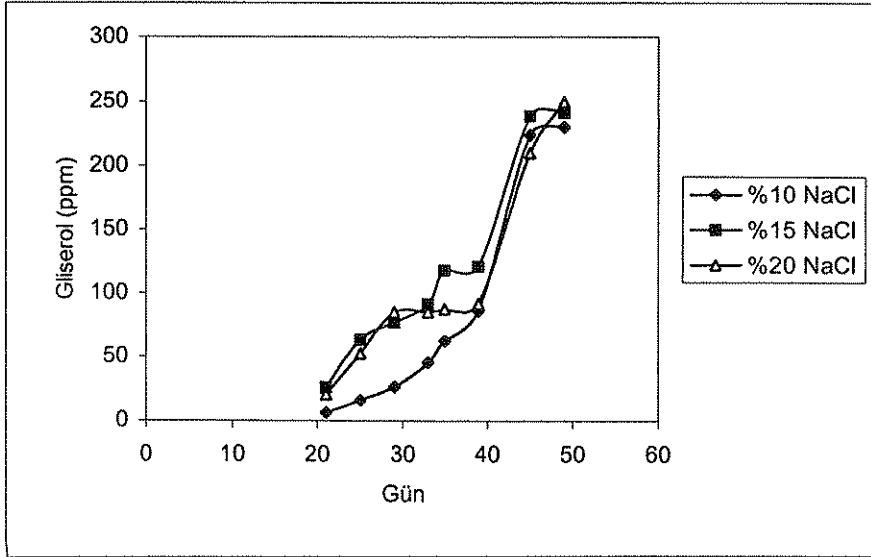
geliştirilmiştir. *Dunaliella* türlerinin ürettiği gliserol miktarları Şekil 1, 2 ve 3'de gösterilmiştir. Bu suşların inkübasyon boyunca Thoma lamı ile belirtilen hücre sayıları ise Tablo 2 de verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi tüm tuz konsantrasyonlarında 7 numaralı *Dunaliella* suşu en yüksek sayıya ulaşmıştır.

Tablo 2. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişen *Dunaliella* kültürlerinin hücre sayıları (adet/ml)

Suşlar	Gün NaCl	21	25	29	33	35	39	45	49
3	%10	7.4×10^6	7.5×10^6	1.3×10^7	1.2×10^7	1.0×10^7	1.2×10^7	1.3×10^7	1.6×10^7
	%15	7.0×10^6	8.8×10^6	1.7×10^7	1.0×10^7	1.6×10^7	1.6×10^7	1.4×10^7	1.7×10^7
	%20	4.8×10^6	0.5×10^7	1.2×10^7	2.1×10^7	1.1×10^7	2.1×10^7	2.5×10^7	2.7×10^7
5	%10	6.4×10^6	4.3×10^6	0.8×10^7	0.9×10^7	1.2×10^7	2.3×10^7	2.6×10^7	3.0×10^7
	%15	3.0×10^6	1.2×10^6	0.9×10^7	1.0×10^7	1.8×10^7	1.9×10^7	3.2×10^7	4.9×10^7
	%20	5.4×10^6	1.4×10^6	1.3×10^7	0.9×10^7	1.5×10^7	1.4×10^7	4.0×10^7	4.0×10^7
7	%10	5.2×10^6	4.5×10^6	0.8×10^7	0.9×10^7	2.8×10^7	2.5×10^7	4.5×10^7	5.0×10^7
	%15	5.6×10^6	0.1×10^6	1.5×10^7	1.6×10^7	2.6×10^7	4.5×10^7	6.5×10^7	7.5×10^7
	%20	4.6×10^6	1.1×10^6	0.9×10^7	1.8×10^7	2.1×10^7	2.6×10^7	5.6×10^7	6.0×10^7

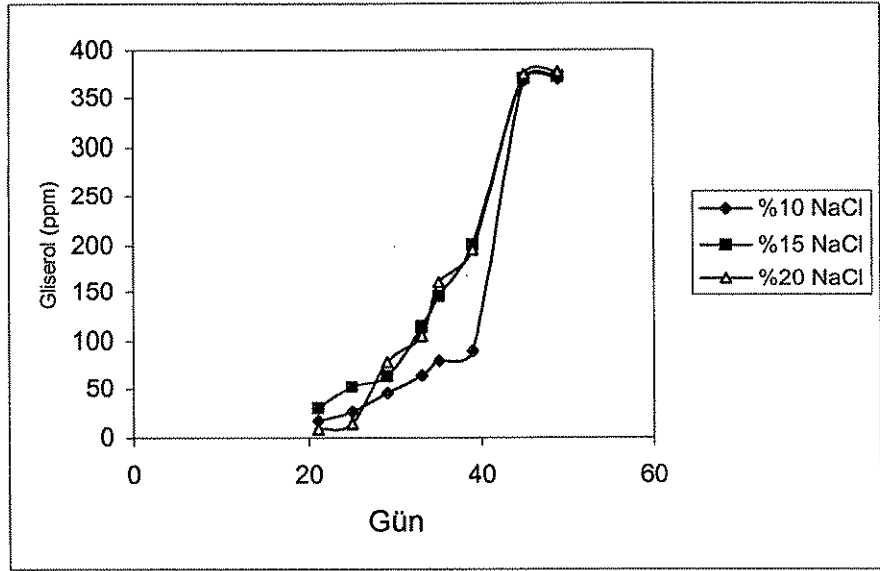


Şekil 1. *Dunaliella sp.* (3 numaralı suş) tarafından üretilen gliserol miktarı



Şekil 2. *Dunaliella sp.* (5 numaralı suş) tarafından üretilen gliserol miktarı

Tuz Gölü'nden İzole Edilen *Dunaliella* Türlerinin Gliserol Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi

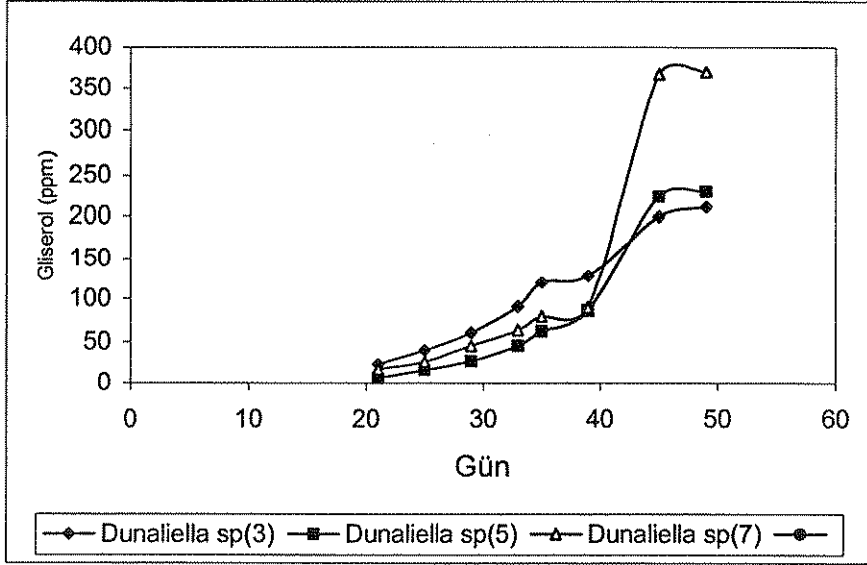


Şekil 3. *Dunaliella* sp. (7 numaralı suş) tarafından üretilen gliserol miktarı

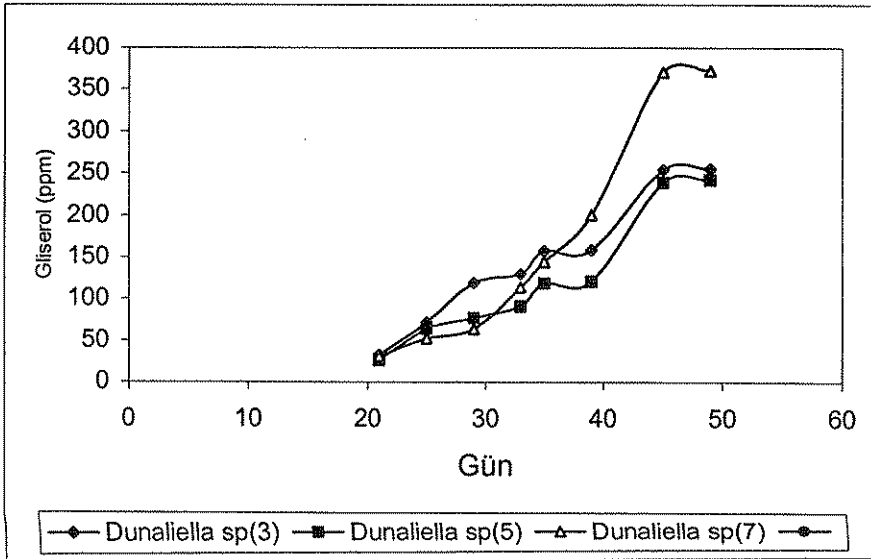
Şekil 1, 2 ve 3 de görüldüğü gibi üç *Dunaliella* türü de %10 gram NaCl içeren besiyerinde az miktarda gliserol üretirken en fazla üretimin %20 gram NaCl içeren besiyerinde olduğu saptanmıştır. Denemelerde, 3 numaralı *Dunaliella* türünün %10 gram NaCl'de 210,42ppm, %15 gram NaCl'de 254,6 ppm ve %20 gram NaCl'de 267,12 ppm; 5 numaralı türün %10 gram NaCl 'de 230,0 ppm, %15 gram NaCl 'de 241,4 ppm ve %20 gram NaCl 'de 249,72 ppm;

7 numaralı türün ise, %10 gram NaCl 'de 369,0ppm, %15 gram NaCl 'de 372,0 ppm ve %20 gram NaCl'de 376,4 ppm gliserol ürettiği belirlenmiştir.

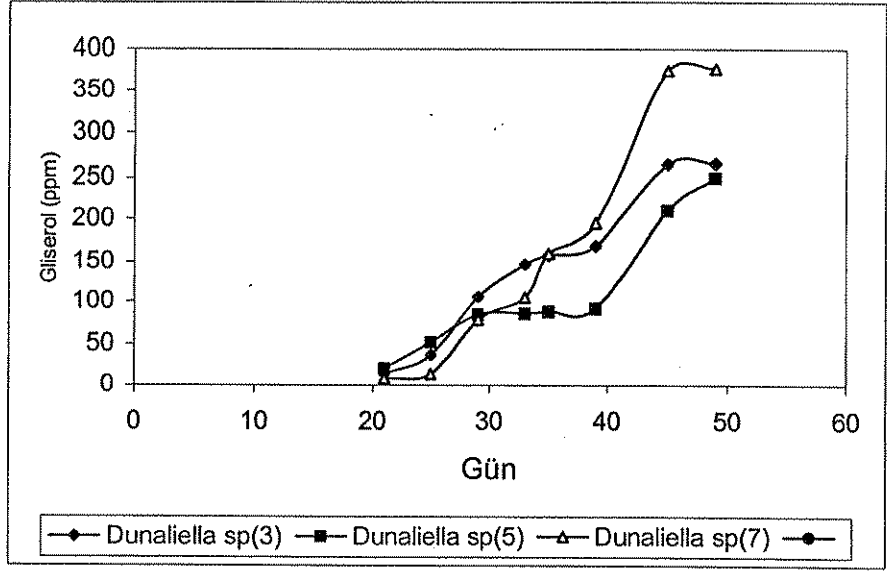
Dunaliella türlerinin üç farklı tuz konsantrasyonunda ürettiği gliserol miktarları şekil 4, 5 ve 6'da gösterilmiştir. Türler arasında tüm tuz konsantrasyonlarında en fazla gliserol üretiminin 7 numaralı türde olduğu denemeler sonucu belirlenmiştir.



Şekil 4. %10 gram NaCl içeren besiyerinde *Dunaliella* türlerinin ürettiği gliserol miktarı



Şekil 5. %15 gram NaCl içeren besiyerinde *Dunaliella* türlerinin ürettiği gliserol miktarı



Şekil 6. %20 gram NaCl içeren besiyerinde *Dunaliella* türlerinin ürettiği gliserol miktarı

Tartışma ve Sonuç

Dunaliella türleriyle yapılan çalışmalarda gliserol üretimi için en uygun pH 'nın 8 olduğu belirlenmiştir (Goyal ve Gimmler, 1989; Thakur ve Kumar, 1997; Thakur ve ark., 2000). Bu çalışmada da %10 tuz içeren Johnson besiyerinde, kültürler en iyi pH 8'de gelişmiştir.

Dunaliella türlerinin hücre içinde gliserol biriktirmesinde çeşitli faktörlerin etkili olduğu belirtilmektedir. Farklı nitrojen kaynaklarının gliserol üretimine etkilerinin belirlendiği bir çalışmada potasyum nitratın gliserol miktarını arttırdığı tesbit edilmiştir (Thakur ve Kumar, 1999a). Yapılan bir diğer çalışmada, gliserol üretimine ışığın ve çeşitli karbon kaynaklarının etkisi incelenmiş, en yüksek gliserol üretiminin

flöresans ışıkta ve glikozlu ortamlarda olduğu belirlenmiştir (Thakur ve Kumar, 1997). Agar, agaroz, karragen ve kalsiyum aljinatta hareketleri önlenen *Dunaliella* türlerince üretilen gliserol miktarı araştırıldığında en fazla üretimin agarda olduğu saptanmıştır (Grizeau ve Navarro, 1986; Thakur ve Kumar, 1999b).

Yapılan çalışma sonucunda, izole edilen *Dunaliella* türlerinin gliserol üretimine pH ve tuz konsantrasyonlarının etkisi belirlenerek, 7 numaralı *Dunaliella* türünün diğerlerine göre yüksek hücre sayılarına ulaşması ve fazla miktarda gliserol üretmesi nedeniyle çeşitli amaçlar için büyük çapta üretilebileceği sonucuna varılmıştır. Yapılacak olan diğer çalışmalarla bu türün gliserol üretimine etkili olan diğer faktörler araştırılacaktır.

Kaynakça

- Ben-Amotz, A. and Avron. M. 1973. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol.* 51:875-878.
- Ben-Amotz, A. 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta). *J.Plant Physiol.* 131:479-487
- Benemann, J. R. 1990. Microalgae products and production : An overview. *J. Ind. Microbiol.* 5:247-256.
- Borowitzka, M. A., L. J. Borowitzka. 1992. *Dunaliella*, p. 27-58. In M. A. Borowitzka and L.J. Borowitzka [eds.], *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press
- Craigie J. S., M. J. McLachlan. 1964 . Glycerol as a photosynthetic product in *Dunaliella tertiolecta* . *Butcher. Can. J. Bot.* 42:777-8.
- Goyal A ., H. Gimmler. 1989. Osmoregulation in *Dunaliella tertiolecta* ,effect of salt stress, and the external pH on the internal pH . *Arch. Microbial.* 152: 138-142.
- Lustigman, B. , J. M. McCormick, G. Dale and I. J. A. Mc Laughlin. 1987. Effect of increasing copper and salinity on glycerol production by *Dunaliella salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38:359-362.
- Schlupalius, L. 1991. The extensive commercial cultivation of *Dunaliella salina*. *Bioresource Technol.* 38:241-243.
- Thakur, A., H. D. Kumar. 1997. Effects of pH, light quality and various carbon sources on glycerol production by the brackish water alga *Dunaliella salina*. *Cytobios*, 90(361):95-102.
- Thakur, A., H. D. Kumar. 1999a. Effects of different nitrogen sources on growth and glycerol production by *Dunaliella salina*. *Cytobios*, 97(385):79-86.
- Thakur, A., H. D. Kumar. 1999b. Use of natural polymers as immobilizing agents and effects on the growth of *Dunaliella salina* and its glycerol production. *Acta-biotechnologica*, 19:37-44.
- Thakur, A., H. D. Kumar and S. M. Cowsik. 2000. Effects of pH and inorganic carbon concentration on growth, glycerol production, photosynthesis and dark respiration of *Dunaliella salina*. *Cytobios*, 102:69-74.