

Yaşar ALUÇ

Doktora Tezi

KÜ 2015

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

BAZI MİKROALGLERDEN KAROTENOİD EKSTRAKSİYONU VE  
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Yaşar ALUÇ

ARALIK 2015

**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**DOKTORA TEZİ**

**BAZI MİKROALGLERDEN KAROTENOİD EKSTRAKSİYONU VE**  
**ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Yaşar ALUÇ**

**ARALIK 2015**

**Biyoloji Anabilim Dalında** YAŞAR ALUÇ tarafından hazırlanan BAZI MİKROALGLERDEN KARETONEOİD EKSTRAKSİYONU VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

...../...../.....

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Doktora Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan	: Prof. Dr. Ahmet ALTINDAĞ	_____
Üye (Danışman)	: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN	_____
Üye	: Prof. Dr. Siyami KARAHAN	_____
Üye	: Doç. Dr. Seyhan AHISKA	_____
Üye	: Doç Dr. Mustafa TÜRK	_____

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



*ALCANTARA*

## ÖZET

### BAZI MİKROALGLERDEN KAROTENOID EKSTRAKSİYONU VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

ALUÇ, YAŞAR

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Aralık 2015, 112 sayfa

Bu çalışmada, insan sağlığı üzerinde etkili olan karotenoidlerin, mikroalglerden elde edilme imkânları ve olası antioksidatif potansiyelleri incelenmiştir.

Kırıkkale ili çevresindeki sucul ortamlardan izole edilen 3 farklı mikroalg türünün inverted mikroskop ve Scaning Elektron Mikroskop görüntüleri çekilerek teşhisleri yapılmıştır. Mikroalglerin büyüme ortamı olarak Tris-Asetat-Fosfat besiyeri (TAP), Basal Bold Medium (BBM), Sager-Granick (SG) ve BG-11 besiyerleri kullanılmış; üretim aşamasında gerekli sayım, Klorofil *a*, kuru ağırlık ölçümleri yapılmıştır. *Scenedesmus* sp. (SCN), *Chlorella* sp. (CHLR) ve *Chlamydomonas* sp. (CHLMY) türlerine ait biyomaslardan yapılan ekstraksiyon işlemini takiben, HPLC-TOF-MS cihazı

kullanılarak karotenoid türevlerinin kalitatif ve kantitatif ölçümleri yapılmıştır. Bu verilere göre; All Trans Lutein, All Trans Zeaksantin, Beta Kriptosantin, All Trans Beta Karoten değerleri sırasıyla CHLR türü için;  $32.85 \pm 1.04$ ,  $1.16 \pm 0.12$ ,  $0.4 \pm 0.06$ ,  $6.35 \pm 1.56$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ 'dir. CHLMY türü için;  $15.60 \pm 3.20$ ,  $1.71 \pm 0.09$ ,  $0.20 \pm 0.03$ ,  $4.18 \pm 1.72$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ . SCN türü için ise;  $14.96 \pm 0.62$ ,  $0.85 \pm 0.13$ ,  $0.45 \pm 0.09$ ,  $7.16 \pm 1.23$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  olarak bulunmuştur. Bu türler arasında toplam karoten miktarı en fazla  $40.76$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  olarak CHLR türü bulunmuştur. Tüm türlerde All Trans Lutein miktarı en fazla bulunmuştur.

Ayrıca; bu çalışmada izole edilen 3 farklı mikroalg türünün ekstraktları DPPH ve FRAP ölçüm metodu kullanılarak antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Türler arasında SCN' nin en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Disk Difüzyon ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) metotları kullanılarak antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda Disk Difüzyon metodunda herhangi bir aktiviteye rastlanmazken, MİK yöntemiyle türlerin hepsinde antimikrobiyal aktivite saptanmıştır. *Staphylococcus aureus* (*S. Aerius*) ve *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) bakterileri için en düşük inhibisyon konsantrasyonu  $12.5$  mg ile CHLMY, *Escherichia coli* (*E coli*) bakterisi için en düşük inhibisyon konsantrasyonu  $25$ mg ile CHLMY, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) bakterisi için herhangi bir aktivite saptanmamış olup bir maya olan *Candida albicans* (*C. albicans*) mikroorganizması için ise  $25$  mg ile CHLMY türü en fazla aktivite göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mikroalg, Karotenoid, HPLC, DPPH, Frap yöntemi  
Antioksidan etki, Antimikrobiyal aktivite

## ABSTRACT

Carotenoid Extraction from Some Algae and Antioxidant Activities of Extracts

ALUÇ, YAŞAR

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph.D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

December 2015, 112 sayfa

In this study, carotenoids, known to have health effects on human being, are investigated to find out whether a yield of them from microalgae might be obtained and, have probable antioxidative potential.

Three different algal species, obtained from aquatic habitats in Kırıkkale province, were identified by using Inverted and Scanning Electron Microscope. Growth media for microalga were Tris-Asetat-Fosfat (TAP), Basal Bold Medium (BBM), Sager-Granick (SG) and BG-11. Cell counting, Chlorophyll-a and dry biomass measurements were all made during growth phases. Growth media for microalga were Tris-Asetat-Fosfat (TAP), Basal Bold Medium (BBM), Sager-Granick (SG) and BG-11. Cell counting, Chlorophyll-a and dry biomass measurements were all made during growth phases. Following the extraction obtained from the biomasses belonging to

each algal species, namely, *Schenedesmus* sp. (SCN), *Chlorella* sp. (CHLR) and *Chlamydomonas* sp. (CHLMY) qualitative and quantitative measurements were made using HPLC-TOF-MS. The measured values of All Trans Lutein, All Trans Zeaxanthin, Beta Cryptoxanthin, All Trans Beta Caroten were  $32.85 \pm 1.04$ ,  $1.16 \pm 0.12$ ,  $0.4 \pm 0.06$ ,  $6.35 \pm 1.56$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ . for CHLR;  $15.60 \pm 3.20$ ,  $1.71 \pm 0.09$ ,  $0.20 \pm 0.03$ ,  $4.18 \pm 1.72$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ . for CHLMY and  $14.96 \pm 0.62$ ,  $0.85 \pm 0.13$ ,  $0.45 \pm 0.09$ ,  $7.16 \pm 1.23$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  for SCN., respectively. The amount of All Trans Lutein was the highest for all species.

Besides, antioxidant activities of each extract from 3 different algae species was measured using DPPH and FRAP methods. Of all, SCN extract showed the highest antioxidant activity. Disc Diffusion (DD) and Minimum Inhibition Concentration (MIC) methods were applied to determine antimicrobial activities of extracts. Whereas no activity was detected in the DD method, MIC methods revealed some certain level of activities for all extracts. While the lowest inhibition concentration to *Staphylococcus aureus* (S. Aeriis) and *Enterococcus faecalis* (E. Faecalis) was found to be 12.5 mg for CHLMY extracts, the corresponding values to E. coli bacteria was 25 mg for CHLMY extracts. No antimicrobial activity to *Bacillus subtilis* (B.subtilis) was found for any extract. A yeast species, *Candida albicans* (C. albicans) was deactivated by a highest value of 25 mg for CHLMY extracts.

**Key words:** Microalg, Carotenoid, Hplc, DPPH, Frap methods, Antioxidant effect, Antimicrobial activity.



## TEŞEKKÜR

Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından finanse edilen bu çalışmada öncelikle Kırıkkale Üniversitesi Rektörlüğü'ne teőekkürü bir borç bilirim. Tezin hazırlanması esnasında, her türlü bilgi ve deneyimleri ile daima desteğini aldığım tez yöneticisi hocam, Sayın Prof. Dr. İlhami TÜZÜN'e teşekkür ederim. Laboratuvar alışmaları esnasındaki yardımlarını esirgemeyen Barış Aydın ERGÜN'e ve Ümit Haydar EROL'a ayrıca; antimikrobiyal aktivite çalışmasında verdiği destek ve yardımları için Aytuna eri'ye teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarındaki deneyim ve tecrübelerini esirgemeyen ve maddi manevi katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Özlem İNCE YILMAZ'a teşekkür ederim. Hem laboratuvar çalışmaları hem de tez yazım aşamasında ki büyük katkılarından dolayı Dr. Gökben BAŞARAN ve Uzman Biyolog Sibel ÖZKAN'a, teşekkür ederim.

Bütün sabırlarından dolayı eşim Derya ALUÇ'a şükranlarımı sunarım.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1.GİRİŞ .....	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ .....	3
2.1. Mikroalgler ve Önemi.....	3
2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar .....	7
2.3. Karotenoidlerin Yapısı Ve Önemi.....	9
2.4. Alglerde Bulunan Bazı Karotenoid Çeşitleri .....	16
2.4.1. $\beta$ -karoten .....	16
2.4.2. $\alpha$ -karoten .....	17
2.4.3. Astaksantin .....	18
2.4.4. Likopen.....	19
2.4.5. Lutein ve Zeaksantin .....	20
2.4.6. Kantaksantin.....	21
2.4.7. Fukosantin .....	22
2.5. Karotenoidlerin Biyosentezi .....	23
2.6. Karotenoidlerin Sağlık Üzerine Etkileri.....	26

2.7. Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivite .....	29
2.9. Çalışılan Alglerin Taksonomisi ve Genel Özellikleri .....	33
2.9.1. <i>Chlorella</i> sp. Genel Özellikleri .....	33
2.9.2. <i>Scenedesmus</i> sp. Genel Özellikleri .....	34
2.9.3. <i>Chlamydomonas</i> sp. Genel Özellikleri .....	35
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>38</b>
3.1. Kültür Ortamları .....	38
3.2. Kültür sistemleri (Fotobiyoreaktörler) .....	40
3.3. Stok Kültür Hazırlanması .....	43
3.4. Ekimi Yapılan Türlerin Sayım İşlemi .....	43
3.5. Ekimi Yapılan Türlerin Klorofil a Tayini .....	44
3.6. Ekimi Yapılan Türlerin Kuru Ağırlık Ölçümü .....	44
3.7. Ekimi Yapılan Türlerin Hasat İşlemi .....	45
3.8. HPLC-MS Cihazı Çalışması .....	45
3.8.1. Alg Ekstraktlarının Hazırlanması .....	45
3.8.2. Karotenoid Standart Çözeltilerinin Hazırlanması .....	46
3.8.3. Karotenoidlerin Belirlenmesi İçin Uygulanan HPLC Metodu ....	47
3.8.4. Karotenoid Piklerinin Tanımlanması Ve Hesaplanması .....	48
3.9. Antimikrobiyal Aktivite Çalışması .....	50
3.9.1. Antimikrobiyal Aktivite Tespitinde Kullanılan Mikroorganizmaların Üretimi .....	50
3.9.2. Antimikrobiyal Aktivite İçin Alg Ekstraksiyon Yöntemi .....	51
3.9.3. Disk difüzyon metodu .....	52
3.9.4. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu .....	52
3.10. Antioksidan Aktivite Ölçümü .....	53

3.10.1. DPPH Yöntemi ile Ölçüm .....	53
3.10.2. FRAP Yöntemi.....	56
3.11. Taramalı Elektron Mikroskobu İçin Numune Hazırlama.....	58
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>59</b>
4.1. <i>Chlorella</i> sp. Analiz Sonuçları .....	59
4.1.1. <i>Chlorella</i> sp.'nin Klorofil a Miktarındaki Değişim .....	59
4.1.2. <i>Chlorella</i> sp. Işık Mikroskobu ve SEM Görüntüleri .....	60
4.1.3. <i>Chlorella</i> sp. Karotenoid Analizi.....	62
4.1.4. <i>Chlorella</i> sp. Antioksidan Sonuçları .....	62
4.1.4.1. <i>Chlorella</i> sp. DPPH Sonuçları .....	62
4.1.4.2. <i>Chlorella</i> sp. Türüne Ait FRAP Sonuçları .....	63
4.1.5. <i>Chlorella</i> sp. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Test Sonuçları.....	64
4.2. <i>Chlamydomonas</i> sp. Analiz Sonuçları .....	66
4.2.1. <i>Chlamydomonas</i> sp. Klorofil a Miktarındaki Değişim.....	66
4.2.2. <i>Chlamydomonas</i> sp. Işık Mikroskobu ve SEM Görüntüleri.....	67
4.2.3. <i>Chlamydomonas</i> sp. Türüne Ait Karotenoid Analizi.....	69
4.2.4. <i>Chlamydomonas</i> sp. Türüne Ait Antioksidan Sonuçları.....	69
4.2.4.1. <i>Chlamydomonas</i> sp. Türüne Ait DPPH Sonuçları.....	69
4.2.4.2. <i>Chlamydomonas</i> sp. Türüne Ait FRAP Sonuçları .....	70
4.2.5. <i>Chlamydomonas</i> sp. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Test Sonuçları.....	71
4.3. <i>Scenedesmus</i> sp. Türüne Ait Analiz Sonuçları .....	73
4.3.1. <i>Scenedesmus</i> sp. Türünün Biyokütlesinin Zamana Bağlı Değişimi .....	73

4.3.2. <i>Scenedesmus</i> sp. Türüne Ait Işık Mikroskobu ve SEM	
Görüntüleri .....	74
4.3.3. <i>Scenedesmus</i> sp. Türüne Ait Karetenoid Analizi.....	76
4.3.4. <i>Scenedesmus</i> sp. Türüne Ait Antioksidan Sonuçları .....	76
4.3.4.1. <i>Scenedesmus</i> sp. Türüne Ait DPPH Sonuçları .....	76
4.3.4.2. <i>Scenedesmus</i> sp. Türüne Ait FRAP Sonuçları .....	77
4.3.5. <i>Scenedesmus</i> sp. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Test	
Sonuçları.....	78
4.4. incelenen Türlere Ait Antioksidan Testlerinin (DPPH ve FRAP)	
Zamana Bağlı Değişimi .....	80
4.6. Çalışılan Türlere Ait Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları .....	82
4.6.1 Disk Difüzyon Metodu.....	82
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	84
5.1. Sonuç ve Değerlendirme .....	90
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>92</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>111</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### ÇİZELGE

### Sayfa

2.1. Alglerden elde edilen pigment çeşitleri ve kaynak türleri.....	5
2.2. Bazı karotenoidlerin UV ve görünür bölgedeki maksimum absorbsiyon dalga boyları, $\lambda_{max}$ .....	14
3.1. TAP besiyeri içeriği .....	38
3.2. BG-11 besiyeri içeriği .....	39
3.3. Sager And Granick besiyeri .....	39
3.4. Bold's Basal Medium .....	40
3.5. Karotenoid standart solüsyon oranları .....	47
4.1. <i>Chlorella</i> sp karoten miktarı $\mu\text{g}/\text{mg}$ cinsinden derişimi.....	62
4.2. <i>Chlorella</i> sp Minimum İnhibisyon Konsantrasyon sonuçları .....	66
4.3. <i>Chlamydomonas</i> sp karoten miktarları $\mu\text{g}/\text{mg}$ cinsinden derişimi ....	69
4.4. <i>Chlamydomonas</i> sp Minimum İnhibisyon Konsantrasyon sonuçları..	73
4.5. <i>Scenedesmus</i> sp. karoten miktarı $\mu\text{g}/\text{mg}$ cinsinden derişimi .....	76
4.6. <i>Scenedesmus</i> sp Minimum İnhibisyon Konsantrasyon sonuçları.....	80
4.7. Analizi yapılan türlere ait disk difüzyon antimikrobiyal sonuçları .....	82

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Karotenoidlerin sınıflandırılması.....	11
2.2. $\beta$ -karotenin yapısı .....	17
2.3. $\alpha$ -karotenin yapısı .....	18
2.4. Astaksantin yapısı.....	18
2.5. Likopenin yapısı .....	19
2.6. Luteinin yapısı.....	20
2.7. Zeaksantin yapısı .....	21
2.8. Kantaksantin yapısı.....	21
2.9. Fukosantin yapısı .....	22
2.10. Karotenoidlerin biyosentezi (Britton 1992) .....	24
2.11. Karotenoidlerin dönüşüm ve biosentez aşamaları. ....	25
3.1. Kültürlerde kullanılan fotobiyoreaktör şeması ve fotoğrafı.....	41
3.2.a. Deneyleerde kullanılan aşı kültür örnekleri .....	41
3.2.b. Kültür odasında fotobiyoreaktörde alg üretimi.....	42
3.3. All Trans Beta-Karoten Kalibrason Grafiği .....	48
3.4. All Trans Lutein Kalibrason Grafiği.....	49
3.5. Beta Kriptosantin Kalibrason Grafiği .....	49
3.6. Zeaksantin Kalibrason Grafiği.....	50
3.7. DPPH deneyi pozitif kontrolü BHT' nin kalibrasyon eğrisi .....	55
3.8. DPPH deneyi pozitif kontrolü ASC' nin kalibrasyon eğrisi.....	55

3.9. FRAP deneyi pozitif kontrolü ASC' nin kalibrasyon eğrisi .....	57
3.10. FRAP deneyi pozitif kontrolü BHT' nin kalibrasyon eğrisi .....	57
4.1. <i>Chlorella</i> sp. türüne ait klorofil a pigmentinin zamana bağlı değişimi.....	60
4.2. <i>Chlorella</i> sp. 10x40 inverted mikroskop görüntüsü .....	61
4.3. <i>Chlorella</i> sp. elektron mikroskop görüntüsü .....	61
4.4. <i>Chlorella</i> sp. türüne ait DPPH süpürme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi.....	63
4.5. <i>Chlorella</i> sp. türüne ait FRAP indirgeme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi.....	64
4.6. <i>Chlorella</i> sp. türüne ait MİK testi fotoğrafları .....	65
4.7. <i>Chlamydomonas</i> sp. türüne ait klorofil a pigmentinin zamana bağlı değişimi .....	67
4.8. <i>Chlamydomonas</i> sp. 10x40 inverted mikroskop görüntüsü.....	68
4.9. <i>Chlamydomonas</i> sp. elektron mikroskop görüntüsü .....	68
4.10. <i>Chlamydomonas</i> sp. türüne ait DPPH süpürme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi.....	70
4.11. <i>Chlamydomonas</i> sp. türüne ait FRAP indirgeme aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	71
4.12. <i>Chlamydomonas</i> sp. türüne ait MİK testi fotoğrafları .....	72
4.13. <i>Scenedesmus</i> sp. Klorofil a pigmentinin zamana bağlı değişimi ...	74
4.14. <i>Scenedesmus</i> sp. 10x40 inverted mikroskop görüntüsü .....	75
4.15. <i>Scenedesmus</i> sp. elektron mikroskop görüntüsü .....	75
4.16. <i>Scenedesmus</i> sp. türüne ait DPPH süpürme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi .....	77
4.17. <i>Scenedesmus</i> sp. türüne ait FRAP indirgeme	



aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi .....	78
4.18. <i>Scenedesmus</i> sp. tőrüne ait MİK testi fotoğrafları .....	79
4.19. Çalışılan alg tőrleri ve pozitif kontrollerin DPPH % inhibisyonun zamana bağlı değişimi.....	81
4.20. Çalışılan alg tőrleri ve pozitif kontrollerin FRAP indirgeme gücünün zamana bağlı değişimi .....	81
4.21. Antimikrobiale çalışmalarda kullanılan mikroorganizmaların sonuç fotoğrafları .....	83



## KISALTMALAR DİZİNİ

ROS	Reaktif Oksijen Türleri
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit radikali
$H_2O_2$	Hidrojen peroksit
$OH^{\cdot}$	Hidroksil radikali
MVA	Mevalonik asit
GGDP	Geranilgeranil difosfat
PPDP	Prefitoen difosfat
FDA	ABD Gıda ve İlaç Uygulamaları
HAT	Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar
ET	Tek elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar
ORAC	Oksijen radikal absorban kapasitesi
TRAP	Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
TEAC	Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
FRAP	Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü
CUPRAC	(Bakır II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi

DPPH	2,2-Diphenyl-1-picryrhydrazyl
IC50	Etkin konsantrasyon
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
CHLR	<i>Chlorella</i> sp.
SCN	<i>Scenedesmus</i> sp.
CHLMY	<i>Chlamydomonas</i> sp.
TAP	Tris-Asetat-Fosfat besiyeri
BBM	Bold's Basal Medium
BG-11	Blue Green Algae besiyeri
S&G	Sager ve Granick besiyeri
µg	Mikrogram
mg	Miligram
L	Litre
nm	Nanometre
Klo-a	Klorofil <i>a</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
CA	<i>Candida albicans</i>
CN	Gentamisin
TCA	Trikloroasetik asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

## 1. GİRİŞ

Yaşamımızı sürdürebilmemiz için gerekli olan oksijeni ve besinlerimizi sağlayan bitkilerin, tedavi amaçlı olarak da kullanımları antik çağlara kadar uzanmakta olup, M.Ö. 2700 yıllarında Kral Shen Nung, algleri ilk kullanan kişi olarak bilinmektedir. M.S. ise, tıp alanında ve besin maddesi olarak, Çin, Japonya ve Kore'de deniz algleri büyük öneme sahip olmuştur [1]. M.Ö. binli yıllardan beri tıbbi amaçlar için oldukça yaygın olarak kullanılan bitkiler; geleneksel, destekleyici ve alternatif tıp kapsamında doğrudan ilaç yahut ticari ilaç yapımında hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır [2].

Dünya Sağlık Örgütü tahminlerine göre dünya nüfusunun % 80'i ilk sağlık ihtiyaçları için bitkisel kökenli ilaçlara bağımlıdır [3]. Bir başka tahmine göre ise, kullanılan ilaçların gelişmiş ülkelerde %25'i, gelişmekte olan ülkelerde ise %75'i bitki ve bitki türevlerinden elde edilmektedir [4]. Günümüzde kullandığımız çok önemli ilaçların keşfi 1800'lü yıllardan itibaren halk arasında kullanılan bitkilerden biyoaktif organik bileşiklerin izolasyonu ile mümkün olmuştur. Bitkilerden izole edilen ilk aktif bileşikler striknin, morfin, atropin ve kolşisin gibi alkoloitlerdir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan ilaçlardan birisi olan aspirin; ilk kez 1897 yılında söğüt ağacının kabuklarından sentezlenerek ilaç dünyasına sunulmuştur.

Bitkilerden ekstrakte edilen başlıca maddeler; primer metabolitler ve sekonder metabolitler olarak ikiye ayrılırlar. Primer metabolitler; karbonhidratlar, proteinler, yağlar ve nükleik asitler gibi yaşamsal metabolitlerdir. Sentezlenme tüm organizmalarda benzer yollarla

gerçekleştirdiğinden primer metabolitler olarak adlandırılır [5]. Sekonder metabolitler ise; organizmanın hayatta kalmasını ve gelişmesini sağlamada, UV radyasyon ve ona benzer abiyotik stres faktörlerinin etkilerinin azaltılmasında veya giderilmesinde, ayrıca bakteri ve mantar mikroorganizmalarının engellenmesinde de görevlidirler. Sekonder metabolitler tüm organizmalarda bulunmamasından dolayı kemosistemik çalışmalar için tercih edilen bileşiklerdir [6].

Sucul ortamlarda çok önemli fonksiyonları olan ve sekonder metabolitler gibi maddelerin kolay ve hızlı bir biçimde elde edilebildiği çeşitli gruplara sahip olan algler; Klo-a içermesi, tek hücreli eşeysiz üreme özelliği sebebiyle mikroskobik canlılardan balıklara ve oradan da insana kadar uzanan besin zincirinin ilk basamağını oluşturmaktadır. Tatlı, tuzlu, acı ve sodalı sulardan kayalara, çöllerde hatta buzullara kadar yeryüzünün değişik ekosistemlerine adapte olmuş ve evrimsel olarak farklılaşmış fotototrofik organizmalardır. Çok zengin biyolojik çeşitliliğe sahip olan algler; sucul ortamda oldukça önemli bir yer işgal etmektedir. Tatlı ve tuzlu sularda, makro ve mikro formlarda, çok çeşitli yapı ve şekillerde olabilen bu canlılar, yeryüzünde yaşamın sürdürülebilmesinde anahtar rol oynamaktadırlar. Ayrıca, su sistemlerinde serbest azotun bağlanmasından, sudaki ve havada bulunan serbest oksijenin büyük bir kısmının üretiminden sorumlu olan özel mikroorganizmalardır [7].

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Mikroalgler ve Önemi

Mikroalgler; ışık enerjisinden organik bileşikler üretmeleri, yaşam döngülerinin hızlı ve kolay olması, çevresel şartlara uyum sağlayabilmeleri ve yüksek miktarda protein, lipit, karbonhidrat, vitamin ve pigmentler içermeleri nedeniyle yüksek ekonomik değere sahiptirler [8]. Mikroalgler; dünya genelinde 26.000'in üzerinde tür çeşidine sahip olup, taksonomik olarak 24 sınıfa ayrılmaktadır. Ayrıca içerdikleri renklere göre; mavi-yeşil algler (Cyanophyceae), yeşil algler (Chlorophyceae), diatomlar (Bacillariophyceae), sarı yeşil algler (Xanthophyceae), altın sarısı algler (Chrysophyceae), kırmızı algler (Rhodophyceae), kahverengi algler (Phaeophyceae), dinoflagellatlar (Dinophyceae) ve piko-plankton (Prasinophyceae ve Eustimatophyceae) gibi sınıflara ayrılmıştır [9].

Alg ürünlerinin başlıca ticari uygulamaları sırayla [10];

I- Gıda: Yetersiz beslenen çocuk ve yetişkinlerin beslenmesinde protein ilavesi olarak kullanımı

II-Yem: Kümes, inek, domuz, balık ve bivallerin beslenmesinde protein ve vitamin ilavesi olarak kullanımı

III-Sağlıklı Beslenme Ürünleri: Sağlıklı besin ürünlerinde algal biyokütlenin katkı ve destek amacıyla kullanımı.

IV- Terapötik: Deri kanseri tedavisinde  $\beta$ -karoten kullanımı.

Algal antibiyotikler tedavide, hidroksilazitlar deri metabolizmasını yükseltmekte ve prostaglandin  $\gamma$ -linoleik asit'i stimule etmektedir. İsootropik bileşikler kolesterol sentezini düzenlemektedir.

V- Pigmentler:  $\beta$ -karoten (Provitamin A) gıda renklendiricisi olarak gıdalara ilave edilmektedir. Ksantofiller tavuk ve balık beslenmesinde, fikobilinler gıda renklendirici, tanı kiti, kozmetik ve analitik ayıraç olarak kullanılmaktadır.

VI- Kimyasal Kaynak Olarak: Gliserol gıdalarda, farmasötiklerde, kozmetiklerde, meşrubatlarda kullanılmaktadır. Yağ asitleri, lipidler, vakslar, steroller, hidrokarbonlar, aminoasitler, enzimler, vitamin E ve C, polisakkaritler, yapıştırıcı ve iyon değiştirici olarak uygulanmaktadır.

VII- Uzun zincirli hidrokarbonlar ve esansiyel yağlar, yanabilir yağlar, yakıtlar, hidrojen ve biyogaz olarak kullanımı

VIII- Hormonlar; Oksinler, giberellinler ve sitokinler olarak kullanımı

IX- Diğerleri: Organik gübreler, toprak iyileştiriciler, atık arıtımında kullanılabilir. Mikroalglerin; gıda, yem, vitamin, pigment, gübre ve diğer özel kimyasalların hammadde kaynağı olarak kullanılacakları konusunda pek çok akademik çalışma yapılmış ve bunların çoğunda antibiyotik etkinliği incelenmiştir. Bir tatlısu yeşil algi olan *Chlorella vulgaris* üzerinde ilk antimikrobiyal aktivite çalışması 1940 yılında Pratt ve Fong tarafından yayınlanmış ve alglerin bakteriyostatik ve bakterisidal aktiviteye

sahip olduğunun anlaşılması ile geleneksel olarak tedavi amaçlı kullanıma sahip olabileceği birçok araştırmacı tarafından öne sürülmüştür [11-15].

Makroalglerden yaklaşık 3000 doğal ürün elde edilmekte olup bu kimyasallardan yaklaşık %20'si denizel alglerden elde edilmektedir. Makroalglerin dışında her yıl en az 300 sekonder metabolit bileşik yeşil alglerden elde edilmektedir [16]. Başlıca mikroalg pigmentleri; klorofil *a*, *b* ve *c*,  $\beta$ -karoten, fikosiyenin, ksantofiller ve fikoeritrin'dir. Bu pigmentler farmasötik ve kozmetik alanında büyük bir kullanım alanına sahiptir [17]. Alglerden elde edilen önemli sekonder metabolitlerden olan pigment çeşit ve kaynakları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Alglerden elde edilen pigment çeşitleri ve kaynak türleri

<b>Karotenoidler</b>	<b>Kaynak Türler</b>
B-karoten	<i>Dunaliella</i> türleri
Astaksantin	<i>Haematococcus pluvialis</i>
Lutein	Bazı yeşil algler ve mutant <i>Dunaliella</i> türleri
<b>Diğer pigmentler</b>	
Fikosiyenin	<i>Spirulina</i> ve diğer mavi-yeşil algler
Fikoeritrin	<i>Porphyra</i> , <i>Porphyridium</i> ve diğer kırmızı algler



1960'lardan itibaren laboratuvar deneyleri artmış %50'den fazla yeni ürün elde edilmiştir. Bu sayı düzenli olarak yıllık yaklaşık %10 oranında artmaktadır [18]. 2000 yılların başından beri yapılan araştırmaların %50'si mavi-yeşil alg ve mikroalg kimyası üzerine olmasına [16] rağmen bu çalışmalar farmasötik (etkin madde) ve antifouling (koruyucu madde) uygulamalarına doğru kaymıştır [19,20].

Bazı mikroalgler yüzyıllardır Doğu Asya, Kuzey Amerika ve Orta Afrika'nın bazı bölgelerinde yöresel topluluklar tarafından kurutulup besin olarak tüketilmektedir [21]. Bu mikroalglerin başında gelen *Chlorella*, tek hücre proteini olarak gıda desteği amacıyla insanlar tarafından kullanılmakta aynı zamanda akuakültürlerde yağ asitleri ve vitaminlerin primer kaynağı olarak balık yemlerine katılmaktadır. Yapılan bir araştırmada *Chlorella* tabletinde %93,1 oranında lutein, %2,6 oranında  $\beta$ -karoten ve aynı oranda  $\alpha$ -karoten'e ve ayrıca %1,3 zeaxantin ve %0,2 kriptosantin bulunduğu tespit edilmiştir. Hücrenin hayatta kalması için gerekli olan önemli yapısal ve işlevsel bileşenlerden biri olan lutein, hem yaşa bağlı maküler dejenerasyona karşı etkili olmakta, hem de kronik hastalıkların geciktirilmesini sağlamaktadır. Ayrıca erken aterosklerozun engellenmesinde önemli rol oynamaktadır [22].

Algler arasında en fazla sekonder metabolit elde edilen Rhodophyta'dan başta phlorotanninler olmak üzere 1500'den fazla bileşik elde edilmiştir [18]. Phaeophyceae (Kahverengi algler) grubundan ise yaklaşık olarak 1140 adet sekonder metabolit elde edilmiştir. Bu metabolitler içerisinde diterpenler, phlorotanninler, asetogeninler başlıcalarıdır [16].

Phlorotanninler kahverengi alglerin kuru ağırlığının %10–20'sini oluşturmaktadır [23,24].

## 2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Bir veya birden fazla eşleşmemiş elektronu bulunan atom ya da moleküllere serbest radikaller denir. Bu tip maddeler, eşleşmemiş elektronu olması sebebiyle oldukça reaktiftirler. Diğer moleküllerle çok hızlı reaksiyona giren ve kimyasal olarak kararlı hale gelebilmek için elektron almaya gereksinim duyan moleküllerdir ve kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam etmektedir. Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin (oksijen iyonu veya peroksit radikalleri), lipit, protein ve nükleik asitler gibi temel ve önemli biyolojik birimler ile etkileşime girerek onların fizyolojik fonksiyonlarını bozduğu bilinmektedir [25,26]. Bu çalışmaların daha çok gıdalarda bulunan antioksidan maddelerin tespiti ve bu gıdaların antioksidan aktivite seviyelerinin belirlenmesine yöneldiği belirtilmiştir [27].

Oksidasyon olayı aslında hayatın her evresinde yaşamakta olduğumuz doğal bir süreçtir. Oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir molekül olmasına rağmen, metabolizmaya zarar verebilecek reaktif oksijen türlerin (ROS) [süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH\cdot$ )]

oluşmasına neden olur. Hücre içi ROS'un %90'dan fazlası aerobik solunum reaksiyonları zincirinde mitokondriumun iç membranında üretilir [28].

Reaktif oksijen türlerinin yüksek dozlarda (oksidatif stres gibi) hücrel zararlar yol açtığı [29], oksidan ve mutajen özellikte olan bu metabolizma yan ürünlerinin DNA, proteinler ve diğer makromoleküllerde tahribata hatta hücrenin ölümüne neden olarak kronik hastalıklara sebep olabildiği bildirilmiştir [30].

Tüm canlılarda gözlenebilen oksidatif stresin insanlarda çeşitli kalp damar patolojileri (arterioskleroz ve hipertansiyon), diyabet, nörodejeneratif süreçler (özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalıkları), hücre yıpranması ve yaşlanma, kıkırdak iltihabından gelen patoloji, solunum yolu hastalıkları (sistik fibroz ve astım), Down sendromu ve kanser gibi hastalıkların oluşumuna etki ettiği bilinmektedir [31].

Çeşitli mekanizmalar sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı vücutta doğal bir savunma mekanizması vardır. Bu savunma mekanizmasını oluşturan bileşiklere "antioksidanlar" denir. Antioksidanlar arasında enzimler; superoksit dismutaz-SOD, katalaz-CAT, glutation peroksidaz-GP, glutatyon redüktaz, sitokrom-C-oksidad, hidroksiperoksidaz, makromoleküller; seruloplazmin, transferrin, ferritin, miyoglobin, haptoglobilin ve mikromoleküller içinde ise  $\beta$ -karoten, A-vitamini, C-vitamini, E-vitamini, tokoferoller, tiol içerenler, glutation (GSH), N-asetil sistein, metionin, kaptopril, ubiguinon gibi bileşikler sayılabilir [32].

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler [27].

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.

2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanalara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.

3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.

4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

### **2.3. Karotenoidlerin Yapısı Ve Önemi**

Bitkiler sağlık için gerekli vitamin ve minerallerin yanında; beslenmede önem taşıyan başka bitkisel bileşenleri de içermektedir. Bu bileşenler arasında yer alan önemli gruplardan birisi ise karotenoidlerdir. Karotenoidler, bütün fotosentetik organizmalarda bulunan ve yağda çözünen pigmentlerdir [33].

Yeşil alglerden elde edilen doğal bileşiklerin %85'den fazlası terpenlerdir [18]. Terpenler'in izopren birimleri düz zincir şeklindedir veya halkalaşmıştır. Biyolojik pigmentlerin, A, D, E ve K vitaminlerinin, elektron

taşıyıcılarının yapısında bulunur; 4 izoprenden oluşan fitol, porfirin halkası ile birleşmiş olarak klorofilin yapısında bulunur. 6 izopren halkası içeren skuvalen kolesterol sentezinde ara üründür. 8 izopren halkalı; Hopen, Likopen, Karotendir. Karotenlerde; 4 izopren zincir halinde; diğer 4'ü ise bu zincirin iki ucunda ikişer izopren birimi olarak halkalaşmıştır (iyonon halkası). Karotenoidlerin sınıflandırılması Şekil 2.1.'de verilmiştir [34].

Karotenoidler, doğada geniş bir dağılım gösteren ve birçok özelliği nedeniyle önemli bir pigment grubudur. Karotenoidler, ilk olarak 1831 yılında Weckenroder tarafından havuçlardan izole edilmiştir [35]. İlk defa 1837'de Berzelius isimli araştırmacı sonbahar yapraklarındaki sarı renkli bileşikleri ksantofiller olarak adlandırmıştır [36].

Önemli antioksidan maddeler arasında yer alan karotenoidler; fitoplankton, bitkiler ve sınırlı sayıdaki mantar ve bakteriler tarafından üretilmektedir. Birçok çeşidi bulunan, geniş dağılımlı, yapısal olarak farklı, çok çeşitli etki ve fonksiyonlarıyla doğada bulunan en önemli pigment gruplarından birini oluşturmaktadır. Bunlardan yalnızca 40 kadarının insan besinleri arasında yer aldığı önemli bir ailedir [37].

Karotenoidler sıklıkla halka yapılarıyla sonlanan 35-40 karbonlu polien zinciri ile karakterizedirler. Başlıca biyokimyasal fonksiyonları, renklerinden de sorumlu olan uzun konjuge çifte bağlara dayanmaktadır. Bu bağların sayısı arttıkça, konjuge sistemlerle etkileşen elektronlar daha çok yer değiştirme olanağı bulmakta ve daha az enerji sarfetmektedir. Bu yolla daha düşük enerji seviyeli ışığın absorblanması sağlanır. Karotenoid bileşiklerinin sıklıkla kırmızı renkte olması bu şekilde açıklanabilir [38].

<b>I.Karotenler</b> (Hidrokarbon yapıları)	$\alpha$ -karoten	
	$\beta$ -karoten	
	$\gamma$ -karoten	
	$\delta$ -karoten	
	Lutein	
<b>II.Ksantofiller</b> (Karotenoid alkoller)	$\beta$ -Kriptoksantin	
	$\alpha$ -Kriptoksantin	
	Lutein	
	Flavoksantin	
	Violaksantin	
<b>III.Karotenoid Ketonlar</b>	Astaksantin	
	Kapsantin	
	Fukoksantin	
<b>IV.Karotenoid Asitler</b>	Biksin	
	Krosetin	

**Şekil 2.1.** Karotenoidlerin sınıflandırılması

Karotenoidlerde yapı, birbirine kovalent olarak bağlanmış izopren ünitelerinden oluşmaktadır. Karotenoidler, beş karbon içeren sekiz izoprenoid birimden oluşan alifatik ve alisiklik yapıların; sarı, turuncu veya kırmızı renkli lipofilik pigmentleridir. Karotenoidler; oksijensiz hidrokarbonlardan oluşan karotenler ve karotenlerin oksijenli türevleri olup; yapısında en az bir oksijen atomu içeren, hidroksil ve keton grupları içerebilen ksantofiller olarak adlandırılabilir [39]. Ksantofiller, karotenlerden daha fazla polar özellikte olup yapısında metoksi, hidroksi, keto, karboksi ve epoksi formunda oksijen içermektedir. Ksantofillere örnek olarak  $\beta$ -kriptoksantin, zeaksantin ve lutein verilebilir. Hidrokarbon karotenoidlerin başlıcaları;  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten ve likopendir. Karotenoidler ayrıca zincir uçlarında halka içerip içermemesine göre de siklik (halkalı) ve asiklik (halkasız) karotenoidler olarak da gruplandırılmaktadır. Likopen, fitoen, fitofluen ve  $\zeta$ -karoten asiklik;  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten,  $\delta$ -karoten ve  $\gamma$ -karoten siklik yapıdaki karotenoidlerdir [40].

Karotenoidlerin konjuge çift bağlarının sayısı ne kadar fazla olursa renkleri o kadar koyu olmaktadır. Fakat konjuge çift bağlar dayanıklı olmayıp, havanın oksijeni, ısı, UV ışınları ile parçalanmakta ve renksizleşebilmektedir [41]. Cis izomerlerin Trans izomerlerine kıyasla genellikle daha az stabil olduğu ve düşük kristalizasyon eğiliminden dolayı daha düşük erime noktasına sahip olduğu bilinmektedir [42]. Karotenoidler belirli bir renk oluşumu için en az yedi konjuge çift bağ içermelidir. Konjuge bağ sayısı arttıkça renk yoğunluğu da artmaktadır. Beş konjuge çift bağ içeren phytoene renksiz iken on bir çift bağ içeren likopen ise kırmızı renklidir. Aynı sayıda çift bağ içeren karotenoidler, siklizasyon nedeniyle farklı renk tonlarında

bulunabilmektedir. Genel olarak karotenoidlerin renkleri, konsantrasyona ve molekülün yapısına bağlı olarak değişmektedir. Karotenoidlerin yapılan çalışmalar sonucu çeşitli formlarda kristalize olduğu ve kristallerin koyu kırmızı ile siyaha yakın renklerden meydana geldiği saptanmıştır. Erime noktaları genellikle yüksektir, moleküler ağırlık ve fonksiyonel grup sayısının artmasıyla artmaktadır [43].

Karotenoidler lipofilik bileşikler olduğundan; yağda ve kloroform, benzen, petrol eter, karbon disülfür gibi apolar organik çözücülerde çözünmekte, alkolde çözünmemektedir. Ksantofiller ise metanol ve etanolde daha iyi çözünmektedir. Karotenoidlerin organik çözücülerde göstermiş olduğu absorbans dalga boyları Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çoğu karotenoid, doğal olarak all-trans formda bulunmakla birlikte; ışık, organik çözücü, asit ve ısı etkisi ile cis konfigürasyona dönüşmektedir. Karotenoidlerin çift bağ sisteminde meydana gelen izomerizasyonlar ile biyolojik ve fiziksel açıdan farklılıklar gösteren çok sayıda konfigürasyon söz konusu olabilmektedir. Karotenoidler çift bağların sayısına göre birçok cis-trans izomerini içermektedir. Doğada tüm trans formları daha baskın olarak bulunmuştur Örneğin,  $\beta$ -karotenin 272 farklı cis-izomeri saptanmıştır [44].

Karotenoidler hayvanlar tarafından sentezlenememesine rağmen bir çok hayvansal üründe, örneğin; yumurta sarısı ve somon balığı derisinde bulunmaktadır. Hayvanlar karotenoid sentezleyemedikleri için diyet aracılığıyla aldıkları karotenoidleri modifiye ederek dokularında depolamaktadır [45].



**Çizelge 2.2.** Bazı karotenoidlerin UV ve görünür bölgedeki maksimum absorpsiyon dalga boyları,  $\lambda_{max}$  [45].

<b><u>Karotenoid</u></b>	<b><u>Çözücü</u></b>	<b><u><math>\lambda_{max}</math> nm</u></b>		
$\alpha$ -Karoten	Aseton	424	448	476
	Kloroform	433	457	484
	Etanol	423	444	473
	Hekzan, Petrol Eteri	422	445	473
$\beta$ -Karoten	Aseton	429	452	478
	Kloroform	435	461	485
	Etanol	425	450	478
	Hekzan, Petrol Eter	425	450	477
Lutein	Kloroform	435	458	485
	Etanol	422	445	474
	Petrol Eter	421	445	474
Likopen	Aseton	448	474	505
	Kloroform	458	484	518
	Etanol	446	472	503
	Petrol Eter	444	470	502
	Hekzan,		472	
Fitoen	Hekzan, Petrol Eter	276	286	297

Bitki ve hayvanlarda bulunan bazı karotenoidlerin proteinlerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Karides ve istakozun dış kabuğunda bulunan kırmızı renkli bir pigment olan astaksantin; proteinle kompleks oluşturduğunda

mavi renktedir, ısıtma ile kompleks bozulmakta ve pigment rengi maviden kırmızıya dönmektedir [44].

Bitkisel dokularda serbest halde veya yağ asitleriyle esterleşmiş, şeker ve proteinlerle kompleks halde bulunabilirler. Karotenoidlerin 430-480 nm dalga boylarında maksimum absorpsiyon gösterdiği, ışık enerjisini depolama; bitkiyi fazla ışıktan koruma ve ayrıca bunun yanında, büyüme düzenleyici bir bileşik olan absisik asidin ön maddesi olduğu gösterilmiştir [44].

Bitkilerdeki karotenoid içeriği üzerine pek çok faktör etki etmektedir. Karotenoid oluşumuna iklim, pestisit kullanımı, toprak çeşidi gibi faktörlerin etki ettiği bildirilmektedir. Bu faktörlerin en önemlilerinden olan ışık, karotenoidlerin biyosentezini teşvik ettiğinden, bitkinin ışığa maruz kalma derecesi karotenoid konsantrasyonunu etkileyen önemli bir faktördür. Bazı mikroalgler anormal ortam koşulları altında önemli miktarda astaksantin, canthaxanthin ve echinone gibi ikincil karotenoid sentezlemektedir (carotenogenesis) [46].

Karotenoidler bitkilerin fotosentetik kısımlarında, meyvelerde yağ damlacıkları içerisinde çözülmüş halde ya da havuç ve domateste olduğu gibi yarı kristalize halde bulunurlar, bulunma yerleri kimyasal yapılarından daha önemlidir ve biyoyararlanımlarını da değiştirmektedir [47].

Karotenoidlerin, düşük sıcaklıktaki depolama koşullarında da izomerizasyona uğradığı ve parçalandığı bilinmektedir. Örneğin bir araştırmada likopen ve  $\beta$ -karoten için de bu durumun geçerli olduğu saptanmıştır [48].  $\beta$ -karotenin çok etkili bir zincir kırıcı antioksidan olarak

fonksiyon gösterdiği, ancak oksijen basıncının artmasıyla  $\beta$ -karotenin antioksidan etkisinin azaldığı belirtilmektedir. Oksijen konsantrasyonu dokudan dokuya farklılık gösterdiğinden karotenoidler farklı dokularda farklı rol oynamaktadırlar [49].

Karotenoidlerin genel özellikleri [50].

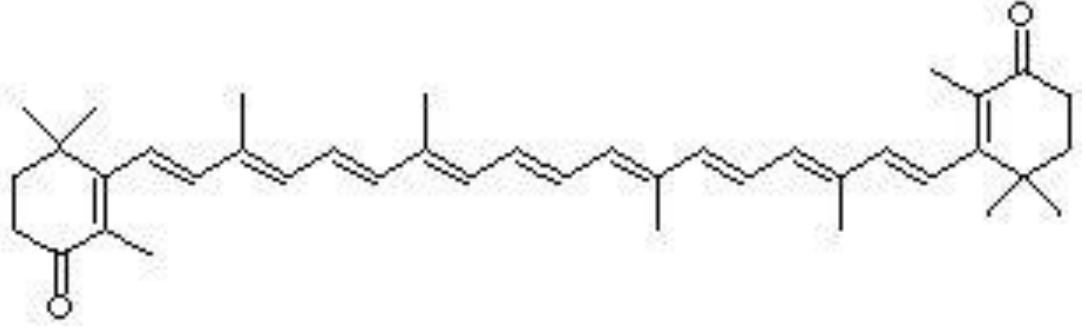
- ✓ Işığı absorbe ederler.
- ✓ Uyarılmış oksijeni bağlarlar.
- ✓ Serbest radikallerin oluşumunu önlerler.
- ✓ Lipofiliktirler, suda çözünürler.
- ✓ Hidrofobik yüzeylere bağlanırlar.
- ✓ Kolay izomerize ve okside olurlar.

## 2.4. Alglerde Bulunan Bazı Karotenoid Çeşitleri

### 2.4.1. $\beta$ -karoten

$\beta$ -karoten, doğada en yaygın bulunan pigmentlerdendir. Üzerinde en fazla çalışılan karotenoidlerden birisi olan  $\beta$ -karotenin en önemli özelliği A vitaminine metabolize olmasıdır.  $\beta$ -karoten zincir yapısının her iki ucunda da  $\beta$ -iyonon halkasının bulunması onun diğer karotenoidlerden daha yüksek provitamin A aktivitesine sahip olmasına sebep olmaktadır [40].  $\beta$ -karotenin kimyasal yapısı Şekil 2. 2.'de gösterilmiştir.



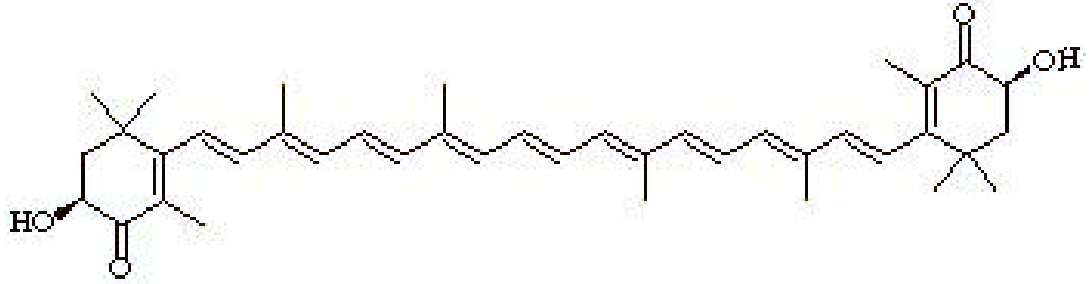


**Şekil 2.3.** α-karotenin yapısı

### 2.4.3. Astaksantin

Astaksantin; hayvanlar ve balıklar için gıda katkısı, insanlar için önemli gıda destekleyicisi olarak kullanılan ticari öneme sahip bir karotenoid türüdür.

Kimyasal yapısı Şekil 2.4.'te verilmiştir.



**Şekil 2.4.** Astaksantin yapısı

Astaksantin'in diğer karotenoidlere göre avantajları [17]

- Diğer karotenoidlere göre daha stabildir.

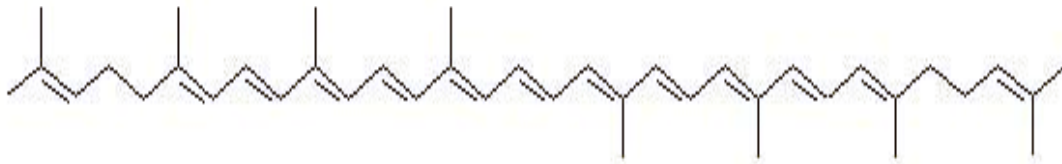
- Daha yüksek antioksidan özelliğe sahiptir. Antioksidan özelliği  $\alpha$ -tokoferolden 500 kat,  $\beta$ -karotenden 10 kat daha yüksektir.
- Kan beyin bariyerini daha kolay geçebilmektedir.
- Daha yüksek boyarlığa sahiptir

Özellikle alg ve funguslar stres koşulları altında astaksantin biriktirmektedir. *Haematococcus lacustris*, büyük miktarda içerdiği astaksantin esterleri nedeniyle, günümüzde astaksantin potansiyel kaynağı sayılmakta ve biyoreaktörler kullanılarak ticari üretimi yapılmaktadır [54].

Astaksantin; immunoglobulin A, M, G ve yardımcı T hücrelerinin üretimini artırıcı ayrıca antijen seviyesini azaltıcı özellik göstermektedir [55].

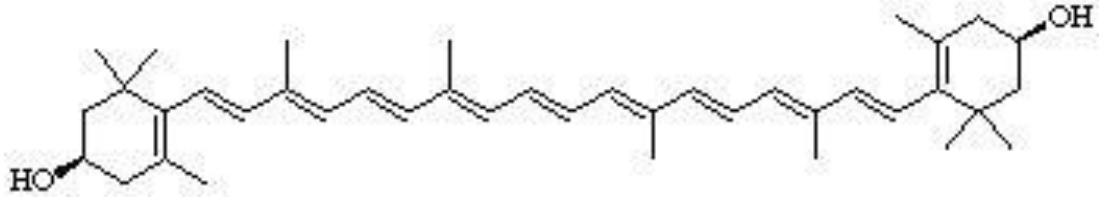
#### 2.4.4. Likopen

Halka yapısı göstermeyen düz zincir yapıda bir hidrokarbon bileşik olan likopen 13 adet çift bağ içermektedir. Konjuge çift bağ sayısı 11 olan likopenin,  $2^{11}$  adet geometrik konfigürasyonu bulunmaktadır [56]. Kimyasal yapısı Şekil 2.5.'te verilmiştir.



**Şekil 2.5.** Likopenin yapısı

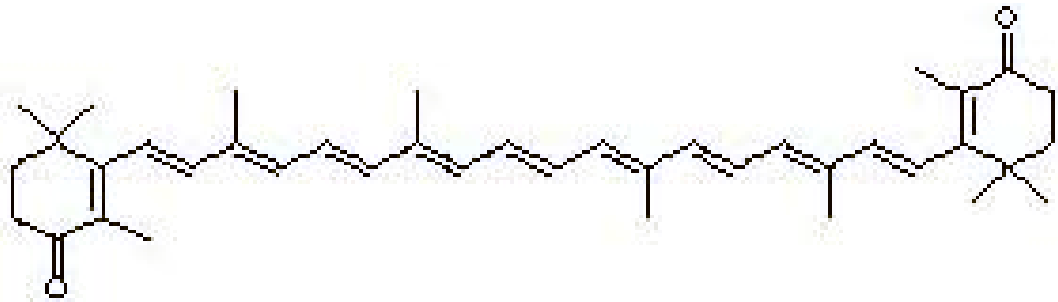




**Şekil 2.7.** Zeaksantin yapı

#### 2.4.6. Kantaksantin

Kantaksantin *Haematococcus lacustris*'den ticari olarak elde edilen, sarı-turuncu rengi veren, Avrupa Birliği düzenlemesine göre gıda katkı maddesi olarak değerlendirilmemiş bir pigmenttir. Tuz stresi altında vitamin A'ya dönüşmektedir. Kumes hayvanlarına sarımsı renk tonunu vermek için, kozmetikte, balık ve et ürünleri, meyve ürünleri, içecekler, çerez, bira ve şarap gibi gıda ürünlerinde kullanılmaktadır.  $\beta$ -karotene göre ışıktan daha az etkilenmektedir [60]. Kimyasal yapısı Şekil 2.8.'de verilmiştir.



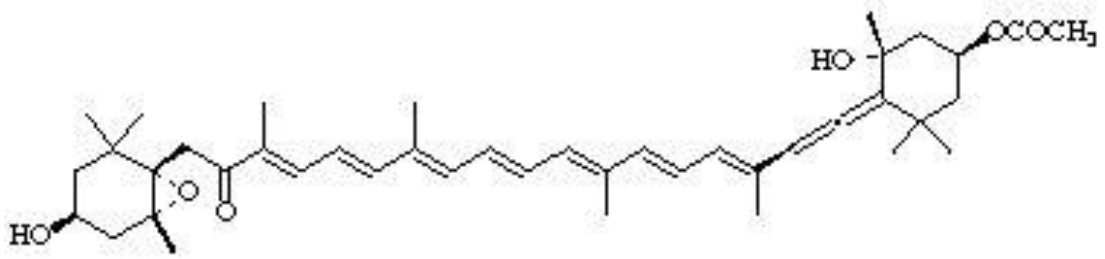
**Şekil 2.8.** Kantaksantin yapı



### 2.4.7. Fukosantin

Fukosantin, başlıca denizel karotenoid türüdür. Kimyasal yapısı Şekil 2.9.'da verilmiştir. Birçok araştırmacı tarafından mükemmel antioksidan potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir [61,62,63]. Kahverengi alglerden elde edilen fukosantin tekli oksijen seviyesini düşürdüğü ve bundan dolayı güçlü bir söndürme (Quenching) etkisinin olduğu gösterilmiştir [64].

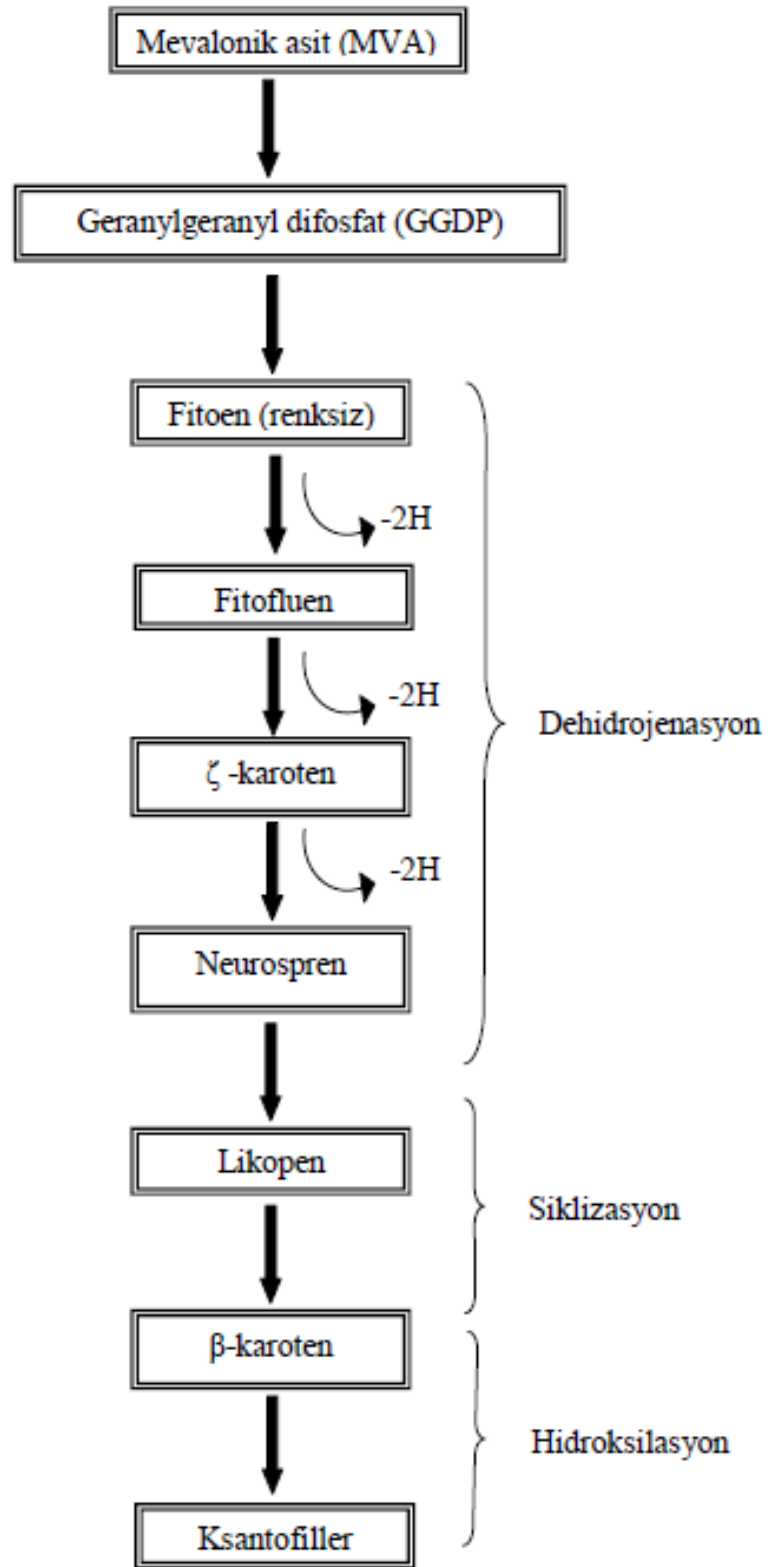
Bir kahverengi alg türü olan *Sargassum siliquastrum*'den elde edilen fukosantin özellikle  $H_2O_2$  hasarına karşı hücreyi koruduğu (cytoprotective effect) gösterilmiştir [65]. Fukosantin; hücre içi reaktif oksijen oluşumunu, DNA hasarını ve  $H_2O_2$ 'nin sebep olduğu apoptozu engellediği, ayrıca insan dermal fibroplastlarının (HDF cells) UV-B ışınlarına karşı potansiyel koruyuculuğunu artırdığı gösterilmiştir [66].



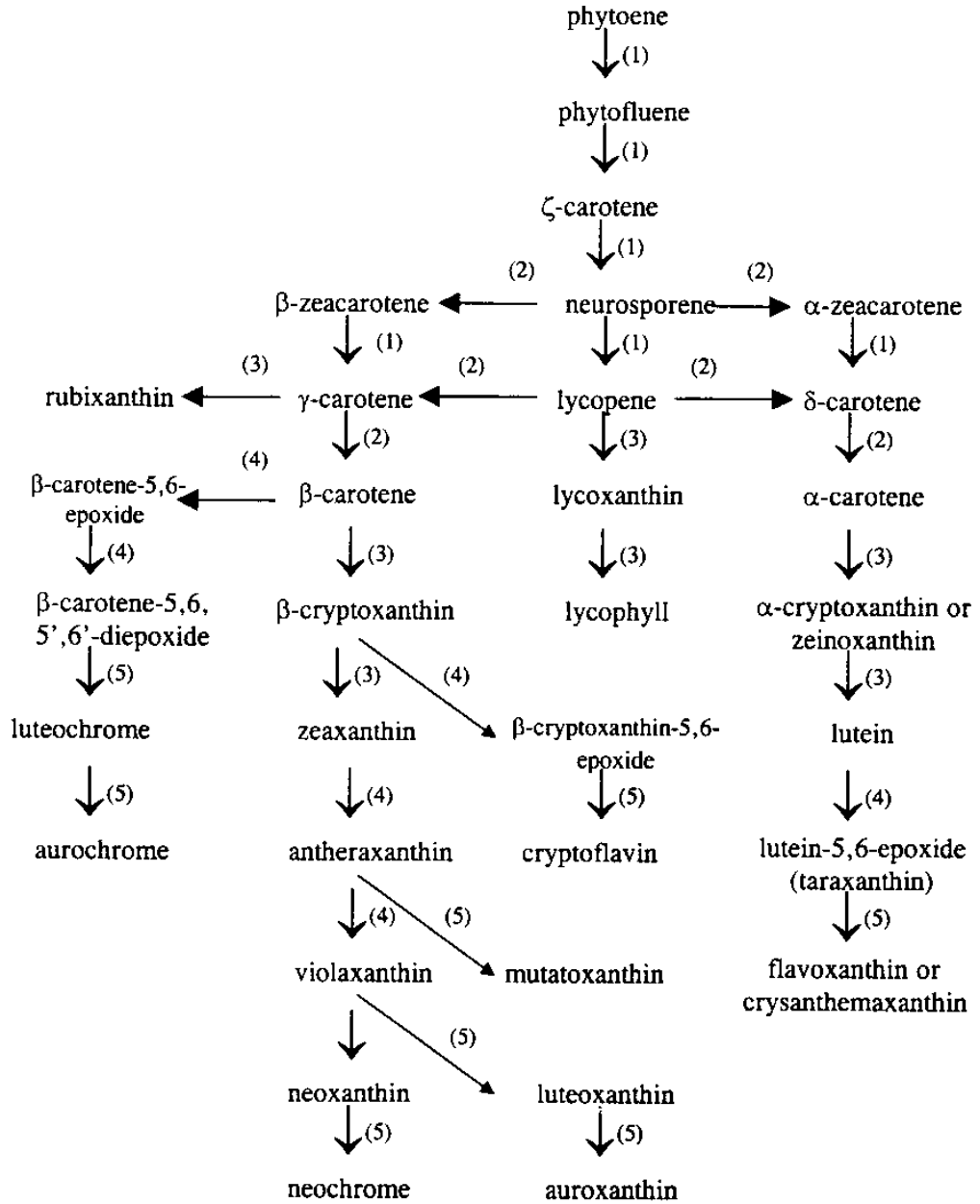
Şekil 2.9. Fukosantin yapısı

## 2.5. Karotenoidlerin Biyosentezi

Yüksek bitkilerde plastitlerde sentezlenen karotenoidler, mevalonik asit (MVA) aracılığıyla asetil koenzim A'dan sentezlenmektedir. Tüm izoprenoid bileşiklerinde biyosentez iz yolunun ilk basamağında, iki molekül geranilgeranil difosfat (GGDP) molekülünden prefitoen difosfat (PPDP) aracılığıyla 40 karbonlu bir hidrokarbon olan fitoen oluşmaktadır. Üç konjuge çift bağ içeren ve renksiz olan fitoen, daha sonra her enzimatik basamakta moleküle yeni bir çift bağ eklenmek suretiyle bir dizi dehidrojenasyon reaksiyonu geçirdikten sonra 13 tane çift bağ içeren simetrik bir molekül olan likopen oluşmaktadır. Likopenden sonraki basamak ise, uç gruplarda halka oluşumudur (siklizasyon). Bunun sonucunda da monosiklik ( $\gamma$ -karoten,  $\delta$ -karoten) ve bisiklik ( $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten) yapıdaki karotenoidler oluşmaktadır. Ayrıca  $\alpha$ -karoten ve  $\beta$ -karotenin hidroksilasyonu sonucunda da lutein ve zeaksantin gibi ksantofiller meydana gelmektedir [67]. Bu sürecin şematize edilmiş hali Şekil 2.10.'da gösterilmiş olup ayrıca karotenoidlerin dönüşüm ve biosentez aşamaları. Şekil 2.11.'de verilmiştir.



**Şekil 2.10.** Karotenoidlerin biyosentezi [17]



**Şekil 2.11.** Karotenoidlerin dönüşüm ve biosentez aşamaları. Reaksiyonlar: 1) Desaturasyon, 2) Siklizasyon, 3) Hidrolikasyon, 4) Epoksilasyon, 5) Epoxidefuranoxide düzenlenmesi [17]

## 2.6. Karotenoidlerin Sağlık Üzerine Etkileri

Kronik hastalıklar üzerinde koruyucu ve tedavi edici potansiyele sahip olduğu düşünölen ve son yıllarda gelişmiş teknikler kullanılarak da yapılan çalışmalarda insan sağlığı üzerine birçok yeni etkileri saptanan karotenoidlerin antioksidan etkisi, antikanser etkisi, provitamin A etkisi ve cilt koruyucu gibi birçok yararları saptanmıştır.

Memelilerde karotenoidlerin %10'dan daha az bir kısmının provitamin A olarak işlev yaptığı ve retinole metobolize edildiği bildirilmiştir [68]. Bununla birlikte kanserin gelişmesine, kalp damar hastalıklarının oluşmasına karşı serbest radikalleri önleme ve antioksidan etkisine sahiptir [69].

İnsanlarda plazma  $\beta$ -karoten düzeyi ile kanser ve kalp-damar hastalıkları riskinde güçlü bir ilişki olduğu birçok araştırmada belirlenmiştir. Örnek olarak; yeterli miktarda domates, marul, kıvırcık, havuç tüketiminin akciğer kanseri gelişimini belirgin derecede engellediği, fazla meyve tüketiminin adenokarsinomlara etkisinin belirgin olmadığı ama yassı epitel hücreli karsinom ile küçük hücreli karsinomlardan koruyucu etkisi olduğu vurgulanmaktadır [70].

Antioksidan öncelikleri (lipit peroksidasyonunun inhibisyonu) bakımından karotenoidlerin; likopen,  $\beta$ -karoten ve lutein A vitamininden oldukça fazla antioksidan aktivite gösterdikleri [68], karotenoidlerin ko-oksidasyon reaksiyonlarında yer aldıkları ve bir karotenoid ile çoklu bir doymamış yağ ko-oksidasyon reaksiyonuna girdiğinde bunun daha etkili olduğu in vitro olarak gösterilmiştir [71].

Karotenoidlerin en önemli fonksiyonları, A vitamininin ön maddesi olmaları ve oksijen radikallerini yakalayıp organizmada oksidatif stresi azaltmalarıdır [72]. Provitamin A karotenoidleri; sağlıklı epitel hücre farklılaşmasını sağlamakta, üreme ve görme fonksiyonlarını düzenlemektedir [33]. Oksidanlar; vücutta normal metabolizma sürecinde ve kimyasal ajanlara karşı savunma sırasında oluşmakta ve DNA'yı, proteinleri ve hücre dokularını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu oksidatif yıkım; yaşlanma, bağışıklık sisteminde azalma ve kataraktın temel nedeni olarak değerlendirilmektedir [33].

Karotenoidlerin insanlarda %5–50 oranında emildikleri, emilimlerinde besinin yağ ve protein içeriği ile safra tuzlarının etkili olduğu, karotenoid fazlalığının emilimlerini azalttığı, emilme sonrasında mukoza hücreleri tarafından burada retinale ve daha sonra da retinole dönüştüğü, bir kısmının ise emilme sonrası dolaşıma karıştığı rapor edilmektedir [70].

Likopen,  $\alpha$  ve  $\beta$ -karoten, Ksantofil,  $\beta$ -kriptoksantin, Lutein ve Zeaksantin insan doku ve plazmasında tespit edilebilen karotenoidlerdir. 1–2mmol/L olan toplam plazma karotenoidlerinin neredeyse yarısını  $\beta$ -karoten, likopen ve lutein oluşturur [68,71]. İnsanlarda, karotenoidlerin en fazla karaciğerde ve özellikle yağ dokuda depolandığı; akciğer, böbrek, serviks ve prostat bezinde de diğer dokulara oranla daha fazla bulunduğu belirtilmiştir [68,73].

İnsanlarda likopenin serum düzeyinin artışı ile meme, yumurtalık, serviks, karaciğer, prostat ve diğer organlardaki birçok kanser riskinin

azaltılması arasında yakın bir ilişkinin olduğu yapılan çalışmalarla belgelendirilmiştir [37].

Likopenin, osteoblast hücrelerinde hücre farklılaşması ve gelişiminde uyarıcı etkilerinin olduğu, osteoklast şekillenmesi ve emiliminde de etkili olduğu belirtilmektedir [74]. Oksidatif stresin osteoporozu hızlandırdığı, C ve E vitamini ile  $\beta$ -karotenin bu riski azalttığı düşünülürse kemik sağlığıyla ilgili daha güvenli klinik çalışmaların yapılması tavsiye edilmektedir [75].

Dolaşımdaki karotenoidlerin lipoproteinlerle beraber bulunması, dağılım ve plazma düzeylerinin kolesterola yakın benzerlik göstermesi birçok araştırmacı tarafından plazma karotenoid düzeylerinin ön belirteci (predictive) olarak kolesterolu da kullanmaktadır [68].

Likopen ve  $\beta$ -karotenin kalp-damar hastalıkları ve bazı kanser türlerinde faydalı iken lutein ve zeaksantin makula densa ve lenste biriken başlıca karotenoid olduğu, retinanın membran segmentlerinde ve lensin korteksinde bu karotenoidlerin oldukça fazla bulunduğu, gözde ışığa bağlı gelişen oksidatif hasara karşı ve katarakt oluşumu engelleyici olabileceği belirtilmiştir [76].

Bazı epidemiyolojik çalışmalarda ise yüksek düzeyde karotenoid alınmasıyla meme kanserinin tekrarlanmasının önlenmesi, teşhisi ve yüksek düzeyde sağkalımda artış belirlenmiş, fazla karotenoid alınmasının hiçbir yan etkisinin olmadığına vurgu yapılmış ayrıca bundan dolayı ABD Gıda ve İlaç Uygulamaları (FDA) dairesi renklendirici ve gıda katkı maddesi olarak  $\beta$ -karotenoidlerin kullanılmasını güvenilir bulmuştur [71]. Yine aynı çalışmada

karotenoidler ve immün cevap ilişkisinin önemi, UV ışığına maruz kalan ve gecikmiş tip fotosupresyonlularda  $\beta$ -karoten ilaveli diyetle beslenen insanlarda deri kanseri riskinde artışın ve immün cevaptaki gecikmenin engellenebildiği gözlemlenmiştir.

## 2.7. Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivite

Bir veya birden fazla eşleşmemiş elektronu bulunan atom ya da moleküllere serbest radikaller denir. Bu tip maddeler, eşleşmemiş elektronu olması sebebiyle oldukça reaktiftirler. Diğer moleküllerle çok hızlı reaksiyona giren ve kimyasal olarak kararlı hale gelebilmek için elektron almaya gereksinim duyan moleküllerdir ve kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam etmektedir. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller (oksijen iyonu veya peroksit radikalleri), lipit, protein ve nükleik asitler gibi temel ve önemli biyolojik birimler ile etkileşime girerek onların fizyolojik fonksiyonlarını bozduğu bilinmektedir [25,26].

Karotenoidler yapılarındaki konjuge çift bağlar sebebiyle yüksek antioksidan aktivite gösterirler. Bu yapısal özellikleri dolayısıyla singlet oksijen türlerini giderme ve doğrudan serbest radikalleri süpürme etkisine sahiptirler [40]. Konjuge çifte bağ sistemine sahip karotenoidlerin bazı koşullar altında lipid ve benzeri substratların oksidasyonunu hızlandırıcı



aktivite de gösterdiği düşünölmektedir [77].  $\beta$ -karoten fizyolojik koşullarda, düşük oksijen kısmi basıncı altında serbest radikalleri süpürme özelliği gösterirken, yüksek oksijen basıncında ve özellikle yüksek derişimlerde prooksidan etki göstermektedir [78].

Karotenoidlerin biyolojik sistemlerde antioksidan aktivitelerini etkileyen bazı faktörler şu şekilde sıralanabilir;

- Karotenoidin yapı (boyut, doğası, pozisyonu, grup sayısı vb.) ve fiziksel formu (kümeli, monomerik vb.),
- Hücre içinde karotenoid molekülünün aktif bölgesi veya yerleşimi,
- Diğer karotenoidler veya antioksidantlar ile etkileşim potansiyeli
- Ortamdaki karotenoidin konsantrasyonu,
- Ortamın oksijen basıncı. [79].

## **2.8. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri**

Antioksidan kapasite tayini, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından iki temel sınıfta toplanabilir:

- i) Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)
- ii) Tek elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (ET)

HAT esaslı analiz yönteminde yarışmalı reaksiyon kinetiği izlenir ve kantitasyon kinetik eğrilerden türetilir. HAT esaslı yöntemlerde serbest radikal (peroksil radikali), yapısında azo grubu bulunduran bir bileşik tarafından ısı etkisiyle oluşturulmakta ve peroksil radikalleri reaksiyona girerek floresan

yoğunluğu azaltılmaktadır. Ortama ilave edilen antioksidan, ortamda bulunan probe ile yarışmakta ve bu bileşimin oksidasyonunu geciktirmekte veya önlemektedir. ET esaslı yöntemlerde renkli oksidan bir bileşik (radikal) ile antioksidan maddenin redoks tepkimesi oluşturulmaktadır. Oksidan bileşik yani radikal, antioksidandan elektron almakta ve renk değişimine uğramaktadır. Radikal rengindeki azalma, reaksiyon bitimini göstermektedir. Absorbanstaki değişim, antioksidan konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmekte ve doğrusal bir eğri elde edilmektedir. Eğrinin eğimi antioksidanın indirgeme kapasitesini göstermektedir. HAT ve ET esaslı yöntemler bir örneğın koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal süpürücü kapasitesini ölçmektedir

(1) HAT analiz yöntemleri:

- (a) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu
- (b) Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)
- (c) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)
- (d) Crocin bleaching deneyleri olarak sıralanabilir.

(2) ET analiz yöntemleri

- (a) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi
- (b) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü
- (c) Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü
- (d) Cu (II) kompleksini oksidan olarak kullanan “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi

- (e) DPPH kullanarak “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi
- (f) CUPRAC (Bakır II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi olarak sıralanabilir [80].

### **2.8.1. DPPH Süpürücü Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi**

Bu yöntem Blois (1958) tarafından ilk kez DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikallerinin antioksidan moleküllerin tayininde kullanılabileceğinin önerilmesi ile ortaya çıkmıştır. DPPH radikali yakalama kapasitesi yöntemi de gıdaların antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Antioksidan aktivite ölçümlerinin yoğunlaştığı yıllarda Brand-Williams ve arkadaşları yöntemi geliştirmiş ve bu yöntem pek çok araştırmacı tarafından referans olarak kullanılmıştır. Yöntemin esası DPPH içeren çözelti ile hidrojen atomu verme eğilimi olan bir molekülün (antioksidan) çözeltisinin karıştırılması sonucu DPPH radikalinin indirgenmesine ve çözeltinin başlangıçta mor olan renginin kaybolmasına dayanır. Mor renkli çözeltinin 515-520 nm civarındaki absorbansının azalması ölçülerek reaksiyon takip edilir. Antioksidan aktivite başlangıçtaki DPPH derişiminin %50'sinin azalması için harcanan antioksidan miktarını ifade eden IC50 (etkin konsantrasyon) değeri ile verilir [81].

## 2.8.2. FRAP Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi

Elektron transferine dayalı diğer bir yöntem olan FRAP yönteminin esası; Fe (III)'ün Fe (II)'ye indirgenmesine dayanmaktadır. 1 FRAP birimi, 1 mol Fe (III)'ün 1 mol Fe (II)'ye indirgenmesini ifade etmektedir. Fe (III)'ün Fe (II)'ye indirgenmesi sonucunda renk artışı olmakta ve bu renk değişimi 593nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmektedir. TEAC ile FRAP yöntemleri arasında fark olmadığı sadece; TEAC yöntemi nötral ortamda gerçekleştirilirken, FRAP yönteminin ise asidik (pH) koşullarda gerçekleştirildiği literatürde belirtilmiştir. [82].

## 2.9. Çalışılan Alglerin Taksonomisi ve Genel Özellikleri

### 2.9.1. *Chlorella* sp. Genel Özellikleri

Alem	Plantae
Bölüm	Chlorophyta
Sınıf	Chlorophyceae
Takım	Chlorococcales
Aile	Oocystaceae
Cins	Chlorella
Tür	<i>Chlorella</i> sp.

*Chlorella* sp. Chlorophyta (Yeşil algler) şubesinde yer alan, 2-10 mikrometre boyutunda, tek hücreli, küre biçiminde, yeşil tatlı su yosunudur.

Kloroplastlarında klorofil *a* ve klorofil *b* taşımakta olup fotosentez yapmaktadırlar. *Chlorella* sp.'in tek hücreli yapısı, vitaminler, proteinler (aminoasit, nükleik asit ve enzim), temel yağ asitleri, mineraller ve karotenoidlerin bir kaynağı olmasına büyük bir avantaj sağlamaktadır. *Chlorella vulgaris* bu besinleri saf, katkısız ve doğal olarak mükemmel bir denge içerisinde barındırır ve tek başına bile tam bir besindir.

*Chlorella vulgaris*, 20'den fazla vitamin ve mineralin yanı sıra bol miktarda doğal  $\beta$ -karoten'de içermekte ve %50-60 oranında proteinden oluşmakta olup klorofilin doğada bilinen en yüksek oranlı kaynağıdır. Sığır karaciğerinin içermekte olduğu B<sub>12</sub> vitamininden daha fazlasını içermektedir. Ayrıca ilaç sanayisinde, Chlorellin denilen antibiyotik *Chlorella vulgaris*'den elde edilmektedir [83].

### 2.9.2. *Scenedesmus* sp. Genel Özellikleri

Alem	Plantae
Bölüm	Chlorophyta
Sınıf	Chlorophyceae
Takım	Chlorococcales
Aile	Scenedesmaceae
Cins	<i>Scenedesmus</i>
Tür	<i>Scenedesmus</i> sp.

Chlorophyta (Yeşil algler) şubesinde yer alan, hücreleri mekik şeklinde, tek olarak ya da 2, 4, 8 veya 16'lı koloniler halinde yaşayan tatlı su yosunudur. Türler göre yeri ve sayısı değişen, boynuza benzer çıkıntıları bulunur ve tatlı sularda yayılış gösterirler. Zengin protein içerdiğinden son yıllarda kültürü yapılmaktadır. SCN. karotenoidce çok zengin olup, kuru maddede 2,5 mg/g lutein, 0,5 mg/g zeaksantin ve 0,52 mg/g astaksantin içermektedir [84,85].

### 2.9.3. *Chlamydomonas* sp. Genel Özellikleri

Alem	Plantae
Bölüm	Chlorophyta
Sınıf	Chlorophyceae
Takım	Chlorococcales
Aile	Chlamydomonadaceae
Cins	Chlamydomonas
Tür	<i>Chlamydomonas</i> sp.

Chlorophyta (yeşil algler) şubesinde yer alan türler, koloni ya da tekil şekilde bulunmaktadır. Çeperleri pektin ve selülozdur. Asimilasyon ürünleri nişasta ve yağlardır. Çoğu ototrof yaşar. Eşaysız üreme zoospor ve aplanosporlarla olur. Zoosporlar armut biçiminde ve eşit uzunlukta 2 ya da 4 kamçıya sahiptirler. Chlamydomonaceae familyası üyeleri koloni oluşturmazlar, tek hücreli ve hücre biçimleri oldukça yuvarlaktır [86].

## 2.10 Çalışmanın Amacı

İnsan sağlığı açısından faydaları uzun zamandır bilinen ve kronik hastalıklar üzerinde koruyucu ve tedavi edici potansiyele sahip olan karotenoidler günümüzde ilgi odağı durumundadırlar. Son yıllarda, karotenoid bileşikleri üzerinde gelişmiş teknikler kullanılarak yoğun çalışmalar yapılmış ve insan sağlığı üzerine birçok yeni etkiler saptanmıştır. Bu doktora çalışması ile Kırıkkale ve çevresinde yer alan sucul ortamlardan elde edilen alg örneklerinin karotenoid miktar ve çeşit bakımından karşılaştırılması ayrıca bu alg türlerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin ölçülerek değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaca uygun olarak;

➤ Kırıkkale ve çevresinde yeralan sucul ortamlardan elde edilen alg örneklerinin laboratuvarında, uygun besiyeri seçilerek ekimi yapılmış, üretimi gerçekleştirilen türlerin sedimentasyon tekniği kullanılarak ters mikroskopta sayım ve ön teşhisleri yapılmış ve çoğaltılmıştır. Bunlar, özellikle Chlorophyta grupları olmuştur.

➤ Katı veya sıvı ortamdaki saf kültürlerin, lag, büyüme ve durgunluk fazları günlük olarak takip edilmiş ve büyüme fazında iken yeni ortamlara ekimi yapılarak yarı-devamlı kültürlerin devamlılığı sağlanmıştır. Kullanılacak sıvı mikroalg kültürleri eksponansiyel büyüme fazının (log fazı) ortalarında iken santrifugasyon ve filtrasyon yöntemleriyle toplandıktan sonra kurutularak toz haline getirilmiş ve ekstraksiyon işlemine kadar karanlık ortamda, -80°C de saklanmıştır.

➤ Analize uygun olarak ekstraksiyonu yapılan numunelerin karotenoid miktar ve çeşit analizleri HPLC-TOF-MS kullanılarak elde edilen karotenoid grupların daha önceden çalışılan karotenoid standartlarına uygun olarak tanımlanması ve hesaplanması yapılmıştır.

➤ Antioksidan aktiviteleri Tek elektron transferi reaksiyonlarına dayanan (ET) analiz yöntemine göre yapılmıştır. Bu analiz yöntemde, antioksidan maddenin indirgendiğinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan derişimi ile bağlantılandırılır. Antioksidan analiz yöntemi olarak, Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü ve DPPH kullanarak “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi kullanılmıştır.

➤ Antimikrobiyal aktivite yöntemi olarak disk difüzyon ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) metodu kullanılmıştır.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kültür Ortamları

Yapılan çalışmada kullanılan CHLR, CHLMY alg türlerini yetiştirmek amacıyla Tris-Asetat-Fosfat (TAP) besiyeri, SCN alg türünü yetiştirmek amacıyla Bold's Basal Medium (BBM) kullanılmıştır. Blue Green Algae (BG-11) ve Sager and Granick (SG) besiyerleri genel besiyeri olarak alglerin izolasyonu aşamasında kullanılmıştır. Bütün besiyerlerine ait ortam içerisindeki kimyasal maddeler ve oranları sırasıyla Çizelge 3.1., Çizelge 3.2., Çizelge 3.3., Çizelge 3.4.'te verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** TAP besiyeri içeriği [87]

Stok solüsyon		İz elementler	
NH <sub>4</sub> Cl	15.0 g/L	EDTA disodium salt	50 g/250 mL
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	4.0 g/L	ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	22 g/100 mL
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2.0 g/L	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.4g/200 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28.8 mg/mL	MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	5.06 g/50 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14.4 mg/mL	CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	1.61 g/50 mL
Tris	2.42 g/L	CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	1.57 g/50 mL
Glasiyal Asetik Asit	1.0 mL	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	1.10g/50 mL
		FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	4.99 g/50 mL

**Çizelge 3.2.** BG-11 besiyeri içeriği [88]

Stok solüsyon		İz elementler	
NaNO <sub>3</sub>	150 g/L	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.0022 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	40 g/L	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.286 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75 g/L	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.181 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36 g/L	Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.002 g/L
EDTA	1 g/L	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.00004 g/L
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 g/L	NaMoO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.0039 g/L
Ferric ammonium citrat	6 g/L		

**Çizelge 3.3.** Sager ve Granick besiyeri [88]

Stok solüsyon		İz elementler	
Na <sub>3</sub> -citrate.2H <sub>2</sub> O	50 g/L	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	30 g/L	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 g/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	30 g/L	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,03 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g/L	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	10 g/L	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5,3 g/L	CuSO <sub>4</sub>	0,004 g/L
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,0 g/L		

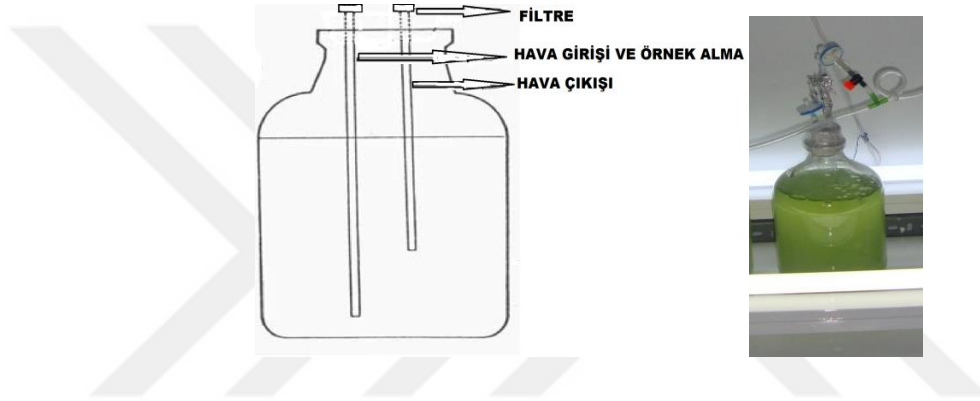
**Çizelge 3.4.** Bold's Basal Medium [89]

<b><u>Makroelementler</u></b>		<b>60ml</b>	<b><u>Alkalin Edta Solüsyonu</u></b>		<b>1ml</b>
NaNO <sub>3</sub>			EDTA		0,025 g / 0,5ml
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,025 g/10ml		KOH		0,016 g / 0,5ml
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,075 g/10ml		<b><u>Asitli Demir Solüsyonu</u></b>		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,075 g/10ml		FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O		0,005 g / 1ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,175 g/10ml		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		1ml
NaCl	0,025 g/10ml		<b><u>Boron Solüsyonu</u></b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,014 g/1ml		MoO <sub>3</sub>		0,071 g/100ml
<b><u>Trace Solüsyonu</u></b>		<b>1ml</b>	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O		0,157 g/100ml
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,882 g/100ml		Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O		0,049 g/100ml
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,144 g/100ml				
936 ml distile suya her solüsyondan yukarıda yazılı kadar eklenerek 1litreye tamamlanmış olup. pH. 6.6 olarak ayarlanmıştır.					

### 3.2. Kültür sistemleri (Fotobiyoreaktörler)

Kültürü yapılan türlerin besiyerleri 250 ml, 1 L, 2 L ve 20 L'lik otoklavlanabilen şişelerde hazırlanarak, çoğaltılma işlemi sıcaklığı kontrol edilebilen bir iklim odasında gerçekleştirilmiştir. Kültür şişelerine; hava girişi sağlama ve örnek alma amacıyla sırasıyla 0,7 x 250 mm ve 0,7 x 400 mm'lik, hava çıkışını sağlamak için ise, 0,7 x 80 mm'lik 2 adet cam boru eklenmiştir. Aynı zamanda bu cam boruların uçlarına dış ortamlardan gelebilecek kontaminasyonu engellemek amacıyla 0,2 µm'lik PTFE filtreler

takılmıştır (Şekil 3.1.). Kùltür ortamlarının ekim işlemleri yapılmadan önce 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Üretimde beslenen hava yaklaşık 1 L/dk'dır. Kùltür odasının yaklaşık sıcaklık ortalaması 25°C olacak durumda korunmuştur ayrıca 90 µmol/m<sup>2</sup>s'n ışık şiddetinde çift taraflı aydınlatma uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.a, 3.2.b.).



**Şekil 3.1.** Kùltürlerde kullanılan fotobiyoreaktör şeması ve fotoğrafı



**Şekil 3.2.a.** Deneylerde kullanılan aşu kùltür örnekleri



**Şekil 3.2.b.** Kùltür odasında fotobiyoreaktörde alg üretimi

### **3.3. Stok Kültür Hazırlanması**

Stok kültürleri hazırlamak amacıyla Kırıkkale Üniversitesi Kampüsü içerisinde bulunan göletten ve Kapulukaya Baraj suyundan 5 L su örneği alınmış ve 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra, süpernatant kısmı dökülerek pellet kısmı 1ml gölet suyu ile karıştırılarak süspansiyon elde edilmiştir. Literatürde yaygın olarak kullanılan S&G ve BG-11 besiyerlerine steril edilmiş öze yardımıyla bu süspansiyondan alınarak petrilere (plak) hazırlanan katı besi ortamına çizgi ekim metoduyla ekim gerçekleştirilmiştir. Etrafı hava almayacak şekilde parafilmle kapatılan petrilere ekim odasında uygun sıcaklık (25°C) ve yeterli ışık altında (90 µmol/m<sup>2</sup>sn) 30 cm mesafeden çift taraflı florasan lambalarla, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak şekilde aydınlatılma yapılmıştır. Bu işlemler monoalgal ve aksenik koloniler elde edilinceye kadar devam ettirilmiştir.

Daha sonra elde edilen türler otoklavlanarak steril edilmiş, ağızları pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılan 250 ml'lik Erlen Mayerlerde hazırlanan sıvı besi yerlerine aktarılarak deneylerde kullanılacak aşı kültürleri elde edilmiştir.

### **3.4. Ekimi Yapılan Türlerin Sayım İşlemi**

Ekimi yapılan türlerden CHLR türünün sayımı otomatik invitrogen marka countess cell counter cihazıyla yapılmış, SCN, CHLMY türleri lugol

solüsyonuyla sedimantasyonu sağlanmış ve Leica DM-IL marka inverted mikroskopta sayımları gerçekleştirilmiştir.

### **3.5. Ekimi Yapılan Türlerin Klorofil a Tayini**

Klo-a tayini Porra ve ark., (1989) [90] tarafından önerilen metoda göre yapılmıştır. Kültürlerden alınan 5ml'lik örnek 3000 devirde 10 dk santrifüj edilmiş süpernatant kısmı dökülmüştür. Pellet kısmına %95'lik metanol eklenerek vortekslenen örnek, 60°C de 5 dakika etüvde bekletilmiş ve sonrasında santrifüj edilmiştir. Klo-a konsantrasyonu 665 ve 652 nm'deki absorbanstan yararlanılarak aşağıdaki eşitlik üzerinden hesaplanmıştır. Ölçümler sırasında metanol kör olarak kullanılmıştır.

$$\text{Chl-a} = 16,29 \cdot A(665 \text{ nm}) - 8,54 \cdot A(652 \text{ nm})$$

### **3.6. Ekimi Yapılan Türlerin Kuru Ağırlık Ölçümü**

Kuru ağırlığın tespiti için Del Campo ve arkadaşları (2004) [91] tarafından önerilen metot kullanılmıştır. Buna göre; ölçüm öncesinde Whatman GF/C kâğıtları 80°C 24 saat kurutulmuş ve ağırlıkları not edilmiştir. Kurutulan Whatman GF/C kâğıdından su trombu yardımıyla 5 ml örnek süzölmüş ve iki kez distile su ile yıkanmıştır ve daha sonra kurutulmak üzere 80°C de 24 saat etüvde bekletilerek tartımları yapılmıştır. İlk ağırlık ile son ağırlık arasındaki fark kuru ağırlık miktarı olarak kaydedilmiştir.

### **3.7. Ekimi Yapılan Türlerin Hasat İşlemi**

Durgun faz durumuna gelen numuneler 3000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek elde edilen çöküntü kısım 1,33 Pa altında -83°C'de 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Daha sonra deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır [92].

### **3.8. HPLC-MS Cihazı Çalışması**

#### **3.8.1. Alg Ekstraktlarının Hazırlanması**

Ekstraksiyon işlemi Chen ve ark. (1991) [93] tarafından önerilen metoda göre yapılmıştır. Yaklaşık olarak 0,1 g alg örneği, 3 ml Hexane–Ethanol–Acetone–Toluene (10:6:7:7, v/v) karışımı ile 100 ml erlen içerisinde 1 saat çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Karışıma daha sonra saponifikasyonu sağlamak amacıyla 25°C'de karanlık ortamda 2 ml %40'lık metanolik KOH ilave edilmiş ve yaklaşık 16 saat çalkalayıcı etüvde bekletilmiştir. Bekleme zamanı biten karışıma karotenoidlerin ayrışmasını sağlamak amacıyla 3 ml hexane ilave edilmiştir. Solüsyon 1 dk kadar çalkalandıktan sonra %10 sodyum sülfat solüsyonu ilave edilmiştir. Bu karışım iki faz birbirinden ayrılıncaya kadar bekletilmiş, üstte kalan ve karotenoid içeren kısım mikropipet yardımıyla alınmış, kalan tortu üzerine tekrar 3 ml hexane ilave edilmiş ve karotenoid kalmayıncaya kadar aynı ekstraksiyon işlemleri tekrarlanmıştır. Elde edilen ekstrakt 40°C'de evaporatör ile kurutularak



ağızları parafilm ile ayrıca tüm yüzeyleri alüminyum folyo ile kapatılarak -20°C'de saklanmıştır. Bütün ekstraksiyon işlemi kısık ışık ortamında yapılmış ve karotenoidlerin izomerizasyonunu ve degradasyonunu önlemek için ortama nitrojen gazı verilmiştir. Karotenoid ekstraktları mobil fazda çözündürülüp 0,2 µm'lik PTFE filtreden süzöldükten sonra HPLC'ye enjekte edilmiştir.

### **3.8.2. Karotenoid Standart Çözeltilerinin Hazırlanması**

β-karoten, lutein, β-apo-8'-Karotenol, Zeaksantin, β-kriptosantin, standartları Extrasynthese firmasından temin edilmiştir. β-karoten, lutein standartlarından 1 mg alınıp 10 mL metilen klor ile çözülen standartlar. 25°C'de 2000–3000lx ışıkta (20 wattlık 4 tane flüoresan lamba) 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübe edilmiş standartlar 40°C'de evapore edilerek kurutulmuştur. Tüm standartlar HPLC'de kullanılmadan önce 1 mL methanol–methylene chloride (50:50 v/v) ile çözümlü 0.2 µm membran filtreden geçirilerek kullanılmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltilerden uygun miktarlarda alınarak belirli oranlarında seyreltilmiş ve karotenoid standart serileri hazırlanmıştır (Çizelge 3.5.).

**Çizelge 3.5.** Karotenoid standart solüsyon oranları

<b><u>Standart</u></b>	<b><u>Miktar</u></b>
<u>All Trans <math>\beta</math>-karoten</u>	<u>250, 500, 1000, 3000ppb</u>
<u>All Trans Lutein</u>	<u>250, 500, 1000, 3000ppb</u>
<u>Zeaksantin</u>	<u>25, 50, 100, 250, 500, 1000ppb</u>
<u><math>\beta</math>-kriptosantin</u>	<u>25, 50, 100, 250, 500ppb</u>

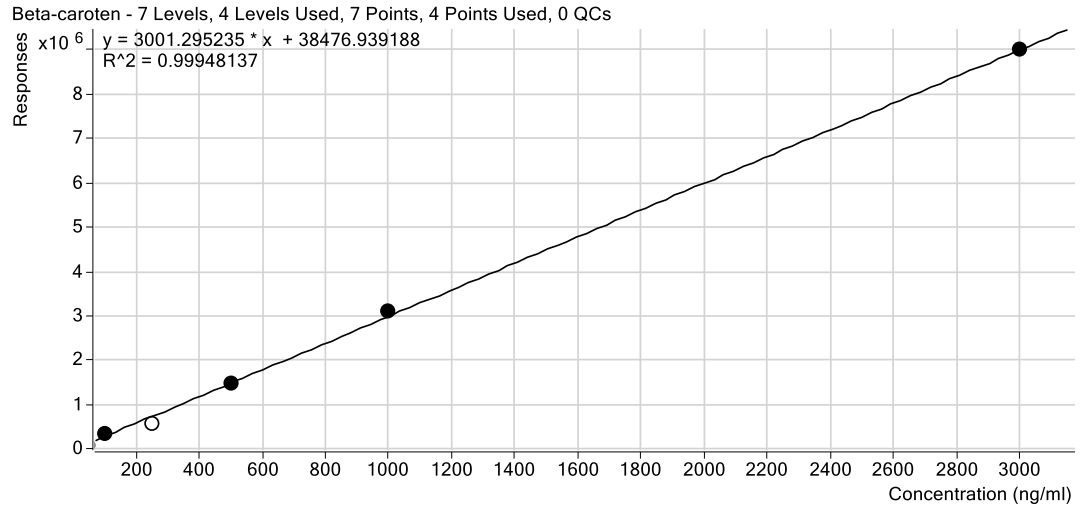
### **3.8.3. Karotenoidlerin Belirlenmesi İçin Uygulanan HPLC Metodu**

Karotenoidlerin HPLC ile analizi Inbaraj ve ark. (2006) [94] tarafından belirtilen yöntemle göre yapılmıştır. Analizde kullanılan HPLC cihazı; Waters 510 pompa (Millipore Co., Milford, USA), Waters 486 UV-VIS dedektör (Millipore Co., Milford, USA) ve Millennium 2010 chromatography software (Millipore Co., Milford, USA) kısımlarından oluşmaktadır. Karotenoidler YMC C30 kolon (250mm×4.6mm I.D., 5  $\mu$ m) (Milford, MA, USA) ile gradient sistemde ayrıştırılmıştır. Mobil faz olarak Methanol–Acetonitrile–Su (84:14:2, v/v/v) karışımı 1ml/dk akış hızında kullanılmıştır. Örnek enjeksiyon hacmi 20  $\mu$ L'dir.

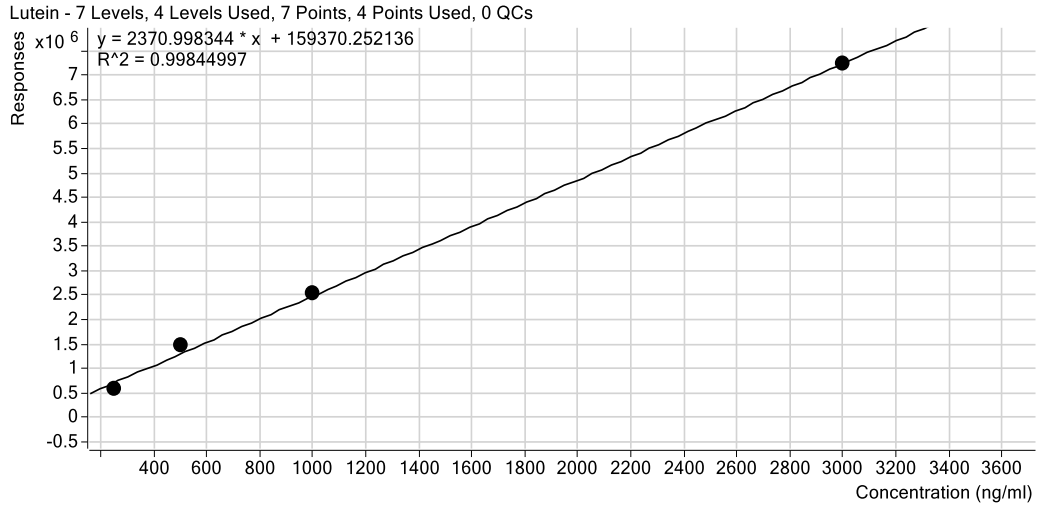
### 3.8.4. Karotenoid Piklerinin Tanımlanması Ve Hesaplanması

Algerde bulunan karotenoidler, elde edilen kromatogramda ki piklerin geliş zamanları ile karotenoid standartlarına ait piklerin geliş zamanının karşılaştırılması, örneklere standart maddelerin ilave edilmesi suretiyle elde edilen sonuçların karşılaştırılması ayrıca literatürde saptanmış spektral karakterlerinin kıyaslanması yoluyla tanımlama yapılmıştır. Karotenoid madde miktarları ise standart karotenoid maddelerden hazırlanan çalışma solüsyonları kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır.

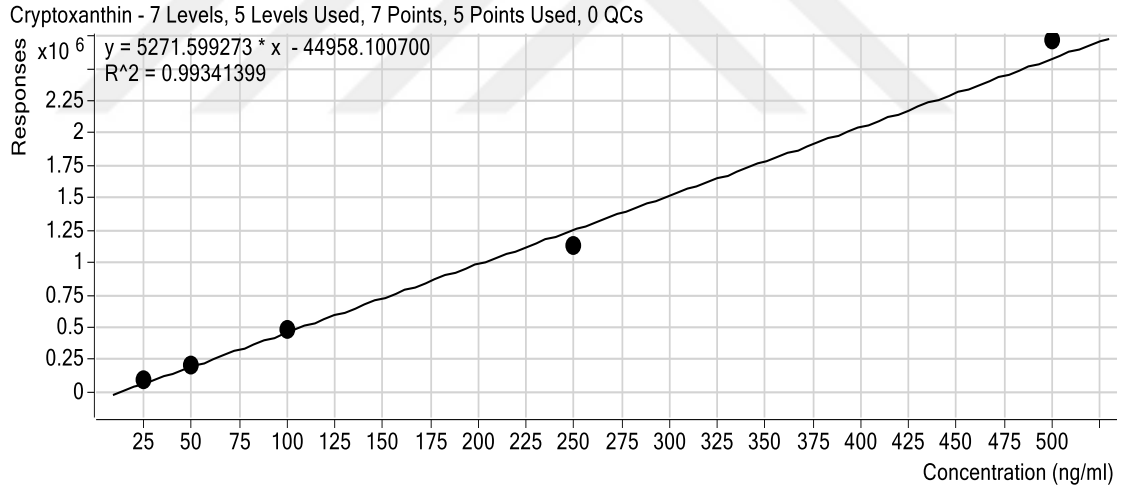
HPLC-TOFF-MS cihazında kullanılan karotenoid standartlarına ait kalibrasyon grafikleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.3., Şekil 3.4., Şekil 3.5., Şekil 3.6.).



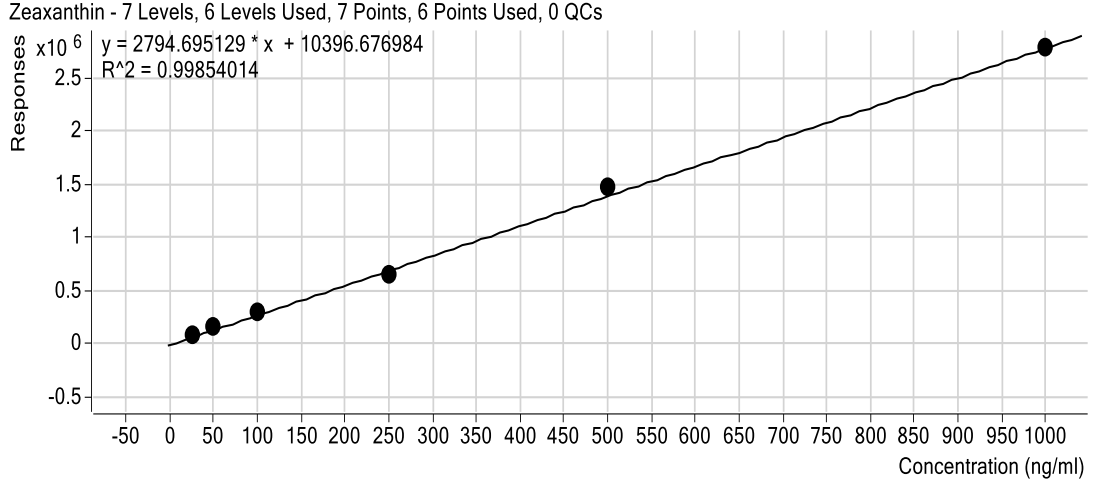
Şekil 3.3. All Trans Beta-Karoten Kalibrasyon Grafiği



**Şekil 3.4.** All Trans Lutein Kalibrasyon Grafiği



**Şekil 3.5.** Beta Kriptosantin Kalibrasyon Grafiği



**Şekil 3.6.** Zeaxantin Kalibrasyon Grafiği

### 3.9. Antimikrobiyal Aktivite Çalışması

#### 3.9.1. Antimikrobiyal Aktivite Tespitinde Kullanılan Mikroorganizmaların Üretimi

Antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi amacıyla *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Candida albicans* ATCC 8459581, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 20913 stok kültürleri kullanılmıştır. Bu kültürlerden öze yardımı ile alınan örnekler 10 ml Nutrient Broth (Merck 105443) sıvı besiyeri bulunan tüplere inokulum metodu ile ekilerek 37°C 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üremiş olan mikroorganizmalı sıvı besiyerleri 0,5 Mcfarland Bulanıklık tüpleriyle karşılaştırılmış ve bulanıklılık değerleri *Staphylococcus aureus*  $900 \times 10^6/\text{ml}$ , *Enterococcus faecalis*;  $600 \times 10^6/\text{ml}$  *Candida albicans*;  $600 \times 10^6/\text{ml}$ ,

*Escherichia coli* 600x10<sup>6</sup>/ml, *Bacillus subtilis*; 900x10<sup>6</sup>/ml olarak tespit edilmiştir. Bulanıklılık değerleri tüm mikroorganizmalar için 300x10<sup>6</sup>/ml olacak şekilde Nutrient Broth ile seyreltme işlemi yapılarak ayarlanmıştır. Daha sonra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* bulunan tüplerden Mueller-Hilton Agar (Merck 1.05437) besiyerine *Candida albicans* ise Sabouraud Dextrose Agar (Merck 105438) besiyeri bulunan petrilere steril pipet uçlarıyla 100 µl alınarak inoküle edilmiş ve eküvyon yardımıyla yüzeye tamamen yayılması sağlanmıştır. Hazırlanan petrilere alg ekstraktları emdirilmiş diskler yerleştirilmiştir. Ekstraktların antimikrobiyal etkilerini karşılaştırmak amacıyla kontrol grubu olarak tüm bakteriler için Gentamisin (CN), antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Oluşan zonları gözlemlemek için petrilere 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

### **3.9.2. Antimikrobiyal Aktivite İçin Alg Ekstraksiyon Yöntemi**

Ekstraksiyon yöntemi olarak Noemi Salvador ve ark. (2007) tarafından modifiye edilmiş olan metot (Caccamese ve ark., 1981) [95] kullanılmıştır. Buna göre liyofilize edilmiş 1 g alg örneği 1ml metanol-toluene (3:1) karışımı içinde homojen hale getirdikten sonra numuneler 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım 40°C'de evapore edilerek çöküntü kısmı 1 ml metanol ile çözülmüş ve 20 µL'si disklere emdirilerek her bir diskte 20 mg/disk alg ekstraktı olması sağlanmıştır.

### 3.9.3. Disk difüzyon metodu;

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla uygulanan disk difüzyon metodunda, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., ve *Chlamydomonas* sp. türlerinin ekstraktlarından 20 µL alınarak 6mm çaplı steril kağıt filtre disklerine (Schleicher and Schül, Nr 2668,Germany) emdirilmiş ve 45°C sıcaklıktaki kurutma fırınında 15 dakika bekletilmiştir. Bekleme sonrasında diskler kurumuş ve methanol uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kuruyan diskler, Mc Farland metodu kullanılarak konsantrasyonları bilinen bakteri suşlarının ekimi yapıldığı petri kutularına 37±0,1°C de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petri kutularındaki diskler bakteri ve maya suşlarının gelişimini inhibe ederek zon oluşturmuştur. Bu zonların çapları milimetre cinsinden ölçülmüştür [11-15].

### 3.9.4. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

Çalışmada minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) elde etme çalışmaları, Eloff'a göre [96] mikropilaka seri seyreltme yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemin uygulanmasında antimikrobiyal aktivite çalışmalarında çok sıklıkla kullanılan ve duyarlı bulunan mikroorganizmalar olan *Staphylococcus aureus* (SA), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Candida albicans* (CA) türleri kullanılmıştır.

Doksanaltı kuyucuklu mikroplate üzerine soldan sağa doğru 8 seri dilüsyon hazırlanmıştır. Seri için her bir kuyucuğa 50 µl distile su eklenmiş ilk kuyucuk içerisinde 100 µl ekstrakt eklenerek 1. kuyucuktan başlanarak alınan her 50 µl ekstrakt sıradaki kuyucuğa eklenerek seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuk üzerine 100 µl mikroorganizma eklenerek mikrolaka 37°C'de 1 gün süre ile inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün her alg türü için hazırlanmış seri dilüsyonlu mikroorganizma karışımları ayrı ayrı petri kaplarına çizgi şeklinde ekilerek 37°C'de 1 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bekleme süresi sonunda fotoğrafları çekilmiş, hangi konsantrasyonlarda üremeye devam ettikleri tespit edilerek değerlendirilmiştir.

### **3.10. Antioksidan Aktivite Ölçümü**

#### **3.10.1. DPPH Yöntemi ile Ölçüm**

Ekstraksiyon yöntemi için Caccamese ve ark. (1981) tarafından belirtilen metodunun modifiye edilmiş hali olan Noemi Salvador ve ark. (2007) [95]'nin önerdiği ekstraksiyon uygulaması kullanılmıştır. Buna göre liyofilize edilmiş 0,1 g alg örneği 1 ml metanol-toluene (3:1) karışımı içinde homejenizatör ile homojen hale getirdikten sonra numuneler 13500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım 40°C'de evapore edilerek çöküntü kısmı alınıp 1ml metanol ile çözülerek -20°C'de saklanmıştır.



DPPH deneyi için stok alg ekstrakt konsantrasyonları 2, 10, 25, 50 ve 100mg/ml olarak hazırlanmıştır. Ayrıca, pozitif kontrol olarak kullanılan BHT için 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,4 ve 0,8 mg/mL, ASC için ise; 0,001; 0,02; 0,05; 0,01; 0,02 ve 0,05 mg/mL olarak stoklar hazırlanmıştır. Deneyde kullanılmak üzere bu stoklardan 62,5 µL alınarak 125 µL metanol ile hızlıca karıştırılmıştır. Günlük olarak hazırlanan %0.004 konsantrasyondaki DPPH çözeltisinden 62,5 µL mikropate gözlerine aktarılarak mikropate çalkalayıcı ile 1050 rpm'de 15 sn karıştırılmış ve 30 dk 25°C'de inkübe edilmiş süre sonunda bekletilmeden spektrofotometrede 515 nm dalga boyunda absorbanslarındaki değişiklikler kaydedilmiştir. Ayrıca zamana karşı değişimi belirlemek amacıyla tüm standartların ve alg ekstraktlarının 0., 5., 15., 25., dakikalarda ve 25. dakikadan sonra da 10 dk boyunca 1'er dakika aralıklarla ve son olarak 45. dakikadaki ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler ile radikal temizleme gücü zamana karşı grafik çizilerek değerlendirilmiştir. Örnek miktarlarına karşılık gelen % inhibisyon değerleri belirlenmiştir [81].

$$\% \text{ İNHİBİSYON} = (AKONTROL - AÖRNEK / AKONTROL) * 100$$

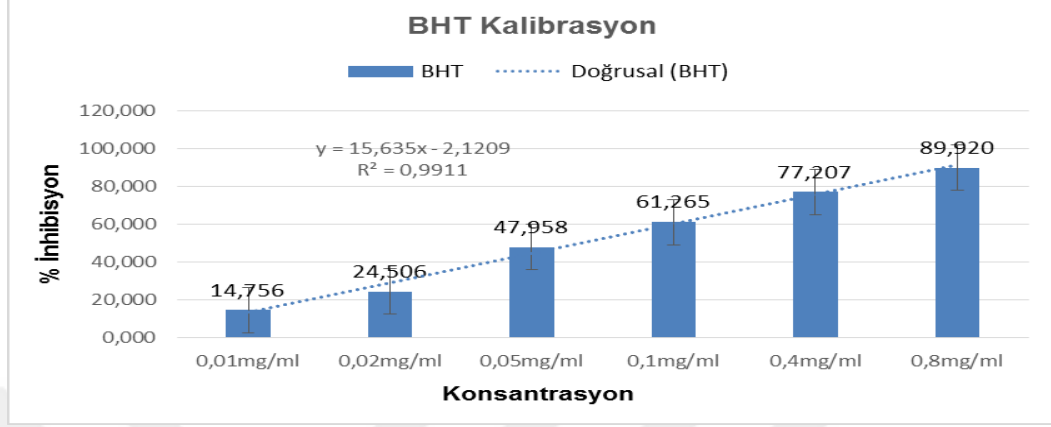
Akontrol: numune olmayan örnek absorbansı

Aörnek: numunenin absorbansı

Antioksidan derişimlerine karşı hesaplanan % İnhibisyon değerleri ile çizilecek grafikten %50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri (IC50) hesaplanmıştır.

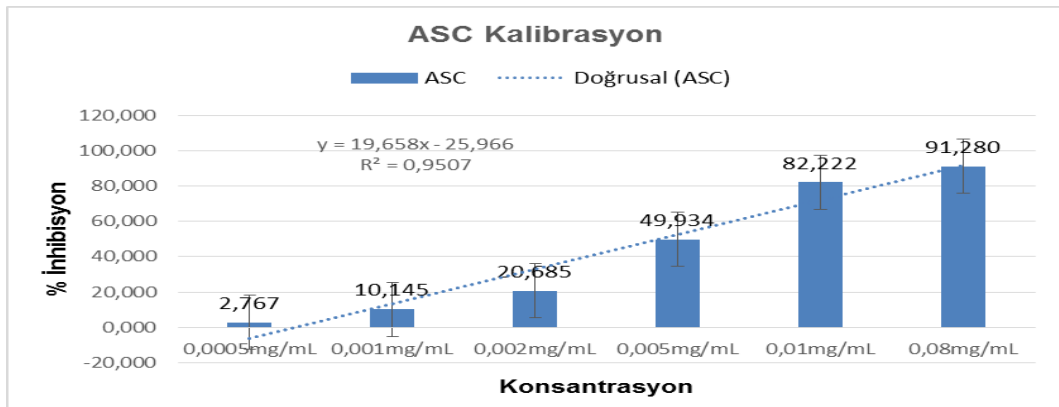
DPPH süpürme aktivite deneyinde kullanılan pozitif kontrollerden BHT'nin 0,01 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,10 mg/mL 0,4 mg/mL ve 0,8 mg/mL ekstraktlarında DPPH süpürme aktivitesi sırasıyla %17,76±0,002;

%24,50±0,002; %47,96±0,004; %61,27±0,003; %77,21±0,001 ve %89,92±0,001 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 3.7.** DPPH deneyi pozitif kontrolü BHT'nin kalibrasyon eğrisi

DPPH süpürme aktivite deneyinde kullanılan pozitif kontrollerden ASC'nin 0,0005 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,002 mg/mL, 0,005 mg/mL 0,001mg/mL ve 0.08mg/mL eksraklarında DPPH süpürme aktivitesi sırasıyla %2,77±0,001; %10,15±0,001; %20,69±0,001; %49,93±0,001, %82,22 ±0,001 ve %91,28 ±0,001 olarak hesaplanmıştır.

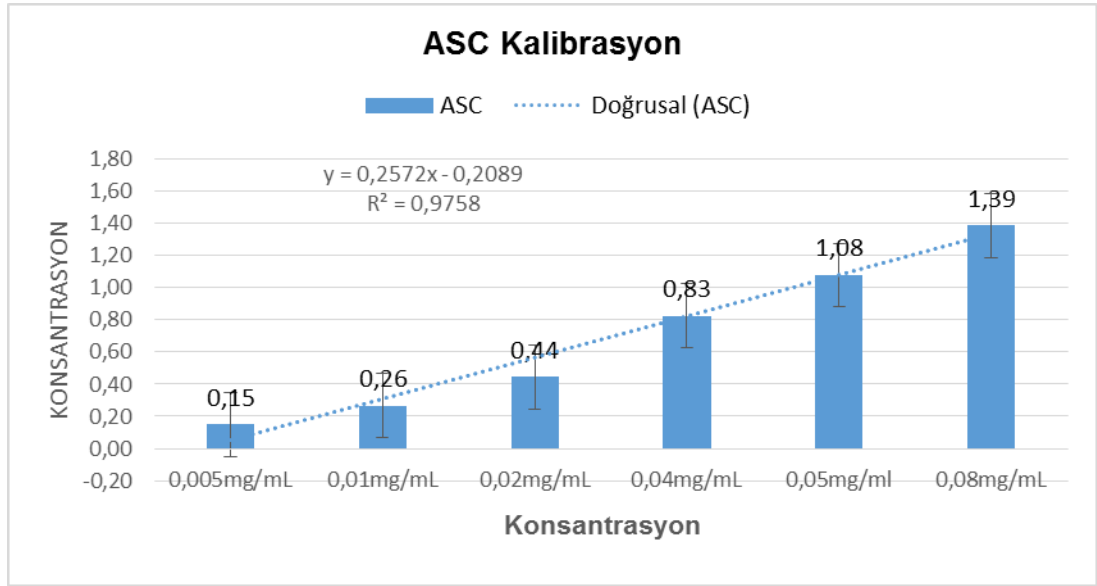


**Şekil 3.8.** DPPH deneyi pozitif kontrolü ASC'nin kalibrasyon eğrisi

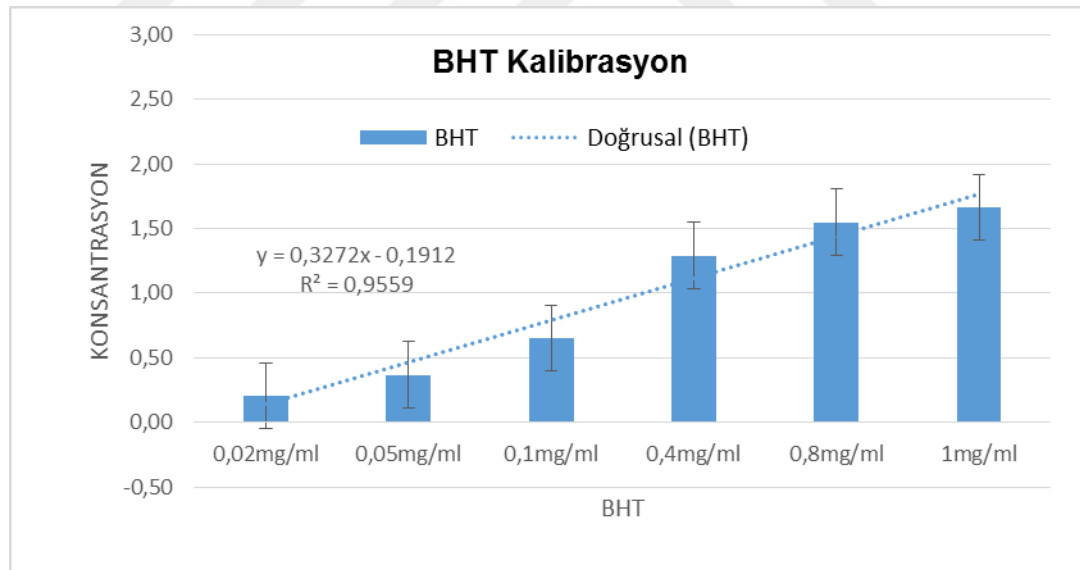
### 3.10.2. FRAP Yöntemi

FRAP yönteminde de DPPH'da kullanılan alg ekstraksiyon metodu uygulanmıştır [95].

İndirgeme gücü aktivitesi için daha önce hazırlanan stok alg türleri kullanılarak 2, 10, 25, 50 ve 100 mg/ml çözeltiler hazırlandı. Ayrıca, pozitif kontrol olarak kullanılan BHT için 0,02; 0,05; 0,1; 0,4; 0,8 ve 1 mg/mL, ASC için ise; 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,05 ve 0,08 mg/mL olarak stoklar hazırlanmıştır. Bu numune ve pozitif kontrol solüsyonlarına, fosfat tamponu (pH=6,6; 0,2 M) ve %1'lik  $K_3Fe(CN)_6$ 'den 200µL eklenmiş ve karışım 50°C 20 dk. inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda karışıma 200 µL %10'luk Trikloroasetik asit (TCA) eklenmiş, karışım 3750 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmından 125 µL alınarak 96'luk mikroplate aktarılmıştır. Bu karışıma 125 µL distile su ilave edilerek homojenizatör (heidolph marka Titromax 100) yardımı ile 1050 rpm'de karıştırılmıştır. Karışım üzerine %0,1'lik 20 µL  $FeCl_3$  ilave edilmiş ve karışımlar vortekslenmiştir. Elde edilen karışımlar 655 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren  $Fe_4 [Fe(CN)_6]_3$  kompleksinin absorpsiyonları ölçüldü ve sonuçlar bu ölçülen absorpsiyon değerlerine göre değerlendirilmiştir [97].



**Şekil 3.9.** FRAP deneyi pozitif kontrolü ASC'nin kalibrasyon eğrisi



**Şekil 3.10.** FRAP deneyi pozitif kontrolü BHT'nin kalibrasyon eğrisi

### 3.11. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İçin Numune Hazırlama

Hasatı yapılmış ve liyoflize edilerek saklanmış örneklerin aşağıda hazırlanışı verilen Trumps fiksativi [98] ile sabitlenmiştir. SEM analizi için sabitlenen örnekler süperkritik karbondioksit cihazında dehidratasyon sonrası altın kaplanarak JSM5600 30kV luk Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) fotoğrafları çekilmiştir.

Trumps fiksativi :

- 86 ml distile su
- 10 ml %37-40'lık formaldehit
- 4 ml %25'lik glutraldehit
- 1.16 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0.27 gr NaOH

## 4. BULGULAR

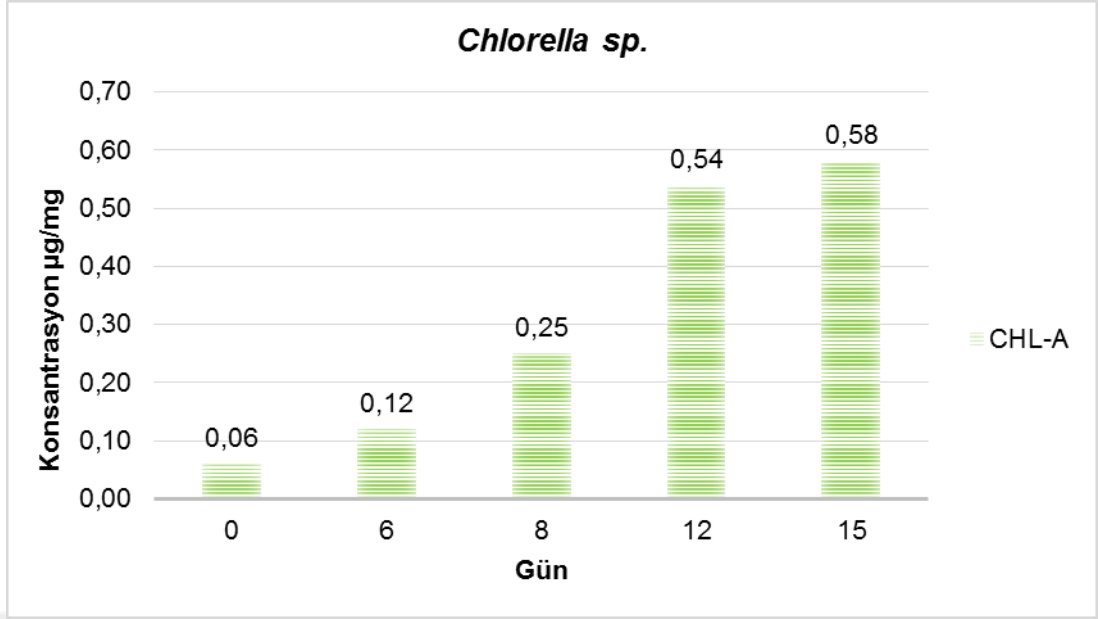
Bu alışmada, CHLR, CHLMY ve SCN mikroalg kültürlerinden karotenoid ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır.

### 4.1. *Chlorella* sp. Analiz Sonuçları

#### 4.1.1. *Chlorella* sp.'nin Klorofil *a* Miktarındaki Değişim

Yapılan çalışmada mikroalg kültürlerinin hasat zamanı yapısındaki Klo-a miktarına göre belirlenmiştir. CHLR türüne ait fotobioreaktrdeki kültürlerin zamanına bağlı Klo-a değişimleri Şekil 4.1. de verilmiştir. Buna göre CHLR için hasat zamanı 15. gün olarak bulunmuştur.

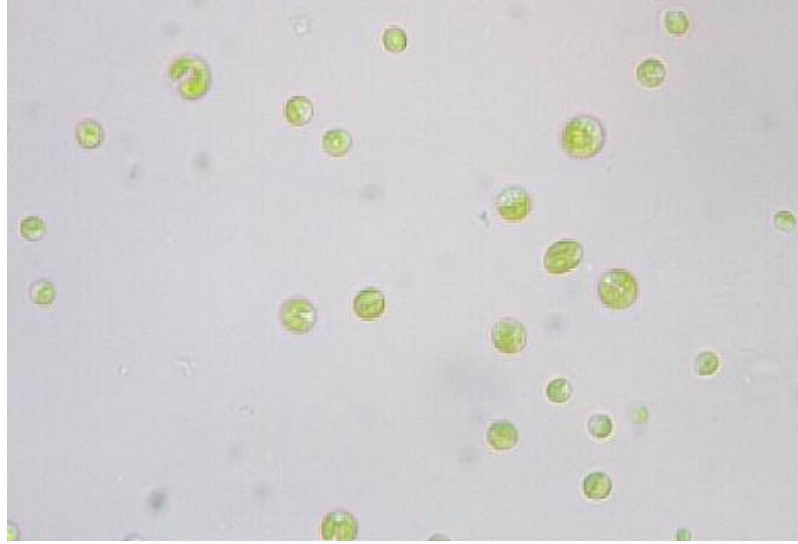
Ekimi yapılan türlerden CHLR türü 15 günlük üretim periyodunda 8. günden itibaren kültür ortamlarının hücre üremesine etkisi belirginleşmeye başlamış olup 8. günde hücre yoğunluğu başlangıca göre 4 kat artmıştır. 12. günden itibaren durgunlaşma fazına girdiği görülmüştür. Sekonder metabolitlerin üretiminin durgun fazda en yüksek düzeye ulaştığı bilinmektedir [99].



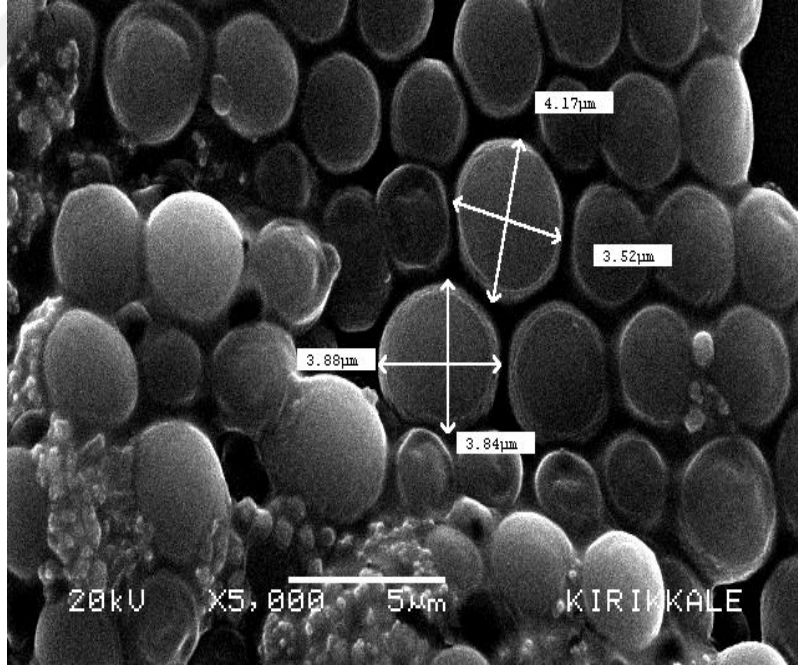
**Şekil 4.1.** *Chlorella* sp. türüne ait Klorofil a pigmentinin zamana bağlı değişimi

#### 4.1.2. *Chlorella* sp. Işık Mikroskobu ve SEM Görüntüleri

Bu çalışmada kullanılan CHLR'ye ait ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskop şekilleri Şekil 4.2. ve Şekil 4.3. de sırasıyla verilmiştir.



Şekil 4.2. *Chlorella* sp. 10x40 inverted mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.3. *Chlorella* sp. elektron mikroskop görüntüsü



#### 4.1.3. *Chlorella* sp. Karotenoid Analizi

Analizi yapılan CHLR. türüne ait karoten miktarlarına ait ortalama ve standart sapma değerleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Buna göre en yüksek karoten içeriği all trans lutein olup  $32,85 \pm 1,04$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  olarak bulunmuş ve sırasıyla  $6,35 \pm 1,56$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  all trans beta karoten,  $1,16 \pm 0,12$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ , all trans zeaksantin ve  $0,4 \pm 0,06$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  ile beta kriptosantin bulunmuştur.

**Çizelge 4.1.** *Chlorella* sp. karoten miktarı  $\mu\text{g}/\text{mg}$  cinsinden derişimi.

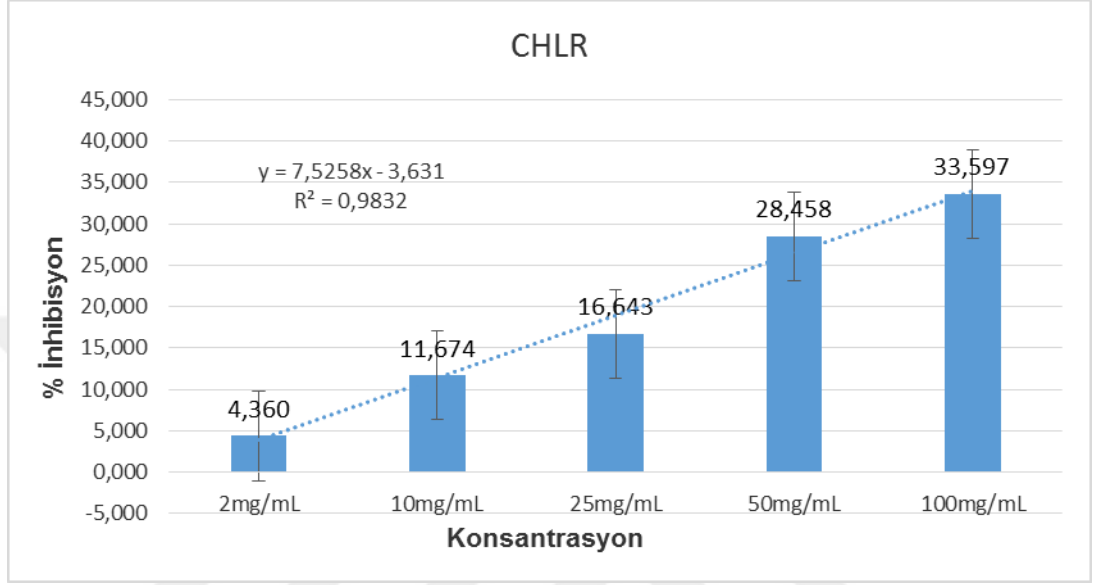
	<u>All Trans Lutein</u>	<u>All Trans Zeaksantin</u>	<u>Beta Kriptosantin</u>	<u>All Trans Beta Karoten</u>
<i>Chlr</i>	$32,85 \pm 1,04$	$1,16 \pm 0,12$	$0,4 \pm 0,06$	$6,35 \pm 1,56$

#### 4.1.4. *Chlorella* sp. Antioksidan Sonuçları

##### 4.1.4.1. *Chlorella* sp. DPPH Sonuçları

Analizi yapılan CHLR türüne ait DPPH süpürme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi Şekil 4.4.'te verilmiştir. CHLR türünün 2 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL ve 100 mg/mL ekstraktlarında DPPH süpürme aktivitesi sırasıyla  $\%4,36 \pm 0,001$ ;  $\%11,67 \pm 0,002$ ;  $\%16,64 \pm 0,002$ ;  $\%28,49 \pm 0,001$  ve  $\%33,60 \pm 0,002$  olarak gözlenmiştir.

Literatürde yaygın olarak DPPH aktivite belirteci olarak kullanılan IC50 değeri, CHLR türü için çalışmamızda 7,13 µg/mg olarak hesaplanmıştır.

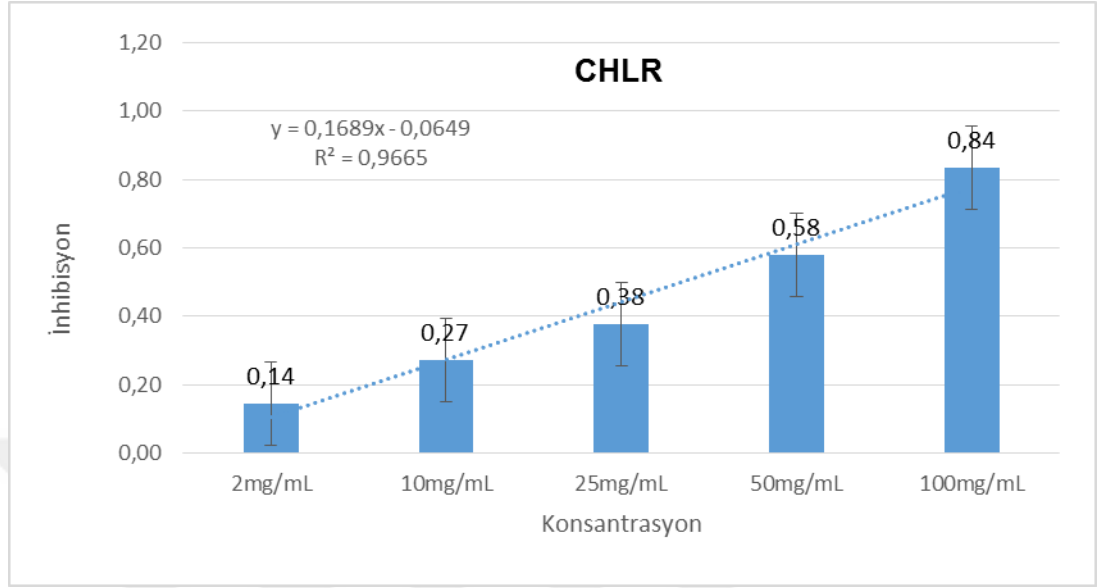


**Şekil 4.4.** *Chlorella* sp. türüne ait DPPH süpürme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi.

#### 4.1.4.2. *Chlorella* sp. Türüne Ait FRAP Sonuçları

Analizi yapılan CHLR türüne ait FRAP indirgeme aktivitesinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.5.'te verilmiştir. CHLR türünde 2 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL ve 100 mg/mL ekstraktlarında FRAP indirgeme aktivitesi sırasıyla 1,35; 1,85; 2,27; 3,04 ve 4,04 mg/mL ASC ve 1,03; 1,43; 1,76; 2,37

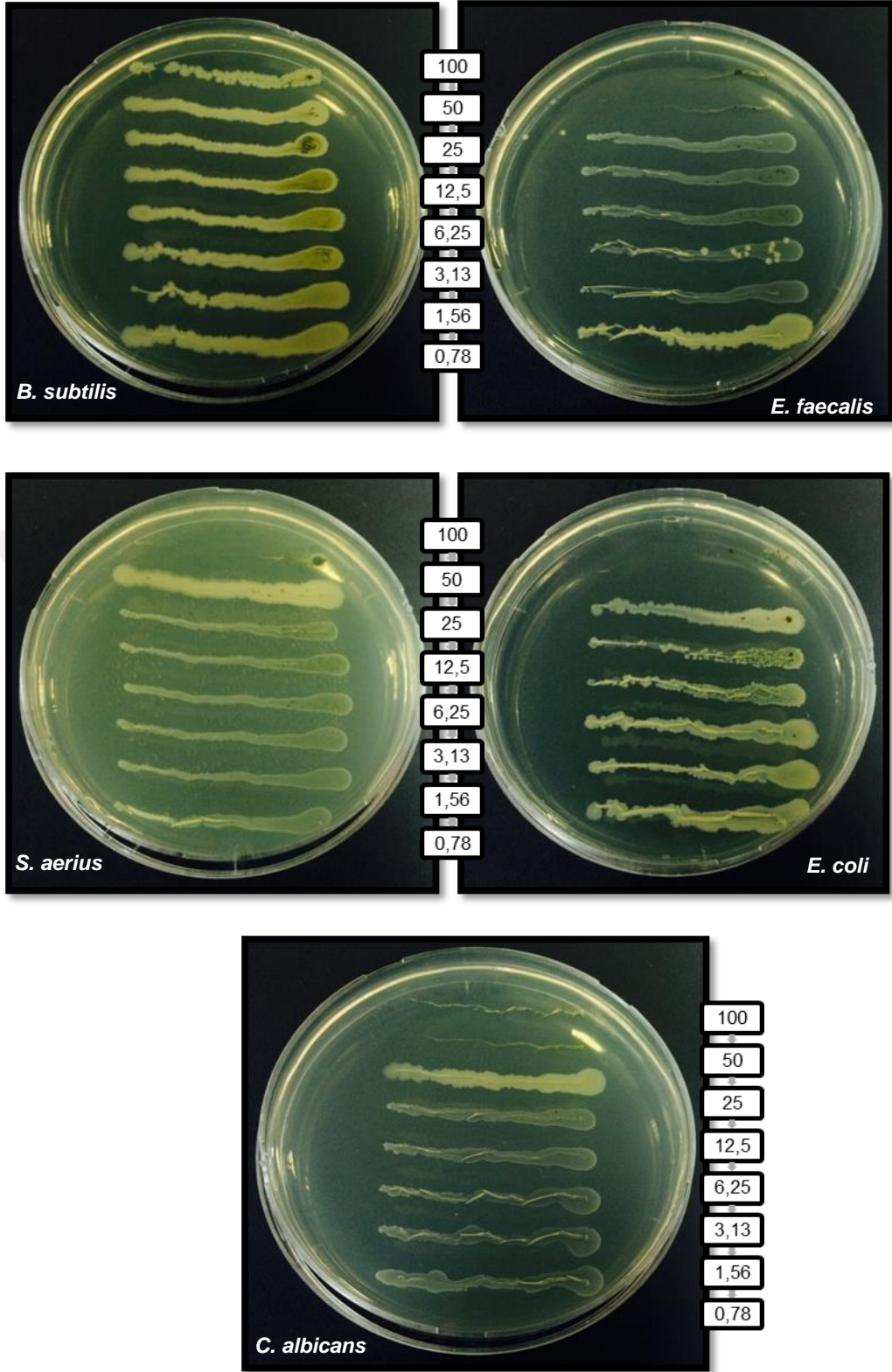
ve 3.16 mg/mL BHT eşitliği olarak bulunmuştur. Deneyde kullanılan pozitif kontrollerde benzer eşitlikler saptanmıştır.



**Şekil 4.5.** *Chlorella* sp. türüne ait FRAP indirgeme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi

#### 4.1.5. *Chlorella* sp. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Test Sonuçları

Analizi yapılan CHLR türünün; *S. aerius*, *B.subtilis*, *C.albicans*, *E. faecalis* ve *E. coli* mikroorganizmalarına karşı göstermiş olduğu Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) sonuçları Şekil 4.6. ve Çizelge.4.1.2.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre en düşük MİK değeri olarak 25 mg/mL ile *E. faecalis* ve *E. coli* mikroorganizmalarına karşı inhibisyon göstermiştir. Çalışılan konsantrasyonlarda *B. subtilis* türüne karşı herhangi bir inhibisyon görülmemiştir.



Şekil 4.6. *Chlorella* sp. türüne ait MİK testi fotoğrafları

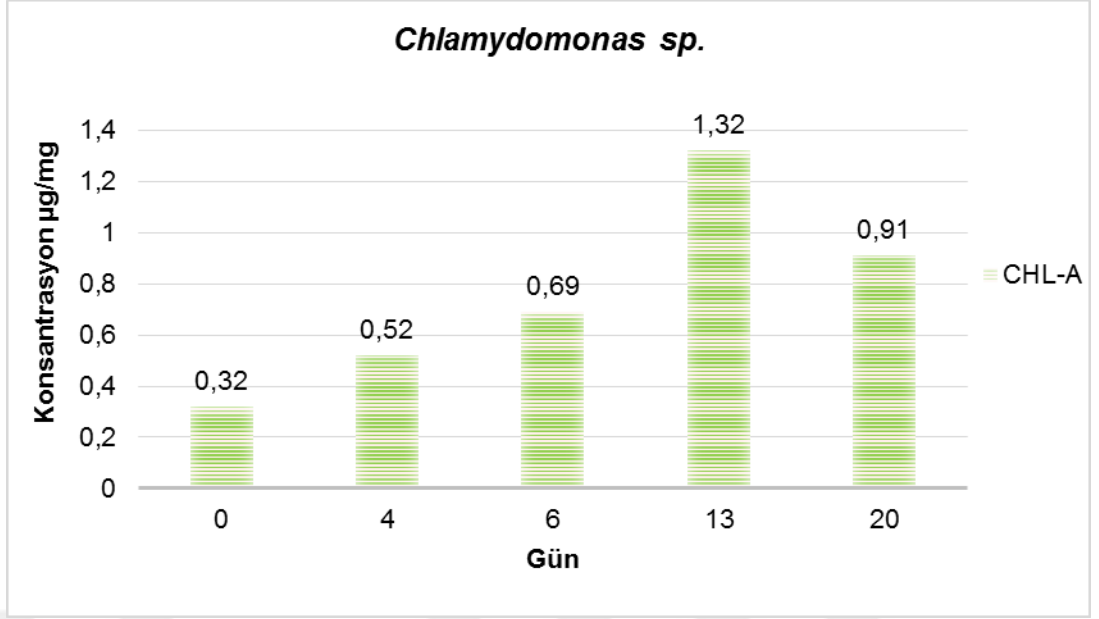
**Çizelge 4.2.** *Chlorella* sp. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon sonuçları

CHLR	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	12,5 mg/mL	6,25 mg/mL	3,13 mg/mL	1,56 mg/mL	0,78 mg/mL
<i>S. aerius</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>B.subtilis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.albicans.</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-

## 4.2. *Chlamydomonas* sp. Analiz Sonuçları

### 4.2.1. *Chlamydomonas* sp. Klorofil a Miktarındaki Değişim

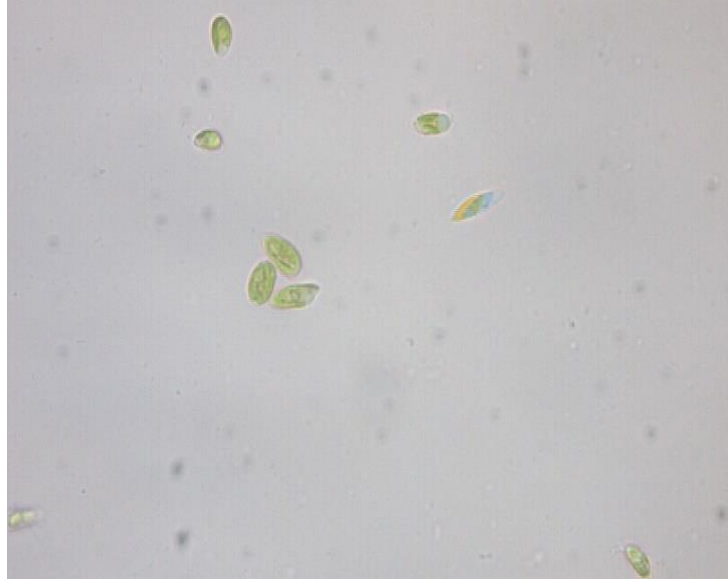
CHLMY türüne ait kültür şartlarında, Klo-a pigmentinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.2.1.'de verilmiştir. Grafikte görüldüğü üzere 6. günden itibaren etkili bir büyüme saptanmış, 13. günden itibaren durgunlaşma fazına geçildiği saptanmıştır.



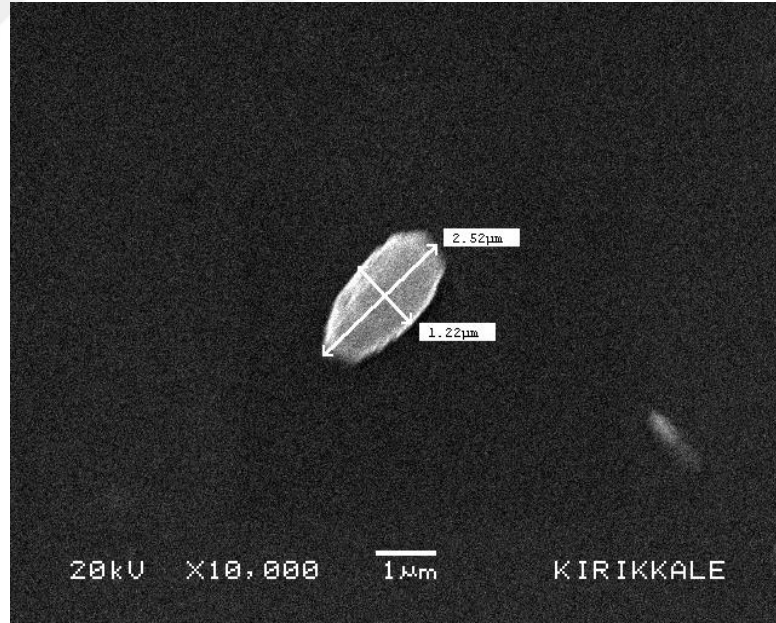
**Şekil 4.7.** *Chlamydomonas sp.* türüne ait klorofil a pigmentinin zamana bağlı değişimi.

#### 4.2.2. *Chlamydomonas sp.* Işık Mikroskobu ve SEM Görüntüleri

Bu çalışmada kullanılan CHLMY'e ait ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskop görüntüleri Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.'da sırasıyla verilmiştir.



**Şekil 4.8.** *Chlamydomonas* sp. 10x40 inverted mikroskop görüntüsü.



**Şekil 4.9.** *Chlamydomonas* sp. elektron mikroskop görüntüsü.

#### 4.2.3. *Chlamydomonas* sp. Türüne Ait Karotenoid Analizi

Analizi yapılan CHLMY türüne ait karoten miktarlarına ait ortalama ve standart sapma değerleri Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir. Buna göre en yüksek karoten içeriği all trans lutein olup  $32,85\pm 1,04$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  olarak bulunmuş ve sırasıyla  $6,35\pm 1,56$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ , all trans beta karoten,  $1,16\pm 0,12$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ , all trans zeaksantin ve  $0,4\pm 0,06$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  ile beta kriptosantin olarak bulunmuştur.

**Çizelge 4.3.** *Chlamydomonas* sp. karoten miktarları  $\mu\text{g}/\text{mg}$  cinsinden değişimi.

	<u>All Trans Lutein</u>	<u>All Trans Zeaksantin</u>	<u>Beta Kriptosantin</u>	<u>All Trans Beta Karoten</u>
<b>Chlmy</b>	$15,60\pm 3,20$	$1,71\pm 0,09$	$0,20\pm 0,03$	$4,18\pm 1,72$

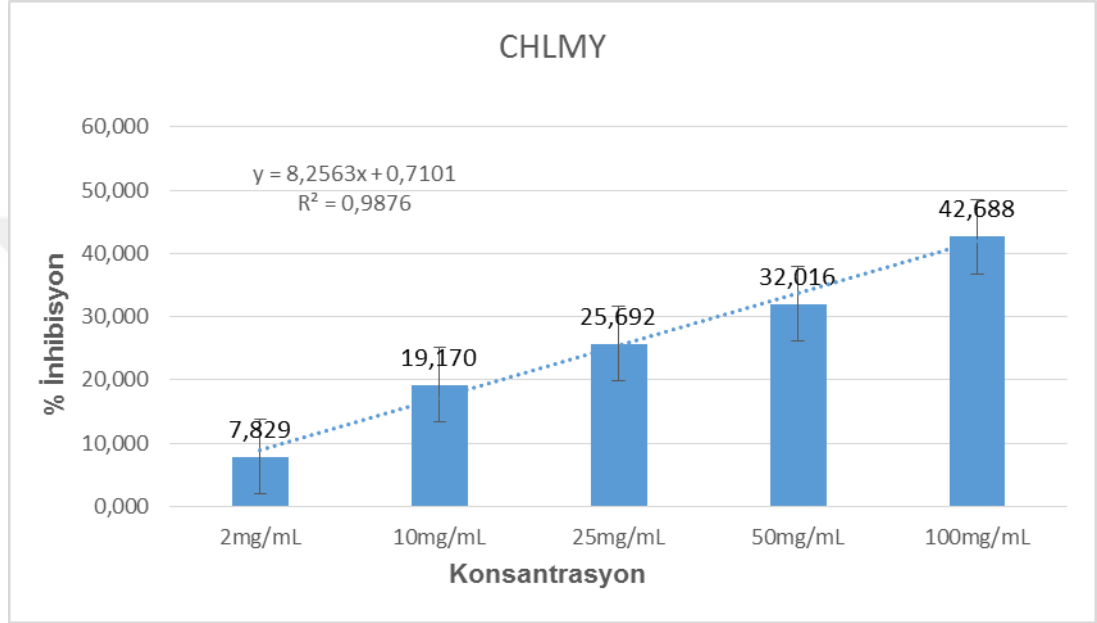
#### 4.2.4. *Chlamydomonas* sp. Türüne Ait Antioksidan Sonuçları

##### 4.2.4.1. *Chlamydomonas* sp. Türüne Ait DPPH Sonuçları

Analizi yapılan CHLMY türüne ait DPPH süpürme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi Şekil 4.10.'da verilmiştir. CHLMY türüne ait 2 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL ve 100 mg/mL ekstraktlarında DPPH süpürme aktivitesi sırasıyla  $\%7,83\pm 0,001$ ;  $\%19,17\pm 0,001$ ,



%25,69±0,001; %32,02±0,001 ve %42,69±0,001 olarak bulunmuştur. CHLMY türü için bu çalışmada IC50 değeri 5,97 µg/mg olarak hesaplanmıştır.

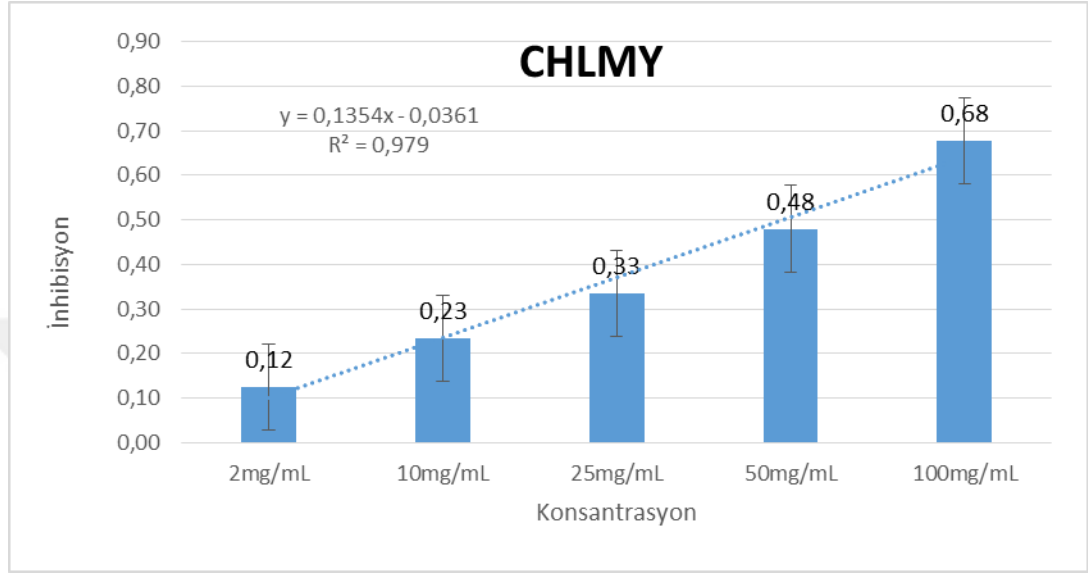


**Şekil 4.10.** *Chlamydomonas* sp. türüne ait DPPH süpürme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi.

#### 4.2.4.2. *Chlamydomonas* sp. Türüne Ait FRAP Sonuçları

Analizi yapılan CHLMY türüne ait FRAP indirgeme aktivitesinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.11.'de verilmiştir. CHLMY türünde 2 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL ve 100 mg/mL ekstraktlarında FRAP

indirgeme aktivitesi sırasıyla 1,27; 1,70; 2,08; 2,66; 3,43 mg/mL ASC ve 0,97; 1,31; 1,61; 2,06; 2,67 mg/mL BHT eşitliği olarak bulunmuştur.



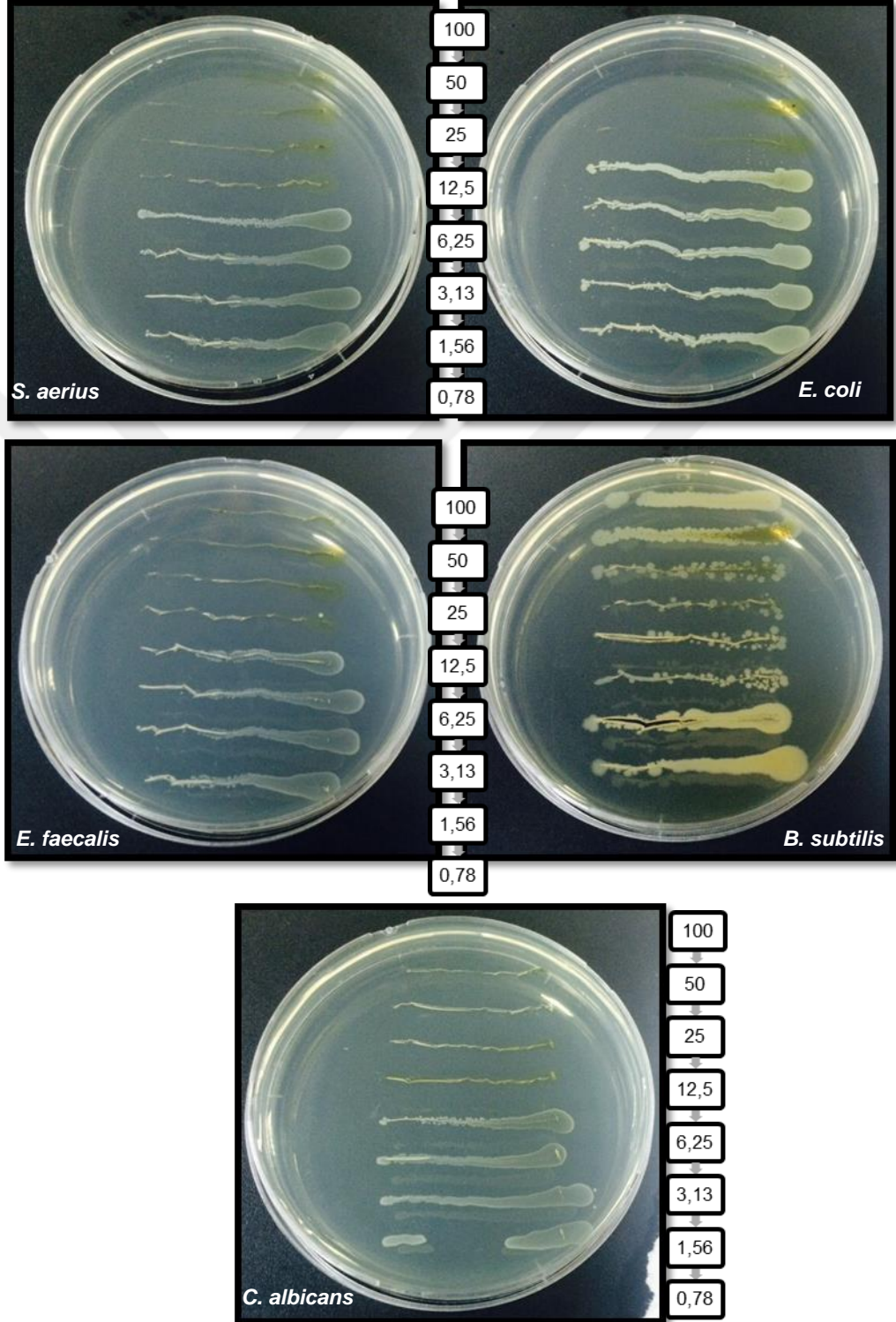
**Şekil 4.11.** *Chlamydomonas* sp. türüne ait FRAP indirgeme aktivitesinin zamana bağlı değişimi

#### 4.2.5. *Chlamydomonas* sp. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Test

##### Sonuçları

Analizi yapılan CHLMY türünün; *S. aerius*, *B.subtilis*, *C.albicans*, *E. faecalis* ve *E. coli* mikroorganizmalarına karşı göstermiş olduğu Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) sonuçları Şekil 4.12. ve Çizelge 4.4'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre en düşük MİK değeri olarak 12.5 mg/mL ile *E. faecalis*, *S. aerius* ve *C.albicans* mikroorganizmalarına karşı inhibisyon

göstermiştir. uygulanan konsantrasyonlarda *B.subtilis* türüne karşı herhangi bir inhibisyon görülmemiştir.



Şekil 4.12. *Chlamydomonas* sp. türüne ait MİK testi fotoğrafları

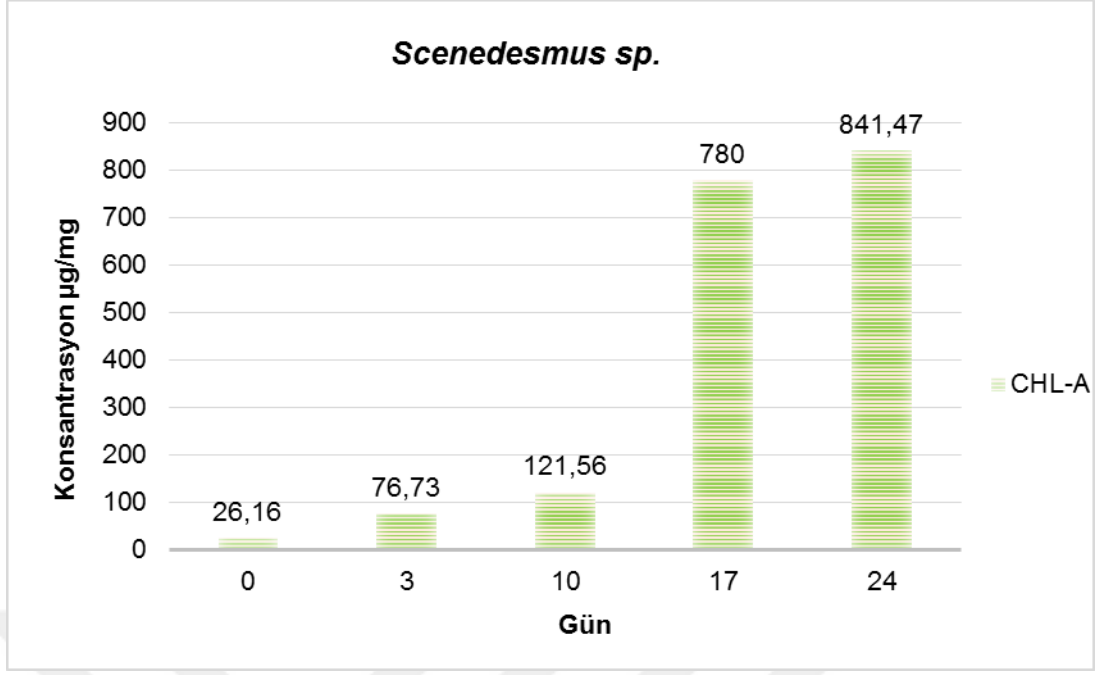
**Çizelge 4.4.** *Chlamydomonas* sp. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon sonuçları

CHLMY	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	12,5 mg/mL	6,25 mg/mL	3,13 mg/mL	1,56 mg/mL	0,78 mg/mL
<i>S. aerius</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>B.subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.albicans.</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-

### 4.3. *Scenedesmus* sp. Türüne Ait Analiz Sonuçları

#### 4.3.1. *Scenedesmus* sp. Türünün Biyokütlesinin Zamana Bağlı Değişimi

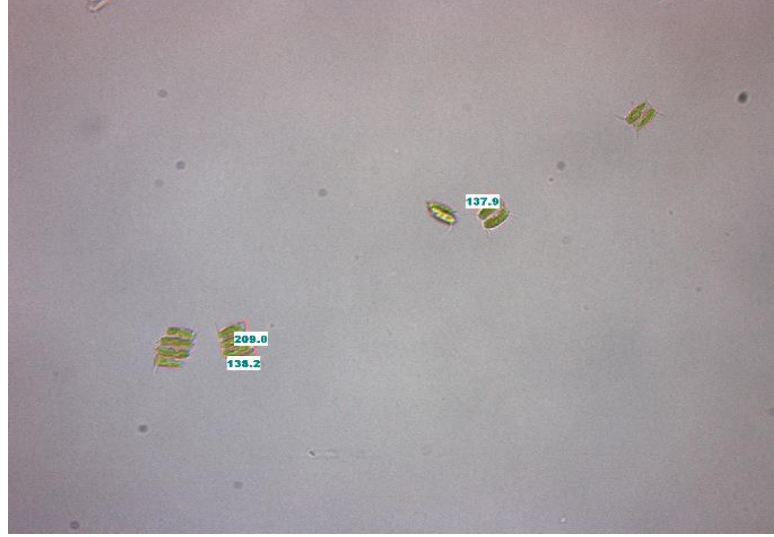
SCN türüne ait kültür şartlarında, biyokütlesinin zamanına bağlı değişimi Şekil 4.13.'te verilmiştir. SCN türünde 10. günden itibaren kültür ortamlarının hücre sayısı kayda değer oranda belirginleşmeye başlamış ve sonraki 7 gün sonunda hücre yoğunluğu yaklaşık 6,5 kat arttığı saptanmıştır. 17. günden itibaren ise durgunlaşma fazına geçildiği görülmüştür.



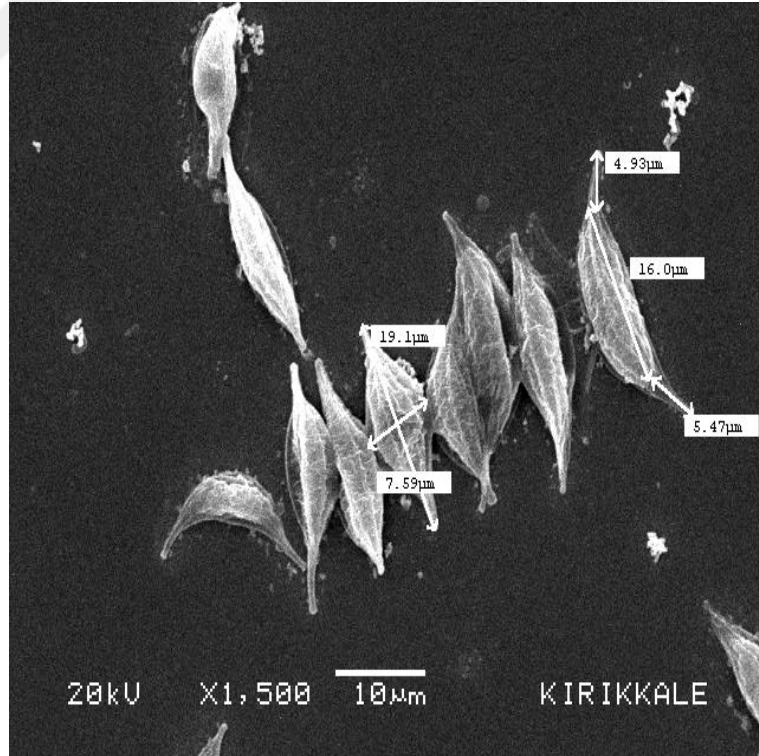
**Şekil 4.13.** *Scenedesmus sp.* biokütlesinin zamana bağlı değişimi

#### 4.3.2. *Scenedesmus sp.* Türüne Ait Işık Mikroskobu ve SEM Görüntüleri

Bu çalışmada kullanılan SCN'ye ait ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskop görüntüleri Şekil 4.14. ve Şekil 4.15.'de sırasıyla verilmiştir.



Şekil 4.14. *Scenedesmus* sp. 10x40 inverted mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.15. *Scenedesmus* sp. elektron mikroskop görüntüsü.

#### 4.3.3. *Scenedesmus* sp. Türüne Ait Karotenoid Analizi

Analizi yapılan SCN türüne ait karoten miktarlarına ait ortalama ve standart sapma değerleri Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Buna göre en yüksek karoten içeriği all trans lutein olup  $14,96\pm 0,62$  µg/mg olarak bulunmuş ve sırasıyla  $7,16\pm 1,23$  µg/mg all trans beta karoten,  $0,85\pm 0,13$  µg/mg, all trans zeaksantin ve  $0,45\pm 0,09$  µg/mg ile beta kriptosantin olarak bulunmuştur.

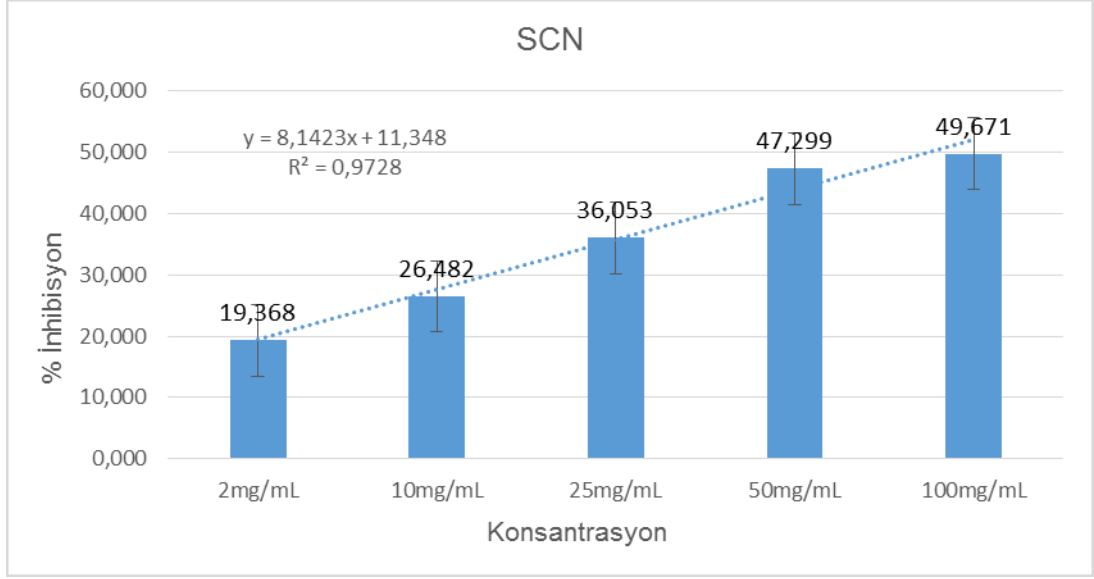
**Çizelge 4.5.** *Scenedesmus* sp. karoten miktarı µg/mg cinsinden derişimi

	<u>All Trans</u> <u>Lutein</u>	<u>All Trans</u> <u>Zeaksantin</u>	<u>Beta</u> <u>Kriptosantin</u>	<u>All Trans</u> <u>Beta Karoten</u>
<b>Scn</b>	$14.96\pm 0.62$	$0.85\pm 0.13$	$0.45\pm 0.09$	$7.16\pm 1.23$

#### 4.3.4. *Scenedesmus* sp. Türüne Ait Antioksidan Sonuçları

##### 4.3.4.1. *Scenedesmus* sp. Türüne Ait DPPH Sonuçları

Analizi yapılan SCN türüne ait DPPH süpürme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi Şekil.4.16.'da verilmiştir. SCN türün 2 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL ve 100 mg/mL ksraktlarında DPPH süpürme aktivitesi sırasıyla  $\%19,37\pm 0,001$ ;  $\%26,48\pm 0,001$ ;  $\%36,05\pm 0,001$ ;  $\%47,23\pm 0,002$  ve  $\%49,67\pm 0,001$  olarak gözlenmiştir. SCN türü için çalışmamızda IC50 değeri 4,75 µg/mg olarak hesaplanmıştır.

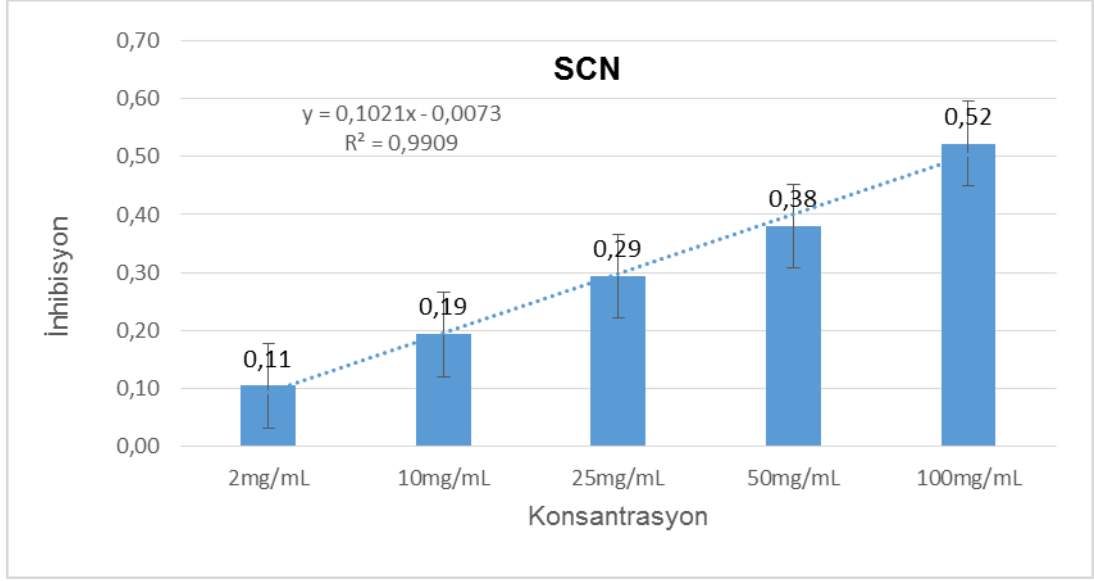


**Şekil 4.16.** *Scenedesmus* sp. türüne ait DPPH süpürme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi

#### 4.3.4.2. *Scenedesmus* sp. Türüne Ait FRAP Sonuçları

Analizi yapılan SCN türüne ait FRAP indirgeme aktivitesinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.17.'de verilmiştir. SCN türünde 2 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL ve 100 mg/mL ekstraktlarında FRAP indirgeme aktivitesi sırasıyla 1,23; 1,54; 1,93; 2,27; 2,81 mg/mL ASC ve 0,94; 1,19; 1,49; 1,76; 2,19 mg/mL BHT eşitliği olarak bulunmuştur.



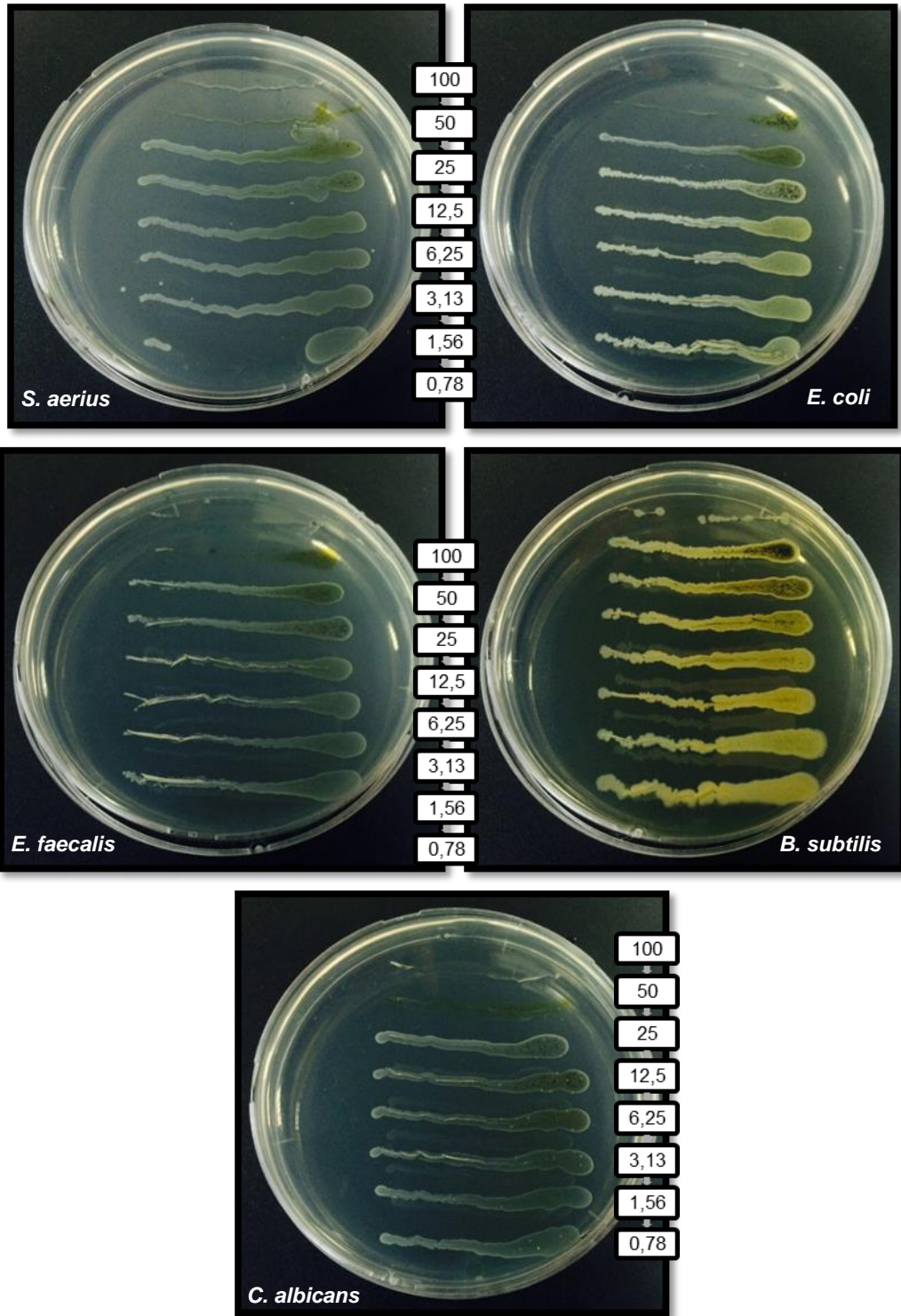


**Şekil 4.17.** *Scenedesmus* sp. türüne ait FRAP indirgeme aktivitesinin konsantrasyona bağlı değişimi.

#### 4.3.5. *Scenedesmus* sp. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Test

##### Sonuçları

Analizi yapılan SCN türünün; *S. aerius*, *B.subtilis*, *C.albicans*, *E. faecalis* ve *E. coli* mikroorganizmalarına karşı göstermiş olduğu Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) sonuçları Şekil 4.18. ve Çizelge.4.3.2.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre SCN türü, *B.subtilis* mikroorganizması hariç diğer mikroorganizmalara karşı 50 mg/mL olarak aynı inhibisyon konsantrasyonu göstermiştir.



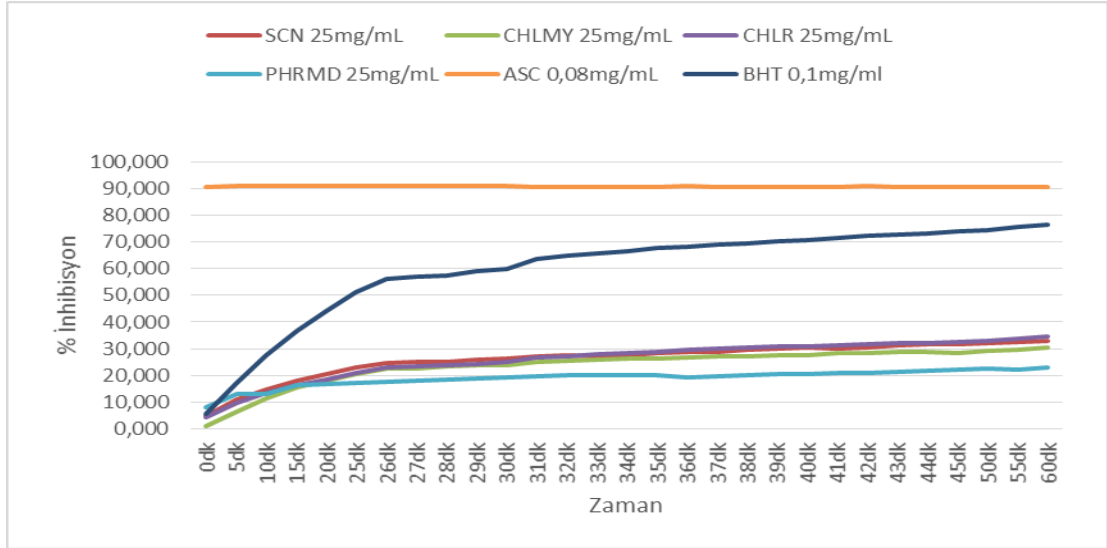
Şekil 4.18. *Scenedesmus* sp. türüne ait MİK testi fotoğrafları

**Çizelge 4.6.** *Scenedesmus* sp. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon sonuçları

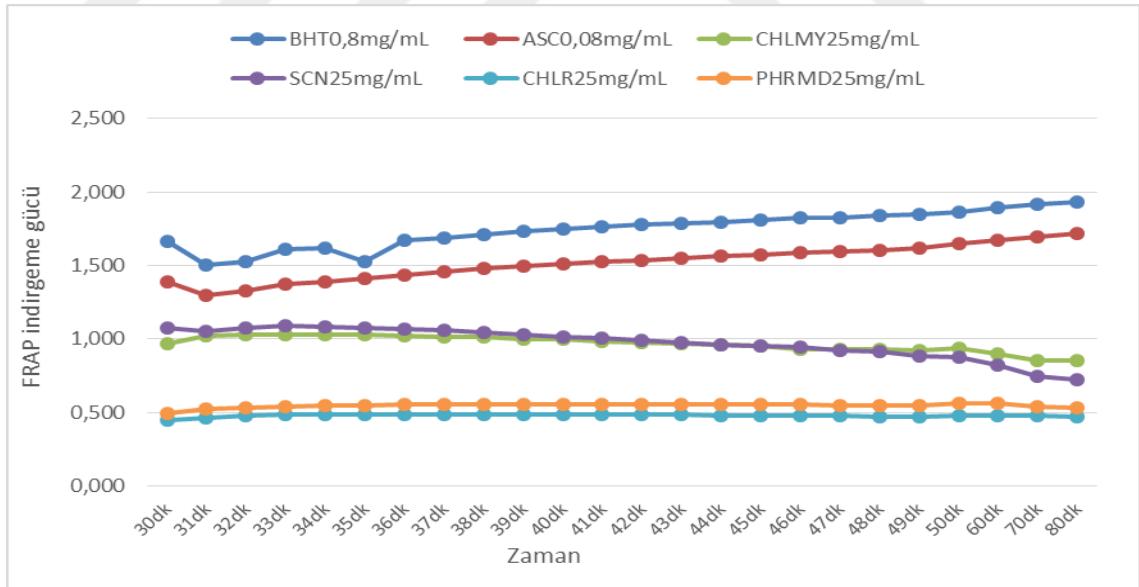
SCN	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	12,5 mg/mL	6,25 mg/mL	3,13 mg/mL	1,56 mg/mL	0,78 mg/mL
<i>S. aerius</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>B.subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.albicans.</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	-	-	-	-	-	-

#### 4.4. İncelenen Türlere Ait Antioksidan Testlerinin (DPPH ve FRAP) Zamana Bağlı Değişimi

İncelenen türlerin ve kontrollerin DPPH aktivitelerinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.19.'da verilmiştir. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi DPPH süpürme aktivitesi ASC pozitif kontrolü hariç tüm örneklerde 15 dakikadan itibaren yavaşlamaya başlamış olup 25 dakikadan itibaren DPPH süpürme aktivitesi hemen hemen en yüksek seviyeye ulaşır ve sabit kalma eğilimi göstermiştir.



**Şekil 4.19.** Çalışılan alg türleri ve pozitif kontrollerin DPPH % inhibisyonun zamana bağlı değişimi



**Şekil 4.20.** Çalışılan alg türleri ve pozitif kontrollerin FRAP indirgeme gücünün zamana bağlı değişimi.

#### 4.6. Çalışılan Türlerle Ait Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

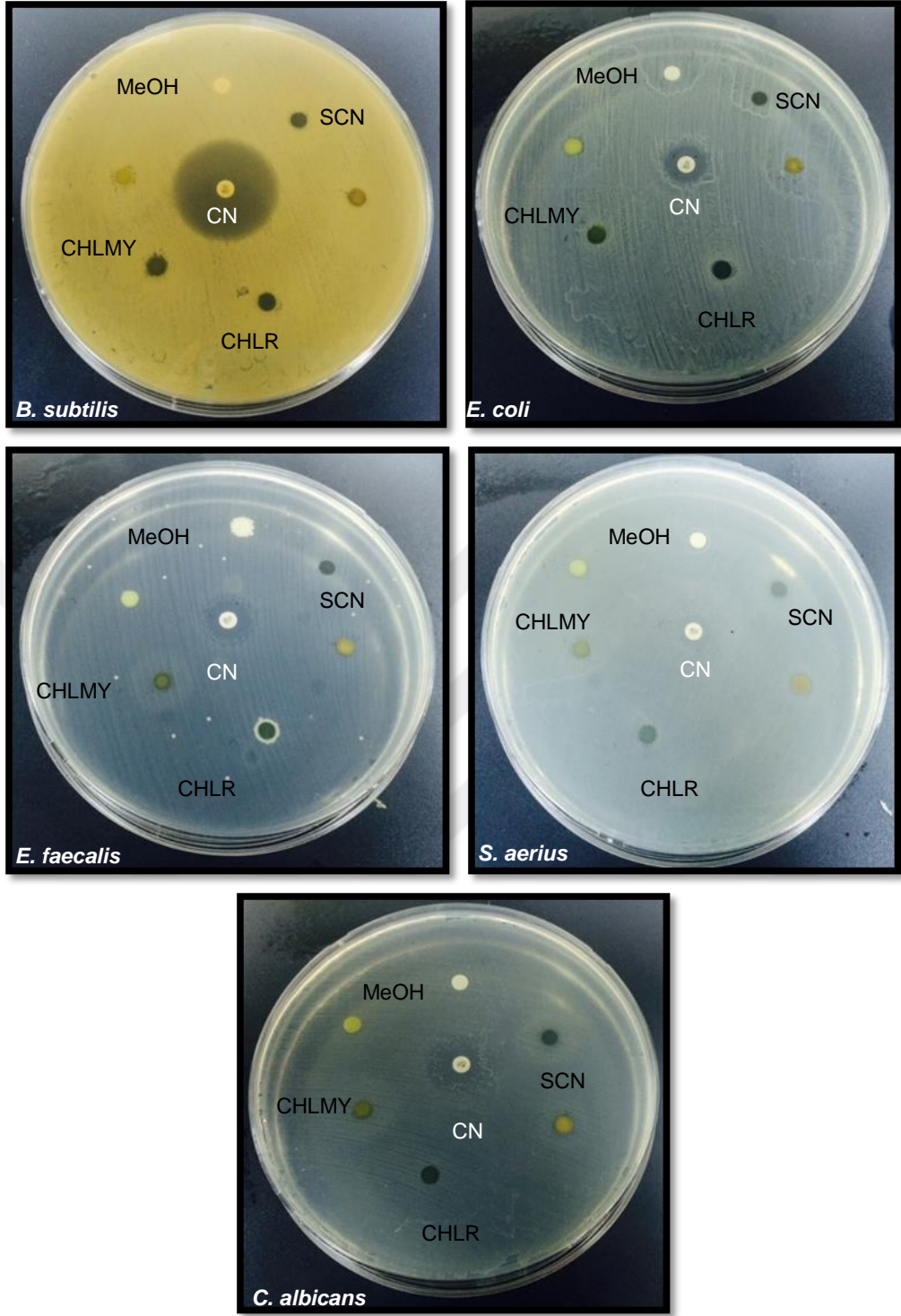
Antimikrobiyal çalışmalarda; *Staphylococcus aureus* (SA) ve *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) bakterileri gram pozitif, *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Bacillus subtilis* (BA) gram negatif bakterileri olarak kullanılmış olup maya kültürü olarak *Candida albicans* (CA), mikroorganizması tercih edilmiştir.

##### 4.6.1 Disk Difüzyon Metodu

Disk difüzyon metoduna göre türlerin sonuç fotoğrafları Şekil 4.21.'de ayrıca ölçüm sonuçları Çizelge 4.7' de verilmiştir. Bu tez kapsamında üretilen dört mikroalg türünden elde edilen ekstraktlar, kullanılan bakteriler ve maya mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinlik yönünden denenmiş ancak herhangi bir inhibisyon zonu gözlenememiştir.

**Çizelge 4.7.** Analizi yapılan türlere ait disk difüzyon antimikrobiyal sonuçları (mm)

Türler	SA			<i>B. subtilis</i>			<i>E. faecalis</i>			<i>E. coli</i>			CA.	
CHLR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHLMY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SCN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol	20	18	19	39	38	36	14	18	18	14	16	15	24	22



**Şekil 4.21.** Disk difüzyon metodu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivitenin fotoğrafları

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yeni antioksidan ve antimikrobiyal bileşenlerin günümüz biyoteknolojisi ile keşfetmek ve geliştirmek için algler üzerine yapılan çalışmaların, son zamanlarda giderek arttığı görülmüştür [100]. Bu çalışmalarda; ototrofik kültür sistemlerinde kültüre alınan tür ile optimal büyüme hızı arasında doğrusal ilişkiyi sağlayabilmek için kullanılan besin ortamı, kullanılan sistemin yüzey alanı, materyalin ve ışığın su kolonunda aldığı yol, ışığın nüfuz etme gücü gibi etkenlerin biyoması dolaylı ya da direkt olarak etkilediği ileri sürülmektedir. Bu koşulların en uygun biçimde sağlanması ile üretilmesi hedeflenen alg kültürlerinin verimliliği ve karotenoid gibi sekonder metabolitlerin miktarı maksimum düzeyde sağlanmış olacaktır [101,102].

Bu bağlamda öncelikli olarak üretilecek alg türlerine uygun besiyerleri seçilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmada CHLR, CHLMY türleri için çoğu fotosentetik mikroalgler için uygun TAP besiyeri çözeltisi [89] ve SCN türü ise BBM besiyeri [103] kullanılarak maksimum düzeyde verim alınmaya çalışılmıştır.

Yapılan çalışmalarda alglerin yapılarında yer alan önemli gruplardan birisi olan karotenoidlerin belirlenmesi amacıyla farklı solvent sistemleri ve farklı ekstraksiyon metodları ortaya konulmuştur. Özellikle biyolojik örneklerin ekstraksiyonunda yaygın olarak su ile karışım gösterebilen aseton, metanol, etanol, THF gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Ancak bu çözücüler kullanılarak yapılan ekstraksiyon çalışmalarında karotenoidlerin bütün

fotosentetik organizmalarda bulunması ve yağda çözünen pigmentler [33] olması sebebiyle tespit miktarında mevcut yağ miktarı ve diğer bileşiklere göre düşüklük olabileceği literatürde belirtilmiştir. Bu sebeple kullanılan ekstraksiyon işlemine sabunlaşma aşamasının eklenerek karotenoidlerin diğer metabolitlerden ayrılmasının sağlanması gerektiği belirtilmektedir. Sabunlaşma; özellikle trigliseridler olmak üzere lipidlerin ve klorofillerin karotenoidlerden ayrılmasını sağlayan önemli bir aşama olduğu ortaya konulmuştur. Yapılan bu çalışmada da ekstraksiyon aşamasında bu sebeplerden dolayı Chen ve ark. (1991) [93] tarafından önerilen metod kullanılmıştır.

Ekstraktların analiz edilmesinde OCC, TLC, GC gibi farklı kromatografik metotlar kullanılabilmeyle beraber günümüzde farklı kolon ve mobil faz seçeneklerinden dolayı yaygın olarak HPLC cihazı ile analiz yapılmaktadır [104]. Normal ve ters faz sistemler ayrıca izokritik veya gradient elüsyon sistemleri karoten analizinde kullanılmasına rağmen literatürde en çok rapor edilen karoten analizi C18 ve C30 kolonların kullanıldığı ters faz HPLC sistemleridir. Karotenoidlerin geometrik izomerlerinin ayrılmasında genel olarak polimerik C30 kolonunun C18' den daha iyi sonuçlar verdiği belirtilmiştir [104]. Bu çalışmada HPLC-TOF-MS cihazında gradient elüsyon ve C30 kolon sistemi kullanılmıştır.

Literatürde sıklıkla tespit edilen karoten türlerinden all trans  $\beta$  karoten, all trans lutein, all trans zeaksantin ve all trans  $\beta$  kriptosantin [17-20,105] yapılan bu çalışmada belirlenen karoten türleri olmuştur. İncelenen Chlorophyta grubuna ait alg türlerinde (CHLR, SCN CHLMY) en yüksek



düzeyde belirlenen karoten çeşidi all trans lutein olarak belirlenmiş [91,94] ve bu durumun literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

Cha ve ark. (2010) [106] *Chlorella vulgaris* ile yaptıkları çalışmada farklı ekstraksiyon metodları kullanmışlar ve tespit edilen karoten çeşitleri içerisinde en fazla olanın lutein (2,97- 3,78 mg/g) olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise; CHLR türü için tespit edilen en yüksek lutein miktarı  $32,85 \pm 1,04$  mg/g olarak hesaplanmıştır. Inbaraj ve ark. (2006) [94] tarafından *Chlorella* sp. tabletleri kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ekstraksiyon işlemleri bizim çalışmamızla benzer şekilde gerçekleştirilmiş ve lutein yine en fazla miktarda tespit edilen karoten olmuştur. Bu çalışmada all trans lutein miktarı 125,03 mg/g olarak belirtilmiştir. Yine bu çalışmada tespit edilen zeaksantin ve  $\beta$  kriptosantin miktarlarının çalışmamızla benzer olduğu ve lutein miktarına göre oldukça düşük olduğu görülmüştür. Diğer bir karoten çeşidi olan all trans  $\beta$  karoten miktarı Inbaraj ve ark. tarafından yapılan çalışmada 2,15 mg/g olarak verilirken, yaptığımız çalışmada ise 6, 35 mg/g olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda karoten miktarlarında gözlemlenen miktar farklılıklarının kültüre edilirken kullanılan ortam koşulları, ekstraksiyon ve ayrılma işlemi sırasında kullanılan metot farklılıklarından kaynaklandığı belirtilmiştir [107,108]. Ayrıca diğer bir etkenin de izomerizasyon olduğu yine literatürde dile getirilmiştir [109].

Günümüzde antimikrobiyal ve antioksidan aktivite sergileyebilen yeni bileşiklerin bulunması ve kullanımı ile ilgili çalışmalar özellikle alglerden elde edilen ve ticari öneme sahip karotenler gibi metabolitlere olan ilgiyi artırmıştır [110].

Bu amaçla algler ile ilgili yapılan çalışmalarda alg ekstraktlarının elde edilmesinde kullanılmak üzere farklı konsantrasyonlarda; etanol, hekzan, dietileter, asetonitril, metanol, toluen gibi çözügenler ve suyun, ayrıca çeşitli oranlarda karıştırılarak kullanıldığı literatürde [111,112] görülmektedir. Bu çalışmada ekstraksiyon yöntemi olarak Noemi Salvador ve ark., (2007) tarafından modifiye edilmiş olan Caccamese ve ark. (1981) [95] metodu kullanılmıştır.

Alglerin son yıllarda besin ve endüstriyel olarak kullanımının artması sonucu alglerden elde edilen sekonder metabolitlerin antiviral, antifungal ve antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve bu etkinliğin ortamda bulunan temel bileşenlerden ve iklimsel değişiklikler gibi çevresel parametrelerden oldukça etkilenmekte olduğu bildirilmiştir [112]. Yapılan antifungal ve antibakteriyel etkinlik çalışmalarında, farklı bölgelerden aynı zaman aralığında toplanan örnekler için aylık değişimlerin de görüldüğü bildirilmektedir [112]. Antimikrobiyal aktivitenin tespit edilmesi için literatürde kuyu difüzyon ve disk difüzyon tekniği ayrıca organizmaların antibiyotiklere olan hassasiyetini saptamada 'altın standart' olarak bilinen minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) gibi test tekniklerin sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir [113].

Bu çalışmada, disk difüzyon tekniği ve MİK testi kullanılarak Chlorophyta grubu alglerinden üç farklı alg türünden elde edilen ekstraktların 3'ü gram(+), 1'i gram(-) bakteri suşlarına ve 1 maya hücresine karşı antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir. Disk difüzyon testine göre yapılan çalışma kapsamında, birçok literatür kaynağı aynı alg türlerinin çeşitli çözügenlerde antimikrobiyal etkisini doğrulamasına [95,111] rağmen bu

çalışmada incelenen 3 farklı mikroalg türünün hiçbirinde antimikrobiyal aktivite disk difüzyon metoduna göre saptanamamıştır. Bunun sebebi olarak yeterli konsantrasyonda alg ekstraktının kullanılmamış olabileceği ve ayrıca yöntemin duyarlılık hassasiyetinin düşük olduğu düşünülmüştür. Daha hassas olduğu bilinen MİK testi aynı alg ekstratlarında uygulanmış ve elde edilen sonuçlara göre incelenen 3 farklı türden CHLMY türünün de diğer iki türe karşı daha fazla etkisinin olduğu belirlenmiştir. Priya (2012) [114] *Chlorella vulgaris* ile yaptığı çalışmada MİK testi dağılımını 25-40 µg/ml olarak bildirmiştir. Bu çalışmada CHL türüne ait MİK testi 25-100 mg/ml aralığında tespit edilmiş olup bu aktiviteler arasındaki büyük farklılığın besiyortamı ve ışık gibi ekolojik parametrelere bağlı olduğu ayrıca örnek materyalin taze ya da liyofilize olarak kullanımının da bu farklılıklara neden olabileceği Marti ve ark. (2004) [115] tarafından bildirilmiştir.

Antimikrobiyal aktivitelerini tespit ettiğimiz alg türlerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için literatürde de sıklıkla uygulanan [81,82,116] hidrojen atomu transferi reaksiyonuna (HAT) dayanan DPPH süpürme aktivite yöntemi ve tek elektron transferi reaksiyonlarına dayanan (ET) analiz yöntemlerinden; Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü ile test edilmiştir.

DPPH deneyi numunede bulunan antioksidant bileşiğinin DPPH radikali ile reaksiyona girerek indirgenmesine dayanır. Kararlı mor renge sahip olan bu radikalın antioksidan maddelerle indirgenmesi sonucu radikalın rengi sarıya doğru değişmekte bu renk değişimi 515 nm dalga boyunda kaydedilebilmektedir. Trolox® ve Ascorbic asit solüsyonları standart olarak

kullanılabilmektedir [117,118]. Bu çalışmada standart solüsyon olarak ASC (Ascorbik asit) ve BHT (Butylated hydroxytoluene) antioksidantları kullanılmış sırasıyla %95 ve %99'luk korelasyon katsayısı elde edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda alınan alg numunelerinin süpürme aktivite yüzdeleri %3,797 ile %36,053 arasında tespit edilmiş. Tüm numune ve standartlarda konsantrasyon ile doğru orantılı olarak bir artış saptanmıştır. Örneklere ait IC50 hesaplamaları; SCN: 4,75 µg/mg, CHLMY: 5,97 µg/mg ve CHLR: 7,13µg/mg olarak bulunmuş, süpürme aktivite gücü sırasıyla SCN, CHLMY ve CHLR şeklinde tespit edilmiştir. Choochote ve ark. (2014) [119] *chlorella* türlerinde DPPH radikal süpürme deneyinde 1,4 mg/mL' de %68,18 ile %58.98 olarak bildirmiş IC50 olarakta 0,81 ile 1,04 literatürde yaygın olarak DPPH aktivite belirteci olarak kullanılan IC50 değeri, bu çalışmada CHLR türü için 7,13 µg/mg olarak hesaplanmıştır. DPPH radikal süpürme etkisi reaksiyon karışımının pH'sı, radikal süpürücünün kimyasal yapısı ve reaksiyon ortamının polaritesine bağlı olarak etkilenmektedir [120].

Antimikrobiyal aktivitelerini tespit ettiğimiz diğer bir ET analiz yöntemi olan Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP), oksidan bileşik olan radikalın, antioksidan maddeden elektron alarak renk değişimine uğramasına bu değişimin ölçülmesi prensibine bağlıdır. Alg numunelerinin antioksidan özellikleri diğer bir yöntem olan FRAP metoduna göre incelenmiş ve farklı konsantrasyonlarda alınan alg ekstraktlarının DPPH sonuçlarına paralellik gösterdiği saptanmıştır. Bu verilere göre bizim çalışmamızda kullanılan alg türlerinde indirgeme potansiyeli sırasıyla SCN, CHLMY ve CHLR olarak

bulunmuş bu sonuçlar DPPH süpürme aktivite deneyi ile uyumluluk göstermiştir.

## 5.1. Sonuç ve Değerlendirme

Kırıkkale ve çevresinde yer alan sucul ortamlardan izole edilen farklı türlerin laboratuvar şartlarında kültürü yapılmış, üretimi gerçekleştirilen türlerin karotenoid kompozisyonu ve miktarları tespit edilmiştir. Ayrıca bu türlerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri farklı metotlarla ölçülmüştür.

İncelenen alg türleri kendi içerisinde ve literatürdeki aynı türler ile karotenoidlerin dağılımı ve ayırımı bakımından birbirine benzerlik göstermiştir.

İncelenen türler arasında ve literatürel karoten miktar farklılıkları gözlenmiş bu farklılıkların;

- i) Türsel (genetiksel) kaynaklı
- ii) Metodik kaynaklı
  - Ekstraksiyon metodu
  - Hplc ölçüm metodu
- iii) Ortamsal kaynaklı
  - Besin kompozisyonu
  - Isı şiddeti

- Işık şiddetinden kaynaklandığı literatürde de çokça ifade edilmiştir.

İncelenen türlerin hepsinde antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler tespit edilmiş ve bu literatür bilgileriyle de uyum göstermiştir. Bu türler arasında karşılaştırma yapabilecek düzeyde bilgiler edinilmiş, bu çalışmada kültüre edilmiş tür arasından CHLMY türü diğer türlere göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite, SCN türü ise daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

Bu çalışmanın devamı niteliğinde çalışılan türlerin gen analizinin yapılarak suşsal karşılaştırmaların yapılması, hedeflenen ticari öneme sahip sekonder metabolitler için optimum şartların sağlanması ile ülkemiz için önemli bir çok sekonder metabolitin ithalatına karşı yerli kültür ürünlerinin ve pazarın oluşmasını sağlayacak çalışmalar ve araştırmalar için temel oluşturacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Cirik, Ş., Algae in Turkish sea and their means of evaluation, (in Turkish). Çevre haberleri, Boğaziçi Üniversitesi yayınları, İstanbul, (9): 65-68, 1981.
- [2] Kaya G., Tibbi bitki rezervi olarak orman kaynaklarının gelecek değerinin belirlenmesinde kullanılan p&p modelinin irdelenmesi. ZKÜ Bartın Orman Fakültesi Dergisi, (8): 9, 23-32, 2006.
- [3] Bhagirathy, K. A., Valuation of Medicinal Plants: Unresolved Issues and Emerging Questions. South Asian Network for Development and Environmental Economics Newsletter, 2003.
- [4] Bann, C., Turkey Forest Sector Review-Global Environment Overlays Program, Draft Report, WorldBank, Turkish Agency, Ankara, 1998.
- [5] Dewick, P.M., Medicinal Natural Products, 2nd ed., Wiley, Chichester, 507pp., 2002.
- [6] Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T., Thin Layer Chromatography in Phytochemistry, CRC press Taylor & Francis, Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, 2008.

- [7] Özyalın, S., Kemer Baraj Gölü (Aydın) Fitoplanktonunun incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü, izmir, 2008.
- [8] Sasson, A., Mikroalgal Biotechnologies: Recent Developments and Prospects for Developing Countries, BIOTECH Publication 1/2542, pg: 3, 46, 1997.
- [9] Bold, H. C. and Wynne, M. J., Introduction to the algae. 2nd ed. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall, 1985.
- [10] Becker, E.W., Microalgae:Biotechnology and Microbiology, Cambridge University Press. Inbaraj, B. S., Chien, J. T., & Chen, B. H., 2006. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Journal of Chromatography A, 1102(1), 193-199, 1995.
- [11] Hornsey, I.S. and Hide, D., The Production of Antimicrobial Compounds by British Marine Algae. IV Variation of Antimicrobial Activity with Algal Generation, Br. Phycol. J., 20, 21 – 25, 1985.
- [12] Ehresmann D.W., Deig E.E., Hatch M.T., Di Salvo E.H., Vedros N.A., Antiviral substances from California marine algae. J. Phycol. 13: 37–40, 1997.



- [13] Vlachos, V., Critchley, A.T., Von Holy, A., Differential antibacterial activity of extracts from selected southern African macroalgal thalli. *Bot. Mar.*; 42: 165–173, 1999.
- [14] Özdemir, G., Horzum, Z., Sukatar, A., Karabay-Yavasoğlu, N.U., Antimicrobial activities of volatile components and various extracts of *Dictyopteris membranacea* and *Cystoseira barbata* from the Coast of Izmir, Turkey. *Pharmaceutical Biol.*, 44: 183–188, 2006.
- [15] Karabay-Yavasoğlu, N.U., Sukatar, A., Özdemir, G., Horzum, Z., Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. *Phytother. Res.*, 21: 153–156, 2007.
- [16] Blunt, J.W., Copp B.R., Hu W.P., Munro M.H.G., Northcote P.T. and Prinsep M.R., Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 24: 31-86, 2007.
- [17] Dufossé L., Galaup P., Yaron A., Arad S.M., Blanc P., Murthy K.N.C., Ravishankar G.A., Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 9: 389–406, 2005.
- [18] Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R., *Marine natural products*, 2005.

- [19] Mannisto S, Smith-Warner S.A., Spiegelman D, Albanes D, Anderson K, Van Den Brandt P.A., Cerhan J.R., Colditz G, Feskanich D, Freudenheim J.L., Giovannucci E, Gohldbohm R.A., Graham S, Miller A.B., Rohan T.E., Virtamo J., Willett W.C., Hunter D.J., Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13: 40–48, 2004.
- [20] Bhadury P. and Wright P.C., Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta*, 219(4): 561-578, 2004.
- [21] Chisti Y., Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3): 294-306, 2007.
- [22] Inbaraj B.S., Chien J.T., Ho G.H., Yang J. and Chen B.H., *Bio chem. Eng. J.*, (31) 204, 2006.
- [23] Ragan, M. A., Glombitzka, K. W., Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog. phycol. Res.* 4: 129–241, 1986.
- [24] Fairhead, V. A., Amsler, C. D., McClintock, J. B., & Baker, B. J., Lack of defense or phlorotannin induction by uv radiation or mesograzers in *desmarestia anceps* and *d. Menziesii* (phaeophyceae), *Journal of Phycology*, 42(6), 1174-1183, 2006.

- [25] Halliwell B, Gutteridge J.M., Free radicals in biology and medicine Oxford University Press, Oxford, UK., 1999.
- [26] Agarwal S, Rao A.V., Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Can Med Assoc J.*, 163: 739 -744, 2000.
- [27] Gökpinar Ş., Koray T., Akçiçek E., Göksan T., Durmaz Y., Algal Antioksidanlar. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences.* 23: 85-89, 2006.
- [28] Weinberger F., Pohnert G., Berndt M., Bouarab K., Kloareg B. and Potin P., Apoplastic oxidation of L-asparagine is involved in the control of the green algal endophyte *Acrochaete operculata* Correa & Nielsen by the red seaweed *Chondrus crispus* Stackhouse. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 56, No. 415, pp. 1317–1326, 2005.
- [29] Martin K R. and Barrett J C, Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Hum Exp Toxicol*, vol. 21, 2:pp.71-75, 2002.
- [30] Kazanç M.B., Antioksidan Vitaminler. *Sendrom*, Temmuz; 14-22, 1997.
- [31] Gardès-Albert M B-RD, Abedinzadeh Z et Jore D., Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? l'actualité chimique, 2003.

- [32] Hilmi Ş., Oksidanlar ve antioksidanlar. THT Drg, 48: 1-2,44-49, 1994.
- [33] Kopsell, D.A. and Kopsell, D.E., Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. Trends Plant Sci., 11; 499-507, 2006.
- [34] Bağdatlıoğlu N., Demirbaker B., Gıda İşlemede Karotenoidlerde Meydana Gelen Gelismeler. Gıda. 9: 48-51, 1999.
- [35] Woutersen, R.A., Wolterbeek, A.P.M., Appel, M.J., Van der Berg, H., Goldbohm, R.A. and Feron, V.J., Safety evaluation of synthetic  $\beta$ -carotene. Crit. Rev.Toxicol., 29: 515-542, 1999.
- [36] Olson, J.A. and Krinsky, N.I., Introduction: The colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. FASEB 9: 1547-1550, 1995.
- [37] Omoni, A.O. and Aluko, R.E., The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene a review. Trends Food Sci. Technol., 16: 344-350, 2005.
- [38] Melendez-Martinez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M., Heredia, F. J., "Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments", Food Chem, 101: 1145-1150, 2007.

- [39] Simpson, K.L., Chemical changes in natural food pigments. In: Chemical changes in food during processing. Richardson, T. and Finley, J.W. (eds), pp. 409-443, 1985.
- [40] Krinsky, N.I. and Johnson, E.J., Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.*, 26: 459-516, 2005.
- [41] Cohen, Judith G., "The spectra of main-sequence stars in Galactic globular clusters. II. CH and CN bands in M71." *The Astronomical Journal* 117: 5 24-34, 1999.
- [42] Schieber, A. and Carle, R., Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: technological, analytical, and nutritional implications. *Trend in Food Sci. Technol.*, 16: 416-422, 2005.
- [43] Tee, E. S., Carotenoids and Retinoids in Human Nutrition, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31 (1/2): 103-163, 1992.
- [44] Von Elbe J.H., Schwartz S.J., Colorants. In: *Food Chemistry* (ed. O. R. Fennema, Marcel Dekker), pp. 651-765, 1996.
- [45] Rodriguez-Amaya, D.B. 2001; A guide to carotenoid analysis in foods, <http://www.ilsa.org/publications>. Erişim tarihi: 2014.

- [46] Rise M, Cohen E, Vishkantsan M, Cojoean H, Gottlieb HE, Arad S., Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. J Plant Physiol 144: 287–292, 1994.
- [47] Stahl W., van den Berg H., Arthur J., Bast A., Dainty J., Faulks R.M., Gärtner C., Haenen G., Hollman P., Holst B., Kelly F.J., Polidori M.C., Rice-Evans C., Southon S., van Vliet T., Viña-Ribes J., Williamson G., Astley S.B., Bioavailability and metabolism. Mol Aspects Med., 23: 39–100, 2002.
- [48] Lin, C.H. and Chen, B.H., Stability of carotenoids in tomato juice during storage. Food Chem., 90: 837-846, 2005.
- [49] El-Agamey A., Lowe G.M., McGarvey D.J., Mortensen A., Philip D.M., Truscott T.G., and Young A.J., Carotenoid radical chemistry and antioxidant/prooxidant properties. Arch. Biochem. Biophys., 430: 37-48, 2004.
- [50] Rodriguez-Amaya D.B., Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods. Opportunities for Micronutrient Intervention (OMNI), Arlington, 1997.
- [51] Bart M.M., Zhou C., Kute K.M. and Rosenthal G.A., Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from

carrot (*Daucus carota* L.) tissue. Journal of agricultural and Food Chemistry. 43: 2876-2878, 1995.

[52] Cowan A.K., Logie M.R.R., Rose P.D., and Phillips L.G., Stress induction of zeaxanthin formation in the  $\beta$ -carotene-accumulating alga *Dunaliella salina* Teod. J. Plant Physiol., 146: 554-562, 1995.

[53] Törnwall M.E., Virtamo J, Korhonen P.A., Virtanen M.J., Taylor P.R., Albanes D & Huttunen J.K., Effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. Eur Heart J. 25: 1171–1178, 2004.

[54] Yuan, J.P., Gong, X.D. & Chen, F., Separation and analysis of carotenoids and chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by high-performance liquid chromatography photodiode array detection. J. Agric. Food Chem., 45(5): 1952-1956, 1997.

[55] Jyonouchi H, Sun S, Tomita Y, Gross M.D., Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. J Nutr., 125: 2483–2492, 1995.

[56] Shao, A. and Hathcock, J.N., Risk assessment for the carotenoids lutein and lycopene. Regul. Toxicol. Pharm. 45: 289-298, 2006.

- [57] Holden J.M., Eldridge A.L., Beecher G.R., Buzzard I.M., Bhagwat S., Davis C.S., Douglass L.W., Gebhardt S., Haytowitz D. and Schakel, S., Carotenoid content of U.S. foods: an update of the database. *J. Food Comp. Anal.*, 12: 169-196, 1999.
- [58] Landrum, J.T. and Bone, R.A., Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch. Biochem. Biophys*, 385: 28-40, 2001.
- [59] Garcia-Casal, M.N., Carotenoids increase iron absorption from cereal-based food in the human. *Nutr. Res.*, 26: 340-344, 2006.
- [60] Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M. and Rice-Evans, C.A., Antioxidant activities of carotenoids and xanthophylls. *FEBS Lett*, 384: 240-242, 1996.
- [61] Kobayashi, M., & Sakamoto, Y., Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology. Letters*, 21: 265-269, 1999.
- [62] Miyashita K., & Hosokawa M., Multi-functional carotenoid in seaweeds: fucoxanthin, 74(2): 261-262, 2008.
- [63] Yan X., Chuda Y., Suzuki M., Nagata T., Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Japan*



Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 63(3): 605-607, 1999.

- [64] Nakkarike S.M., Emiko S., Hayato M., Masashi H., Yoshimi N., Masahiro K., Kazuo M., Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21): 8516-8522, 2007.
- [65] Heo S., Ko S., Kang S., Kang H., Kim J., Kim S., Lee K., Cho M., Jeon Y., Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage. *Eur Food Res Technol*, 228: 145–151, 2008.
- [66] Heo, S.J. and Jeon, Y.J., Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology* 95: 101-107, 2009.
- [67] Britton G, Carotenoids. En: Dey PM, Harborne JB, editores. *Methods in plant Biochemistry*. London: Academic Press; p. 473-518, 1991.
- [68] Rao, A. V. and Rao, L. G., Crotenoids and human health. *Pharmacol Res.* 55,207-216, 2007.
- [69] Kapoor V.K., Dureja J., Chadha R., Herbals in the control of ageing. *Drug Discov Today* 14 (19–20): 992–98, 2009.

- [70] Su Q, Rowley K.G, Balazs N.D.H., Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *J Chromatogr B*. 781: 393–18, 2002.
- [71] Rock C.L. Carotenoids: Biology and treatment. *Pharmacol Ther.*, 75: 185–97, 1997.
- [72] Rao A.V. and Honglei S., Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutr. Res.*, 22: 1125-1131, 2002.
- [73] Zhu Y.I., Hsieh W.C., Parker R.S., Herraiz L.A., Haas J.D., Swanson E.J. and Roe D.A., Evidence of a role for fatfree body mass in modulation of plasma carotenoid concentrations in older men: studies with hydrodensitometry. *J Nutr*. 127: 321–26, 1997.
- [74] Kim L, Rao A.V., Rao L.G., Lycopene II-effect on osteoblasts: the Halliwell carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells. *J. Med. Food*, 6: 79–86, 2003.
- [75] Rao L.G., Krishnadev N., Banasikowska K., Rao A.V., Lycopene effects on osteoclasts: lycopene inhibits basal and parathyroid hormone-stimulated osteoclast formation and mineral resorption mediated by reactive oxygen species in rat bone marrow cultures. *J Med Food*. 6: 69–78, 2003.

- [76] Ma L., Lin X.M., Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. *J Sci Food Agric.* Jan 15; 90 (1): 2-12, 2010.
- [77] Burton, G. W., Ingold, K. U., Lipid Peroxidation and Lipid Antioxidants in Normal and Tumor Cells. *Toxicol Pathol*, 12: 235, 1984.
- [78] Cadenas E., Packer L., editors. *Handbook of Antioxidants*. 2nd. Marcel Dekker, Inc.; New York: 2002.
- [79] Britton G., Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9: 1551–1558, 1995.
- [80] A. ARDAĞ, Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 2008.
- [81] Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30, 1995.
- [82] Huang D., Ou B. and Prior R.L., The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1841-1856, 2005.
- [83] Akbaba, G., *Biyoteknolojide Mikroalgler*, *Bilim Teknik Dergisi*, 429: 28-35, 2003.

- [84] Timur, G., Plankton Bilgisi ve Plankton Kùltürü. Akdeniz Üniv. Yay. No: 40, Ankara, 1992.
- [85] Hata M. and Hata M., Studies on astaxanthin formation in some fresh-water fishes, Tohoku J. of Agricultural Research, 24 (4): 192-196, 1973.
- [86] Güner H., ve Aysel A., Tohumuz Bitkiler Sistematiđi. no:108 VI. Baskı, 1.cilt, 117-120.Ege Üniversitesi Fen Fakùltesi Kitaplar serisi, 2006.
- [87] Harris E.H., The genus Chlamydomonas. In The Chlamydomonas sourcebook: introduction to Chlamydomonas and its laboratory use. Elsevier, 2(1):1-18, 2009.
- [88] Sukatar A., Alg Kùltür Yöntemleri. Ege Üni. Fen Fak. Kitapları Serisi No:184, syf: 101-104, 2002.
- [89] Z. Demirel, Eğirdir gölünden izole edilen yeşil mikroalg (chlorophyta) *Scenedesmus protuberans* Fris.'in antimikrobiyal ve antioksidan özelliğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi. İzmir, 2006.
- [90] Porra R.J., Thompson W.A. and Kriedemann P.E., Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic

absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975: 384-394, 1986.

[91] Del Campo J. A., Rodríguez. J., Vargas M. Á., Rivas J., Guerrero M. G., Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl Microbiol Biotechnol*, 64: 848–854, 2004.

[92] Richmond A., *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd, 2004.

[93] Chen B.H., Yang S.H., Han L.H., Characterization of major carotenoids in water convolvulus (*Ipomoea aquatica*) by open-column, thin-layer and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 543; 147-155, 1991.

[94] Inbaraj B.S., Chien J.T. and Chen B.H., Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Chromatography A*, 1102: 193–199, 2006.

[95] Salvador N., Garreta A.G., Lavelli L. And Ribera M., Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina* 71(1): 101-113, 2007.

- [96] Eloff, J.N., A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts bacteria. *Planta Med.*, 64: 711-713, 1998.
- [97] Zhu J.K., Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247–273, 2002.
- [98] A. Can, Taramalı electron mikroskobu örnek hazırlama ve icelme yöntemleri. A.Ü. Biyoteknoloji enstitüsü Lisans Üstü-Doktora Eğitim Programı. Erişim tarihi:2015.
- [99] Babaoğlu M., Bitki Büyüme Düzenleyicileri Türkiye'deki Durum ve Sağlık Açısından Değerlendirmeler, Ders Notları, Selçuk Üni. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümü, Konya, 2002.
- [100] Wijesekara I., Yoon N. Y., and Kim S.K., Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. *Biofactors*, 36(6): 408-414, 2010.
- [101] Xue C., Hu Y., Saito H., Zhang Z., Li Z., Cai Y., Ou C., Lin H., Imbs A.B., Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 77: 9–13, 2002.
- [102] Brennan L. And Owende P., Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and

co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557–577, 2010.

[103] Wolk C.P. and Kraus J., Two approaches to obtain low extracellular deoxyribonuclease activity in cultures of heterocyst-forming cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 131: 302-307, 1982.

[104] Rivera S.M., Canela-Garayoa R., Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*, 1224: 1–10, 2012.

[105] Orosa M., Torres E., Fidalgo P., Abalde J., Production and analysis of secondary carotenoids in green algae, *Journal of Applied Phycology*, 12: 553-556, 2000.

[106] Cha K.H., Lee H.J., Koo S.Y., Song D.G., Lee D.U., And Pan C.H., Optimization of Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids and Chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 793–797, 2010.

[107] Lamers P.P., Janssen M., De Vos R.C.H., Bino R.J., Wijffels R.H., Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol.* 26: 631–638, 2008.

- [108] Mulders K.J.M., Lamers P.P., Martens D.E., Wijffels R.H., Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *J Phycol* 50: 229–242, 2014.
- [109] Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R., Microalgae for oil, strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102:100–112, 2009.
- [110] Wijesekara I., Yoon N.Y., and Kim S.K., Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. *Biofactors*, 36(6): 408-414, 2010.
- [111] Pradhan J., Das S. and Das B.K., Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 8 (32): 809-818, 2014.
- [112] Haliki A., Denizci A.A., Çetingül V., Bazı Deniz Alglerinin (Phaeophyta, Rhodophyta) Antifungal Aktiviteleri Üzerine Bir Araştırma. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 22: 13-15, 2005.
- [113] Andrews, J.M., Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, S1: 5-16, 2001.



- [114] Priya. S., Analysis of value-added biochemical compounds and antimicrobial activity of green algae *Chlorella vulgaris*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 4(5): 2577-2579, 2012.
- [115] Marti R., Uriz M.J. and Turon X., Seasonal and spatial variation of species toxicity in Mediterranean seaweed communities: correlation to biotic and abiotic factors. Mar. Ecol. Prog. Ser., 282: 73-85, 2004.
- [116] Saito S., Okamoto Y. and Kawabata J., Effect of alcoholic solvents on antiradical abilities of protocatechuic acid and its alkyl esters. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 68: 1221–1227, 2004.
- [117] Samaniego-Sánchez C., Troncoso-González A.M., García-Parrilla M.C., Quesada Granados J.J., López-García de la Serrana H., López-Martínez M.C., Anal Chim Acta 593:103–107, 2007.
- [118] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology 28: 25–30, 1995.
- [119] Choochote W., Suklampoo L. and Ochaikul D., Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. J Appl Phycol, 26: 43–48, 2014.
- [120] Lopez A., Rico M., Rivero A., Tangil M.S., The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. Food Chem, 125: 1104–1109, 2011.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yaşar ALUÇ

Doğum Tarihi : 17/04/1980

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu : (Kurum ve Yıl)

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen-edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü. 2001-2005

Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen-edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü. 2005-2008. "Üniversite Göllerinde (Kırıkkale) Besin Zinciri İlişkilerinin Su Kalitesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi"

Doktora: Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2009-2015. "Bazı Mikroalglerden Karetoneoid Ekstraksiyonu Ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi"

Yayınlar (Diğer) :

1. Özlem İnce, Yasar Aluc, Gökben Basaran, İlhami Tüzün. Kapulukaya Baraj Gölünde Litoral Ve Pelajik Bölgelere Ve Mevsime Bağlı Zooplankton Dağılımlarının Karşılaştırılması. Türk Sucul Yasam Dergisi, 2007 Yıl: 3-5 Sayı:5-8.

2. Özlem İNCE YILMAZ, Yaşar ALUÇ, Gökben BAŞARAN, İlhami TÜZÜN, 2011. Kapulukaya Baraj Gölü'nde Litoral Bölgelerdeki Makrofit İçi ve

Makrofit Dışı Zooplankton Populasyonlarının Karşılaştırılması. "Ekoloji 2011" Sempozyumu, 5-7 Mayıs, Düzce. (Sözlü Bildiri).

3. Yaşar ALUÇ, İlhami TÜZÜN 2010. Sığ Ve Ötrofik İki Gölette Dış Yüklerin Azaltılmasına Bağlı Olarak Su Kalitesi Üzerinde Ortaya Çıkan Değişimler. "Ekoloji 2010" Sempozyumu, Aksaray. (Sözlü Bildiri).

#### Ulusal Kuruluşlarca Desteklenen Projede Görev Alma

1. Kızılırmak (Kırıkkale) Bölgesine Uyum Sağlamış Farklı Alg Türlerinden Karotenoid Ekstraksiyonu ve Antioksidan Seviyelerinin Belirlenmesi. (2011/11 Kırıkkale Üniversitesi BAP Projesi).

2. Siyanobakter-Azolla simbiyontunun azot fiksasyonu ve biyolojik gübre üretiminde kullanma imkanlarının araştırılması. (2015/3 Kırıkkale Üniversitesi BAP Projesi).

3. Ayçiçeği tohumu rafinasyon yan ürününden lesitin eldesi. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı (1907.TGSD.2015).