

EGE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA  
PROJE KESİN RAPORU  
EGE UNIVERSITY SCIENTIFIC  
RESEARCH PROJECT REPORT

**PROJE NO: 09-SÜF-022**

(Yüksek Lisans)

**AKUAKÜLTÜRDE KULLANILAN BAZI  
MİKROALG TÜRLERİNDE PİGMENT  
ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU VE  
ANALİZ YÖNTEMLERİ**

**PROJE YÖNETİCİSİ**

Doç. Dr. Yaşar DURMAZ

**ARAŞTIRMACI**

Prof.Dr. Şevket GÖKPINAR

Araş. Gör . A. Çağlar ORUÇ

Gaye Ünal

**Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü**

Faculty of Fisheries

Department of Aquaculture

**Bornova-İZMİR**

**2013**

## ÖNSÖZ

Mikroalglerin gıda zincirindeki önemi anlaşıldıktan sonra, çeşitli türleri akuakültürde kullanılmaya başlanmıştır. Ekonomik değere sahip denizel türlerin yetiştirilmesinde canlı yem kaynağı olarak yararlanılır. Denizel üretim endüstrisinde mikroalgler çift kabukluların tüm evrelerinde, bazı kabukluların larval evrelerinde ve bazı balık türlerinin ilk büyüme evrelerinde doğrudan kullanılır. Ayrıca algler, balık ve kopepodların juvenil evrelerinde besin olarak kullanılan zooplanktonun üretiminde kullanılmaktadır.

Mikroalglerin büyük ölçekli yığın kültürlerinden elde edilen algal biyomas ile bundan çıkarılan proteinler, lipitler, nişasta, gliserol, doğal pigmentler ve biyopolimerler gibi metabolitlere olan ticari ilgi giderek artmaktadır. Birçok bilim adamı, mikroalgleri, zengin bir PUFA (Polyunsaturated fatty acid) kaynağı, vitamini E, pigmentler ve diğer nutrientler (steroller, protein ve amino asit vs) kaynağı olduğunu rapor etmişlerdir.

Kültür balığı üretiminde mikroalg üretimi önemli bir maliyet girdisi oluşturur. Bu nedenle mikroalg üretim maliyetlerinin düşürülmesi çok çalışılan bir konudur. Bu proje kapsamında akuakültür en çok canlı yem olarak kullanılan *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* ve *Tetraselmis suecica* türlerinin için optimum kültür yoğunluğunun tespit edildiği, optimum ışık yolu belirlenmiştir. Böylelikle balık çiftliklerinde bol miktarda kültürü yapılarak canlı yem olarak kullanılan bu türlerin kültür şartlarının pigment oranlarına bağlı olarak optimize edilmesi sağlanarak çiftlikler için daha kaliteli biyomas elde edilmiş olunacaktır. Çünkü hücrelerin ışığı etkin kullanamaması mikroalg üretiminde maliyeti etkileyen en önemli parametredir.

Bu proje kapsamında türlerin sağlanmasında, kültür çalışmalarında gerekli malzeme desteklerinde bulunan AKVA-TEK-SU ÜRÜNLERİ TURİZM SAN. VE TİC. LTD. ŞTİ kuruluşuna teşekkür ederiz.

Doç. Dr. Yaşar DURMAZ

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VI
ÖZET .....	VII
ABSTRACT .....	VIII

1.GİRİŞ .....	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ .....	4
2.1. Algal Kültür Yöntemleri .....	4
2.2. Algal Metabolitler .....	4
2.3. Algal Metabolitleri etkileyen faktörler .....	7
2.4. <i>Nannochloropsis. oculata</i> .....	10
2.4.1. <i>N.oculata</i> 'nın Biyolojisi .....	11
2.4.2. <i>N.oculata</i> 'da Pigmentler .....	12
2.5. <i>Tetraselmis suecica</i> .....	14
2.5.1. <i>Tetraselmis suecica</i> 'nın Biyolojisi .....	15
2.6. <i>Isochrysis galbana</i> .....	16
2.6.1.1. <i>galbana</i> 'nın Biyolojisi .....	17
3.MATERYAL METOD .....	18
3.1. Organizmalar ve Kültür Koşulları .....	18
3.2. Analitik Ölçümler .....	23
3.2.1. Hücre Sayımı .....	23
3.2.2. Kuru Ağırlık Tayini .....	23
3.2.3. Pigment Analizi .....	24
4.BULGULAR .....	25
4.1. <i>Tetraselmis suecica</i> .....	25
4.2. <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	28
4.3. <i>Isochrysis galbana</i> .....	30
5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER .....	32
6.KAYNAKÇA .....	37

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>N. oculata</i> 'nın hücre ince yapısı (Maruyama et al., 1997).....	12
Şekil 2. <i>Tetraselmis suecica</i> 'nın Hücre Yapısı .....	15
Şekil 3. <i>Isochrysis galbana</i> 'nın Hücre Yapısı .....	17
Şekil 4. Cam Panel Biyoreaktör Sistemi .....	18
Şekil 5. Yatay Airlift Tübüler Fotobiyoreaktör .....	20
Şekil 6. Dikey Airlift Tübüler Fotobiyoreaktör.....	21
Şekil 7. Cam Panel Biyoreaktörler (3 cm, 5 cm) (A-B) .....	22
Şekil 8. Cam Panel Biyoreaktörler (10 cm) (A-B).....	23
Şekil 9. <i>Tetraselmis suecica</i> 'nin zamana bağlı hücre sayısı grafiği .....	25
Şekil 10. <i>Tetraselmis suecica</i> 'nin zamana bağlı spesifik büyüme grafiği.....	26
Şekil 11. <i>Tetraselmis suecica</i> 'nin Işık yolu uzunluğuna bağlı kuru ağırlık grafiği.....	27
Şekil 12. <i>Nannochloropsis oculata</i> 'nin zamana bağlı hücre sayısı grafiği. ....	28
Şekil 13. <i>Nannochloropsis oculata</i> 'nin zamana bağlı hücre sayısı grafiği. ....	29
Şekil 14. <i>Nannochloropsis oculata</i> 'nin Tübüler Fotobiyoreaktörde zamana bağlı hücre sayısı grafiği. .....	29
Şekil 15. <i>Isochrysis galbana</i> 'nin zamana bağlı hücre sayısı grafiği.....	31

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. Akuakültürde kullanılan <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> ve <i>Tetraselmis suecica</i> 'nın logaritmik fazda hasat edildiklerindeki kimyasal kompozisyonları .....	4
Tablo 2. F/2 ortamının kimyasal içeriği .....	19
Tablo 3. Solüsyon kullanım oranları .....	19
Tablo 4. <i>T. suecica</i> 'nın Farklı Fotobiyoreaktörlerde Toplam Karoten ve Klorofila Değerleri....	27
Tablo 5. <i>N. oculata</i> 'nın Farklı Fotobiyoreaktörlerde Toplam Karoten ve Klorofila Değerleri ...	30
Tablo 6. <i>I. galbana</i> 'nın Farklı Fotobiyoreaktörlerde Toplam Karoten ve Klorofila Değerleri ...	31

## ÖZ

Bu proje kapsamında, Ege Bölgesinde yer alan akuakültür işletmelerinde kullanılan *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*'nın kültür şartlarının pigment oranlarına bağlı olarak optimize edilmesi amaçlanmıştır. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Urla Tesisi plankton kültürü laboratuvarında; 3 cm, 5 cm, 8 cm ve 10 cm ışık ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörlerde ve tübüler fotobiyoreaktörde *N. oculata*, *I. galbana* ve *T. suecica*, türünün kültürüleri yapıldı.

*I. galbana* ve *T. suecica*, türlerinin ışığa bağlı gelişimin araştırılması denemesinde en yüksek hücre yoğunluğu 3 cm'lik ışık yolu uzunluğuna sahip cam panelde elde edildi ( $13,81 \times 10^6$  hücre  $ml^{-1}$   $12,44 \times 10^6$  hücre  $ml^{-1}$ ). *N. oculata* türünün ışığa bağlı büyümesinde ise 5cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde  $232 \times 10^6$  hücre  $ml^{-1}$  olarak tespit edildi. *T. suecica* *N. oculata* *I. galbana* türlerinde en yüksek toplam karoten değerlerine 3 cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde 525,4  $\mu g/g$  1235,27  $\mu g/g$  7920,1  $\mu g/g$  olarak elde edildi. Klorofil a değerlerinde ise ışık yolu uzunluğunun artışı ile paralel olarak değerlerde artış olduğu saptandı ve sırasıyla en yüksek klorofil a değeri 5851,9  $\mu g/g$ , 9187,10  $\mu g/g$  ve 1769,5  $\mu g/g$  olarak tespit edildi. Tübüler fotobiyoreaktörde yapılan denemede ise toplam karoten değeri 2334,00  $\mu g/g$  iken klorofil a değeri ise 7335,45  $\mu g/g$  olarak tespit edildi.

Akuakültür çiftliklerinde canlı yem olarak kullanmak için yoğun bir şekilde kültürü yapılan bazı türlerin biyokimyasal yapısını değiştiren etkenlerden bir bölümü açığa çıkarılmıştır. Bu çalışmadaki büyüme sonuçları gösteriyorki ışık yolu uzunluğu *N. oculata*, *I. galbana* ve *T. suecica* türlerinin büyümelerini etkileyen parametrelerden olmuştur.

**Anahtar Kelimeler: Mikroalg, pigment, akuakültür, biyoreaktör**

## ABSTRACT

In this project, it was aimed to optimize culture conditions of *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, which are used in aquaculture operations in Aegean Region, depending on pigment rates. At the plankton culture laboratory at the Urla Facility of Ege University Faculty of Fisheries, cultures of species *N. oculata*, *I. galbana* and *T. suecica* were made in photobioreactors with optical path lengths of 3 cm, 8 cm, and 10 cm, and in tubular photobioreactors.

In the experiment within the research on the light-dependent growth of *I. galbana* and *T. suecica*, the highest cell density was observed at the glass panel with the optical path length of 3 cm ( $13,81 \times 10^6$  cell ml<sup>-1</sup>  $12,44 \times 10^6$  cell ml<sup>-1</sup>). As for the light-dependent growth of *N. oculata*, it was observed in the photobioreactor with the optical path length of 5 cm as  $232 \times 10^6$  cell ml<sup>-1</sup>. The highest carotene values for *T. suecica*, *N. oculata*, and *I. galbana* were observed as 525,4 µg/g 1235,27 µg/g 7920,1 µg/g in the photobioreactor with the optical path length of 3 cm. As for the chlorophyll a values, increase in values was observed in parallel with increase in optical path length and the highest chlorophyll a value was found to be as 5851,9 µg/g, 9187,10 µg/g and 1769,5 µg/g, respectively. At the experiment in tubular photobioreactor, while the total carotene value was 2334,00 µg/g, chlorophyll a value was found as 7335,45 µg/g.

Some of the factors affecting the biochemical structure of some microalgae species, which is intensively culture to be used in aquaculture farms as live feed, were revealed. The growth results in this research show that optical path length is among the parameters affecting the growth of *N. oculata*, *I. galbana* and *T. suecica*.

**Keywords: Microalgae, pigment, aquaculture, bioreactor**

## 1. GİRİŞ

Algler, gündüz periyodunda atmosferdeki karbondioksidi büyük bir jeneratör gibi emmekte ve insan ile diğer canlıların yaşamı için hayati öneme sahip olan oksijeni üretmektedirler. Alglerden elde edilen biyomasın yanı sıra hücresel olarak bünyelerinde biriktirdikleri kıymetli metabolitlerin yüksek ticari değere sahip olması ve bazı türlerin çevre ile ilgili uygulamalarda kullanılabilmesi mikroalglerle mevcut ilgiyi daha da arttırmakta ve biyoteknolojide yoğun araştırmaların yapıldığı bir alan haline getirmektedir.

Algler, hücre içinde protein, pigment, yağ asitleri, vitaminler, antibiyotikler, hidrokarbonlar, polisakkaritler ve daha pek çok metabolitleri yüksek miktarlarda doğal olarak biriktirebilmektedirler. Bu nedenle mikroalglerden yararlanmak için insanoğlu 100 yıldan fazla bir zamandır araştırmalar yapmaktadır. Alg kültürleriyle ilgili ilk çalışmalarda hedeflenen esas amaç, tek hücre proteinini elde etmektir. İlk olarak 1890 yılında Beijerinck, *Chlorella vulgaris*'in agar üzerinde kolonilerini elde etmiş ve kültürünü yapmıştır. O yıllarda alg kültürleriyle tek hücre protein üretiminin dünyadaki protein açığını kapatacak büyük bir alternatif olduğuna inanılıyordu. Dolayısıyla konuya sadece bu açıdan yaklaşılması nedeniyle, çalışmalar belli bir noktaya kadar gelmiş ve arzu edilen sonuçlar elde edilemeyince hayal kırıklığına uğramıştır. 1919 yılında Otto Warburg, *Chlorella* kültürü üzerindeki araştırmaları daha da geliştirmiştir. 1940-1950 yıllarında Almanya ve Japonya'daki daha sonraları da ABD'deki araştırmacılar fototrofik mikroalglerin yığın üretiminde temel kültür özelliklerini çalışmışlardır. Böylelikle, alg kültürlerinin sahip olduğu pek çok avantajının (yüksek fotosentetik verim, yıl boyu işlem yapma olanağı, yüksek bitkisel protein içeriği v.s.) olduğu tespit edildi (Gökpınar, 1991). Halen birçok türün kimyasal kompozisyonları ve metabolizmaları üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

Mikroalglerin gıda zincirindeki önemi anlaşıldıktan sonra, çeşitli türleri akuakültürde kullanılmaya başlanmıştır. Ekonomik değere sahip denizel türlerin yetiştirilmesinde canlı yem kaynağı olarak yararlanılır. Denizel üretim endüstrisinde mikroalgler çift kabukluların tüm evrelerinde, bazı kabukluların larval evrelerinde ve bazı balık türlerinin ilk büyüme evrelerinde doğrudan kullanılır. Ayrıca algler, balık ve



kopepodların juvenil evrelerinde besin olarak kullanılan zooplanktonun üretiminde kullanılmaktadır. Birçok alg türü denizel canlıların üretiminde kullanılmasına rağmen, hepsinin gelişimi aynı oranda desteklemez. Bu durum, farklı büyüklükler, sindirilebilirlik ve özellikle besinsel değerlerinden ileri gelir (Zittelli et al., 2004).

Mikroalglerin büyük ölçekli yığın kültürlerinden elde edilen algal biyomas ile bundan çıkarılan proteinler, lipitler, nişasta, gliserol, doğal pigmentler ve biyopolimerler gibi metabolitlere olan ticari ilgi giderek artmaktadır. Birçok bilim adamı, mikroalgleri, zengin bir PUFA (polyunsaturated fatty acid= çoklu doymamış yağ asitleri) kaynağı, vitamini E, pigmentler ve diğer nutrientler (steroller, protein ve amino asit vs) kaynağı olduğunu rapor etmişlerdir (Bandarra et al., 2003). Ayrıca mikroalglerin kontrollü şartlarda geniş ölçekli üretimi, gıda endüstrisinde, karasal ve sucul canlıların beslenmesinde toz yem ve canlı yem olarak kullanılmasının yanısıra, azot ve fosfor gibi çözünmüş nutrientler bakımından düşük düzeyde, başka bir deyişle biyolojik yolla arıtılmış atık su eldesi bakımından önemlidir (Gökpınar, 1991; Cirik ve Gokpınar, 1999; Ötleş and Pire, 2001).

Alg kültürlerinin sahip olduğu pek çok avantajının (yüksek fotosentetik verim, yıl boyu işlem yapma olanağı, yüksek pigment içeriği v.s.) olduğu tespit edildi. Proje hazırlık çalışmaları sırasında, konu ile ilgili ulusal ve uluslararası alanda yapılmış olan araştırmalar incelenmiş olup, halen birçok türün kimyasal kompozisyonları ve metabolizmaları üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

Algal biyoteknolojideki gelişmelere rağmen mikroalg türlerinin kültürlerinde çeşitli güçlüklerle karşılaşmaktadır. Mikroalg kültürlerinde biyomasın biyokimyasal kompozisyonu ve yağ asitleri değerleri, çevresel faktörler, besin ortamı, sıcaklık, tuzluluk, pH, ışık gibi büyüme koşullarına bağlıdır (Sukenik, 1991; Cohen et al., 1988; Brown et al., 1989; Roessler, 1990; Lourenco et al., 2002; Hu, 2004).

Mikroalgler çeşitli antioksidan vitaminler bakımından oldukça zengindir. Bu nedenle mikroalgler, en çok üzerinde çalışma yapılan biyolojik materyallerden biri haline gelmiştir. Günümüzde bu antioksidan bileşiklerden bir kısmı ticari olarak üretilmekte ve büyük talep görmektedir. Algler, fotosentez ile güneş enerjisini organik

bileşiklere dönüştüren bitkisel bir yapıdır. Alglerin çoğu, vitaminler ya da pigmentler gibi ticari değeri olan bileşikleri yüksek oranda üretebilmektedir.

Algal biyoteknolojideki gelişmelere rağmen mikroalg türlerinin kültürlerinde çeşitli güçlüklerle karşılaşmaktadır. Mikroalg kültürlerinde büyümenin yanı sıra biyomasın biyokimyasal kompozisyonu çevresel faktörler, besin ortamı, sıcaklık, tuzluluk, pH, ışık gibi büyüme koşullarına bağlıdır. Bundan dolayı bu çalışmada akuakültür işletmelerinde de yoğun miktarda kullanılan mikroalg türlerinin(*Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*) kültür koşullarında yapılacak değişikliklerle(ışık, sıcaklık, tuzluluk, fotobiyoreaktör, kültür ortamı vb) maksimum düzeyde vitamin ve pigment değeri eldesi için optimum kültür koşullarının tespit edilmesi amaçlanmaktadır. En yüksek biyomasın ve pigment seviyesinin elde edildiği kültür ortamında endüstriyel üretimde uygulanabilecek fotobiyoreaktörlerin tespiti yapılacaktır. Ayrıca, balık çiftliklerinde bol miktarda kültürü yapılarak canlı yem olarak kullanılan bu türlerin kültür şartlarının pigment oranlarına bağlı olarak optimize edilmesi sağlanarak çiftlikler için bir protokol çıkarılması amaçlanmıştır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Algal Kültür Yöntemleri

*N. oculata*, *T. suecica* ve *I. galbana* yığın kültürleri farklı hacim ve yöntemlerde; laboratuvarında 50-500 litrelik naylon torbalarda ya da silindir fiberglass tanklarda yapay ışıklandırma kullanılarak (Fulks and Main, 1991), dışarı kültürlerinde ise havuz ve büyük tanklarda (Okauchi, 1991; Sukenik, 1999) yapılmaktadır.

### 2.2. Algal Metabolitler

Protein, karbonhidrat, yağ ve mineral maddeler algal hücrenin kuru ağırlığını %75-95 dir. Tablo 1’de alglerin toplam kimyasal kompozisyonu gösterilmiştir.

Yağ asitleri alglerin yağ parçacıklarının büyük oranda bileşenini oluşturmaktadır. Ağırlıktaki toplam yağlarının %20-40’nı oluşturmaktadır (Cohen, 1986). Yağ asitleri gliserollerin esterleşmesi ile meydana gelmektedir ve tri-gliserol ve di-gliserol, fosfolipid ve glükolipidler bulunmaktadır.

Tablo 1. Akuakültürde kullanılan *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata* ve *Tetraselmis suecica*’nın logaritmik fazda hasat edildiklerindeki kimyasal kompozisyonları (% kuru ağırlık) (Peirson, 1983).

Türler	Protein (%)	Karbonhidrat (%)	Yağ (%)	Mineral (%)
<i>Isochrysis galbana</i>	41	5	21	13
<i>Nannochloropsis oculata</i>	52	16	27	5
<i>Tetraselmis suecica</i>	39	8	7	23

Farklı koşullarda kùltùrlenene veya farklı büyüme safhalarında hasat edilen mikroalglerin biyokimyasal bileşimleri değişebilir. Bu algdeki EPA ve DHA seviyeleri üzerine çeşitli araştırcıların raporlarındaki sonuçlarda farklı eğimler göstermiştir (Volkman et al., 1981; Servel et al., 1993; Vazhappilly ve Chen 1998; Lui ve Lin, 2001). Bu datalar yağ asitlerinin kùltür koşullarına bağlı olduğuna dair bir kanıt olarak gösterilebilir.

Doymuş yağ asitleri yeşil alglerdeki toplam yağ asitlerinin yaklaşık % 20-35, iken tek doymamış yağ asitleri %20-30 arasındadır. Toplam çok doymamış yağ asitleri bakımından en iyi *Tetraselmis suecica* iken *Isochrysis galbana* 20:5w3 (EPA) ve 22:6w3 (DHA) bakımından en yüksek değere sahiptir. Özellikle çok doymamış yağ asitlerinde EPA ve DHA denizel hayvanların beslenmesinde önemli yağ asitlerindedir.

*Isochrysis galbana* ve *Tetraselmis suecica* zengin PUFA kaynağı özellikle EPA olarak tanımlanmıştır (Grima et al., 1994; Fidalgo et al., 1998) Bir çok sucul hayvanın ticari olarak yetiştirilmesinde besin çeşitli olarak kullanılmaktadır.

Mikroalglerin çoğu çeşitli doğal pigmentlerin mükemmel bir kaynağıdır. Mikroalglerin ana pigmentleri yeşil klorofil, sarı, turuncu ve kırmızı karotenoyitlerdir. Bunalar hücrenin kuru ağırlığını %0,5-5 ni oluşturular.

Beta karoten yada provitamin A alglerde en yaygın karoteneyittir. Yeşil alglerde en yüksek konsantrasyonda bulunur. Alglerin kuru ağırlığının %1 kadar bulunması yanında bu seviye %10 a kadar özellikle yüksek tuzluluklara toleranslı *Dunaliella salina*'da toplanabilmektedir Osmoregölasyon işlemiyle pek çok denizel mikroalg türü aşırı tuzluluklarda yaşayabilir. Bu işlem sonunda değerli kimyasalların pek çoğu üretilebilir. *Dunaliella salina* doymuş NaCl solüsyonunda bile yaşayabilir ve kuru ağırlığının % 40'dan fazla glycenol yanısıra % 10'dan fazla beta-karoten biriktirdiği rapor edilmiştir (Ben-Amotz et al., 1985).

Mikroalg zengin yağ asitleri kompozisyonunun yanısıra zengin vitamin ve protein kaynağı olarak kullanılmaktadır. Özellikle mikroalg balık yetiştiriciliğinde balıkentinin yağ asitleri bakımından ve vitamin açısından zenginleştirilmesinde canlı yem kaynağıdır. Ayrıca mikroalg yağ asitleri, protein ve vitamin gibi besinsel değeri

nedeniyle dünyada, insan besini olarak doğrudan yâda gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Çünkü yağ asitleri, vitamin vb. bakımından zengin gıdaların tüketilmesi sonucunda kalp damar rahatsızlıklarında, yüksek tansiyon ve çeşitli sağlık problemlerinde oldukça iyi derecede olumlu etkiler verdiği yapılan çalışmalar ile ispat edilmiştir.

Mikroalg türleri doğal antioksidan olması özelliğiyle insan sağlığı ve balık dış satımında renklenme açısından büyük önem taşıyan, dolayısıyla da yüksek ticari değere sahip olan vitamin ve pigment gibi bileşikleri yüksek oranda içermektedir. Karotenoidler ve klorofiller, fotosentez yapan organizmalarda bulunan yapılardır ve bu hücrelerle beslenen hayvanlarda depolanan karotenoidlerin kaynağıdır. Karotenoidler sadece fitoplankton, algler, bitkiler ve sınırlı sayıdaki mantar ve bakteriler tarafından üretilen, yağda çözünebilir moleküllerdir (Horrobin,1999; Baysal ve Ersus, 1999). Bitki ve alglerde karotenoidler klorofil ve diğer pigmentlerle beraber fotosentetik işlemlerde hayati bir öneme sahiptir. Hayvan vücudunda karotenoidlerin bir bölümünün retinole dönüştüğü, diğer bölümünün ise yumurta sarısı, süt ve organellerde yağ içinde yer aldığı bilinmektedir (Baysal ve Ersus, 1999). Primer karotenoidler uygun büyüme koşulları altında sentez edilebilen pigmentlerdir. Sekonder karotenoidler ise özellikle yüksek ışık şiddeti ve azot yetersizliği gibi ekstrem koşullar altında üretilir. Özellikle besin sınırlaması sonucunda, algin renginin yeşilden kırmızı-turuncu renge dönüşü, sekonder karotenlerin artışı ile ilişkilidir.

Karotenler biyolojik antioksidan olarak hücre çekirdiğini ve dokuları zararlı etkenlerden koruduğu için insan sağlığı açısından önemlidir (Yanar et al., 2004).  $\beta$  karoten, lutein, zeaksanthin gibi karotenler halen kanser tedavisinde uygulanmaktadır ve bir çok araştırmacı karotenoidleri, insan hastalıklarına karşı koruyucu olarak önermektedirler (Richmond, 2000; Ziegler et al., 1996). Ayrıca lutein, yaşlılığa bağlı olarak ortaya çıkan retina ve katarakt hastalıkları riskini azaltmaktadır (Lubián et al., 2000). Çünkü provitamin-A aktivitesi gösteren karotenoidlerin bir bölümü ince bağırsaklarda karoten oksijenaz enzimiyle retinol, retinal ve retinoik aside dönüşerek bağışıklık sistemi, görme ve epitel dokunun oluşturması ve yenilenmesinde rolü vardır (Baysal ve Ersus, 1999).

Beta karoten yağda çözünen bir pigmenttir ve yağda çözünen Vit-A'nın hammaddesidir. Oksidasyon ile oluşan serbest radikalleri scavenging etki ile süpürür ve oksidasyonun neden olduğu hastalıklara karşı korur. Karotenoidler arasında lutein'in antioksidan aktivitesi  $\alpha$ - veya  $\beta$ -karoten kadar yüksek değildir. Ancak karotenoidlerin hücre için antioksidan aktivitesi karışım yüzdelerine bağlıdır. Karotenoidlerin antioksidan aktivitelerine bağlı olarak kanser oluşumunu inhibe ettikleri pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Bazı karotenoidlerin UV ışık ve kimyasalların neden olduğu tümörleri inhibe ettikleri ve immun cevabı arttırdıkları, yüksek antioksidan aktiviteye sahip Vit-E ve  $\alpha$ -tokoferol'ün ise cildi UV ışığın neden olduğu hasarlara karşı koruduğu gösterilmiştir.

### **2.3. Algal Metabolitleri etkileyen faktörler**

Algal biyoteknolojideki gelişmelere rağmen mikroalg türlerinin kültürlerinde çeşitli güçlüklerle karşılaşmaktadır. Mikroalg kültürlerinde biyomasın biyokimyasal kompozisyonu ve yağ asitleri değerleri, çevresel faktörler, besin ortamı, sıcaklık, tuzluluk, pH, ışık gibi büyüme koşullarına bağlıdır (Sukenik, 1991; Cohen et al., 1988; Brown et al., 1989; Roessler, 1990; Lourenco et al., 2002; Hu, 2004). Örneğin, yüksek ışık şiddeti altında yapılan kültürlerde PUFA değerlerinde bir azalma (Sukenik et al., 1993a), düşük ışık şiddetlerinde ise PUFA değerlerinde artış olmaktadır (Seto et al., 1992; Thompson et al., 1989).

Azot, karbondan sonra biyomas üretimi için en önemli besin maddesidir. Azot, türlere bağlı olarak hücre kuru ağırlığının %1 ile %10'nu oluşturur. Azotun çeşitli formları mikroalg kültürleri için uygundur. Kültürlerde hücreler tarafından kullanılabilen en önemli inorganik azot kaynakları nitrat azotu ( $\text{NO}_3^-$ -N), amonyum azotu ( $\text{NH}_4^+$ -N) ve üre azotu ( $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ -N)'dur (Kaufman et al 1983; Price et al 1985; Kristangen and Lund 1989; Gökpınar, 1991; Levasseur et al., 1993; Grobbelaar, 2000). Fitoplankton büyümesini sınırlayan en önemli nutrientlerin özellikle doğada dominant halde bulunan amonyum ve nitrat gibi inorganik azot kaynakları olduğu saptanmıştır (Gökpınar, 1991) Tüm azot kaynakları hücrenin yapıtaşları olan aminoasitlerin ve dolayısıyla proteinlerin yapısına girmesinden ötürü yaşamsal değere sahiptir. Ayrıca mevcut azotun yağ asitleri üzerinde çok büyük etkisi olduğu bilinir. Azot enzimlerin ve proteinlerin yapıtaşı olduğu için, yağ asitleri sentezi, algal hücrelerin protein

fonksiyonlarında ve yapılaşmasında gereklidir (Harwood, 1988; Grobbelaar, 2000). Azot kaynakları ve konsantrasyonları, algal kültürlerde büyümeyi ve biyokimyasal kompozisyonu etkilemekte ve özellikle yağ asitleri değerlerinde ve karoten miktarlarında değişikliklere sebep olmaktadır (Xu et al., 2001, Lourenco et al., 2002). Azot atomu, karbonhidratlar ve yağlar üzerine etkilidir (Zou and Richmond, 1999, 2000). Bunun yanısıra azot sınırlamasının temelinde hücrel yağ asitleri ile hücrel büyüme ilişkili olduğundan dolayı, yağ asitleri bakımından zenginleştirmede azot sınırlaması etkilidir. Mikroalglerin kültüründe azot sınırlaması hücre sayısı ve klorofil a miktarlarında azalmaya neden olurken, mikroalglerin biyokimyasal yapısındaki yağlar gibi organik karbon bileşikleri oranlarında artış olmaktadır. Bununla birlikte mikroalgin renginde azalma (klorofil-a oranı azalırken, karoten artar) saptanmıştır (Shifrin and Chisholm, 1981; Sukenik et al., 1989).

Bir çok araştırmacı tarafından azot kaynağı ve konsantrasyonunun, algal kültürlerde büyüme ve biyokimyasal kompozisyonu etkileyen en önemli faktörlerden olduğu belirtilmiştir (Utting, 1985; Brown et al., 1989; Fidalgo et al., 1995; Xu et al., 2001). Farklı büyüme fazlarında biyokimyasal kompozisyon üzerine azot kaynaklarının etkisini çalışmak, akuakültürde yaygın bir şekilde kullanılan *N. oculata* türünün metabolizması üzerine çok önemli bilgiler verebilir. Bu bilgiler, akuakültürde, yetiştiriciliği yapılan organizmalar için besleyici değeri daha yüksek kültürlerin yapılmasına yardımcı olacaktır. Bu çalışmada çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA), EPA ve ARA (arachidonic asit, 20:4 $\omega$ 6), karotenoid ve klorofil pigmenti bakımından zengin bir tür olan *N. oculata* çalışıldı. Çalışmada azot kaynakları, azot sınırlamasının ve farklı büyüme fazlarının *N. oculata*'nın gelişimi ve biyokimyasal kompozisyonuna (toplam karoten, klorofil-a, yağ asitleri ve  $\alpha$ -tokoferol) etkisi araştırıldı.

Örneğin, yüksek ışık şiddeti altında yapılan kültürlerde PUFA değerlerinde bir azalma (Sukenik et al., 1993), düşük ışık şiddetlerinde ise PUFA değerlerinde artış olmaktadır (Seto et al., 1992; Thompson et al., 1989). Azot kaynakları ve konsantrasyonları, algal kültürlerde büyümeyi ve biyokimyasal kompozisyonu etkilemekte ve özellikle yağ asitleri değerlerinde ve karoten miktarlarında değişikliklere sebep olmaktadır (Xu et al., 2001, Lourenco et al., 2002). Bunun yanısıra mikroalglerin

kültüründe azot sınırlaması hücre sayısı ve klorofil a miktarlarında azlamaya neden olurken, mikroalglerin biyokimyasal yapısındaki yağlar gibi organik karbon bileşikleri oranlarında artış olmaktadır. Bununla birlikte mikroalgin renginde azalma (klorofil-a oranı azalırken, karoten artar) saptanmıştır (Shifrin and Chisholm, 1981; Sukenik et al., 1989).

Fotoototrofik türlerin kültürlerinde ışık en önemli parametredir. Algal kültürlerde ki büyüme doğrudan ışık ile sınırlanır ve spesifik büyüme hızındaki artış ta direkt olarak ışık rejimine bağlıdır. Algler de bitkilerde olduğu gibi fotosentez yaparak inorganik maddelerden organik madde üretirler. Fotosentezin kaynağı ışıktır. Fotosentezin verimliliği ışığın yoğunluğuna, şiddetine, spektral kalitesine ve aydınlatma süresine göre değişkenlik göstermektedir.

Fotosentezde etkili olan ışık dalga boyu 400-700 nm. arasındadır. Bu değere PAR (Photosynthetically Active Radiation) denir. Spektral kalitesi en yüksek ışık güneş ışığıdır. Kullanılan suni ışık kaynaklarının ortamı ısıtmamasına dikkat edilmelidir. Bu nedenle florsan lambalar yaygın olarak kullanılmaktadır. Aydınlatmadaki ışık sınırı 1000-10000 lüks olup ortalama 2500-5000 lüks değerleri arasındadır. Kültür yoğunluğu ve derinliği arttıkça ışık şiddeti arttırılmalıdır. Kültürlerde foto-periyot uygulanabileceği gibi sürekli aydınlatmada yapılabilir. Optimal şartlarda hücre yoğunluğu artan kültürlerde ışığın alt katmanlara geçmemesi yani tüm hücrelerin ışıktan verimli şekilde yararlanamaması biyomas artışını sınırlar.

Fotobiyoreaktör tasarımında amaç güneş enerjisi gibi yüksek seviyeli ışık kaynağının optimal kullanımı için kültür sistemlerinin yapılmasıdır (Richmond,1982). Mikroalgal üretimde ışık yolu uzunluğu, optimal hücre yoğunluğu ve aydınlık/karanlık döngüsü doğrudan etkilidir(Hu et al.,1998a). Fotobiyoreaktör tasarımında ışık rejiminin yanı sıra, ışık yolu uzunluğu alansal çıkış hızında çok önemlidir. Bu nedenle her tür için optimal ışık yolu uzunluklarına sahip biyoreaktörlerde üretim yapılarak maksimum verimlilikte ürünler elde edilebilir

Alg kültürleri bir ışık kaynağına gereksinim duyarlar. Çünkü ışık fotosentezin enerji kaynağıdır. Hücreler ışık karşısında inorganik karbonu metabolize ederek diğer nütrientlerle birlikte organik madde sentezlerler. Kültürlerin aydınlatılmasında dikkate



alınan faktörler: spektral aralık, spektral kalite, ışık şiddeti ve foto-peryot' tur. Uygulanan ışık şiddeti kültürün derinliğine ve yoğunluğuna bağlıdır. Kültür derinliği ve yoğunluğu artarsa ışık şiddeti arttırılmalıdır. Bu artış doygun ışık yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra da devam ederse fotosentez inhibasyonu başlar. Düşük ışık yoğunluklarıysa fotosentezi sınırlayıcı bir faktör olarak ortaya çıkar. Bu sınırlayıcı etki, ortamdaki hücre konsantrasyonunun bir sonucu olarak hücrelerin birbirini gölgelemesi ve ışığa doygun hale gelen hücrelerin daha fazla ışık enerjisi kullanmaması nedeniyle ortaya çıkar. Direk güneş ışığı alg kültürleri için inhibe edici etki yapar. Bu nedenle kültür kapları güneş ışığını direk almayan ortamlara konulur. Kültür uygulamaları suni aydınlatma kaynaklarıyla yürütülecekse, bunların güneş ışığına eşdeğer kaynaklar olmasına dikkat edilmelidir. Bu işlem için genellikle florasan lambalar kullanılır. Farklı tipteki bu florasan lambalarının verdiği ışık şiddeti de farklıdır. Bunların hesaplanıp, uygun ışık kaynaklarının seçilmesi gerekmektedir. Geniş ölçekli mikroalg kültürlerinin yapılabilmesi iki faktöre bağlıdır. Bunlar üretim maliyetinin mümkün olduğu kadar düşürülmesi ve yüksek ticari kalitede biyomas elde etmektir. Bunun için yeni fotobiyoreaktör tasarımları yapılması gerekmektedir.

*Nannochloropsis* Eustigmatophyceae sınıfı üyesi olup önceden “deniz chlorella”sı olarak adlandırılır. Daha sonradan 1981 yılında Hibbered tarafından *Nannochloropsis* olarak adlandırılmıştır (Maruyama et al., 1986; Rodolfi et al., 2003). Bu mikroalg genellikle balık çiftliklerinde rotifer besini ve yeşil su tekniği için balık larvası tanklarında kullanılır (Lubzens et al., 1995; Rodolfi et al., 2003; Zittelli et al., 2004; Hu, 2004). *Nannochloropsis* klorofil *b*, hücresel ksantofil pigmentlerinin kompozisyonunun yanısıra, yağ asitlerinden özellikle de yüksek EPA (Eicosapentaenoic asit, 20:5 $\omega$ 3) içeriği (Maruyama et al., 1986) steroller (Patterson et al.,1994; Gladu et al., 1995) gibi yüksek yapıları ile tanımlanmaktadır (Owens et al.,1987; Volkman et al., 1993).

#### **2.4.Nannochloropsis. oculata**

*Nannochloropsis oculata*'nın sistematikteki yeri şu şekildedir:

Domain *Eukaryota*

Kingdom *Chromista* Cavalier-Smith, 1981

Subkingdom *Chromobiota* Cavalier-Smith, 1991

Infrakingdom *Heterokonta* Cavalier-Smith, 1986

Phylum *Ochrophyta* Cavalier-Smith, 1986

Subphylum *Phaeista* Cavalier-Smith, 1995

Infraphylum *Chrysista* Cavalier-Smith, 1986

Superclass *Limnista* Cavalier-Smith, 1996

Class *Eustigmatophyceae* Hibberd & Leedale, 1970

Genus *Nannochloropsis*

*Nannochloropsis oculata* Hibberd 1981

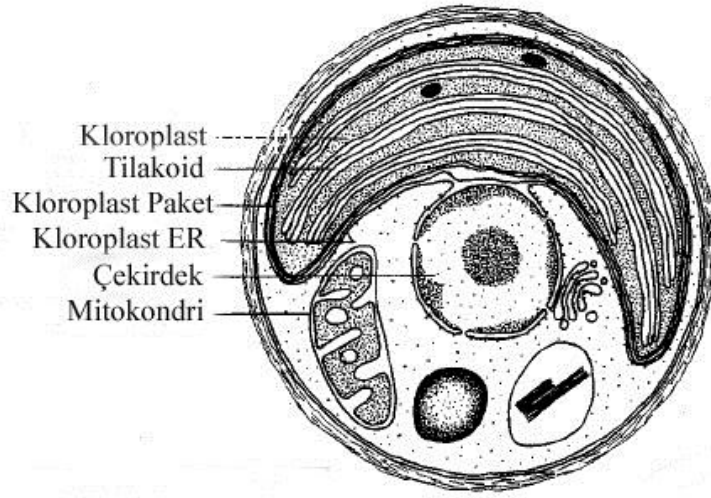
#### **2.4.1. *N. oculata*'nın Biyolojisi**

*N. oculata* ilk olarak Hibberd (1981) tarafından *Monodopsidaceae* ailesi içindeki *Eustigmatophyceae* sınıfı içinde tanımlanmıştır (Maruyama et al., 1986; Rodolfi et al., 2003; Zittelli et al., 2004)

*Nannochloropsis*'in dört türü tanımlanmıştır;

- *N. oculata* (Hibberd, 1981)
- *N. salina* (Hibberd, 1981)
- *N. gaditana* (Lubian, 1982 ve daha sonra Karlson et al., 1996)
- *N. granulata* sp.

*N. oculata* 2-4 µm boyutlarında ince bir hücre duvarı ile çevrelenmiş, bir ya da çok sayıda uzun ya da oval kloroplastlar, bir çekirdek ve bir kaç mitokondriye sahiptir. Kloroplastlar düzgün aralıklardaki lamellerden oluşan değişken sayıdaki tilakoidlerden meydana gelmişlerdir. Pirenoid ve nişasta taneciği yoktur. Kloroplast membranı ve çekirdek zarfları süreklidir. Sitoplazma içinde lameller ile tamamlanmış boşluklar yer almaktadır (Sukenic et al., 1989; Maruyama et al., 1997).



Şekil 1. *N. oculata*'nın hücre ince yapısı (Maruyama et al., 1997)

#### 2.4.2. *N. oculata*'da Pigmentler

Karotenoidler ve klorofiller, fotosentez yapan organizmalarda bulunan yapılardır ve bu hücrelerle beslenen hayvanlarda depolanan karotenoidlerin kaynağıdır. Karotenoidler sadece fitoplankton, algler, bitkiler ve sınırlı sayıdaki mantar ve bakteriler tarafından üretilen, yağda çözünebilir moleküllerdir (Horrobin,1999; Baysal ve Ersus, 1999). Bitki ve alglerde karotenoidler klorofil ve diğer pigmentlerle beraber fotosentetik işlemlerde hayati bir öneme sahiptir. Hayvan vücudunda karotenoidlerin bir bölümünün retinole dönüştüğü, diğer bölümünün ise yumurta sarısı, süt ve organellerde yağ içinde yer aldığı bilinmektedir (Baysal ve Ersus, 1999).

Karotenler biyolojik antioksidan olarak hücre çekirdiğini ve dokuları zararlı etkenlerden koruduğu için insan sağlığı açısından önemlidir (Yanar et al., 2004).  $\beta$  karoten, lutein, zeaksanthin gibi karotenler halen kanser tedavisinde uygulanmaktadır ve bir çok araştırmacı karotenoidleri, insan hastalıklarına karşı koruyucu olarak önermektedirler (Richmond, 2000; Ziegler et al., 1996). Ayrıca lutein, yaşlılığa bağlı olarak ortaya çıkan retina ve katarakt hastalıkları riskini azaltmaktadır (Lubián et al., 2000). Çünkü provitamin-A aktivitesi gösteren karotenoidlerin bir bölümü ince bağırsaklarda karoten oksigenaz enzimiyle retinol, retinal ve retinoik aside dönüşerek bağışıklık sistemi, görme ve epitel dokunun oluşturması ve yenilenmesinde rolü vardır (Baysal ve Ersus, 1999).

*N. oculata* türünde klorofil-a,  $\beta$ -karoten, viyolaksantin ve vaukheriksantin ana pigmentlerdir. Ayrıca bu alg türü kantaksantin ve astaksantin gibi sekonder karoten gruplarında içermektedir (Lubián et al., 2000).

Primer karotenoidler uygun büyüme koşulları altında sentez edilebilen pigmentlerdir. Sekonder karotenoidler ise özellikle yüksek ışık şiddeti ve azot yetersizliği gibi ekstrem koşullar altında üretilir. Özellikle besin sınırlaması sonucunda, algin renginin yeşilden kırmızı-turuncu renge dönüşü, sekonder karotenlerin artışı ile ilişkilidir. *N. oculata* ve *N. salina* türlerinde sekonder karotenlerden kantaksantin ve astaksantin oranlarının, kültür yaşı ile doğru orantılı olarak arttığı ve toplam pigmentler içinde viyolaksantin'in %60 olduğu bildirilmiştir. (Owens et al.,1987; Lubián et al., 2000).

Sukenik et al., (1989) *N. oculata* ile yaptıkları çalışmalarında üç farklı ışık şiddetinin (35, 290 ve 350  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) klorofil-a ve toplam karoten miktarlarına etkisini incelemişler, ışık şiddetinin artışına bağlı olarak klorofil-a ve toplam karoten değerlerinde bir azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Lubián et al., (2000) *N. oculata*'nın ticari pigmentlerini viyolaksantin (%48.9) ve vaukheriksantin (%45.3) olarak tespit etmişlerdir. Örnek alma zamanı 10. günden 20. güne çıkartıldığında viyolaksantin değerinde azalma olurken vaukheriksantin değerinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada en yüksek klorofil-a değeri 168.6  $\mu\text{g} (10^6 \text{ hücre})^{-1}$  olarak 20. günde tespit etmişlerdir. Erken örnek alma döneminde *N. oculata* da bu değeri 116.4  $\mu\text{g} (10^6 \text{ hücre})^{-1}$  olarak rapor etmişlerdir.

Akuakültür, gıda üretimi çalışmalarında hızla gelişen sektörlerden biridir. Mikroalglerin gıda zincirindeki önemi anlaşıldıktan sonra, akuakültürde kullanılmaya başlanmış ve ekonomik değere sahip midye, balık ve krustase türlerinin kültürlerinde canlı yem olarak yararlanılmaktadır. Deniz kültür endüstrisinde mikroalgler çift kabukluların tüm evrelerinde, bazı kabukluların larval evrelerinde ve bazı balık türlerinin erken büyüme evrelerinde doğrudan kullanılır. Algler, balık ve kopepodların juvenil evrelerinde besin olarak kullanılan yoğun miktarda zooplankton (rotifer, kopepod ve karides) üretiminde de kullanılır. Gerekli besin maddelerinin geçişi açısından mikroalglerin, zooplanktonların üretiminde kullanım oranı çok önemlidir.

Farklı yazarlar (Behrens ve Kyle 1996; Ötleş ve Pire, 2001) mikroalgeleri PUFA kaynağı ve diğer nutrientleri için kullanılabilirliğini rapor etmişlerdir. Sterols (Volkman et al., 1981), e vitamini (Fabregas et al., 1999), pigment (Flynn et al., 1993) gibi. Birçok önemli biyomoleküler mikroalglerden sentezlenebilir. Buna rağmen, bu metabolitlerin üretimi sıcaklık, tuzluluk, pH, ışık, uygun besin ortamı gibi büyüme koşullarına bağlıdır.

Bir çok alg türü denizel hayvan üretiminde kullanılmasına rağmen, bütün hepsi hayvanların hepsinde aynı orada gelişimi desteklememektedir (Davis ve Guillard, 1958, Enright et al., 1986, Walne, 1967). Bütün bunların sebepleri farklı büyüklükler, sindirilebilirlik ve özellikle besinsel değeriyle ilişkili olmaktadır. Besinsel değeri özellikle algin biyokimyasal kompozisyonu ve hayvanın spesifik besin ihtiyacına bağlıdır.

Denizel hayvanların yetiştiriciliği için uygun besin olan *Isochrysis galbana*, *Dunaliella salina* ve *Tetraselmis suecica* mikroalglerinin besinsel kompozisyonu hakkında bilgi vermek amaçlanmıştır.

### ***2.5.Tetraselmis suecica***

*Tetraselmis suecica*'nın sistematikteki yeri şu şekildedir:

Kingdom Plantae

Subkingdom Viridaeplantae

Phylum ChlorophytaPhylum Chlorophyta

Class Prasinophyceae

Order Chlorodendrales

Family Chlorodendraceae Oltmanns, 1904

Genus *Tetraselmis* F.Stein, 1878

Species *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher, 1959

### 2.5.1. *Tetraselmis suecica*'nın Biyolojisi

*Tetraselmis Suecica*, *Pransinophyceae* sınıfına ve *Tetraselmis* cinsine ait bir algdir. Genel karakteristik özellikleri yeşil renkte ve oval yapıdadır. Uzunluğu karşılıklı çapı 1µm ile 10µm arasında, tepe noktası 8 µm kadardır. Genelde dört adet kamçıya sahip bir deniz algidir (Thomas et al., 2001).



Şekil 2. *Tetraselmis suecica*'nın Hücre Yapısı

Juvenil mollusklar, yaşına göre değişmekle beraber 2-30 µm çaptaki partikülleri sindirme yeteneğine sahip olan ve suyu süzerek beslenen canlılardır (Richmond 1986). Günümüzde kabuklu kuluçkahanelerinde besleme için kullanılan organizmalar; *Skeletonema*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Isochrysis*, *Nannochloris* ve *Tetraselmis* türleri üyeleridir. Akuakültürde geniş bir kullanım alanına sahip çoğu *Tetraselmis* türü heterotrofik büyüme yeteneğindedir. Day et al., (1991), kabukluların beslenmesinde kullanılan *Tetraselmis suecica* türünün heterotrofik kültürü için endüstriyel ölçekli bir işlem tanımladı ve bu amaç doğrultusunda heterotrofik türlerde uyulması gereken kriterleri numaraladı: pahalı olmayan, kolay sterilize edilebilen ortamda hızlı büyüme kabiliyeti; yeni ortama transferde gecikme fazının kısa olması veya hiç olmaması; karanlıkta veya düşük şiddetteki kesikli ışıkta hücre bölünme kapasitesi; ve

fermentörlerde konu olan mekanik etki ve hidrodinamik güçlere dayanabilme yeteneğinde olan hücre duvarları.

Day et al. (1991), heterotrofik bir *Tetraselmis*'ten geliştirilen ürüne dikkat çekmiştir: bu ürün, kabuklu yumurtalarının beslenmesinde kullanılan mikroalglerin % 70'i ile yer değiştirmesi için ve anaç bakımı için kullanılan alglerin % 90'ı ile yer değiştirmesi için uygun görüldü. Bundan dolayı sağlık ürünü olarak üretilen *Chlorella*'nın endüstriyel üretiminde gereken heterotrofik bir safhaya ilave olarak, mikroalglerin heterotrofik üretimi, akuakültürde şu an besin olarak geliştirilen geleneksel fototrofik yığın kültür tekniklerine alternatif olabilir.

Konsantrasyondan sonra elde edilen *Tetraselmis* biyoması, toz hali elde etmek amacıyla kurutulması ile stabilize edilir. Sonuç ise, *Tetraselmis* CSL161'in canlı bir bivalv besini ile direkt olarak yer değiştirebilmesi ve ümit verici bir potansiyele sahip olmasıdır (Day et al., 1991).

## ***2.6. Isochrysis galbana***

*Isochrysis galbana*'nın sistematikteki yeri şu şekildedir:

Kingdom Chromista

Subkingdom Hacrobia

Phylum Haptophyta

Class Prymnesiophyceae

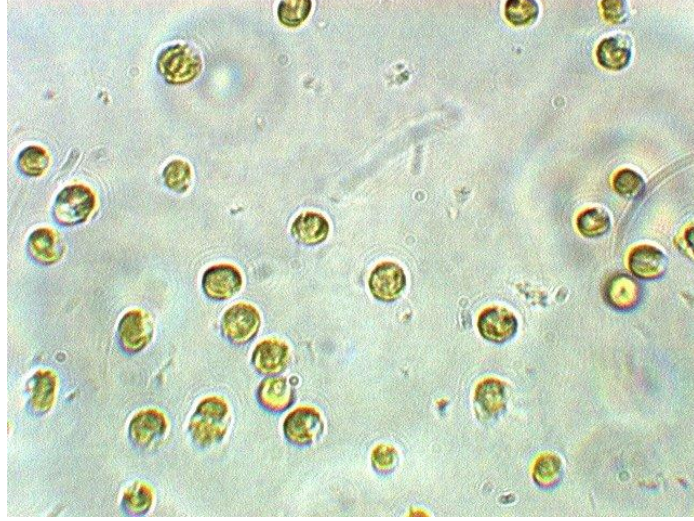
Family Isochrysidaceae Pascher, 1910

Genus Isochrysis Parke, 1949

Species Isochrysis galbana Parke, 1949

### 2.6.1.I. *galbana*'nın Biyolojisi

*Isochrysis galbana* Chromophyta filumunda Haptophyceae sınıfına ve Isochrysidales ordosuna ait bir deniz algidir. Genel karakteristik özelliği, 5-6 µm uzunluğa ve 2-4 µm genişliğe sahip hücre iki adet kamçıya sahiptir. Bu alg Avrupa kıyılarında, Kuzey Atlantik ve İrlanda kıyılarında yaygındır. Ayrıca tuzlu göllerde de bulunmuştur. (Thronsen, 1993). Bu mikroalg zengin PUFA kaynağı özellikle EPA olarak tanımlanmıştır (Grima et al., 1994; Fidalgo et al., 1998) Bir çok sucul hayvanın ticari olarak yetiştirilmesinde besin çeşidi olarak kullanılmaktadır (Sanchez et al., 2000).



Şekil 3. *Isochrysis galbana*'nın Hücre Yapısı

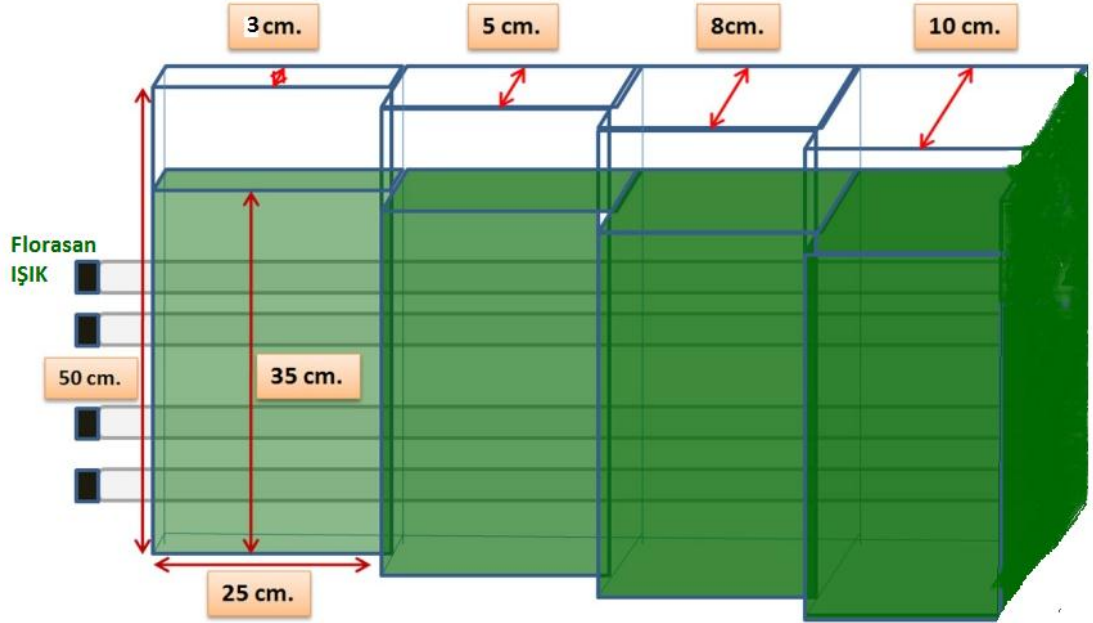


### 3. MATERYAL METOD

#### 3.1. Organizmalar ve Kültür Koşulları

*Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* türler için uygun olan F/2 besin ortamı hazırlanılarak (Tablo3, Tablo 4), gerekli sterilizasyon işlemlerinden sonra ışık, farklı fotobiyoreaktör tipleri (tübüler fotobiyoreaktör, cam panel biyoreaktör,) (Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7 ve Şekil 8) kullanımı gibi değişikliklerle farklı kültür koşulları sağlanarak türler E.Ü. Urla tesislerinde kültüre alındı.

Çalışmalarda laboratuvar koşullarında yapılan denemelerde 20 cm genişlikte, 50 cm yükseklikte ve 3 cm, 5 cm, 8 cm, 10 cm ışık yolu uzunluklarına sahip cam panel fotobiyoreaktörler kullanıldı (Şekil 4). Fotobiyoreaktörlerdeki kültür derinliği 35 cm olacak şekilde dolduruldu. Kültür yüzeyi 0.07 m<sup>2</sup> olarak ölçüldü. Kültür hacimleri sırasıyla 1,8 lt, 3.5 lt, 5.6 lt, 7.7lt olarak hesaplandı.



Şekil 4. Cam Panel Biyoreaktör Sistemi

Çalışmalarda laboratuvar koşullarında yapılan denemelerde 1 cm çapında plastik boruya sahip Tübüler fotobiyoreaktör kullanılmıştır (Şekil 5). 20 cm genişlikte, 50 cm

yükseklikte ve 3 cm, 5 cm, 8 cm, 10 cm ışık yolu uzunluklarına sahip cam panel fotobiyoreaktörler kullanıldı (Şekil 4). Toplam boru uzunluğu 20 m olup toplama tankı ile beraber 25 lt hacme sahip bir biyoreaktördür. Toplam tankı akrilikten yapılarak aydınlatama alanı sağlanmıştır. Suyun boru içerisindeki hareketi airlift (hava taşıma) sistemi ile sağlanmış akış hızı 20 cm/sn olarak ayarlanmıştır.

Kültürü yapılan *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* E. Ü Urla tesislerinde santrifuj yöntemi ile süzülüp elde edilen biyomas kurutuldu.

**Tablo 2. F/2 ortamının kimyasal içeriği**

<b>Solüsyonlar</b>	<b>Elementler</b>	<b>1 lt (gr)</b>
<b>NaNO3 stok solüsyon</b>	NaNO <sub>3</sub>	75,0
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> stok solüsyon</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0
<b>Trace Metal stok solüsyon</b>	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,15
	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	4,36
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0098
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0063
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,022
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,001
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,18
<b>Vitamin stok solüsyon</b>	Vitamin B12	0,001
	Biotin	0,0001
	Thiamine	0,2

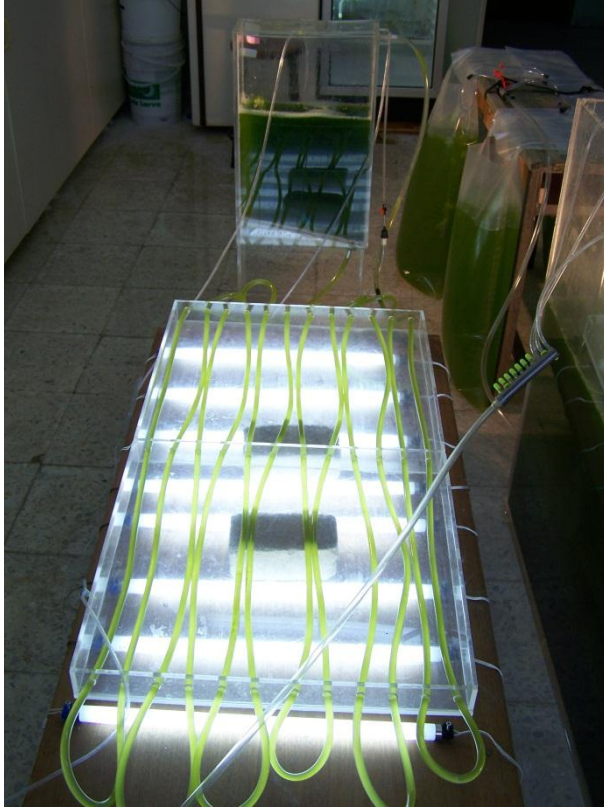
**Tablo 3. Solüsyon kullanım oranları**

<b>Solüsyonlar</b>	<b>1 lt (ml)</b>
--------------------	------------------

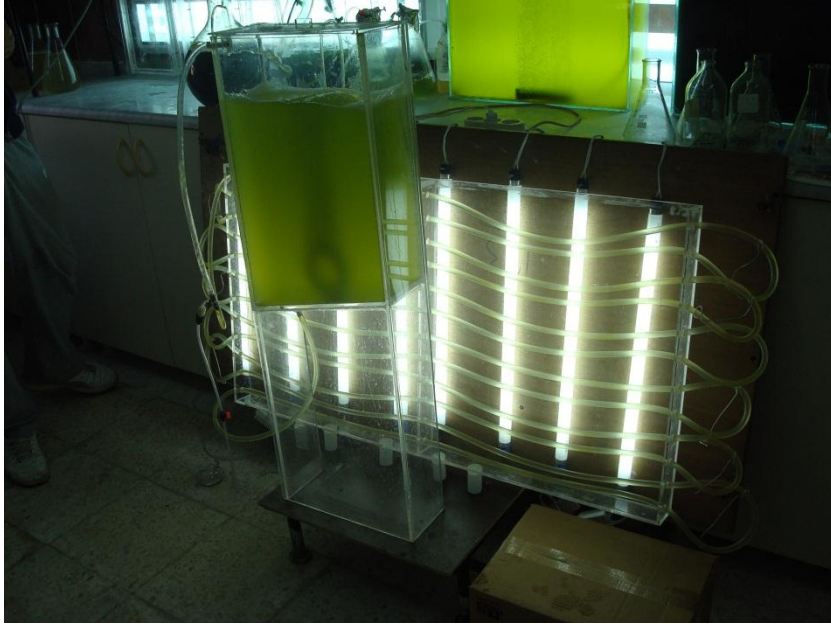
---

<b>NaNO<sub>3</sub> stok solüsyon</b>	1,0
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> stok solüsyon</b>	1,0
<b>Trace Metal stok solüsyon</b>	1,0
<b>Vitamin stok solüsyon</b>	0,5

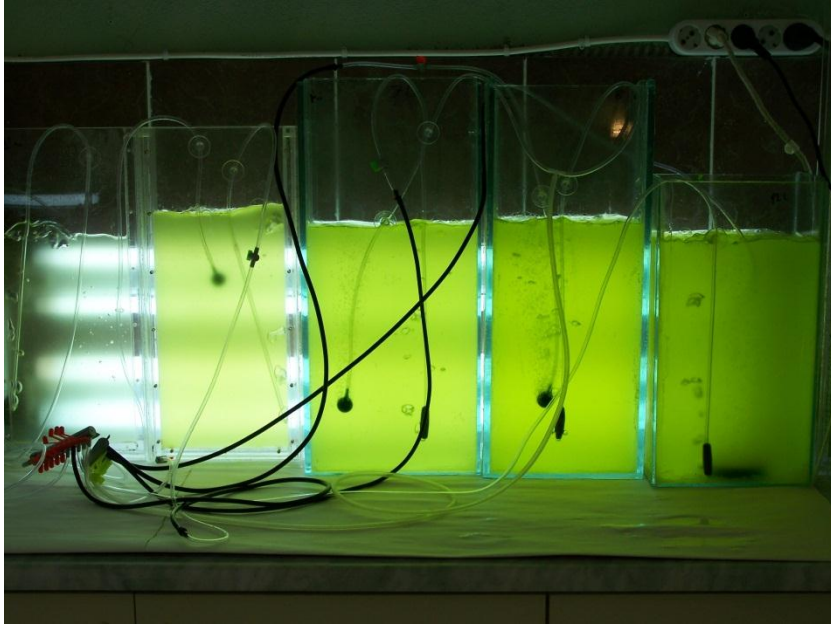
---



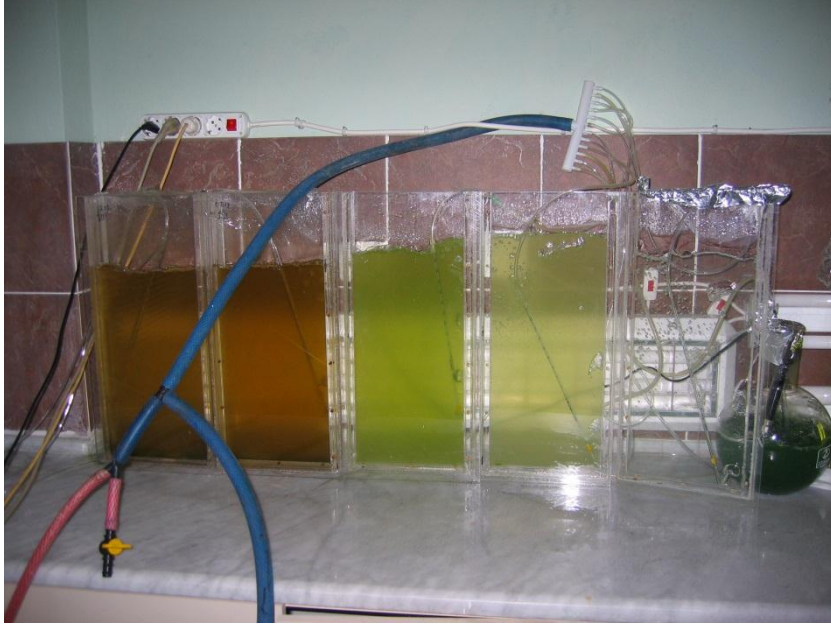
**Şekil 5. Yatay Airlift Tübüler Fotobiyoreaktör**



**Şekil 6. Dikey Airlift Tübüler Fotobiyoreaktör**

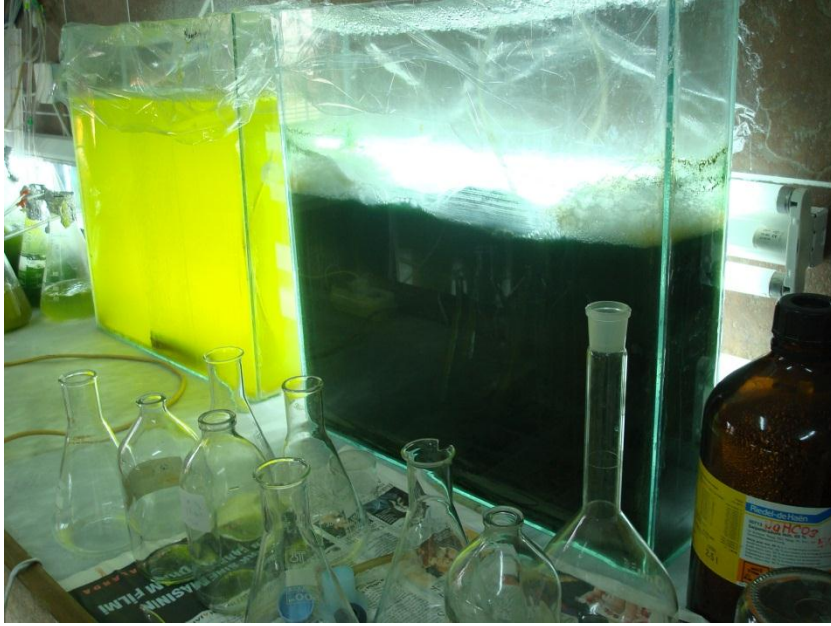


(A)

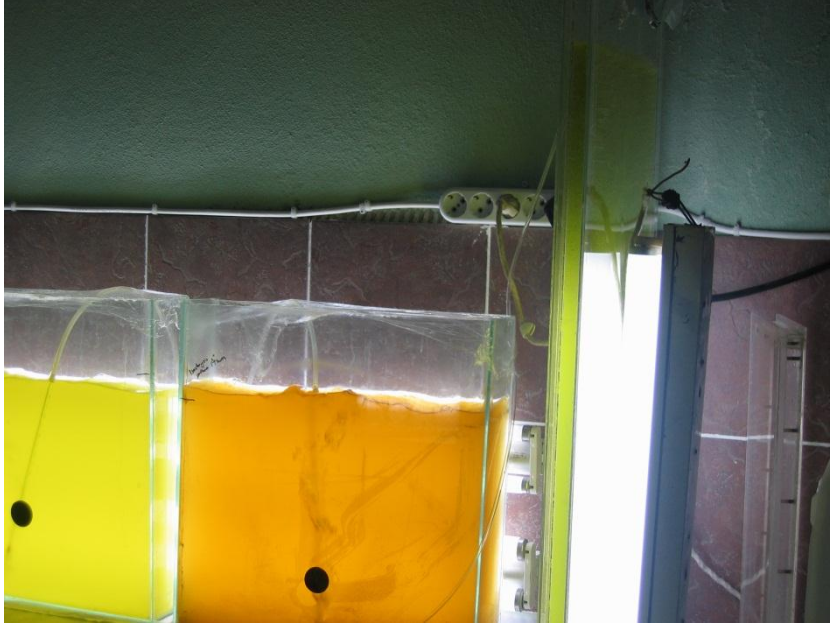


(B)

**Şekil 7. Cam Panel Biyoreaktörler (3 cm, 5 cm) (A-B)**



(A)



(B)

**Şekil 8. Cam Panel Biyoreaktörler (10 cm) (A-B)**

### **3.2. Analitik Ölçümler**

#### **3.2.1. Hücre Sayımı**

Hücre sayımı Neubauer Hemositometresi ile ışık mikroskobu kullanılarak yapıldı (Nikon, Japonya). Sayım yapılacağı zaman kültürden temiz pipetler ile örnek alındı. Kullanmadan önce lam saf su ile temizlendi ve kurulandı. Sayımlar alınan örnekler kullanılarak 4 tekrarlı olarak yapıldı, kaydedildi ve gereken hesaplamalarla hücre sayısı tespit edildi.

#### **3.2.2. Kuru Ağırlık Tayini**

Bu analiz ile 4 adımda biyomasın kuru ağırlığı hesaplandı.

- GF- 52 (Seleicher&Schuel) filtre kağıtlarının hassas terazi (Sartorius GC8035 0CE) ile darası alındı.
- 10 ml kültür örneği alınarak GF/C 52 filtre kağıtları ile süzüldü.
- Filtre kağıtları etüvde (Nüve FN500) 3 saat 105 °C’de kurutuldu.

- Daha sonra bir hassas terazi (Sartorius GC8035 0CE) ile ml ve L'deki son ağırlık bulundu.

### 3.2.3. Pigment Analizi

Toplam karoten ve klorofil-a spektrofotometrik yöntemle göre aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı. 5 mg kurutulmuş örnek alınarak 5 ml metanol ve aseton (Merck %100, Germany) muamele edildikten sonra, hücreler Ika (Ultra Turrax T25) marka homojenitör ile 5 dakika süre ile homojenize edildi. Daha sonra 10 dakika 70°C'de banyoya tabi tutuldu. Elde edilen ekstrakt madde 3500 rpm'de sentrifuj ile ayrıldı. Örnekler spektrofotometrede (JENWAY 6305) 475 nm ve 666 nm dalga boylarında okundu. Aşağıda verilen formüller ile toplam karoten ve klorofil-a miktarları tespit edilir.

$$C_{\text{Karoten}} (\text{mg g}^{-1}) = 4.5 A_{475} (\text{Zou and Richmond, 2000})$$

$A_{475}$  475 nm okunan absorbans (soğurma) değeri,

$$C_{\text{Klorofil-a}} (\text{mg g}^{-1}) = 13.9 A_{666} (\text{Sanchez et al., 2005})$$

$A_{666}$  666 nm okunan absorbans değeri

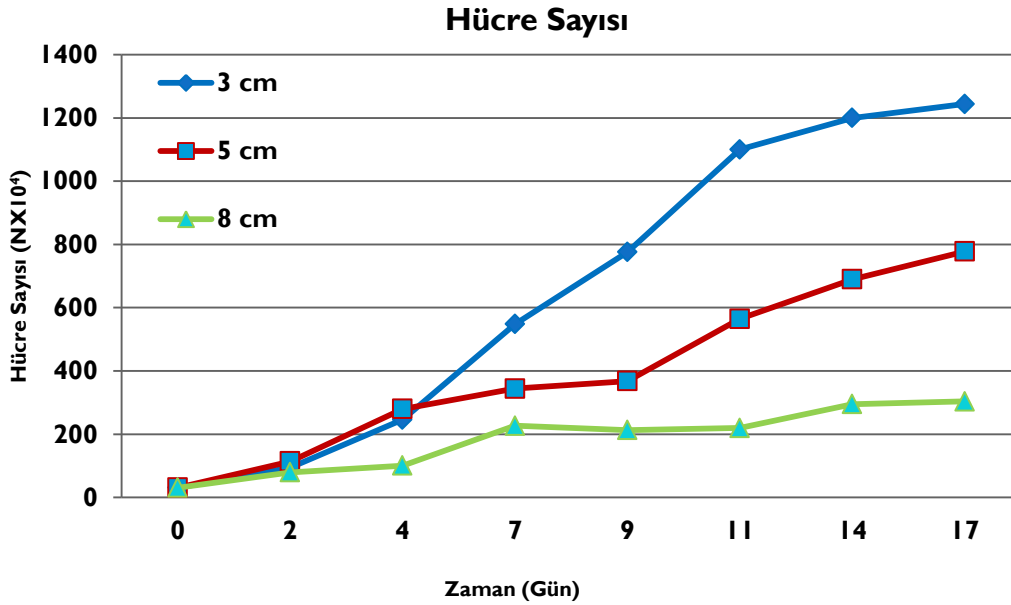
Denemeler 2 tekerrürlü 3 paralelli olarak gerçekleştirilecektir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Tetraselmis suecica*

Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Urla Tesisi plankton kültürü laboratuvarında; 3 cm, 5 cm, 8 cm ışık ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörlerde *Tetraselmis suecica*, türünün kültürü yapıldı.

*T. suecica* türünün ışığa bağlı gelişiminin araştırılması denemesinde en yüksek hücre yoğunluğu 3 cm'lik ışık yolu uzunluğuna sahip cam panelde yaklaşık  $12,44 \times 10^6$  hücre  $ml^{-1}$  ile elde edildi (Şekil 9). 3 cm'lik fotobiyoreaktörü 5 ve 8 cm'lik ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörler sırası ile  $7,78 \times 10^6$  ve  $3,04 \times 10^6$  hücre  $ml^{-1}$  ile takip etti. Hücre yoğunluğunun ışık yolu uzunluğuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edildi.

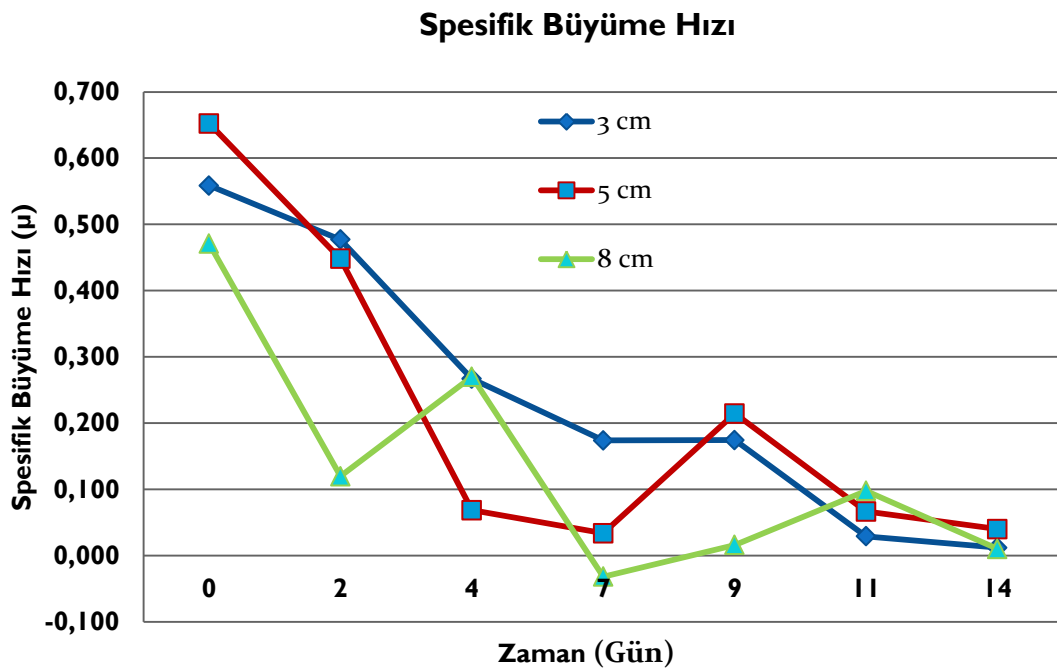


Şekil 9. *Tetraselmis suecica*'nin zamana bağlı hücre sayısı grafiği.

Spesifik büyüme hızı grafiğine bakıldığında en hızlı büyümenin 5 cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 10). 8 cm'lik biyoreaktörde ise büyüme hızında önce hücrelerin adaptasyonu kaynaklı bir düşüş daha

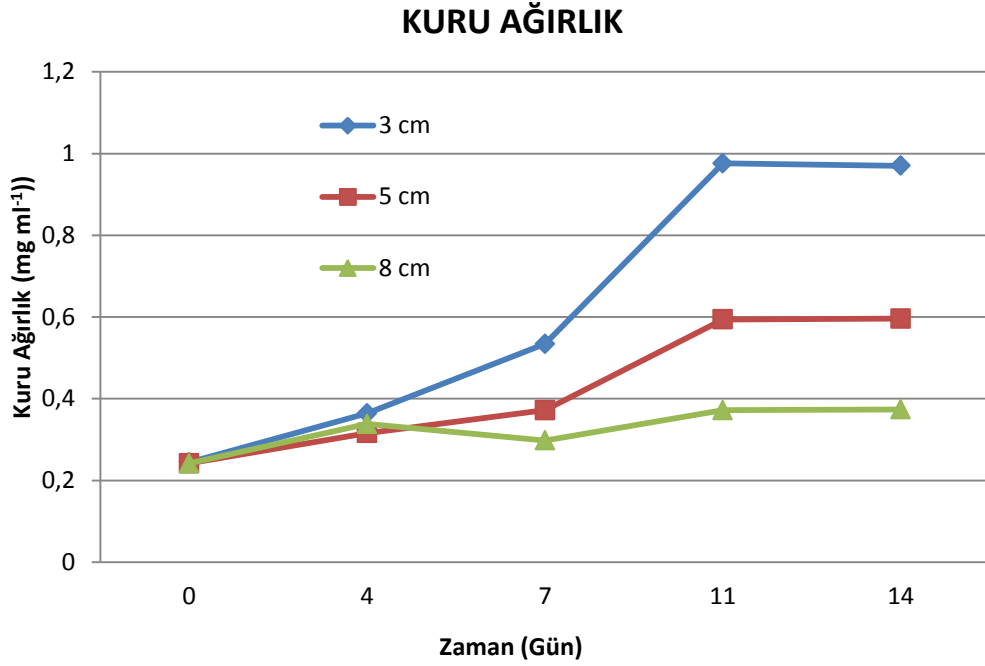


sonra artma gözlemlendi ve bu artış 5. güne kadar devam etti. Ardından dengeli bir azalma gerçekleşti. Diğer fotobiyoreaktörlerin genelinde ise 4. gün sonrası büyüme hızının düştüğü görüldü. Bununla birlikte 12. günde en yüksek büyüme hızı 3 cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde elde edildi.



**Şekil 10.** *Tetraselmis suecica*'nin zamana bağlı spesifik büyüme grafiği

En yüksek üretim, hücre yoğunlu ile orantılı olarak  $0,97 \text{ mg ml}^{-1}$  'lik değer ile 3 cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde elde edildi (Şekil 11). Hücre yoğunluğuna bağlı olarak 5 cm'lik fotobiyoreaktörde de  $0,59 \text{ mg ml}^{-1}$  kuru ağırlık miktarı tespit edildi. 8 cm'lik biyoreaktörde yaklaşık  $0,37 \text{ mg ml}^{-1}$ 'lik en düşük kuru ağırlık değeri ölçüldü. Işık yolu uzunluğunun artışı ile birlikte elde edilen kuru ağırlık değerlerinde düşüş olduğu tespit edildi.



**Şekil 11. *Tetranelmis suecica*'nin Işık yolu uzunluğuna bağlı kuru ağırlık grafiği**

*T. suecica* türünün ışığa bağlı olarak toplam karoten değerlerine etkisinin araştırılması denemesinde en yüksek değer 3 cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde 525,4  $\mu\text{g/g}$  olarak elde edildi (Tablo 4). Işık yolu uzunluğunun artışına paralel olarak toplam karoten değerlerinde bir azalma olduğu tespit edildi. 5 cm ışık yolu uzunluğuna sahip biyoreaktörde 449,1  $\mu\text{g/g}$  8 cm ışık yolu uzunluğuna sahip biyoreaktörde ise 344,8  $\mu\text{g/g}$  değerleri ölçüldü.

Klorofil a değerlerinde ise ışık yolu uzunluğunun artışı ile paralel olarak değerlerde artış olduğu saptandı. En yüksek klorofil a değeri 8 cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde 5851,9  $\mu\text{g/g}$  olarak tespit edildi ( Tablo 4). En düşük değer 3 cm ışık yolu uzunluğuna sahip biyoreaktörde 3294,3  $\mu\text{g/g}$  olarak ölçüldü.

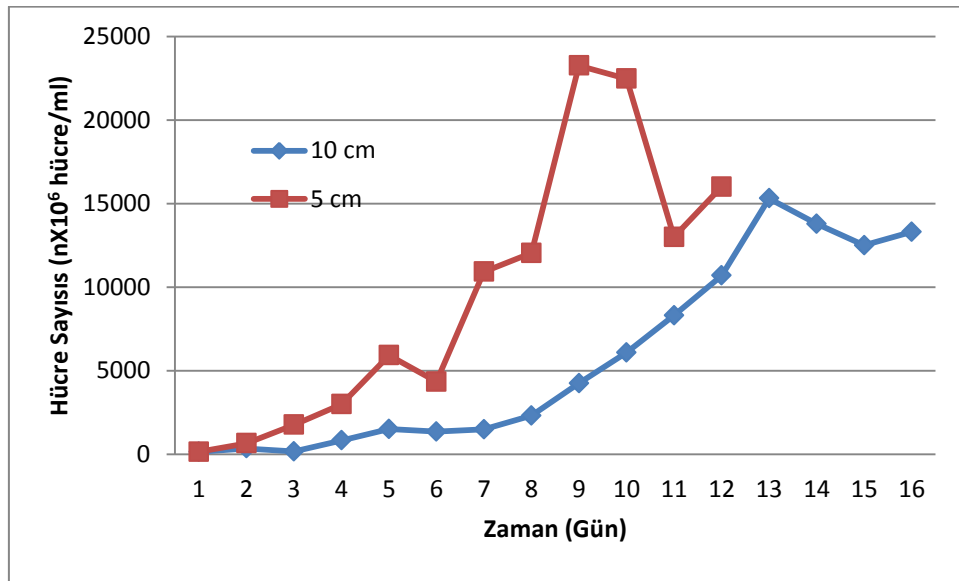
Tablo 4. *T. suecica*'nın Farklı Fotobiyoreaktörlerde Toplam Karoten ve Klorofil a Değerleri

Fotobiyoreaktör	Topam Karoten ( $\mu\text{g/g}$ )	Klorofil a ( $\mu\text{g/g}$ )
3 cm	525,4	3294,3
5 cm	449,1	3475,5
8 cm	344,8	5851,9

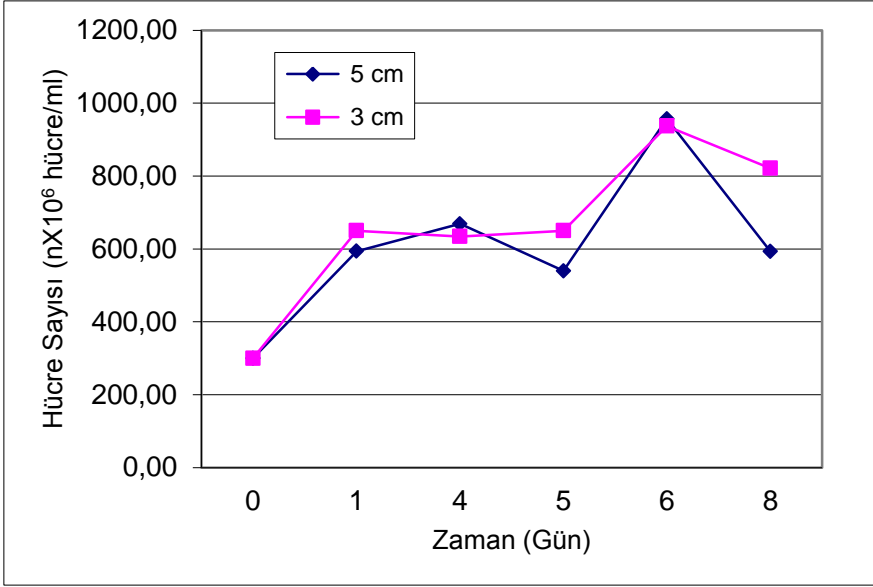
#### 4.2. *Nannochloropsis oculata*

Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Urla Tesisi plankton kültürü laboratuvarında; 3 cm, 5 cm, 10 cm ışık ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörlerde ve tubular fotobiyoreaktörde *Nannochloropsis oculata*, türünün kültürleri yapıldı.

*N. oculata* türünün ışığa bağlı gelişimin araştırılması denemesinde en yüksek hücre yoğunluğu 5 cm'lik ışık yolu uzunluğuna sahip cam panelde yaklaşık  $232 \times 10^6$  hücre  $\text{ml}^{-1}$  ile elde edildi (Şekil 12ve Şekil 13). 10 cm'lik ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde ise en yüksek hücre sayısı  $153 \times 10^6$  hücre  $\text{ml}^{-1}$  ile takip etti. Hücre yoğunluğunun ışık yolu uzunluğuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edildi.

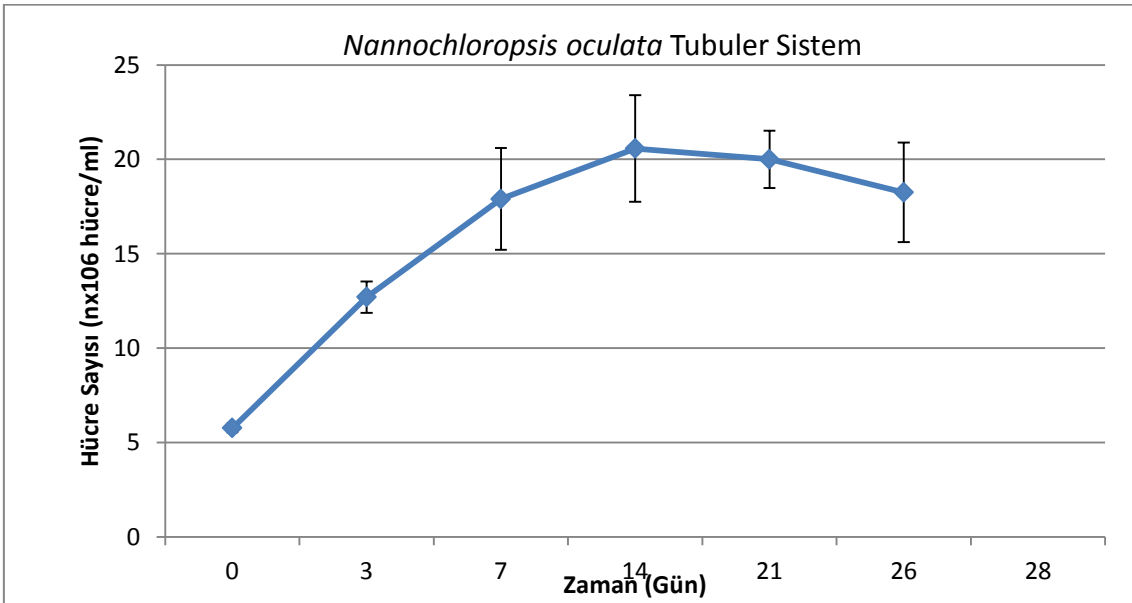


Şekil 12. *Nannochloropsis oculata*'nın zamana bağlı hücre sayısı grafiği.



**Şekil 13. *Nannochloropsis oculata*'nın zamana bağlı hücre sayısı grafiği.**

*N. oculata* türünün airlift tübüler fotobiyoreaktöre bağlı gelişimin araştırılması denemesinde en yüksek hücre yoğunluğu  $20,57 \times 10^6$  hücre  $\text{ml}^{-1}$  ile elde edildi (Şekil 14). Hücre yoğunluğunun tübüler fotobiyoreaktörün dikey yada yatay olması durumunun değiştirmedeği tespit edildi.



**Şekil 14. *Nannochloropsis oculata*'nın Tübüler Fotobiyoreaktörde zamana bağlı hücre sayısı grafiği.**

*N. oculata* türünün ışığa bağlı olarak k toplam karoten değerlerine etkisinin araştırılması denemesinde en yüksek değer 3 cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde 1235,27 µg/g olarak elde edildi (Tablo 5). Işık yolu uzunluğunun artışına paralel olarak toplam karoten değerlerinde bir azalma olduğu tespit edildi.

Tübüler fotobiyoreaktörde yapılan denemede ise toplam karoten değeri 2334,00 µg/g iken klorofil a değeri ise 7335,45 µg/g olarak tespit edildi (Tablo 5).

Klorofil a değerlerinde ise ışık yolu uzunluğunun artışı ile paralel olarak değerlerde artış olduğu saptandı. En yüksek klorofil a değeri 10 cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde 9187,10 µg/g olarak tespit edildi.

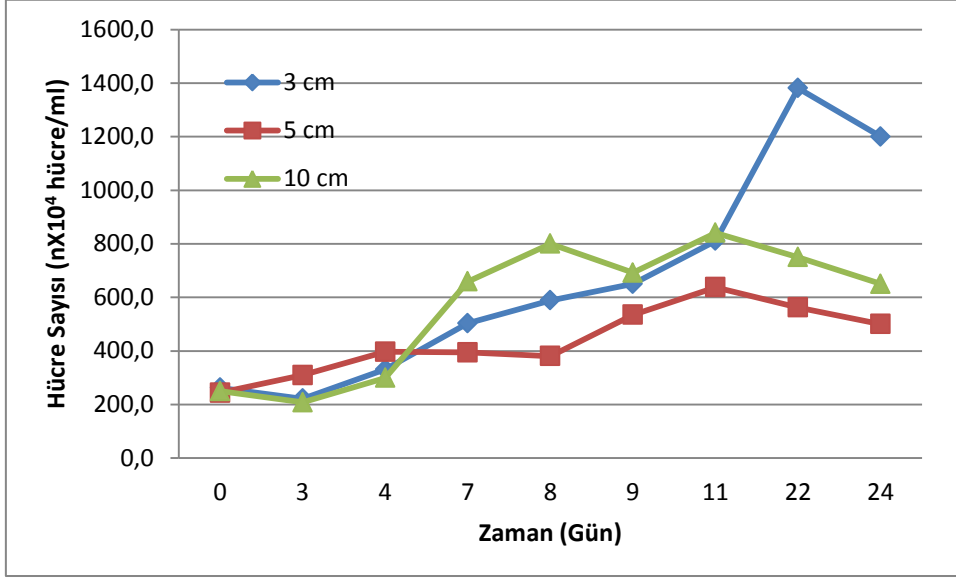
**Tablo 5. *N. oculata*'nın Farklı Fotobiyoreaktörlerde Toplam Karoten ve Klorofila Değerleri**

Fotobiyoreaktör	Topam Karoten (µg/g)	Klorofil a (µg/g)
3 cm	1235,27	7506,12
5 cm	1175,89	7533,20
10 cm	1024,19	9187,10
Tübüler	2334,00	7335,45

#### **4.3. *Isochrysis galbana***

Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Urla Tesisi plankton kültürü laboratuvarında; 3 cm, 5 cm, 10 cm ışık ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörlerde *Isochrysis galbana*, türünün kültürleri yapıldı.

*I. galbana*'nın türünün ışığa bağlı gelişimin araştırılması denemesinde en yüksek hücre yoğunluğu 3 cm'lik ışık yolu uzunluğuna sahip cam panelde yaklaşık  $13,81 \times 10^6$  hücre  $ml^{-1}$  ile elde edildi (Şekil 15). 10 cm'lik ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde ise en yüksek hücre sayısı  $84,0 \times 10^6$  hücre  $ml^{-1}$  ile takip etti. Hücre yoğunluğunun ışık yolu uzunluğuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edildi.



**Şekil 15. *Isochrysis galbana*'nın zamana bağlı hücre sayısı grafiği.**

*I.galbana* türünün ışığa bağlı olarak toplam karoten değerlerine etkisinin araştırılması denemesinde en yüksek değer 3 cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde 7920,1 µg/g olarak elde edildi (Tablo 6). Işık yolu uzunluğunun artışına bağlı olarak toplam karoten değerlerinde bir düşme olduğu tespit edildi.

Klorofil a değerlerinde ise ışık yolu uzunluğunun artışı ile paralel olarak değerlerde artış olduğu saptandı. En yüksek klorofil a değeri 10 cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörde 1769,5 µg/g olarak tespit edildi.

**Tablo 6. *I.galbana*'nın Farklı Fotobiyoreaktörlerde Toplam Karoten ve Klorofila Değerleri**

Fotobiyoreaktör	Toplam Karoten (µg/g)	Klorofil a (µg/g)
3 cm	7920,1	1610,2
5 cm	7335,5	1630,4
10 cm	7245,2	1769,5

## 5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Akuakültür çiftliklerinde canlı yem olarak kullanmak için yoğun bir şekilde kültürü yapılan bu türün biyokimyasal yapısını değiştiren etkenlerden bir bölümü açığa çıkarılmıştır. Bu çalışmadaki büyüme sonuçları gösteriyorki ışık yolu uzunluğu *N. oculata*, *I. galbana* ve *T. suecica* türlerinin büyümelerini etkileyen parametrelerden olmuştur. Işık yolu uzunluğu arttıkça hücre sayısında düşüş olduğunu araştırmalar göstermektedir.

Gıda üretimi endüstrisinde akuakültür hızla gelişmekte olan sektörlerdendir. Akuakültür yoluyla ekonomik türlerin üretimi son yüzyıl içerisinde 1 milyon ton'dan 8 milyon ton'a ulaşmıştır. Mikroalglerin gıda zincirindeki önemi anlaşıldıktan sonra, akuakültürde kullanılmaya başlanmış ve ekonomik değere sahip midye, balık ve krustase türlerinin kültürlerinde canlı yem olarak yararlanılmaktadır. Ayrıca mikroalgler, sadece akuakültürde hayvan gıdası olarak değil insan gıdası olarak, kimya, kozmetik ve biyoteknolojinin çeşitli alanlarında da kullanılmaktadır. Mikroalgler ayrıca kirli suların arıtılmasında ve suyun oksijen ve karbondioksit düzeyinin dengelenmesinde de kullanılır.

Mikroalg biyoteknolojisinde fotobiyoreaktör tasarımı hem bilimsel hem de ekonomik açıdan önem arz eder. Fotobiyoreaktör tasarımında amaç güneş enerjisi gibi yüksek seviyeli ışık kaynağının optimal kullanımı için yeni kültür sistemlerinin yapılmasıdır (Richmond, 1982). Ancak, fotosentetik hücrelerin ticari üretiminde yapay aydınlatma kullanmak algal biyomas maliyetlerini yükseltir. Vonshak et. al., (1982) belirtildiğine göre güneş ışığı maliyeti düşürmesine rağmen iklim şartlarının uygunluğu da verimliliği etkilemektedir. Bu nedenle kültür sistemi kurulurken verimliliği etkileyecek koşullar göz önüne alınıp optimal verimliliğe ulaşması amaçlanmıştır.

Richmond and Zou (1999) yapılan çalışmada 1,3 cm' den başlayan ve 17 cm ışık yolu uzunluğuna sahip fotobiyoreaktörlerde *Nannochloropsis sp.* çalışmışlardır. Küçük reaktörlerde alansal çıkış hızı düşük olmakla birlikte daha yüksek hacimsel çıkış elde etmişlerdir. *Nannochloropsis sp.* için en uygun 10cm ışık yolu uzunluğuna sahip

biyoreaktörler olarak belirtilmiştir. Bu proje kapsamında yapılan çalışmalarda ise en uygun ışık yolu uzunluğunun biyomas değerleri açısından 5cm, pigment değerleri açısından ise 10 cm ışık yolu uzunluğuna sahip biyoreaktörler tespit edildi. Fakat ışık şiddeti ve ışık spektral aralık açısından tekrar çalışma yapılması sonucunda farklı sonuçlar elde edilebilecektir. Özellikle *N. oculata* türünün denemesinde tübüler fotobiyoreaktör sonuçlarında olduğu gibi biyomas miktarı düşük iken pigment değerlerinde artış olduğu tespit edilmiştir.

Zou et al., (1999) *Nannochloropsis* sp. türü ile laboratuvar şartlarında 1 cm ve 3 cm ışık yolu uzunluğunda ve laboratuvar dışında ise 1,3 cm den başlayarak 17cm ışık yolu uzunluğu olan ince panel reaktörler kullanarak denemeler yapmışlardır. İlk denemelerinde aydınlatma başlangıçta  $150 \mu E m^{-2} s^{-1}$  ışık şiddeti kullanmışlardır ve daha sonra ışık şiddetini  $1000 \mu E m^{-2} s^{-1}$  ile  $3000 \mu E m^{-2} s^{-1}$  arasında değiştirmişlerdir. İkinci olarak düşük hücre yoğunluğunda, farklı ışık yolu uzunluğu olan bioreaktörlerde yüksek ışığa maruz bırakmışlar, son olarak da yüksek hücre yoğunluğundaki kültürleri yüksek ışık şiddetine maruz bırakmışlardır. Buna göre düşük ışıktan yüksek ışığa maruz kalan hücrelerin klorofil içeriği keskin bir şekilde düştüğü gözlenmiştir. Fakat 7 gün sonra yüksek aydınlatmada ( $2000$  ve  $3000 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ) ışığa uyumun başlaması ile birlikte klorofil konsantrasyonunda da bir artış olmuştur. Düşük hücre yoğunluğunda, hücreler yüksek ışık şiddetine maruz bırakılınca strese girmekte ve hücre klorofil konsantrasyonu ile birlikte hücre yoğunluğu da düşmektedir. Yüksek hücre yoğunluğunda, yüksek ışık şiddeti kullanılması durumunda ise, hücre konsantrasyonu ve ışık yolu uzunluğu kriter olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan bu çalışmada ise 3, 5 8 ve 10 cm' lik ışık yolu uzunluğuna sahip ince panellerde yetiştirilen *N. oculata*, *I. galbana* ve *T. suecica* kültürlerinde klorofil değerleri incelenmiştir. Deneme boyunca yüksek ışığa (2400 lüx) maruz kalan kültürlerde klorofil *a* oranları düştüğü gözlenmiştir.

Yapılan çalışmada laboratuvar koşullarında *N. oculata* için optimum ışık yolu uzunluğu 8 cm olarak tespit edildi. Bizim çalışmamızda kültürlerle foto-peryot uygulaması yapılmadı. Park ve Lee (2000) ' de yaptıkları çalışmada iç mekanda kullanılan fotobiyoreaktörlerde mikroalg üretimi için foto peryot uygulamasının biyomas verimliliğini ve fotosentez oranını arttırdığını tespit etmişlerdir. Bu nedenle aynı çalışmanın kültürlerle foto-peryot uygulanarak yapılması *N. oculata*' da biyomas



verimliliğini ve fotosentez oranını etkileyerek daha farklı sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir.

Mikroalg üretiminde temel hedef ekonomik bir sonuca ulaşmaktır. Hücrelerin ışığı etkin kullanamaması mikroalg üretiminde maaliyeti etkileyen en önemli parametredir. Kültür balığı üretiminde mikroalg üretimi önemli bir maliyet girdisi oluşturur. Bu nedenle mikroalg üretim maliyetlerinin düşürülmesi çok çalışılan bir konudur. Her alg türü için optimum kültür yoğunluğunun tespit edildiği, optimum ışık yolu belirlenmelidir (Zou ve Richmond, 1999). Az harcamayla daha yüksek verimlilikte ürün elde edebilmek için bu konuyla ilgili çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir. EPA(eikosapentanoik asit) ve ARA (arakidonik asit) çoklu doymamış yağ asitlerince de zengin olan ve mas kültürüne uygun olan *N. oculata* üzerinde, daha çok araştırmaya gereksinim vardır.

Karotenler biyolojik antioksidan olarak hücre köklerini ve dokuları zararlı etkenlerden koruduğu için insan sağlığı için hayati öneme sahiptir (Yanar et al., 2004). Bir çok araştırmacı karotenidleri, insanları hastalıklara karşı koruyucu olarak önermiş ve  $\beta$  karoten, lutein, zeaksanthin gibi karotenler halen kanser tedavisinde uygulanmaktadır (Richmond, 2000; Ziegler et al., 1996). *N. oculata* türünde klorofil-a,  $\beta$  karoten, viyolaksantin ve vaukherisantın ana pigmentlerdir. Ayrıca bu alg türü kantaksantin ve astaksantin gibi sekonder karoten gruplarını ihtiva etmektedir. Sekonder karotenoidler yüksek ışık şiddeti ve azot yetersizliği gibi ekstrem koşullar altında üretilir. Özellikle besin sınırlaması sonucunda, algin renginin yeşilden kırmızı-turuncuya dönüşü, sekonder karotenlerin artışı ile ilişkilendirmiştir (Lubián et al., 2000).

Sukenik et al., (1989) *N. oculata* ile yaptıkları çalışmalarında üç farklı ışık şiddetinin (35, 290 ve 350  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) klorofil-a ve toplam karoten miktarlarına etkisini tespit etmişlerdir. Işık şiddeti artışına bağlı olarak klorofil-a ve toplam karoten değerlerinde bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Lubián et al., (2000) *N. oculata*'nın ticari pigmentlerini viyolaksantin (%48.9) ve vaukheriksantin (%45.3) olarak tespit etmişlerdir. Örnek zamanını 10. günden 20. güne çıkartıldığında viyolaksantin değerinde azalış olur iken, vaukheriksantin değerinde artış olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada en yüksek klorofil-a değeri 168.6  $\mu\text{g (10}^6 \text{ hücre)}^{-1}$  olarak 20. günde tespit etmişlerdir. Erken örnek döneminde *N. oculata* da bu değer 116.4  $\mu\text{g (10}^6 \text{ hücre)}^{-1}$

olarak rapor etmişlerdir. *N. oculata* ile yaptıkları çalışmalarında üç farklı ışık yolu ve tübüler fotobiyoreaktör arasındaki klorofil-a ve toplam karoten miktarlarına etkisini tespit etmişlerdir. Işık şiddetinin artışına bağlı olarak klorofil-a ve toplam karoten değerlerinde bir azalma olduğunu tespit edilmiştir. Tübüler fotobiyoreaktörde 1 cm çapında boru kullanılmasına rağmen, biyoreaktör sisteminin değişmesi ile toplam karoten ve klorofil a değerlerinde artış görülmüştür. Gelecek dönem çalışmalarında farklı ışık şiddeti ile *I. galabana* ve *T. suecica* türlerinin etkileşimlerin tespit edilmesi gerekmektedir.

Mikroalglerin gıda zincirindeki önemi anlaşıldıktan sonra, çeşitli türleri akuakültürde kullanılmaya başlanmıştır. Ekonomik değere sahip denizel türlerin yetiştirilmesinde canlı yem kaynağı olarak yararlanılır. Denizel üretim endüstrisinde mikroalgler çift kabukluların tüm evrelerinde, bazı kabukluların larval evrelerinde ve bazı balık türlerinin ilk büyüme evrelerinde doğrudan kullanılır. Ayrıca algler, balık ve kopepodların juvenil evrelerinde besin olarak kullanılan zooplanktonun üretiminde kullanılmaktadır.

Mikroalg üretiminde temel hedef ekonomik bir sonuca ulaşmaktır. Hücrelerin ışığı etkin kullanamaması mikroalg üretiminde maliyeti etkileyen en önemli parametredir. Kültür balığı üretiminde mikroalg üretimi önemli bir maliyet girdisi oluşturur. Bu nedenle mikroalg üretim maliyetlerinin düşürülmesi çok çalışılan bir konudur. Her alg türü için optimum kültür yoğunluğunun tespit edildiği, optimum ışık yolu belirlenmelidir.

Az harcamayla daha yüksek verimlilikte ürün elde edebilmek için bu konuyla ilgili çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.

Yapılacak olan denemeler sonucunda kültür koşullarında yapılacak değişikliklerle (ışık, sıcaklık, tuzluluk, fotobiyoreaktör, kültür ortamı vb) maksimum düzeyde vitamin ve pigment değeri eldesi için optimum kültür koşullarının tespit edilerek en yüksek biyomasın ve pigment seviyesinin elde edildiği kültür ortamında endüstriyel üretimde uygulanabilecek fotobiyoreaktörlerin tespiti yapılmıştır.

Bu proje çalışması;

1.Mikroalg türlerinden elde edilecek maksimum pigment için optimum kültür şartlarının tespit edilmiştir.

2.Çalışmanın/araştırmanın proje sonuçları endüstriyel üretime uygulanabilecek şekilde yol göstericiliği vardır,

3.Farklı kültür koşullarının (ışık,) ve fotobiyoreaktörlerin (ince cam panel reaktörler ve tubüler sistem) uygulanmasının söz konusu olmuştur,

4.Elde edilmesi öngörülen biyomasın pigment bakımından en uygun kültür koşulunun optimize edilmesi nedenleri ile çeşitli perspektiflerden özgünlük taşımaktadır.

## 6. KAYNAKÇA

- Bandarra, N.M., Pereira, P.A., Batista, I., and Vilela, M.H., 2003. Fatty acids, sterols and  $\alpha$ -tocopherol in *Isochrysis galbana*. Journal of Food Lipids 10: 25-34.
- Baysal, T., ve Ersus, S., 1999, Karotenoidler ve insan sağlığı. Gıda Dergisi 24 (3):177-185.
- Behrens P. W., Kyle D. J. 1996. Microalgae as a source of fatty acids. J. Food Lipids. 3: 259-272.
- Ben-Amotz A., Tornabene T.G., Thomas W.H., 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. J. Phycol. 21: 72–81.
- Brown M.R, Dunstan G.A., Jeffrey S.W., Volkman J.K., Barrett S.M., Leroi J.M., 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of the Prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (CLONE TISO). J. Phycol. 29: 601–612.
- Brown, C. 1973. The effects of some selected bacteria on embryos and larvae of the American oyster *Crassostrea virginia*. J. Invertebr. Pathol. , 21: 215-225.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Garland, C.D., 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. CSIRO Mar. Lab. Rep. 205, 44.
- Brown, M.R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. and Trenerry, C., 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. Journal of Applied Phycology, 11: 247-255.
- Cirik, S. ve Gökpmar, Ş. 1999. Plankton Bilgisi ve Kültürü. E. Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No:47, Ders Kitabı 2. Baskı, sayfa 274.
- Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. In: “Handbook of Migro algal Mass Culture” A. Richmond ed., CRC Press, Florida, pp. 421-454.
- Cohen, Z., Vonshak, A. & Richmond, A., 1988 Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. Journal of Phycology 24, 328– 332.

- Davis, H.C. ve Guillard, R.R. 1958. Relative value of ten genera of micro-organisms as foods for oyster and clam larvae. Fish. Buil. US, 58:293-304.
- Day J.G., A.P. Edwards, G.A. Rodgers. 1991. Development of an industrial-scale process for the heterotrophic production of microalgal mollusc feed. Bioresour. Technol., 38, pp. 245-249.
- Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. and Casteil, J.D., 1986. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L.fed *Chaetoceros gracilis* Schutt of varied chemical composition. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 96: 15-26.
- Fábregas, J., Garcia, D., Fernandez-Alonso, M., Rocha, A.I., Gomez-Puertas, P., Escribano, J.M., Otero, A. and Coll, J.M. 1999. *In vitro* inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. Antiviral Res. 44, 67-73.
- Fidalgo J. P., Cid A., Torres E., Sukenik A., Herrero C. 1998. Effects of Nitrogen Source and Growth Phase on Proximate Biochemical Composition, Lipid Classes and Fatty Acid Profile of the Marine microalga *Isochrysis galbana*. Aquaculture. 166: 105-116.
- Flynn K.J., Zapata M., Garrido J.L., Oepik H., Hipkin C.R. 1993. Changes in carbon and nitrogen physiology during ammonium and nitrate nutrition and nitrogen starvation in *Isochrysis galbana*. Eur. J. Phycol. 28(1): 47-52.
- Fulks W, Main KL., 1991. Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceeding of a U.S.-Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, pp. 364.
- Gladu, P.K., Patterson, G.W., Wikfors, G.H., Smith, B.C., 1995. Sterol, fatty acid, and pigment characteristics of UTEX 2341, a marine eustigmatophyte identified previously as *Chlorella minutissima* (Chlorophyceae). J. Phycol. 31, 774-777.
- Gökpınar, Ş., 1991. Akuakültürde önemli beş deniz flagellat'ının inorganik azot alınimleri üzerine sıcaklık değişimlerinin etkisi. (Doktora Tezi). Dokuz Eylül Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, sayfa,88.

- Grobbelaar, J.U., 2000. Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *J Appl Phycol* 12:201–206.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum, New York, pp. 296–360.
- Harwood, J. L., 1988. Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:101–38.
- Horrobin, D.F., 1999. Lipid metabolism, human evolution and schizophrenia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Volume 60, Issues 5-6, Pp: 431-437
- Hu, Qiang., 2004. Environmental effects on cell composition, in *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, Richmond, A. (Eds) Blackwell publishing company, pp. 83-93.
- Kaufman, Z.G., Lively, J.S. and Carpenter, E.J., 1983. Uptake of nitrogenous nutrients by phytoplankton in a Barrier Island Estuary: Great South Bay, New York. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 17:483-493.
- Kristiansen, S. and Lund, B.A., 1989. Nitrogen cycling in the Barents Sea-I. Uptake of nitrogen in the water column. *Deep-Sea Res.* 36:255-268.
- Levasseur, M., Thompson, P.A., Harrison, P.J., 1993. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *J. Phycol.* 29, 587–595.
- Liu C., Lin L. 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis sp.* CCMP1324. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42: 207-214.
- Lourenco, S., Barbarino, E., Mancini-Filho, J., Schinke, K., Aidar, E., 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: An evaluation for aquaculture. *Phycologia*, 41: 158-168.

- Lubian LM, Montero O, Moreno-Garrido I, Huertas IE, Sobrino C, Gonzales-del Valle M, Pares G., 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology* 12: 249–255.
- Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O., Sukenik, A., 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture* 133, 295–309.
- Maruyama, I., Nakamura, T., Matsubayashi, T., Ando, Y. and Naeda, T., 1986. Identification of the alga known as ‘marine chlorella’ as a member of the Eustigmatophyceae. *Jap. J. Phyco.* 34: 319-325.
- Maruyama, I., Nakao, T., Shigeno, I., Ando, I. and Hirayama, K., 1997. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the massculture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 358: 133–138.
- Molina-Grima E., Sanchez-Perez J.A., Garcia-Camacho F., Fernandez-Sevilla J.M., Acien-Fernandez F.G. 1994. Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41(1): 23-27.
- O. Morineau-Thomas<sup>1</sup>, P. Legentilhomme<sup>1</sup>, P. Jaouen<sup>1,\*</sup>, B. Lepine<sup>2</sup> ve Y. Rince. 2001. Influence of a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*. *Biotechnology Letters* 23: 1539–1545.
- Okauchi, M., 1991. The status of phytoplankton production in Japan. In: Fulks, W., Main, K.L. (Eds.), *Rotifers and Microalgae Culture Systems*. Proceedings of a US–Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolulu, HI, pp. 247– 256
- Ötles, S., and Pire, R., 2001. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *J. AOAC International* 84: 1708-1714.
- Owens T.G., Gallagher J.C., Alberte R.S., 1987. Photosynthetic lightharvesting function of violaxanthin in *Nannochloropsis* spp. (Eustigmatophyceae). *J. Phycol.* 23: 79-85.

- Patterson, G.W., Tsita-Tsardis, E., Wikfors, G.H., Gladu, P.K., Chitwoods, D.J., and Harrison, D. 1994. Sterols and alkenones of *Isochrysis*. *Phytochemistry* 35: 1233-1236.
- Peirson, W.M. 1983. Utilization of eight algal species by the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus*.( Say). *J.Exp. Mar. Biol.Ecol.*, 68: 1-11.
- Price, N.M., Cochlan, W.P. and Harrison, P.J., 1985. Time course of uptake of inorganic and organic nitrogen by phytoplankton in the Strait of Georgia: comparison of frontal and stratified communities. *Mar. Ecol. Prog. Scr.* 27:39-53.
- Richmond, A., 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *J. appl. Phycol.* 12: 441–451.
- Rodolfi, L., Zittelli G.C., Barsanti L., Rosati G. and Tredici, M.R., 2003. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomolecular Engineering* 20: 243-248
- Roessler, P. G., 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* 26:393–399.
- Sánchez M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L.M. and Montero O., 2005. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Food Engineering* 66: 245–251.
- Sánchez, S., Martínez, M.E. and Espinola, F. 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal* 6, 13-18.
- Servel M., Claire C., Derrien A., Coiffard L., De Roeck-Holtzhauer Y. 1994. Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry.* 36(3): 691-693.
- Seto A, Kumasaka K, Hosaka M, Kojima E, Kashiwakura M, Kato T., 1992. Production of eicosapentaenoic acid by marine microalgae and its commercial utilization for aquaculture. In Kyle DJ, Ratledge C (eds), *Industrial Applications*



- of Single Cell Oils. American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, pp. 219–234.
- Shifrin, N.S. and Chisholm, S.W., 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and lightdark cycles. *Journal Phycol.* 17:372–84.
- Sukenik, A. Yamaguchi, Y. And Livne, A., 1993, Alterations in lipid molecular species of the marine Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal Phycology*, 29: 620-626.
- Sukenik, A., 1991. Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Bioresource Technol.* 35 (3), 263–269.
- Sukenik, A., 1999. Production of EPA by marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*. In: Cohen E, ed. *Chemicals from Microalgae*. London: Taylor & Francis.
- Sukenik, A., Carmeli, Y., Berner, T., 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal Phycology* 25: 686–692.
- Sukenik, A., Carmeli, Y., Berner, T., 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal Phycology* 25: 686–692.
- Thomas O. Morineau, P. Legentilhomme, P. Jaouen, B. Lepine & Y. Rince. 2001. Influence of a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*. *Biotechnology Letters* 23: 1539–1545.
- Thompson, P.A., Levasseur, M.E. and Harrison, P.J., 1989. Light-limited growth on ammonium vs. nitrate: what is the advantage of marine phytoplankton? *Limnol. Oceanogr.* 34:1014-1024.
- Thronsen, J. 1993. The planktonic marine flagellates. In *Marine Phytoplankton. A guide to naked flagellates and coccolithophorids*. (R. Tomas Carmelo, ed.) pp. 7-131, Academic Press, San Diego, California.

- Vazhappily R., Chen F. 1998. Eicopentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *JAOCS*. 75(3): 393- 397.
- Volkman J. K., Smith D. J., Eglinton G., Forsberg T.E.V., Corner E.D.S. 1981. Sterol and fatty acid composition of four marine Haptophyceae Algae. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*. 61: 509-527.
- Volkman, J.K., Brown, M.R., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W., 1993. The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae. *J. Phycol.* 29: 69–78
- Walne, P.R. 1967. The food value of 13 species of unicellular algae to *Artemia salina*. ICES, CM. 1967/E: 5-7 pp.
- Xu, N., Zhang, X., Fan, X., Han, L. and Zeng, C., 2001. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion sp.* (Eustigmatophyta). *J. Applied Phycology* 13: 463–469.
- Yanar Y, Celik M, Yanar M., 2004. Seasonal changes in total carotenoid contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and *Metapenaeus monoceros*) inhabiting the eastern Mediterranean. *Food Chemistry* 88 (2): 267-269.
- Ziegler, R.G., Colavito, E.A., Hartge, P., McAdams, M.J., Schoenberg, J.B., Mason, T.J., Fraumeni, J.F.J., 1996. Importance of a-carotene, b-carotene and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 612–615.
- Zittelli G., Rodolfi L. and Tredici, M.R., 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products- species of high potential, in *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, Richmond, A. (Eds) Blackwell publishing company, pp. 298-303.
- Zou, N. and Richmond, A., 2000. Light-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis sp.* (Eustigmatophyceae). *Journal of Applied Phycology* 12: 349–354.