

EGE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
(DOKTORA TEZİ)

**Azot Kaynakları ve Konsantrasyonlarının *Nannochloropsis  
oculata* (Droop) Hibberd (Eustigmatophyceae)'nın Büyüme  
ve**

**Biyokimyasal Yapısına Etkisi**

**Yaşar DURMAZ**

Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu:504.04.01

Sunuş Tarihi: 23.06.2005

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Şevket GÖKPINAR

Dr. Narcisa Maria BANDARRA

Bornova-İzmir

EGE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
(DOKTORA TEZİ)

**Azot Kaynakları ve Konsantrasyonlarının *Nannochloropsis  
oculata* (Droop) Hibberd (Eustigmatophyceae)'nın Büyüme  
ve**

**Biyokimyasal Yapısına Etkisi**

**Yaşar DURMAZ**

Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu:504.04.01

Sunuş Tarihi: 23.06.2005

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Şevket GÖKPINAR

Dr. Narcisa Maria BANDARRA

Bornova-İzmir

Yaşar DURMAZ tarafından DOKTORA TEZİ olarak sunulan ‘Azot Kaynakları ve Konsantrasyonlarının *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd (Eustigmatophyceae)’nın Büyüme ve Biyokimyasal Yapısına Etkisi’ başlıklı bu çalışma, E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 23.06.2005 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı : Prof.Dr. Şevket GÖKPINAR .....

II. Danışman : Dr. Narcisa Maria BANDARRA .....

Raportör Üye : Prof.Dr. Semra CİRİK .....

Üye : Prof.Dr. Tufan KORAY .....

Üye : Prof.Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN .....

Üye : Doç.Dr. Oya IŞIK .....



## ÖZET

### **Azot Kaynakları ve Konsantrasyonlarının *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd (Eustigmatophyceae)'nın Büyüme ve Biyokimyasal Yapısına Etkisi**

**DURMAZ, Yaşar**

Doktora Tezi, Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı

Tez Yöneticileri: Prof.Dr. Şevket GÖKPINAR

Dr. Narcisa Maria BANDARRA

Haziran 2005, 92 Sayfa

Azot kaynakları ve konsantrasyonlarının *Nannochloropsis oculata*'nın yağ asitleri,  $\alpha$ -tocopherol, karotenoidler ve klorofil a üretimi üzerine etkileri incelendi. *N. oculata* 2 litrelik erlenlerde, F/2 ortamı ile zenginleştirilmiş % 2.5 tuzluluktaki steril deniz suyunda,  $18\pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıkta,  $196 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ışık şiddetinde sürekli aydınlatma koşullarında yetiştirildi. Kültür denemelerinde F/2 zenginleştirme medimu baz alınarak, F/2 içeriğinde bulunan azot, 3 farklı inorganik azot (nitrat, amonyum, üre) kaynağı ile yer değiştirildi. Bu azot kaynakları optimal konsantrasyonları ( $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ve sınırlı konsantrasyonları ( $441 \mu\text{mol}$ ) kullanılarak deney grupları oluşturuldu. Bu deneme gruplarında algal büyüme başladıktan sonra büyümenin farklı fazlarında iken alg örnekleri alınıp freeze-dry tekniği ile kurutuldu ve Varian Star 3800 Cx gaz kromatografi cihazında Christie (1977) metoduna göre yağ asitleri ve Chen et al., (1998) metoduna göre  $\alpha$ -tokoferol HPLC ile tayin edildi. Ayrıca tezde spektrofotometrik yöntem ile pigment analizleri, TLC ile pigment tanımları ve hücre sayma cihazı ile hücre sayısının tespiti yapıldı.

Çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) önemli bir türü olan EPA (Eicosapentanoic acid), optimal  $\text{NO}_3^-$ -N konsantrasyonu ( $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ile yapılan denemede durgunluk fazında maksimum %16.7 ve en yüksek  $\alpha$ -tokoferol değeri ise  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$ -N ile yapılan denemede ( $581 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) elde edildi. Toplam karotenler ( $4.17 \pm 0.37 \text{ mg g}^{-1}$ ) ve klorofil a ( $12.42 \pm 1.08 \text{ mg g}^{-1}$ ) bakımından en yüksek değerler  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  nitrat konsantrasyonu ile yapılan kültür denemesinde durgunluk fazından alınan alg örneklerinde tespit edildi. Viyolaksanthin, vaucheriasanthin,  $\beta$ -karoten ve klorofil a ana pigmentler olarak tespit edildi. *N. oculata* türü için azot kaynaklarından  $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N büyüme ve biyokimyasal yapısı açısından benzer sonuçlar elde edildi. Fakat üre-N'nun bu tür için uygun kaynak olmadığı tespit edildi.

**Anahtar sözcükler:** Mikroalg, *Nannochloropsis oculata*, Azot kaynakları, Büyüme, Fatty asit  $\alpha$ -tokoferol, pigment



**ABSTRACT**

The Effect of Nitrogen Sources and Concentration On Growth and Biochemical Composition Of *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd (Eustigmatophyceae)

**DURMAZ, Yaşar**

Ph.D. Faculty of Fisheries

Supervisors: Prof.Dr. Şevket GÖKPINAR

Dr. Narcisa Maria BANDARRA

June 2005, 92 Pages

Effects of nitrogen sources and concentration on the production of fatty acid,  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids and chlorophyll a of the *Nannochloropsis oculata* was examined. *N. oculata* were grown in laboratory, 2 L erlens with enriched sterilized seawater (salinity 2.5 %) with F/2 medium, kept at  $18\pm 1^\circ\text{C}$  temperature under continuous illumination at  $196 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . In culture experiments, by following F/2 enriched medium as reference medium, the nitrogen in F/2 medium was replaced by three different resources (nitrate, ammonium and urea). Optimal concentration as  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  and limited concentration as  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  were arranged for these nitrogen sources in experimental culture medium groups. After algal experiment groups started to grow, samples were taken at different growth phases and dried by freeze-dry method after that fatty acids were analyzed method by gas chromatography according to the method introduced by Christie (1997) and  $\alpha$ -tocopherol was analyzed by HPLC according to the method described by Chen et al., (1998). In addition, pigment analysis were done spectrophotometric



method, pigments were identified by TLC and cell counts were by Cell Counter.

The highest performed eicosapentaenoic acid (EPA) one of the most polyunsaturated fatty acids (PUFAs), the highest level was found  $16.7 \pm 3.4$  % in at  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ -N culture medium at stationary growth phase and maximum level of  $\alpha$ -tocopherol was  $581.43 \mu\text{g g}^{-1}$  in  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  concentration in  $\text{NH}_4^+$ -N culture medium. The highest carotenoid ( $4.17 \pm 0.37 \text{ mg g}^{-1}$ ) and chlorophyll *a* ( $12.42 \pm 1.08 \text{ mg g}^{-1}$ ) levels were found at stationary growth phase of the algae in the  $\text{NO}_3^-$ -N ( $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). The main pigments were violaxanthin, vaucherixanthin,  $\beta$ -carotene and chlorophyll *a*.  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{NH}_4^+$ -N nitrogen groups, growth and biochemical composition of *N. oculata* showed similar results. However, urea-N as a nitrogen source was determined to be unsuitable due to lower *N. oculata* growth and poor biochemical composition.

**Key Words:** Microalgae, *Nannochloropsis oculata*, Nitrogen sources, Growth, Fatty acid,  $\alpha$ -tocopherol, pigment



## TEŞEKKÜR

Mikroalg konusunda derin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda ilgi ve desteklerini gördüğüm değerli sayın hocalarım Prof.Dr. Şevket GÖKPINAR ve Dr. Narcisa BANDARRA'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında bilgi desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof Dr. Semra CİRİK'e ve kendi tür koleksiyonunda bulunan *Nannochloropsis oculata* türünü tez çalışmamda kullanmak üzere veren Doç.Dr. Oya Işıık'a Őükranlarımı sunarım.

Portekiz'deki çalışmalarım esnasında yardım ve desteklerini aldığım Margarida MONTEIRO ve arkadaşım Luis Alberto BATISTA'ya teşekkür ederim.

Maddi ve manevi olarak destek olan aileme ve her konuda yardımlarıyla yanımda olan, sabır ve sevgisini daima gördüğüm eşim Aslı DURMAZ'a teşekkür ederim.

12

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>N. oculata</i> 'nın hücre ince yapısı .....	8
Şekil 3.1. <i>N. oculata</i> 'nın 2 L'lik erlenlerdeki kültür görüntüleri (A: NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N denemesi, B: NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N denemesi ve C: üre-N denemesi) ...	23
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan α-tokoferol solusyonları ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi .....	27
Şekil 4.1. NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (882 ve 441 µmol L <sup>-1</sup> oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder) Ok işaretleri örnek alım zamanlarını belirtir. ....	29
Şekil 4.2. NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında spesifik büyüme hızlarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (882 ve 441 µmol L <sup>-1</sup> oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder).....	30
Şekil 4.3. NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (882 ve 441 µmol L <sup>-1</sup> oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder) Ok işaretleri örnek alım zamanlarını belirtir. ....	31
Şekil 4.4. NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (882 ve 441 µmol L <sup>-1</sup> oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder) .....	32

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>Şekil</u>	<u>sayfa</u>
Şekil 4.5. Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (882 ve 441 $\mu\text{mol L}^{-1}$ oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder) Ok işaretleri örnek alım zamanlarını belirtir. ....	33
Şekil 4.6. $\text{NH}_4^+$ -N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (882 ve 441 $\mu\text{mol L}^{-1}$ oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder) .....	34
Şekil 4.7. $\text{NO}_3^-$ -N, $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 ve 441 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki toplam karoten değerleri.....	35
Şekil 4.8. $\text{NO}_3^-$ -N, $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 ve 441 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki birim hücredeki toplam karoten değerleri .....	38
Şekil 4.9. $\text{NO}_3^-$ -N, $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 ve 441 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki klorofil-a değerleri.....	39
Şekil 4.10. $\text{NO}_3^-$ -N, $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 ve 441 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki birim hücredeki klorofil-a değerleri .....	41



## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>Şekil</u>	<u>sayfa</u>
Şekil 4.11. 882 $\mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonda $\text{NO}_3^-$ -N, $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamlarında <i>N. oculata</i> 'nın TLC analizi ile belirlenen pigment kompozisyonu (1, $\beta$ -karoten; A1, $\text{NO}_3^-$ -N denemesinde durgunluk faz; A2, $\text{NO}_3^-$ -N, denemesinde ölüm faz; B1, $\text{NH}_4^+$ -N denemesinde durgunluk faz; B2, $\text{NH}_4^+$ -N denemesinde ölüm faz; C1, üre-N denemesinde durgunluk faz; C2, üre -N denemesinde ölüm faz).....	43
Şekil 4.12. 441 $\mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonda $\text{NO}_3^-$ -N, $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamlarında <i>N. oculata</i> 'nın TLC analizi ile belirlenen pigment kompozisyonu (1, $\beta$ -karoten; a1, $\text{NO}_3^-$ -N denemesinde durgunluk faz; a2, $\text{NO}_3^-$ -N denemesinde ölüm faz; b1, $\text{NH}_4^+$ -N denemesinde durgunluk faz; b2, $\text{NH}_4^+$ -N denemesinde ölüm faz; c1, üre-N denemesinde durgunluk faz; c2, üre -N denemesinde ölüm faz).....	44
Şekil 4.13. $\text{NO}_3^-$ -N, $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 $\mu\text{mol}$ ve 441 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki $\alpha$ -tokoferol değerleri .....	45
Şekil 4.14. $\text{NO}_3^-$ -N, $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 $\mu\text{mol}$ ve 441 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki $\omega$ -3 değerleri.....	58
Şekil 4.15. $\text{NO}_3^-$ -N, $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 $\mu\text{mol}$ ve 441 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki $\omega$ -6 değerleri.....	59

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Şekilsayfa

Şekil 4.16.  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882  $\mu\text{mol}$  ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki EPA değerleri ..... 60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>sayfa</u>
Çizelge 3.1. F/2 Besin ortamı .....	20
Çizelge 3.2. F/2 besin ortamında kullanılan metal solusyonu ve vitamin solusyonu .....	21
Çizelge 3.3. F/2 besin ortamında kullanılan azot kaynakları ve konsantrasyonları .....	22
Çizelge 4.1. Farklı azot kaynaklarında ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan besin ortamlarında <i>N. oculata</i> türünün pigment kompozisyonunun taşınım zamanları ve pigmentlerin renkleri.	42
Çizelge 4.2 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 ve 441 µmol L <sup>-1</sup> ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki yağ asitleri değişimleri .....	48
Çizelge 4.3. NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 ve 441 µmol L <sup>-1</sup> ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki yağ asitleri değişimleri .....	52
Çizelge 4.4. Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 ve 441 µmol L <sup>-1</sup> ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki yağ asitleri değişimleri .....	55



## 1. GİRİŞ

Son yıllarda mikroalgal biyoteknolojiye giderek artan ilgi, bazı türlerin hücre içinde yüksek miktarda biriktirdikleri değerli maddelerden ileri gelmektedir.

Algler, gündüz periyodunda atmosferdeki karbondioksidi büyük bir jeneratör gibi emmekte ve insan ile diğer canlıların yaşamı için hayati öneme sahip olan oksijeni üretmektedirler. Alglerden elde edilen biyomasın yanısıra hücresel olarak bünyelerinde biriktirdikleri kıymetli metabolitlerin yüksek ticari değere sahip olması ve bazı türlerin çevre ile ilgili uygulamalarda kullanılabilmesi mikroalgere mevcut ilgiyi daha da arttırmakta ve biyoteknolojide yoğun araştırmaların yapıldığı bir alan haline getirmektedir (Cirik ve Gokpınar, 1999).

Bu canlılar, hücre içinde protein, pigment, yağ asitleri, vitaminler, antibiyotikler, hidrokarbonlar, polisakkaritler ve daha pek çok metabolitleri yüksek miktarlarda doğal olarak biriktirebilmektedirler. Bu nedenle mikroalglerden yararlanmak için insanoğlu 100 yıldan fazla bir zamandır araştırmalar yapmaktadır. Alg kültürleriyle ilgili ilk çalışmalarda hedeflenen esas amaç, tek hücre proteinini elde etmektir. İlk olarak 1890 yılında Beijerinck, *Chlorella vulgaris*'in agar üzerinde kolonilerini elde etmiş ve kültürünü yapmıştır. O yıllarda alg kültürleriyle tek hücre protein üretiminin dünyadaki protein açığını kapatacak büyük bir alternatif olduğuna inanılıyordu. Dolayısıyla konuya sadece bu açıdan yaklaşılması nedeniyle, çalışmalar belli bir noktaya kadar gelmiş ve arzu edilen sonuçlar elde edilemeyince hayal kırıklığına uğramıştır (Gökpinar, 1991). 1919 yılında Otto Warburg, *Chlorella* kültürü

üzerindeki araştırmaları daha da geliştirmiştir. 1940-1950 yıllarında Almanya ve Japonya'daki daha sonraları da ABD'deki araştırmacılar fototrofik mikroalglerin yığın üretiminde temel kültür özelliklerini çalışmışlardır. Böylelikle, alg kültürlerinin sahip olduğu pek çok avantajının (yüksek fotosentetik verim, yıl boyu işlem yapma olanağı, yüksek bitkisel protein içeriği v.s.) olduğu tespit edildi (Gökpınar, 1991). Halen bir çok türün kimyasal kompozisyonları ve metabolizmaları üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

Mikroalglerin yığın kültürleriyle ilgili ilk çalışmalar, ilk olarak 1978 yılında, Ege Üniversitesi, Biyolojik Oseanografi Bölümüne bağlı Deniz Biyolojisi Araştırma Laboratuvarında başlamış ve çeşitli diyatome ve flagellat türlerinin monospesifik kültürleri başarıyla yapılmıştır. Gökpınar (1980, 1982) bir çok türün farklı ortam koşullarındaki büyüme özellikleri üzerine araştırmalarda bulunmuş ve daha sonra *Nannochloris* sp. türünde, inorganik azot alımı üzerine sıcaklığın etkisini araştırmıştır (Gökpınar, 1991; Gökpınar, 1994).

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

desteklemez. Bu durum, farklı büyüklükler, sindirilebilirlik ve özellikle besinsel değerlerinden ileri gelir (Zittelli et al., 2004).

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

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

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

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

Azot, karbondan sonra biyomas üretimi için en önemli besin maddesidir. Azot, türlere bağlı olarak hücre kuru ağırlığının %1 ile %10'nu oluşturur. Azotun çeşitli formları mikroalg kültürleri için uygundur. Kültürlerde hücreler tarafından kullanılabilen en önemli inorganik azot kaynakları nitrat azotu ( $\text{NO}_3^-$ -N), amonyum azotu ( $\text{NH}_4^+$ -N) ve üre azotu ( $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ -N)'dur (Kaufman et al 1983; Price et al 1985; Kristangen and Lund 1989; Gökpınar, 1991; Levasseur et al., 1993; Grobbelaar, 2000). Fitoplankton büyümesini sınırlayan en önemli nutrientlerin özellikle doğada dominant halde bulunan amonyum ve nitrat gibi inorganik azot kaynakları olduğu saptanmıştır (Gökpınar, 1991; Gökpınar, 1994) Tüm azot kaynakları hücrenin yapıtaşları olan aminoasitlerin ve dolayısıyla proteinlerin yapısına girmesinden ötürü



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

Bir çok araştırmacı tarafından azot kaynağı ve konsantrasyonunun, algal kültürlerde büyüme ve biyokimyasal kompozisyonu etkileyen en önemli faktörlerden olduğu belirtilmiştir (Utting, 1985; Brown et al., 1989; Gökpınar, 1994; Fidalgo et al., 1995; Xu et al., 2001). Farklı büyüme fazlarında biyokimyasal kompozisyon üzerine azot kaynaklarının etkisini çalışmak, akuakültürde yaygın bir şekilde kullanılan *N. oculata* türünün metabolizması üzerine çok önemli bilgiler verebilir. Bu bilgiler, akuakültürde, yetiştiriciliği yapılan organizmalar için besleyici değeri daha yüksek kültürlerin yapılmasına yardımcı

olacaktır. Bu çalışmada çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA), EPA ve ARA (arachidonic asit, 20:4 $\omega$ 6), karotenoid ve klorofil pigmenti bakımından zengin bir tür olan *N. oculata* çalışıldı. Çalışmada azot kaynakları, azot sınırlamasının ve farklı büyüme fazlarının *N. oculata*'nın gelişimi ve biyokimyasal kompozisyonuna (toplam karoten, klorofil-a, yağ asitleri ve  $\alpha$ -tokoferol) etkisi araştırıldı.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1 TÜRÜN ÖZELLİKLERİ

#### 2.1.1. *N. oculata*'nın Sistematikteki Yeri

*Nannochloropsis oculata*'nın sistematikteki yeri şu şekildedir:

Domain *Eukaryota*

Kingdom *Chromista* Cavalier-Smith, 1981

Subkingdom *Chromobiota* Cavalier-Smith, 1991

Infrakingdom *Heterokonta* Cavalier-Smith, 1986

Phylum *Ochrophyta* Cavalier-Smith, 1986

Subphylum *Phaeista* Cavalier-Smith, 1995

Infraphylum *Chrysista* Cavalier-Smith, 1986

Superclass *Limnista* Cavalier-Smith, 1996

Class *Eustigmatophyceae* Hibberd & Leedale, 1970

Genus *Nannochloropsis*

*Nannochloropsis oculata* Hibberd 1981

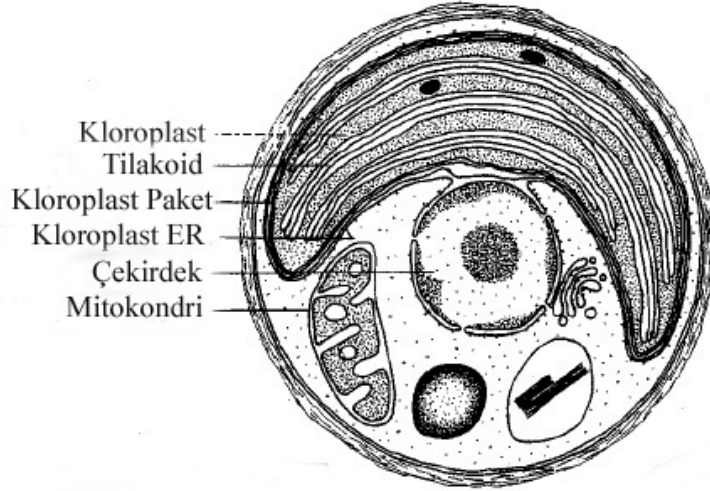
#### 2.1.2. *N. oculata*'nın Biyolojisi

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

*Nannochloropsis*'in dört türü tanımlanmıştır;

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

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



Şekil 2.1. *N. oculata*'nın hücre ince yapısı (Maruyama et al., 1997)

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

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

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

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

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

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

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

alma döneminde *N. oculata* da bu değeri  $116.4 \mu\text{g} (10^6 \text{ hücre})^{-1}$  olarak rapor etmişlerdir.

### 2.3. Azot Kaynakları

Doğada bulunan tüm azot kaynakları hücrenin yapıtaşları olan aminoasitlerin ve dolayısıyla proteinlerin yapısına girmektedirler. İnorganik azot kaynakları deniz suyunda, nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve amonyum ( $\text{NH}_4^+$ ) iyonları halinde bulunur. Doğal koşullarda nitrat ve amonyum iyonları dominant halde bulunur, ancak, fitoplankton tarafından azot, her üç formda da absorblanabilir (Gökpınar, 1991).

Fitoplankton büyüme ve gelişmeleri için azot ve diğerlerinin ortamda yeteri kadar bulunması gerekir (Gökpınar, 1991; Egemen ve Sunlu, 1999). Fitoplankton kültürleri için  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve üre-N her zaman için en baskın azot kaynağı olarak kullanılmıştır. Bununla beraber bu iyonların tümünün aynı ortamda bulunması halinde, hücre bunları genel bir tercih sırasına göre almaya başlar. Mikroalgler tarafından üç azot bileşiği içerisinde ilk olarak  $\text{NH}_4^+$ -N daha sonra  $\text{NO}_3^-$ -N ve sonra üre tercih edilir. Örneğin ortamda hem  $\text{NO}_3^-$ -N hemde  $\text{NH}_4^+$ -N'nun birlikte bulunması halinde, hücre öncelikle  $\text{NH}_4^+$ -N'nu almaya başlar ve  $\text{NO}_3^-$ -N alınımı, amonyum konsantrasyonunun ancak belirli bir düzeyin altına düşmesinden sonra başlar. Çünkü nitrat iyonlarının kullanımı enerji tüketimini gerektiren bir indirgenme ile olur (nitrit'e indirgenmesi) ve bu olay hücre içi yüksek enerji (NADH yada NAD(P)H) kullanımını gerektirir (Levasseur et al., 1990; Gökpınar, 1991; Levasseur et al., 1993; Egemen ve Sunlu, 1999; Lourenco et al., 2002).

$\text{NO}_3^-$ -N alınımı için , ATP ile ilişkili olarak hücrelerin fazladan enerji ihtiyacı vardır.  $\text{NO}_3^-$  iyonlarının nitrat-redüktaz tarafından indirgenmesi yapıldığından büyüme hızı daha düşük kayıt edilir. Bundan dolayı enerji sınırlaması olduğu zaman mikroalgler ilk olarak  $\text{NH}_4^+$ -N tercih eder ve daha yüksek büyüme hızı gerçekleşir (Gökpınar, 1991; Levasseur et al., 1993; Grobbelaar, 2000, Hu, 2004).  $\text{NO}_3^-$ -N fitoplankton büyümesinde azaltıcı etkisine rağmen, biyokimyasal yapıdaki artış ile bu etkiyi telafi etmektedir Ayrıca  $\text{NO}_3^-$ -N ile  $\text{NH}_4^+$ -N arasında büyüme hızları açısından istatistiki bir farklılık yoktur (Conover, 1975; Syrett, 1981; Thompson et al., 1989; Lourenco et al., 2002).

Azot kaynağı olarak üre hakkında bilgi çok azdır. Bazı türlerde üre ile büyüme görülmemiştir. Fakat birkaç diatom türü ile tek kamçılı alg türlerinde üre-N daha iyi sonuç vermiş ve diğer azot kaynakları ( $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N) arasında fark olmadığını rapor edilmiştir (Syrett, 1981, 1988; Lourenco et al., 2002). Syrett (1981) ve Antia et al., (1991) üre ile yapılan deneme büyüme sonuçları ile  $\text{NH}_4^+$ -N ile yapılan denemenin büyüme sonuçlarını benzer bulmuşlar ve büyüme oranını ya fazla ya da daha düşük olarak bildirmişlerdir.

Azotlu bileşikler, yağ asitleri sentezi için çok önemlidir ve hücresel PUFA içeriği üzerine azot sınırlamasının etkisinin olduğu anlaşılmıştır (Levasseur et al., 1993; Lourenco et al., 2002). Yüksek kaliteli besin, yüksek oranda PUFA, özellikle  $\omega$ -3 tipinin çok yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir (Brett and Müller- Navarra 1997, Ahlgren et al., 2000; Müller-Navarra, 2000). *N. oculata* türünün biyokimyasal yapısında özellikle EPA miktarında önemli düzeydedir (Zittelli et al., 1999).



Yongmanitchai and Ward (1991), farklı azot kaynaklarının ( $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve üre-N) *Phaeodactylum tricornutum*'un yağ asitleri kompozisyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. EPA bakımından zengin bir tür olan *P. tricornutum* için  $\text{NO}_3^-$ -N, ve üre-N ile hazırlanan besin ortamlarında en yüksek değerler (%24.6 ve %37.8) elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Marin et al., (1998), *Dunaliella salina* türünde  $\text{NO}_3^-$ -N konsantrasyonunun (882, 435 ve 212  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) klorofil-a ve karoten miktarlarına etkisini araştırmışlar. En yüksek klorofil-a ve karoten değerlerini 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ -N konsantrasyonunda ve durgunluk fazında tespit etmişlerdir.

*Chlorella vulgaris*'in yığın kültüründe azot sınırlamasında  $\alpha$ -linoleik asit (ALA, 18:3 $\omega$ 3) oranı 10 kez artarken (Piorreck et al., 1984), *C. sorokinana*'da 2-4 kat azalma olmuştur (Chen and Johns 1991). Bunların aksine *Scenedesmus obligus* kültürlerinde, azot sınırlaması ile ALA oranında çok küçük değişim olmuştur (Ahlgren et al., 2000; Ahlgren and Hyenstrand, 2003). Ben-Amotz et al., (1985) ALA oranının *Ankistradesmus sp.* ve *D. salina*'da azaldığını, ALA ve DHA (decasoheksanoic asit, 22:6 $\omega$ 3) oranının ise *Isochrysis sp.*'de arttığını bildirmişlerdir.

Xu et al., (2001), Eustigmatophyceae sınıfı içerisinde *Ellipsoidion sp.* ile 3 farklı azot kaynağının ( $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve üre-N ) etkisini araştırmışlar. Azot kaynakları arasında  $\text{NO}_3^-$ -N ile  $\text{NH}_4^+$ -N arasında büyüme açısından farklılık tespit edilmez iken, üre-N ile hazırlanan besin ortamında daha düşük oranda bir üretim kayıt edilmiştir. *Ellipsoidion sp.*

hücreleri ilk olarak  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 'nu tercih etmesi durumunda bekleme fazı süresinin  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 'na göre daha kısa olduğunu bildirmişlerdir. Yağ asitleri bakımından ise PUFA, EPA ve ARA değerlerinin azot konsantrasyonu ile doğru oranlı bir şekilde arttığını tespit etmişlerdir. En yüksek PUFA, EPA ve ARA değerlerinin  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ve  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ile hazırlanan besin ortamlarında elde etiklerini bildirmişlerdir.

Fidalgo et al. (1998) farklı azot kaynaklarının ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ , ve üre-N) *Isochrysis galbana*'nın yağ asit kompozisyonuna etkisini araştırmışlardır. Üre- N ile hazırlanan besin ortamında en yüksek EPA üretiminin durgunluk fazında olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı şekilde azot kaynaklarının *I. galbana*'nın pigment kompozisyonu üzerine etkili olduğunu belirtmişlerdir. En yüksek klorofil-a ve karoten miktarları üre-N ile hazırlanan besin ortamında logaritmik fazda elde etiklerini bildirmişlerdir.

#### 2.4. Yağ Asitleri

Lipidler; yüksek yağ asitleri, bunların oluşturduğu doğal bileşikler ve bunlarla kimyasal olarak bağlanan maddeleri kapsayan doğal bir madde grubudur. Suda çözünmezler; eter, benzen, kloroform gibi organik çözücülerde çözünürler. Yağ asitlerinin esteridirler veya esterleşebilirler. Metabolizmada yağlar, yağ asitleri ve bunların metabolik ürünleri önemli fonksiyonlar göstermektedir. Bunların arasında, etkin enerji kaynağı olmaları, dış faktörlere karşı dayanıklılık sağlamaları, hormon benzeri bileşiklerin (örneğin prostaglandin, tromboksan ve lökotrientler gibi) ön

maddesi olarak görev almaları sayılabilir (Simopolous, 1999; Molina-Grima et al., 1999; Certik and Shimizu, 1999).

Yağ asitleri, hidrokarbon zincirdeki bağlara göre doymuş veya doymamış yağ asitleri olmak üzere iki grupta incelenebilir. Doymamış bağların sayısı bir veya daha fazla olabilir ve doymamış yağ asitleri doymuş hale getirilebilir. Doymamış yağ asitleri kolaylıkla okside olabilirler. Özellikle çift bağın sayısının artması oksidasyonu (metaller, ısı, ışık vb.) hızlandırmaktadır. Hormon benzeri bileşiklerin oluşumunda vücut tarafından sentezlenemeyen PUFA'lar yer almaktadır. Bu yağ asitlerine esansiyel yağ asitleri denmektedir. Oleik asit doğada en yaygın bulunan yağ asididir. Bilinen tüm doğal yağların ve fosfolipidlerin hepsinde oleik asit saptanmıştır. Hayvansal lipdlerde en çok bulunan doymamış yağ asitleri palmitoleik, oleik, Linoleik (LA) ve ARA asitlerdir (Molina-Grima et al., 1999; Certik and Shimizu, 1999).

Esansiyel yağ asitleri hayvansal organizmada ancak bir tek çift bağlı yağ asitleri sentezlenebilmektedir. Birden fazla doymamış bağa sahip olan LA, ALA ve ARA asitler hayvansal organizmada sentez edilemez ve mutlaka dışarıdan alınması gereklidir. Bu yağ asitlerinin organizmaya yeterli miktarlarda alınmaması durumunda büyüme durur, dermatit oluşur. Böbreklerde harabiyet ve hematüri (kan işeme) görülür. Esansiyel yağ asitleri verilirse bu belirtiler kaybolur. EPA son zamanlarda kalp hastalıklarında ve yüksek kolesterol tedavisinde, kandaki kolesterolü düşürmede, romatizma riskinin azaltılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca EPA ve ARA gibi PUFA'lar, insan vücudunda prostaglandinlerin prekürsörüdür ve Prostaglandinler, yağ metabolizması, kalp atış hızı, kan basıncı üzerinde etkin olduğu bulunmuştur. Astım, romatid artrit gibi

alevlenme dönemleri olan ateşli hastalıkların tedavisinde, peptik ülserlerde, yüksek tansiyonun kontrolünde, kan basıncı ve yağ metabolizmasının düzenlenmesinde etkilidir (Simopolous, 1999; Molina-Grima et al., 1999; Certik and Shimizu, 1999).

GLA (gammalinelic asit, 18:3 $\omega$ 6) bazı deri hastalıklarının, diabetin ve üreme bozukluklarının önlenmesinde rolünün olduğu saptanmıştır (Gunstone, 2003; Horrobin, 1999). ARA ve DHA sinir sisteminin gelişimini desteklediği (Innis, 1991, 2003; Nettleton, 1993; Singh and Chandra, 1988; Nettleton and Katz, 2005) ve retina gelişimi ile ilişkisinin olduğu bildirilmiştir (Brown et al., 1999). Çeşitli sağlık kuruluşları, bebek gelişimi üzerinde olumlu etkileri nedeniyle bebek maması formüllerini DHA ve ARA ile güçlendirilmesini tavsiye etmektedirler (Gill and Valivety, 1997).

Maruyama et al., (1997) *N. oculata* ile *C. vulgaris* alglerinin protein, amino asit, mineral maddeler ve vitaminler açısından birbirlerine benzemelerine rağmen yağ asitleri değerlerinde farklılıklar tespit etmişlerdir. *N. oculata*'da toplam yağ asitleri içerisinde PUFA'lardan EPA %40, ARA %6.6 iken DHA tespit edilmediğini rapor etmişlerdir.

Xu et al., (2001) Eustigmatophyceae sınıfı içerisinde *Ellipsoidion sp.* ile üç farklı azot kaynağının ( $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve üre-N ) yağ asitleri kompozisyonuna etkisini araştırmışlar. Azot kaynağı eklemeyen hazırlanan besin ortamında en düşük yağ asitleri değerleri elde edilmiştir. Üre-N kullanılan besin ortamı toplam yağ asitleri değerlerinde,  $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamlarının toplam yağ asitlerine göre istatistik önemde azalma kayıtlı edilmiştir.  $\text{NO}_3^-$ -N ile hazırlanan besin

ortamında logaritmik fazın başlangıcındaki EPA değeri %20.3 logaritmik fazın sonunda %10.2 değerine düşmüştür. Aynı şekilde  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ile hazırlanan besin ortamında EPA konsantrasyonu %19 değerinden %12.3 değerine düşmüştür. Aynı çalışmada beş farklı  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ve  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  konsantrasyonunda (160, 320, 640, 1280 ve 1920  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında *Ellipsoidion sp.* kültürünü yaparak yağ asitleri değişimlerini incelemişlerdir. Azot konsantrasyonundaki azalışla beraber toplam PUFA değerlerinde bir azalış olduğu tespit edilmiştir.  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ile hazırlanan besin ortamlarındaki toplam PUFA ve EPA değerleri  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ile hazırlanan besin ortamlarına göre daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir. En yüksek EPA üretiminin  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ile hazırlanan besin ortamında logaritmik fazın başlangıcında elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Xu et al., (2004) *Nannochloropsis sp.* ile mikсотrofik kültür denemelerinde azot kaynağı olarak  $\text{NO}_3^-$  iyonlarını ve organik karbon kaynağı olarak glukoz kullanmışlardır. *Nannochloropsis sp.*'nin yığın kültürü yapıldığı zaman EPA değeri %23.6 iken,  $\text{NO}_3^-$  eklemesi yapıldığı zaman EPA değerinde (%30.9) artış tespit edilmiştir. Glukoz eklenmesi sonucunda EPA değerinde (%20.1) azalma olmuştur.

Hu and Gao, (2003) iki farklı oranda karbon kaynağının (350 ve 2800  $\mu\text{l CO}_2 \text{L}^{-1}$ ) *Nannochloropsis sp.*'nin yağ asitleri değerlerine etkisini araştırmışlar. En yüksek EPA değerini yüksek oranda kabbondioksit ( $\text{CO}_2$ ) verilen kültürde %25.3±1 olarak tespit etmişlerdir.

Besin ortamı ve sıcaklık optimum olacak şekilde ayarlandıktan sonra mikroalgin biyokimyasal yapısında etkili olacak etmen ışıktır. *Nannochloropsis sp.* kültürüleri için düşük ışık şiddeti EPA üretimini

yükseltmektedir. Düşük ışık şiddetinde %28.90 olan EPA değerinin ışık şiddetinin  $480\mu\text{mol Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'e çıkarıldığı zaman %8.02'ye düştüğü görülmüştür (Fábregas et al., 2004).

Tago and Teshima, (2002)  $15\text{mgL}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{SO}_4$  ve  $10\text{mgL}^{-1}$  üre ile hazırladığı besin ortamında *N. oculata*'nın  $\%32.9\pm 3.8$  EPA,  $\%5.8\pm 1.3$  ARA değerlerini bildirmişlerdir.

## 2.5. $\alpha$ -tokoferol

İnsan sağlığına olumlu katkıları nedeniyle antioksidanlara verilen önem giderek artmaktadır. Son dönemin en popüler takviyelerinden olan antioksidanlar, genel yaşam süresini uzatan, kanser, kalp hastalıkları gibi hastalıklara yakalanma riskini azaltan ve yaşlanmanın etkilerini geciktiren etkileriyle bilinir.

Mikroalgler balık ve karides yetiştiriciliğinde kuluçkahanelerde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Larval besinler makrobesinlerin yanısıra vitamin gibi mikrobeseinleri de içermelidir. Son zamanlarda  $\alpha$ -tokoferol, yağları oksidasyondan koruma özelliği sebebiyle besinlerin içinde kullanılmasının gerekliliği konusunda pek çok yayın bulunmaktadır. (Qiang et al., 1998; Brown et al., 1999). Balık ve karides yetiştiriciliğinde üretim verimliliğinin artırılmasında ve stresten uzaklaştırılmada  $\alpha$ -tokoferol kullanımının faydaları ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Maruyama et al., 1997).

Mikroalglerde bulunan pigment ve enzim grupları oksijen aktivitesinin ve DNA oksidasyonuna karşı görev yapmaktadırlar.

vitamin-E, vitamin-C ve  $\beta$ -karoten antioksidan aktivitesi vardır ve DNA'ya zarar veren oksijen reaksiyonlarına karşı hücrel koruma sağlar (Hunter, and Fletcher, 2002).

Algler, fotosentez ile güneş enerjisini organik bileşiklere dönüştüren bitkisel bir yapıdır. Alglerin çoğu, vitaminler ya da pigmentler gibi ticari değeri olan bileşikleri yüksek oranda üretebilmektedir (Qiang et al., 1998). Alglerin  $\alpha$ -tokoferol içerikleri ışık, sıcaklık, besin ortamı gibi çevresel faktörlere ve mikroalg türüne bağlıdır (Brown et al., 1999).

Maruyama et al., (1997) kurutulmuş *N. Oculata*'nın  $300\mu\text{g g}^{-1}$   $\alpha$ -tokoferol içerdiğini tespit etmişlerdir.

Brown et al., (1999) 12:12 saat aydınlık:karanlık periyodu uygulayarak *Nannochloropsis sp.* kültürünü yapmışlardır. Logaritmik fazda  $\alpha$ -tokoferol değeri  $290\mu\text{g g}^{-1}$  iken durgunluk fazında  $180\mu\text{g g}^{-1}$  azalmıştır. 24 saat aydınlık periyot uygulandığı zaman logaritmik fazda  $\alpha$ -tokoferol değerinin  $350\pm 2\mu\text{g g}^{-1}$  yükseldiğini ve bu değerler arasında istatistiksel önemde farklılık olduğunu rapor etmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Organizma

Yeşil alglerden *Nannochloropsis oculata* (CCAP-8491, İskoçya) Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinden temin edildi.

#### 3.2. Kültür Ortamı ve Deney Düzenegi

Kültür ortamı olarak F/2 besin ortamı (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2) ile zenginleştirilmiş deniz suyu kullanıldı (Guillard, 1975). Besin ortamında Merck (Darmstadt, Germany) kimyasal maddeleri kullanıldı. Tuzluluk ‰ 25 olacak şekilde saf su ile ayarlandı. Hazırlanan stok solusyonlar, kültür ortamları, kullanılan erlenler ve diğer malzemeler otoklavda 121°C’de 20 dakika bekletilerek steril hale getirildi. Vitamin solusyonu 0.22µ filtreden geçirilerek steril hale getirildi.

Çizelge 3.1. F/2 Besin ortamı (Guillard, 1975)

Miktar	Eklenen Madde	Stok solusyon	Molar Konsantrasyon
1 mL	NaNO <sub>3</sub>	75g L <sup>-1</sup>	882 µmol L <sup>-1</sup>
1 mL	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 mg L <sup>-1</sup>	363 µmol L <sup>-1</sup>
1 mL	f/2 metal solusyonu	Tablo 2	
0.5 mL	f/2 vitamin solusyonu	Tablo 2	



Çizelge 3.2. F/2 besin ortamında kullanılan metal solusyonu ve vitamin solusyonu

FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3.15 g
Na <sub>2</sub> EDTA. 2 H <sub>2</sub> O	4.36 g
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0.0098 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0.0063 g
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.022 g
CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0.01 g
MnCl <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	0.18 g

Vitamin B12	0.001 g
Biotin	0.001 g
Thiamine HCl	200 mg

F/2 besin ortamında 0.075g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> bileşiminden 882 µmol L<sup>-1</sup> azot maddesi bulunmaktadır. İlk denemede azot kaynağı olarak NaNO<sub>3</sub> bileşimi kullanıldı ve azot kaynağı olarak 882 ve 441 µmol L<sup>-1</sup> konsantrasyonu sağlayacak şekilde besin ortamına eklendi. 2. denemede ise NH<sub>4</sub>Cl bileşimi azot kaynağı olarak kullanıldı ve 882 ve 441 µmol L<sup>-1</sup> konsantrasyonu oluşturuldu. 3. denemede ise (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO (üre) azot kaynağı olarak kullanıldı ve 882 ve 441 µmol L<sup>-1</sup> olacak şekilde besin ortamına eklendi (Çizelge 3.3). Böylelikle farklı azot kaynakları ile ayrı ayrı besin ortamları hazırlanarak, yoğunluklarının eşit olması sağlandı.

Çizelge 3.3. F/2 besin ortamında kullanılan azot kaynakları ve konsantrasyonları

Azot Kaynakları	Optimum (%100)	Azot Sınırlaması (%50)
1.Deneme: NaNO <sub>3</sub> (Nitrat-N)	882 µmol L <sup>-1</sup>	441 µmol L <sup>-1</sup>
2.Deneme: NH <sub>4</sub> Cl (Amonyum-N)	882 µmol L <sup>-1</sup>	441 µmol L <sup>-1</sup>
3.Deneme: (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (Üre-N)	882 µmol L <sup>-1</sup>	441 µmol L <sup>-1</sup>

### 3.4. Kültür Koşulları

*N. oculata* kültürlerinde 2L hacmindeki erlenler (Şekil 3.1) 1.5 L besin ortamı ile dolduruldu. Kültürlerin aydınlatılmasında daylight floresan lambalar (Philips TLM 40W/54RS) kullanıldı. 196 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> aydınlatma seviyesi erlenlerin yüzeyinden Li-Core (Model SPH, Quantum SPG A0525) ışık ölçer ile tespit edildi. Laboratuvar sıcaklığı bir klima ile 18±1°C'ye ayarlandı. Sürekli havalandırma ile kültürlerin karıştırılması yapıldı. Havalandırmada CO<sub>2</sub> eklemesi yapılmadı.



A



B



C

Şekil 3.1. *N. oculata*'nın 2 L'lik erlenlerdeki kültür görüntüleri (A:  $\text{NO}_3^-$ -N denemesi, B:  $\text{NH}_4^+$ -N denemesi ve C: üre-N denemesi)

### 3.5. Örneklerin Alımı

Farklı büyüme fazlarından alınan 250 ml hacmindeki örnekler 8000 rpm 18°C'de 10 dakika santrifuj (Kubota 6000, Japon) edilerek çöktürüldü. Elde edilen algal pasta -80°C'de buzdolabında 24 saat bekletilerek dondurulduktan sonra 48 saat freeze-dry yöntemi ile kurutuldu. Bu işlemde -40°C de 10<sup>-1</sup> atm basınçta ayarlanan Edward marka freezer.dry cihazı ile kurutma gerçekleştirildi (Ek açıklamalar Şekil Ek B1).

### 3.6. Analitik Ölçümler

#### 3.6.1. Hücre Sayısı

Hücre sayısı elektronik sayıcı (Coulter EPICS XL, Beckman Company, Miami, FL) ile her iki günde bir yapıldı (Ek açıklamalar Şekil Ek B2) Hücre sayısından Spesifik büyüme hızı ( $\mu$ ) aşağıdaki formüllere göre bulundu;

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

Formülde  $X_2$  ve  $X_1$ , sırasıyla  $t_2$  ve  $t_1$  zamanlarındaki biyomas konsantrasyonlarını belirtir.

### 3.6.2. Pigment Analizi

Toplam karoten ve klorofil-a spektrofotometrik yöntemle göre aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı. 5 mg kurutulmuş örnek alınarak 5 ml metanol (Merck %100, Germany) muamele edildikten sonra, hücreler Ika (Ultra Turrax T25) marka homojenitör ile 5 dakika süre ile homojenize edildi. Daha sonra 10 dakika 70°C'de ultrason (Transonic T570/H (ELMA, Germany)) banyoya tabi tutuldu. Elde edilen ekstrakt madde 3500 rpm'de satirifuj ile ayrıldı. Örnekler spektrofotometrede (Hitachi U-2001, Japan,) 475 nm ve 666 nm dalga boylarında okundu. Aşağıda verilen formüller ile toplam karoten ve klorofil-a miktarları tespit edildi.

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

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

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

$A_{666}$  666 nm okunan absorbans değeri

Pigmentlerin tanımlanmasında Thin Layer Chromatograph (TLC) kullanıldı (Govenia et al., 1997). TLC plakları (Silica gel 60F<sub>254</sub> Merk, Germany) 20x20 cm boyutlarında olup alüminyum kağıt üzerine yayılmış şeklindedir. Pigment standartları olarak  $\beta$ -karoten (Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)) ve astaksantin (Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)) kullanıldı.

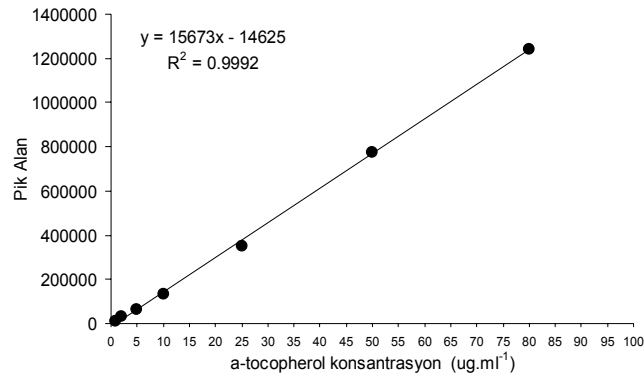
### 3.6.3. $\alpha$ -tokoferol Analizi

Vitaminler çok çabuk oksidasyona uğrayan maddeler olduğu için kurutma işleminden hemen sonra  $\alpha$ -tokoferol analizi yapıldı. Ekstraksiyon işleminde Chen et al., (1998), metodu kullanıldı. 0.5 g kurutulmuş alg örnekleri üzerine 5ml metanol ilave edildikten sonra ekstrakte işlemini hızlandırmak için 25°C de 20 dakika ultrasonik (Transonic T570/H, ELMA, Germany) banyoda tutuldu. Daha sonra metanol uçurulduktan sonra hekzan ile ekstrakte işlemine devam edildi. Toplanan organik fazdan 20  $\mu$ l HPLC'ye (JASCO model 980 (Tokyo, Japan)) enjekte edildi (Ek açıklamalar Şekil Ek B3). Otomatik enjektör (JASCO Model AS-950-10 (Tokyo, Japan)) kullanarak enjekte edildi ve floresan dedektör ( JASCO Model FP-1520 ( $\lambda_{exc} = 290$  nm ve  $\lambda_{em} = 300$  nm))'de ölçüldü. Ayırma işleminde S2-SS (10 mm x 2 mm çap, Chrompack, Walnut Creek, CA) silisli kolon ile korunan Lichrosorb Si 60-5 (250 mm x 3 mm çap, Chrompack, Walnut Creek, CA) kullanıldı. Taşıyıcı sıvı faz olarak n-hekzan:isopropanol (99.3:0.7 v/v) karışımı, 1 ml dak<sup>-1</sup> akıntı hızında olacak şekilde Gastor Model GT-104(Tokyo, Japan) sistemi ile ayarlandı. Verilerin analizinde Borwin (versiyon: 1.21) kromatografik program (JMBS Developpements, Le Fontanil, France) kullanıldı. Bütün analizler 3 tekrar olarak yapıldı.

$\alpha$ -tokoferol miktarı belirlenmesinde kalibrasyon eğrisi yapıldı. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında  $\alpha$ -tokoferol standardı (Tokoferol kit, 2h043196 908, Merck, Germany) kullanıldı. Çözgen olarak kullanılan hekzan içinde üçer tekrarlı 1  $\mu$ g. mL<sup>-1</sup> den başlayarak 2, 5, 10, 25, 50 ve 80  $\mu$ g. mL<sup>-1</sup> oranlarında  $\alpha$ -tokoferol standartları hazırlandı.

Cihazın verdiği pik değerleri ile sunulan  $\alpha$ -tokoferol arasında kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.2).

$y = 15673.1x - 14625.3$  formülü tespit edildi. Eğim 15673.1 eğim, kesim -14625.3 ve  $R^2 = 0.9992$ 'dir.



Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan  $\alpha$ -tokoferol solusyonları ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi grafiği ve denklemi

### 3.6.4. Yağ Asitleri Analizi

Yağ asitleri analizinde Christie, (1997) metodu kullanıldı. Yağ asitleri ekstraksiyon işlemi metanol ile muamele edildikten sonra 12 saat karanlıkta bekletildi. 0.5 ml asetik asit eklenerek reaksiyon durdurulduktan sonra 10 dakika 25°C de ultrason (Transonic T570/H, ELMA, Germany) banyo işlemi yapıldı. Ektrakte edilen örnek, sodyum sülfat ile filtre ve suyu uzaklaştırıldıktan sonra azot gazı ile metanol uzaklaştırıldı. Heptan (Merck, Germany) ile yağlar çözüldürüldükten

sonra, 250°C alevli iyon detektöre sahip Varian Star 3800 Cx (Walnut Creek, CA) gaz kromatografisi (GC) ile fatt asit analizi yapıldı (Ek açıklamalar Şekil Ek B4).

Ayırma işlemi 50 m uzunluğunda, 0.25 mm çapında, 0.25 µm kalınlığında film tabakası olan DB-WAX (J&W Scientific (Folsom, CA, USA)) marka polietilen glikol kapillar kolon (CP-Sil 88) ile yapıldı. Split oranı 100:1 olarak belirlendi. Kolon sıcaklığı, 180°C den 220°C ye artışı dakikada 4°C olacak şekilde 5 dakikada, 10 dakika 200°C bekletildikten sonra 25 dakika 220 °C de sabit tutulması programlandı. Enjektör sıcaklığı 40 dakika süresince 250 °C de sabit tutuldu.

Yağ asitlerinin belirlenmesinde standart olarak Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) kullanıldı. Bütün analizler 3'er tekrarlı olarak yapıldı.

### **3.6.5. İstatistik Analiz**

Veriler ilk olarak Kolmogorow-Smirnow testi ile normal dağılışa uygun olup olmadığı kontrol edildikten sonra parametrik testlerden Anova (tek yönlü varyans analizi) testi uygulandı. Gruplar arasında farklılık olup olmadığını ve farklılığın nerede olduğunu tespit edebilmek için Tukey testi uygulandı (Zar, 1999). İstatistik analizler için SPSS for Windows (ver 12.0) ve Graphpad Prism Software for Windows (ver 4.0) programları kullanıldı.

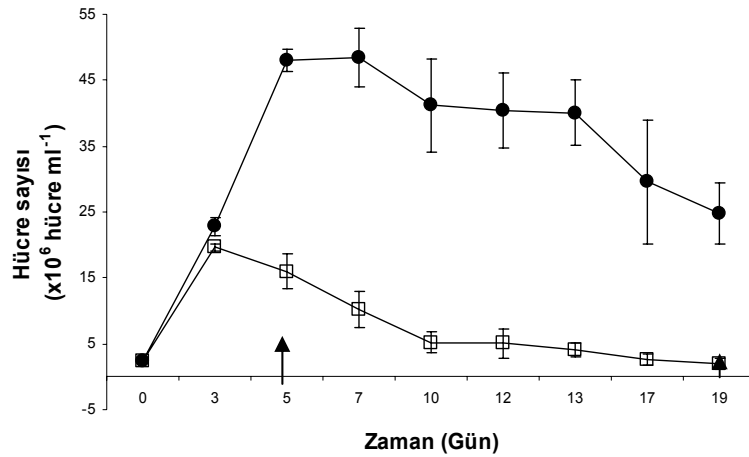


## 4. BULGULAR

### 4.1. Zamana Bağlı Hücre Sayısı Değişimleri

#### 4.1.1. $\text{NO}_3^-$ -N Denemesi

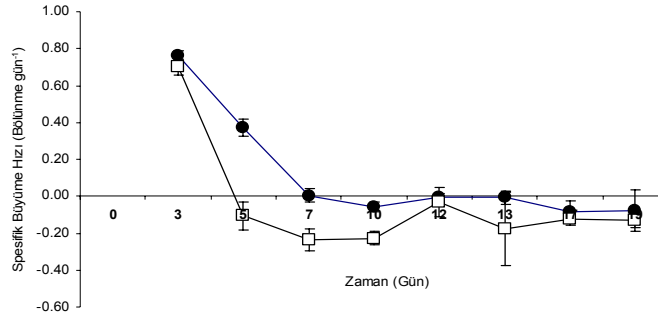
Bu denemede azot kaynağı olarak sodyum nitrat kullanıldı. İki farklı  $\text{NO}_3^-$ -N konsantrasyonunda ( $882, 441 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) gerçekleştirilen denemelerde *N. oculata* büyüme özellikleri araştırıldı. Hücre sayıları değişimine bakıldığı zaman  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ -N denemesinde 7. güne kadar artış olur iken,  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ -N denemesinde 3. günden sonra hücre sayısında azalma meydana geldi (Şekil 4.1 ).



Şekil 4.1.  $\text{NO}_3^-$ -N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler ( $882$  ve  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder) Ok işaretleri örnek alım zamanlarını belirtir.

İlk hasat, 5. günde 300 ml örnek alınarak yapıldı. 2. örnek alma işlemi ise denemenin sonu olan 19. günde kalan tüm kültür hasat edilerek örnek alındı. 1. örnek dönemi durgunluk fazı olup 2. örnek dönemi ölüm fazı olarak kabul edildi. Her iki grupta da hücre sayısındaki düşüş deneme süresi olan 19. güne kadar devam etti.  $882 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_3^- \text{-N}$  denemesinde ise 5. günden sonra kültür durgunluk fazına girdi. Daha sonra hücre sayısı kademeli olarak azalmaya başladı. İki farklı  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  konsantrasyonda hazırlanan besin ortamında maksimum hücre sayısı  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ 'lik konsantrasyonda elde edildi ( $5.30 \times 10^7$  hücre  $\text{ml}^{-1}$ ).  $441 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_3^- \text{-N}$  konsantrasyonu ile hazırlanan besin ortamında ise en yüksek  $2.02 \times 10^7$  hücre  $\text{ml}^{-1}$  kayıt edildi.

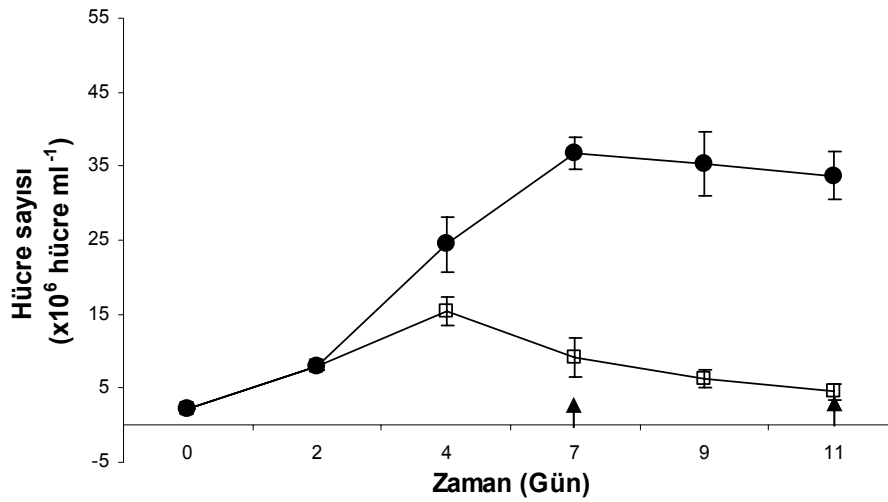
Spesifik büyüme hızları bakımından ise  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ 'lik  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  konsantrasyonda hazırlanan besin ortamında 3. günde en yüksek  $0.76 \pm 0.03$  bölünme.gün $^{-1}$ , azot sınırlamasında ise  $0.70 \pm 0.04$  bölünme.gün $^{-1}$  değerleri elde edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2.  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında spesifik büyüme hızlarında meydana gelen zamana bağlı değişimler ( $882$  ve  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder).

#### 4.1.2. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ Denemesi

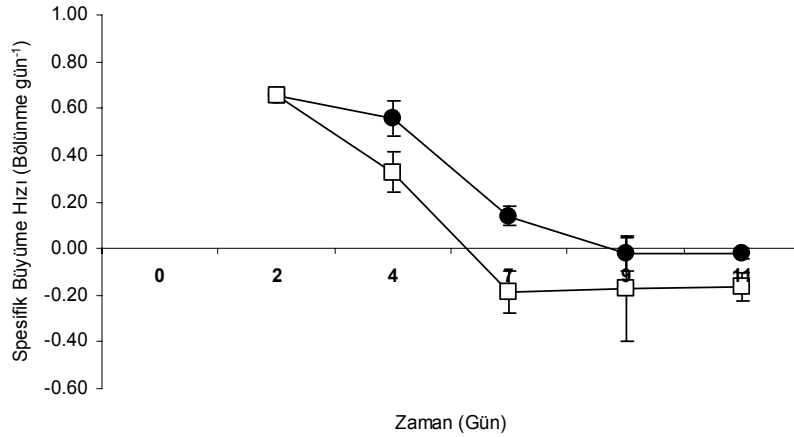
Bu denemede azot kaynağı olarak amonyum klorür kullanıldı. İki farklı  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  konsantrasyonunda ( $882, 441 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) hazırlanan besin ortamında gerçekleştirilen denemelerde *N. oculata*'nın büyüme özellikleri araştırıldı. Hücre sayıları değişimine bakıldığı zaman  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+\text{-N}$  konsantrasyonda hazırlanan besin ortamında 7. güne kadar artış olur iken  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+\text{-N}$  konsantrasyonda 4. günden sonra hücre sayısında azalma meydana geldi (Şekil 4.3 ). İlk hasat, 7. günde 300 ml örnek alınarak yapıldı. 2. örnek alım işlemi ise denemenin sonu olan 11. günde kalan tüm kültür hasat edildi. 1. örnek dönemi durgunluk



Şekil 4.3.  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler ( $882$  ve  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder) Ok işaretleri örnek alım zamanlarını belirtir.

fazı olup 2. örnek dönemi ölüm fazı olarak kabul edildi. Her iki grupta da hücre sayısındaki düşüş deneme süresi olan 11. güne kadar devam etti.  $882 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+\text{-N}$  ile hazırlanan besin ortamında ise 7. günden sonra kültür durgunluk fazına girdi. Daha sonra hücre sayısı kademeli olarak azalmaya başladı. İki farklı  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  konsantrasyonlarında maksimum hücre sayısı  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$ 'lik konsantrasyonda elde edildi ( $3.84 \times 10^7$  hücre  $\text{ml}^{-1}$ ).  $441 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+\text{-N}$  konsantrasyonundaki kültür en yüksek  $1.74 \times 10^7$  hücre  $\text{ml}^{-1}$  hücre sayısı tespit edildi.

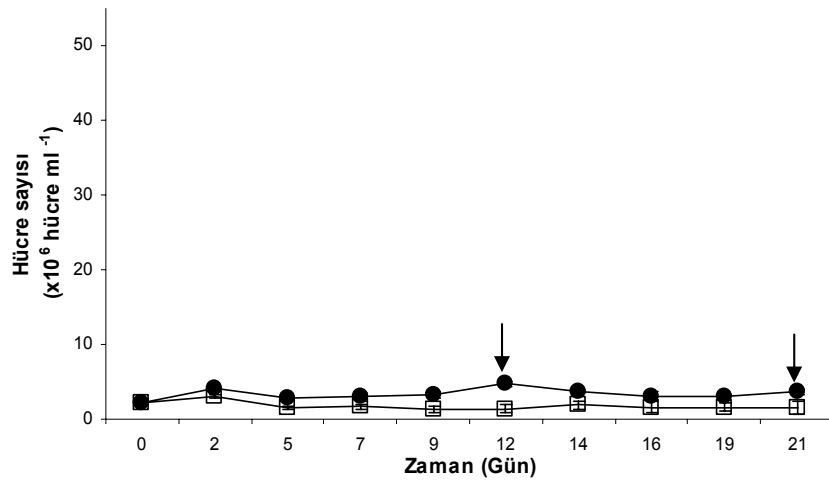
Spesifik büyüme hızları bakımından ise 2. günde her iki konsantrasyonda da aynı değer kayıt edildi ( $0.66 \pm 0.03$  bölünme.gün $^{-1}$ ). 4. günde  $882 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+\text{-N}$  spesifik büyüme hızı  $0.56 \pm 0.07$  bölünme.gün $^{-1}$  değerine düşerken azot sınırlamasında ise yaklaşık %50 oranında azalma kayıt edildi ( $0.32 \pm 0.09$  bölünme.gün $^{-1}$ ).



Şekil 4.4.  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler ( $882$  ve  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder).

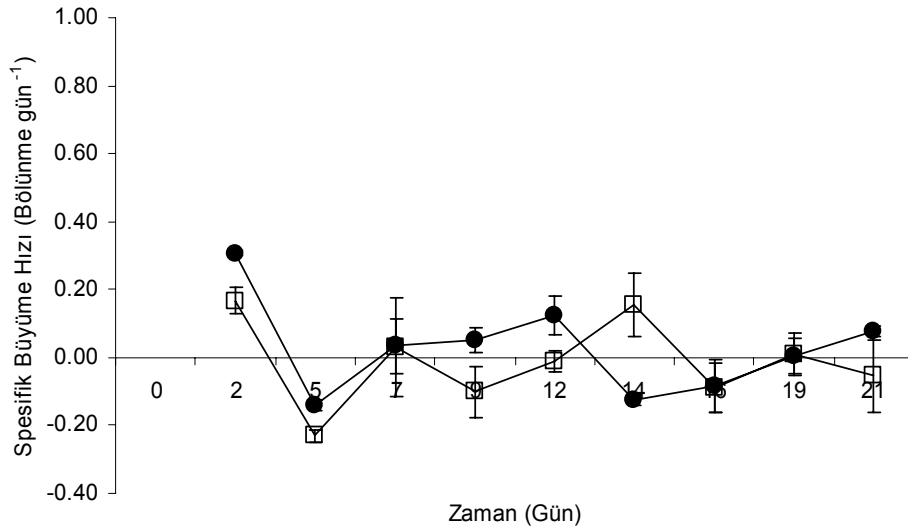
### 4.1.3 Üre-N Denemesi

Bu denemede azot kaynağı olarak üre kullanıldı. İki farklı üre-N konsantrasyonunda (882, 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) gerçekleştirilen denemelerde *N. oculata* büyüme özellikleri araştırıldı. Maksimum hücre sayıları 882 ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonlarda sırasıyla 5.04 ve 3.32  $\times 10^6$  hücre  $\text{ml}^{-1}$  tespit edildi. 21 gün devam eden denemeler boyunca hücre sayısı artış ve azalışlar şeklinde devam ettiği görüldü (Şekil 4.5 ).



Şekil 4.5. Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (882 ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder) Ok işaretleri örnek alım zamanlarını belirtir.

İlk hasat, 12. günde 300 ml örnek alınarak yapıldı. 2. örnek alım işlemi ise denemenin sonu olan 21. günde kalan tüm kültür hasat edildi. 1. örnek dönemi durgunluk fazı, 2. örnek dönemi ölüm fazı olduğu kabul edildi. Spesifik büyüme hızları bakımından ise en çok bölünme 2. günde 882 ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  üre-N konsantrasyonlarında hazırlanan besin ortamlarında sırasıyla  $0.31\pm 0.009$  ve  $0.17\pm 0.04$  bölünme  $\text{gün}^{-1}$  değerler kayıt edildi. Daha sonra spesifik büyüme hızlarında bir düşüş kayıt edildi. 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  üre-N konsantrasyonunun hücre sayısı ve spesifik büyüme hızı azot sınırlamasına göre daha yüksek oldu.

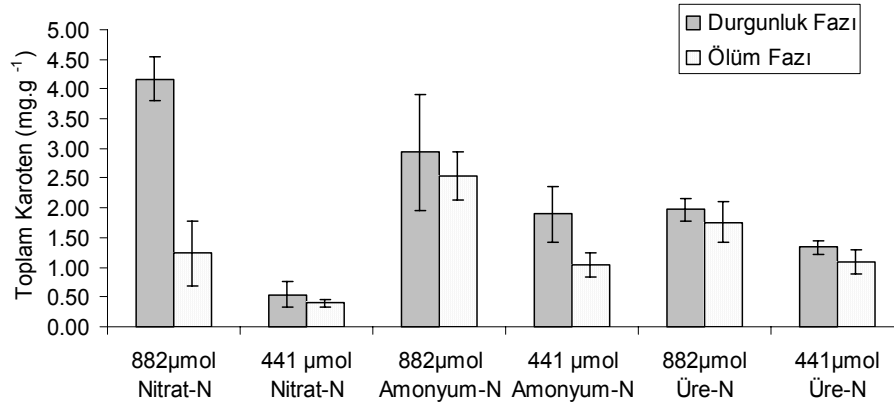


Şekil 4.6. Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamında hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler (882 ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  oranları sırasıyla içi dolu daire ve içi boş kare temsil eder).

## 4.2. Büyüme Fazlarına, Azot Bileşikleri Ve Konsantrasyonlarına Bağlı Toplam Karoten ve Klorofil-A Değişimleri

### 4.2.1. Toplam Karoten

Durgunluk ve ölüm fazlarından alınan kültür örneklerinde toplam karoten miktarları tespit edildi. Çıkan sonuçlar biyolojik kütledeki toplam karoten miktarlarını temsil etmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7.  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882  $\mu\text{mol}$  ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki toplam karoten değerleri.

En yüksek toplam karoten miktarı  $\text{NO}_3^-$ -N  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda kullanılan besin ortamında durgunluk fazında alınan örneklerde elde edildi ( $4.17 \pm 0.37 \text{ mg g}^{-1}$ ). Aynı denemede 2. örnek dönemi olan ölüm fazında toplam karoten miktarında istatistiki önemde azalış oldu ( $P < 0.05$ ). En düşük toplam karoten miktarı  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NO}_3^-$ -N kullanılan besin ortamında kayıt edildi ( $0.26 \pm 0.02 \text{ mg g}^{-1}$ ).

$882 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ -N kullanılan besin ortamındaki değerlere göre azot kaynağı olarak üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamlarında toplam karoten miktarlarında istatistiki önemde azalış tespit edildi ( $P < 0.05$ ).  $\text{NH}_4^+$ -N ve üre-N ile hazırlanan besin ortamları kendi aralarında istatistiki bir değişim olmadı ( $P > 0.05$ ). En yüksek değer, üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamında  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyondaki durgunluk fazında ( $1.97 \pm 0.20 \text{ mg g}^{-1}$ ), en düşük değer,  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyondaki ölüm fazında ( $1.97 \pm 0.19 \text{ mg g}^{-1}$ ) elde edildi.

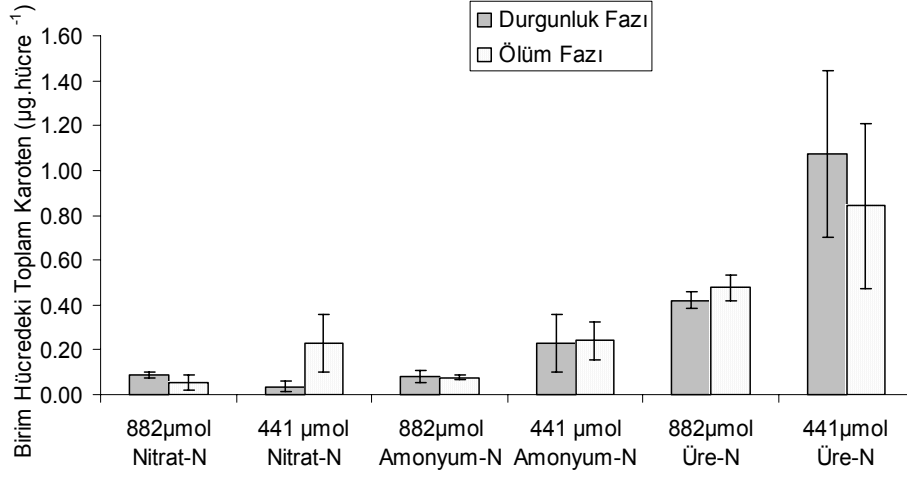
$441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonlarında  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamlarında durgunluk ve ölüm fazlarında azot sınırlamasının olduğu kültürde toplam karoten miktarında azalış oldu ( $P > 0.05$ ).  $882$  ve  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonlar arasında istatistiki önemde farklılık kayıt edildi ( $P < 0.05$ ). En yüksek değer  $\text{NH}_4^+$ -N kullanılarak hazırlanan besin ortamında  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyondaki durgunluk fazında ( $2.93 \pm 0.98 \text{ mg g}^{-1}$ ), en düşük değer  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyondaki ölüm fazında ( $1.04 \pm 0.20 \text{ mg g}^{-1}$ ) elde edildi.



Üre-N ile hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamlarında yapılan kültürlerdeki toplam karoten sonuçları arasında istatistiki önemde bir değişiklik olmadığı tespit edildi ( $P>0.05$ ).

Bütün deneme gruplarında biyomastaki toplam karoten miktarının yanısıra hücre başına düşen karoten miktarlarda hesaplandı (Şekil 4.8 ). Hem  $\text{NO}_3^-$ -N ile hazırlanan besin ortamlarında hem de  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamlarının bütün gruplarında ( $882$  ve  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) kendi içinde ve birbirleri arasında istatistiki fark olmadığı tespit edildi ( $P>0.05$ ). Üre-N kullanılan besin ortamında hücre başına düşen toplam karoten miktarları istatistiki önemde yüksek değerler kayıt edildi ( $P<0.05$ ). En yüksek hücre başına düşen toplam karoten miktarı üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamının azot sınırlamasının olduğu grupta  $1.07\pm 0.37 \mu\text{g hücre}^{-1}$  olur iken, en düşük hücre başına düşen toplam karoten değeri ise  $\text{NO}_3^-$ -N kullanılan besin ortamının azot sınırlamasının yapıldığı grupta tespit edildi ( $0.04\pm 0.02 \mu\text{g hücre}^{-1}$ ).

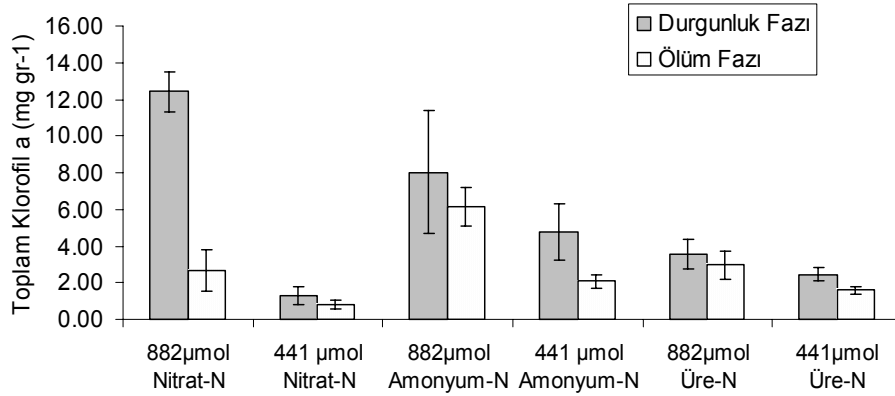
$\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan her iki konsantrasyondaki besin ortamlarında durgunluk fazında hücre başına  $0.08 \text{ mg g}^{-1}$  olan toplam karoten miktarı, ölüm fazında yaklaşık olarak 3 kat arttığı tespit edildi.



Şekil 4.8.  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882  $\mu\text{mol}$  ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki birim hücredeki toplam karoten değerleri.

#### 4.2.2. Klorofil-a

Durgunluk fazında ve ölüm fazında alınan kurutulmuş örneklerde klorofil-a miktarları tespit edildi. Sonuçlar, biyomastaki klorofil-a miktarlarını temsil etmektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9.  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki klorofil-a değerleri.

En yüksek klorofil-a miktarı  $\text{NO}_3^-$ -N 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda kullanılan besin ortamında durgunluk fazında alınan örneklerde elde edildi ( $12.42 \pm 1.08 \text{ mg g}^{-1}$ ). Ölüm fazında toplam karoten miktarında istatistiki önemde azalış oldu ( $P < 0.05$ ). En düşük klorofil-a miktarı 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ -N kullanılan besin ortamında kayıt edildi ( $0.82 \pm 0.21 \text{ mg g}^{-1}$ ).

882  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ -N kullanılan besin ortamındaki değerlere göre azot kaynağı olarak üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamlarında klorofil-a miktarlarında istatistiki önemde azalış tespit edildi ( $P < 0.05$ ).  $\text{NH}_4^+$ -N ve üre-N ile hazırlanan besin ortamları arasında klorofil-a miktarlarında istatistiki önemde bir değişim olmadı ( $P > 0.05$ ). 882 ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonlarında, 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamlarında durgunluk fazında klorofil-a miktarında azalma

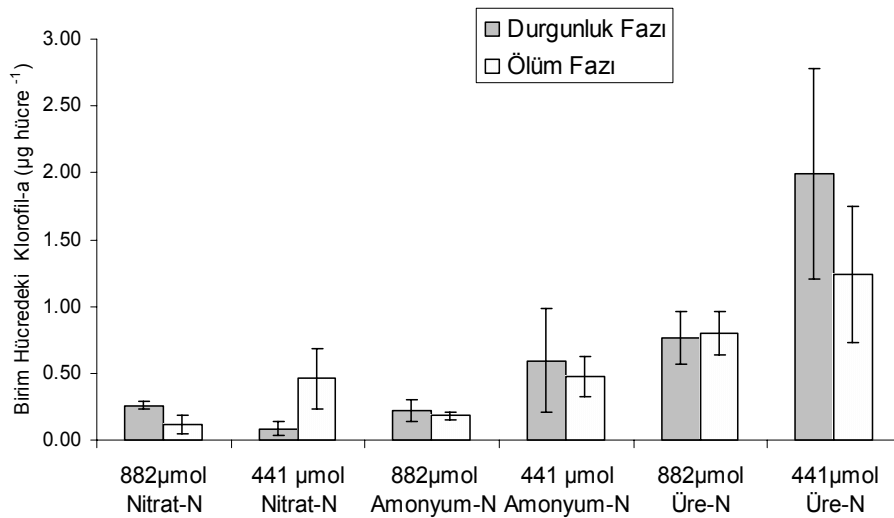
gözlendi ( $P>0.05$ ). Durgunluk ve ölüm fazları arasında istatistiki önemde farklılık tesbit edildi ( $P<0.05$ ). Bununla birlikte üre-N ile hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki besin ortamlarında yapılan kültürlerdeki toplam karoten sonuçları arasında istatistiki önemde farklılık olmadığı tespit edildi ( $P>0.05$ ).

En yüksek klorofil-a değeri,  $\text{NH}_4^+$ -N kullanılarak hazırlanan besin ortamında  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyondaki durgunluk fazında ( $8.04 \pm 3.32 \text{ mg g}^{-1}$ ), en düşük klorofil-a değeri  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyondaki ölüm fazında ( $2.06 \pm 0.36 \text{ mg g}^{-1}$ ) tespit edilen değer 4 kat daha düşüktür.

En yüksek klorofil-a değeri üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamında  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyondaki durgunluk fazında ( $3.56 \pm 0.84 \text{ mg g}^{-1}$ ), en düşük klorofil-a değeri  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyondaki ölüm fazında ( $1.61 \pm 0.20 \text{ mg g}^{-1}$ ) tespit edilen değer 2 kat daha düşüktür.

Bütün deneme gruplarında biyomastaki klorofil-a miktarının yanısıra hücre başına düşen klorofil-a miktarları da hesaplandı (Şekil 4.10). Hem  $\text{NO}_3^-$ -N ile hazırlanan besin ortamlarında hem de  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamlarında ( $882$  ve  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) kendi içinde ve birbirleri arasında istatistiki fark olmadığı tespit edildi ( $P>0.05$ ). Fakat üre-N kullanılan besin ortamı diğer azot kaynaklarına göre hücre başına düşen toplam karoten miktarları bakımından istatistiki önemde yüksek değerler kayıt edildi ( $P<0.05$ ). En yüksek değerde hücre başına düşen klorofil-a miktarı  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamının  $1.99 \pm 0.79 \text{ mg g}^{-1}$  hücre, en düşük hücre başına düşen klorofil-a değeri ise  $\text{NO}_3^-$ -N kullanılan besin ortamının azot sınırlamasının yapıldığı grupta tespit edildi ( $0.18 \pm 0.03 \text{ mg g}^{-1}$  hücre).

$\text{NH}_4^+\text{-N}$  ile hazırlanan besin ortamlarının durgunluk fazında hücre başına düşen klorofil-a değeri  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $0.22 \pm 0.08 \text{ mg g}^{-1}$  iken, ölüm fazında  $0.18 \pm 0.03 \text{ mg g}^{-1}$  değere düşmüştür ( $P > 0.05$ ). Üre-N kullanılan besin ortamında ise  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda klorofil-a miktarı durgunluk fazında  $0.76 \pm 0.03 \text{ mg g}^{-1}$ 'dan  $0.80 \pm 0.16 \text{ mg g}^{-1}$  değere yükselmiştir.  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ile hazırlanan besin ortamında azot sınırlamasının yapıldığı  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda hücre başına düşen klorofil-a miktarı durgunluk fazında  $0.09 \pm 0.05 \text{ mg g}^{-1}$ 'dan  $0.46 \pm 0.22 \text{ mg g}^{-1}$  yükselmiştir ( $P > 0.05$ ).



Şekil 4.10.  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki ( $882 \mu\text{mol}$  ve  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki birim hücredeki klorofil-a değerleri.

#### 4.2.2. TLC Analizi

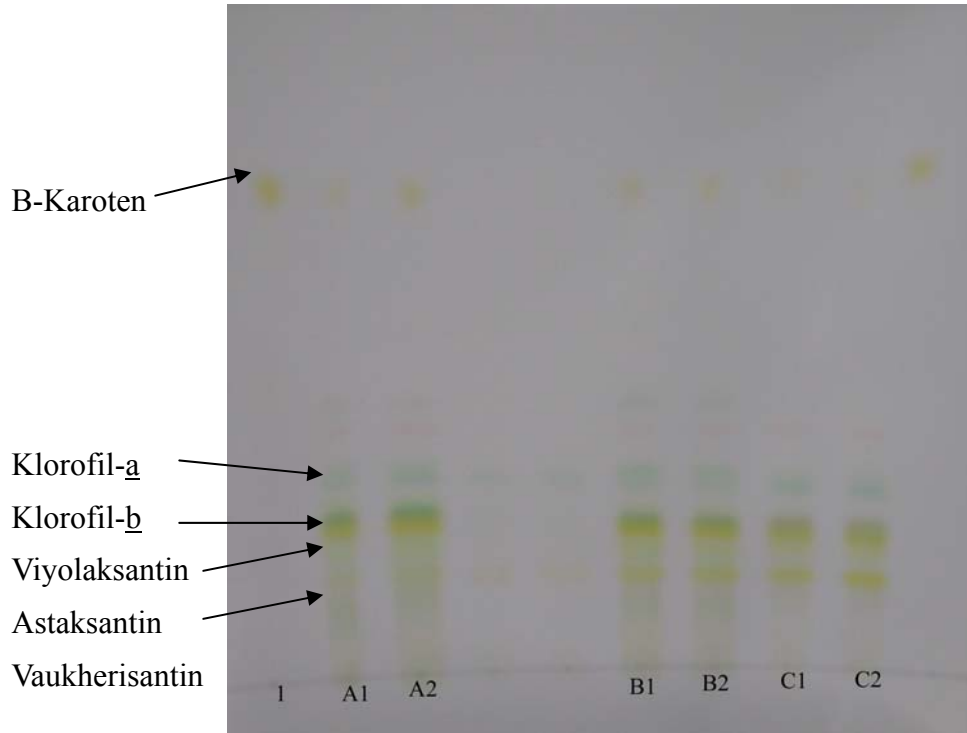
Durgunluk fazında ve ölüm fazında alınan kültür örneklerinde freeze-dry yöntemi ile kurutuldu. Pigment türlerini tespit etmek için TLC analizi yapıldı. TLC plakalarında *N. oculata* farklı azot kaynaklarında ve farklı konsantrasyonlardaki örneklerin pigment kompozisyonları çıkarıldı. Pigment tespitlerinde renk ve Rf oranları temel alındı (Çizelge 4.4). Rf oranları pigment türlerinin TLC plaka üzerinde taşındığı mesafenin yüzde değerlerinin hesaplanması sonucunda elde edilmektedir.

Çizelge 4.1. Farklı azot kaynaklarında ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan besin ortamlarında *N. oculata* türünün pigment kompozisyonunun taşınım zamanları ve pigmentlerin renkleri.

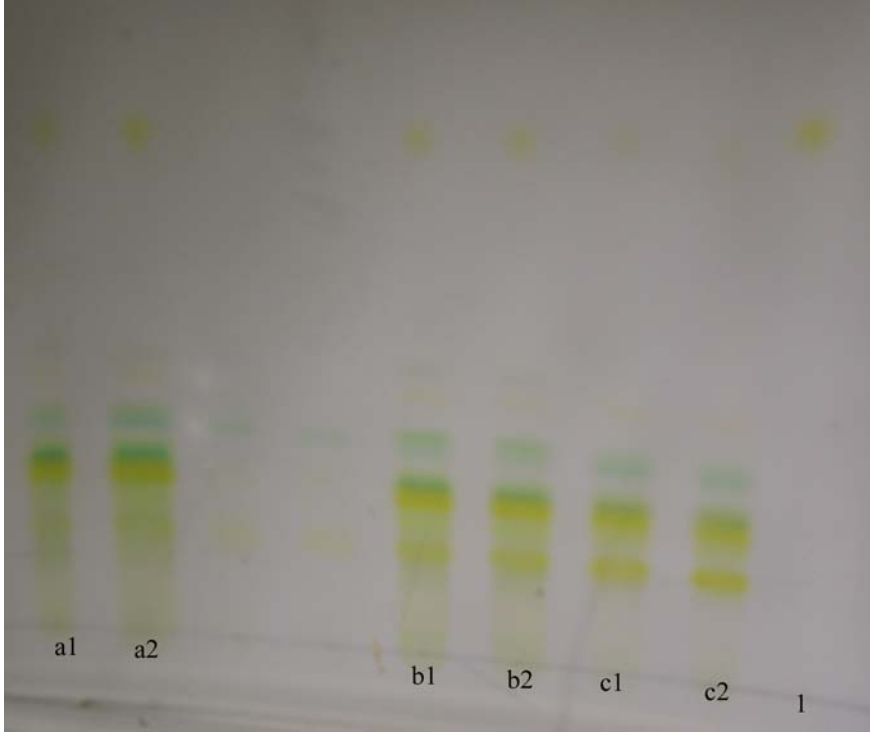
	Rf	renk
B-Karoten	0.93-0.95	sarı-turuncu
Klorofil-a	0.63	mavi-yeşil
Klorofil-b	0.59	sarı-yeşil
Violaksantin	0.54	sarı
Kantaksantin	0.36	sarı
Zeaksantin	0.39-0.42	sarı-turuncu
Astaksantin	0.40	turuncu
Vaucheriaksantin	0.54	sarı

HPCL ile yapılan pigment miktarlarının tespitinde öncelikle TLC analizi yapmak esastır. Bu nedenle öncelikle TLC analizi yapılır ve kullanılan ekstrakte etme metodunun çalışıp çalışmadığına bakılır. Ayrıca TLC analizinde *N. oculata*'nın ekstraksiyon metodunun ve kullanılan

çözgen maddenin başarılı olduğu tespit edildi. *N. oculata*'nın farklı azot kaynaklarında ve konsantrasyonlarda yapılan kültürlerinde, kültür fazına, azot kaynağına ve sınırmasına bağlı olarak tüm deney gruplarında temel olan pigment sınıfları aynı idi (Şekil 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.11.  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamlarında *N. oculata*'nın TLC analizi ile belirlenen pigment kompozisyonu (1,  $\beta$ -karoten; A1,  $\text{NO}_3^-$ -N denemesinde durgunluk faz; A2,  $\text{NO}_3^-$ -N denemesinde ölüm faz; B1,  $\text{NH}_4^+$ -N denemesinde durgunluk faz; B2,  $\text{NH}_4^+$ -N denemesinde ölüm faz; C1, üre-N denemesinde durgunluk faz; C2, üre-N denemesinde ölüm faz).

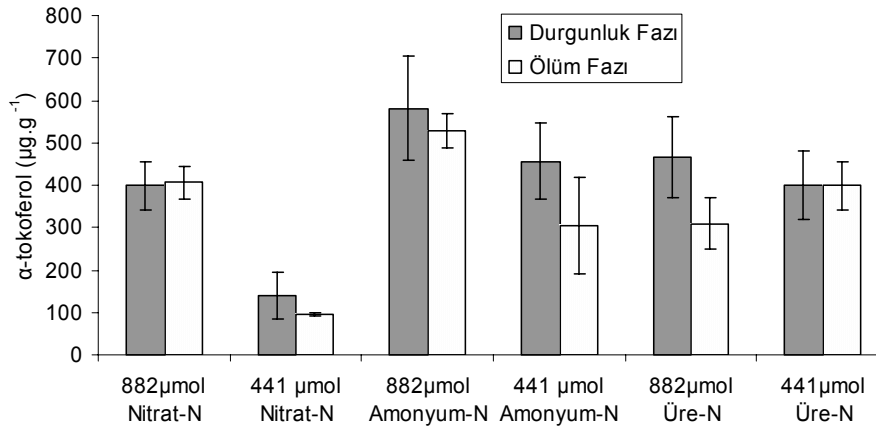


Şekil 4.12.  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamlarında *N. oculata*'nın TLC analizi ile belirlenen pigment kompozisyonu (1,  $\beta$ -karoten; a1,  $\text{NO}_3^-$ -N denimesinde durgunluk faz; a2,  $\text{NO}_3^-$ -N denimesinde ölüm faz; b1,  $\text{NH}_4^+$ -N denimesinde durgunluk faz; b2,  $\text{NH}_4^+$ -N denimesinde ölüm faz; c1, üre-N denimesinde durgunluk faz; c2, üre-N denimesinde ölüm faz).



### 4.3. Büyüme Fazları ile Farklı Azot Kaynakları Konsantrasyonlarına Bağlı $\alpha$ -Tokoferol Değişimleri

Durgunluk fazında ve ölüm fazında kültürlerden alınan örnekler freeze-dry yöntemi ile kurutuldu ve  $\alpha$ -tokoferol miktarları HPCL cihazı ile tespit edildi. Sonuçlar, dondurularak kurutulmuş örneklerdeki  $\alpha$ -tokoferol miktarlarını temsil etmektedir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13.  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882  $\mu\text{mol}$  ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki  $\alpha$ -tokoferol değerleri

En yüksek  $\alpha$ -tokoferol değeri 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamında durgunluk fazında  $581.43 \pm 123.73 \mu\text{g.g}^{-1}$  tespit edilirken, ölüm fazında ( $529.57 \pm 40.71 \mu\text{g.g}^{-1}$ )  $\alpha$ -tokoferol

değerinde istatistiki önemde olmayan bir azalma tespit edildi ( $P>0.05$ ). 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ile hazırlanan besin ortamında ise durgunluk fazında  $\alpha$ -tokoferol değeri  $456.79\pm 91.11 \mu\text{g.g}^{-1}$  iken, ölüm fazında  $304.40\pm 112.45 \mu\text{g.g}^{-1}$  olduğu tespit edildi ( $P>0.05$ ).

882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ile hazırlanan besin ortamında  $\alpha$ -tokoferol değerleri  $398.55\pm 58.05 \mu\text{g.g}^{-1}$  (durgunluk fazı) ve  $405.51\pm 39.58 \mu\text{g.g}^{-1}$  (ölüm fazı) olarak tespit edildi. 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda hazırlanan besin ortamında ise durgunluk ve ölüm fazlarında  $\alpha$ -tokoferol değerlerinde ( $139.33\pm 56.37 \mu\text{g.g}^{-1}$  ve  $94.54\pm 3.25 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) istatistiki önemlilikte bir azalma tespit edildi ( $P<0.05$ ).

882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{üre-N}$  ile hazırlanan besin ortamında  $\alpha$ -tokoferol değeri durgunluk fazında  $465.23\pm 94.73 \mu\text{g.g}^{-1}$  iken ölüm fazında  $310.01\pm 58.89 \mu\text{g.g}^{-1}$  olarak tespit edildi ( $P>0.05$ ). 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda hazırlanan besin ortamında  $\alpha$ -tokoferol değerlerinde durgunluk ve ölüm fazlarında istatistiki önemde farklılık olmadı (sırasıyla,  $399.85\pm 80.15 \mu\text{g.g}^{-1}$  ve  $398.55\pm 58.05 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) ( $p>0.05$ ).

Üre-N ile hazırlanan besin ortamlarında (882 ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) kendi içindeki gruplar arasında ve  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  kullanılan besin ortamındaki  $\alpha$ -tokoferol değerlerinde istatistiki fark olmadığı tespit edildi ( $P>0.05$ ).

#### 4.4. Büyüme Fazları İle Azot Kaynakları Konsantrasyonlarına Bağlı Yağ Asitleri Değişimleri

##### 4.4.1 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N Denemesi

Bu deneme de azot kaynağı olarak NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N kullanıldı. İki farklı NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N konsantrasyonunda (882, 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) gerçekleştirilen denemelerde iki farklı büyüme fazlarında (durgunluk fazı ve ölüm fazı) büyüme özellikleri araştırıldı. Durgunluk fazında ve ölüm fazında alınan örnekler kurutulduktan sonra yağ asitleri miktarları tespit edildi. Örneklerde yapılan yağ asitleri analizlerinde %98-99 oranında standartlar doğrultusunda yağ asitleri tanımlaması yapıldı.

Farklı büyüme fazlarında ve farklı konsantrasyonlardaki *N. oculata*'nın yağ asitleri kompozisyonu çizelge 4.2'de gösterildi. Büyüme fazlarında ve konsantrasyonlarda farklılık tespit edildi. Azot sınırlaması yapıldığı zaman toplam PUFA değerlerinde istatistikî önemde azalış oldu ( $P < 0.05$ ). En yüksek toplam PUFA değeri 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N kullanarak hazırlanan besin ortamının durgunluk fazında (%24.72 $\pm$ 5.00) elde edildi. Ölüm fazında toplam PUFA değerinde bir azalma tespit edildi (%9.60 $\pm$ 1.36). NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N'nun 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda toplam PUFA değeri durgunluk fazına (%8.00 $\pm$ 1.24) göre ölüm fazında azalma olduğu görüldü (%6.49 $\pm$ 0.88). NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N ile hazırlanan besin ortamında EPA, PUFA grubu yağ asitleri içersinde baskın yağ asidi oldu. En yüksek EPA seviyesi 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında (%16.74 $\pm$ 3.42) tespit edildi.

Çizelge 4.2  $\text{NO}_3^-$ -N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki yağ asitleri değişimleri.

Yağ Asitleri	882 $\mu\text{mol NO}_3^-$ -N		441 $\mu\text{mol NO}_3^-$ -N	
	Durgunluk Fazı	Ölüm Fazı	Durgunluk Fazı	Ölüm Fazı
<b>14:0</b>	5.16 ± 1.28	4.43 ± 1.02	5.51 ± 0.78	4.77 ± 0.37
<b>16:0</b>	29.65 ± 4.05	36.31 ± 1.32	39.01 ± 1.59	37.63 ± 0.59
<b>20:0</b>	1.90 ± 0.37	0.18 ± 0.25	0.35 ± 0.07	0.02 ± 0.03
<b>Diğer <math>\Sigma</math>SAT</b>	1.74 ± 0.04	1.43 ± 0.05	1.53 ± 0.08	1.45 ± 0.11
<b><math>\Sigma</math>SAT</b>	38.46 ± 5.00	42.34 ± 0.77	46.40 ± 2.22	43.81 ± 0.82
<b>16:1<math>\omega</math>7</b>	24.29 ± 2.09	27.66 ± 2.93	30.36 ± 0.33	30.28 ± 1.12
<b>18:1<math>\omega</math>9-c</b>	10.37 ± 1.27	17.90 ± 1.28	14.37 ± 1.21	17.58 ± 0.70
<b>Diğer <math>\Sigma</math>MUFA</b>	1.11 ± 0.49	0.81 ± 0.16	0.65 ± 0.11	0.59 ± 0.15
<b><math>\Sigma</math>MUFA</b>	35.78 ± 1.27	46.21 ± 2.34	45.38 ± 0.98	48.57 ± 0.46
<b>18:2<math>\omega</math>6</b>	3.31 ± 0.43	1.81 ± 0.35	1.61 ± 0.26	1.01 ± 0.89
<b>18:3<math>\omega</math>6</b>	0.75 ± 0.15	0.14 ± 0.02	0.06 ± 0.06	0.02 ± 0.03
<b>20:4<math>\omega</math>6</b>	2.94 ± 0.68	0.89 ± 0.66	0.93 ± 0.13	0.79 ± 0.07
<b>20:5<math>\omega</math>3</b>	16.74 ± 3.42	5.80 ± 0.66	4.49 ± 0.73	3.76 ± 0.17
<b>22:6<math>\omega</math>3</b>	0.44 ± 0.39	0.29 ± 0.07	0.12 ± 0.20	0.10 ± 0.17
<b>Diğer <math>\Sigma</math>PUFA</b>	0.54 ± 0.12	0.56 ± 0.13	0.78 ± 0.32	0.71 ± 0.36
<b><math>\Sigma</math>PUFA</b>	24.72 ± 5.00	9.60 ± 1.36	8.00 ± 1.24	6.49 ± 0.88
<b>Tanımlanan</b>	98.96 ± 0.54	98.15 ± 0.83	99.77 ± 0.10	98.87 ± 1.56
<b><math>\Sigma\omega</math>-3</b>	17.46 ± 3.78	6.55 ± 0.77	5.30 ± 0.89	4.62 ± 0.09
<b><math>\Sigma\omega</math>-6</b>	7.25 ± 1.23	3.05 ± 1.04	2.70 ± 0.36	1.87 ± 0.83

Not:

- $\Sigma$ SAT: Doymuş Yağ Asitleri
- $\Sigma$ MUFA: Tek Doymamış Yağ Asitleri
- $\Sigma$ PUFA: Çok Doymamış Yağ Asitleri

a)  $\Sigma$ Diğer SAT: 12:0, 13:0, 14:0 isobr, 15:0, 16:0 iso, 16:0 anteiso, Phytanic Acid, 18:0, ve 22:0.

b) Diğer  $\Sigma$ MUFA: 17:1, 18:1 $\omega$ 7, 18:1 $\omega$ 9, 20:1 $\omega$ 9, 20:1 $\omega$ 7, 22:1 $\omega$ 11 ve 22:1 $\omega$ 9.

c) Diğer  $\Sigma$ PUFA: 16:4 $\omega$ 3, , 18:3 $\omega$ 3, 18:4 $\omega$ 3, 20:4 $\omega$ 3, 22:5 $\omega$ 6 ve 22:5 $\omega$ 3.

882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonun ölüm fazında ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonun büyüme fazında EPA değerinde yaklaşık %65 ile %77 arasında bir azalma meydana geldi ( $P<0.05$ ). Ayrıca PUFA grubu yağ asitleri içerisinde en yüksek LA, GLA, ARA ve DHA yağ asitlerinin seviyeleri, 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında tespit edildi (sırasıyla,  $3.31\pm 0.43$ ,  $0.75\pm 0.15$ ,  $2.94\pm 0.68$  ve  $0.44\pm 0.39$ ). Fakat 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonun ölüm fazında ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonun büyüme fazlarındaki değerinde istatistiki önemde bir azalma meydana geldi ( $P<0.05$ ). 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazındaki yağ asitleri değerleri ile  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ile hazırlanan besin ortamındaki PUFA grubu yağ asitleri değerleri arasında istatistiki önemde fark görülmedi ( $P>0.05$ ). Fakat üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamındaki büyüme fazlarında PUFA grubu yağ asitleri değerlerinde önemli oranda bir azalma kayıt edildi ( $P<0.05$ ).

PUFA grubu yağ asitlerinin tam tersine toplam doymuş yağ asitleri (TSAT) ve toplam tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) gruplarında en yüksek değerler azot sınırlamasının yapıldığı kültürlerde elde edildi (TSAT  $46.40\pm 2.22$ , MUFA  $48.57\pm 0.46$ ).

882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda TSAT değerleri %38'den (durgunluk fazı) %42'ye yükselirken, 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda %46'dan (durgunluk fazı) %43'e (ölüm fazında) düştüğü tespit edildi. TSAT grubu içinde en baskın yağ asidi 16:0 oldu ve en yüksek değeri olan %39, 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında kayıt edildi. 2. baskın grup olarak ise 14:0 tespit edildi. 14:0 değerleri 16:0'ın tersine her iki konsantrasyonda da durgunluk fazlarında %5 değerleri, ölüm fazında %4 değerine düştü ( $P>0.05$ ).

MUFA grubu yağ asitlerinde baskın yağ asidi %30'luk değer ile 16:1ω7 olur iken, 18:1ω9-c yağ asidi 2. baskın grup oldu. 16:1ω7, 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda %24'den (durgunluk fazı) %27'ye (ölüm fazı) yükselirken ( $P>0.05$ ), 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda en yüksek değerler kayıt edildi (durgunluk ve ölüm fazlarında, %30).

#### 4.4.2 $\text{NH}_4^+$ -N Denemesi

Durgunluk fazında ve ölüm fazında alınan kurutulmuş örneklerin yağ asitleri miktarları tespit edildi. Örneklerde yapılan yağ asitleri analizlerinde %95-99 oranında yağ asitleri tanımlaması yapıldı.

Farklı büyüme fazlarında ve farklı konsantrasyonlardaki *N. oculata*'nın yağ asitleri kompozisyonu çizelge 4.3'de gösterildi. Büyüme fazlarında ve konsantrasyonlarda farklılık tespit edildi. Azot sınırlaması yapıldığı zaman toplam PUFA değerlerinde istatistiksel önemde azalış oldu ( $P<0.05$ ). 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında en yüksek toplam PUFA değeri %21.06±2.91 kayıt edildi. Fakat ölüm fazında %12.20±0.88 değere düşmüştür.  $\text{NH}_4^+$ -N'unun 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda toplam PUFA değeri durgunluk fazına (%10.11±1.73) göre ölüm fazında daha yüksek kayıt edildi (11.43±0.38).

$\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamında EPA, PUFA grubu yağ asitleri içersinde baskın yağ asidi oldu. EPA, 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında %14.23±0.23 ile en yüksek değerde tespit edildi. 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda ölüm fazında (%7.66±0.85) ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk (%6.71±1.27) ve ölüm

fazlarında (%7.33±0.33) EPA değerlerinde istatistiki önemde farklılık tespit edildi (P<0.05).

PUFA grubu yağ asitleri içersinde LA, GLA ve ARA yağ asitleri en yüksek seviyeleri 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında (sırasıyla, %2.79±0.26, %0.64±0.17 %2.64±0.29), DHA ise ölüm fazında (%0.23±0.03) tespit edildi. 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  kullanılarak hazırlanan besin ortamlarındaki *N. oculata* kültürlerinde durgunluk fazındaki yağ asitleri değerleri, aynı konsantrasyonda kullanılan  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ve üre-N denemelerindeki durgunluk fazları arasında istatistiki önemde farklılık tespit edildi (P<0.05). Fakat 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda ölüm fazlarında ve azot sınırlamasını olduğu her iki büyüme fazlarındaki sonuçlar arasında istatistiki önemde bir değişiklik görülmedi (P>0.05).

Azot sınırlaması ile *N. oculata* yağ asitlerinde oksidasyona sebep olduğu için, TSAT ve MUFA gruplarında en yüksek değerler azot sınırlamasının yapıldığı kültürlerde elde edildi (TSAT %45.06±1.82, MUFA %45.50±0.72).

Çizelge 4.3.  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki yağ asitleri değişimleri.

Yağ Asitleri	882 $\mu\text{mol NH}_4\text{-N}$		441 $\mu\text{mol NH}_4\text{-N}$	
	Durgunluk Fazı	Ölüm Fazı	Durgunluk Fazı	Ölüm Fazı
<b>14:0</b>	5.41 ± 0.44	4.21 ± 0.63	5.06 ± 0.53	3.83 ± 0.77
<b>16:0</b>	30.15 ± 2.77	33.89 ± 0.78	39.04 ± 1.76	36.42 ± 0.25
<b>20:0</b>	1.60 ± 0.35	0.02 ± 0.00	0.16 ± 0.20	0.39 ± 0.02
<b>Diğer <math>\Sigma\text{SAT}</math></b>	1.25 ± 0.37	0.44 ± 0.04	0.82 ± 0.60	0.47 ± 0.12
<b><math>\Sigma\text{SAT}</math></b>	38.41 ± 2.53	38.56 ± 1.33	45.08 ± 1.82	41.11 ± 1.07
<b>16:1<math>\omega</math>7</b>	27.16 ± 1.21	27.96 ± 1.16	29.04 ± 0.48	27.22 ± 0.32
<b>18:1<math>\omega</math>9-c</b>	12.66 ± 0.46	16.46 ± 0.99	13.05 ± 0.90	17.79 ± 0.24
<b>Diğer <math>\Sigma\text{MUFA}</math></b>	0.49 ± 0.38	0.56 ± 0.12	0.31 ± 0.18	0.49 ± 0.24
<b><math>\Sigma\text{MUFA}</math></b>	40.31 ± 1.98	44.98 ± 0.40	42.40 ± 0.61	45.50 ± 0.72
<b>18:2<math>\omega</math>6</b>	2.79 ± 0.26	1.90 ± 0.07	1.40 ± 0.15	1.55 ± 0.06
<b>18:3<math>\omega</math>6</b>	0.64 ± 0.17	0.03 ± 0.03	0.13 ± 0.10	0.16 ± 0.00
<b>20:4<math>\omega</math>6</b>	2.64 ± 0.29	1.55 ± 0.28	1.35 ± 0.23	1.49 ± 0.09
<b>20:5<math>\omega</math>3</b>	14.23 ± 1.97	7.66 ± 0.85	6.71 ± 1.27	7.33 ± 0.33
<b>22:6<math>\omega</math>3</b>	0.09 ± 0.15	0.23 ± 0.03	0.09 ± 0.08	0.15 ± 0.15
<b>Diğer <math>\Sigma\text{PUFA}</math></b>	0.68 ± 0.21	0.83 ± 0.22	0.43 ± 0.21	0.77 ± 0.3
<b><math>\Sigma\text{PUFA}</math></b>	21.06 ± 2.91	12.20 ± 0.88	10.11 ± 1.73	11.43 ± 0.38
<b>Tanımlanan</b>	99.78 ± 2.05	95.74 ± 0.43	97.59 ± 0.86	98.04 ± 0.41
<b><math>\Sigma\omega\text{-3}</math></b>	14.99 ± 2.20	8.41 ± 0.70	7.09 ± 1.35	8.03 ± 0.36
<b><math>\Sigma\omega\text{-6}</math></b>	6.07 ± 0.72	3.78 ± 0.21	3.03 ± 0.38	3.40 ± 0.10

Not:

- $\Sigma\text{SAT}$ : Doymuş Yağ Asitleri
- $\Sigma\text{MUFA}$ : Tek Doymamış Yağ Asitleri
- $\Sigma\text{PUFA}$ : Çok Doymamış Yağ Asitleri

a)  $\Sigma\text{Diğer SAT}$ : 12:0, 13:0, 14:0 isobr, 15:0, 16:0 iso, 16:0 anteiso, Phytanic Acid, 18:0, ve 22:0.

b)  $\Sigma\text{Diğer } \Sigma\text{MUFA}$ : 17:1, 18:1 $\omega$ 7, 18:1 $\omega$ 9, 20:1 $\omega$ 9, 20:1 $\omega$ 7, 22:1 $\omega$ 11 ve 22:1 $\omega$ 9.

c)  $\Sigma\text{Diğer } \Sigma\text{PUFA}$ : 16:4 $\omega$ 3, , 18:3 $\omega$ 3, 18:4 $\omega$ 3, 20:4 $\omega$ 3, 22:5 $\omega$ 6 ve 22:5 $\omega$ 3.



882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda TSAT değerleri, durgunluk fazında ve ölüm fazında (%38.41 $\pm$ 2.53 ve %38.56 $\pm$ 1.82) eşit değerler verdi. Fakat 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda, %45.08 $\pm$ 1.82'den (durgunluk fazı) %41.11 $\pm$ 1.07'ye (ölüm fazında) azaldığı tespit edildi. Her iki konsantrasyonda durgunluk fazları arasında istatistiki önemde farklılık oldu ( $P<0.05$ ). Fakat ölüm fazları arasında istatistiki önemde farklılık görülmedi ( $p>0.05$ ). TSAT grubu içinde en baskın yağ asidi 16:0 oldu. 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında en yüksek 16:0 değeri %39.04 $\pm$ 1.76 tespit edilirken, ölüm fazında %36.42 $\pm$ 0.25 değerine azaldığı görüldü. 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında %30.15 $\pm$ 2.77 ve ölüm fazında %33.89 $\pm$ 0.78 16:0 değerleri değeri tespit edildi. TSAT grubu içersinde 2. baskın grup olarak ise 14:0 oldu. 14:0 değerleri 16:0'ın tersine her iki konsantrasyonda da durgunluk fazlarında %5 değerleri, ölüm fazında %4 değerine düştü ( $P>0.05$ ). TSAT grubu içersinde bir diğer yağ asidi 20:0 en yüksek 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında %1.60 $\pm$ 0.35 tespit edildi. 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda hazırlanan besin ortamında büyüme fazlarında 20:0 değerlerinde istatistiki önemde bir azalış kayıt edildi ( $P<0.05$ ).

MUFA grubu yağ asitlerinde baskın yağ asidi 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında %29.04 $\pm$ 0.48'lik değer ile 16:1 $\omega$ 7 olur iken, aynı konsantrasyonda ölüm fazında 18:1 $\omega$ 9-c yağ asidi 2. baskın grup oldu (%17.79 $\pm$ 0.24). 882 ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonlardaki durgunluk ve ölüm fazları değerleri arasında istatistiki önemde farklılık olmadığı tespit edildi ( $P>0.05$ ).

#### 4.4.3. Üre -N Denemesi

Bu deneme de azot kaynağı olarak üre-N kullanıldı. İki farklı üre-N konsantrasyonunda (882, 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) gerçekleştirilen denemelerde iki farklı büyüme fazlarında (durgunluk fazı ve ölüm fazı) büyüme özellikleri araştırıldı. Durgunluk fazında ve ölüm fazında alınan örneklerin yağ asitleri miktarları tespit edildi. Örneklerde yapılan yağ asitleri analizlerinde %98-99 oranında yağ asitleri tanımlaması yapıldı.

Farklı büyüme fazlarında ve konsantrasyonlardaki *N. oculata*'nın yağ asitleri kompozisyonu çizelge 4.4'de gösterildi. Azot sınırlaması yapıldığı zaman toplam PUFA değerlerinde istatistiksel önemde farklılık tespit edildi ( $P < 0.05$ ). 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda ölüm fazında en yüksek toplam PUFA değeri  $15.06 \pm 2.01$  elde edilirken, durgunluk fazında  $12.59 \pm 2.22$  değerinde tespit edildi ( $P > 0.05$ ). 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda toplam PUFA değeri durgunluk fazına ( $10.70 \pm 0.47$ ) göre ölüm fazında daha düşük kayıtları edildi ( $11.95 \pm 1.9$ ).

Üre-N ile hazırlanan besin ortamında EPA, PUFA grubu yağ asitleri içerisinde baskın yağ asidi oldu. 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda ölüm fazında EPA'nın en yüksek seviyesi  $6.26 \pm 1.20$  olarak tespit edildi. Fakat 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonun büyüme fazlarında EPA değeri daha düşük seviyede tespit edildi ( $P > 0.05$ ).

Çizelge 4.4. Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882 ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki yağ asitleri değişimleri.

Yağ Asitleri	882 $\mu\text{mol (NH}_2)_2\text{-N}$		441 $\mu\text{mol (NH}_2)_2\text{-N}$	
	Durgunluk Fazı	Ölüm Fazı	Durgunluk Fazı	Ölüm Fazı
<b>14:0</b>	3.29 $\pm$ 0.20	3.95 $\pm$ 0.38	4.12 $\pm$ 0.09	4.62 $\pm$ 0.34
<b>16:0</b>	36.28 $\pm$ 1.14	35.23 $\pm$ 0.97	36.61 $\pm$ 2.06	34.49 $\pm$ 0.83
<b>20:0</b>	0.28 $\pm$ 0.24	0.55 $\pm$ 0.08	0.34 $\pm$ 0.31	1.03 $\pm$ 0.27
<b>Diğer <math>\Sigma</math>SAT</b>	0.58 $\pm$ 0.36	1.19 $\pm$ 0.03	1.51 $\pm$ 0.35	1.27 $\pm$ 0.14
<b><math>\Sigma</math>SAT</b>	41.03 $\pm$ 1.17	40.30 $\pm$ 0.94	42.58 $\pm$ 2.40	41.41 $\pm$ 1.01
<b>16:1<math>\omega</math>7</b>	30.85 $\pm$ 5.99	27.07 $\pm$ 1.41	24.17 $\pm$ 2.41	24.51 $\pm$ 0.76
<b>18:1<math>\omega</math>9-c</b>	16.92 $\pm$ 1.13	17.06 $\pm$ 0.62	16.92 $\pm$ 1.25	14.59 $\pm$ 0.76
<b>Diğer <math>\Sigma</math>MUFA</b>	0.91 $\pm$ 0.19	0.66 $\pm$ 0.12	1.3 $\pm$ 0.43	1.20 $\pm$ 0.16
<b><math>\Sigma</math>MUFA</b>	48.43 $\pm$ 5.87	45.03 $\pm$ 1.54	42.40 $\pm$ 1.25	40.30 $\pm$ 1.43
<b>18:2<math>\omega</math>6</b>	1.60 $\pm$ 0.12	1.58 $\pm$ 0.30	2.05 $\pm$ 0.47	1.80 $\pm$ 0.22
<b>18:3<math>\omega</math>6</b>	0.12 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.10
<b>20:4<math>\omega</math>6</b>	1.49 $\pm$ 0.12	1.24 $\pm$ 0.07	0.86 $\pm$ 0.06	0.97 $\pm$ 0.17
<b>20:5<math>\omega</math>3</b>	6.20 $\pm$ 0.33	5.40 $\pm$ 0.22	4.61 $\pm$ 0.23	6.26 $\pm$ 1.20
<b>22:6<math>\omega</math>3</b>	0.18 $\pm$ 0.08	0.11 $\pm$ 0.10	0.35 $\pm$ 0.61	0.00 $\pm$ 0.00
<b>Diğer <math>\Sigma</math>PUFA</b>	3.46 $\pm$ 1.41	1.11 $\pm$ 0.16	4.63 $\pm$ 1.71	5.72 $\pm$ 0.63
<b><math>\Sigma</math>PUFA</b>	10.70 $\pm$ 0.47	11.95 $\pm$ 1.92	12.59 $\pm$ 2.22	15.06 $\pm$ 2.01
<b>Tanımlanan</b>	100.00 $\pm$ 6.48	97.27 $\pm$ 0.35	97.56 $\pm$ 1.01	96.77 $\pm$ 0.19
<b><math>\Sigma\omega</math>-3</b>	7.04 $\pm$ 0.36	8.72 $\pm$ 1.33	9.59 $\pm$ 1.85	11.98 $\pm$ 1.61
<b><math>\Sigma\omega</math>-6</b>	3.65 $\pm$ 0.20	3.23 $\pm$ 0.60	3.00 $\pm$ 0.37	3.08 $\pm$ 0.49

Not:

- $\Sigma$ SAT: Doymuş Yağ Asitleri
- $\Sigma$ MUFA: Tek Doymamış Yağ Asitleri
- $\Sigma$ PUFA: Çok Doymamış Yağ Asitleri

a)  $\Sigma$ Diğer SAT: 12:0, 13:0, 14:0 isobr, 15:0, 16:0 iso, 16:0 anteiso, Phytanic Acid, 18:0, ve 22:0.

b) Diğer  $\Sigma$ MUFA: 17:1, 18:1 $\omega$ 7, 18:1 $\omega$ 9, 20:1 $\omega$ 9, 20:1 $\omega$ 7, 22:1 $\omega$ 11 ve 22:1 $\omega$ 9.

c) Diğer  $\Sigma$ PUFA: 16:4 $\omega$ 3, , 18:3 $\omega$ 3, 18:4 $\omega$ 3, 20:4 $\omega$ 3, 22:5 $\omega$ 6 ve 22:5 $\omega$ 3.

PUFA grubu yağ asitleri içersinde en yüksek LA, GLA ve DHA yağ asitleri seviyeleri  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda iken, ARA değeri  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda daha yüksek tespit edildi.  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda PUFA grubu içindeki DHA durgunluk fazında %0.35 değer kayıt edilirken, ölüm fazında bu değer %0 değere düşüşü istatistiki önemde farklılık olarak tespit edildi ( $P < 0.05$ ). Fakat  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda DHA değerleri arasında istatistiki önemde farklılık görülmedi ( $P > 0.05$ ).

TSAT, üre-N sınırlamasının olduğu denemelerde en yüksek değerler tespit edildi ( $\%42.58 \pm 2.40$ ). MUFA değerleri, TSAT'ın tam tersine en yüksek değerler  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda tespit edildi ( $\%48.43 \pm 5.87$ ).

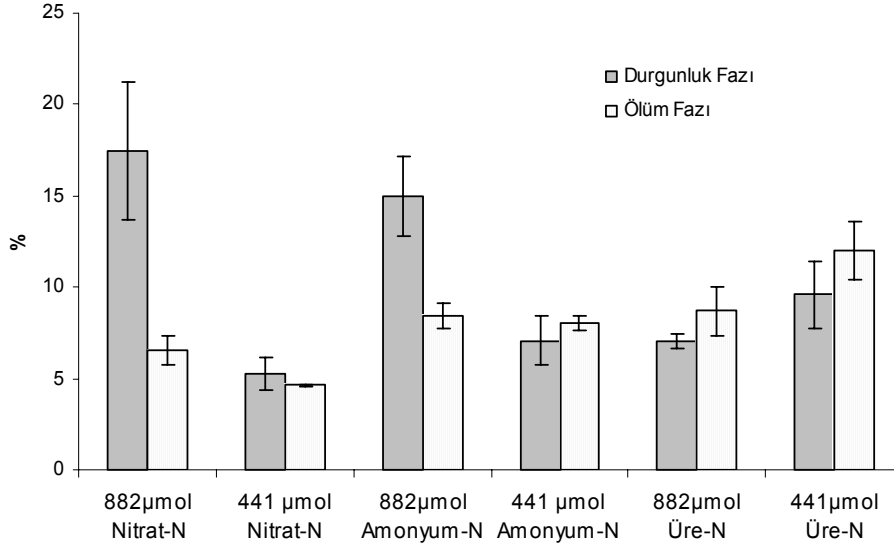
$882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda TSAT, durgunluk fazında ve ölüm fazındaki ( $\%41.03 \pm 1.17$  ve  $\%40.30 \pm 0.94$ ) değerler ile  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda,  $\%42.58 \pm 2.40$  (durgunluk fazı) ve  $\%41.41 \pm 1.01$  (ölüm fazında) değerleri arasında azot konsantrasyonunun etkisinin olmadığı tespit edildi ( $P > 0.05$ ). TSAT grubu içinde en baskın yağ asidi 16:0 oldu.  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında en yüksek 16:0 yağ asidi değeri  $\%36.61 \pm 2.06$  iken, ölüm fazında  $\%34.49 \pm 0.83$  değerine azaldığı görüldü. Aynı şekilde  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazı ile ölüm fazı arasında çok fazla farklılık görülmedi (srasıyla,  $\%36.28 \pm 1.14$ ,  $\%35.23 \pm 0.97$ ). TSAT grubu içersinde 2. baskın grup olarak ise 14:0 tespit edildi. Üre-N sınırlamasının olduğu denemelerdeki 14:0 değerleri daha yüksek seviyeye de olmasına rağmen istatistiki olarak fark görülmedi ( $P > 0.05$ ). TSAT grubu içersinde bir diğer yağ asidi 20:0, üre-N sınırlamasında durgunluk fazında  $\%1.03 \pm 0.27$  tespit edilirken, ölüm fazı

ve  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda denemelerdeki büyüme fazlarında diğer azot kaynakları ile yapılan denemelerdeki EPA değerleri ile istatistiki önemde farklılık tespit edildi ( $P < 0.05$ ).

$882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında MUFA grubu yağ asitlerinde baskın yağ asitleri  $30.85 \pm 5.99$  değer ile 16:1 $\omega$ 7 ve  $17.06 \pm 0.62$  değer ile 18:1 $\omega$ 9-c oldu.  $882$  ve  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonlardaki durgunluk ve ölüm fazları değerleri arasında istatistiki önemde farklılık olmadığı tespit edildi ( $P > 0.05$ ).

#### **4.5. Büyüme Fazları İle Azot Kaynakları Konsantrasyonlarına Bağlı Yağ Asitleri İçerisindeki $\Omega$ -3, $\Omega$ -6 ve EPA Değişimleri**

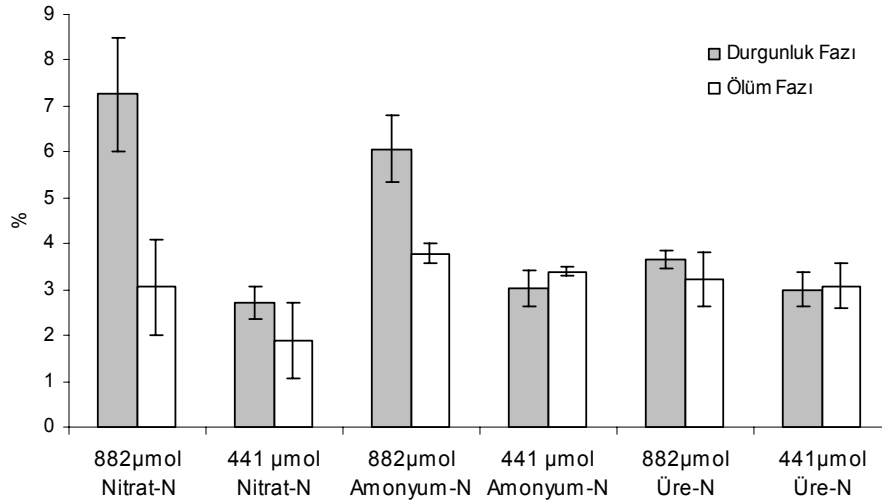
*N. oculata* türünde iki büyüme fazında elde edilen kurutulmuş örneklerdeki  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 ve EPA değerlerinde azot kaynakları ve konsantrasyonlarına bağlı değişimler tespit edildi. PUFA grubu yağ asitleri içersinden toplam  $\omega$ -3 değerleri şekil 4.14'de gösterildi. En yüksek  $\omega$ -3 değerleri  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NO}_3^-$ -N (%  $17.46 \pm 3.78$ ) ve  $\text{NH}_4^+$ -N (%  $14.99 \pm 2.20$ ) ile hazırlanan besin ortamlarında durgunluk fazında elde edildilerken ( $P > 0.05$ ), ölüm fazında ve azot sınırlamasının yapıldığı denemelerde  $\omega$ -3 değerlerinde istatistiki önemde bir azalış kayıt edildi ( $P < 0.05$ ). Fakat üre-N ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan besin ortamlarında  $\omega$ -3 değerleri arasında istatistik önemde bir değişiklik olmadığı tespit edildi ( $P > 0.05$ ). En yüksek  $\omega$ -3 değeri  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda üre-N ile hazırlanan besin ortamında ölüm fazında elde edildi (%  $11.98 \pm 1.61$ )



Şekil 4.14.  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki ( $882 \mu\text{mol}$  ve  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki  $\omega$ -3 değerleri.

PUFA grubu yağ asitleri içersinden toplam  $\omega$ -6 değerleri şekil 4.15'de gösterildi. En yüksek  $\omega$ -6 değerleri  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NO}_3^-$ -N (%  $7.25 \pm 1.23$ ),  $\text{NH}_4^+$ -N (%  $6.07 \pm 0.72$ ) ve üre-N (%  $3.65 \pm 0.20$ ) ile hazırlanan besin ortamlarında durgunluk fazında elde edildi.  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamlarında durgunluk fazlarındaki  $\omega$ -6 değerleri arasında farklılık olmaz iken ( $P > 0.05$ ), ölüm fazlarında ve azot sınırlamasının yapıldığı denemelerde  $\omega$ -6 değerlerinde istatistiki önemde azalış kayıt edildi ( $P < 0.05$ ). Fakat farklı konsantrasyonlarda üre-N ile

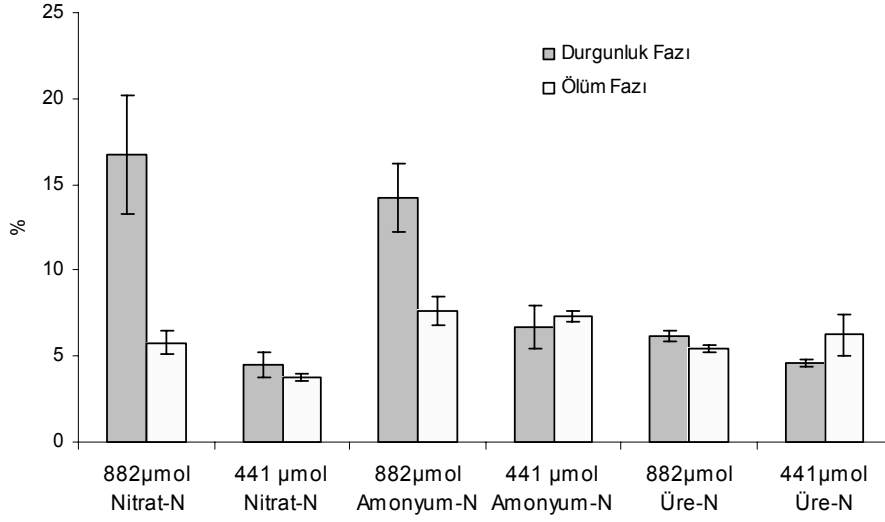
hazırlanan besin ortamlarında  $\omega$ -6 değerleri arasında istatistik önemde bir değişiklik olmadığı tespit edildi ( $P>0.05$ ).



Şekil 4.15.  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki  $\omega$ -6 değerleri.

PUFA grubu yağ asitleri içersinden toplam EPA değerleri şekil 4.16'da gösterildi. En yüksek EPA değerleri 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NO}_3^-$ -N (% 16.74 $\pm$ 3.42) ve  $\text{NH}_4^+$ -N (% 14.23 $\pm$ 1.97) ile hazırlanan besin ortamlarında durgunluk fazında bulundu ( $P>0.05$ ). Fakat üre-N hazırlanan besin ortamında 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda en yüksek %6.26 $\pm$ 1.20 değerinde tespit edildi.  $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N kullanılarak hazırlanan besin ortamlarında ölüm fazında ve azot

sınırlamasının yapıldığı denemelerde EPA değerlerinde istatistiki önemde bir azalış kayıt edildi ( $P < 0.05$ ). Farklı konsantrasyonlarda üre-N ile hazırlanan besin ortamlarında EPA değerleri arasında istatistik önemde bir değişiklik olmadığı tespit edildi ( $P > 0.05$ ).



Şekil 4.16.  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve Üre-N kullanılarak hazırlanan iki farklı konsantrasyondaki (882  $\mu\text{mol}$  ve 441  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) besin ortamlarında büyüme fazlarındaki EPA değerleri.



## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Su ürünleri yetiştiriciliğinde yoğun olarak kültürü yapılan *N. oculata* (Eustigmatophyceae) türünün, farklı büyüme fazlarında, biyokimyasal kompozisyonu üzerine azot kaynakları ve konsantrasyonlarının etkisi çalışıldı.

Çevresel koşullar ile birlikte kültür ortamında kullanılan nutrientler ve konsantrasyonları mikroalgal büyüme ve mikroalgin biyokimyasal yapısı üzerinde değişikliklere neden olabilir. Büyümeyi, besin ortamlarında kullanılan nutrient türünün yanısıra konsantrasyonları da etkilemektedir (Brown et al., 1989). Pek çok tür için uygun olan F/2 besin ortamı ile *N. oculata* kültüründe en yüksek biyokimyasal değerler elde edilmektedir (Owens et al., 1987; Sukenik et al., 1989; Sukenik et al., 1993b; Schneider and Roessler, 1994; Lourenco et al., 2002). Bu nedenle çalışmamızda besin ortamı olarak F/2 besin ortamı tercih edilmiştir.

Azot kaynağı değişikliği ve konsantrasyonlarının mikroalglerin büyüme ve biyokimyasal yapılarında etkili olduğu bilinmektedir. (Utting, 1985; Gökpınar, 1991; Fidago et al., 1995; Valenzuela-Espinoza et al., 1999; Xu et al., 2001). İnorganik azot kaynaklarından  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve üre-N formları, akuakültürde besin ortamlarında yaygın bir şekilde kullanılan formlardır. F/2 besin ortamında azot kaynakları olarak  $\text{NO}_3^-$ -N kullanılmaktadır. Bu çalışmada farklı azot kaynaklarını içeren ( $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve üre-N) F/2 besin ortamları kullanıldı. Azot konsantrasyonu olarak *N. oculata* için optimum değer olan  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  temel alınmıştır (Guillard, 1975). %50 oranında besin ortamına eklenen azot

kaynağında azaltma yolu ile azot sınırlaması gerçekleştirildi. Azot kaynakları değişikliği ve ekleme oranları *N. oculata*'da büyümeyi etkileyen parametrelerden olmuştur.  $\text{NO}_3^-$ -N ile hazırlanan besin ortamında en yüksek büyüme oranı elde edilmiştir.  $\text{NO}_3^-$ -N ile  $\text{NH}_4^+$ -N arasında büyüme açısından büyük farklılık olmaz iken, üre-N ile hazırlanan besin ortamı *N. oculata* için uygun olmadığı tespit edilmiştir. Bir çok araştırmacı, amino asitlerin özümsemesinde hücre tarafından ilk alınacak azot kaynağı  $\text{NH}_4^+$ -N olduğunu bildirmişlerdir (Utting, 1985; Fidago et al., 1995; Valenzuela-Espinoza et al., 1999; Xu et al., 2001). Çünkü hücrelerin ihtiyacı olan azot için  $\text{NO}_3^-$ -N'nun  $\text{NH}_4^+$ -N'a indirgenmesi gerekmektedir. Aynı araştırmacılar,  $\text{NO}_3^-$ -N ile  $\text{NH}_4^+$ -N arasında benzer büyüme oranları kayıt edildiği bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki büyüme sonuçları gösteriyor ki; *N. oculata*  $\text{NO}_3^-$ -N kaynağını en iyi kullanmıştır.  $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamlarında ki spesifik büyüme oranları arasında farklılık görülmemiştir. Fakat üre-N ile hazırlanan besin ortamlarında *N. oculata*'nın büyüme oranı düşük kayıt edilmiştir. Besin ortamına konulan azot kaynaklarının konsantrasyonlarının azaltılması sonucunda, büyüme oranlarında aynı oranda azaldığı tespit edilmiştir.

Xu et al., (2001) *Ellipsoidion sp.* ile yapılan çalışmalarında azot kaynağı olarak  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N ve üre-N formları kullanmıştır. Besin ortamı olarak kullandığı Provasoli besin ortamında azot konsantrasyonu  $643 \mu\text{mol L}^{-1}$  temel alınmış azot sınırlamasını %50 ve %25 oranında azaltarak denemişlerdir. Ayrıca %200 ve %300 oranında azot konsantrasyonunu arttırarak geniş konsantrasyon aralığında incelemişlerdir. Böylelikle kesin sonuçlara ulaşmakta kolaylık

sağlayacağını belirtmişlerdir.  $\text{NH}_4^+$ -N azot kaynağı olarak kullanıldığı zaman en yüksek EPA değerini  $2.56 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{NO}_3^-$ -N ile hazırlanan besin ortamlarında ise en yüksek EPA değerini  $1.92 \text{ mmol L}^{-1}$  elde ettiklerini bildirmişlerdir. *Ellipsoidion sp.*'nin yağ asitleri üretimi için azot sınırlaması yerine azot konsantrasyonunun arttırılması gerektiğini belirtmişlerdir. Xu et al., (2001) *Ellipsoidion sp.* için üre-N uygun bulunmaz iken ilk olarak  $\text{NH}_4^+$ -N tercih ettiğini bildirmiştir. Fakat kültür süresinin artmasıyla  $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamları arasında büyüme açısından farklılık olmadığını bildirmişlerdir.

Yüksek kaliteli besin, yüksek oranda PUFA, özellikle de  $\omega$ -3 tipinin çok yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir (Brett and Müller-Navarra 1997, Ahlgren et al., 2000; Müller-Navarra, 2000). Besin kalitesinin belirlenmesinde özellikle de EPA miktarı *N. oculata* türünün biyokimyasal yapısında etkili olabilmektedir (Zittelli et al., 1999). Ayrıca mikroalglerin biyokimyasal kompozisyonları, büyüme oranı ve büyüme fazları (Molina-Grima et al., 1996), sıcaklık (Fábregas et al., 1986; Kaplan et al., 1986; Qiang and Richmond, 1994), aydınlatma (Brown et al., 1993; Molina-Grima et al., 1994), besin ortamı ve azot konsantrasyonu (Fábregas et al., 1986) gibi koşullara bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada en yüksek EPA,  $\omega$ -3 ve  $\omega$ -6 değerleri (sırasıyla,  $16.74 \pm 3.42$ ,  $17.46 \pm 3.78$ ,  $7.25 \pm 1.23$ )  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NO}_3^-$ -N ile hazırlanan besin ortamında durgunluk fazında elde edilirken, üre-N ile hazırlanan besin ortamında  $441 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda en yüksek değerler tespit edildi.

EPA,  $\omega$ -3 ve  $\omega$ -6 değerleri diğer araştırmacıların sonuçlarına göre daha düşük kayıt edilmiştir. Diğer araştırmacılar logaritmik fazda hasat

işlemi gerçekleştirerek analiz sonuçlarını bildirmişlerdir. Büyüme fazlarında *N. oculata*'nın biyokimyasal kompozisyonunda değişiklikler olmaktadır. Durgunluk ve ölüm fazlarında özellikle de yağ asitleri değerlerinde büyük bir azalma olduğu ortaya tespit edilmiştir. Toplam PUFA ve EPA en yüksek değerleri  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NO}_3^-$ -N ile hazırlanan besin ortamında durgunluk fazında (sırasıyla,  $\%24.72 \pm 5.0$  ve  $\%16.74 \pm 3.42$ ) elde edilirken,  $\text{NH}_4^+$ -N ve üre-N ile hazırlanan besin ortamlarında azalma kayıtlı edilmiştir. Ayrıca PUFA grubu yağ asitleri içerisinde LA, GLA, ARA ve DHA yağ asitleri en yüksek seviyeleri  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda durgunluk fazında tespit edildi (sırasıyla,  $\%3.31 \pm 0.43$ ,  $\%0.75 \pm 0.15$ ,  $\%2.94 \pm 0.68$  ve  $\%0.44 \pm 0.39$ ).  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamındaki PUFA grubu yağ asitleri değerleri arasında istatistiki önemde fark görülmedi ( $P > 0.05$ ). Fakat üre-N kullanılarak hazırlanan besin ortamındaki büyüme fazlarındaki PUFA grubu yağ asitleri değerlerinde önemli oranda bir azalma kayıtlı edildi ( $P < 0.05$ ). Ayrıca büyüme fazlarında yağ asit açısından durgunluk ve ölüm fazları arasında önemli oranda azalma kayıtlı edilmiştir.

Bir çok araştırmacı, azot sınırlamasının yağ asitleri değerlerinde artışa, hücre sayısında azalmaya yol olacağını belirtmişlerdir (Conover, 1975; Syrett, 1981; Thompson et al., 1989; Lourenco et al., 2002). *C. vulgaris*'in yığın kültüründe azot sınırlamasında ALA oranı 10 kez arttarken (Piorreck et al., 1984) *C. sorokinana*'da 2-4 kat azalma olmuştur (Chen and Johns 1991). Bunların aksine *S. obliquus*, azot sınırlaması ile ALA oranında çok küçük değişim olmuştur. Ben-Amotz et al., (1985) çalışmasında ALA oranı *Ankistradesmus sp.* ve *D. salina*'da azalırken ALA ve DHA oranı *Isochrysis sp.*'de artış olduğunu bildirmiştir

(Ahlgren et al., 2000; Ahlgren and Hyenstrand, 2003). *P. tricornutum* türünde azot kaynaklarından üre-N ve  $\text{NO}_3^-$ -N'unda en yüksek EPA değerleri kayıt edilirken (Yongmanitchai and Ward, 1991) *I. galbana* ve *Ellipsoidion sp.* türlerinde en yüksek EPA değeri  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamında elde edilmiştir (Molina and Sanches 1992; Xu et al., 2001). Xu et al., (2004) *Nannochloropsis sp.* ile yaptıkları çalışmalarında  $\text{NO}_3^-$  ve glukoz azot kaynağı olarak kullanmışlar ve sürekli olarak kültür ortamına eklemişler. *Nannochloropsis sp.*'nin yığın kültürü yapıldığı zaman EPA değeri %23.6 iken,  $\text{NO}_3^-$ -N eklemesi yapıldığı zaman EPA değerinde (%30.9) artış tespit edilmiştir. Fakat glukoz eklenmesi sonucunda EPA değerinde (%20.1) azalma tespit etmişlerdir. Hu and Gao, (2003) iki farklı oranda karbon kaynağının *Nannochloropsis sp.*'nin yağ asitleri değerlerine etkisini araştırmışlar. En yüksek EPA değerini  $25.3 \pm 1$  olarak tespit etmişlerdir. Fábregas et al., 2004 *Nannochloropsis sp.* kültürüleri için düşük ışık şiddeti EPA üretimi %28.90 olarak tespit etmiştir. Tago and Teshima, (2002)  $15 \text{mgL}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{SO}_4$  ve  $10 \text{mgL}^{-1}$  üre ile hazırladığı besin ortamında *N. oculata*'nın  $32.9 \pm 3.8$  EPA,  $5.8 \pm 1.3$  ARA değerlerini tespit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Azot kaynakları değişikliği ve ekleme oranları *N. oculata*'da  $\alpha$ -tocopherol değerlerini etkileyen parametrelerden olmuştur.  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamında durgunluk fazında en yüksek  $\alpha$ -tocopherol ( $581.43 \pm 123.73 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) değeri tespit edildi. Büyüme fazına bağlı olarak  $\alpha$ -tocopherol değerinde bir azalma tespit edildi (ölüm fazında,  $529.57 \pm 40.71 \mu\text{g.g}^{-1}$ ).  $\text{NO}_3^-$ -N ve üre-N azot kaynağı olarak besin ortamında kullanıldığı zaman  $\alpha$ -tocopherol değerleri  $\text{NH}_4^+$ -N kullanılan besin ortamı değerlerine göre daha düşük kayıt edildi.

Maruyama et al., (1997) kurutulmuş *N. oculata* 300 $\mu\text{g g}^{-1}$   $\alpha$ -tocopherol içerdiğini tespit etmişlerdir. Brown et al., (1999) 12:12 saat aydınlık:karanlık periyodu uygulayarak *Nannochloropsis sp.* kültürünü yapmışlardır. Logaritmik fazda  $\alpha$ -tocopherol değeri 290  $\mu\text{g g}^{-1}$  iken durgunluk fazında 180  $\mu\text{g g}^{-1}$  azalmıştır. 24 saat aydınlık periyot uygulandığı zaman logaritmik fazda  $\alpha$ -tocopherol değerinin 350 $\pm$ 2  $\mu\text{g g}^{-1}$  yükseldiğini ve bu değerler arasında istatistiksel önemde farklılık olduğunu rapor etmişlerdir.

Karotenler biyolojik antioksidan olarak hücre köklerini ve dokuları zararlı etkenlerden koruduğu için insan sağlığı için hayati öneme sahiptir (Yanar et al., 2004). Bir çok araştırmacı karotenidleri, insanları hastalıklara karşı koruyucu olarak önermiş ve  $\beta$  karoten, lutein, zeaksanthin gibi karotenler halen kanser tedavisinde uygulanmaktadır (Richmond, 2000; Ziegler et al., 1996). *N. oculata* türünde klorofil-a,  $\beta$  karoten, viyolaksantin ve vaukherisantin ana pigmentlerdir. Ayrıca bu alg türü kantaksantin ve astaksantin gibi sekonder karoten gruplarını ihtiva etmektedir. Sekonder karotenoidler yüksek ışık şiddeti ve azot yetersizliği gibi ekstrem koşullar altında üretilir. Özellikle besin sınırlaması sonucunda, algin renginin yeşilden kırmızı-turuncuya dönüşü, sekonder karotenlerin artışı ile ilişkilendirmiştir (Lubián et al., 2000). Bu çalışmada  $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N ile hazırlanan besin ortamlarında durgunluk fazlarında en yüksek toplam karoten değerleri elde edilirken, azot sınırlamasında ve büyüme fazlarından ölüm fazında azalma olmuştur. TLC yöntemi ile karotenid içeriğinde, azot sınırlamasının ve büyüme fazlarının değişikliğe sebep olmadığı tespit edilmiştir.

Sukenik et al., (1989) *N. oculata* ile yaptıkları çalışmalarında üç farklı ışık şiddetinin (35, 290 ve 350  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) klorofil-a ve toplam karoten miktarlarına etkisini tespit etmişlerdir. Işık şiddeti artışına bağlı olarak klorofil-a ve toplam karoten değerlerinde bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Lubián et al., (2000) *N. oculata*'nın ticari pigmentlerini viyolaksantin (%48.9) ve vaukheriksantin (%45.3) olarak tespit etmişlerdir. Örnek zamanını 10. günden 20. güne çıkartıldığında viyolaksantin değerinde azalış olur iken, vaukheriksantin değerinde artış olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada en yüksek klorofil-a değeri 168.6  $\mu\text{g (10}^6 \text{ hücre)}^{-1}$  olarak 20. günde tespit etmişlerdir. Erken örnek döneminde *N. oculata* da bu değer 116.4  $\mu\text{g (10}^6 \text{ hücre)}^{-1}$  olarak rapor etmişlerdir. Sánchez et al., (2005) *N. gaditana*'da geleneksel metod olarak kabul edilen metanol ve aseton ekstaktı ile süperkritik sıvı ekstraksiyon metodunu karşılaştırmışlardır. İlk olarak aseton ile metanol karşılaştırması sonucunda metanol çözgeninin asetona göre daha başarılı tespit etmişlerdir. Süperkritik sıvı ekstraksiyon metodunu metanol metoduna göre daha hızlı ve ayarlanabilir basınç ve sıcaklıktan dolayı tercih edilebilir olduğu sonucunu bildirmişlerdir. Marin et al., (1998) *D. salina* türünde  $\text{NO}_3^-$ -N konsantrasyonunun (882, 435 ve 212  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) klorofil-a ve karoten miktarlarına etkisini araştırmışlar. En yüksek klorofil-a ve karoten değerlerini 882  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$ -N konsantrasyonunda büyüme fazlarından durgunluk fazında tespit etmişlerdir. Sukenik et al., (1989) *N. oculata* ile yaptıkları çalışmalarında üç farklı ışık şiddetinin (35, 290 ve 350  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) klorofil-a ve toplam karoten miktarlarına etkisini tespit etmişlerdir. Işık şiddetinin artışına

bağlı olarak klorofil-a ve toplam karoten değerlerinde bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

*N. oculata* 2 L'lik erlenlerde,  $18\pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıkta,  $196 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde, farklı azot kaynakları ve konsantrasyonlarda hazırlanan F/2 besin ortamlarında başarı ile kültürleri yapıldı. Büyüme fazlarına göre *N. oculata*'nın biyokimyasal yapısında farklılıklar tespit edildi. Çoğu mikroalg türü için yağ asitleri içeriği, azot kaynağının eksikliğinde artmasına rağmen, *N. oculata* türünde yağ asitleri değerlerinde azalma kayıtlı edildi. Azot kaynağı konsantrasyonu, yağ asitleri değerleri ile arasında kuvvetli bir bağ olduğu ortaya çıkartıldı. Büyüme, yağ asitleri,  $\alpha$ -tocopherol, toplam karoten ve klorofil-a değerleri açısından *N. oculata* türü için  $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N uygun azot kaynağı ve  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  uygun konsantrasyon olarak tespit edilmiştir. Çünkü en yüksek EPA ve  $\alpha$ -tocopherol değerlerinin elde edilmesinin yanısıra en yüksek büyüme hızları  $882 \mu\text{mol L}^{-1}$  konsantrasyonda  $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N bileşiklerinde elde edildi. Böylelikle bu türün biyokimyasal yapısını değiştiren etkenlerden bir bölümü açıklığa çıkarılarak, gerek bilimsel gerekse ticari amaçlı uygulamalardaki başarıyı arttıracaktır.



## 6. ÖNERİLER

Yapılan denemelerde kültür ortamlarında  $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N kullanımında EPA ve ARA düzeyleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadığı gözlemlendi. *N. oculata* türü için besin ortamında  $\text{NO}_3^-$ -N ve  $\text{NH}_4^+$ -N azot kaynağı olarak kullanılmalıdır.

Azot sınırlaması sonucunda *N. oculata* türünün büyümesinde biyokimyasal yapısında azalma meydana getirmektedir. Özellikle yağ asitlerinden EPA bakımından zengin *N. oculata* türünde EPA değerlerinde azalmaya sebep olduğundan optimum konsantrasyonda azot kaynağı içeren besin ortamında kültürü yapılmalıdır.

$\text{NH}_4^+$ -N kullanımının hücre içi  $\alpha$ -tokoferol sentezini arttırdığı tespit edildi. Büyüme oranının  $\text{NO}_3^-$ -N'una göre daha az olmasına rağmen  $\alpha$ -tokoferol değerindeki artıştan dolayı azot kaynağı olarak  $\text{NH}_4^+$ -N kullanılabilir.

Üre-N ile hazırlanan besin ortamında kültürü yapılan *N. oculata* türünün büyüme ve biyokimyasal yapısında tüm değerleri düştüğü tespit edildi. Besin ortamının sadece Üre-N ile hazırlamak bu tür için uygun değildir.

Azot kaynakları ve konsantrasyonuna bağlı olarak pigment kompozisyonunda değişiklikler olduğu tespit edildi. Sekonder karotenoidlerin miktarlarını ve azot kaynak ve konsantrasyonlarının etkisinin tespit etmek için detaylı araştırma yapılmalıdır.

Azot enzimlerin ve proteinlerin yapısında kaynak oluşturduğu için azot kaynakları ve konsantrasyonları *N. oculata* türünün protein

miktarında değişikliğe sebep olup olmadığı konusunda araştırmalar yapılmalıdır.

Büyüme fazlarında *N. oculata* türünün biyokimyasal yapısında değişikliklere sebep olmaktadır. En yüksek değerler durgunluk fazda elde edilirken ölüm fazında biyokimyasal kompozisyon değerlerinde azalma meydana gelmektedir. Özellikle yağ asitlerinden EPA bakımından zengin *N. oculata* türünde EPA değerlerinde azalmaya sebep olmaktadır. Aynı şekilde  $\alpha$ -tocoferol, toplam karoten ve klorofil-a değerlerinde önemli oranda azalmalar olmaktadır. Bir çok araştırıcı, *N. oculata* türünde en yüksek biyokimyasal değerler logaritmik fazda elde edildiği belirtilmiştir. Bu sebeple büyüme fazlarının tümünde örnek işlemi gerçekleştirilerek, sonuçlar değerlendirilmelidir.

**KAYNAKLAR**

- Ahlgren, G. and Hyenstrand, P.,** 2003. Nitrogen limitation effects of different nitrogen sources on nutritional quality of two freshwater organisms, *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) and *Synechococcus* sp. (Cyanophyceae). J. Phycol.39, p 906–917.
- Ahlgren, G., Hyenstrand, P., Vrede, T., Karlsson, E. & Zetterberg, S.,** 2000. Nutritional quality of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) grown in different N regimes and tested on Daphnia. Verh. Intl. Verein. Limnol. 27:1234–8.
- Antia, N.J., Harrison, P.J., Oliveira, L.,** 1991. The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. Phycologia 30: 1-89.
- Bandarra, N.M., Pereira, P.A., Batista, I., and Vilela, M.H.,** 2003. Fatty acids, sterols and  $\alpha$ -tocopherol in *Isochrysis galbana*. Journal of Food Lipids 10: 25-34.
- Baysal, T., ve Ersus, S.,** 1999, Karotenoidler ve insan sağlığı. Gıda Dergisi 24 (3):177-185.
- Ben-Amotz A., Tornabene T.G., ThomasW.H.,** 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. J. Phycol. 21: 72–81.
- Brett, M. T. & Müller-Navarra D. C.,** 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. Freshwater Biol. 38:483–99.

**Kaynaklar (devam ediyor)**

- Brown M.R., Dunstan G.A., Jeffrey S.W., Volkman J.K., Barrett S.M., Leroi J.M.**, 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of the Prymnesiophyte *Isochrysis sp.* (CLONE TISO). *J. Phycol.* 29: 601–612.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Garland, C.D.**, 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. CSIRO Mar. Lab. Rep. 205, 44.
- Brown, M.R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. and Trenerry, C.**, 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11: 247-255.
- Certik, M., and Shimizu, S.**, 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87, No. 1, 1-14.
- Cirik, S. ve Gökpmar, Ş.** 1999. Plankton Bilgisi ve Kültürü. E. Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No:47, Ders Kitabı 2. Baskı, sayfa 274.
- Chen, F. and Johns, M. R.**, 1991. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *J. Appl. Phycol.* 3:203–9.
- Chen, J.Y., Latshaw, J. D., Lee, H.O. and Min, D.B.**, 1998.  $\alpha$ -Tocopherol content and oxidative stability of egg yolk as related to dietary  $\alpha$ -tocopherol. *J. Food Science* 63: 919-922.

**Kaynaklar (devam ediyor)**

- Christie, W.W.**, 1997. Structural analysis of fatty acids. In Advances in Lipid Methodology-Four, (eds W.W. Christie) Oily Press, Dundee, pp. 119-169.
- Cohen, Z., Vonshak, A. & Richmond, A.**, 1988 Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. Journal of Phycology 24, 328– 332.
- Collos, Y. and Slawwyk, G.**, 1980. Nitrogen uptake and assimilation by marine phytoplankton. In: Primary Productivity in the Sea (eds: Paul G. Falkowski), Plenum Press, New York, pp:195-211.
- Conover, S.A.M.**, 1975. Partitioning of nitrogen and carbon in cultures of the marine diatom *Thalassiosira fluviatilis* supplied with nitrate, ammonium or urea. Mar. Biol. 32: 231-246.
- Egemen, Ö. Ve Sunlu, U.**, 1999. Su Kalitesi (Ders Kitabı), E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayın no: 14. sy, 148.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. and Abalde, J.**, 1986. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. Aquaculture 53: 101–113.
- Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A. and Otero, A.**, 2004. The cell composition of *Nannochloropsis sp.* changes under different irradiances in semicontinuous culture. World Journal of Microbiology & Biotechnology 20: 31–35.

**Kaynaklar (devam ediyor)**

- Fidalgo J. P., Cid A., Torres E., Sukenik A., Herrero C.,** 1998. Effects of Nitrogen Source and Growth Phase on Proximate Biochemical Composition, Lipid Classes and Fatty Acid Profile of the Marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*. 166: 105-116.
- Fidalgo, J.P., Cid, A., Abalde, J., Herrero, C.,** 1995. Culture of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* with different nitrogen sources: growth, nutrient conversion and biochemical composition. *Cah. Biol. Mar.* 36, 165–173.
- Fulks W, Main KL.,** 1991. Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceeding of a U.S.-Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, pp. 364.
- Gill, I. and Valivety, R.,** 1997. Polyunsaturated fatty acids, part 2: Biotransformations and biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, Volume 15, Issue 11, pp: 470-478.1
- Gladu, P.K., Patterson, G.W., Wikfors, G.H., Smith, B.C.,** 1995. Sterol, fatty acid, and pigment characteristics of UTEX 2341, a marine eustigmatophyte identified previously as *Chlorella minutissima* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 31, 774–777.
- Gökpınar, Ş.,** 1980. Deniz diatomu *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin'un kültürü üzerine gözlemler. *Tubitak VII. Bilim Kongresi, Kuşadası, İzmir*, sy. 827-840.

**Kaynaklar (devam ediyor)**

- Gökpınar, Ş.**, 1982. Observations on the culture of a marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in different nutrient and concentration. Ege Univ., Fac. Of Sci. Jour. Ser. B, 6: 77-86.
- Gökpınar, Ş.**, 1994. *Nannochloris* sp. (Chlorophyceae) inorganik azot kaynaklarını kullanımı üzerine sıcaklık değişimlerinin etkisi. Ege Univ. Fen Fakültesi Dergisi, sy: 1169-1178.
- Gökpınar, Ş.**, 1991. Akuakültürde önemli beş deniz flagellat'ının inorganik azot alınımını üzerine sıcaklık değişimlerinin etkisi. (Doktora Tezi). Dokuz Eylül Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, sayfa,88.
- Gouveia, L., Gomes, E., and Empis, J.**, 1997. Use of *Chlorella vulgaris* in diets for rainbow trout to enhance pigmentation of muscle. Journal of Applied Aquaculture 7: 61-70.
- Grobbelaar, J.U.**, 2000. Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. J Appl Phycol 12:201–206.
- Guillard, R.R.L.**, 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), Culture of Marine Invertebrates Animals. Plenum, New York, pp. 296–360.
- Gunstone, F.D.**, 2003. Lipid chemistry—a personal view of some developments in the last 60 years. Biochimica et Biophysica Acta 1631: 207– 217
- Harwood, J. L.**, 1988. Fatty acid metabolism. Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol. 39:101–38.

**Kaynaklar (devam ediyor)**

- Harwood, J.L.**, 1988. Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 39: 101-138.
- Horrobin, D.F.**, 1999. Lipid metabolism, human evolution and schizophrenia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Volume 60, Issues 5-6, Pp: 431-437
- Hu, H and Gao, K.**, 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnology Letters* 25: 421–425.
- Hu, Qiang.**, 2004. Environmental effects on cell composition, in *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, Richmond, A. (Eds) Blackwell publishing company, pp. 83-93.
- Hunter, K.J. and Fletcher, J.M.**, 2002. The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, pp:399-406
- Innis, S.M.**, 1991. Essential fatty acids in growth and development *Progress in Lipid Research*, Volume 30, pp: 39-103
- Innis, S.M.**, 2003. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Pediatrics*, 143, pp: 1-8.



**Kaynaklar (devam ediyor)**

- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z., Aaronson, S.,** 1986. Algal nutrition. In: Richmond, A. Ed., Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, FL, pp. 147–198.
- Karlson, B., Potter, D., Kuylenstierna, M., Andersen, R.A.,** 1996. Ultrastructure, pigment composition and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), a marine ultra-plankton isolated from the Skagerrak, northeast Atlantic Ocean. Phycologia 35, 253±260.
- Kaufman, Z.G., Lively, J.S. and Carpenter, E.J.,** 1983. Uptake of nitrogenous nutrients by phytoplankton in a Barrier Island Estuary: Great South Bay, New York. Estuarine Coastal Shelf Sci. 17:483-493.
- Kristiansen, S. and Lund, B.A.,** 1989. Nitrogen cycling in the Barents Sea-I. Uptake of nitrogen in the water column. Deep-Sea Res. 36:255-268.
- Levasseur, M., Thompson, P.A., Harrison, P.J.,** 1993. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. J. Phycol. 29, 587–595.
- Levasseur, M.E., Harrison, P.J., Heimdahl, B.R. and Therriault, J.C.,** 1990. Simultaneous nitrogen and silicate deficiency of a phytoplankton community in a coastal jet-front. Mar. Biol. 104:329-338.

**Kaynaklar (devam ediyor)**

- Lourenco, S., Barbarino, E., Mancini-Filho, J., Schinke, K., Aidar, E.,** 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: An evaluation for aquaculture. *Phycologia*, 41: 158-168.
- Lubian LM, Montero O, Moreno-Garrido I, Huertas IE, Sobrino C, Gonzales-del Valle M, Pares G,** 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology* 12: 249–255.
- Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O., Sukenik, A.,** 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis sp.*) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture* 133, 295–309.
- Marín, N., Morales, F., Lodeiros, C. and Tamigneaux, E.,** 1998. Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *Journal of Applied Phycology* 10: 405–411.
- Maruyama, I., Nakamura, T., Matsubayashi, T., Ando, Y. and Naeda, T.,** 1986. Identification of the alga known as ‘marine chlorella’ as a member of the Eustigmatophyceae. *Jap. J. Phyco.* 34: 319-325.
- Maruyama, I., Nakao, T., Shigeno, I., Ando, I. and Hirayama, K.,** 1997. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the massculture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 358: 133–138.

**Kaynaklar (devam ediyor)**

- Molina G.E., Sánchez P.J.A.**, 1992. EPA from *Isochrysis galbana*. Growth conditions and productivity. *Process Biochem.* 27: 299–305.
- Molina Grima, E., Garcia Camacho, F. and Acien Fernandez, F. G.**, 1999. Production of EPA from *Phaeodactylum tricornutum* . In Cohen, Z. [Ed.] *Chemicals from Microalgae* . Taylor and Francis, London, pp. 57–92.
- Molina-Grima, E., Fernández-Sevilla, J.M., Sánchez-Pérez, J.A. & García-Camacho, F.**, 1996. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology* 45, 59–69.
- Molina-Grima, E., García, F., Sánchez, J.A., Fernández, J.M., Acien, F.G., Contreras, A.**, 1994. A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *J Chem Technol Biotechnol* 61:167–173.
- Müller-Navarra, D.**, 2000. A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* 403:74–7.
- Nettleton, J.A.**, 1993. Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development? *Journal of the American Dietetic Association*, 93, pp: 58-64.

**Kaynaklar (devam ediyör)**

- Nettleton, J.A. and Katz, R.**, 2005. n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: A review. *Journal of the American Dietetic Association*, 105, pp:428-440
- Okauchi, M.**, 1991. The status of phytoplankton production in Japan. In: Fulks, W., Main, K.L. (Eds.), *Rotifers and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a US-Asia Workshop*. The Oceanic Institute, Honolulu, HI, pp. 247- 256
- Ötles, S., and Pire, R.**, 2001. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *J. AOAC International* 84: 1708-1714.
- Owens T.G., Gallagher J.C., Alberte R.S.**, 1987. Photosynthetic lightharvesting function of violaxanthin in *Nannochloropsis spp.* (Eustigmatophyceae). *J. Phycol.* 23: 79-85.
- Patterson, G.W., Tsita-Tsardis, E., Wikfors, G.H., Gladu, P.K., Chitwoods, D.J., and Harrison, D.** 1994. Sterols and alkenones of *Isochrysis*. *Phytochemistry* 35: 1233-1236.
- Piorreck, M., Baasch, K.H. and Pohl, P.**, 1984. Biomass production, total protein, Chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23:207-216.

**Kaynaklar (devam ediyor)**

- Price, N.M., Cochlan, W.P. and Harrison, P.J.**, 1985. Time course of uptake of inorganic and organic nitrogen by phytoplankton in the Strait of Georgia: comparison of frontal and stratified communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 27:39-53.
- Qiang, H. and Richmond, A.**, 1994. Optimizing the population density in *Isochrysis galbana* grown outdoors in a glass column photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 6: 391–396.
- Qiang, H., Faiman, D. and Richmond, A.**, 1998. Optimal tilt angles of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Volume 85:pp 230-236.
- Richmond, A.**, 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *J. appl. Phycol.* 12: 441–451.
- Rodolfi, L., Zittelli G.C., Barsanti L., Rosati G. and Tredici, M.R.**, 2003. Growth medium recycling in *Nannochloropsis sp.* mass cultivation. *Biomolecular Engineering* 20: 243-248
- Roessler, P. G.**, 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* 26:393–399.
- Sánchez M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L.M. and Montero O.**, 2005. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Food Engineering* 66: 245–251.

**Kaynaklar (devam ediyör)**

- Schneider, J., and Roessler, P.,** 1994. Radilabeling studies of lipids and fatty acids in *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), an oleaginous marine alga. *Journal of Phycology* 30: 594-598.
- Seto A, Kumasaka K, Hosaka M, Kojima E, Kashiwakura M, Kato T.,** 1992. Production of eicosapentaenoic acid by marine microalgae and its commercial utilization for aquaculture. In Kyle DJ, Ratledge C (eds), *Industrial Applications of Single Cell Oils*. American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, pp. 219–234.
- Shifrin, N.S. and Chisholm, S.W.,** 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and lightdark cycles. *Journal Phycol.* 17:372–84.
- Simopolous, A.P.,** 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 560–569.
- Singh, G. and Chandra, R.K.,** 1988. Biochemical and cellular effects offish and fish oils. *Prog. Food Nutr,* 12: 371-419.
- Sukenik, A. Yamaguchi, Y. And Livne, A.,** 1993a, Alterations in lipid molecular species of the marine Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal Phycology,* 29: 620-626.
- Sukenik, A.,** 1991. Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Bioresource Technol.* 35 (3), 263–269.

**Kaynaklar (devam ediyor)**

- Sukenik, A.**, 1999. Production of EPA by marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*. In: Cohen E, ed. Chemicals from Microalgae. London: Taylor & Francis.
- Sukenik, A., Carmeli, Y., Berner, T.**, 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. Journal Phycology 25: 686–692.
- Sukenik, A., Zmora, O., Carmeli, Y.**, 1993b. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition: II. *Nannochloropsis* sp. Aquaculture 117, 313–326.
- Syrett, P.J.**, 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. In platt, T. (eds). Physiological Basis of Phytoplankton Ecology. Can. Bull. Fish. Aqual. Sci. 210:182-210.
- Tago, A. and Teshima, S.**, 2002. Preparation Of [13C] Eicosapentaenoic Acid By *Nannochloropsis oculata*. Fisheries Science 68: 452–454.
- Thompson, P.A., Levasseur, M.E. and Harrison, P.J.**, 1989. Light-limited growth on ammonium vs. nitrate: what is the advantage of marine phytoplankton? Limnol. Oceanogr. 34:1014-1024.
- Utting, S.D.**, 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. Aquacult. Engng. 4: 175–190.

**Kaynaklar (devam ediyor)**

- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. and Núñez-Cebrero, F.,** 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) culture with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacult. Eng.* 20, 135–147.
- Volkman, J.K., Brown, M.R., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W.,** 1993. The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae. *J. Phycol.* 29: 69–78
- Xu, F., Cai, Z., Cong, W. and Ouyang, F.,** 2004. Growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis sp.* Grown mixotrophically in fed-batch culture. *Biotechnology Letters* 26: 1319–1322.
- Xu, N., Zhang, X., Fan, X., Han, L. and Zeng, C.,** 2001. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion sp.* (Eustigmatophyta). *J. Applied Phycology* 13: 463–469.
- Yanar Y, Celik M, Yanar M.,** 2004. Seasonal changes in total carotenoid contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and *Metapenaeus monoceros*) inhabiting the eastern Mediterranean. *Food Chemistry* 88 (2): 267-269.
- Yongmanitchai, W., Ward, O.P.,** 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(2): 419–425.
- Zar, J.H.,** 1999. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River, Prentice Hall, New Jersey. 4<sup>th</sup> Edition. *cap 12*, USA. 231-272.



**Kaynaklar (devam ediyor)**

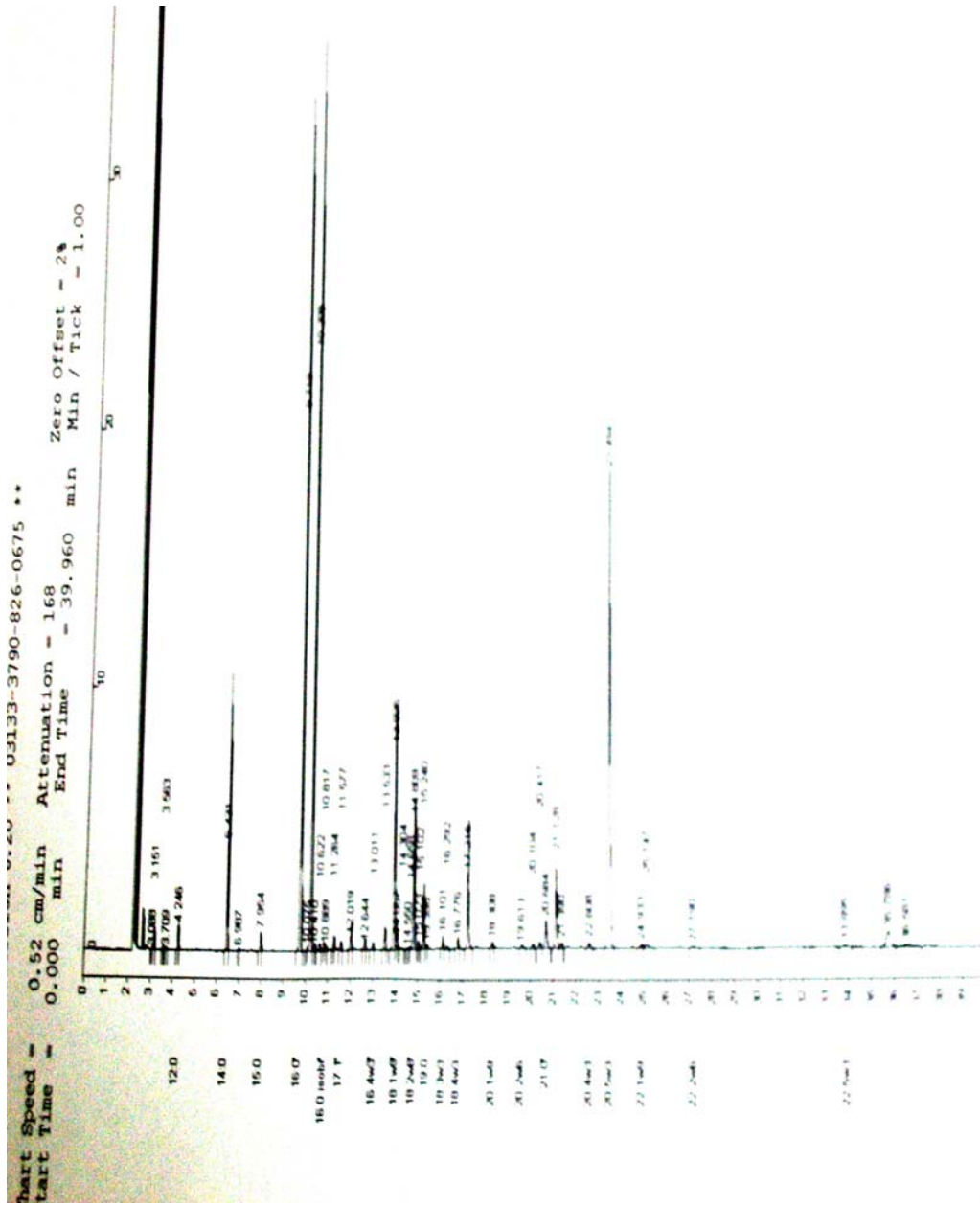
- Ziegler, R.G., Colavito, E.A., Hartge, P., McAdams, M.J., Schoenberg, J.B., Mason, T.J., Fraumeni, J.F.J., 1996.** Importance of a-carotene, b-carotene and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 612–615.
- Zittelli G., Rodolfi L. and Tredici, M.R., 2004.** Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products- species of high potential, in *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, Richmond, A. (Eds) Blackwell publishing company, pp. 298-303.
- Zittelli G, Lavista F, Bastianini A, Rodolfi L, Vincenzini M, Tredici MR., 1999.** Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J. Biotech.* 70: 299–312.
- Zou, N. and Richmond, A., 1999.** Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp. *J. Biotech.* 70: 351–356.
- Zou, N. and Richmond, A., 2000.** Light-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Journal of Applied Phycology* 12: 349–354.

**EK AÇIKLAMALAR A**

Çizelge Ek A1. Yağ asitleri Tablosu

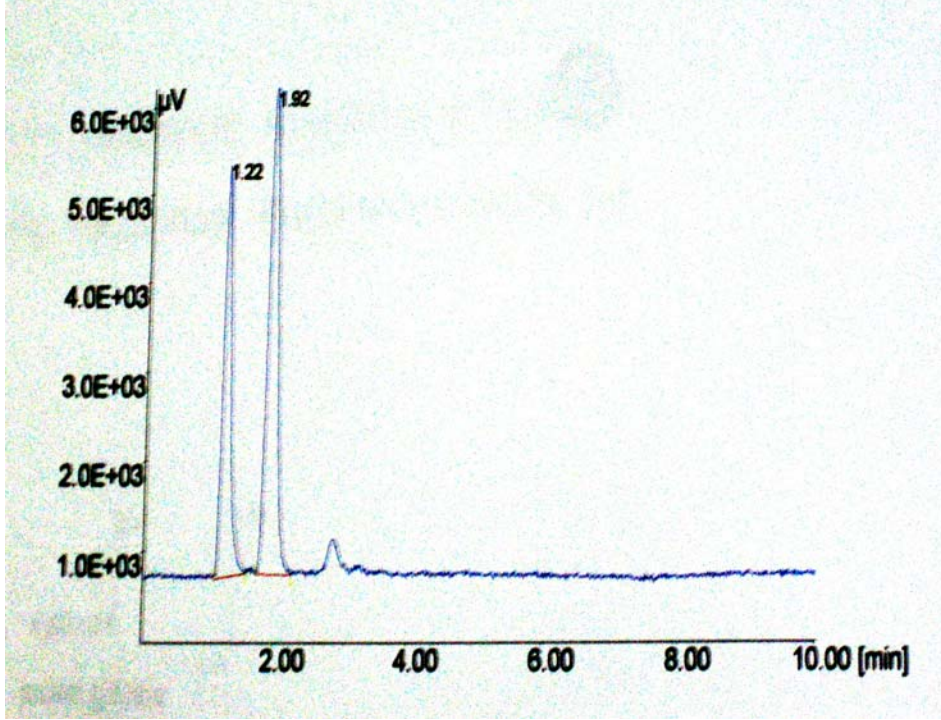
Bilimsel İsim	Moleküler İsim	Yaygın İsim
Doymuş Yağ Asitleri		
tetradecanoic acid	14:0	myristic acid
hexadecanoic acid	16:0	palmitic acid
octadecanoic acid	18:0	stearic acid
eicosanoic acid	20:0	arachidic acid
docsosanoic acid	22:0	behenic acid
Tek Doymamış Yağ Asitleri		
9-tetradecenoic acid	14:1 ω5	myristoleic acid
9-hexadecenoic acid	16:1 ω7	palmitoleic acid
11-octadecenoic acid	18:1 ω7	vaccenic acid
9-octadenoic acid	18:1 ω9	oleic acid
11-eicosenoic acid	20:1 ω9	eicosenoic acid
5,8,11-eicosatrienoic acid	20:3 ω9	mead acid
13-docosenoic acid	22:1 ω9	erucic acid
Çok Doymamış Yağ asitleri - Omega 3 Ailesi (ω3)		
9,12,15-octadecatrienoic acid	18:3 ω3	α-linolenic acid (ALA)
6,9,12,15-octadecatetraenoic acid	18:4 ω3	stearidonic acid
11,14,17-eicosatrienoic acid	20:3 ω3	eicosatrienoic acid (ETA)
8,11,14,17-eicsoatetraenoic acid	20:4 ω3	eicsoatetraenoic acid
5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	20:5 ω3	eicosapentaenoic acid (EPA)
7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid	22:5 ω3	docosapentaenoic acid (DPA)
4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid	22:6 ω3	docosahexaenoic acid (DHA)
6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoic acid	24:6 ω3	tetracosahexaenoic acid
Çok Doymamış Yağ asitleri - Omega 6 Ailesi (ω6)		
9,12-octadecadienoic acid	18:2 ω6	linoleic acid (LA)
6,9,12-octadecatrienoic acid	18:3 ω6	g-linolenic acid (GLA)
11,14-eicosadienoic acid	20:2 ω6	eicosadienoic acid
8,11,14-eicosatrienoic acid	20:3 ω6	homo-g-linolenic acid
5,8,11,14-eicosatetraenoic acid	20:4 ω6	arachidonic acid (ARA)
13,16-docosadienoic acid	22:2 ω6	docosadienoic acid
7,10,13,16-docosatetraenoic acid	22:4 ω6	docosatetraenoic acid

## Ek Açıklamalar A (Devam ediyor)



Şekil Ek A1. Gaz kromatografisi ile yapılan fatty asit analiz grafik çıktısı

## Ek Açıklamalar A (Devam ediyor)



Şekil Ek A2. HPCL ile yapılan  $\alpha$ -tocoferol analiz sonucundaki grafik çıktısı

**EK AÇIKLAMALAR B**

Şekil Ek B1. Edward marka freez.dry cihazı görüntüsü

**Ek Açıklamalar B (Devam ediyor)**

Şekil Ek B2. Coulter EPICS XL, ( Beckman Company. Miami, FL) hücre sayma cihazı görüntüsü



Şekil Ek B3. JASCO Model AS-950-10 model enjektöre ve florasan dedektöre sahip HPLC' (JASCO model 980 (Japan) cihazın görüntüsü

**Ek Açıklamalar B (Devam ediyor)**

Şekil Ek B4 Varian Star 3800 Cx (Walnut Creek, CA) gaz kromatografisi görüntüsü

## **ÖZGEÇMİŞ**

Yaşar DURMAZ 08.03.1974 yılında Konya'nın Cihanbeyli İlçesinde doğdu. İlkokulu, ortaokulu ve lise'yi Cihanbeyli'de tamamladıktan sonra Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesini kazandı. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden 1996 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 1997 yılında Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nin açmış olduğu Araştırma Görevlisi sınavını kazandı ve o yıldan beri görev yapmaktadır. 2000 yılında yüksek lisans tezi çalışmaları için İsrail'de Ben-Gurion Üniversitesi'nde 1 ay süre ile mikroalg kültür çalışmaları yaptıktan sonra yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü'nde doktora eğitimine başladı. 2002 yılında Portekiz'in Balıkçılık ve Deniz Ürünleri Araştırma Enstitüsünde mikroalg kültürlerinde fatty asit, tokoferol, sterol ve karoten analizleri konusunda 3 aylık araştırmada bulundu. 2004 yılında tez çalışmalarını tamamlamak amacıyla 6 aylık süre boyunca aynı enstitüde bulundu.



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>KABUL VE ONAY SAYFASI.....</b>	<b>III</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>IX</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>XI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>XV</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ .....</b>	<b>XIX</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>27</b>
2.1 TÜRÜN ÖZELLİKLERİ .....	27
2.1.1. <i>N. oculata</i> 'nın Sistematikteki Yeri.....	27
2.1.2. <i>N.oculata</i> 'nın Biyolojisi .....	27
2.2. <i>N.oculata</i> 'da Pigmentler.....	29
2.3. AZOT KAYNAKLARI.....	31
2.4. YAĞ ASİTLERİ .....	34
2.5. $\alpha$ -TOKOFEROL.....	38
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>40</b>
3.1. ORGANİZMA .....	40
3.2. KÜLTÜR ORTAMI VE DENEY DÜZENEĞİ .....	40
3.4. KÜLTÜR KOŞULLARI .....	42
3.5. ÖRNEKLERİN ALIMI.....	44
3.6. ANALİTİK ÖLÇÜMLER.....	44

3.6.1. Hücre Sayısı .....	44
3.6.2. Pigment Analizi .....	45
3.6.3. $\alpha$ -tokoferol Analizi .....	46
3.6.4. Yağ Asitleri Analizi.....	47
3.6.5. İstatistik Analiz.....	48
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>49</b>
4.1. ZAMANA BAĞLI HÜCRE SAYISI DEĞİŞİMLERİ .....	49
4.1.1. $NO_3^-$ -N Denemesi .....	49
4.1.2. $NH_4^+$ -N Denemesi.....	51
4.1.3. Üre-N Denemesi.....	53
4.2. BÜYÜME FAZLARINA, AZOT BİLEŞİKLERİ VE KONSANTRASYONLARINA BAĞLI TOPLAM KAROTEN VE KLOROFİL-A DEĞİŞİMLERİ .....	55
4.2.1. Toplam Karoten.....	55
4.2.2. Klorofil-a.....	58
4.2.2. TLC Analizi .....	62
4.3. BÜYÜME FAZLARI İLE FARKLI AZOT KAYNAKLARI KONSANTRASYONLARINA BAĞLI $\alpha$ -TOKOFEROL DEĞİŞİMLERİ.....	65
4.4. BÜYÜME FAZLARI İLE AZOT KAYNAKLARI KONSANTRASYONLARINA BAĞLI YAĞ ASİTLERİ DEĞİŞİMLERİ .....	67
4.4.1 $NO_3^-$ -N Denemesi .....	67
4.4.2 $NH_4^+$ -N Denemesi.....	70
4.4.3. Üre -N Denemesi.....	74
4.5. BÜYÜME FAZLARI İLE AZOT KAYNAKLARI KONSANTRASYONLARINA BAĞLI YAĞ ASİTLERİ İÇERİSİNDEKİ $\Omega$ -3, $\Omega$ -6 VE EPA DEĞİŞİMLERİ.....	77
<b>5. SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>	<b>81</b>
<b>6. ÖNERİLER.....</b>	<b>89</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>91</b>
<b>EK AÇIKLAMALAR A.....</b>	<b>106</b>

**EK AÇIKLAMALAR B.....109**

**ÖZGEÇMİŞ.....112**