

***Scenedesmus obliquus* Türünün Gelişimine, Klorofil-a ve Protein Üretim Kapasitesine pH, Nitrat ve Fosfat Konsantrasyonlarının Etkisi**

Muharrem Balcı, Abuzer Çelekli\*, Aziz Deveci, Fatma Eyüboğlu

Abant İzzet Baysal Üniv., Fen Edebiyat Fak., Biyoloji Böl., Gölköy, Bolu.

\* celekli\_a@ibu.edu.tr.

**Özet**

Gölcük Gölet'i'nden (Bolu-Türkiye) izole edilen *Scenedesmus obliquus* türünün gelişimine ve protein üretimine, nitrat ve fosfat konsantrasyonlarının etkisi, farklı pH'larda, 1000 lx ışık yoğunluğunda ve 20±2 °C'de Jonhson besiyerinde kesikli kültürlerde çalışılmıştır. Her iki pH'da nitrat, fosfat konsantrasyonlarının hücre sayısı, klorofil-a ve protein üretimini önemli oranda etkilediği görülmüştür. Çalışma süresince en yüksek hücre sayısına (15.5x10<sup>6</sup>) ve protein konsantrasyonu (8,08 mg/l) pH 7'de 12 mM nitrat ve 0.3 mM fosfat konsantrasyonlarında ulaşılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Scenedesmus obliquus*, protein üretimi, mikroalg kültürü.

**Giriş**

Biyoteknolojik çalışmalarda kültürü yapılan *Scenedesmus* (Chlorococcales) yeşil bir alg cinsi olup, genellikle 2, 4 ve 8 hücreden oluşan tek ve çift sıralı sönobyum olarak adlandırılan koloniler halinde bulunabilmektedirler (1, 2). Biyoteknolojik çalışmalar 1950'li yıllardan beri özellikle *Chlorella*, *Scenedesmus* ve *Dunaliella* cinslerine ait türler ile yapılmaktadır (3). Günümüzde bir çok mikroalg türü yüksek protein, β-karoten, doymamış yağ asitleri, vitamin ve pigment içeriklerinden dolayı endüstriyel amaçlı biyoteknolojik çalışmalarda kullanılmaktadırlar (4). Mikroalglerden elde edilen ürünler gıda, eczacılık, tarım, ziraat, çevre gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar (5). Birçok mikroalg türünün, özellikle yeşil ve mavi-yeşil algler, birim alan başına yüksek yapılı bitkilerden daha fazla oranda protein içerdiği bilinmektedir (6). İzole edilen *S. obliquus* türünün gelişim, protein ve klorofil üretim kapasitesinin, farklı nitrat ve fosfat konsantrasyonlarının farklı pH'larda belirlenmesi amaçlanmıştır.

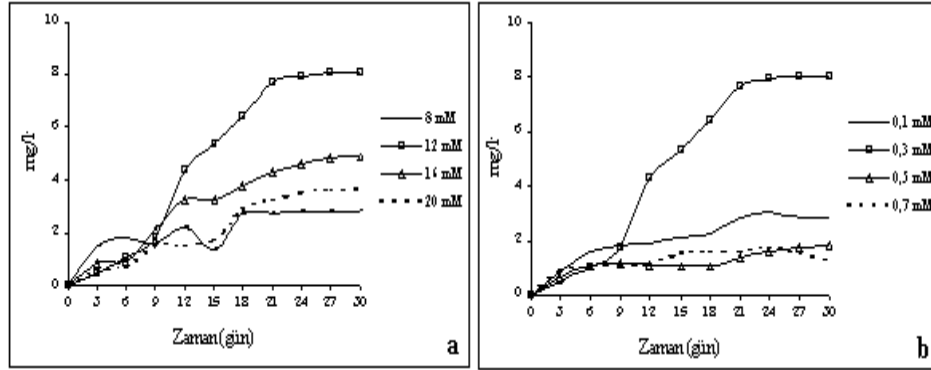
**Materyal ve Yöntem**

Jonhson besiyeri (7) kullanılarak *Scenedesmus* türleri (8) Gölcük Gölet'i'nden (Bolu) izole edilerek saflaştırılmıştır. İzole edilen bu türün gelişimine, protein ve klorofil a üretimine farklı nitrat (8, 12, 16, 20 mM) ve fosfat (0.1, 0.3, 0.5,

0,7 mM) konsantrasyonlarının etkisi, farklı pH'larda (7, 8), 1000 lx ışık yoğunluğunda ve  $20\pm 2$  °C'de Jonhson besi yerinde kesikli kültürlerde çalışılmıştır. Hücre sayısı Thoma lamı kullanılarak, protein miktarı biüret metoduna göre 550 nm dalga boyunda (9) ve klorofil miktarları aseton metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (10). Protein standardı için sığır serum albümin (10mg/ml BSA) kullanılarak grafik hazırlanmıştır (9). Çalışmada seçilen pH, nitrat ve fosfat konsantrasyonlarının hücre sayısı, klorofil-a ve protein miktarları üzerindeki etkisi Varyans Analizi (ANOVA) kullanılarak test edilmiştir (11).

### Bulgular ve Tartışma

Saflaştırılan *Scenedesmus* suşu, 2, 4 ve 8 hücreden oluşan tek ve çift sıralı bir sönobiyum yapısına sahip,  $7,5 \mu\text{m}$  ( $3-8 \mu\text{m}$ ) genişliğinde ve  $10 \mu\text{m}$  ( $7,2-12 \mu\text{m}$ ) uzunluğundadır. Çalışılan bu türün, *S. obliquus* türünün özelliklerini gösterdiği bulunmuştur (1, 2).

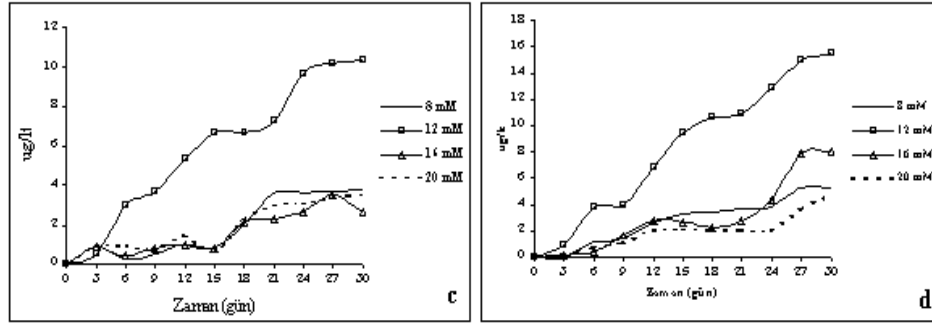


Şekil 1. Nitrat (a) ve fosfat (b) konsantrasyonlarının protein üretim miktarına etkisi

İnkübasyon süresince nitrat konsantrasyonlarının protein üretimi üzerine önemli etkisi ( $p<0,001$ ) olmuştur. Çalışmanın 9. gününden sonuna kadar yüksek protein düzeyi 12 mM nitrat konsantrasyonunda elde edilmiştir (Şekil 1-a,b). Diğer bir mikroalg türü olan *Dunaliella viridis* en iyi gelişim 5-10 mM nitrat konsantrasyonu aralığında olduğu bulunmuştur (7).

Farklı fosfat konsantrasyonları, protein miktarını önemli ( $p>0,001$ ) derecede etkilediği bulunmuştur. Çalışmanın bu kısmında da 9. günden sonra en fazla protein miktarı 0,3 mM fosfat düzeyinde olmuştur. Diğer üç fosfat konsantrasyonlarında önemli bir farklılık ( $p>0,05$ ) tespit edilmemiştir. *Scenedesmus* türleri ile yapılan çalışmada protein miktarı 0,09-0,56 g/g (kuru ağırlık) olarak bulunmuştur (12). Denenen değişkenler klorofil a miktarında

üzerinde önemli bir etkiye ( $p < 0,001$ ) sahip olmuştur (Şekil 2-c). Farklı nitrat konsantrasyonlarında inkübasyon süresince en fazla klorofil a miktarı ( $10,30 \mu\text{g/l}$ ) 12 mM nitrat, 0,3 mM fosfat düzeylerinde ulaşılmıştır (Şekil 2-c). *Spirulina* türü üzerinde yapılan çalışma da klorofil biyoması  $11,5 \text{ mg/g}$  olarak bulunmuştur (13). Seçilen diğer nitrat ve fosfat konsantrasyonlarında oldukça az miktarda klorofil a elde edilmiştir. Ancak diğer fosfat seviyelerine göre nitrat konsantrasyonlarının klorofil a miktarını daha fazla etkilediği görülmüştür.



Şekil 2. Farklı nitrat konsantrasyonlarının pH 7'deki (c) klorofil a üretim kapasitesine ve (d) hücre sayısına etkisi.

Çalışmada sonucunda klorofil a olduğu gibi hücre sayısı üzerinde de nitrat ve fosfat konsantrasyonlarının önemli etkisi olmuştur ( $p < 0,001$ ). İnkübasyon süresince 12 mM'lık nitrat (Şekil 2-d) ve 0,3 mM'lık fosfat konsantrasyonlarında hücre sayısının logaritmik olarak arttığı gözlemlenmiştir. İnkübasyon süresince en yüksek hücre sayısına ( $15,5 \times 10^6$ ) pH 7'de 12 mM nitrat ve 0,3 mM fosfat'ta ulaşılmıştır. *Haemotococcus pluvialis* üzerine yapılan çalışmada en fazla hücre sayısı ( $3,65 \times 10^5$ ) 4 mM nitrat konsantrasyonunda ve 12 mM nitrat konsantrasyonunda  $4,26 \times 10^5$  değerleri bulunmuştur (14).

İnkübasyon süresince, farklı nitrat ve fosfat konsantrasyonlarının hücre sayısını, klorofil a ve protein miktarını önemli oranda ( $p < 0,001$ ) etkilediği belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, en yüksek hücre sayısı, protein ve klorofil a miktarı 0,3 mM fosfat ve 12 mM nitrat konsantrasyonlarında pH 7'de elde edilmiştir. Ülkemizde bu cinsin protein üretim kapasitesi ile ilgili herhangi bir kültür çalışmasına rastlanılmamıştır. Diğer taraftan denemeler sonucunda izole edilen *Scenedesmus* türünün endüstriyel boyutlarda protein üretiminde kullanım potansiyeline sahip olup olmadığı sonucuna varılması için diğer değişkenlerin etkisinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

### **Kaynaklar**

- 1.- Borowitzka MA, Borowitzka LJ, 1992. Micro-Algal Biotechnology. Cambridge Univ. Press, 477 s.
2. John DM, Whitton BA, Brook JA. 2002. The Freshwater algal flora of the British Isles. First edition. Cambridge University Press, 702 s, Cambridge.
3. Ben-Amotz A., Avron M. 1983. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. Ann. Rev. Microbiol, 37:95-119.
4. Soletto D, Binaghi L, Lodi A, Carvalho JCM, Converti A. 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina plantensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources, 243: 217-224.
5. Del Campo JA, Moreno J, Rodríguez H, Vargas MA, Rivas J, Guerrero MG. 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). Journal of Biotechnology 76:51-59.
6. Wood A, Toerien DF, Robinson RK. In Hudson BJB, (Ed.). Developments in Food Proteins-7, Elsevier Applied Science, London. 1991.
7. Johnson MK, Johnson EJ, MacElroy RD, Speer HL, Bruff BS. 1968. Effects of salts on the halophylic alga *Dunaliella viridis*. Journal of Bacteriology, 95:1461-1468.
8. Çelekli A, Dönmez G. 2005. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentration on growth and  $\beta$ -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology.
9. Wear CM. 1996. Food Chemistry Laboratory. CRC Press, 123 s.
10. Porra RJ. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b Photosynthesis Research, 73: 149–156.
11. Zar JH. 1999. Biostatistical Analysis (4<sup>th</sup> ed.). Prentice-Hall International Limited, 929 s, London.
12. Tahiri M, Benider A, Belkoura M, Daut A. 2000. Caracterisation biochimique de l'algue verte *Scenedesmus abundans*: influence des conditions de culture. Ann. Limnol, 36:3-12. In: Geider RJ, La Roche J. 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. Eur. J. Phycol, 37:1-17.
13. Henrickson H.1989. Earth food *Spirulina*. In: Danesi EDG, Rangel CO, Carvalho JCM, Sato S. 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. Biomass and Bioenergy, 23: 261-269.
14. Fàbregas J, Domínguez A, Rigueiro M, Maseda A, Otero A. 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalgae *Haematococcus pluvialis*. Appl. Microbial Biotechnol, 53:530-535.