

Haematococcus pluvialis Flotow (Chlorophyceae)'un Farklı Işık Şiddetlerinde Vejetatif Büyüme Özellikleri

Tolga Göksan¹, *Şevket Gökpınar²

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Terzioğlu Yerleşkesi, 17020, Çanakkale, Türkiye

²Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye

*E mail: gokpinar@bornova.ege.edu.tr

Abstract: *Vegetative growth characteristics of Haematococcus pluvialis Flotow at different light intensities.* Five different light intensities of 50, 100, 200, 400 and 600 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were applied on the vegetative cultures of *Haematococcus pluvialis* to determine the optimal light intensity, and the growth performance. While dry weight and total carotenoid amounts increased in parallel to the light intensities, total chlorophyll amount increased up to the irradiance of 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2.21 mg L^{-1}), and no change was observed in the higher illuminations (mean value of 2.35 mg L^{-1}). Interestingly, cell count increased in all the groups from the mean value of 3.45×10^4 cells ml^{-1} on the 15th hour to 5.66×10^4 cells ml^{-1} on the 18th hour, which coincided with the dark period. In conclusion, astaxanthin accumulation was triggered and cell number was decreased above the illuminations of 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12.73×10^4 , 16.10×10^4 , 19.73×10^4 , 15.90×10^4 and 12.89×10^4 cells ml^{-1} for 50, 100, 200, 400 and 600 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively). In the experiment applied five different illuminations, optimal light intensity range for the vegetative stage cultivation of the cells was found to be 50 – 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and the best growth was in the light intensity of 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Key Words: *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, vegetative stage, light, pigment composition.

Özet: *Haematococcus pluvialis*'in vejetatif kültürlerinde, optimal ışık şiddeti aralığı ve büyüme performanslarının tespiti için 50, 100, 200, 400 ve 600 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ 'lik beş farklı ışık şiddeti uygulandı. Deneme gruplarında kuru ağırlık ve toplam karoten miktarları artan ışık şiddetleri ile doğru orantılı olarak artarken, toplam klorofil miktarı 200 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ 'lik aydınlatmaya kadar arttı (2.21 mg L^{-1}) ve bunun üzerindeki aydınlatma şiddetlerinde herhangi bir değişim görülmedi (ortalama 2.35 mg L^{-1}). Hücre sayısı tüm gruplarda karanlık periyoda denk gelen 15. saatte ortalama 3.45×10^4 hücre ml^{-1} 'den 18. saatte 5.66×10^4 hücre ml^{-1} 'ye arttı. Sonuç olarak, 200 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ 'lik ışık şiddetinin üzerindeki aydınlatmalarda astaksantin birikiminin tetiklendiği ve hücre sayısının azaldığı görüldü (50, 100, 200, 400 ve 600 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ 'lik ışık şiddetleri için sırasıyla 12.73×10^4 , 16.10×10^4 , 19.73×10^4 , 15.90×10^4 ve 12.89×10^4 hücre ml^{-1}). Beş farklı ışık şiddetinin uygulandığı denemede hücrelerin vejetatif safhada kültür edilebilmesi için optimal ışık şiddeti aralığı 50 - 200 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ olarak bulundu ve en iyi büyüme 200 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ 'lik ışık şiddetinde gerçekleşti.

Anahtar Kelimeler: *Haematococcus pluvialis*, astaksantin, vejetatif safha, ışık, pigment kompozisyonu.

Giriş

Mikroalgler, ticari değeri olan bazı metabolitleri bünyelerinde biriktirme özelliğinden ötürü, bu metabolitlerin elde edilebileceği önemli mikrobiyal kaynaklardan biridir. Ülkemizde mikroalgal biyoteknolojiye olan ilgi son yıllarda giderek artmış, özellikle bir siyanobakteri türü olan *Spirulina platensis* üretimi için ticari girişimler başlamıştır. Mikroalgal metabolitlerden çok doymamış yağ asidi (PUFA) grubuna ait olan EPA (eicosapentaenoic asit) insan sağlığına faydalı etkileri nedeni ile büyük bir pazar payına sahip olduğu rapor edilmektedir (Belarbi ve diğ., 2000). Günümüzde mikroalgal biyoteknolojinin en önemli handikaplarından biri, üretimi yapılabilen ticari tür sayısının sınırlı sayıda olmasıdır. Bu nedenle bu alana yeni türlerin kazandırılması bir zorunluluk gibi görülmektedir. Ticari üretimi yapılabilecek muhtemel türlerden *Haematococcus pluvialis*'in yanı sıra yüksek EPA düzeylerine sahip olan *Phaeodactylum tricornutum*'dur. EPA bakımından zengin bir pennat diyatom türü *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin'in kültürü üzerinde yirmi yıl önce

gerçekleştirilen denemeler bu konuda ilk çalışmaları teşkil etmektedir (Gökpınar, 1980; Gökpınar, 1982).

Astaksantin, mikroalglerden elde edilen yüksek ticari değere sahip güçlü antioksidan özelliğinden ötürü insan sağlığı üzerine olumlu etkileri olan bir karotenoyittir. Hayvanlar karotenoyitleri sentez edemedikleri için, bunların besinleri aracılığı ile alınma zorunluluğu vardır (Davis, 1985). Astaksantin üretiminde halen bilinen en zengin mikrobiyal kaynak *Haematococcus*'tur. Bu mikroalg türünden elde edilen astaksantin için en büyük pazar, akuakültür uygulamalarında salmonid yemleri için olup (Torrison ve Christiansen 1995), tropikal süs balıklarının renklerinin korunmasında (Ako ve Tamaru 1999), kümes hayvanları endüstrisinde yumurta sarılarının renklendirilmesinde (Inberr 1998) de başarıyla kullanılır. Ayrıca son zamanlarda insanlardaki olumlu etkilerinden dolayı (Terao, 1989; Guerin ve diğ., 2003) besin takviyesi ve antioksidan olarak kullanımı da giderek yaygınlaşmaktadır.

Yeşil alglerden *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae), uygun olmayan ortam koşullarında (başta

yüksek ışık şiddeti olmak üzere, sıcaklık ve pH değerlerindeki dalgalanmalar, ortamda besin miktarının azalması vb.) biriktirdiği sekonder karotenoyit astaksantin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) bakımından biyoteknolojik olarak öneme sahip bir türdür (Boussiba, 2000; Masojidek ve diğ., 2000). Bu tür vejetatif safhasında iki adet kamçısı ile hareketli ve yeşil renkli bir organizma olup, ortam koşulları bozulduğunda kalın hücre duvarına sahip aplanosporlar oluşturur ve yoğun bir şekilde astaksantin pigmentini biriktirmeye başlar (Boussiba ve Vonshak, 1991; Johnson ve An 1991).

Haematococcus'tan astaksantin üretimi, bazı sistemlerde tek bir reaktörde gerçekleştirilebilir (Göksan ve diğ., 2003) de, genelde iki aşamalı olarak gerçekleştirilir; önce vejetatif hücreler laboratuvar koşullarında düşük ışık şiddetinde kültüre edilir, belirli bir hücre yoğunluğa ulaşan vejetatif hücrelerin dış ortamda tübüler reaktörler veya havuzlarda yüksek ışık şiddeti altında astaksantin biriktirmesi sağlanır ve kültür kırmızılaştırılır. Dış ortama çıkartılan kültürlerde astaksantin birikimini tetiklemek için hücreler stres altına sokulmalıdır. Bunun için kültür ortamından azot ve fosfor gibi makro besinler çıkarılır ve yüksek ışık şiddetinin yanı sıra nutrient limitasyonu hücrelerde astaksantin birikimini başlatır. Bu çalışmada, üretim safhaları ve büyüme performansları ile ilgili detaylı bilgi bulunmayan *Haematococcus*'un beş farklı ışık şiddetinde kültürü gerçekleştirildi. Bu sayede üretimin en önemli safhasını oluşturan vejetatif kültürler için optimal ışık şiddeti ve uygulanan ışık şiddetindeki büyüme performansları saptanmaya çalışıldı.

Materyal ve Yöntem

Deney organizması *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) lokal olarak Giuseppe TORZILLO tarafından izole edildi. Büyüme ortamı olarak BG11 (Rippka ve diğ. 1979) kullanıldı ve sıcaklık $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'ta Ben-mari sistemi ile sabit tutuldu.

Farklı aydınlatma şiddetlerinin *Haematococcus*'un büyüme özellikleri üzerindeki etkilerini araştırmak için 50, 100, 200, 400 ve 600 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ 'lik beş farklı ışık şiddeti uygulandı. Fototrofik olarak 1 L'lik erlenlerde büyütülen kültürler, doğal aydınlanma periyoduna yakın olması amacıyla 11 saat aydınlık, 13 saat karanlık periyoda maruz bırakıldı.

Kuru ağırlık tayini için 25'er ml örnekler, önceden kurutulup darası alınmış GF/C fiberglas filtrelerden süzüldü. Bu filtreler daha sonra 105°C 'ye getirilmiş etüvde 2 saat kurutulduktan sonra bir hassas terazide tekrar tartılarak algal biyomas g L^{-1} kuru ağırlık cinsinden hesaplandı.

Toplam klorofil ve karotenoid miktarları bir spektrofotometrede % 80 aseton ile tespit edildi (Lichtenthaler 1987). Hücre sayımları Neubauer sayma kamerasında üç tekrar ile gerçekleştirildi. Spesifik büyüme hızı (μ) ve ikilenme zamanları (d.t.) aşağıdaki formüllere göre bulundu;

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad \text{d.t.} = \frac{\ln 2}{\mu} = 0,693$$

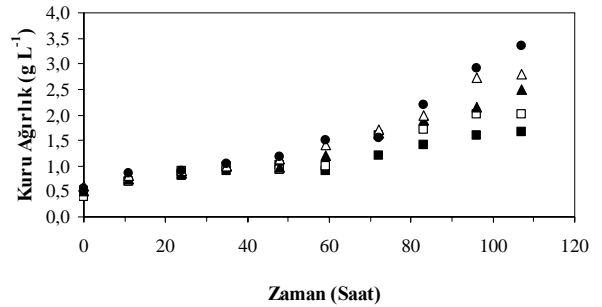
Formülde X_2 ve X_1 , sırasıyla t_2 ve t_1 zamanlarındaki

biyomas konsantrasyonlarını belirtir (Vonshak, 1997).

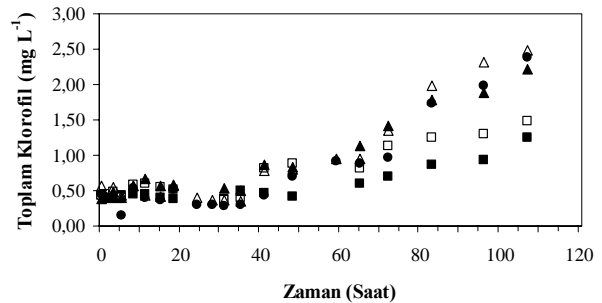
Bulgular

Beş farklı ışık şiddetinde (50, 100, 200, 400 ve 600 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{sn}^{-1}$) gerçekleştirilen denemelerde *H. pluvialis*'in büyüme özellikleri araştırıldı. Kuru ağırlıktaki değişimlere bakıldığında, tüm grupların ışık şiddetleriyle doğru orantılı olarak arttığı izlendi (Şekil 1). Ortalama 0.5 g L^{-1} 'lik kuru ağırlık değeri ile başlayan denemenin 48. saatine kadar gruplar birbirine paralel olarak artarken, deneme sonunda 50, 100, 200, 400 ve 600 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ 'lik ışık şiddetlerinde değerler sırasıyla 1.70, 2.02, 2.50, 2.79 ve 3.35 g L^{-1} olarak bulundu.

Başlangıçta 0.4 mg L^{-1} olacak şekilde ayarlanan klorofil konsantrasyonları, ilk 11 saatlik aydınlık periyot süresince hücreler uygulanan ışık şiddetlerine adapte olmaya çalıştıklarından dolayı artma yada azalma göstermedi ($F=1.51 < F_{\text{tablo}}=2.76$, $P < 0.05$). İkinci günden itibaren artmaya başlayan toplam klorofil miktarları deneme sonuna kadar sürekli bir artış göstererek, 50, 100, 200, 400 ve 600 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ 'lik ışık şiddetlerinde sırasıyla 1.25, 1.49, 2.21, 2.49 ve 2.39 mg L^{-1} 'lik konsantrasyonlara ulaşılar (Şekil 2). Yeşil alglerde bulunan klorofil moleküllerinden klorofil a ve b miktarları tüm gruplarda deneme sonuna kadar aynı oranda kaldı ve klorofil a / b oranı tüm gruplar için ortalama 2.3 olarak hesaplandı.



Şekil 1. Farklı ışık şiddetlerinde kuru ağırlık miktarlarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (50, 100, 200, 400 ve 600 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ 'lik ışık şiddetlerini sırasıyla içi dolu ve boş kare, içi dolu ve boş üçgen ve içi dolu daire temsil eder).



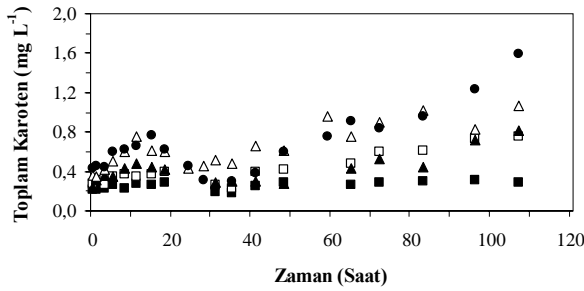
Şekil 2. Farklı ışık şiddetlerinde toplam klorofil konsantrasyonlarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (50, 100, 200, 400 ve 600 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ 'lik ışık şiddetlerini sırasıyla içi dolu ve boş kare, içi dolu ve boş üçgen ve içi dolu daire temsil eder).

0.22 mg L^{-1} toplam karotenoid konsantrasyonu ile

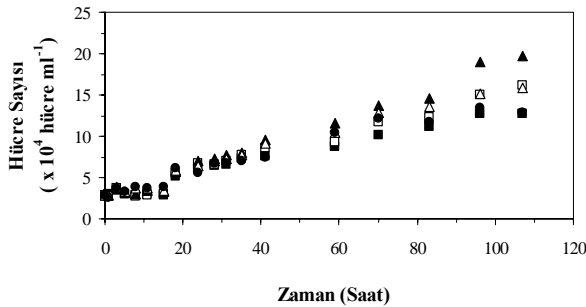
başlayan 50 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik aydınlatmanın uygulandığı grupta toplam karoten miktarı deneme sonuna kadar değişmez iken, 100 ve 200 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik aydınlatmalarda 0.80 mg L^{-1} konsantrasyona ulaşıldı. 400 ve 600 μmol foton m^{-2} sn^{-1} ışık şiddetlerinde ise sırasıyla 1.06 ve 1.59 mg L^{-1} lik değerlere ulaşıldı (Şekil 3).

Denemenin 15. saatine kadar gruptardaki hücre sayıları, adaptasyon işleminden dolayı artmadı ($F=1.92 < F$ tablo=2.69, $P < 0.05$). 18. saatte yapılan sayımlarda ise hücre sayılarının tüm gruptarda aniden 2 kat arttığı, ve bu artışın deneme sonuna kadar devam ettiği görüldü. Deneme sonunda ulaşılan hücre sayıları 50, 100, 200, 400 ve 600 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik ışık şiddetlerine karşılık sırasıyla 12.73×10^4 , 16.10×10^4 , 19.73×10^4 , 15.90×10^4 ve 12.89×10^4 hücre ml^{-1} olarak bulundu (Şekil 4).

50, 100, 200, 400 ve 600 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik ışık şiddetleri için spesifik büyüme hızları (μ) sırasıyla 0.012, 0.014, 0.013, 0.019 ve 0.025 bölünme saat^{-1} , ikilenme zamanları ise 57.8, 49.5, 53.3, 36.5 ve 27.7 saat olarak tespit edildi.



Şekil 3. Farklı ışık şiddetlerinde toplam karoten konsantrasyonlarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (50, 100, 200, 400 ve 600 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik ışık şiddetlerini sırasıyla içi dolu ve boş kare, içi dolu ve boş üçgen ve içi dolu daire temsil eder).



Şekil 4. Farklı ışık şiddetlerinde hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (50, 100, 200, 400 ve 600 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik ışık şiddetlerini sırasıyla içi dolu ve boş kare, içi dolu ve boş üçgen ve içi dolu daire temsil eder).

Tartışma ve Sonuç

50, 100, 200, 400 ve 600 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik ışık şiddetlerinin uygulandığı denemede *H. pluvialis*'in vejetatif büyüme karakteristikleri büyük ölçüde ortaya çıkarıldı.

Gruplarda kuru ağırlık (Şekil 1) ve toplam karoten miktarlarının (Şekil 3) artan ışık şiddetleri ile doğru orantılı olarak arttığı görüldü.

Farklı şiddetlerde aydınlatılan grupların hücre sayıları incelendiğinde en yüksek değere 200 μmol foton/luk grupta (19.73×10^4 hücre ml^{-1}), daha sonra ise sırasıyla 100 μmol foton (16.10×10^4 hücre ml^{-1}), 400 μmol foton (15.90×10^4 hücre ml^{-1}) ve 50 μmol foton/luk (12.73×10^4 hücre ml^{-1}) gruptarda ulaşıldı (Şekil 4). Hücre sayılarında dikkati çeken nokta, hücre sayılarının ilk günün sonunda karanlık periyotta, ışıkların kapatılmasından 7 saat sonra aniden 2 kata yakın artış göstermesiydi. Bu da *Haematococcus* hücrelerinin sabaha karşı bölündükleri fikrini desteklemektedir (Elliot 1934).

Gruplar arasında en yüksek hücre sayısı değerine 200 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik grupta ulaşıldı (19.73×10^4 hücre ml^{-1}), bu şiddetten daha yüksek aydınlatmalarda hücre sayısı tedricen azaldı. Hücre sayılarında bir artış gözlenmeksizin kuru ağırlık miktarının 200 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik ışık şiddetinden daha yüksek aydınlatmalarda da artmaya devam etmesi, birim hücre ağırlığının arttığını gösterir. Bu fenomen, 400 ve 600 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik yüksek ışık şiddetlerinden dolayı hücrelerin çaplarının artması ve hücre duvarının kalınlaşması ile açıklandı.

Güneş ışığı altında ve azot bakımından sınırlı kültürlerde astaksantin birikiminin tetiklenmesi ile birlikte klorofil moleküllerinin yıkıma uğradığı rapor edilmiştir (Boussiba 2000). Çalışmamızda, 65. saatten sonra 50-200 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik aydınlatma aralığında klorofil miktarlarının artan ışık şiddeti ile hızla arttığı ve bu artışın tek yönlü varyans analizi ile test edildiğinde istatistiksel olarak önemli olduğu ($F=8.46$, $P < 0.05$) görüldü. 200-600 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik ışık şiddetlerinde ise klorofil miktarındaki artışın durduğu ve herhangi önemli bir değişikliğin meydana gelmediği ve bunun tek yönlü varyans analizi ile test edildiğinde artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($F=0.19$, $P < 0.05$) (Şekil 2). Yapılan çalışmanın, gerek güneş ışığına oranla çok daha düşük bir şiddette gerçekleştirilmesi, gerekse büyüme ortamının azot içermesi, klorofil miktarının düşmemesinin nedenleri olabilir. Sonraki çalışmalarda, daha yüksek ışık şiddetlerinde azot içeren ve içermeyen kültürlerin kullanılması ile bu sorunun cevabı bulunabilir.

Sonuç olarak beş farklı ışık şiddetinin uygulandığı laboratuvar denemesinde, *Haematococcus* hücrelerinin vejetatif safhada kültür edilebilmesi için optimal ışık şiddeti aralığı 50 - 200 μmol foton m^{-2} sn^{-1} olarak bulunup, en iyi büyümenin 200 μmol foton m^{-2} sn^{-1} lik ışık şiddetinde gerçekleştiği görüldü. Bu aralığın üzerindeki şiddetlerde astaksantin birikiminin tetiklendiği ve hücre sayısının azaldığı görüldü.

Kaynakça

- Ako, H., C.S. Tamaru, 1999. Are feeds for food fish practical for aquarium fish? Intl. Aqua Feeds. 2: 30-36.
 Belarbi E.H., Molina E., Christi Y.A., 2000. Process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from

- microalgae and fish oil. *Enzyme Microbiol Technol.*, 26:516-29.
- Boussiba, S., A. Vonshak, 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *H. pluvialis*, *Plant Cell Physiol.*, 32: 1077-1082.
- Boussiba, S., 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response, *Physiol. Plantarum*, 108: 111-117.
- Davis, B.H., 1985. Carotenoid metabolism in animals: a biochemist's view, *Pure Appl. Chem.*, 57: 679-684.
- Elliot, A.M., 1934. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*, *Archiv. Protistekunde*, 82: 250-272.
- Gökpinar, Ş., 1980. Observations on the culture of a marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (in Turkish), TUBİTAK VII. Bilim Kong., 827-840, Kuşadası, İZMİR.
- Gökpinar, Ş., 1982. Observations on the culture of a marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in different nutrient and salinity concentrations, E.Ü. Fac. of S.Ü., Jour.Ser.B., 6: 77-86.
- Göksan, T., G. Torzillo, M. Sergejevova, M. Sekerkova, M. Verbovikova, Ş. Gökpinar, J. Kopecky, J. Masojidek, 2003. Microalgae cultivation in a new type of photobioreactor-preliminary studies, (in Turkish), XII. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Elazığ, Eylül 2003 (in press).
- Guerin, M., M.E. Huntley, M. Olaizola, 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition, *Trends in Biotechnology*, 21: 210-216.
- Inbarr, J., 1998. *Haematococcus*, The poultry pigmentor, *Feed Mix.*, 6: 31-34.
- Johnson, E.A., G.H. An, 1991. Astaxanthin from microbial sources, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11: 297-326.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes, *Methods Enzymol.* 148: 349-382.
- Masojidek, J., G. Torzillo, M. Koblizek, J. Kopecký, L. Nidiaci, J. Komenda, A. Lukavska, A. Sacchi, 2000. Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress, *J. Appl. Phycol.*, 12: 417-426.
- Rippka, R., J.B. Deruelles, M. Herdman, B. Waterbury, R.Y. Stanier, 1979. Generic assignments, strain history and properties of pure cultures of Cyanobacteria, *J.Gen.Microbiol.*, 111: 1-61.
- Terao, J., 1989. Antioxidant activity of beta-carotene related carotenoids in solution, *Lipids*, 24, 659-662.
- Torrissen, O.J., R. Christiansen, 1995. Requirements for carotenoids in fish diets. *J. Appl. Ichtiol.*, 11: 225-230.
- Vonshak, A., 1997. *Spirulina*: growth, physiology and biochemistry, in: *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell biology and Biotechnology, Vonshak, A. (Ed.), Taylor and Franchis, London, pp. 43-65.