

Farklı Stres Ortamlarının *Phaeodactylum tricornutum* Üretimi Üzerine Etkisi

Bahar ASLANBAY Zeliha DEMIREL Esra IMAMOĞLU*
Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye

*Sorumlu Yazar:
E-posta:esraimamoglu@yahoo.com

Geliş Tarihi: 09 Şubat 2016
Kabul Tarihi: 21 Mart 2016

Özet

Phaeodactylum tricornutum denizel ortamda yaşayan tek hücreli bir diatomdur. Değişen çevre koşulları ile birlikte iğsi, oval ve Y şeklinde morfolojiler gösterebilen bu mikroalg, tüm genom dizisi bilinen ikinci diatom olmasından dolayı model mikroorganizma olarak kullanılmaktadır. İçeriğinde bulunan protein, karbonhidrat ve yağ bileşenlerinin yanı sıra fukoksantin pigmenti *P.tricornutum*'un ticari amaçla üretimi ve kullanımı için önemli faktörlerdendir. Mevcut çalışmada temel amaç, *P. tricornutum* mikroalgi ile gerçekleştirilecek fukoksantin üretiminde F/2 besin ortamında bulunan bileşenlerin eksikliğinin (azotsuz ve fosfatsız F/2 besin ortamı) fukoksantin üretimi üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Bu amaçla hücreler 13 gün boyunca azotsuz, fosfatsız, azotsuz-fosfatsız ve normal F/2 ortamlarında kültive edilmişlerdir. Denenen besin ortamlarında maksimum spesifik büyüme hızı ($0,2137 \text{ gün}^{-1}$) azot içermeyen besin ortamında gözlenmiştir. Ancak fukoksantin üretimi göz önüne alındığında maksimum verimlilik değeri $3,01 \text{ mg.L}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ olup bu değere normal F/2 besin ortamında ulaşılmıştır. Hücelere besin kıtlığının uygulanması sonucu fukoksantin miktarında azalma olmuştur. Sonuç olarak, primer metabolit olan fukoksantin üretimi hücre artışıyla doğru orantılıdır ve pigment miktarının artırılması için stres ortamı uygulanması hücre miktarını ve fukoksantin miktarını azaltmıştır.

Anahtar Kelime: diatom, fukoksantin, mikroalg, *Phaeodactylum tricornutum*, pigment

The Effect of Different Culture Media on Production of *Phaeodactylum tricornutum*

Abstract

Phaeodactylum tricornutum is a marine, unicellular diatom. This microalga can exist in different morphotypes (fusiform, triradiate, and oval), and changes in cell shape can be stimulated by environmental conditions. Furthermore, *P. tricornutum* is the second diatom for which a whole genome sequence has been generated. In addition to protein, carbohydrate and lipid content, fucoxanthin pigment is one of the important factors for the production and usage of *P.tricornutum* commercially. The main objective of the current study, was to investigate the effect of component deficiency (nitrogen free and phosphate free F/2 media) in F/2 culture medium on the production of fucoxanthin by *P. tricornutum*. With this aim, the cells were cultivated in five different culture media as the nitrogen free, phosphate free, nitrogen-phosphate free and normal F/2 culture media at 24 °C with the air flow rate of 3 vvm during 13 days of the cultivation period. It was recorded that, maximum specific growth rate of 0.2137 day^{-1} was obtained in the nitrogen free medium at 24 °C with the air flow rate of 3 vvm. However, when the fucoxanthin production was considered, the maximum product yield of $3.01 \text{ mg.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$ was found in F/2 culture medium. Important point to note here is that fucoxanthin content reduced under the condition of nutrient starvation. Consequently, fucoxanthin content, as a primer metabolite, increased with increasing the growth rate, and the application of stress conditions reduced the cell growth and fucoxanthin content.

Keywords: diatom, fucoxanthin, microalgae, *Phaeodactylum tricornutum*, pigment

GİRİŞ

Mikroalgler genel olarak denizel ve tatlı sularda yaşayan tek hücreli mikroorganizmalardır. Yüksek büyüme hızına sahip, farklı boyutlarda fotosentetik canlılardır. Doğadaki ekolojik dengenin korunumunda büyük öneme sahip olmasının yanı sıra içerdiği yağ asitleri, steroller, fenolik bileşenler, terpenler, enzimler, polisakkaritler, alkaloidler, toksinler ve pigmentler sayesinde mikroalgler ile ilgili pek çok çalışma yürütülmektedir[1].

Ökaryotik fitoplanktonda bulunan mikroalgler arasında denizel üretimin %40 oranla büyük çoğunluğu diatomlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Diatomlar kahverengi, tek hücreli ve karakteristik olarak silisli hücre çeperine sahip ökaryotik mikroorganizmalardır[2]. Yeryüzündeki yıllık biyokütle üretiminin yaklaşık %25'ini sağlamalarına rağmen sadece birkaç türü akuakültür ve biyoteknolojik ürün üretiminde kullanılmaktadır[3]. Bu türlerden biri de *Phaeodactylum tricornutum*'dur.

P. tricornutum mikroalgi yaygın olarak tuzlu ve denizel ortamlarda yaşayan, yetiştirilmesi kolay, iğsi, oval ve Y şeklinde olmak üzere farklı şekillerde bulunabilen bir di-

atomdur. Yapısı kuru ağırlık bazında 36,4% protein, 26,1% karbonhidrat, 18% yağ ve 15,9% kül içermektedir. [1,4]. Fotosentetik mikroalgler arasında *P. tricornutum* en çok çalışılan türlerden biridir. Tüm genom dizisi bilinen ikinci diatom olması dolayısıyla model mikroorganizma olarak diatom çalışmaları yaygın olarak yer almaktadır. Ayrıca optimum koşullar altında yüksek büyüme hızına sahip olması ve eikosapentaenoik asit (EPA), fukoksantin ve doymamış çoklu yağ asitleri açısından zengin bir içeriğe sahip olması sayesinde gıda, farmasötik, biyoyakıt, akuakültür ve kozmetik alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. [4,5].

Fukoksantin, turuncu renkte olup kahverengi deniz algleri, diatomlar ve dinoflagellatlarda bulunan bir pigmenttir. Klorofil a, klorofil c ve bir apoprotein ile oluşturdukları fukoksantin-klorofil a/c kompleksi sayesinde fotosentezde ışığı toplayan merkez olarak önemli bir role sahiptir [6]. Fukoksantin pek çok biyolojik aktiviteye sahiptir. Yapılan çalışmalar bu pigmentin güçlü bir antioksidan ve etkili yağ yakma potansiyeli sayesinde anti-obezite etkilerinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca fukoksantin anti-enflamatuar, anti-diyabetik, anti-kanser, kardiyovasküler siste-

mi koruyucu etkilerinin bulunduğu da bilinmektedir[7].

Fukoksantin ilk olarak 1914 yılında yenilebilir kahverengi deniz algı olan *Fucus*, *Dictyota* ve *Laminaria* türlerinden izole edilmiştir[7]. Bu aşamada sonra yapılan çalışmalarda fukoksantin genel olarak *Laminaria japonica*, *Eisenia bicyclis* ve *Undaria pinnatifida* makroalglerinden elde edilmiştir. Özellikle *L. japonica* kahverengi makroalginin üretimi sırasında oluşan atıklar fukoksantin endüstriyel alanda kullanım için üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır[1]. Fukoksantin açısından zengin olan kahverengi makroalglerin ekolojik sistemde büyük bir öneme ve yere sahip olduğu düşünüldüğünde bu karotenoid için alternatif kaynak arayışı uzun süredir devam etmektedir. Ana karotenoidi fukoksantin olan *P. tricornutum* diatomu ideal bir alternatif olmasına rağmen bu konuda yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Bu yüzden mevcut çalışmada, *P. tricornutum* mikroalgi ile gerçekleştirilecek fukoksantin üretiminde besin ortamında bulunan bileşenlerin eksikliğinin biyokütle ve ürün üretimi üzerine etkisi incelenmiştir.

Çalışmada kullanılan *P. tricornutum* mikroalgi Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonu (EGEMACC-70)'ndan temin edilmiştir. Hücreler 2 L'lik şişelerde F/2 besin ortamında 14 gün süresince stok kültür oluşturmak amacıyla kültüvasyona bırakılmışlardır. Kültüvasyon koşulları 18 ± 2 °C sıcaklık, $45 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 2 vvm havalandırma hızı olacak şekilde ayarlanmıştır. İnokulasyon için hücreler stok kültürden santrifugasyon ile toplanıp 100 ml F/2 ortamı içeren 250 mL'lik erlenlere alınmıştır. 4 gün boyunca aynı koşullarda kültüvasyona devam edildikten sonra bu hücreler toplam hacmin %10'u oranında inokulasyon için kullanılmıştır.

İnokulasyon için hazırlanan hücreler 900 mL steril besin ortamı içeren 1000 mL'lik şişelere aseptik koşullarda inoküle edilmiştir. Besin ortamında meydana gelecek stresin ürün üretimi üzerine etkisinin görülmesi için F/2 besin ortamı; azotsuz (N-Free), fosfatsız (P-Free) ve azotsuz-fosfatsız (NP-Free) içerikleriyle hazırlanmış ve kontrol olarak da normal F/2 besin ortamı kullanılmıştır. Bu amaçla hücreler $45 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti altında 3 vvm havalandırma hızında 18 °C'de 13 gün boyunca kültive edilmişlerdir.

Kültürlerden örnekler günün belirlenen saatinde alınarak analizler iki paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Hücre büyümesinin izlenmesi için Neubauer hemositometre lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. Ayrıca hücrel türbiditenin belirlenmesi için UV/VIS spektrofotometrede 600 nm'de optik yoğunluk ölçülmüştür. Büyüme eğrisinin gözlenmesi adına yapılan kuru ağırlık analizinde 5 ml örnek önceden ağırlığı tartılmış GF/C filtre kağıtlarından filtre edilerek 65 °C'de 24 saat boyunca kurutulmuşlardır. Hücre içeriğinde bulunan klorofil-a, klorofil-c ve fukoksantin pigmentinin ekstraksiyonu dimetil sülfoksit (DMSO) ile gerçekleştirilmiştir [8].

Yapılan analizler sonucunda spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi, biyokütle verimliliği ve fukoksantin birikim hızı gibi bazı kinetik parametreler hesaplanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

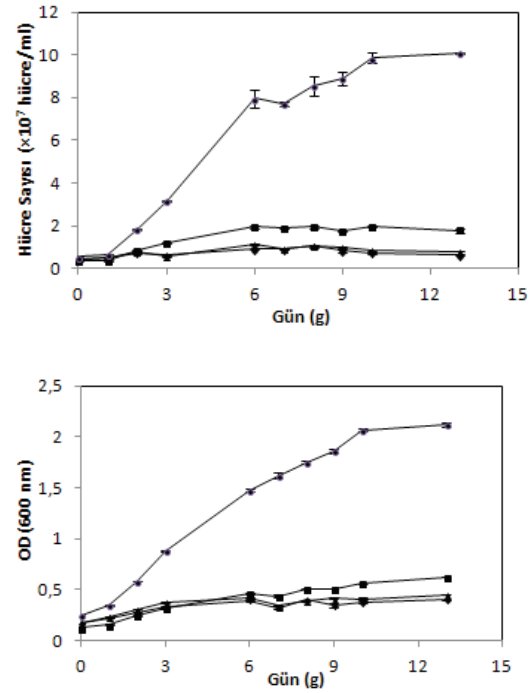
Hücreler farklı içeriklere sahip besin ortamlarında (N-Free, P-Free, NP-Free ve normal F/2) 13 gün boyunca kültive edilmiştir.

Şekil 1'de görüldüğü üzere üretimin başlangıcından itibaren hücre sayısı, ortam stresi bulunmayan normal F/2 besin ortamında diğerlerinden yüksek farkla maksimum değere ulaşmıştır. Normal F/2 içeren besin ortamında son gün elde edilen hücre miktarı $10 \pm 0,02 \times 10^7$ hücre/ml iken,

azot eksikliği stresi uygulanan şişelerde maksimum hücre sayısı $1,7 \pm 0,04 \times 10^7$ hücre/ml'dir. Prestegard ve arkadaşları [9] *P. tricornutum* hücrelerini 20 °C'de herhangi bir stres uygulanmayan Walne's besin ortamında $249 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti altında 14 gün boyunca kültüvasyona bırakmışlar ve maksimum 4×10^7 hücre sayısına ulaşmışlardır.

Hücre yoğunluğundaki değişimi görmek amacıyla 600 nm'de gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümde normal F/2 besin ortamı $2,12 \pm 0,26$ değerini göstererek en yüksek türbiditeyi vermiştir (Şekil-1.b). Hücre sayısındaki değişimde görüldüğü gibi kültür ortamının yoğunluğu da stres uygulanan şişelerde son derece düşük değerlerdedir. Ayrıca, klorofil-a değeri ise en yüksek $5,8 \pm 0,21$ mg/L, klorofil-c değeri ise $1,17 \pm 0,71$ mg/L olarak normal F/2 besin ortamında elde edilmiştir (Şekil-2). Sıcaklığın *P. tricornutum* üretimi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada F/2 besin ortamında 20 °C sıcaklık koşulu ile $40 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanarak elde edilen maksimum klorofil-a konsantrasyonu $2,5$ mg/L'dir [10].

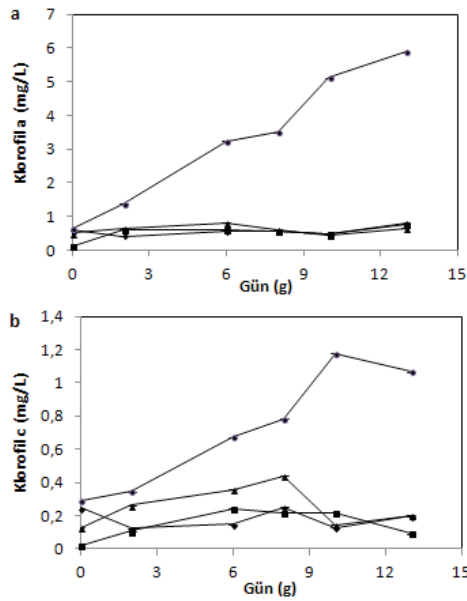
Üretim sırasında hücre morfolojileri incelendiğinde normal F/2 içeren besin ortamındaki hücrelerin daha uzun ve iğsi yapıya sahip oldukları, stres uygulanan hücrelerde ise oval ve kısa yapıların belirginleşmeye başladığı gözlemlenmiştir.



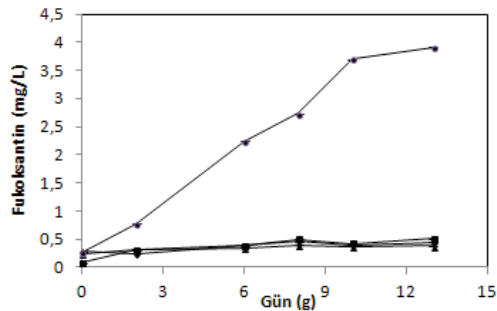
Şekil 1. Farklı stres ortamlarında *P. tricornutum* hücrelerinin büyüme profili: a) Hücre Sayımı, b) Türbidimetrik analiz (■) N-Free, (◆) P-Free, (▲) NP-Free, (●) Kontrol.

Çalışmanın temel amacı olan fukoksantin üretimi üzerine stres ortamlarının etkisi incelendiğinde, en yüksek fukoksantin miktarı $3,9 \pm 0,42$ mg/L ile normal F/2 besin ortamı içeren şişede elde edilmiştir. Stres uygulanan şişelerde ise bu değer birbirine çok yakın olup ortalama $0,4$ mg/L'dir (Şekil-3). Besin ortamında bulunan bileşenlerin eksikliği ile fukoksantin miktarında meydana gelen büyük düşüş stres koşullarının fukoksantin üretimini indiklemediğini göstermektedir. Sonuç olarak, fukoksantin fotosentetik aktivite ile doğrudan ilişkili olduğu düşünüldüğünde hücre büyümesinin maksimum olduğu evrede fukoksantin üretiminin de en

yüksek değere ulaştığı belirlenmiştir.



Şekil 2. Farklı stres ortamlarında *P. tricornutum* hücrelerinin klorofil-a ve klorofil-c miktarlarındaki değişim: (■) N-Free, (◆) P-Free, (▲) NP-Free, (●) Kontrol.



Şekil 3. Farklı stress ortamlarında *P. tricornutum* hücrelerinden elde edilen fukoksantin miktarı: (■) N-Free, (◆) P-Free, (▲) NP-Free, (●) Kontrol.

Üretim süresince yapılan analizler ile elde edilen kinetik parametreler Tablo-1'de gösterilmiştir. Maksimum spesifik büyüme hızına $0,155 \text{ gün}^{-1}$ değeri ile normal F/2 besin ortamında ulaşılmıştır. Hücrelerin maksimum çoğalma gösterdiği bu ortamda fukoksantin ve biyokütle miktarları da en yüksek değerdedir.

Tablo 1. Farklı stres ortamlarında *Phaeodactylum tricornutum* üretimi için elde edilen kinetik değerler.

Üretim Koşulları	Kuru Ağırlık (g L^{-1})	Biyokütle Verimliliği ($\text{g L}^{-1}\text{gün}^{-1}$)	Spesifik büyüme hızı ($\mu, \text{gün}^{-1}$)	Fukoksantin miktarı (mg/L)
18 °C	3,18	0,244	0,225	2,515
24 °C	2,98	0,229	0,156	3,702
28 °C	3,31	0,254	0,161	3,967

SONUÇ

Primer bir metabolit olan fukoksantin insan sağlığına olumlu etkileri, elde edilebilirliğinin kolay olması ve katma değeri yüksek ticari bir ürün olması nedeni ile önemli bir pigmenttir. Bu metabolitin üretiminde alternatif kaynak

arayışları sonucunda karşılaşılan *P.tricornutum* mikroalgi zengin fukoksantin içeriğine sahip olduğundan tercih edilebilir bir türdür. Bu çalışmada, pigment miktarının artırılması için denenen stres uygulaması mevcut üretimde ürün üretimini negatif etkilemiştir. Üretim sırasında besin eksikliği uygulanarak oluşturulan stres koşullarında *P. tricornutum* hücrelerinde hem biyokütle hem de ürün artışı olmamıştır. Maksimum fukoksantin miktarı $3,9\pm 0,42 \text{ mg/L}$ olup bu değere normal F/2 besin ortamında ulaşılmıştır. Sonuç olarak, fukoksantin üretiminin hücre büyümesiyle doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, ES1408 COST aksiyonu kapsamında olup TÜBİTAK 115M014 proje kapsamında finansal olarak desteklenmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Kim S. M., Jung Y. J., Kwon O. N., Cha K. H., Um B. H., Chung D., Pan C. H., 2012. A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 166: (7)1843-1855.
- [2] Gundermann K., Schmidt M., Weisheit W., Mittag M., Büchel C., 2013. Identification of several sub-populations in the pool of light harvesting proteins in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 1827: (3)303-310
- [3] Benavides A. M. S., Torzillo G., Kopecky J., 2013. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds, Biomass and Bioenergy, 54: 115-122ç
- [4] Kwak H. W., Kang M. J., Bae J. H., Hur S. B., Kin I. S., Park Y. H., Lee K. H., 2014. Fabrication of *Phaeodactylum tricornutum* extract loaded gelatin nanofibrous mats exhibiting antimicrobial activity, International Journal of Biological Macromolecules, 63:198-204.
- [5] Perez E. B., Pina I. C., Rodriguez P., 2008. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor, Biochemical Engineering Journal, 40: (3) 520-525.
- [6] Xia S., Wang K., Wan L., Li A., Hu Q., Zhang C., 2013. Production, Characterization, and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the Marine Diatom *Odontella aurita*, Marine Drugs, 11: 2667-2881.
- [7] Juan P., Yuan J. P., Wu C. F., Wang J., H., 2011. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health, Marine Drugs, 9: 1806-1828.
- [8] Duncan M. J., Harrison P. J., 1982. Comparison of Solvents for Extracting Chlorophylls from Marine Macrophytes. Botanica Marina, 25: 445-447.
- [9] Prestegard S. K., Erga S. R., Steinrücken P., Mjos S. A., Knutsen G., Rohloff J., 2015. Specific Metabolites in a *Phaeodactylum tricornutum* Strain Isolated from Western Norwegian FjordWater, Marine Drugs, 14 (9).
- [10] Bojko M., Brzostowska K., Kuczynska P., Latowski D., Pajor M. O., Krzeszowiec W., Waloszek A., Strzalka K., 2013. Temperature effect on growth, and selected parameters of *Phaeodactylum tricornutum* in batch cultures, Acta Biochimica Polonica, 60 (4): 861-864.