

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Müzeyyen KÖKSAL

**FARKLI ORTAM KOŞULLARININ (IŞIK, SICAKLIK, BESİN EKSİKLİĞİ
VE HAVALANDIRMA) *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* FLOTOW'DA
BÜYÜME VE ASTAKSANTİN MİKTARINA ETKİSİ**

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2008

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI ORTAM KOŞULLARININ (IŞIK, SICAKLIK, BESİN EKSİKLİĞİ
VE HAVALANDIRMA) *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* FLOTOW'DA
BÜYÜME VE ASTAKSANTİN MİKTARINA ETKİSİ**

Müzeyyen KÖKSAL

YÜKSEK LİSANS

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez .../.../ 2008 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu
İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....

İmza

İmza.....

Prof.Dr. Oya IŞIK
DANIŞMAN

Doç.Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
ÜYE

Doç.Dr. Fatma ÇEVİK
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Temel bilimler Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

**Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir.**

Proje No: SÜF.2006.YL.9

• **Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
YÜKSEK LİSANS

**FARKLI ORTAM KOŞULLARININ (IŞIK, SICAKLIK, BESİN EKSİKLİĞİ
VE HAVALANDIRMA) *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* FLOTOW'DA
BÜYÜME VE ASTAKSANTİN MİKTARINA ETKİSİ**

Müzeyyen KÖKSAL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof.Dr. Oya IŞIK

Yıl 2008, Sayfa:43

Jüri : Prof.Dr. Oya IŞIK

Doç.Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ

Doç Dr. Fatma ÇEVİK

Laboratuvar koşullarında kültüre alınan yeşil alg *Haematococcus pluvialis* vejetatif büyümesine ve kiste dönüşümüne, ışık, sıcaklık ve havalandırma etkisini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada 27 ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma ve % 2-10 aşılama miktarlarının vejetatif gelişmeye önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Kist oluşumunun sağlanması için 177 ve 379 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma sağlanmış ve aynı zamanda besi ortamında azot eksilmesi yapılmıştır. Düşük hücre yoğunluğunda 27 ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddetleri büyümenin 11. gününde astaksantin birikimine neden olurken, yüksek hücre yoğunluğu ve azot eksik ortamda 177 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinin kist oluşumu için yeterli olmadığı saptanmıştır. En yüksek astaksantin miktarı %3.60 ile 379 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddetinde, 24 °C sıcaklıkta ve havalandırma yapılan kültürlerde saptanmıştır. Çalışmada 35 °C sıcaklığın ve 177 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanmanın hücrelerde ölüme sebep olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Haematococcus pluvialis*, ışık, sıcaklık, azot eksikliği astaksantin

**ABSTRACT
MSc THESIS**

**THE EFFECTS OF THE DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS
(LIGHT, TEMPERATURE, NUTRIENT DEFICIENCY AND AERATION)
ON THE GROWTH and ASTAXANTHIN QUANTITY OF
HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS FLOTOW**

Müzeyyen KÖKSAL

DEPARTMENT OF FISHERIES

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor : Prof.Dr. Oya IŞIK

Year 2008, Page:43

Jury : Prof.Dr. Oya IŞIK

Assoc.Prof.Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ

Assist.Prof.Dr. Fatma ÇEVİK

In the study carried out to determine the effects of light intensity, temperature, nitrogen deficiency and aeration on the vegetative growth and form of the cysts of the green alga *Haematococcus pluvialis* in the laboratory conditions, vegetative growth of the cultures were found similar at the light intensities of 27 and 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and % 2-10 inoculation amounts. *H. pluvialis* cultures were exposed to the 177 and 379 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensities and N-deficient condition to form cyst and accumulate astaxanthin. While 27 and 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensities caused the accumulation of astaxanthin at the low cell concentrations, 177 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ irradiance was insufficient to turn red the cells in the N-deficient medium and high cell densities. The highest astaxanthin content of % 3.60 was obtained from the cultures aerated, at the irradiance of 379 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and 24 °C. In the study, it was observed that 35 °C temperature and 177 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ irradiance caused the death of the cells.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, light, temperature, N deficiency, astaxanthin

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans öğrenimim süresince bana ilgisini ve desteğini hiç esirgemeyen, büyük bir sabır ve titizlikle bilgi ve tecrübelerini aktararak gelişmemi sağlayan, inandığım ve güvendiğim değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Oya IŞIK'a, tez çalışmam esnasında ilgisini ve yardımlarını gördüğüm, laboratuvar deneyim ve birikimlerinden yararlandığım değerli Ar.Gör. Leyla USLU'ya, Doç.Dr. Tolga GÖKSAN, Doç.Dr. Fatma ÇEVİK, Yrd.Doç.Dr. Selin SAYIN'a ve Ar. Gör. Levent SANGÜN'e, tez çalışmam süresince tüm varlıklarıyla her zaman yanımda olan değerli iş ortaklarım ve meslektaşlarım Yüksek lisans öğrencileri Yasemin BULUT ve Hande OGUZ'a, engin düşüncelerini paylaşan ve manevi desteğini ilgisini gördüğüm değerli meslektaşım Ar.Gör. Barış DERİCİ ve Ar.Gör. Sinan MAVRUK'a, Su Ür. Müh. Barış SEZER'e denemelerimin yürütülmesi ve analizler sırasında yardımlarını gördüğüm Su Ürünleri Mühendisleri Ahmet Mahmut AKSOY, Evin PİRİNÇCİ, Hazal BAŞAR, Cansev AZGIN, Sercan ŞAŞMAZ, Nehir ÜNSAL, Burcu AK, Gizem ÇEVİKEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmam esnasında benimle birlikte olup cesaret veren, bana inanıp maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, asla beni yalnız bırakmayan hayatımdaki en değerli varlığım ailem; annem, babam, kardeşim ve ağabeyime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	6
3. MATERYAL VE METOD	10
3.1. Materyal.....	10
3.1.1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	10
3.1.2. Besi Ortamı	11
3.1.3. <i>Haematococcus pluvialis</i> Stok Kültürleri	11
3.1.4. Hasat	12
3.2. Metod	12
3.2.1. Deneme Planı.....	12
3.2.1.1. Deneme (1).....	12
3.2.1.2. Deneme (2).....	13
3.2.1.3. Deneme (3).....	14
3.2.1.4. Deneme (4).....	15
3.2.2. Deneme Süresince Günlük Yapılan Analizler.....	15
3.2.2.1. Astaksantin Analiz Metodu.....	15
3.2.2.2. Klorofil- <i>a</i> Analizi.....	17
3.2.2.3. Kuru Madde Analizi.....	18
3.2.2.4. Hücre Sayımı.....	19
3.2.2.5. Optik Yoğunluk.....	19
4. BULGULAR.....	20
4.1. Deneme (1).....	20
4.2. Deneme (2).....	22

4.3. Deneme (3)	26
4.4. Deneme (4).....	30
5. TARTIŞMA.....	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	43

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 1.1. Bazı Organizmaların Astaksantin İzomerlerinin Dağılımı	4
Çizelge 3.1. Denemede Kullanılan 3N-BBM+V <i>Haematococcus</i> Besi Ortamı	11

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. <i>Haematococcus pluvialis</i> vejetatif hücreleri ve kistleri.....	10
Şekil 3.2. <i>H. pluvialis</i> başlangıç kültürleri.....	12
Şekil 3.3. <i>Haematococcus pluvialis</i> Deneme Kültürleri.....	14
Şekil 3.4. Analiz Sonucu Elde Edilen Astaksantin Pigmenti.....	17
Şekil 3.5. Analiz Sonucunda Elde Edilen Klorofil- <i>a</i> Pigmenti.....	18
Şekil 4.1. %2 Aşılamanın Yapıldığı ve 27 ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanmanın Uygulandığı Kültürlere ait OD Değerleri.....	20
Şekil 4.2. %10 Aşılamanın Yapıldığı ve 27 ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanmanın Uygulandığı Kültürlere ait OD Değerleri.....	21
Şekil 4.3. 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki OD Değerleri.....	22
Şekil 4.4. 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Kuru Madde Miktarı.....	22
Şekil 4.5. 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Vejetatif Evre Klorofil- <i>a</i> Değerleri.....	23
Şekil 4.6. 177 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Kistik Evre Klorofil- <i>a</i> Değerleri.....	24
Şekil 4.7. 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Hücre Sayısı	24
Şekil 4.8. Havalandırılmalı ve Havalandırmaz Kültürlerdeki Kuru Madde Miktarı.....	26
Şekil 4.9. 379 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Havalandırılmalı ve Havalandırmaz Kültürlerdeki Klorofil- <i>a</i> Grafiği.....	27
Şekil 4.10. Havalandırmaz Kültürlerde Astaksantin Grafiği.....	27
Şekil 4.11. Havalandırılmalı Kültürlerde Astaksantin Grafiği.....	28
Şekil 4.12. Havalandırılmalı ve Havalandırmaz Kültürlerde Astaksantin Grafiği.....	29
Şekil 4.13. 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki OD Değerleri.....	30
Şekil 4.14. 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Kuru Madde Miktarı.....	30
Şekil 4.15. 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Klorofil- <i>a</i> Değerleri.....	31
Şekil 4.16. Vejetatif Evre Hücre Grafiği.....	33

1. GİRİŞ

Sucul organizmaların ülkemizde besin olarak tüketilmesi bilinci giderek artmaktadır. Balık, karides gibi zaten tüketilmekte olan besinlere yeni bir besin kaynağı olan alg ilave edilmiştir. Hücre içinde biriktirdikleri protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitamin, mineral pigmentler ve daha pek çok önemli ürün nedeniyle, insanlar tarafından başlıca, besin desteği olarak kullanılmaktadır. Besin olarak kullanımı ile birlikte mikroalglerden elde edilen metabolitler mikrobiyal teknolojinin birincil çalışma alanını oluşturmaktadır. Bugün başta *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Spirulina* olmak üzere diğer pek çok türden elde edilen hücre metabolitleri veya kurutulmuş biyomas, ticari olarak değerlendirilmektedir. Bu metabolitler, farmasötik ve nutrasötik olarak sağlıklı ürünler ve kozmetik alanında pazar bulmaktadır.

Pigmentler son yıllarda üzerinde en çok çalışılan konulardan birini oluşturmakta olup, mikroalgler bu çalışmalarda potansiyel organizmalar olarak görülmektedir. Günümüzde ticari üretimi yapılan mikroalgler ve en önemli pigmentler; beta-karoten (*Dunaliella salina*), fikosiyanın (*Spirulina sp.*) astaksantin (*Haematococcus pluvialis*), lutein (*Muriellopsis sp.*) ve fikoeritrin (*Porphyridium cruentum*)'dir.

Karotenoid pigmentlerinden olan beta-karoten ve astaksantin kullanım amaçları benzer olsa da astaksantin daha üstün özelliklere sahiptir. Astaksantin kullanım alanlarını akuakültür çalışmalarında başta salmon ve alabalık olmak üzere çipura, mercan, karides ve kerevit gibi ekonomik değere sahip türlerin ve akvaryum balıklarının renklendirilmesinde, kümes hayvanları endüstrisinde yumurta sarılarının renklendirilmesinde, antioksidan etkisi sebebiyle insan sağlığında kullanımı (Gökpınar, 2005) şeklinde sıralamak mümkündür.

Yetiştiriciliği yapılan mikroalg türlerinden *Haematococcus pluvialis*, krill, kerevit ve karides, kırmızı yengeç işleme atıkları gibi bitkisel ve hayvansal içerikli doğal karotenoidlerin kullanılabilirliği konusunda araştırmalar yapılmaktadır. Bu konu ile ilgili çalışmalara hız kazandırılması, doğal kaynaklarının kapsamlı bir şekilde incelenmesi ve ekonomik yolla tüketicinin isteği yönünde doğal pembe-kırmızı rengin sağlanması amacıyla araştırmaların yapılması ülkemiz için yararlı

olacaktır. Karotenoidin dış ülkelerden getirilmesi döviz kaybına yol açmaktadır bu nedenle balıkların pigmentasyonunda kullanılabilecek yurt içinde üretilen, ucuz doğal karotenoid kaynakların araştırılması büyük önem taşımaktadır (Ergün ve Erdem,1999).

Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae), yüksek ışık, tuzluluk ilavesi, azot ve fosforun ortamdaki çekilmesi gibi stres koşulları altında hücre içinde biriktirdiği astaksantin pigmenti ile mikroalgal biyoteknolojide son zamanlarda çok önemli bir konuma gelmiştir. Özellikle güneş altında 4-5 gün içinde, kullanılan sisteme bağlı olarak kuru ağırlığının % 2-5'i arasında astaksantin biriktirir. Günümüzde astaksantin için en önemli pazar, salmon ve alabalıkların karakteristik et renklerinin sağlanması içindir. Roche firmasının ürettiği sentetik astaksantin fiyatı 2500 USD/kg civarında iken doğal ve organik bir ürün olan *Haematococcus*'tan elde edilen astaksantin fiyatı 7.000/8000 USD/kg civarındadır. *Haematococcus*'tan üretilen astaksantin sahip olduğu spesifik izomer yapı, balıkların pigmentlenmesinde kullanılan sentetik ve doğal astaksantin arasındaki farkın kolaylıkla ayırt edilebilmesini sağlamaktadır (Trujman, 1997). Son yıllarda tüketicilerin bilinçlenmesi ve organik ürünlere olan talebin artması, daha pahalı ama doğal olan *Haematococcus* üretimini desteklemektedir.

Haematococcus pluvialis canlılarda renklenmeyi sağlayan karotenoid pigmentlerinden biri olan astaksantin (3R,3'R dihidroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) ce oldukça zengin bir alg türüdür. Astaksantin sadece ihtiva ettiği kırmızı renkten dolayı değil ayrıca yapısında bulundurduğu β -karoten, zeaksantin, kantaksantin gibi ve hatta yapısındaki E- vitamininden dolayı anti-oksidant etkiye sahip bir karotenoiddir. Astaksantin doğada sadece birkaç canlı tarafından sentezlenebilirken, canlıların birçoğu bu gereksinimlerini dışardan aldıkları besinlerle sağlamak zorundadırlar. Bunu ya doğrudan bu pigmenti içeren canlıları tüketerek ya da yem rasyonlarına dışardan eklenerek karşılamaları mümkün olmaktadır (Lorenz ve Cysewski, 2000). *Haematococcus pluvialis* bu renk maddesini yüksek oranda doğal olarak içermesinden dolayı son yıllarda oldukça ilgi gören bir alg türü olmuştur. Gelişen teknoloji ile birlikte kullanım alanları artmaya başlayan bu pigment, yaygın biçimde balık, kabuklu ve kümes hayvanlarının yem rasyonlarında, insan besinlerinde, katkı

maddesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle sucul canlıların üretim sektöründe astaksantin, yıllık olarak yaklaşık 200 milyon dolar'lık bir pazar bulmaktadır (Hagen, 2001).

Haematococcus pluvialis Flotow Chlorophyceae sınıfına ait Volvaceales takımının üyesi olan, tek hücreli yeşil bir tatlı su algidir (Kobayashi ve ark., 1997). *Haematococcus pluvialis*'in büyüme safhası hem hareketli hem de hareketsiz forma sahiptir. Görünümleri armut şeklinde olup hücre büyüklükleri ise 8-50 µm çapında olmaktadır. Fincan şeklinde kloroplast ile sık, dağınık ve çok sayıda preneoid bulunmaktadır. Kontraktil koful oldukça düzensiz olarak protoplastın yüzeyine yakın ve dağınık bulunmaktadır. Bir nukleusu, apikal konumlu eşit uzunlukta iki kamçısı ve geniş açılı porlara sahip selüloz hücre duvarı bulunmaktadır. Hücre duvarı kalın, jelatinimsi olup protoplast iplikler halinde görülmektedir.

Haematococcus pluvialis ekonomik değere sahip olan mikroalglerden birisidir. Astaksantin, bıldırcın ve tavukların yumurta sarılarını renklendirmede ve sucul üretimde salmonidler ve karides yemlerinde besin destekleyicisi olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında astaksantin insanlar tarafından doğal destek gıda olarak ve kanser hastalarında (Mayne, 1996; Chew ve ark., 2000), deri hastalıklarında ve kalp rahatsızlığı gibi hastalıklarda kullanılmıştır (Querin ve ark., 2003). Astaksantince zengin mikroalgin kullanıldığı farelerle yapılan denemelerde başarılı olunmuş ve insanlardaki *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda uygulanmak üzere yeni bir tedavi stratejisi olarak önerilmiştir (Wang ve ark., 2003). Son yıllarda *Haematococcus pluvialis*'deki astaksantin pigmentinden insan sağlığında faydalanılması konusuna ilgi artmıştır (Querin ve ark., 2003).

Haematococcus pluvialis'deki diğer ler, genel olarak β-karoten, zeaksantin, kantaksantin ve vitamin C ile vitamin E'dir. *Haematococcus* öncelikle 16:0, 18:1 ve 18:2 yağ asitlerine bağlı astaksantin monoesterlerini içermektedir. Serbest astaksantin tümü ve *Haematococcus*'daki mono ve diesterleri görsel olarak saf (3S, 3'S) izomer yapıya sahiptirler (Renstorm ve ark., 1981).

Haematococcus'daki astaksantin esterlerinin kompozisyonu, salmonidlerin doğal besin kaynağı olan krustaselerinkine benzemektedir. Kistleşmiş *Haematococcus*'un astaksantin yapısında yaklaşık olarak % 76 monoesterler, % 7

diesterler, % 1 â-â karoten, % 3 adonuribin ester, % 7 lutein, % 2 violaksantin ve % 1 neoksantin içermektedir. Bazı sucul canlılar doğal (3S, 3'S) yapıdaki astaksantin pigmentini içermektedir ve *Haematococcus* algi de bu canlılardan biridir (Trujman ve ark., 1997).

Çizelge 1.1. Bazı Organizmaların Astaksantin İzomerlerinin Dağılımı

TÜRLER	3S,3'S	(3R,3'R) ve (3R,3'S)	(3R,3'R)
Phaffia sp.	-----	<2%	>98%
Haematococcus pluvialis	100%	-----	-----
Sentetik astaksantin	25%	50%	25%
Atlantik salmonu	87-85%	2-6%	12-17%

Algal astaksantinde saf 3S,3'S formu sentezi görülebilir. *Haematococcus pluvialis*'deki 3S,3'S formu ayrıca salmon türlerinde bulunup baskın izomerlerle birebir eşleşmiştir. Serbest astaksantin doğada trans ve cis isomer yapılarından her ikisiyle yağ asitlerinin mono ve diesterleri ile birlikte az miktarda da olsa doğada bulunmuştur (Renstrom ve ark., 1981).

Haematococcus algi Japonya'da balık beslemede bir pigment kaynağı ve doğal kırmızı gıda boyası olarak kullanılmaktadır. Kanada Besin Denetleme Kurumu ve Amerika Besin ve İlaç Denetimi (FDA) son yıllarda *Haematococcus* alginin salmon balıklarının yemlerinde pigment kaynağı olarak kullanımını kabul edip onaylamıştır. *Haematococcus* alginin insan sağlığı için besleyici gıda desteği olarak tüketimi ve pazarlanması Avrupa ülkelerinde de onaylanmıştır.

Astaksantin pigmentinin kullanım amaçları antioksidan, hormon, bağışıklık sistemini uyarması, provitamin A kaynağı olması, üreme ve büyüme de olumlu etkileri ve zararlı UV ışınlarına karşı koruma etkisi olarak sıralanmaktadır. Yapılan çalışmalarla astaksantin deride DNA zararını ve ayrıca insanlarda güneş yanıklarını zamana bağlı olarak azalttığı saptanmıştır (Naguib, 2000). Sonuç olarak, 1990 yılından bu yana birçok şirket tarafından üretilmiş doğal astaksantin marketlerde yaygın bir şekilde satılmaya başlanmıştır. Hawaii'deki Mera Pharmaceuticals, Soft Gel Technologies, Inc., La Haye Laboratories ve Amerika'daki Cyanotech, Japonya'daki Itano ve İngiltere'deki Britannia Health örnek şirketlerdir.

Dünyada pek çok ülkede özellikle Norveç ve Kanada başta olmak üzere *Haematococcus*, akuakültür sektöründe yem olarak tüketilmektedir. Dünyada

akuakültür üretim sektöründe, yıllık yaklaşık 200 milyon dolar'lık pazara sahip olduğu bilinen astaksantin, antioksidan madde, kanatlı yemlerinde katkı maddesi, kozmetik alanında renk maddesi olarak son yıllarda birçok ülkede ve ülkemizde de tüketilmeye başlanmıştır. *Haematococcus* alginin ülkemizde ticari anlamda üretimi yapılmamaktadır. Bu çalışma, vejetatif kültürlerde farklı ışık şiddetlerine bağlı olarak en yüksek düzeyde canlı kütle edebilmek ve yüksek ışık, yüksek sıcaklık ve besin azlığı gibi stres faktörlerinin *Haematococcus pluvialis*'deki astaksantin birikimine etkisini belirlemek amacıyla planlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kobayashi ve ark. (1997) yeşil alg *Haematococcus pluvialis*'deki astaksantin ve antioksidan rolünü çalışmışlar ve genel olarak, karotenoidlerin fotosentetik canlılarda iki önemli rolü olduğunu bildirmişlerdir. Birincisi, ışık enerjisini yakalayıp, ışığın tutulması ve klorofillere aktarılmasında yardımcı pigmentler olarak rol oynamaktadırlar. İkinci ve daha önemli görevi ise karotenoidler, fotosentetik organeller olarak hücreyi ışık kaynaklı stresten korurlar. Örneğin foto-oksidasyon sonucu meydana gelen oksijenin olumsuz etkisini azalttığını belirtmişlerdir.

Astaksantin doğal kaynağı mikroalg *Haematococcus*, ticari bir potansiyele sahiptir. *Haematococcus* tarafından üretilen astaksantin ileri teknoloji ile ticari bir ürün olmuştur. *Haematococcus* kuru ağırlığında % 1.5-3.0 astaksantin içermektedir ve bu pigment sucul üretimde, kümes hayvanları yemlerinde ve dünyanın pek çok ülkesinde doğal besin satan marketlerde talep görmektedir (Lorenz ve Cysewski, 2000).

Tuzluluk stresi altında yeşil alg *Hematococcus pluvialis*'de ışıktan bağımsız olarak astaksantin üretimi çalışılmıştır. Vejetatif hücrelerde % 0.1 NaCl, MgCl₂, KCl veya CaCl₂ ile karanlık ortamda stres oluşturulmuş ve kist oluşumu sağlanmıştır. Tuz stresi uygulanan kahverengi-kırmızı kist hücreleri karanlık ortamda hücrede 30 pg astaksantin biriktirmiştir. Sonuç olarak tuz stresi karanlık ortamda hem kist oluşumuna hem de karotenoid biyosentezine neden olmuştur (Kobayashi ve ark., 1997).

Orasa ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada mikroalg *Haematococcus pluvialis*'i litrede 0'dan 1 grama kadar NaNO₃ ile kültüre almışlar ve optimum büyümeyi 0,15 gr L⁻¹'da saptanmışlardır. Bunun yanında sodyum asetat ve malonate (% 0'dan 2'ye kadar) ile ototrofik kontrol kültürlerine sırasıyla üç ve beş kattan daha fazla astaksantin birikimine ulaşılmıştır. Ancak sodyum asetat ve malonatenin yüksek konsantrasyonlarının büyümeyi durdurduğu ve toplam karotenoid ve klorofil-*a* oranının azot azlığının iyi bir belirleyicisi olduğu gösterilmiştir

Aflalo ve ark. (2007) stres koşulları altında kırmızı karotenoid üreten *Haematococcus pluvialis*'in ticari üretimi için iki aşama olduğunu belirtmişlerdir. İlk aşama biyomas üretimi (optimum büyüme ve yeşil safha) ve ikinci aşama pigment (sürekli stres, kırmızı safha) oluşumudur. İki aşamalı üretim sisteminde 11.5 mg L⁻¹ gün⁻¹ ile daha yüksek astaksantin üretimi (kuru biyomasın % 4) ile astaksantin elde edilmiştir.

Bu sistem dışarı kültürü için uygulanabilir ve astaksantin üretimi daha fazla yükseltilebilir. Her iki evrede hücre yoğunluğuna aydınlanmanın etkisinin ayarlanmasıyla yeşil biyomas büyümesi ve kırmızı pigment birikiminin artırılabilceğini belirtmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada birkaç mikroalg türünde astaksantin birikimi çalışılmış, en yüksek astaksantin birikim oranı $2.7 \text{ mg}^{-1} \text{ gün}^{-1}$ ve toplam astaksantin içeriği 22.7 mg g^{-1} biyomas ile *Hematococcus pluvialis*'de bulunmuştur. *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Chorella zofingiensis* ve *Scenedesmus vacuolatus*'da sırasıyla 19.2, 14.3, 10.9, 6.8 ve 2.7 mg astaksantin g^{-1} elde edilmiştir (Orasa ve ark., 2001).

Kang ve ark. (2006) yürüttükleri bir çalışmada CO_2 hava karışımı ve yoğun ışık altında *Haematococcus pluvialis*'in astaksantin sentezini teşvik etmek amacıyla karbon/azot (C/N) oranının etkisi araştırmışlardır. $200 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık altında sürekli aydınlatma ile stres uygulandığında *Haematococcus pluvialis*'in C/N oranı ve astaksantin içeriği arasında pozitif bir ilişki bulmuşlardır. C/N oranı ve astaksantin içeriği hetetrofik olarak teşvik edildiğinde de benzer olduğu saptanmıştır. Daha düşük C/N oranı *Haematococcus*'un kiste dönüşümünü geciktirmemiş, fakat ışık miktarının yetersiz olmasından dolayı kültürdeki biyomas artışı, astaksantin miktarının azalmasıyla sonuçlanmıştır. Ancak, düşük C/N oranları astaksantin üretimini azalttığından dolayı, daha kısa sürede astaksantin üretimine teşvik, $200\text{-}300 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ üzerindeki ışık yoğunluğuna yükseltilmesiyle başarılmıştır. Düşük C/N oranları kültürlerdeki hücre yoğunluğunu ve astaksantin pigmenti miktarını artırmasıyla sonuçlanmıştır. Sonuç olarak, fototrofik *Haematococcus pluvialis*'in astaksantin üretiminde C/N oranından daha fazla ışık yoğunluğunun tetikleyici olduğu bulunmuştur.

Tek hücreli yeşil tatlı su mikroalgi *Haematococcus pluvialis* hücresinde içeriğinde % 80'den daha fazla astaksantin içermektedir. Astaksantin üretimi başlıca besin azlığı (N-P), yüksek tuzluluk konsantrasyonları ve yüksek sıcaklık gibi faktörler etkisiyle artış göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, *Haematococcus pluvialis*'in büyüme ve astaksantin üretiminde, ışık yoğunluğu, havalandırma gibi çevresel faktörlerin ve besleyici elementlerin etkisi araştırılmıştır. *Haematococcus pluvialis*'in en iyi büyümesi BBM kültür ortamında, 28°C 'de, sürekli beyaz floresan ışık ($177 \mu\text{mol}$

foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) aydınlatması altında ve sürekli havalandırma ile (1.5 v.v.m) $3.5 \cdot 10^5$ hücre/ml bulunmuştur. En yüksek astaksantin üretimi ise BAR kültür ortamında sürekli aydınlatma ($345 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ile 1 g L^{-1} sodyum asetat ve havalandırma ile 98 mg g^{-1} biyomas olarak elde edilmiştir (Dominquez ve ark., 2003).

Garcia ve ark. (2005), balon ve kolon tübüler fotobiyoreaktörde *Haematococcus pluviialis*'in dışarı kültürünün karşılaştırılmasını yapmışlardır. Çalışmada aynı hacime sahip ve benzer yollar uygulanan sistemlerde reaktör dizaynının etkisini araştırmışlardır. Dışarı kültürde *Haematococcus pluviialis*'in biyokimyasal kompozisyonu ve hücre morfolojisindeki değişimlere bağlı yeni ve daha hızlı metotlar geliştirip, kültürün tanımlanmasında, biyomas yoğunluğunun hesaplanmasında, biyomasın astaksantin içeriği, klorofil ve karotenoid içeriğini belirlemek amacıyla kolorimetrik metot kullanmışlardır. Reaktörlerden elde edilen verilere göre çok yüksek ışık yoğunluğuna bağlı astaksantin veya *H. pluviialis* biyomasının üretimi için tübüler reaktörlerin daha uygun olduğunu saptamışlardır. Tübüler fotobiyoreaktörde 16 günün sonunda 7.0 gr L^{-1} (kuru ağırlıkta), genel olarak biyomas üretiminde günde 0.41 gr L^{-1} 'ye ulaşılmıştır. En yüksek günlük biyomas üretimi 0.55 gr L^{-1} ile $130 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlatmadaki tübüler fotobiyoreaktörde elde edilmiştir. Bununla birlikte tübüler fotobiyoreaktördeki biyomasın içeriği kuru ağırlıkta % 2.0'a yükselirken balon kolonlardaki içeriği kuru ağırlıkta % 0.5'de kalmıştır.

Yürütülen bir çalışmada *Haematococcus pluviialis*, 40 ve $230 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ olmak üzere iki farklı ışık yoğunluğuyla N ve Mg^{+2} eksikliği altında kültüre alınmış, en yüksek astaksantin konsantrasyonu, N eksikliği ve yüksek ışık yoğunluğunda $49.5 \mu\text{g/ml}$ astaksantin bulunmuştur. N eksikliği hücre bölünmesini durdururken astaksantin sentezinde yüksek ışık yoğunluğundan çok daha büyük bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Mg^{+2} eksikliği ile birlikte düşük ve yüksek ışık yoğunluğunda sırasıyla 7 ve $26 \mu\text{g ml}^{-1}$ astaksantin üretilmiştir. Astaksantin miktarı, N ve Mg^{+2} 'un eksikliğinde sadece N azlığına göre daha düşük fakat Mg^{+2} eksikliğindekine göre daha yüksek olmuştur (Fabregas ve ark., 2000).

Cifuentes ve ark. (2003), yürüttükleri çalışmada *Haematococcus pluviialis*'de astaksantin üretimi ve yığın kültürü için optimum koşulları saptamayı amaçlamışlardır. Çalışmada, Nevada (USA)'dan *Haematococcus pluviialis* kültürü temin edilmiş, besi

ortamı olarak ototrofik (NaNO_3 , NH_4Cl ve üre ile) ve mikсотrofik koşullar altında (4, 8, 12 Mm sodyum asetat ile) 2 foton flux ışık yoğunluğu (PFD) (35 ve $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) uygulanmıştır. Karotenoid oluşumu için 1) NaCl ilavesi ($\%0.2$ ve 0.8), 2) N azlığı, 3) Yüksek ışık yoğunluğu ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) uygulanmıştır. Amonyum kloritin, büyüme için en iyi azot kaynağı olduğu saptanmıştır ($k=0.7\text{div gün}$, $228\text{-}258 \text{ mg/l}^{-1}$ ve $2.0 \cdot 10^5\text{-}2.5 \cdot 10^5$ hücre/ ml^{-1} 35 ve 85 PFD). Yükselen asetat konsantrasyonu ile $85 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda büyüme azalmıştır. Işık karotenoid üretimini tetikleyen en önemli faktördür ve en yüksek karotenoid üretimi (4.9 mg L^{-1} , 25 pg hücre^{-1}) ön yetiştirme kültürlerinde nitrat ve düşük ışıhta bulunmuştur. NaCl konsantrasyonunun yükselmesi ile hücredeki karotenoid içeriğinin de yükseldiği gözlenmiş ancak yüksek oranda hücre ölümüyle sonuçlanmıştır. $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık altındaki kültürler, NaCl muamelesi uygulanan kültürler ile karşılaştırıldığında karotenoid içeriğinde artış olmamıştır. Hücrede en yüksek karotenoid içeriği 22 pg ve kuru ağırlıktaki astaksantin içeriği, (10.3 mg g^{-1}) $\% 0.8 \text{ NaCl}$ ile $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık altında bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada, yeşil alg *Haematococcus pluvialis*, yeşil hücrelerinin kiste dönüşümü değişimi, yeşil safhada asetat veya asetatla birlikte Fe^{+2} ilavesiyle teşvik edilmiştir. Astaksantin oluşumunda asetat ve Fe^{+2} 'nin birlikte ilavesi sadece asetat ilavesine oranla daha etkili olmuştur. Kistleşmiş alg hücrelerindeki karotenoid sentezi aktinomisin ya da sikloheksimid tarafından durdurulmuştur. Ancak daha sonra kist oluşumu, sadece asetat ilavesiyle teşvik edilmiş ve karotenoid ilavesiyle oluşumu durdurucuların varlığında bile Fe^{+2} ilavesiyle arttırılabilmektedir. Fe^{+2} arttırılan karotenoid sentezi potasyum iyod tarafından durdurulmuştur. Bu da, dört aktif oksijen türü olan, saf oksijen, oksit anyon, hidrojen peroksit ve peroxy radikal asetatın kistleşmeyi hızlandırdığı ve karotenoid oluşumunda bunların Fe^{+2} ile yer değiştirme işlevine sahip olduğunu göstermiştir (Kobayashi ve ark., 1997).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. *Haematococcus pluvialis*

Çalışmada kullanılacak olan yeşil mikroalg *Haematococcus pluvialis* 34/12 saf kültürü İngiltere'den, CCAP (Kültür Koleksiyon Alg ve Protozoa) kültür koleksiyon merkezinden getirilmiştir. Türün adaptasyonu algal biyoteknoloji laboratuvarında sağlanmış ve küçük hacimlerde kültüre alınarak daha büyük hacimlere çoğaltılmıştır. *Haematococcus pluvialis*'in sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir.

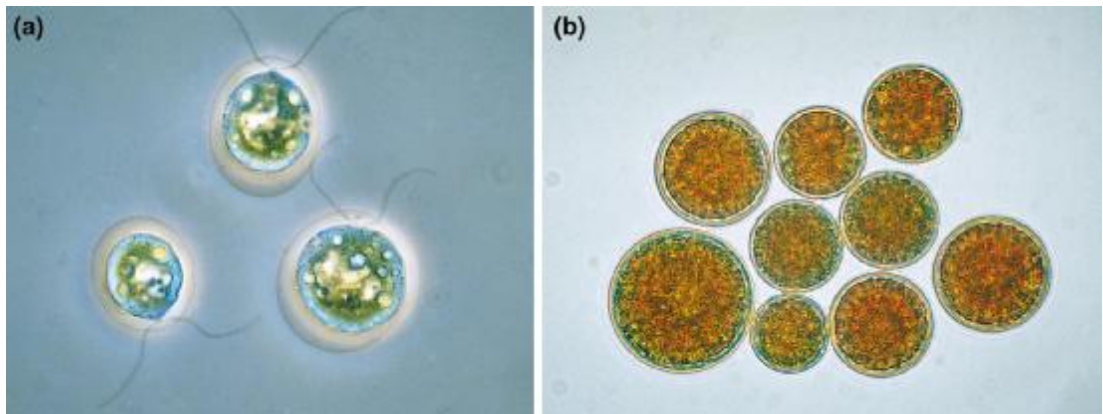
Bölüm: Chlorophyta

Sınıf: Chlorophyceae

Takım: Volvaceles

Aile: Haematococcaceae

Haematococcus pluvialis tek hücreli, çift kamçılı, hücre büyüklükleri yaklaşık olarak 8-50 µm çapında, armutsu yapıya sahip bir tatlı su algidir. Bir çekirdek ve iki eşit uzunlukta kamçıya sahiptir. Selüloz hücre duvarı geniş, açık porlara sahiptir. Hücre duvarı güçlü, kalın ve jelatinimsi, protoplast ise basit veya dallanmış iplikli şekildedir. Ayrıca kontraktıl vakuollere sahiptir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Haematococcus pluvialis* vejetatif hücreleri (a) ve kistleri (b).

Haematococcus pluvialis vejetatif hücreleri optimum 25-28 °C sıcaklıkta 6-8 pH aralığında, 25-100 µmol m⁻²s⁻¹ 'de aydınlatma şiddetinde büyümektedir.

3.1.2. Besi Ortamı

Haematococcus pluvialis'in 34/12 kültüründe, 3N-BBM (Bold Basal Medium with 3- fold Nitrogen) besi ortamı kullanılmıştır (CCAP). Besi ortamının içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. 3N-BBM + V *H. pluvialis* Besi Ortamı

3N-BBM +V <i>Haematococcus</i> Besi Ortamı		
Stok solüsyon g/1000 ml distile su	Stok solüsyon g/1000 ml distile su	Stok solüsyon g/1000 ml distile su
(1) 25.0 g	NaNO ₃	30.0 ml
(2) 5.0 g	CaCl ₂ .2H ₂ O	10.0 ml
(3) 7.5 g	MgSO ₄ .7H ₂ O	10.0 ml
(4) 7.5 g	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	10.0 ml
(5) 17.5 g	KH ₂ PO ₄	10.0 ml
(6) 2.5 g	NaCl	10.0 ml
(7)Mikro element solüsyonu		6.0 ml
(8) Vitamin B1		1.0 ml
(9) Vitamin B2		1.0 ml
Mikro element solüsyonu	1000 ml distile su içerisine 0.75g Na ₂ EDTA ilave edildikten sonra mikro elementler eklenir	
	FeCl ₃ .6H ₂ O	97.0 mg
	MnCl ₂ .4H ₂ O	41.0 mg
	ZnCl ₂ .6H ₂ O	5.0 mg
	CoCl ₂ .6H ₂ O	2.0 mg
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4.0 mg

3.1.3. *Haematococcus pluvialis* Stok Kültürleri

Denemede aşı olarak kullanılmak üzere, Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Algal Biyoteknoloji laboratuvarında vejetatif *Haematococcus pluvialis* 34/12 kültürü çoğaltılmıştır. Bu amaçla stok kültürler 250 ml'lik erlenlerde üretime alınmış (Şekil 3.2) ve kültür hacimlerini artırmak için 500 ml, 2L, 4L balonlar ve 5L litrelik kavanozların aşılmasında kullanılmışlardır. Optimum koşulları oluşturmak için oda sıcaklığı iklimlendirme cihazıyla 23±2 °C'ye ayarlanmış ve

kültürler $27 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde sürekli aydınlanmanın sağlandığı laboratuvar koşullarında tutulmuştur.



Şekil 3.2. *H. pluvialis* Başlangıç Kültürleri

3.1.4. Hasat

Haematococcus pluvialis, mikroskobik tek hücreli, hücre büyüklüğü 8-50 μm arasında değişen bir alg türüdür. Kültürün hasatı, santrifüj cihazı ile 3500 rpm'de 5 dakika süreyle, hücreler tüplerin dip kısmına çökene kadar yapılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Deneme Planı

Haematococcus pluvialis ile vejetatif büyüme ve astaksantin birikiminin sağlandığı kistik evre denemeleri 4 aşamada yürütülmüştür. Kültürlerde büyüme, optik yoğunluk (OD) ölçümleri ile belirlenmiştir.

3.2.1.1. Deneme (1)

Araştırmanın bu bölümünde, aydınlanma şiddeti ve aşılama miktarının *Haematococcus pluvialis*'in vejetatif gelişimine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla stok kültürler aşı olarak kullanılmak üzere çoğaltılmış ve OD değeri 0,73

olan *Haematococcus pluvialis* kültürü aşısı olarak kullanılmıştır. Kültürlere, 27 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ olmak üzere iki farklı ışık şiddeti uygulanmış ve vejetatif safhada günlük olarak OD ölçümleri için 3 ml örnek alınmıştır. Üç tekrarlı olarak planlanan bu denemede 12 adet 2'şer L'lik cam balonlara hazırlanmış olan 3N-BBM besi ortamından 1,5 L konularak otoklavda 121 °C'de 30 dakika sterilize edilmiş ve soğutulmuş ve 6 adet cam balona 30'ar ml aşısı eklenmiştir. Diğer 6 adet cam balona ise 150'şer ml aşısı ilave edilerek tüm cam balonlardaki kültürler, 27 ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanmanın sağlandığı iki ayrı rafa yerleştirilmiştir. Kültürler gün içerisinde 5-6 kez elle karıştırılmıştır. Laboratuardaki ortam sıcaklığı 20°C'ye ayarlanmıştır.

3.2.1.2. Deneme (2)

Araştırmanın bu bölümünde, vejetatif gelişim ve vejetatif evrenin tamamlanmasının ardından kist oluşumunu sağlamak amacıyla stres oluşturmak üzere yüksek ışık yoğunluğu (177 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve besin eksikliği faktörleri denenmiştir. Vejetatif kültürlerin oluşturulmasında üç adet dört L'lik cam balona, 2100 ml steril besi ortamı ve OD'si 0.48 olan 900 ml aşısı eklenmiştir.

Vejetatif süreçte 27 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddeti uygulanan kültürler hava verilmeyip gün içerisinde 5-6 kez elle karışım sağlanmıştır. Laboratuvarındaki ortam sıcaklığı 22 °C'ye ayarlanmış ve günlük olarak OD için 3 ml, hücre sayımı için 2 ml, klorofil-*a* için 5 ml, kuru madde için 20 ml örnek alınmıştır. Günlük ölçülen OD değerlerinin sabitlendiği ya da düşmeye başladığı noktada deneme sonlandırılmış ve kültürler 3500 rpm'de 15 ml'lik cam tüplerde santrifüj edilmiştir.

Kamçılı, yeşil hücrelerin kiste dönüşümünü sağlamak amacıyla stres faktörü olarak üç adet 4 L'lik cam balona besleyici element azot eklemekten hazırlanmış 3'er L 3N-BBM *Haematococcus* besi ortamı ilave edilmiş ve sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besi ortamı içerisine santrifüj edilen biyomas eklenerek balonlardaki kültürler 177 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ beyaz floresan ışık düzeneğine yerleştirilip, kist oluşumu ve astaksantin üretimi belirlenmiştir.

3.2.1.3. Deneme (3)

Bu bölümde vejetatif *H. pluvialis* hücrelerinin kiste dönüşümü ve astaksantin üretimine azotsuz besi ortamı, yüksek ışık yoğunluğu ve havalandırmanın etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 3'er L *Haematococcus pluvialis* kültürü 3500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek hasat edilmiş ve elde edilen çökelti biyomas aşısı olarak kullanılarak 4'er L'lik dört adet cam balonda, NaNO₃'suz 3N-BBM besi ortamı ile kültürler oluşturulmuştur. Denemede iki tekrarlı iki grup oluşturulmuş ve gruplardan birine akvaryum hava kompresörü ile hava verilmiş diğer gruptaki kültürler hava verilmeyip gün içerisinde 5-6 kez el ile çalkalanmıştır (Şekil 3.3). Vejetatif hücrelerin eklendiği balonlardaki kültürler yüksek ışık ($379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ile stres yaratmak amacıyla aydınlatılmış bir sandık içerisindeki düzeneğe yerleştirilmiş ve ortam sıcaklığı 24°C'ye ayarlanmıştır. Denemede günlük olarak klorofil- *a* analizi için 10 ml, iki günde bir kuru madde için 20 ml ve astaksantin analizi için 400'şer ml örnek alınmıştır.



Şekil 3.3. *Haematococcus pluvialis* Deneme Kültürleri

3.2.1.4. Deneme (4)

Bu bölümde vejetatif evrede büyüme verimliliği belirlenmiş kültürlerde yüksek sıcaklık ve yüksek ışık yoğunluğunun kist oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla vejetatif evre için üç adet 4 L'lik cam balona steril 3N-BBM *Haematococcus* besi ortamından 2100 mL konularak 900'er ml aşı ilave edilmiştir. Günlük olarak OD için 3 ml, klorofil- *a* için 5 ml, kuru madde için 20'şer ml örnek alınmıştır.

Vejetatif büyüme süresince $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddeti uygulanan kültürlerle hava verilmeyip gün içerisinde 5-6 kez elle karışım sağlanmıştır. Laboratuardaki ortam sıcaklığı iklimlendirme aletiyle 22°C 'ye ayarlanıp 4.deneme başlatılmıştır. Vejetatif evre, günlük olarak ölçülen OD değerleri göz önünde bulundurularak, değerlerin sabitlendiği ya da düşmeye başladığı noktada sonlandırılmış ve kültürler 3500 rpm'de 15 ml'lik cam tüplerde santrifüj edilmiştir.

Vejetatif büyüme tamamlandığında balonlardaki kültürler 3500'rpm de 15 ml'lik cam tüplerde santrifüj edilmiştir. Üç adet dört L'lik cam balona azotu çekilmiş steril 3 L 3N-BBM *Haematococcus* besi ortamı ve santrifüj edilen biyomas eklenmiştir. Balonlardaki kültürler $177 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ beyaz floresan ışık düzeneğinin yerleştirildiği cam akvaryuma, 35°C sıcaklıkta su banyosu içerisine konularak 4.deneme başlatılmıştır. Yüksek ışık ve sıcaklık muameleleri birlikte uygulanarak stres oluşturulmuş ve kist oluşumu ile birlikte astaksantin elde edilmesi amaçlanmıştır.

3.2.2. Deneme Süresince Yapılan Analizler**3.2.2.1. Astaksantin Analiz Metodu**

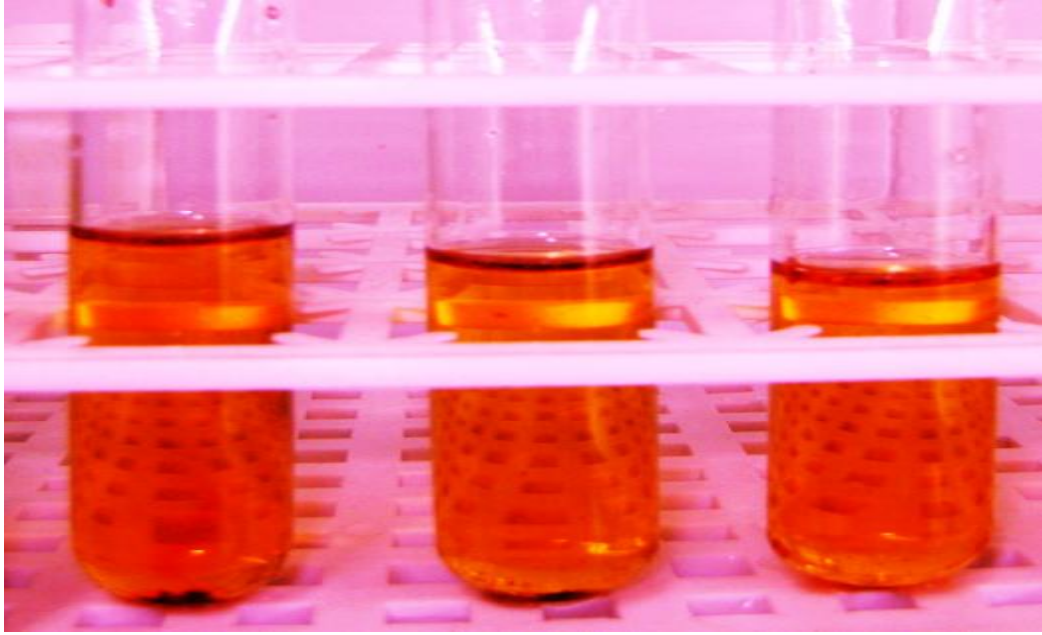
Analize başlanmadan önce astaksantin çıkarımı için kullanılacak solüsyonlar hazırlanmıştır.

Analiz için izlenecek yol aşağıdaki gibidir;

- 4-5 mg toz *Haematococcus* tartılır ve tüp içerisine konur,

- Üzerine 1-2 damla su eklenir,
- 10 dakika nemlendirmek için beklenir,
- Üzerine % 30'luk metanol içine 5 gr KOH'dan 5 ml ilave edilir,
- 70 C° su banyosunda 10 dakika bekletilir,
- 3000 rpm de 5 dakika santrifüj yapılır,
- Üstteki supernatant dökülür (klorofili uzaklaştırmak için),
- Çökelti üzerine 5 damla asetik asit ve 5 ml DMSO (dimetil sülfosit) eklenir,
- Tekrar 70 C° su banyosunda 10 dakika bekletilir,
- 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir,
- Üzerindeki süpernatant ayrı bir kaba alınır,
- Ve üzerine tekrar 5 damla asetik asit ve 5 ml DMSO eklenerek bu işlem 2-3 kez tekrarlanır.
- Kaptaki biriken supernatant spektrofotometrede 490 ve 750 nm de okunur (Şekil 3.4).
- Okunan değerler aşağıdaki formül kullanılarak astaksantin miktarı hesaplanır (Boussiba, 1992).

% Astaksantin= (ABS490 - ABS750) * 5,6 * Eksrakte edilen hacim (litre) / örnek miktarı



Şekil 3.4. Analiz Sonucu Elde Edilen Astaksantin Görünümü

3.2.2.2. Klorofil *a* analizi

Deneme boyunca hücre sayısı ve klorofil-*a* miktarını belirlemek için her bir balondan 10'ar ml örnek alınmıştır. Klorofil-*a* analizi için alınan 10 ml'lik örnek su trombu yardımıyla GF/6 filtre kağıdından süzölmüş, sonra filtre kağıtları oda sıcaklığında karanlıkta 2-4 saat kurumaya bırakılmıştır. Nispeten kuruyan filtre kâğıtları, içinde 10 ml % 90'lık aseton bulunan deney tüplerine konulmuştur. Asiditenin artması ve pigmentin zarar görmesini önlemek amacıyla filtre sırasında 2 damla % 1'lik MgCO₃ eklenmiştir. Ağızları mantar tıpa ile kapatılan deney tüpleri çalkalandıktan sonra buzdolabında (+4 °C) 24 saat karanlıkta bırakılmış ve ekstraksiyon süresi sonunda 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki berrak kısım alınarak görünür spektrofotometrede 630, 645, 665, 750 nm'de absorpsiyon değeri ölçölmüştür (Şekil 3.5). Ölçölen değeri 750 nm'de ki absorbansın çıkarılmasıyla düzeltilerek aşağıdaki denkleme yerleştirilmiş ve klorofil-*a* miktarı hesaplanmıştır (Parsons ve Strickland, 1963).

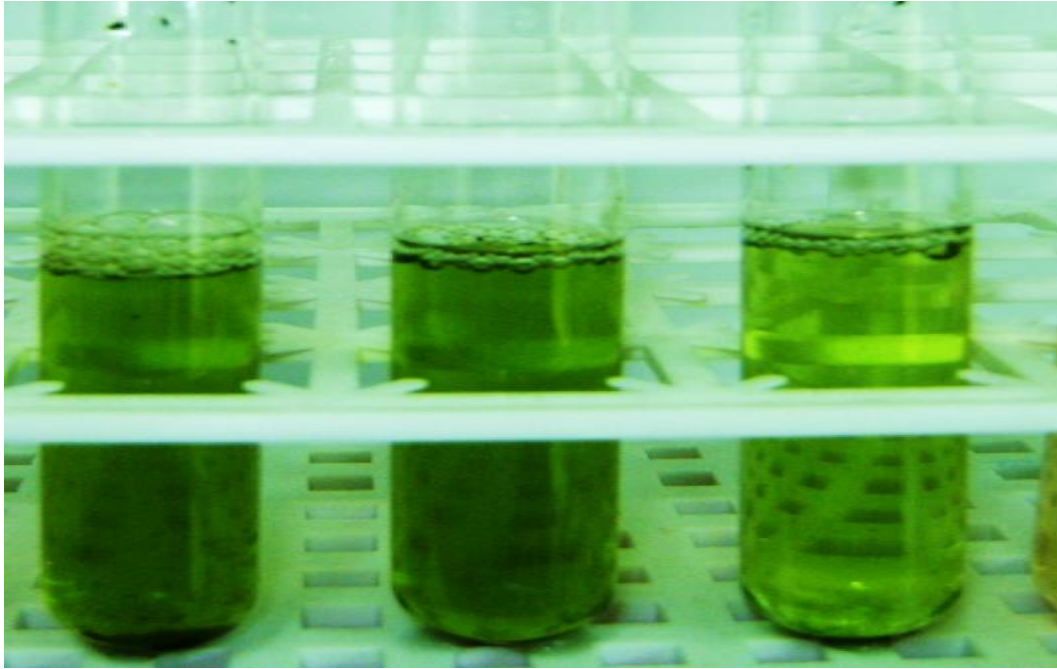
$$\text{Chl.}a = 11.6 \cdot D_{665} - 0.14 \cdot D_{630} - 1.31 \cdot D_{645}$$

$$\mu\text{g/L} = \frac{\text{Chl.}a \cdot v}{1 \cdot V}$$

V= Filtre edilen su örneği(L)

v= Kullanılan asetonun hacmi (ml)

l= Küvetten geçen ışık yolu (cm)



Şekil 3.5. Analiz Sonucunda Elde Edilen Klorofil Pigmenti

3.2.2.3. Kuru Madde Analizi

Kuru madde miktarlarının saptanması için her balondan 20'şer mL alg kültürü alınmıştır. Daha önceden 105 °C'de 1 saat etüvde tutulmuş, desikatörde soğutulmuş ve darası alınmış 0.45 µ göz açıklığındaki Whatman GF/C filtre kâğıtlarından, süzme düzeneği ve bir su trombu kullanılarak oluşturulan vakum yardımıyla *Haematococcus* hücreleri sıvı besi ortamdan ayrılarak yoğunlaştırılmıştır.

Yoğunlaştırılmış *Haematococcus* hücreleri, 0.001 gr duyarlı hassas terazide ağırlıkları alınmış petri kapları içerisinde belirli miktarlarda tartılarak, önceden 105 °C'ye getirilen etüvde 4 saat tutulmuştur. Bu süre sonunda petri kapları bir desikatöre konularak, oda sıcaklığına kadar soğumaları sağlanmış ve

daha sonra 0.001 gr duyarlı hassas terazide tartımları yapılmıştır. Örnekler yaş iken yapılan tartım sonucu elde edilen değerden, kurutulduktan sonraki tartım değeri çıkarılarak kuru madde miktarı hesaplanmıştır (Vonshak, 1997).

3.2.2.4. Hücre Sayımı

Deneme süresince *Haematococcus* kültürünün gelişimini görmek için kültürlerden günlük olarak laboratuvar tüplerine en az 2 ml örnek alınarak hücrelerin ölmesi ve hareketsiz kalması için üzerine 8-10 damla formaldehit damlatılmıştır. Daha sonra örnekler homojen olarak karıştırılarak bir pipet ile alınmış ve Thoma lamının her iki bölmesine 2'şer damla damlatılarak mikroskop altında sayılmıştır. Günlük olarak yapılan hücre sayımları sonucunda kültürün büyüme grafiği oluşturulmuştur.

3.2.2.5. Optik Yoğunluk

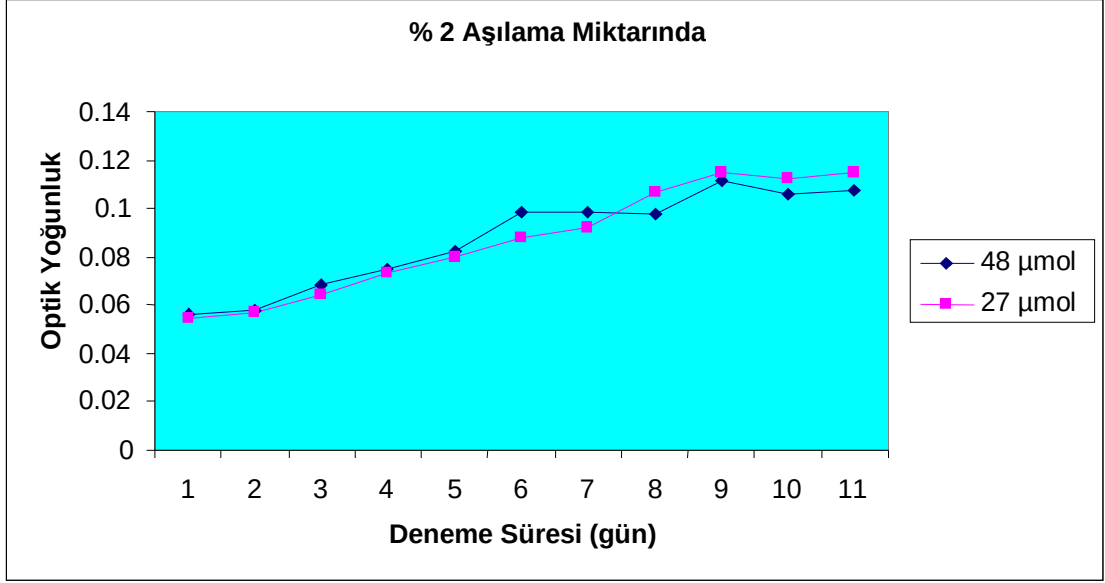
Optik yoğunluğu ölçmek için günlük olarak kültürler homojen olarak karıştırıldıktan sonra bir pipet yardımıyla 3 ml örnek alınmıştır. Tüplere alınan örnekler kuartz tüplere konularak görünür spektrofotometrede 680 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır (Kang ve ark., 2005).

4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Algal Biyoteknoloji Laboratuvarında, çevre koşullarının *Haematococcus pluvialis* Flotow'da büyüme ve astaksantin miktarına olan etkisini belirlemek amacıyla yürütülen dört farklı denemede sıcaklık (°C), aydınlık şiddeti ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ölçümleri yapılmış, klorofil-*a* (mg L^{-1}), kuru ağırlık (g/mL^{-1}), optik yoğunluk ve astaksantin miktarları belirlenmiştir. Söz konusu çevre faktörleri dört farklı denemede uygulanmıştır.

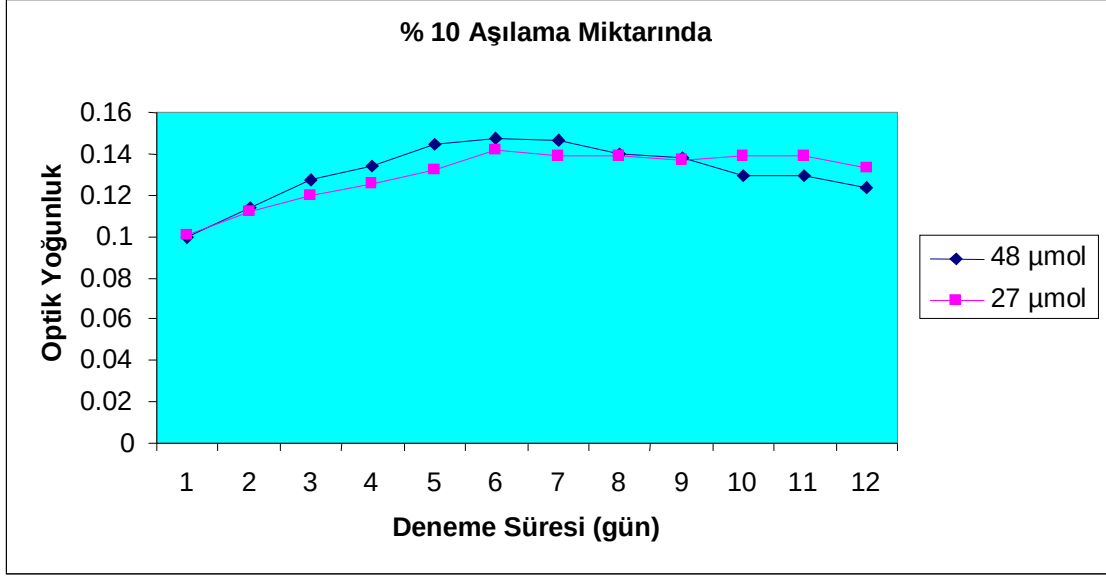
4.1. Deneme (1)

Bu denemede iki farklı ışık yoğunluğu (27 ve $48 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve iki farklı aşılama miktarının (% 2- 10) vejetatif büyümeye olan etkisi araştırılmıştır. % 2 aşılamanın yapıldığı denemede 27 ve $48 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddetlerinde başlangıç optik yoğunluk değerleri 0.05 ± 0.02 ve 0.05 ± 0.02 olarak bulunurken, denemenin sonunda 0.11 ± 0.02 ve 0.10 ± 0.02 olarak bulunmuştur. Aşılama düzeyinin % 2 olduğu kültürlerde 27 ve $48 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluklarının büyümeye olan etkisini belirlemek üzere en yüksek optik yoğunluk değerleri karşılaştırıldığında, aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$). Deneme süresince % 2 aşılama yapılan 27 ve $48 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunun uygulandığı kültürlerle ait optik yoğunluk değerlerine ait grafik Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. % 2 Aşılamanın Yapıldığı 27 ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Aydınlanmanın Uygulandığı Kültürlere ait OD Değerleri.

%10 aşılamanın yapıldığı denemede 27 ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddetlerinde başlangıç optik yoğunluk değerleri 0.10 ± 0.01 ve 0.09 ± 0.01 olarak bulunurken denemenin sonunda 0.13 ± 0.01 ve 0.12 ± 0.01 olarak bulunmuştur. Aşılama düzeyinin % 10 olduğu kültürlerde 27 ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluklarının büyümeye olan etkisini belirlemek üzere en yüksek optik yoğunluk değerleri karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$). Deneme süresince % 10 aşılamanın yapıldığı 27 ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunun uygulandığı kültürlerle ait optik yoğunluk değerlerine ait grafik Şekil 4.2’de verilmiştir.

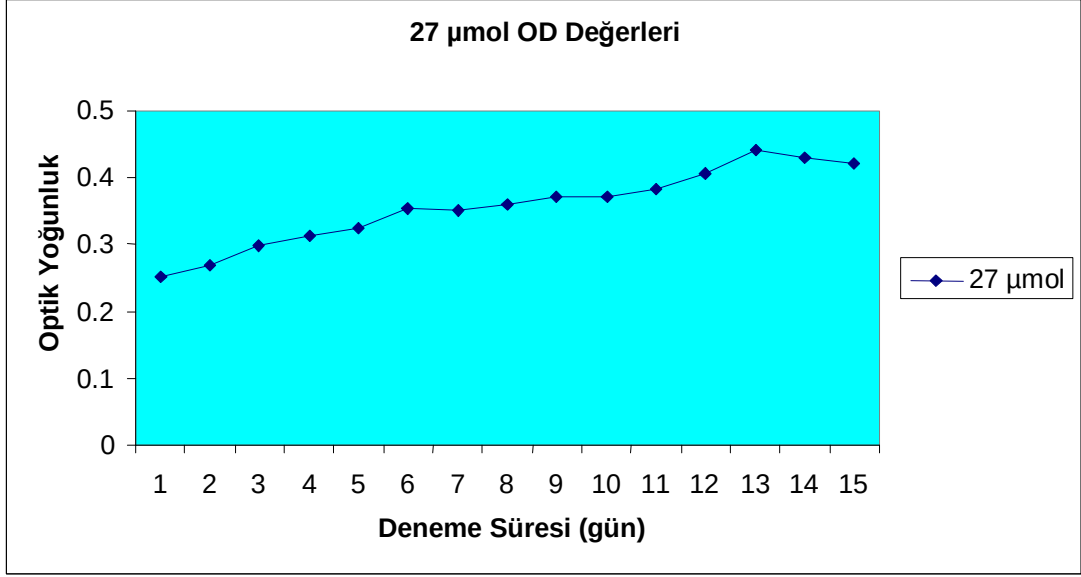


Şekil 4.2. % 10 Aşılamanın Yapıldığı 27 ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Aydınlanmanın Uygulandığı Kültürlere ait OD Değerleri

Denemenin 11. gününde yeşil renkli kültürlerde kistleşmenin başladığı, vejetatif safhanın sonlandığı ve turuncu rengin oluştuğu gözlenmiştir. Yürütülen bu deneme koşullarında, 11 gün süren vejetatif büyümeden sonra 27 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma ile kist oluşumunun sağlandığı belirlenmiştir.

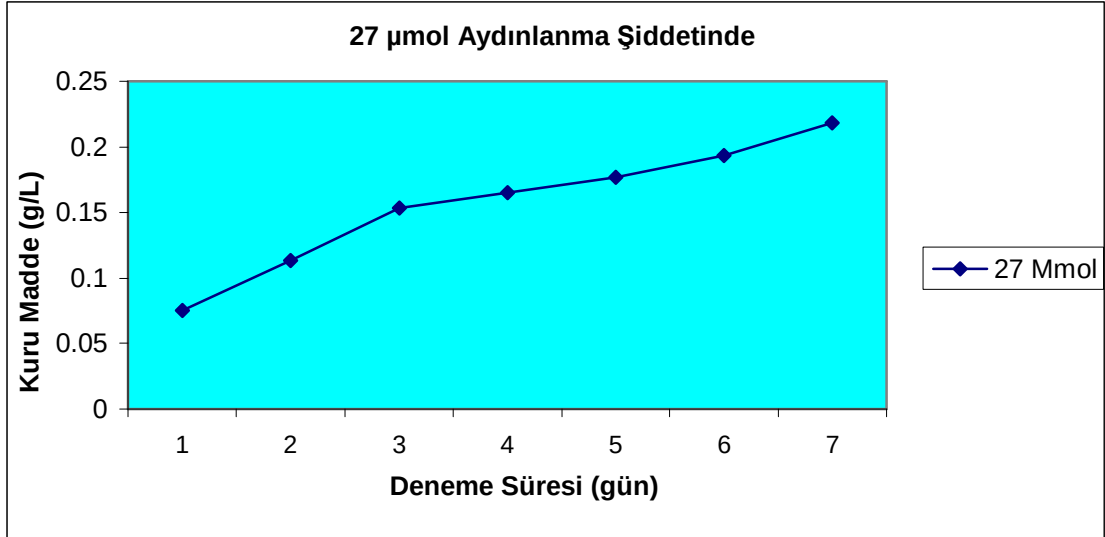
4.2. Deneme (2)

Bu aşamada 27 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinin uygulandığı ve başlangıç optik yoğunluğu 0.25 ± 0.04 olan kültürlerde vejetatif büyüme araştırılmıştır. Vejetatif evrenin 15 günde tamamlandığı denemede en yüksek optik yoğunluk değeri 0.44 ± 0.04 olarak kaydedilmiştir. 27 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunun uygulandığı kültürlerle ait optik yoğunluk değerlerine ait grafik Şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.3. 27 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki OD Değerleri

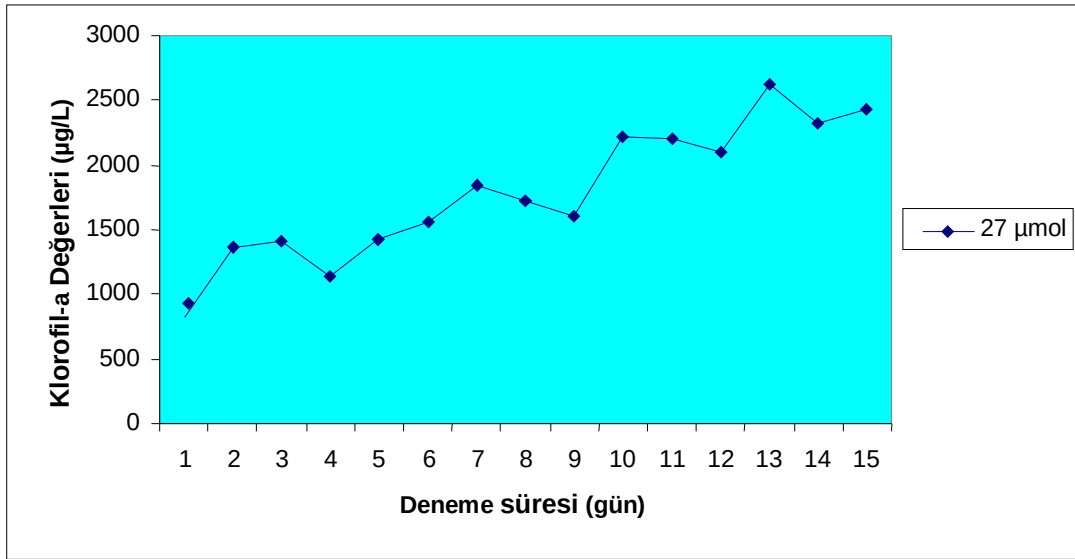
Deneme süresince kuru madde için 2 günde bir 20 ml örnek alınmıştır. Yürütülen denemede kuru madde miktarı $0.07 \pm 0.0008 \text{ g L}^{-1}$ ile başlanmış ve denemenin 15. günü kuru madde değeri $0.21 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. 27 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetindeki kültürlerle ait kuru madde grafiği Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4. 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Kuru Madde Miktarı

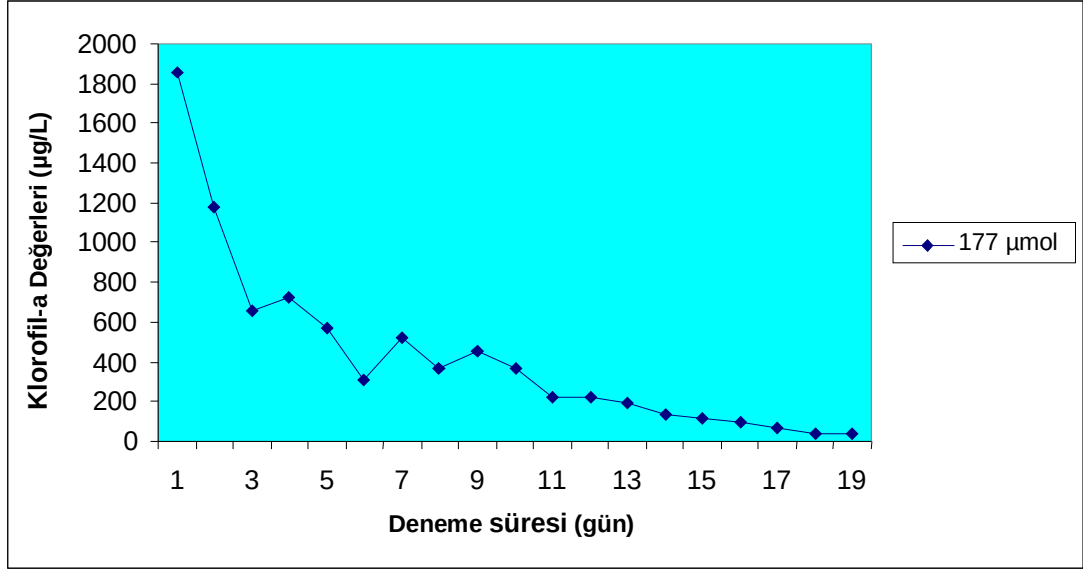
Vejetatif gelişimin sonunda ve hemen kistik safhanın başlangıcında astaksantin analizi yapılmış % 0.545 astaksantin miktarı bulunmuştur.

Kültürlerdeki astaksantin miktarıyla birlikte yeşil pigment klorofil-*a* değerleri günlük olarak belirlenmiştir. Vejetatif safhada denemenin başlangıcında ölçülen klorofil-*a* değeri $826.56 \pm 226.57 \mu\text{g L}^{-1}$ bulunmuştur. Denemenin sonunda 15. günde saptanan klorofil-*a* değeri $2425.64 \pm 695.20 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Deneme süresince vejetatif evrede elde edilen klorofil- *a* değerleri Şekil 4.5’de verilmiştir.



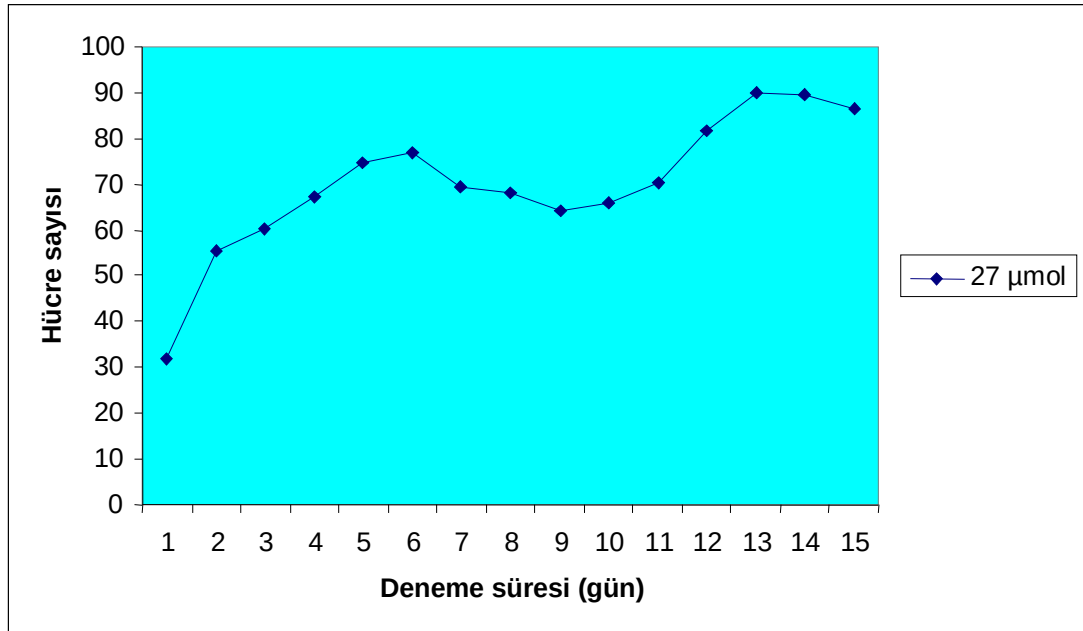
Şekil 4.5. $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Vejetatif Evre Klorofil-*a* Değerleri

Kistik safhada denemenin başlangıcında 16. günde ölçülen klorofil-*a* değeri $1852.28 \pm 679.55 \mu\text{g L}^{-1}$ bulunmuştur. Denemenin sonunda ise saptanan klorofil-*a* değeri $40.55 \pm 2.66 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Deneme süresince kistik safhada elde edilen klorofil- *a* değerleri günlere bağlı olarak Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6. 177 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Kistik Evre Klorofil-*a* Değerleri

Çalışmada büyümeyi saptamak amacıyla klorofil- *a* ve OD ölçümünün yanında hücre sayımı da yapılmıştır. 15 gün süren vejetatif aşamanın ilk gününde kültürlerdeki hücre sayısı $32 \cdot 10^6 \pm 16.09$ iken en yüksek hücre sayısı 13. günde $90 \cdot 10^6 \pm 20.81$ olarak belirlenmiştir. Deneme süresince elde edilen hücre sayımı grafiği günlere bağlı olarak Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. 27 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Hücre Sayısı

Vejetatif evrenin tamamlanmasının ardından kültürlerde yüksek ışık yoğunluğu ($177 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve besin eksikliği faktörleri uygulanarak stres oluşturulmuştur. Bu aşamada havalandırma yapılmamıştır.

15 günlük vejetatif evrenin tamamlanmasının ardından kültürler santrifüj edilerek yoğunlaştırılmıştır. Uygulanan stres faktörleri ile 19 gün devam eden kistik evreden sonra kistik biyomas elde edilmiş ve % astaksantin miktarları saptanmıştır. Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen denemeden elde edilen astaksantin miktarlarının ortalaması % 1.481 olarak belirlenmiştir.

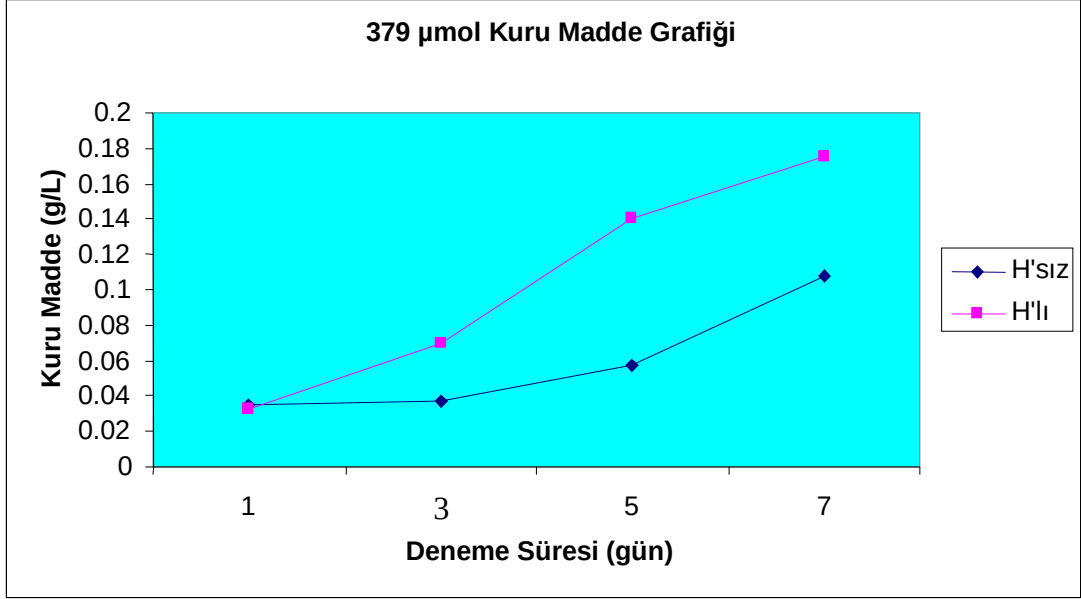
Deneme (3)

Bu aşamada azotsuz besi ortamı, yüksek ışık yoğunluğu ($379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve havalandırmanın, vejetatif yeşil hücrelerin kiste dönüşümleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Havalandırma yapılan kültürlerde azotsuz besi ortamı ve yüksek ışık yoğunluğunun ($379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) etkisi araştırılmıştır. Bu deneme grubundaki kültürlerde de gün aşırı olarak yapılan kuru madde ölçümlerinde, denemenin başında $0.032 \pm 0.001 \text{ g L}^{-1}$ kuru madde belirlenirken, kistik evrenin sonunda kuru madde miktarı $0.175 \pm 0.001 \text{ g L}^{-1}$ olarak saptanmıştır.

Havalandırma yapılmayan kültürlerde azotsuz besi ortamı ve yüksek ışık yoğunluğunun ($379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) etkisi araştırılmıştır. Bu deneme grubundaki kültürlerde de gün aşırı olarak yapılan kuru madde ölçümlerinde denemenin başında $0.035 \pm 0.001 \text{ g L}^{-1}$ bulunurken denemenin sonunda $0.1075 \pm 0.0002 \text{ g L}^{-1}$ bulunmuştur.

$379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanan, havalandırma yapılan ve havalandırma yapılmayan iki gruptaki kuru madde miktarları arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Denemede kistik safhada $379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu uygulanan havalandırmalı ve havalandırmasız kültürlerle ait kuru madde grafiği Şekil 4.8’de verilmiştir.

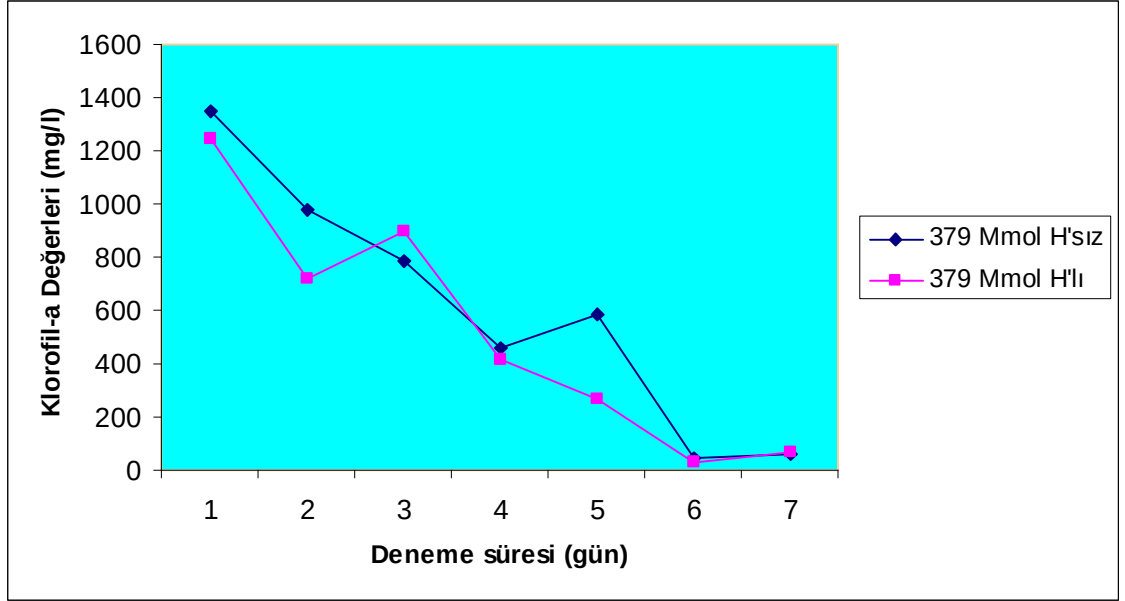


Şekil 4.8. Havalandırılmalı ve Havalandırılmaz Kùltürlerdeki Kuru Madde Miktarı

Havalandırılmalı ve havalandırılmaz kùltürlerde kuru madde ve astaksantin miktarıyla birlikte yeşil pigment klorofil-*a* değeri günlük olarak belirlenmiştir.

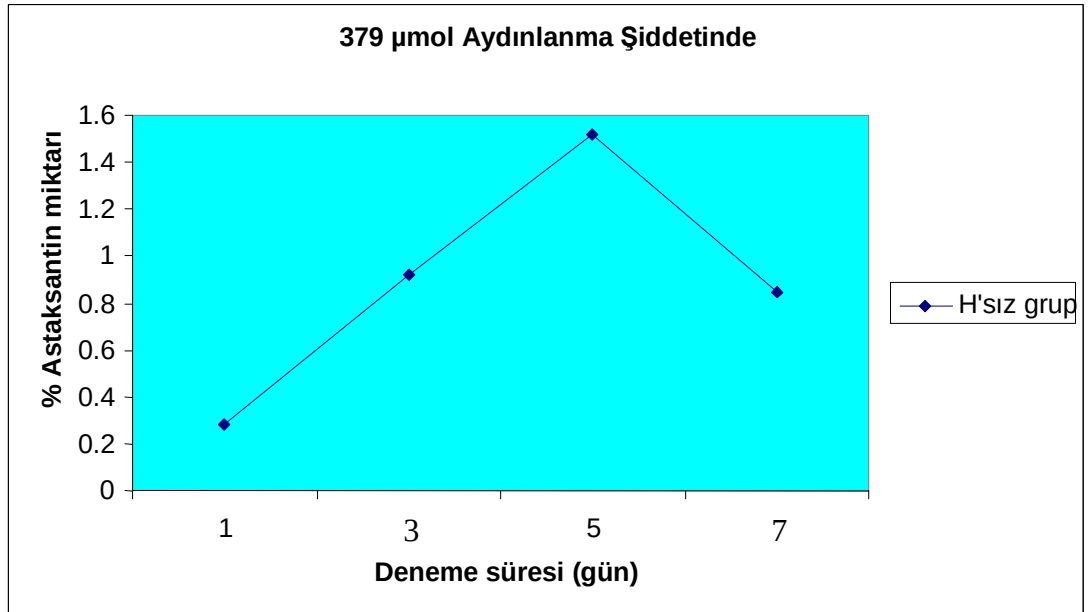
Havalandırma yapılmayan kùltürlerde denemenin başlangıcında ölçülen klorofil-*a* değeri $1345.34 \pm 188.84 \mu\text{g L}^{-1}$ ölçülmüştür. Denemenin 7. gününde saptanan klorofil-*a* değeri $56.63 \pm 91.75 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Havalandırma yapılan kùltürlerde denemenin başlangıcında ölçülen klorofil-*a* değeri $1242.636 \pm 433.69 \mu\text{g L}^{-1}$ bulunmuştur. Denemenin 7. gününde $64.879 \pm 80.09 \mu\text{g L}^{-1}$ ölçülmüştür. $379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda havalandırma yapılan ve havalandırma yapılmayan gruplara ait klorofil-*a* değeri arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Havalandırma yapılan ve yapılmayan kùltürlerden elde edilen klorofil-*a* değeri Şekil 4.9'da verilmiştir.



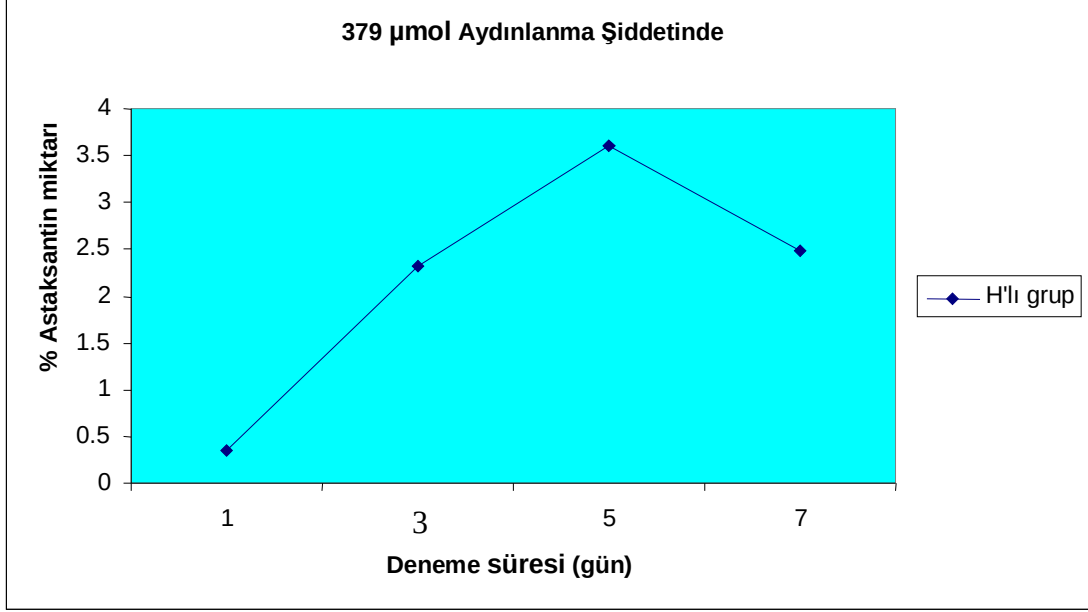
Şekil 4.9. 379 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Havalandırılmalı ve Havalandırmasız Kültürlerdeki Klorofil-a Grafiği

Bu aşamada ise gün aşırı astaksantin analizi yapılmıştır. Havalandırma yapılmayan kültürlerdeki başlangıçtaki astaksantin miktarı % 0.285 iken en yüksek astaksantin miktarı kistleşmenin 5. gününde % 1.515 bulunmuştur. Denemede 379 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık altında havalandırma yapılmayan kültürün astaksantin miktarı grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir.



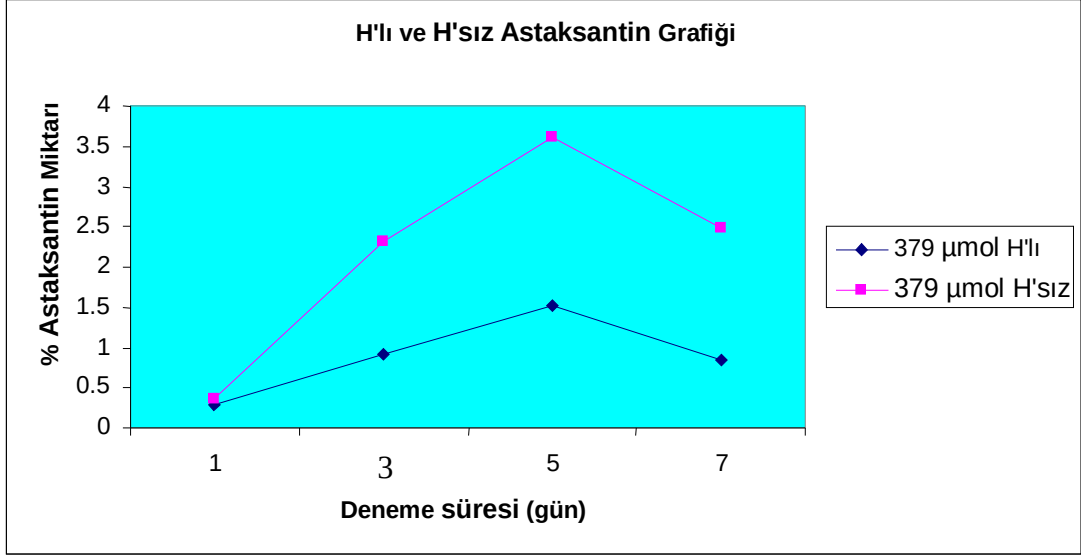
Şekil 4.10. Havalandırmasız Kültürlerde Astaksantin Grafiği

Denemede havalandırma yapılan grupta $379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu altında başlangıçtaki astaksantin miktarı % 0.35 bulunurken iken en yüksek astaksantin miktarı denemenin 5. gününde % 3.605 olarak bulunmuştur. Denemede havalandırma yapılan kültürün astaksantin miktarı grafiği Şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.11. Havalandırılmal Kültürlerde Astaksantin Grafiği

Deneme sonunda her 2 gruptaki en yüksek astaksantin miktarı havalandırma yapılan grupta $379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık altında % 3.605 bulunurken, en düşük astaksantin miktarı ise % 0.35 olarak bulunmuştur. Havalandırma yapılmayan grupta ise $379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık altında en yüksek astaksantin miktarı % 1.515 bulunurken en düşük astaksantin miktarı ise % 0.285 olarak bulunmuştur. Yürütülen bu denemede $379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda havalandırma yapılan ve havalandırma yapılmayan kültürlerde astaksantin miktarları arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Denemede havalandırma yapılan ve havalandırma yapılmayan kültürün astaksantin miktarları Şekil 4.12’de verilmiştir.

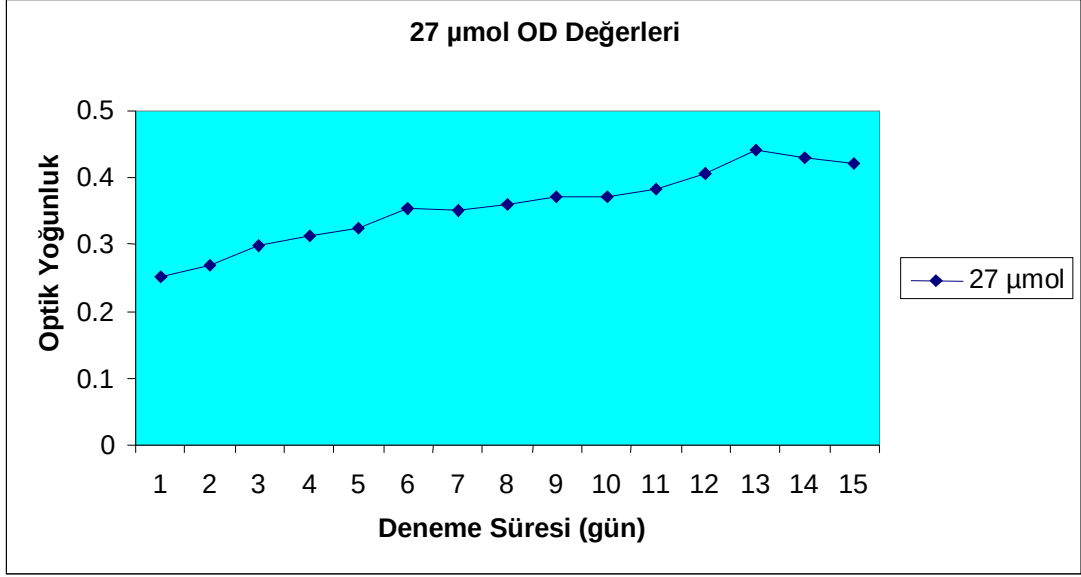


Şekil 4.12. Havalandırılmalı ve Havalandırılmasız Kültürlerde Astaksantin Grafiği

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

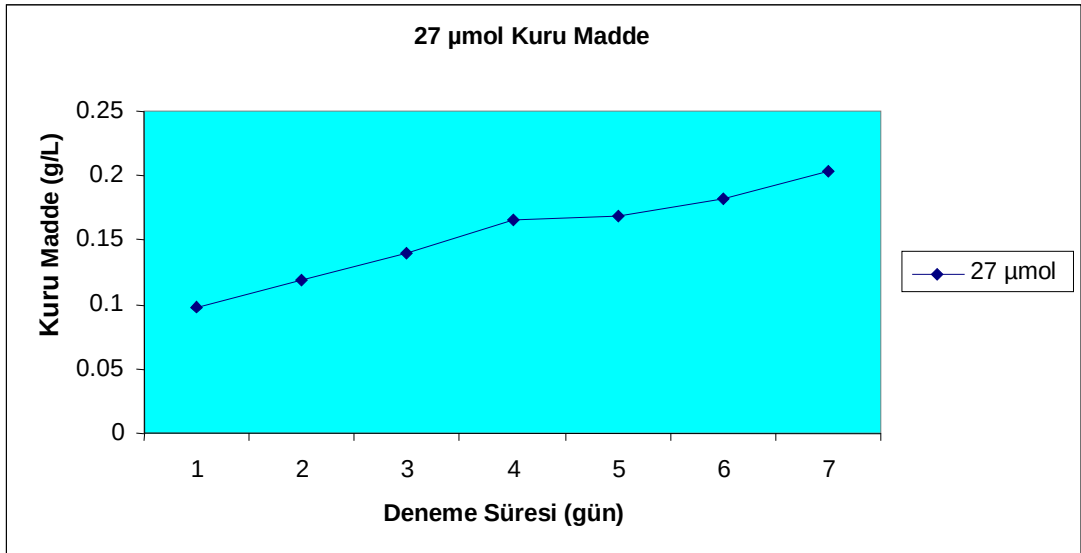
4.4. Deneme (4)

Bu denemede *Haematococcus pluvialis* mikroalginin vejetatif evredeki gelişimi ve kiste dönüşümünde yüksek sıcaklık (35°C) ile yüksek ışığın ($177 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) etkisi araştırılmıştır. Vejetatif evrede $27 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanmıştır. Denemeye 0.25 ± 0.04 optik yoğunluk ile başlanan kültürde denemenin bitiminde ulaşılan en yüksek optik yoğunluk değeri 0.40 ± 0.05 bulunmuştur. Denemede kültürlerle ait optik yoğunluğun değişim grafiği Şekil 4.13'de verilmiştir.



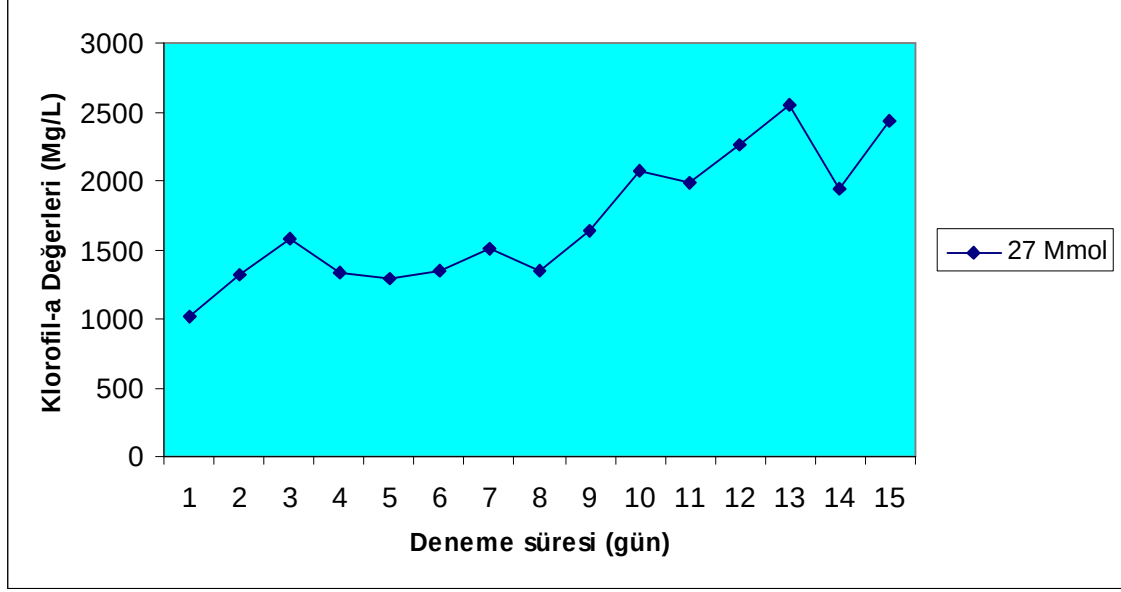
Şekil 4.13. 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki OD Değerleri

Deneme süresince kuru madde için 2 güne bir 20'şer ml örnek alınmıştır. Vejetatif safhanın başında kuru madde miktarı $0.098 \pm 0.001 \text{ g L}^{-1}$ iken denemenin bitiminde ulaşılan en yüksek kuru madde miktarı $0.203 \pm 0.001 \text{ g L}^{-1}$ bulunmuştur. Denemedeki 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanan kültürlere ait kuru madde grafiği Şekil 4.14'de verilmiştir.



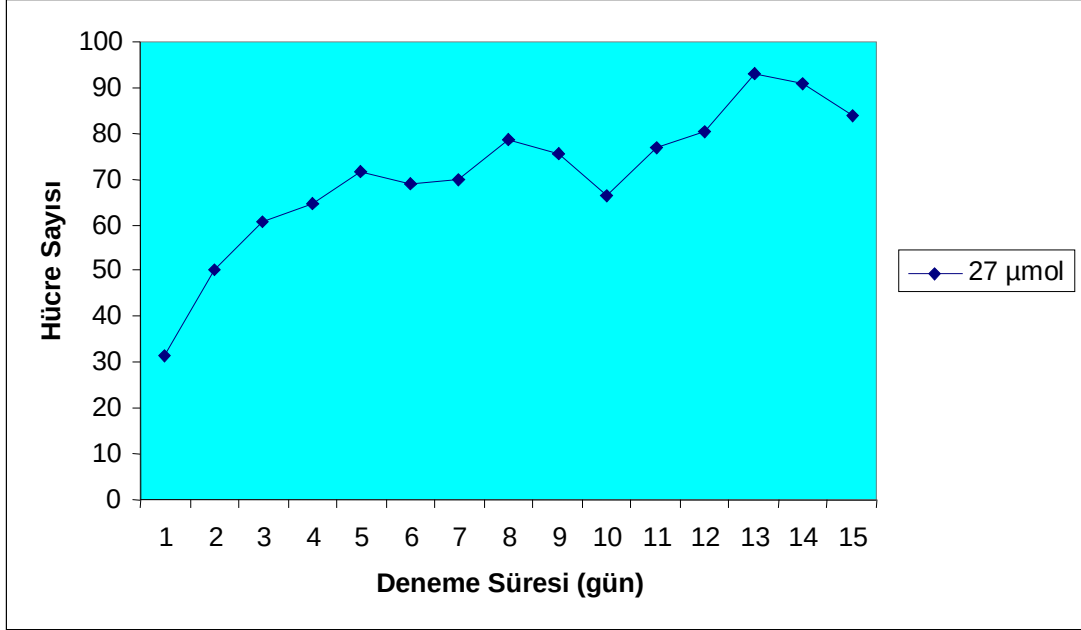
Şekil 4.14. 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Kuru Madde Miktarı

Yürütülen bu denemede vejetatif evrede ölçülen en yüksek klorofil-*a* değeri denemenin 13. gününde $2548.02 \pm 541.58 \mu\text{g L}^{-1}$ ölçülmüştür. En düşük klorofil-*a* değeri ise denemenin 1.gününde $1020 \pm 126.63 \mu\text{g L}^{-1}$ bulunmuştur. Deneme boyunca günlere bağlı olarak değişen klorofil-*a* değerleri Şekil 4.15’de verilmiştir.



Şekil 4.15. $27 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Aydınlanma Şiddetindeki Klorofil-*a* Değerleri

Vejetatif evrede günlük olarak Thoma lamıyla yapılan hücre sayımında vejetatif evrenin başlangıçta hücre sayısı $31 \times 10^6 \pm 21.33$ bulunurken, en fazla hücre sayısı 13. günde $97 \times 10^6 \pm 21.84$ olarak bulunmuştur. Deneme süresince elde edilen günlere bağlı olarak değişen vejetatif evre hücre grafiği Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16. Vejetatif Evre Hücre Grafiği

Yürütülen bu deneme üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş olup, stres koşulları oluşturmak için kültürler 35 °C sıcaklıkta su banyosu yaptırılmış ve $177 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanarak hava verilmemiştir.

Astaksantin miktarını artırmak için oluşturulan stres koşulları altında, vejetatif kültürler kistik evrenin ikinci gününde yüksek sıcaklıktan (35 °C) dolayı yeşil hücrelerin kırmızı kistik hücrelere dönüşmeden beyazlaşarak öldüğü gözlemlenmiştir. Yeşil alg *Haematococcus pluvialis*'i kistleştirmek için, yüksek sıcaklık (35 °C) değerinin yüksek ve uygun olmadığı belirlenmiştir.

5.TARTIŞMA

Yeşil alglerden *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae), uygun olmayan ortam koşullarında (yüksek ışık şiddeti, sıcaklık ve pH değerlerindeki dalgalanmalar, ortamda besin miktarının azalması vb.) biriktirdiği sekonder karotenoid astaksantin nedeniyle biyoteknolojik olarak öneme sahip bir türdür (Boussiba, 2000; Masojidek ve ark., 2000).

Astaksantin pigmenti elde etmek için *Haematococcus pluvialis* kültürünün iki aşamalı bir üretim periyodu geçirmesi gerekmektedir. İlk aşama, vejetatif, kamçılı, yeşil hücrelerin çoğalmasını sağlayacak, optimum büyüme koşullarında büyümenin gerçekleştirildiği evredir. İkinci aşama, kültürde logaritmik evrenin tamamlandığı ve en yüksek biyomasın elde edildiği zamanda oluşturulan stres koşullarıyla hücrelerin astaksantin biriktirerek kist oluşumunun sağlandığı evredir. Bu tez çalışmasında her iki aşamanın da gerçekleştirildiği dört farklı deneme yürütülmüştür. Vejetatif evrede en uygun büyüme koşullarının belirlenmesi yanında farklı sıcaklık, aydınlanma şiddeti ve besin eksikliği (azot eksikliği) faktörlerinin *Haematococcus pluvialis* hücrelerinde astaksantin birikimine olan etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Yürütülen birinci denemede laboratuvar koşullarında sabit sıcaklıkta, 27 ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddeti ve % 2 - 10 aşılama yoğunluklarının vejetatif büyümeye önemli etkisi olmadığı belirlenmiş ve büyüme değerleri benzer bulunmuştur. Denemenin 11. günü vejetatif evre sonlanmış ve yeşil renkli kültürlerin kistleşmeye başlayarak turuncu renge dönüştüğü gözlemlenmiştir. Onbir gün süren vejetatif evrede muhtemelen başlangıç hücre yoğunluğunun düşük olması sebebiyle kültürlerde logaritmik evredeki büyüme yetersiz kalmış ve mevcut ışık şiddetleri stres oluşturarak kist oluşumuna neden olmuştur. Aşı miktarındaki azlık sebebiyle ışık geçirgenliği yüksek olan kültürlerde istenen biyomas artışı sağlanamadığından hücreler kiste dönüşmüştür. Aydınlanma şiddetinin etkileri ile ilgili pek çok araştırma yapılmış ve 200 ile 800 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ değerleri arasında çalışılmıştır (Cifuentes ve ark., 2003; Kang ve ark., 2007; Zhekisheva ve ark., 2002; Ceron ve ark., 2006). Bu çalışmadaki aydınlanma değerleri kist oluşumu için yetersiz görülmekle birlikte hücre yoğunluğunun düşük olması nedeniyle bu koşullarda bile hücrelerin kist oluşturduğu değerlendirilebilir.

İkinci denemede yüksek aşılama yoğunluğu (% 25) ve 0.25 OD ile kültüre başlanmış ve vejetatif safhada yüksek yeşil hücre yoğunluğu ($OD=0.44\pm0.04$) elde edilmiştir. Bu denemede $177 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlık şiddeti ve azot yokluğunda % 1.481 astaksantin bulunmuştur. Vejetatif evre sonunda hücre yoğunluğunun fazla olması ve uygulanan ışık şiddetinin ($177 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) astaksantin üretimi için yetersiz olmasından dolayı hücreler kistleşme evresini uzun sürede tamamlamıştır. Aynı zamanda bu denemede kültürlerde havalandırma yapılmaması nedeniyle ortamda hücre dağılımı homojen olmamış ve buna bağlı olarak da hücrelerde kist oluşumu ve astaksantin birikimi zayıf olmuştur. Yürütülen bir çalışmada *Haematococcus pluvialis*'in vejetatif kültürlerinde optimum ışık şiddeti aralığı ve büyüme performansının saptanması için 50, 100, 200, 400 ve 600 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'lik 5 farklı ışık şiddeti uygulanmıştır. Deneme gruplarında kuru ağırlık ve toplam karoten miktarları artan ışık şiddetleri ile doğru orantılı olarak artarken, toplam klorofil- *a* miktarı 200 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'lik aydınlatmaya kadar artmıştır ve daha yüksek aydınlatma şiddetlerinde herhangi bir değişim görülmemiştir. Sonuç olarak 200 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'lik ışık şiddeti üzerindeki aydınlatmalarda astaksantin birikiminin tetiklendiği görülmüştür. Beş farklı ışık şiddetinin uygulandığı denemede hücrelerin vejetatif evrede kültüre edilebilmesi için optimum ışık şiddeti aralığı 50-200 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ olarak bulunmuş ve en iyi büyüme 200 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'lik ışık şiddetinde gerçekleşmiştir (Göksan ve Gökpınar 2005). Bu çalışmada yüksek aşı miktarı ve 48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddetinde bir önceki denemeye göre daha iyi bir büyüme gerçekleşmiş ancak 177 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddetinin kist oluşumu için yeterli olmadığı görülmüştür. Bu aşamada ışık düzeyinin yetersizliği yanında kültürde havalandırma yapılmadığından hücrelerin homojen olarak dağılmaması ve ışığın yeterli nüfuz edememesi nedeniyle kist oluşumunun uzun sürdüğü değerlendirilmiştir.

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

Havalandırmanın kültürlerde astaksantin birikimine olan etkisini belirlemek üzere yürütülen üçüncü denemede, azotu eksikliği, $379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve havalandırma yapılmayan kültürlerde astaksantin % 0.89 bulunurken, havalandırma yapılan kültürlerde ise % 2.19 olarak saptanmıştır. En yüksek astaksantin miktarı havalandırma yapılan kültürlerde ortalama % 3.60 olarak bulunmuştur. Yüksek ışık yoğunluğu ve havalandırmanın astaksantin birikimine olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda ışık yoğunluğunun kist oluşumuna etkisinin kültür yoğunluğu ile yakın ilişkili olduğu saptanmıştır. Yapılan bir çalışmayla karşılaştırıldığında *Haematococcus* yeşil hücreleri BG-11 ortamında $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık uygulamasında astaksantin birikimine teşvik edilememiştir. Fosfat veya azot azlığında $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ile strese maruz bırakıldığında kuru ağırlığında % 4'ün üzerinde astaksantin biriktirmiştir. Astaksantin birikimi azot azlığı altında daha hızlı gerçekleştiği bildirilmiştir (Boussiba ve ark., 1999).

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

Boussiba ve ark. (2007) stres koşulları altında değerli kırmızı karotenoid üreten *Hematococcus pluvialis*'in ticari üretimi için iki aşama olduğunu belirtmişlerdir. İlk bölümünde biyomasın üretimi (yeşil evre) ve ikinci bölümünde pigment (sürekli stres, kırmızı evre) oluşumudur. Laboratuvar koşullarında daha zengin astaksantin üretimi (kuru biyomasın % 4'ü) ile $11.5 \text{ mg/L gün}^{-1}$ astaksantin üretimi elde edilmiştir.

Bu çalışmada $177 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddeti ve azot azlığı uygulanan kültürlerde kistik evrenin başlangıcında ölçülen astaksantin miktarı düşük bulunurken klorofil- *a* değerleri yüksek bulunmuştur. Denemenin sonunda ise strese giren kültürlerde astaksantin miktarı artarken klorofil- *a* değerlerinde büyük bir düşüş gözlemlenmiştir. Kistik evrede kültürlerde oluşan stres sonucunda astaksantin

pigmentinin artışı ile beraber klorofil-*a* değerlerinin düştüğü belirlenmiştir. Yürütülen bir çalışmada güneş ışığı altında azot bakımından sınırlı kültürlerde astaksantin birikiminin teşviki ile birlikte klorofil molekülerinin yıkıma uğradığı rapor edilmiştir (Boussiba, 2000).

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

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

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Laboratuvar koşullarında sıcaklık ve aydınlanma çevresel faktörlerinin *Haematococcus pluvialis*'de vejetatif büyümeye ve ikincil karotenoid astaksantin pigmenti miktarına olan etkisini belirlemek üzere yürütülen denemelerde vejetatif evrede aşılama miktarının ve aydınlanma şiddetinin önemli olduğu, düşük hücre yoğunluğunda, $27 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddetinin bile kist oluşumunu sağladığı belirlenmiştir. Hücre yoğunluğunun $90 \times 10^6 \pm 20.81$ olduğu kültürlerde $177 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddetinin azot eksikliği ile birlikte kist oluşumu ve astaksantin birikimi için yeterli olmadığı kaydedilmiştir. Azotsuz besi ortamı ve $379 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddetinin havalandırma etkisi ile birlikte yüksek astaksantin birikimi sağladığı saptanmıştır. Yüksek ışık yoğunluğu uygulamasının, hücre yoğunluğu yüksek kültürlerde kist oluşumunda etkili olması için kültürde havalandırma ile bir karışımın sağlanması önerilmektedir. Kistik evrede astaksantin birikimi ile birlikte yeşil pigment klorofil- *a* içeriğinde azalma gözlenmiştir. Yüksek sıcaklık (35°C) uygulamasının hücre ölümüne sebep olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- AFLALO, C., MESHULAM, Y., ZARKA, A., BOUSSIBA, S., 2007. On the Relative Efficiency of Two- vs. One-stage Production of Astaxanthin by the Green Alga *Haematococcus pluvialis*, Biotechnol. Bioeng. 2007;98: 300-305.
- BOUSSIBA, S., 1999. Carotenogenesis in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular Physiology and Stress Response, Physiologia Plantarum 108: 111-117.2000
- BOUSSIBA, S., WANG, B., YUAN, J.-P., ZARKA, A., CHEN, F., 1999. Changes in Pigments Profile in the Green Alga *Haematococcus pluvialis* Exposed to Environmental Stresses. Biotechnology LETTERS 21: 601-604,
- BOUSSIBA, S., FAN, L, VONSHAK., 1992. Enhancement and Determination Astaxanthin Accumulation in Green Alga *Haematococcus pluvialis* v. 213 p. 386-391.
- CERON, M.C., GARCIA-MALEA, M.C., RÍVAS, J., ACÍEN, F.G., FERNANDEZ, J.M., DEL RÍO, E., GUERRERO, M.G., MOLÍNA, E., 2006. Antioxidant Activity of *Haematococcus pluvialis* Cells Grown in Culture as a Function of Their Carotenoid and Fatty Acid Content DOI 10.1007/s00253-006-0743-5.
- CULTURE COLLECTION of ALGAE and PROTOZOA, CCAP@sams.ac.uk.
- CIFUENTES, A.S., GONZALEZ, M.A., VARGAS, S., HOENEISEN, M., GONZALEZ, N., 2003. Optimization of Biomass, Total Carotenoids and Astaxanthin Production in *Haematococcus pluvialis* Flotow Strain Steptoe (Nevada, USA) Under Laboratory 36:343,357.
- DOMINQUEZ-BOCANEGRA A.R., LEGARRETA G.I., JERONIMO M.F., CAMPOCOSIO T.A., 2003. Influence of Environmental and Nutritional Factors in the Production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Doi:10.1016/j.biotech.2003.04.001.
- ERGÜN, S., ERDEM, M., 1999. Doğal ve Sentetik Kaynaklarının Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Pigmentasyona Etkisi. Turk J Wet Anim Sci, 24: 393-402 p.
- FABREGAS, J., DOMINQUEZ, A., REQUERIO, M., MASEDA, A., OTERO, A., 2000. Optimization of Culture Medium for the Continuous Cultivation of the Microalgae *Haematococcus pluvialis*. Appl Microbiol Biotechnol, 53:530-535.

- GARCIA, M.C., MALEA, L., SANCHEZ, E.D.R., LOPEZ, J.L., FERNANDEZ A.F.G., SEVILLA, F.J.M., RIVAS, J., GUERRERO, M.G., GRIMA, M.E., 2005. Comparative Analysis of the Outdoor Culture of *Haematococcus pluvialis* in Tubular and Bubble Column Photobioreactors, *Journal of Biotechnology* 123 (2006) 329-342.
- GONG, X., CHEN, F., 1997. Optimazition of Culture Medium for Growth of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology* 9:437-444.
- GÖKPINAR, Ş., GÖKSAN, T., 2005. *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae)'un Farklı Işık Şiddetlerinde Vejetatif Büyüme Özellikleri. *E.U Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 22: 21-24 p.
- HAGEN, C., GRÜNEVALD, K., XYLANDER, M. AND ROTHE, E., 2001. Effect of Cultivation Parameters on Growth and Pigment Biosynthesis in Flagellated Cells of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology*, 13: 79-87 p.
- KANG, C.D., LEE, J.S., PARK, T.H., SIM, S.J., 2005. Comparison of Hetetrophic and Photoautotrophic Induction on Astaxanthin Production by *Haematococcus pluvialis* 68:237-241.
- KANG, C.D., LEE, J.S., PARK, T.H., SIM, S.J., 2007. Complementary Limitting Factors of Astaxanthin Synthesis During Photoautotrophic Induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N and Light Intensity, 74:987-994.
- KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T., NAGAI, S., 1993. Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate- Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*, *Applied and Environmental Microbiology*, p. 867_873.
- KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T., NISHIO, T., NAGAI S., KURIMURA, Y., TSUJI, Y., 1997. Antioxidant Role of Astaxanthin in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 48: 351-356 p.
- KOBAYASHI, M., KURIMURA, Y., TSUJI, Y., 1997. Light-Independent, Astaxanthin Production by the Green Microalga *Haematococcus pluvialis* Under Salt Stres. *Biotechnology Letters*, pp. 507-509.
- LORENZ, R.T., CHSEWSKI, G.R., 2000. Commercial Potential for *Haematococcus* Microalgae as a Natural Source of Astaxanthin. *Elsevier Science Ltd*, 18: 160-167 p.

- MAYNE ST 1996. β - Carotene, Carotenoids and Disease Prevention in Humans. FASEB J 10: 690-701.
- MONTSANT, A., ZARKA, A., BOUSSIBA, S., 2001. Presence of a Nonhydrolyzable Biopolymer in the Cells and Astaxanthin-Rich Cysts of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). Mar. Biotechnol. 3, 515-521.
- NAGUIB, S. MD., 2000. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids (Journal of Agricultural and Food Chemistry) 152.118.33.
- ORASA, M., FRANGUEIRA D., CID, A., ABALDE, J., 2000. Carotenoid Accumulation in *Haematococcus pluvialis* in Mixotrophic Growth. 23: 373-378, 2001.
- ORASA, M., VALERO, J.F., HERRERO, C., ABALDE, J., 2001. Comparison of the Accumulation of Astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and Other Green Microalgae Under *N*-Starvation and High Light Conditions. 23: 1079-1085, 2001.
- PARSONS, T.R. and STRICKLAND, J.D.H., 1963. Discussion of Spectrophotometric Determination of Marine Plant Pigments, with Revised Equations for Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids. Journal of Marine Research, Vol: 21, No: 3, p.115-163.
- QUERIN M, HUNTLEY ME, OLAIZOLA M. 2003 *Haematococcus* astaxanthin: Applications for Human Health and Nutrition. TRENDS Biotechnol 21:210-216.
- RENSHAW, B. et al. (1981) Optical Purity of (3S, 3'S)- Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Phytochem. 20,2561-2564.
- STEINBRENNER, J., LINDEN, H., 2001. Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced Astaxanthin Formation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*, Plant Physiology, Vol. 125, pp. 810-817.
- TRUJMAN, S. et al. (1997) Rapid Liquid Chromatographic Method to Distinguish Wild Salmon from Aquacultured Salmon Fed Synthetic Astaxanthin. J. AOAC Int. 80,622-632.
- WANG, B., ZARKA, A., TBREST, A., BOUSSIBA S., 2003. Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an Active Photoprotective Process Under High Irradiance, J.Phycol, 39,1116-1124.

- VONSHAK, A.,1997. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*): The Basic Concept. (L.Tomoselli editör). *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, Cell-Biology and Biotechnology. Taylor&Francis Ltd. Great Britain, pp.1-15.
- ZHEKISHEVA, M., BOUSSIBA, S., GOLDBERG,-KHOZIN, I., ZARKA, A., COHEN, Z., 2002. Accumulation of Oleic Acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) Under Nitrogen Starvation or High Light is Corelated with That of Astaxanthin Esters. J. Phycol. 38, 325-331.
- ZHEKISHEVA, M., ZARKA, A., GOLDBERG-KHOZIN, I., COHEN, Z., BOUSSIBA, S., 2005. Inhibition of Astaxanthin Synthesis Under High Irradiance does not Abolish Triacylglycerol Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Adana’da doğdum. İlkokul, orta ve lise öğrenimimi Adana’da tamamladım. 1997 yılında Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde lisans eğitimime başladım ve 2001 yılında Su Ürünleri Mühendisi olarak mezun oldum. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Temel Bilimler Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım.