



**Çeşitli Mikroalglerin Karotenoid İçeriklerinin
Kromatografik/Spektroskopik Yöntemlerle Araştırılması ve
Ekstrakte Edilecek Karotenoidlerin Antioksidan Aktivitelerinin
Akış Enjeksiyon Analiz Sistemiyle Belirlenmesi**

Proje No: 110T099

Prof. Dr. Ahmet E. EROĞLU
Prof. Dr. Meltem CONK DALAY
Dr. Ayşegül Erdoğan
Hayriye SOYKAN
Canberk İŞLER
Sevde HATİPOĞLU USLU

EYLÜL 2013
ANKARA

ÖNSÖZ

Projede, çeşitli mikroalglerdeki (*Prochlorococcus sp.*, *Scenedesmus protuberans* ve *Nitzschia sp.*) karotenoidlerin miktarının artırılması, ekstraksiyonu, derişimlerinin belirlenmesi ve ürünlerin karakterizasyonu hedeflenmiştir. Bazı mikroalglerin farklı stres koşullarında daha fazla karotenoid ürettikleri, bazı karotenoidlerin ise sadece stres koşullarında üretildiği bilindiğinden, mikroalgler farklı kültür koşullarında yetiştirilmiş ve bu koşulların ürün miktarına etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC), sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS) gibi kromatografik teknikler ve UV-görünür bölge spektrometri kullanılmıştır. Oksijen ve ışığa karşı oldukça duyarlı olan karotenoidlerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için HPLC ile bir akış-enjeksiyon analiz (FIA) sistemi tasarlanmış ve işler hale getirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
1.1. Mikroalgler ve Karotenoidlerin Önemi	1
1.2. Karotenoidlerin Genel Özellikleri.....	2
1.2.1. Fiziksel Özellikleri	4
1.2.2. Kimyasal Özellikleri	4
1.2.3. Spektroskopik Özellikleri.....	4
1.2.4. Adsorpsiyon Özellikleri.....	7
1.3. Karotenoid Analizinde Kullanılan Genel Yöntemler	8
1.3.1. Numune Hazırlama.....	8
1.3.2. Ekstraksiyon	8
1.3.3. Sabunlaştırma	9
1.3.4. Farklı Çözgede Toplama	9
1.3.5. Kromatografik Ayırım.....	9
1.3.6. Yapı Tayini ve Miktarın Belirlenmesi.....	11
1.4. Karotenoid Analizinde Hata Kaynakları	11
1.4.1. Karotenoid Analizi Sırasında Yapılan Yaygın Hatalar	12
1.4.2. Karotenoid Analizinde Alınması Gereken Önlemler	12
1.5. Antioksidan Aktivite Tayini	12
1.5.1. DPPH Yöntemi	13
BÖLÜM 2 GEREÇ ve YÖNTEM.....	15
2.1. Kimyasallar	15
2.2. Cihazlar	15
2.3. Kullanılan Mikroalg Türleri ve Yetiştirilmesi.....	16
2.4. Mikroalglerin Hazırlanması	17
2.5. Standart Karotenoid Çözeltilerinin Hazırlanması.....	17
2.5.1. LOD ve LOQ Değerlerinin Hesaplanması	18
2.5.2. Kalibrasyon Grafiklerinin Oluşturulması	18
2.6. Mikroalglerden Karotenoid Ekstraksiyonu	18
2.7. Ekstraktların Sabunlaştırılması	19

2.8. Mikroalglerde bulunan Karotenoidlerin Ayrılması İçin Yöntem Geliştirme	22
2.9. Luteinin Önemi	23
2.9.2. Farklı Azot Kaynaklarının Lutein Miktarına Etkisi	24
2.9.3. Farklı Işık Kaynaklarının Lutein Miktarına Etkisi	24
2.9.4. Farklı Oksidatif Stres Kaynaklarının Lutein Miktarına Etkisi	25
2.10. Fukoksantin Önemi	25
2.10.1. Ekstraksiyon Koşullarının Fukoksantin Miktarına Etkisi	26
2.10.2. Farklı Azot Kaynaklarının Fukoksantin Miktarına Etkisi.....	26
2.10.3. Farklı Oksidatif Stres Kaynaklarının Fukoksantin Miktarına Etkisi.....	26
2.10.4. Farklı Işık Kaynaklarının Fukoksantin Miktarına Etkisi	26
2.11. DPPH çözeltisinin hazırlanması.....	27
BÖLÜM 3 BULGULAR ve TARTIŞMA	28
3.1. Mikroalglerin Morfolojik Yapıları ve Büyüme Hızları	28
3.2. Yeşil Mikroalglerde Bulunan Karotenoidlerin HPLC-DAD ile Analizi	31
3.3. Kahverengi Mikroalgde Bulunan Karotenoidlerin HPLC-DAD ile Analizi	33
3.4. Mikroalglerde Bulunan Karotenoidlerin LC/MS (APCI) ile Analizi.....	38
3.5. Yeşil Mikroalglerden Lutein Ekstraksiyonu İçin Uygun Koşulların Belirlenmesi	46
3.5.1. Çözgen Bileşiminin Lutein Ekstraksiyonuna Olan Etkisi.....	47
3.5.2. Sabunlaştırma Süresinin Lutein Ekstraksiyonuna Etkisi.....	48
3.5.3. Ekstraksiyon Süresinin Lutein Eldesine Etkisi.....	51
3.5.4. Sıcaklığın Lutein Ekstraksiyonuna Etkisi.....	51
3.5.5. Ekstraksiyon Sayısının Lutein Eldesine Etkisi.....	52
3.6. Metot Validasyonu.....	56
3.7. Farklı Azot Kaynaklarının Yeşil Mikroalglerde Bulunan Lutein Miktarına Etkisi	56
3.8. Farklı Işık Kaynaklarının Yeşil Mikroalglerde Bulunan Lutein Miktarına Etkisi	58
3.9. Oksidatif Stres Koşullarının Yeşil Mikroalglerde Bulunan Lutein Miktarına Etkisi	60

3.10. Kahverengi Mikroalgden Fukoksantin Ekstraksiyonu İçin Uygun Koşulların Belirlenmesi	62
3.10.1. Çözgen Bileşiminin Fukoksantin Ekstraksiyonuna Etkisi	63
3.10.2. Ekstraksiyon Süresinin Fukoksantin Eldesine Etkisi	64
3.10.3. Ekstraksiyon Sayısının Fukoksantin Eldesine Etkisi	65
3.10.4. Sıcaklığın Fukoksantin Ekstraksiyonuna Etkisi	66
3.11. Farklı Azot Kaynaklarının Kahverengi Mikroalgdeki Fukoksantin Miktarına Etkisi	67
3.12. Farklı Azot Kaynaklarının Kahverengi Mikroalgdeki Fukoksantin Miktarına Etkisi	67
3.13. Farklı Işık Kaynaklarının Kahverengi Mikroalgdeki Fukoksantin Miktarına Etkisi	68
3.14. Karotenoidlerin Antioksidan Aktivitelerinin DPPH Yöntemiyle Belirlenmesi	69
BÖLÜM 4 SONUÇLAR	74
EK A Çalışmada Kullanılan Diğer Mikroalg Türleri	76
REFERANSLAR	79

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Karotenoidlerin sınıflandırılması	3
Tablo 2.1. BBM ortamının içeriği	16
Tablo 2.2. F/2 ortamının içeriği	17
Tablo 2.3. Yeşil mikroalglerde bulunan karotenoidlerin HPLC-DAD.....	23
Tablo 3.1. <i>Prochlorococcus sp.</i> 'deki karotenoidlerin deneme niteliğinde tanımlanması	37
Tablo 3.2. <i>Scenedesmus protuberans</i> 'daki karotenoidlerin deneme niteliğinde tanımlanması	37
Tablo 3.3. <i>Nitzschia sp.</i> 'deki karotenoidlerin deneme niteliğinde tanımlanması	37
Tablo 3.4. <i>Prochlorococcus sp.</i> ekstraktına ait LC-MS-APCI (pozitif mod) değerleri	39
Tablo 3.5. <i>Scenedesmus protuberans</i> ekstraktına ait LC-MS-APCI (pozitif mod) değerleri ..	39
Tablo 3.6. <i>Nitzschia sp.</i> ekstraktına ait LC-MS-APCI (pozitif mod) değerleri	39
Tablo 3.7. <i>Prochlorococcus sp.</i> 'de bulunan karotenoidleri ayırmak için önerilen LC yönteminin sistem uygunluğu testleri ve validasyon parametreleri	44
Tablo 3.8. <i>Scenedesmus protuberans</i> 'ta bulunan karotenoidleri ayırmak için önerilen LC yönteminin sistem uygunluğu testleri ve validasyon parametreleri	44
Tablo 3.9. <i>Nitzschia sp.</i> 'de bulunan karotenoidleri ayırmak için önerilen LC yönteminin sistem uygunluğu testleri ve validasyon parametreleri	45
Tablo 3.10. Mikroalglerdeki karotenoid tayini için sertifikalı referans madde (BCR 485, CRM-Mixed Vegetables) kullanılarak yapılan metot validasyon sonuçları	56
Tablo 3.11. Farklı azot kaynakları ile yetiştirilen <i>Prochlorococcus sp.</i> 'nin büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı	57
Tablo 3.12. Farklı azot kaynakları ile yetiştirilen <i>Scenedesmus protuberans</i> 'ın büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı	57
Tablo 3.13. Mikroalglerde bulunan başlıca pigmentlerin fotonik özellikleri	59
Tablo 3.14. Farklı dalgaboyunda ışık kaynakları ile yetiştirilen <i>Prochlorococcus sp.</i> 'nin büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı	60
Tablo 3.15. Farklı dalgaboyunda ışık kaynakları ile yetiştirilen <i>Scenedesmus protuberans</i> 'ın büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı	60
Tablo 3.16. Oksidatif stres koşullarında yetiştirilen <i>Prochlorococcus sp.</i> 'nin büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı	61
Tablo 3.17. Oksidatif stres koşullarında yetiştirilen <i>Scenedesmus protuberans</i> 'ın büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı	61

Tablo 3.18. Farklı azot kaynakları ile yetiştirilen <i>Nitzschia sp.</i> 'nin büyüme hızı ve içerdiği fukoksantin miktarı	67
Tablo 3.19. Oksidatif stres koşullarında yetiştirilen <i>Nitzschia sp.</i> 'nin büyüme hızı ve içerdiği fukoksantin miktarı	68
Tablo 3.20. Farklı dalgaboyunda ışık kaynakları ile yetiştirilen <i>Nitzschia sp.</i> 'nin büyüme hızı ve içerdiği fukoksantin miktarı	68
Tablo 3.21. DPPH ve luteine ait reaksiyonun zamana bağlı absorbands değişimi	69

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Oksidatif stres, antioksidanlar ve kronik hastalıklar	2
Şekil 1.2. Karotenoidlerin yapısı ve numaralandırma sistemi	2
Şekil 1.3. En bilinen karotenoidlerin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 1.4. Karotenoidlerin UV-Görünür bölgedeki genel absorpsiyon spektrumu	5
Şekil 1.5. Farklı karotenoidlerin spektral yapıya etkileri	6
Şekil 1.6. Farklı kromofor ve fonksiyonel grupların, karotenoidlerin UV-Görünür bölgedeki absorpsiyon spektrumlarına olan etkileri. (A) Kromofor grubunun uzunluğu (B) Halkalı yapının etkisi, (C) Hidroksil grubunun varlığı (D) Epoksi yapının bulunması .	6
Şekil 1.7. Farklı karotenoidlerin petrol eterinde alınmış absorpsiyon spektrumları:	7
Şekil 1.8. DPPH yöntemiyle antioksidan aktivitenin belirlenmesi.....	14
Şekil 2.1. Bazık ortamda fukoksantinole dönüşümü	19
Şekil 2.2. Yeşil mikroalglerde (<i>Prochlorococcus sp.</i> ve <i>Scenedesmus protuberans</i>) bulunan karotenoidlerin ekstraksiyonu, sabunlaştırma işlemi ve analizi	21
Şekil 2.3. Kahverengi mikroalgde (<i>Nitzschia sp.</i>) bulunan karotenoidlerin ekstraksiyonu ve analizi	22
Şekil 3.1. Yeşil mikroalgelere ait büyüme eğrileri	29
Şekil 3.2. Kahverengi mikroalge ait büyüme eğrisi.....	29
Şekil 3.3 (a) <i>Scenedesmus protuberans</i> (x6500), (b) <i>Prochlorococcus sp.</i> (x50000) ve (c) <i>Nitzschia sp.</i> (x10000) için alınan SEM görüntüleri	30
Şekil 3.4. (a) <i>Scenedesmus protuberans</i> (x40), (b) <i>Prochlorococcus sp.</i> (x40) ve <i>Nitzschia sp.</i> (x40) için alınan optik mikroskop görüntüleri	30
Şekil 3.5. <i>Prochlorococcus sp.</i> 'nin HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı	32
Şekil 3.6. <i>Scenedesmus protuberans</i> 'in HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı	32
Şekil 3.7. <i>Nitzschia sp.</i> 'nin HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı	33
Şekil 3.8. <i>Prochlorococcus sp.</i> 'den ekstrakte edilen karotenoidlere ve mevcut standartlarına ait absorbans spektrumları	34
Şekil 3.9. <i>Scenedesmus protuberans</i> 'den ekstrakte edilen karotenoidlere ve mevcut standartlarına ait absorbans spektrumları	35
Şekil 3.10. <i>Nitzschia sp.</i> 'den ekstrakte edilen karotenoidlere ve mevcut standartlarına ait absorbans spektrumları	36
Şekil 3.11. <i>Prochlorococcus sp.</i> ekstraktından elde edilen kütle spektrumu	41
Şekil 3.12. <i>Scenedesmus protuberans</i> ekstraktından elde edilen kütle spektrumu	42
Şekil 3.13. <i>Nitzschia sp.</i> ekstraktından elde edilen kütle spektrumu	43

Şekil 3.14. Lutein ve trans-β-apo-8'-karotenale (iç standart) ait absorbands spektrumu	46
Şekil 3.15. Lutein ve trans-beta-apo-8'-karotenale (iç standart) ait HPLC kromatogramı	47
Şekil 3.16. İkili çözgen bileşiminin lutein ekstraksiyonuna etkisi (a) <i>Prochlorococcus sp.</i> (b) <i>Scenedesmus protuberans</i>	49
Şekil 3.17. Sabunlaştırma süresinin lutein ekstraksiyonuna etkisi (a) <i>Prochlorococcus sp.</i> (b) <i>Scenedesmus protuberans</i>	50
Şekil 3.18. Ekstraksiyon süresinin lutein eldesine etkisi (a) <i>Prochlorococcus sp.</i> (b) <i>Scenedesmus protuberans</i>	53
Şekil 3.19. Sıcaklığın lutein ekstraksiyonuna etkisi (a) <i>Prochlorococcus sp.</i> (b) <i>Scenedesmus protuberans</i>	54
Şekil 3.20. Ekstraksiyon sayısının lutein eldesine etkisi (a) <i>Prochlorococcus sp.</i> (b) <i>Scenedesmus protuberans</i>	55
Şekil 3.21. Elektromanyetik spektrum ve görünür bölgedeki ışığın özellikleri	58
Şekil 3.22. Fukoksantin ve astaksantine (iç standart) ait absorbands spektrumları	62
Şekil 3.23. Fukoksantin ve astaksantine (iç standart) ait HPLC kromatogramı	62
Şekil 3.24. İkili çözgen bileşiminin <i>Nitzschia sp.</i> 'den fukoksantin ekstraksiyonuna etkisi	63
Şekil 3.25. Ekstraksiyon süresinin <i>Nitzschia sp.</i> 'den fukoksantin eldesine etkisi	64
Şekil 3.26. Ekstraksiyon sayısının <i>Nitzschia sp.</i> 'den fukoksantin elde edilmesindeki etkisi	65
Şekil 3.27. Sıcaklığın <i>Nitzschia sp.</i> 'den ekstrakte edilen fukoksantin miktarına olan etkisi ...	66
Şekil 3.28. DPPH'nin lutein ile reaksiyonu öncesi ve sonrasında çözeltinin rengi	70
Şekil 3.29. Karotenoidlerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde	70
Şekil 3.30. (A ₁) <i>Prochlorococcus sp.</i> 'nin 450 nm'de HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı (A ₂) <i>Prochlorococcus sp.</i> 'nin DPPH yöntemiyle 515 nm'de HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı	71
Şekil 3.31. (A ₁) <i>Scenedesmus protuberans</i> 'in 450 nm'de HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı	72
Şekil 3.32. (A ₁) <i>Nitzschia sp.</i> 'nin 450 nm'de HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı	73

ÖZET

Mikroskobik canlılardan mikroalgler önemli enerji kaynaklarıdır. Pigment ve antioksidan kaynağı olan karotenoidler mikroalgler tarafından üretilen ürünlerdendir; sağlık amaçlı ve doğal renklendirici olarak kullanılırlar. Çeşitli karotenoidlerin üretilmesi için yeni tür organizmaların bulunması özel bir önem kazanmıştır. Karotenoidlerin analitik olarak kullanılması izolasyonuna yönelik yöntemlerin geliştirilmesini de gerekli kılar.

Bu çalışmada, karotenoidlerin mikroalgler tarafından biyolojik yollarla üretimi, ürünlerin karakterizasyonu ve derişimlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, mikroalglerden (*Prochlorococcus sp.*, *Scenedesmus protuberans* and *Nitzschia sp.*) karotenoidlerin biyosentezi ile elde edilen karotenoidlerin içerik ve seviyeleri belirlenmiştir. Bazı mikroalglerin farklı stres koşullarında daha fazla karotenoid ürettikleri bilinmektedir. Bazı karotenoidler ise sadece stres koşullarında üretilmektedir. Dolayısıyla, seçilen mikroalglerden yüksek miktarlarda veya yeni karotenoidlerin üretilmesi için kültür koşulları optimize edilmiştir.

Liyofilize edilen mikroalgler çeşitli organik çözügenlerle ekstrakte edilmiş ve karotenoid içerikleri, yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC), sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS) gibi diğer kromatografik teknikler ve UV-görünür bölge spektrometri ile belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan yeşil mikroalglerde (*Prochlorococcus sp.*'de 2.54 mg/g ve *Scenedesmus protuberans*'da 2.45 mg/g) yüksek miktarda lutein, kahverengi mikroalgde (*Nitzschia sp.*) ise yüksek miktarda fukoksantin (6.58 mg/g) bulunmuştur. Çoğu mikroalg türü stres koşullarında biyosentez mekanizmalarını değiştirmektedir. Bu nedenle, farklı azot kaynakları, oksidatif stres koşulları ve farklı ışık kaynaklarının yeşil mikroalglerde bulunan lutein, kahverengi algde ise fukoksantin miktarına olan etkisi araştırılmıştır.

Karotenoidler, antioksidan özellikleri sayesinde çeşitli sağlık sorunlarında koruyucu/tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, mikroalglerden elde edilecek ekstrakt içindeki karotenoidlerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinin önemi açıktır. Önerilen projenin bir bölümünü söz konusu deneyler oluşturulmuştur. Özellikle oksijen ve ışığa karşı oldukça hassas ve bu nedenle kararsız olan karotenoidlerin antioksidan aktivite tayinlerinin özenle ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, HPLC ile bir akış-enjeksiyon analiz (FIA) sistemi tasarlanmış ve işler hale getirilmiştir.

ABSTRACT

Microalgae are the most important energy sources among microorganisms. Carotenoids, as important pigments and antioxidants, are produced by microalgae and are used both for health purposes and as natural colorants. There has been considerable research for the development, identification and determination of new strains of organisms to produce a variety of carotenoids. New methods for the isolation of carotenoids should be developed also for analytical purposes.

This study aimed the biosynthesis of carotenoids from microalgae (*Prochlorococcus* sp., *Scenedesmus protuberans* and *Nitzschia* sp.), their identification and quantification. It is known that some types of microalgae can produce high amount of carotenoids under different stress conditions while some others can produce carotenoids only under stress. For this purpose, cultivation conditions were optimized for the production of new or high value of carotenoids in the selected microalgal strains.

Freeze-dried microalgae were extracted using various organic solvents and their carotenoid contents were investigated by high performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic techniques such as liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in addition to UV-VIS spectrometry.

In green microalgae, lutein (2.54 mg/g for *Prochlorococcus* sp. and 2.45 mg/g for *Scenedesmus protuberans*) is the most abundant carotenoid. On the other hand, in brown microalgae, fucoxanthin (6.58 mg/g for *Nitzschia* sp.) is the highly accumulated carotenoid. Under stress conditions, many microalgae alter their biosynthetic pathways for the formation and accumulation of carotenoids. Therefore, the effect of different nitrogen sources, oxidative stress conditions and different light sources on lutein content in green microalgae and on fucoxanthin content in brown microalgae were investigated.

Due to their antioxidant properties, carotenoids are used for protection and/or treatment purposes for solving some health problems. It is, therefore, very important to investigate the antioxidant properties of carotenoids in organic extract obtained from microalgae. A part of proposed research covered these experiments. Determination of antioxidant activities of carotenoids, which are air and light sensitive, has to be performed rapidly and carefully to obtain reliable results. Therefore, a flow injection analysis (FIA) system was designed to work with HPLC analysis.



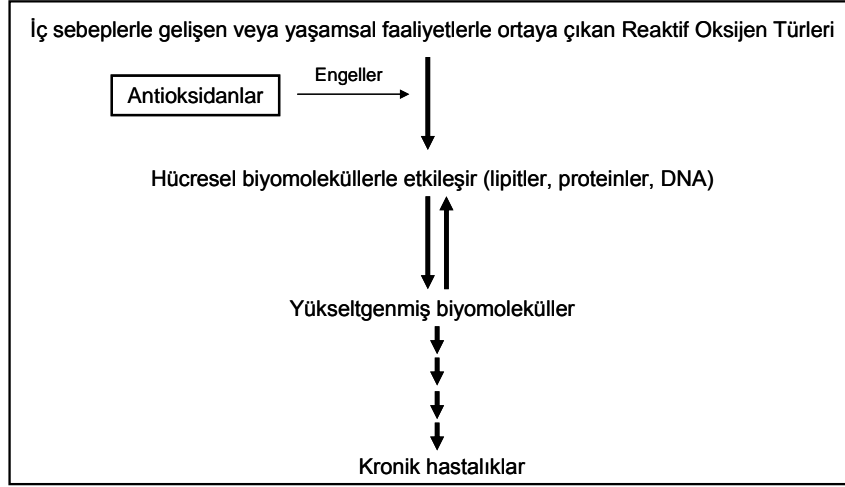
BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. Mikroalgler ve Karotenoidlerin Önemi

Biyoteknolojik araştırmaların gelişimi ile birlikte modern biyoteknolojinin uygulama alanları da genişlemektedir. Başta tıp ve tarım alanlarında olmak üzere insanlığın faydasına sunulan ürünlerin büyük bir kısmı biyoteknolojik yöntemlerle ortaya çıkmaktadır. Günümüzde biyoteknolojik çalışmalarda küf ve mantarların yanı sıra algler de kullanılır. Alglerin bu konuda tercih edilme nedenleri, günlük ağırlıklarını hızlı bir şekilde artırabilmeleri, biyoteknolojik işlemlerden kolayca geçirilebilmeleri, üretim maliyetlerinin düşük olması, çok sayıda yararlı madde içermeleri ve çevresel etkilere kısa sürede direnç göstermeleri olarak özetlenebilir. Alglerin birçoğu gıda sektöründe de önemli bir yere sahiptir. Günümüzde *Spirulina*, *Chlorella* ve *Dunaliella* gibi mikroalgler besleyici değerleri yüksek olduğundan yiyecek maddesi olarak da kullanılmaktadır. Mikroalglerden elde edilen metabolitler mikroalgal biyoteknolojinin en önemli çalışma alanıdır. İçerdikleri pigment maddeleri, antibiyotikler, vitaminler nedeniyle tarım, tıp, eczacılık alanlarında ve kozmetik sektöründe geniş yer bulur.

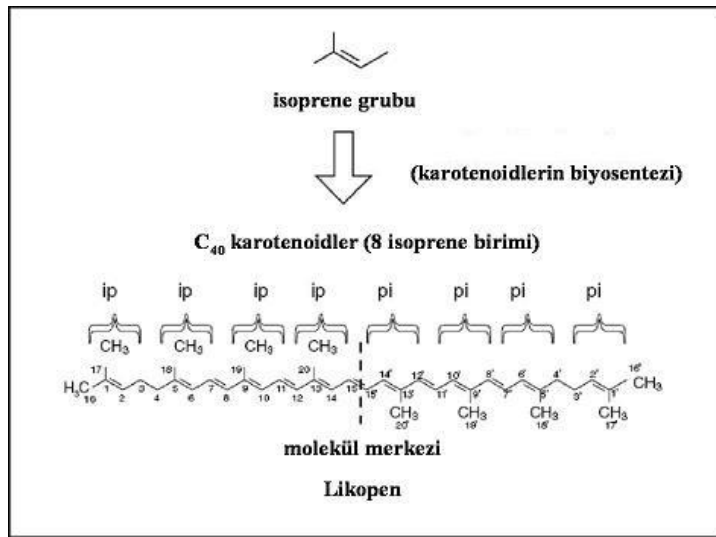
Pigmentler son yıllarda önem kazanan metabolitlerdendir. Mikroalgler pigmentlerin üretiminde potansiyel organizmalar olarak görülmektedir (Wijffels 2007, Del Campo vd. 2007). Metabolizmanın işleyişi sırasında oksidasyon sonucu organizmada çeşitli hasarlar yaratan kanser, kalp rahatsızlıkları ve bazı kronik hastalıklara sebep olan serbest radikallerin oluşumu, bu radikallerle mücadele eden antioksidan bileşiklere olan ilgiyi artırmıştır; antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu engeller (Şekil 1.1) (Rao A.V. ve Rao L.G. 2007). Alglerin fotosentetik pigmentleri arasında yer alan karotenoidler de kuvvetli antioksidan etkiye sahiptir. Karotenoidler sadece fitoplankton algler, bitkiler ve sınırlı sayıdaki mantar ve bakteriler tarafından üretilebilen yağ pigmentlerinin bir sınıfıdır. Yüksek sıcaklık, kuraklık, tuzluluk ve kimyasal toksisite gibi stres koşulları bu canlılardaki karotenoid birikimini etkilemekte, stres koşullarında genellikle daha yüksek miktarlarda üretilmelerine neden olmaktadır (Wijffels 2007).



Şekil 1.1 Oksidatif stres, antioksidanlar ve kronik hastalıklar
(Rao A.V. ve Rao L.G. 2007)

1.2. Karotenoidlerin Genel Özellikleri

Karotenoidler yağda çözünen pigmentlerdir; çeşitli sebze, meyve, içecek, çiçek, mantar, alg ve hatta kuşlara rengini verirler. Açık sarıdan parlak turuncu ve kırmızıya kadar değişen renkleri kimyasal yapılarına bağlıdır (Osganian vd. 2003). Genel anlamda yiyeceklerde yer alan karotenoidler tetraterpenoidlerin (C_{40}) bir kategorisidir; Şekil 1.2'de gösterildiği gibi sekiz isoprenoid biriminden oluşmaktadır (Delgado-Vargas vd. 2000). Molekülün ortasından itibaren bu yapı tersine dönmüş ve böylece molekül simetrik bir yapı kazanmıştır.

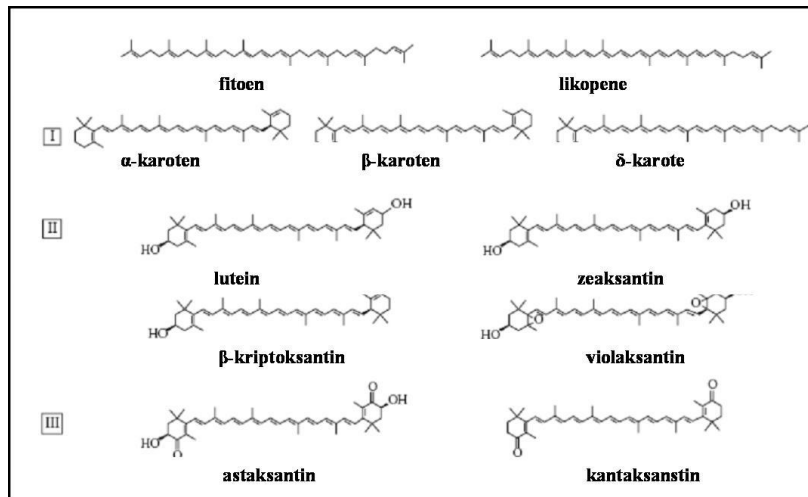


Şekil 1.2 Karotenoidlerin yapısı ve numaralandırma sistemi
(Delgado-Vargas vd. 2000)

Karotenoidlerin genel anlamda sınıflandırılması Tablo 1.1'de gösterilmiştir (Delgado-Vargas vd. 2000). Yiyeceklere rengini veren en iyi bilinen doğal pigmentler karotenoidlerdir (Francis 1999). Yaygın olarak bulunan karotenoidlerin yapısı Şekil 1.3'de gösterilmiştir (Ötles ve Çagindi 2008, Francis 1985, Stahl ve Sies 1996). Yapısal olarak polien zincirlerden oluşan maddeler bazen halkalar ile sonlanabilir. Lutein ve zeaksantin gibi oksijen atomu bulunduranlar ksantofil, alfa-karoten, beta-karoten ve likopen gibi oksijensiz karotenoidler ise karoten olarak adlandırılır.

Tablo 1.1 Karotenoidlerin sınıflandırılması (Delgado-Vargas vd. 2000)

Sınıflandırma kriteri	Alt gruplar ve özellikleri	Örnekler
Element yapısına göre	Karotenler: Karbon ve hidrojen oluşur.	α -karoten, β -karoten, β -kriptoksantin
	Ksantofiller: Karbon, hidrojen ve oksijenden oluşur.	Lutein, zeaksantin, violaksantin, neoksantin, fukoksantin
İşlevselliğine göre	Birincil: Fotosentetik süreç için gerekli olanlar	β -karoten, β -kriptoksantin, lutein, zeaksantin, violaksantin, neoksantin, fukoksantin
	İkincil: Bitkilerin yaşamını sürdürmesi için doğrudan gerekli olmayanlar	Meyve ve çiçeklerde bulunan karotenoidler: α -karoten, kapsantin, likopen, biksin,



Şekil 1.3 En bilinen karotenoidlerin kimyasal yapısı (I. Başlıca karotenler, II. Ksantofiller, III. Hayvansal karotenoidler (Ötles ve Çagindi 2008)

1.2.1. Fiziksel Özellikleri

Karotenoidlerin önemli fiziksel özellikleri arasında genelde pek çok çözümlenmede çözünürlüklerinin az olması ve kararsız olmaları yer alır (Klaui 1981). Karotenoidler ışık ve oksijen varlığında kararsız moleküllerdir (Frickel 1984, Dawson ve Hobbs 1994, Isler ve Gutmann 1971). Diğer taraftan bu moleküller serbest radikaller ile çok hızlı reaksiyona girer ve etkisiz hale gelmelerinde önemli bir rol oynar. Ayrıca lipid peroksidasyonunu da yavaşlatır. Dolayısıyla antioksidan özellik sergilerler.

Kimyasal yapıları nedeniyle suda çözünmezler, ancak yağda iyi çözünürler. Genelde lipofilik moleküllerdir. Aseton, alkol, eter, diklorometan, kloroform ve etil asetat gibi organik çözümlenmede kolaylıkla çözümlenirler (Nguyen and Schwartz 1998).

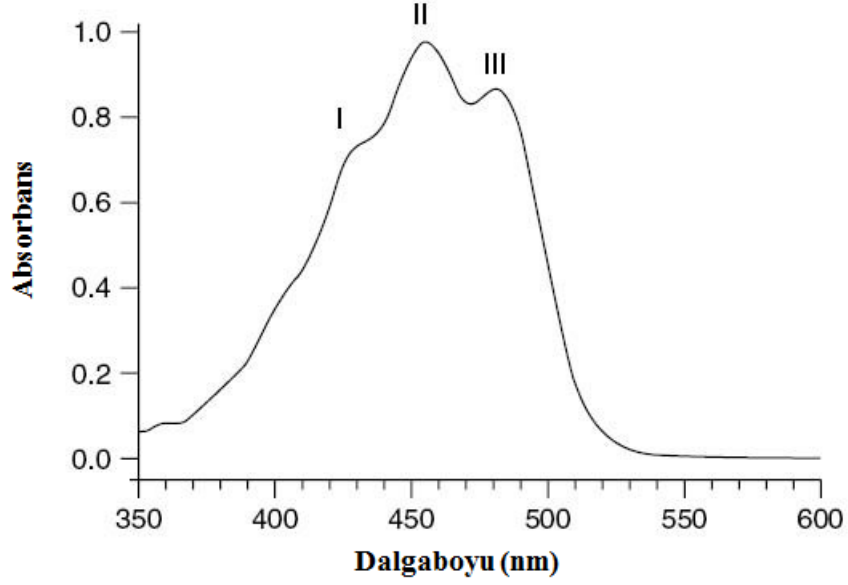
Karotenoidlerle çalışırken, deneyler sırasında çok sayıda önlem alınması gerekir. Işıksız ortamda çalışmak, çözümlenmede uçurulması sırasında azot gazı kullanmak, örnekleri azot gazı geçirip karanlıkta ve -20°C 'de saklamak ve son olarak korunmaları için askorbik asit, BHT ve pyrogallol gibi bazı sentetik antioksidan maddeler eklemek bunlardan en önemlileridir.

1.2.2. Kimyasal Özellikleri

Karotenoidlerin gösterdiği özelliklerin bu kadar önemli olmasının nedeni kimyasal yapılarından ileri gelir. Trans yapıda olan tüm karotenoidler konjuge çift bağlı, düz ve sabit moleküllerdir. Ancak cis yapıları düz (lineer) değildir. Dolayısıyla, hücrenin altyapısında bulunan kısımlara yerleşme şekilleri de değişir (Britton 1995b). Çeşitli nedenlerle izomerleşmeleri sonucunda yapıları katlanarak değişir ve trans yapıya göre farklılık gösterir. Uzun konjuge zincirleri karotenoidleri kararsız olmaya, izomerleşmeye ve oksitlenmeye uygun hale getirir. Sıcaklık, ışık ve asidik ortam nedeniyle kolaylıkla izomerleşebilirler (Falconer 1964).

1.2.3. Spektroskopik Özellikleri

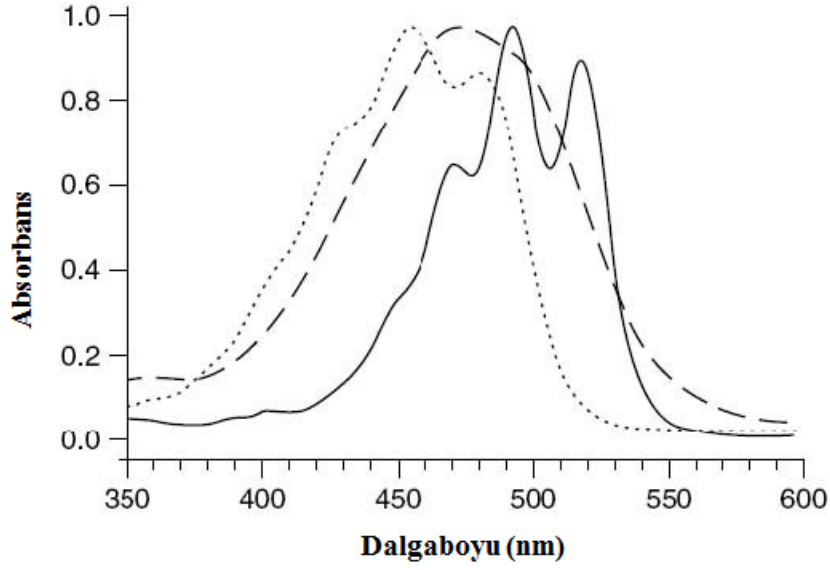
Karotenoidler uzun ve konjuge çift bağlı zincirleri nedeniyle UV-Görünür bölgede karakteristik absorpsiyon bantları verir. Maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyu, bahsedilen uzun zincirde bulunan çift bağlarla ilgilidir (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4 Karotenoidlerin UV-Görünür bölgedeki genel absorpsiyon spektrumu (Hurst 2008)

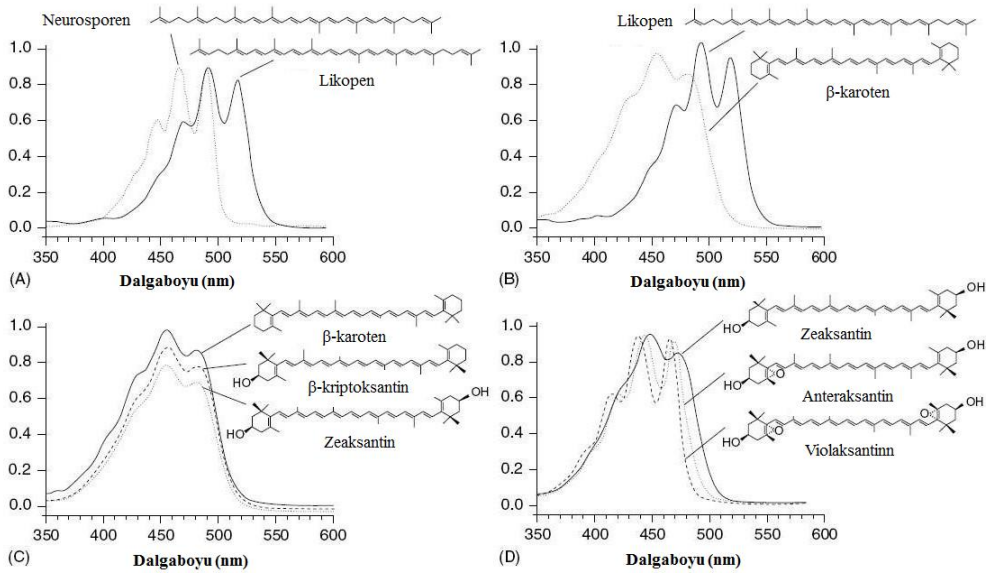
En yüksek absorbands verdiği dalgaboyları genelde Roma rakamları ile (I, II ve III) belirtilir. Konjuge çift bağı zincire yeni bir çift bağ eklendiğinde oluşan kromofor grubu nedeniyle dalgaboyu (λ_{max}), 20–22 nm kadar daha yüksek bir dalgaboyuna kayar (bathochromic shift). Ancak bu yine de yapıda bulunan diğer fonksiyonel grupların varlığına da bağlıdır. Şekil 1.5'te karotenoidlerdeki kromofor grubunun absorpsiyona etkisi görülmektedir.

Karotenoidlerin absorpsiyon spektrumu ve en yüksek absorbands verdiği dalgaboyu, molekülün çözündüğü çözügene ve çözügen içinde yer alan diğer maddelere de bağlıdır. Genelde, polaritesi düşük olan çözügenler en yüksek absorbands verdiği dalgaboyunu etkilemez. Örneğin, λ_{max} , hekzan, dietileter, metanol ve etanol gibi çözügenlerin varlığında değişmezken durum polar çözügenlerde farklıdır. Bazen en yüksek absorbands verdiği dalgaboyu 30-40 nm kadar daha yüksek dalgaboyuna (bathochromic shift) kayabilir.



Şekil 1.5 Farklı karotenoidlerin spektral yapıya etkileri
Likopen (—), β -karoten (.....) ve kapsantin (---) (Hurst 2008)

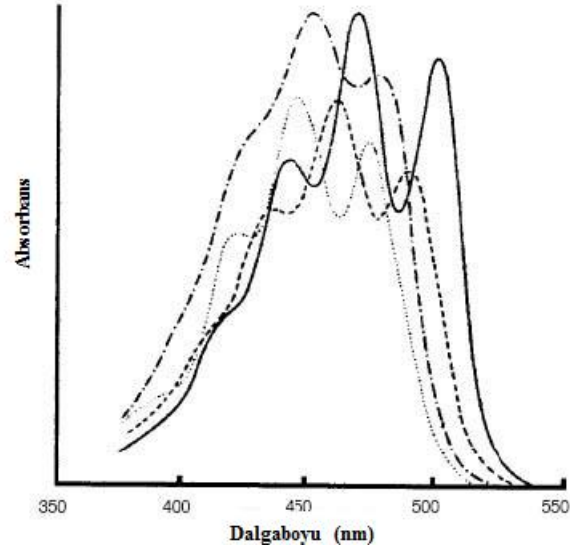
Karotenoidlerin absorpsiyon spektrumları karşılaştırılırken yalnızca en yüksek absorpsiyon verdiği dalgaboyuna bakılmaz. Bunun dışında karotenoid yapısı da absorpsiyon profili üzerinde etkilidir. Şekil 1.6 çeşitli karotenoid yapılarının UV-Görünür bölge absorpsiyon spektrumlarına olan etkilerini göstermektedir. Bu bilgi karotenoidlerin yapı tayininde kullanılan başlıca özelliklerdir (Britton 1995b).



Şekil 1.6 Farklı kromofor ve fonksiyonel grupların, karotenoidlerin UV-Görünür bölgedeki absorpsiyon spektrumlarına olan etkileri. (A) Kromofor grubunun uzunluğu (B) Halkalı yapının etkisi, (C) Hidroksil grubunun varlığı (D) Epoksi yapının bulunması (Hurst 2008).

Karotenoidlerin büyük bir bölümü üç farklı dalgaboyunda absorpsiyon verir. Konjuge çift bağların sayısı arttıkça bu dalgaboylarının değerleri de artar. Herhangi bir karotenoidin renk vermesi için en az 7 konjuge çift bağ bulundurması gerekir. Bu nedenle, halkalı yapı bulundurmeyen ve 11 konjuge çift bağı bulunan likopen kırmızıdır ve yüksek dalgaboylarında (λ_{max} : 444, 470 ve 502 nm) absorpsiyon verir (Şekil 1.7).

Daha önce belirtildiği gibi, karotenoidlerin absorpsiyonu çözgen çeşidine bağlıdır. Ancak, unutulmaması gereken önemli bir unsur, HPLC-DAD analizi sırasında gradient ya da isokratik yöntemlerde farklı çözgen bileşimleri olacağından, karotenoidlerin absorpsiyon dalgaboylarının bu farklılıklardan etkilenebileceği ve değişebileceğidir (Britton 1995).



Şekil 1.7 Farklı karotenoidlerin petrol eterinde alınmış absorpsiyon spektrumları: likopen (—), γ -karoten (- - -), β -karoten (-.-.-) ve α -karoten (....) (Hurst 2008)

1.2.4. Adsorpsiyon Özellikleri

Karotenoidlerin yapılarından ileri gelen bazı önemli özellikleri vardır. Bunlardan biri de adsorpsiyondur. Adsorpsiyon, kromatografinin dayandığı prensiplerden biri olduğundan, kromatografik yöntemler kullanılırken bu özellik oldukça işe yarar ve karotenoidlerin yapısına dair önemli bilgiler verir. Konjuge çift bağların yapısı, halkalı yapının olması, hidroksil ya da oksijen gruplarının bulunması bunların başında gelir. Örneğin, halkalı yapının bulunması adsorpsiyon ilgisini azaltır; öyle ki, β -karoten ile likopen karşılaştırıldığında β -karoten daha zayıf bir şekilde tutunur.

Diğer taraftan oksijenli yapıların varlığı adsorpsiyonu artırır; sayısı, yapısı ve pozisyonu etkilidir. Hidroksil grubu karbonil grubu ile kıyaslandığında adsorpsiyon açısından daha etkindir. Fonksiyonel grupların adsorpsiyon üzerindeki etkisi şöyle sıralanabilir: $\neg\text{OR} < \neg\text{C}=\text{O} < 2 [\neg\text{C}=\text{O}] < \neg\text{OH} < \neg\text{COOH}$ (Davies 1976).

Günümüzde analiz için daha çok ters faz kromatografi kullanılmaktadır. Yukarıda belirtilen etkiler normal faz kromatografi için olduğundan, ters fazda durum bunun tam tersidir. Yani, daha polar olan ksantofiller karotenlere göre daha önce gelirler. Ancak karotenlerin tamamı için bu durum söz konusu değildir. Bu aynı zamanda kullanılan mobil faz ve kolonun monomerik ya da polimerik olması ile de ilgilidir.

1.3. Karotenoid Analizinde Kullanılan Genel Yöntemler

Karotenoid analizi genel anlamda örnek hazırlama, ekstraksiyon, sabunlaştırma, farklı çözügen yardımıyla ayırma, yıkama, çözügenin uçurulması, kromatografik ayırım, yapı tayini ve miktar belirleme gibi bazı basamaklarda oluşur (Rodriguez-Amaya 1999a).

Bu basamakların her birinden hata gelebileceği için her basamakta titizlikle çalışılmalı, laboratuvarında çalışmaya başlamadan önce iyi bir plan yapılmalı, örnekler mümkün olduğunca kısa sürede analiz edilmelidir. İlerleyen bölümlerde alınması gereken önlemlerle ilgili ayrıntılı bilgi verilmiştir.

1.3.1. Numune Hazırlama

Numuneler genellikle kısıtlı miktarlardadır ve ön hazırlık gerektirir; ekstraksiyon öncesi zarar görmemelidir. Numune, öncelikle homojen hale ve sonrasında uygun parçacık boyutuna getirilmelidir.

Numunenin özellikleri her aşamada göz önünde bulundurulmalı ve kullanılacak analitik yöntem buna göre belirlenmelidir. Analiz hemen yapılmayacaksa numune buzdolabında ve mümkün olduğunca düşük sıcaklıkta saklanmalıdır. Ayrıca, yüksek miktarda su içeren örneklerin liyofilize edilmesinde yarar vardır (Pomeranz ve Meloan 1994).

1.3.2. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon işlemi karotenoid analizindeki en kritik basamaklardan biridir; çünkü iyi bir ekstraksiyon işlemi sayesinde tüm karotenoidler numune içinden yapıları bozunmadan ekstrakte edilip çözügene alınır. Karotenoidler besinlerde bulunduğu gibi bakteri ve alglerde de vardır. O nedenle, örneğin yapısına uygun bir ekstraksiyon yöntemi geliştirilmelidir.

Seçilen çözügen ya da çözügenlerin numunedeki karotenoidlerin hepsini çözüp alması beklenir. Ayrıca, sıcaklığa karşı hassas olan karotenoidlerin kaynama noktaları düşük olan çözügenlerle ekstrakte edilmesi önerilir.

Yüksek su içeriklerinden dolayı biyolojik numunelerden karotenoid ekstraksiyonu yapılırken su ile karışabilen (etanol, metanol, aseton veya bunların karışımı gibi) çözügenlerin seçilmesinde fayda vardır. Son olarak, karotenoidlerin ekstraksiyonu sırasında açığa çıkan asitlerin nötralize edilmesi ve isomerleşme ya da bozunmayı önlemesi açısından $MgCO_3$ veya benzeri bir maddenin kullanılması gerekir (Britton 1995a).

1.3.3. Sabunlaştırma

Karotenoid analizinde diğer bir önemli basamak sabunlaştırmadır. Sabunlaştırma işleminin amacı, istenmeyen yağların ve klorofillerin ortamdan uzaklaştırılıp kromatografik ayırım ve analizin kolaylaştırılmasıdır. İstenmeyen pek çok maddenin uzaklaştırılması hem analizde meydana gelebilecek karışıklığı önler hem de kolonun ömrünü uzatır.

Sabunlaştırma işlemi aynı zamanda yapıda bulunan karotenoid ve karotenol esterlerinin serbest karotenoidlere dönüşmesini de sağlar; ancak bazen, bazı karotenoidlerin (astaksantin, fukoksantin, keto-karotenoidler vb.) bozunmasına da neden olur. Bu nedenle gerekmediği sürece bu işlemin yapılmamasında fayda vardır. Eğer sabunlaştırma işlemi kaçınılmaz ise, %10'luk metanolik KOH kullanılmalıdır. Numunenin yapısına göre KOH oranı değişebilir. Kararıklıkta gerçekleştirilmesi gereken sabunlaştırma işlemi sonunda alkali ortamın uzaklaştırılması için bol su ile yıkanması gerekir (Britton 1995a).

1.3.4. Farklı Çözgünde Toplama

Ekstrakt genelde yüksek miktarda su içerdiğinden bundan kurtulmak amacıyla hekzan, dietileter, diklorometan ve bunların karışımı olabilecek başka bir çözügene alınmalıdır. Dietileter bu ayırım için en çok kullanılan çözügenlerin başında gelir. Dietileter fazına alınan ekstrakt altta kalan su fazından bir ayırma hunisi yardımıyla ayrılır. Daha sonra bu çözügen de uçurulur ve son olarak analiz öncesinde uygun bir çözügende ya da mobil fazda çözülerek analize hazır hale getirilir.

1.3.5. Kromatografik Ayırım

Karotenoid analizinde elde edilmek istenen bilgi kromatografik ayırımın kapsamını da belirler. Gıda ve alg örnekleri genelde hem karotenleri hem de polar olan ksantofilleri içerir.

Bu nedenle, kullanılacak olan kromatografik yöntemin bu polarite farklılığı ile başa çıkabilmesi ve en kısa zamanda en iyi ayırımı gerçekleştirmesi gerekir.

Karotenoid analizinde genellikle 5- μm C₁₈ (250 × 4.6 mm) kolonu kullanılır. Ancak günümüzde artık daha küçük parçacık boyutlu ve kısa kolonlar da kullanılırken en çok C₃₀ kolon tercih edilmektedir. Monomerik kolonların yanı sıra geometrik izomerlerin ayrılmasına yarayan polimerik kolonların kullanımı da revaçtadır (Craft 1990, Lesellier 1989, Quackenbush ve Smallidge 1986, Bushway 1985). Açıkta bulunan silanol gruplarının uçlarının kapatılmaması sayesinde geometrik izomerler de ayrılabilir.

Analitik kolonu koruma amacıyla gard kolonu mutlaka kullanılmalıdır. Ayrıca, metal bağlantılar yerine PEEK boruların kullanılması tavsiye edilir (Hart ve Scott 1995); çünkü metal aksam genelde karotenoidlerin yapısını bozar (Scott 1992).

Karotenoidlerin ayrılmasında kullanılan kromatografik yöntemlerin başarılı olabilmesi için çözücü seçimi diğer önemli bir etkidir. Çözücü seçiminde; viskozite, uçuculuk, polarite ve toksik özellikleri önemlidir. Karotenoid analizinde pek çok çözücü ve bileşimleri kullanılır; ancak bunların başında asetonyitril ve metanol gelir (Craft 1992). Asetonyitril kullanılırken amonyum asetat eklenmesinde, metanol kullanırken de trietilamin gibi ayırma yardımcı bazı maddelerin kullanılmasında fayda olduğu belirtilmektedir (Hart and Scott 1995). Hatta bazen suyun kullanılması ile bile kromatografik ayırım daha iyi olabilir (Craft 1992).

Gradient yöntem ancak isokratik yöntem kullanılmadığı zaman tercih edilmelidir. Çünkü isokratik yöntem daha kolay ve hızlıdır; üstelik, tek bir pompa sistemi ile gerçekleştirilebilir. Genelde kararlı bir sinyal verir.

Gradient yöntemin yüksek hassasiyet, daha iyi ayırım gücü ve sıkı tutunan molekülleri sürükleyebilmesi gibi bazı avantajları vardır. Ayrıca polar ve apolar karotenoidlerin bulunduğu bir numunede bu yöntemin kullanılması kaçınılmazdır. Ancak bazı dezavantajları da vardır; daha karmaşıktır, pahalı cihazlara ve bileşenlerine ihtiyaç duyar, analizler arasında dengeye gelme süresi gerektirir, farklı dedektör sinyalleri verebilir ve tekrarlanabilirlik sorunu olabilir (Craft 1992). Bunlar ve daha pek çok nedenden dolayı karotenoidlerin kromatografik yöntemlerle yapı tayini ve miktarlarının belirlenebilmesi için belirli ve tek bir metod yoktur.

Önemli olan bir diğer etken de enjeksiyon çözücünün mobil faz ile uyumlu olması gerekliliğidir. Eğer karotenoidler enjeksiyon çözücünde daha fazla çözünüyorlarsa enjeksiyon sonrası mobil faz ile karışınca çökelme meydana gelebilir. Bu, piklerin kuyruklanmasına, pik yarılmalarına veya ayrılmayan piklerin görünmesine neden olabilir (Craft 1992). Bu nedenle, genelde örneklerin mobil fazda çözünmesi ya da en azından mobil faz ile seyreltilmesi daha uygundur.

1.3.6. Yapı Tayini ve Miktarın Belirlenmesi

Karotenoidlerin davranışı ve UV-Görünür bölgeden elde edilen absorpsiyon spektrumları onların yapı tayininde kullanılacak bilgilerin başında gelir. En yüksek absorpsiyon verdikleri dalgaboyları, bunların konumu ve spektrumun şekli karotenoidlerin yapısı hakkında bazı ipuçları verebilir. Daha sonra bu bilgiler standartlardan elde edilen verilerle karşılaştırılır. Ayrıca, alıkonma zamanları da önemlidir. Ancak tüm bunlar tek başına yeterli değildir. Örneğin, aynı kromofor grubuna sahip karotenoidler hemen hemen aynı absorpsiyon spektrumuna sahiptir.

Buna benzer pek çok nedenden kaynaklanan hataları gidermek amacıyla başka verilerin de olması istenir. Literatürde, yapı tayini için şu koşulların sağlanmasının gerekli olduğu belirtilmektedir (Schiedt and Liaaen-Jensen 1995, Pfander 1994); UV-Görünür bölgede bulunan absorpsiyon spektrumlarının en az iki farklı çözücüde alınması, kromatografik özelliklerinin iki farklı sistem için de aynı sonuçları vermesi (TLC'de aynı R_F , HPLC'de aynı t_R 'ye sahip olmak gibi), mümkünse kütle spektrumunun elde edilmesi. Yapı tayini sonlandığında, karotenoid derişimleri hem spektroskopik hem de kromatografik yollarla belirlenebilir. Absorpsiyon katsayıları kullanılarak $A^{1\%}_{1cm}$ karotenoidlerin derişimlerinin belirlenmesi mümkündür. Ancak, katsayılar çözümden çözüme değişir ve HPLC analizinde kullanılan mobil fazlar da sonucu etkiler. Bu nedenle sadece bu yöntemle güvenilemez ve HPLC analizi için karotenoid standartlarına ihtiyaç duyulur. Derişimler, çeşitli kalibrasyon yöntemleri kullanılarak belirlenebilir.

1.4. Karotenoid Analizinde Hata Kaynakları

Karotenoidlerin analizi çeşitli nedenlerden dolayı oldukça zordur (Rodriguez Amaya 1999a). Öncelikle, doğal halde çok sayıda karotenoidin bulunmasıdır ki, bu yapı tayinini ve derişimlerin doğru bir şekilde belirlenmesini zorlaştırır. Diğer sebeplerden biri ise, ticari olarak satılan karotenoid standartlarının sınırlı olmasıdır. Ayrıca hem gıdalarda hem de alglerde, bakterilerde bulunan karotenoidlerin yapısı ve içeriği farklı olduğundan her bir aşamanın numuneye göre yapılması gerekir. Bunların dışında, bazı karotenoidlerin diğerlerine göre daha kararsız olması ve bu işlemler sırasında bozunup izomerleşmesi de sayılabilir.

1.4.1. Karotenoid Analizi Sırasında Yapılan Yaygın Hatalar

Karotenoidlerin analizinin her basamağında hata yapılabilir ve bu tüm sonuçları etkiler. En yaygın yapılan hatalar şöyle sıralanabilir: örnekleme için iyi yapılamaması, eksik ekstraksiyon/sabunlaştırma işlemi, çeşitli aşamalar sırasında karşılaşılan fiziksel kayıplar, kromatografik ayırımın yapılamaması, yanlış yapı tayini, miktar tayininin yanlış yapılması veya hesap hataları, analiz/saklama sırasında karotenoidlerin bozunması veya izomerleşmesi.

Bunlara ek olarak HPLC analizi sırasında da şu hatalar olabilir (Kimura and Rodriguez Amaya 1999); enjeksiyon çözgeninin mobil faz ile uyumlu olmaması, yanlış tanımlama, örtüşen piklerden kaynaklanan hatalar, kullanılan HPLC kolonundan gelebilecek hatalar ve kalibrasyon standartlarının yanlış hazırlanmasından kaynaklanan hatalar.

1.4.2. Karotenoid Analizinde Alınması Gereken Önlemler

Karotenoidler oldukça kararsız maddeler olduğundan alınması gereken pek çok önlem şöyle sıralanabilir (Davies 1976, Britton 1991, Schiedt and Liaaen Jensen 1995): analizin en kısa zamanda gerçekleştirilmesi, ortamdaki oksijenin uzaklaştırılması, ışıktan ve yüksek sıcaklıktan koruma, asidik ortamdan kaçınma, yüksek saflıkta çözgen kullanımı ve numune/standartların düşük sıcaklıkta saklanması.

1.5. Antioksidan Aktivite Tayini

Oksidanlar başta proteinler, lipitler, karotenoidler, DNA ve karbohidratlar olmak üzere biyomolekülleri doğrudan veya dolaylı hasara uğratma yeteneği bulunan reaktif oksijen türleridir (ROT). Süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH \cdot) gibi ROT'lar çeşitli in vivo koşullarda oluşabilirler. Metabolizmanın normal işleyişi sırasında, gerek elektronların elektron transferi sırasındaki akışıyla, gerekse çeşitli enzimlerin aktivitesiyle oluşan ROT'lar hücre ve dokuları biyolojik hasara uğratabilirler. Hücre ve dokular ise bu hasarı önlemek için ROT'ları süpürmeye ve yok etmeye çalışırlar. Genel olarak antioksidan savunma olarak adlandırılan bu savunma sisteminde çeşitli enzimler (katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), peroksiredoksin, glutatyon peroksidaz, DNA tamir enzimleri) ve antioksidan bileşikler [askorbik asit, tokoferoller, indirgenmiş glutatyon (GSH), bilirubin, karotenoidler, ürik asit, ubikinon vb.] görev alır.

ROT'ların yaşlanma, ateroskleroz, kanser, iskemi reperfüzyon, inflamasyon, romatoid artrit, nörodejeneratif hastalıklar, karaciğer hastalıkları gibi birçok patolojik durumda etken rol oynadığı kabul edilmektedir. Günümüzde, organizmada oluşam oksidatif strese karşı önlem almak üzere serbest radikallerin yer aldığı bilinen hastalıkların tedavisi amacıyla antioksidanlardan yararlanılmaktadır. Diyetle birlikte alınan polifenolik bileşikler, E vitamini ve karotenoidlerin, oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların önlenmesinde en etkili antioksidanlar olduğu saptanmıştır. Bu yüzden son yıllarda antioksidanlarla yapılan çalışmalarda artış gözlenmektedir.

Çalışmalar genellikle antioksidan kapasiteyi belirlemeye yöneliktir ve bu amaçla birçok yöntem kullanılmaktadır. *In vitro* antioksidan aktivite deneyleri iki kategoride değerlendirilebilir: 1) hidrojen atomu transfer reaksiyonlarını içeren aktivite testleri [ORAC (oksijen radikali absorban kapasitesi), linoleik asit oksidasyonu inhibisyonu, TRAP (total radikal tutuklama antioksidan parametresi)], 2) elektron transfer reaksiyonu temelli aktivite testleri [FRAP (demir iyonu indirgeyici antioksidan parametresi), DPPH (difenil-1-pikrilhidrazil)].

Bilinen tüm aktivite tayini protokollerinin taşınması gereken özellikler şöyledir; biyolojik olarak bilinen bir substratı seçmelidir; çeşitli oksidasyon koşullarını test etmelidir; hem başlangıç, hem ikincil oksidasyon ürünlerini ölçmelidir; antioksidanları, aynı derişimdeki aktif yapıtaşları ile karşılaştırmalıdır ve yüzde inhibisyonu veya IC₅₀ (% 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimi) belirleyebilmelidir.

1.5.1. DPPH Yöntemi

DPPH stabil ve ticari olarak elde edilen azot radikalidir ve 515 nm'de maksimum absorbanı sahiptir. Aktivite testi sırasında, örnek aktifse (DPPH'nin indirgenmesine yola açıyorsa) zamanla hazırlanan karışımın renginde açılma gerçekleşir (Koleva vd. 2000).

Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde veya kıyaslanmasında çeşitli yöntemlere başvurulmaktadır. Bu yöntemlerde serbest radikali süpürme/temizleme amacıyla 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (\bullet DPPH) radikali, süperoksit anyon radikali (\bullet O₂), hidroksil radikali (\bullet OH) veya peroksil radikali (ROO \bullet) kullanılır. Bunlar arasında en sık tercih edilenlerden biri oldukça kararlı olan DPPH radikaldır. Serbest DPPH radikalinde bulunan tek elektron 515 nm'de mor renkte güçlü bir absorban verir. DPPH radikalinin tek elektronu serbest radikali temizleyen antioksidan maddeden gelen hidrojenle eşleşince DPPH radikalinin 515 nm'deki absorbanı azalır (DPPH-H oluşur) ve mor renk sarıya döner (Şekil 1.8).



Şekil 1.8 DPPH yöntemiyle antioksidan aktivitenin belirlenmesi

DPPH yöntemi belirli bir antioksidan maddeye özgü değildir ve tüm antioksidan maddelerin aktivitesini belirlemede kullanılabilir. Düşük absorbanstaki güçlü antioksidan aktiviteye işaret eder (Hu vd. 2008).

Bu metot DPPH radikalının antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanır. Metanolik DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengi açılır ve absorbanstaki azalma UV-VIS spektrofotometre ile ölçülür. Metanolik DPPH çözeltisindeki daha fazla renk açılması, reaksiyon karışımının absorbanstaki daha fazla düşme, dolayısıyla yüksek radikal süpürme kapasitesi demektir. DPPH yöntemi basit ve hızlıdır. Ayrıca, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar verir.

BÖLÜM 2

GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kimyasallar

Trans-lutein, trans-astaksantin Dr. Ehrenstorfer GmbH'den, trans- β -Apo-8'karotenol, trans-fukoksantin, pyrogallol ve DPPH ise Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. Kullanılan diğer standartlar (trans-violoksantin, trans-neoksantin, trans-beta-karoten, trans-alfa-karoten ve 9-cis-beta-karotene) ise Carotenature'den satın alınmıştır. Ayrıca, çalışmada kullanılan tüm çözümler HPLC kalite olup Merck firmasından temin edilmiştir.

2.2. Cihazlar

Karotenoidlerin kromatografik ve bazı spektroskopik analizleri için Agilent 1200 Series HPLC-DAD sistemi kullanılmıştır. Analizlerden önce tüm çözümler ultrasonik banyoda (Elmasonic S80H) degaz işlemine tabi tutulmuştur. LC-MS analizleri için ise, AB Sciex Api 4000 Q-trap cihazı kullanılmıştır.

Karotenoidlerin ayrılması için özel bir ters-faz kolonu olan YMC Carotenoid C₃₀, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m (Waters, Milford, MA, USA) kullanılmıştır. Yeşil mikroalglerde bulunan karotenoidlerin ayrımı için metanol, metil-tert-butil-eter ve sudan oluşan ve herbiri % 0.10 (v/v) TEA ve % 0.010 (v/v) pyrogallol içeren yeni geliştirilmiş bir gradient program kullanılmıştır. Ancak kahverengi mikroalgde bulunan karotenoidlerin ayrımı için ise yine herbiri % 0.10 (v/v) TEA ve % 0.010 (v/v) pyrogallol içeren, metanol ve asetonitrilden oluşan isokratik sistem kullanılmıştır. DAD dedektörü 450 nm'ye ayarlanmış ve kolon sıcaklığı 25.0°C'de sabitlenmiştir. Deneme niteliğinde ve sadece ön bilgi olarak kullanılması amacıyla 300-600 nm'deki tüm absorpsiyon değerleri de DAD dedektörü ile kaydedilmiştir. Bu veriler daha sonra karotenoidlerin kimliklendirilmesinde kullanılmıştır.

Karotenoidlerin ekstraksiyon işlemleri ultrasonik banyo ile yapılmış ve sonrasında çözümler Heidolph Hei-VAP Advantage (rotary evaporator) ile uçurulmuştur.

2.3. Kullanılan Mikroalg Türleri ve Yetiştirilmesi

Bu projede çok sayıda mikroalg türü yetiştirilmiş ve karotenoid içerikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Ön denemeler sonucunda bazı mikroalglerin çok az miktarda karotenoid içerdiği, bazılarının ise kirlilik nedeniyle aksenik olarak yetiştirilemediği belirlenmiş, bu nedenle optimizasyon çalışmaları yapılmamıştır. Bunlara ait veriler Ek 2'de sunulmuştur.

Scenedesmus protuberans, *Prochlorococcus sp.* ve *Nitzschia sp.* ile yapılan çalışmalar oldukça önemli sonuçlar vermiş ve projede bu mikroalgler ile ilgili planlar gerçekleştirilmiştir. Tüm mikroalgler Ege Üniversitesi Kültür koleksiyonundan temin edilmiş ve en uygun koşullarda yetiştirilmiştir. Yeşil mikroalgler için BBM ortamı (Bold's Basal Medium) kullanılmıştır. BBM ortamının içeriği Tablo 2.1'de verilmiştir. Diğer taraftan, *Nitzschia sp.* için F/2 ortamı kullanılmıştır (Tablo 2.2). Seçilen ortamlarda mikroalgler hızlı bir şekilde büyümüştür. Hücreler 2.0 litrelik şişelerde 2000 lüks ışık şiddetinde floresan lamba kullanılarak (Philips, 18W/54), 24.0°C'de yetiştirilmiştir. Her bir kültür için havalandırma hızı 1.25 vvm'dir. Cam malzemelerin hepsi ve kültür ortamı 121.0 °C'de 20 dakika boyunca otoklavlanmıştır.

Tablo 2.1. BBM ortamının içeriği

Kimyasallar	Miktar
NaNO ₃ (5.0 g/200 mL)	10.0 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O (0.5 g/200 mL)	10.0 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O (1.5 g/200 mL)	10.0 mL
K ₂ HPO ₄ (1.5 g/200 mL)	10.0 mL
KH ₂ PO ₄ (3.5 g/200 mL)	10.0 mL
NaCl (0.5 g/200 mL)	10.0 mL
FeSO ₄ .7H ₂ O (4.98 g/L)	1.0 mL
H ₃ BO ₃ (11.42 g/L)	1.0 mL
KOH çözeltisi	1.0 mL
Eser elementler	1.0 mL
Saf su ile seyreltme	1.0 L

Tablo 2.2. F/2 ortamının içeriği

Kimyasallar	g/1000.0 mL denizsuyu
NaNO ₃	0.075
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0.005
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	0.03
Tiamin-HCl	0.0001
Biotin	0.0005
Vitamin B ₁₂	0.00005
Eser elementler	1.0 mL g/1000.0 mL saf su
Na ₂ EDTA	4.36
FeCl ₃ .6H ₂ O	3.15
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.18
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.022
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.006

2.4. Mikroalglerin Hazırlanması

Mikroalgler hasat için hazır olduklarında 0.45 µm selüloz-asetat filtreden (Whatman) süzülür. Filtre edilen biyomas besi ortamından gelebilecek tuzlardan arındırılması için saf su ile yıkanır. Son olarak elde edilen kütle liyofilize edilir (Christ Alpha 1–4 Ld Liyofilizatör) ve -20.0 °C’de saklanır. Daha sonra bu kütle havan yardımıyla parçacık boyutu küçülene dek ezilir. Elde edilen biyomas ekstraksiyon işlemine dek -20°C’de saklanır.

Ekstraksiyon işlemi öncesinde mikroalglerin optik (Olympus CH40) ve elektron (Philips XL-30S FEG) mikroskop görüntüleri alınmıştır. Ayrıca elementel analizleri (LECO-932) de yapılmıştır. Buna göre, *Prochlorococcus sp.* kütlece % 47.06 C, % 6.92 N, % 7.05 H, ve % 0.64 S; *Scenedesmus protuberans* kütlece % 43.12 C, % 5.21 N, % 6.51 H ve % 0.73 S; *Nitzschia sp.* ise kütlece % 23.2 C, % 3.5 N, % 3.5 H, ve % 0.6 S içermektedir.

2.5. Standart Karotenoid Çözeltilerinin Hazırlanması

Karotenoidler ışığa karşı hassas maddeler olduğundan çözeltileri sarı ışık altında (Philips TLD 36W/16, 500-750 nm’de ışık veren sarı lamba) ve oda sıcaklığında en kısa sürede hazırlanmıştır. Stok karotenoid standartları hazırlanırken, her bir standarttan 1.0 mg tartılmış ve kloroformda çözülüp 10.0 mL’ye tamamlanmıştır. Daha düşük derişimler bu

çözeltiler kullanılarak hazırlanmıştır. İç standart kalibrasyon yöntemi kullanıldığından, tüm çözeltiler sabit miktarda iç standart içermiştir. Standart çözeltiler ve numuneler koyu renkli balon jöjelerde hazırlanıp alüminyum folyo ile sarılarak muhafaza edilmiştir.

2.5.1. LOD ve LOQ Değerlerinin Hesaplanması

Bir analitik yöntemin doğruluğunu ve hassasiyetini sınırlayan en büyük etken, *gürültü*dür. Yabancı ve istenmeyen bu tür sinyaller analitik sinyalin üzerine binerler. Analitik olarak gürültünün büyüklüğünü ölçmek amacıyla, belirli sayıda kör çözeltiler analiz edilip standart sapma hesaplanır. Bu çalışmada on adet kör çözeltiler analiz edilerek ve standart sapma hesaplanmış ve bu değer kullanılarak tayin sınırı ve ölçüm sınırı belirlenmiştir. Buna göre, on adet kör çözeltilerin ortalama değeri artı üç kat standart sapması tayin sınırı; on adet kör çözeltilerin ortalama değeri artı on kat standart sapması ölçüm sınırı olarak kullanılmıştır.

2.5.2. Kalibrasyon Grafiklerinin Oluşturulması

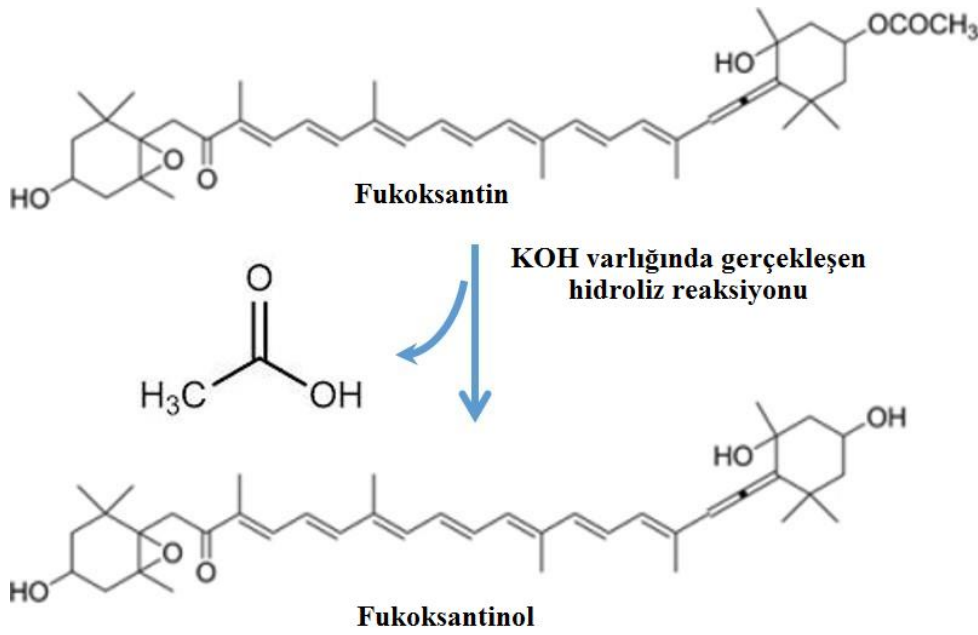
Farklı derişimlerde (0.010-5.0 mg/L) karotenoid çözeltileri HPLC ile ölçülmüştür. Kalibrasyon grafikleri analit piklerinin iç standart pikine olan oranı kullanılarak oluşturulmuştur. Bu amaçla trans-beta-apo-8'-karotenol yeşil mikroalglerde bulunan karotenoidlerin analizinde, trans-astaksantin ise kahverengi mikroalgde bulunan karotenoidlerin analizinde iç standart olarak kullanılmıştır.

2.6. Mikroalglerden Karotenoid Ekstraksiyonu

Mikroalgler (0.25 g), CaCO₃ (0.25 g) eklendikten sonra farklı çözen sistemleri (10.0 mL) kullanılarak (% 0.010 (m/v) pyrogallol içeren) ekstrakte edilmiştir. Karışım ultrasonik banyoya yerleştirilmiş ve 15.0 dakika süreyle ekstraksiyon yapılmıştır. Daha sonra çözeltiler 6000 rpm'de santrifüj edilmiş, kalıntıya 10.0 mL yeni çözen eklenerek renk görülmeyene dek ekstraksiyon işlemi sürdürülmüştür. Süzüntüler biriktirilip çözenleri 35.0 °C'de vakum altında uçurulmuştur. Yeşil mikroalglerde bulunan karotenoidlerin analizi için kalıntı 10.0 mL diklorometanda çözümlenip sonrasında 10 kat mobil faz kullanılarak seyreltilmiş ve kromatografa (20.0 µL) enjekte edilmiştir. Kahverengi mikroalgde bulunan karotenoidlerin analizi için ise bu işlem kloroformda çözümlenme ve yine mobil faz ile 10 kat seyreltilerek yapılmıştır.

2.7. Ekstraktların Sabunlaştırılması

Sabunlaştırma işlemi sadece yeşil mikroalglerden elde edilen ekstraktlara uygulanmıştır. Bunun nedeni, kahverengi mikroalgte bulunan fukoksantin bazik ortamda fukoksantinole dönüşmesidir ki, bu istenmez (Şekil 2.1).



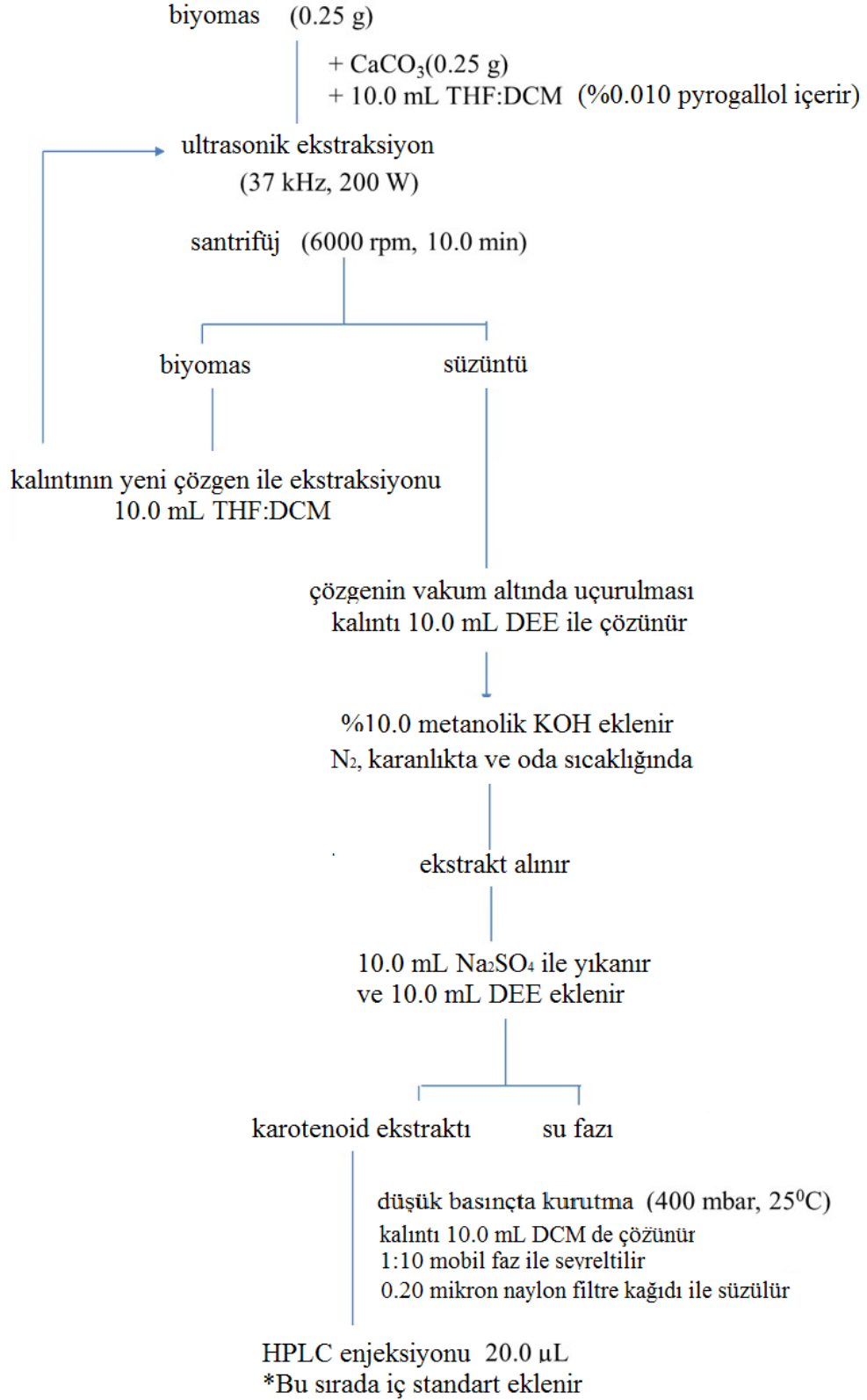
Şekil 2.1. Bazik ortamda fukoksantin fukoksantinole dönüşümü

Yeşil mikroalglerden elde edilen ekstraktlar çözümleri uçurulduktan sonra 10.0 mL dietileter fazına alınır ve buna 10.0 mL %10.0'luk KOH (metanolik, % 0.010 (m/v) pyrogallol içeren) çözeltisi eklenir. Sabunlaştırma işlemi karanlıkta ve azot gazı kullanılarak gerçekleştirilir. Sonra, tuz eklenerek sabunlaştırma işlemine son verilir. Kullanılan Na_2SO_4 (10.0 mL, % 10.0 (m/v)) çözeltisi ile artık ortam aşırı bazik değildir. Su ve eter fazı ayrılınca toplanan ve karotenoidlerin bulunduğu eter fazı, 0.20 µm naylon filtreden (Sartorius) vakum filtrasyon yöntemiyle süzülür. Daha sonra rotary evaporatör yardımıyla 400 mbar ve 25.0 °C'de uçurulur. Kalan su azot gazı yardımıyla uzaklaştırılır. Kalıntı 10.0 mL diklorometanda çözülüp analiz için mobil faz ile on kat seyreltilir. Yeşil ve kahverengi mikroalgler için kullanılan ekstraksiyon, (sabunlaştırma) ve analiz işlemleri sırasıyla Şekil 2.2 ve 2.3'de özetlenmiştir.

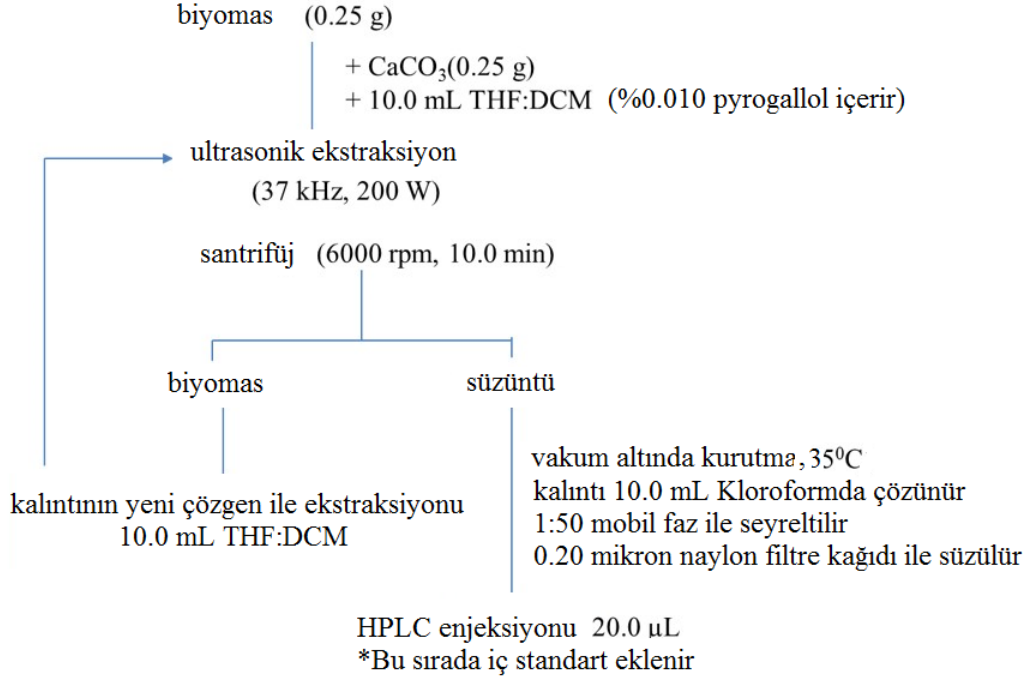
Yapılan çalışmalarda sabunlaştırma işleminin karotenoid analizi için oldukça önemli olduğu bildirilmiştir (Britton 1995a). Çünkü farklı yapılara sahip bu organizmaların karotenoid

içerikleri de farklıdır. Bu işlem sayesinde örneklerde bulunan yağ ve yağ asitleri, esterler ve klorofiller ortamdan uzaklaştırılır. Böylece, karotenoidlerin kromatografik ayırımı ve miktar tayini de kolaylaşmış olur. Her mikroorganizmanın farklı yapıya sahip olduğu düşünülürse bunun önemi daha iyi anlaşılabilir.

Bu çalışmada kullanılan iki farklı yeşil mikroalgin yapıları ve morfolojik özellikleri birbirinden farklı olduğundan, sabunlaştırma işlemi her iki mikroorganizma için ayrı ayrı optimize edilmiştir.



Şekil 2.2. Yeşil mikroalgelerde (*Prochlorococcus sp.* ve *Scenedesmus protuberans*) bulunan karotenoidlerin ekstraksiyonu, sabunlaştırma işlemi ve analizi



Şekil 2.3. Kahverengi mikroalgde (*Nitzschia sp.*) bulunan karotenoidlerin ekstraksiyonu ve analizi

2.8. Mikroalglerde bulunan Karotenoidlerin Ayrılması İçin Yöntem Geliştirme

Yeşil mikroalglerde bulunan karotenoidlerin ayrılması için gradient yöntem geliştirilmiştir; çünkü bu örnekler için isokratik yöntem çok uzun sürmekte ve hassasiyeti azaltmaktadır. Geliştirilen yönteme ait bilgi ve koşullar Tablo 2.3'te özetlenmiştir. Kahverengi mikroalg için kullanılan yöntem ise daha kolaydır; % 70 (v/v) metanol ve % 30 (v/v) asetonitril kullanılmış ve isokratik çalışılmıştır.

Yöntemlere ait önemli parametreler Tablo 3.4, 3.5 ve 3.6'da verilmiştir. Buna göre, çalışmada adı geçen mikroalglerdeki karotenoidlerin ayrılması için geliştirilen her iki metodun da hızlı, kesin ve spesifik olduğu düşünülmektedir.

Tablo 2.3. Yeşil mikroalglerde bulunan karotenoidlerin HPLC-DAD ile analizi için geliştirilen gradient program

Çözgenler % 0.10 TEA içermektedir			
Süre (dakika)	MeOH	MTBE	H ₂ O
0	70	25	5
5	60	35	5
10	45	55	0
15	25	75	0

*(Analizler C₃₀ kolon kullanılarak 450 nm'de ve 1.0 mL/min akış hızı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.)

2.9. Luteinin Önemi

Lutein ve onun kronik hastalıkları engellenmesine ait pek çok çalışma bildirilmiştir. Buna göre bazı kanser türlerini iyileştirdiği (Astorg 1997, Demmig-Adams 2002, Heber and Lu 2002), kalp hastalıklarına iyi geldiği (Dwyer, 2001) ve retinaya ait bozulmaları engellediğine (Chiu and Taylor 2007 and Granado 2003) dair çalışmalar kaydedilmiştir. İnsan vücudu luteini üretemez ve bunu ancak dışardan aldığı besinlerle sağlayabilir. Lutein aynı zamanda makula pigmenti olarak da adlandırılır. Lutein alımının katarakt hastalığına iyi geldiği bilinmektedir. Oldukça kuvvetli bir antioksidan olduğundan serbest radikallerin yol açtığı etkileri bertaraf edebilmektedir (Richmond 1990, Le Marchand 1993 and Ziegler 1996).

Doğal halde bulunan lutein bitkiler ve algler tarafından üretilmektedir. Bitkilerle kıyaslandığında bu maddenin algler tarafından üretilmesi daha avantajlıdır. Algler tarafından daha kısa sürede ve daha yüksek miktarlarda üretildiği bildirilmiştir. (Shi 1997, Shi 1999, Shi 2000). Saf luteinin günümüzde ticari olarak üretimi sarı kadife çiçeği (*Tagetes erecta L.*) ile sağlanır. Ancak bu çiçekte bulunan lutein mikroalglerde bulunan miktarla kıyaslandığında daha azdır. Bu da lutein için alternatif doğal kaynakların aranmasına neden olmaktadır.

Mikroalglerin biyoteknoloji alanında uygulamaları günümüzde daha çok dikkat çekmektedir. Bunun nedeni mikroalglerin yapılarında insan sağlığına faydalı pek çok doğal maddenin bulunmasıdır. Bunlar arasında karotenoidler de yer almaktadır. Hatta doğal ortamları dışında farklı çevresel faktörlere maruz kaldıklarında farklı maddelerin üretildiği ya da varolan maddelerin miktarlarının değiştiği bildirilmiştir (Jin , 2003).

Bu etkenlerin arasında lutein miktarını en çok etkileyenler ışık, sıcaklık, azot kaynağı, tuz miktarı ve oksidatif strestir. Bunlar hem lutein miktarına hem de biyomasın üreme hızına olumlu ya da olumsuz anlamda etki edebilir. (Fernandez-Sevilla, 2010). Bu nedenle

mikroalglerden lutein elde edilirken mikroorganizmanın üreme hızının da yüksek olması beklenir. Son yıllarda, luteinin mikroalgler tarafından üretilmesinin tartışılması, bu çalışmada adı geçen mikroalglerden daha fazla lutein elde edilmesine yönelik bazı optimizasyon çalışmalarının yapılmasına da sebep olmuştur. Günümüzde pek çok mikroalgün lutein ürettiği bilinmektedir: *Muriellopsis sp.* (Del Campo 2001, Blanco 2007), *Chlorella zofingensis* (Del Campo 2000), *Chlorella protothecoides* (Wei 2008), *Scenedesmus almeriensis* (Sánchez 2008). Karotenoidlerin analizinde kesin ve tek bir yöntem olmadığından, her bir kaynak için ayrı bir yöntem geliştirilmesi gerekmektedir. Böylece bu kaynaklarda bulunan karotenoidlerin yapıları çözülüp miktarları belirlenebilir.

Bu çalışmada adı geçen yeşil mikroalglerden (*Prochlorococcus sp.* ve *Scenedesmus protuberans*) yüksek miktarlarda lutein elde edilmesi için uygun ekstraksiyon koşulları belirlenmiş ve farklı ışık kaynağı, farklı azot kaynakları ve oksidatif stres koşulları gibi lutein miktarını etkileyen değişkenler kullanılmıştır.

Ekstraksiyon işlemi için ultrasonik yöntem kullanılmıştır. Bu sayede hücre içindeki maddelerin çözümler tarafından etkin bir şekilde alınması sağlanmıştır. Karotenoidlerin ayrılması için özel C₃₀ kolonu kullanılmış ve analizler HPLC-DAD ile gerçekleştirilmiştir.

2.9.1. Ekstraksiyon Koşullarının Lutein Miktarına Olan Etkisi

En yüksek lutein miktarına ulaşmak için olası tüm koşullar optimize edilmiştir. Bu amaçla; çözümler bileşimi, ekstraksiyon ve sabunlaştırma süresi, sıcaklık ve ekstraksiyon sayısı gibi önemli etkenler incelenmiştir.

2.9.2. Farklı Azot Kaynaklarının Lutein Miktarına Etkisi

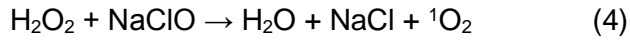
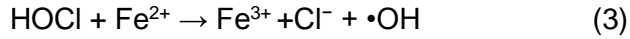
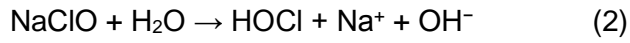
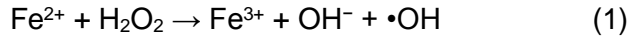
Literatürde yer alan çalışmalar farklı azot kaynaklarının lutein miktarını değiştirdiğini göstermektedir (Shi 2000 ve Fernández-Sevilla 2010). Bu nedenle, mikroalglerin yetiştirilmesinde, eşit miktarda azot içerecek şekilde nitrit, amonyum ve üre gibi maddeler kullanılmıştır.

2.9.3. Farklı Işık Kaynaklarının Lutein Miktarına Etkisi

Yeşil mikroalglerde lutein biyosentezinde farklı dalgaboyuna sahip ışık kaynaklarının etkilerini görmek amacıyla sürekli ışık veren floresan lambalar (6 W, beyaz, kırmızı ve mavi) kullanılmıştır.

2.9.4. Farklı Oksidatif Stres Kaynaklarının Lutein Miktarına Etkisi

Bu çalışmada BBM ortamında yetiştirilen yeşil mikroalglerin oksidatif strese maruz kaldıklarında lutein miktarına olan etkileri araştırılmıştır. Bunun için demir Fe^{2+} iyonu varlığında H_2O_2 ve NaOCl eklenmiştir. Hidroksil radikali ve ($\cdot OH$) ve singlet oksijen (1O_2) doğada bulunan en güçlü oksidatif türlerdir ve aşağıdaki denklemlerde (1-4) belirtilen mekanizmalara göre oluşmaktadır (Ip 2005 ve Shi 1999):



2.10. Fukoksantinın Önemi

Fukoksantin kahverengi algler tarafından üretilen sarı-kahverenkli bir pigmenttir ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle günümüzde dikkat çekmektedir. Fukoksantinın kanser, yüksek tansiyon, inflamatuvar ve obezite gibi bazı hastalıklar üzerinde tedavi edici özelliği bulunduğu bildirilmiştir (Peng 2011). Bu özelliklerinin moleküler yapısından kaynaklandığı bilinmektedir (Nomura 1997). Yapısında bulunan çok sayıda çift bağ ve içerdiği epoksi, hidroksil, karbonil ve karboksil gibi önemli fonksiyonel gruplar nedeniyle yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilir (Sachindra 2007).

Mikroalglerden fukoksantin ekstraksiyonu günümüzde ilgi çeken ancak henüz yeni bir araştırma konusudur. Bugüne kadar yapılan endüstriyel çalışmaların tamamı kahverengi deniz yosunlarına aittir (Fung 2013, Maeda 2005, Jaswir 2011, Zailanie 2011 ve Yan 1999). Karotenoidlerin bu denli önemli olmalarına karşın, ekstraksiyonu ve içeriklerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların yeterince aydınlatıcı olduğu söylenemez. Bu nedenle, yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir (Peng 2011, Mise 2011 ve Jaswir 2011). Morfolojik yapılarının birbirinden farklı olmasından dolayı, mikroalglerin ekstraksiyon koşullarının özellikle optimize edilmesi gerekmektedir.

2.10.1. Ekstraksiyon Koşullarının Fukoksantin Miktarına Etkisi

Kahverengi mikroalgten (*Nitzschia sp.*) fukoksantin ekstraksiyonu için çözgen bileşimi, ekstraksiyon süresi, sıcaklık ve ekstraksiyon sayısının optimize edilmesi gerekmektedir. Ayrıca, fukoksantin biyosentezini arttırmak amacıyla farklı azot kaynakları, farklı dalgaboylarında ışık ve oksidatif stres gibi parametrelerin etkilerine bakılmıştır.

2.10.2. Farklı Azot Kaynaklarının Fukoksantin Miktarına Etkisi

Literatürde, farklı azot kaynaklarının mikroalg yetiştirilmesinde fukoksantin miktarına olan etkilerine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, farklı azot kaynakları olarak nitrit, amonyum ve üre kullanılmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi azot miktarı aynı kalacak şekilde azot kaynakları mikroalgin kültür ortamına eklenmiştir.

2.10.3. Farklı Oksidatif Stres Kaynaklarının Fukoksantin Miktarına Etkisi

Oksitleme kabiliyetlerinin çok güçlü olması, bazı maddelerin reaktif oksijen bileşikleri (ROB) olarak isimlendirilmesine neden olmuştur. Örneğin, hidrojen peroksit mikroalglerin oksidatif metabolizmaları sayesinde çıkan bir üründür. Neredeyse tüm canlılar düşük derişimde olan hidrojen peroksiti su ve oksijene çevirir. Ancak bu madde yüksek derişimlerde hücrelere zarar verebilir. Özellikle demir (II) iyonu varlığında hidrojen peroksit bozunur ve Fenton reaksiyonu adı verilen reaksiyonla oldukça reaktif olan hidroksil radikalini oluşturur. Mikroalgler de pek çok organizma gibi buna karşı savunma mekanizması geliştirir ve biyomas üretiminde azalma meydana gelir (Fernandez-Sevilla 2010).

2.10.4. Farklı Işık Kaynaklarının Fukoksantin Miktarına Etkisi

Farklı dalgaboyuna sahip ışık kaynaklarının fukoksantin üretimine etkisini incelemek amacıyla, beyaz, kırmızı ve mavi ışık veren 6W'lık floresan lambalar kahverengi mikroalgin kültür şişelerinin içine yerleştirilmiştir. Daha sonra her farklı koşulda, mikroalgin hem büyüme hızına hem de ürettiği fukoksantin miktarına bakılmıştır.

2.11. DPPH çözeltilisinin hazırlanması

Antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan DPPH çözeltisi (30µM), gerekli madde miktarı tartılıp metanolde çözülerek balon jodede hazırlanmıştır. Kahverengi şişeye aktarılan çözeltinin ışıktan etkilenmemesi için şişe ayrıca alüminyum folyo ile de sarılmıştır. Hazırlanan çözelti mor renklidir ve 515 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir.

BÖLÜM 3

BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Mikroalglerin Morfolojik Yapıları ve Büyüme Hızları

Her bir mikroalg uygun kültür koşullarında yetiştirilmiştir ve buna göre büyüme hızları *Scenedesmus protuberans* için 0.110 gün^{-1} , *Prochlorococcus sp.* için 0.419 gün^{-1} *Nitzschia sp.* için 0.134 gün^{-1} olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplar Becker'in (Becker 1993) aşağıda verilen denklemine göre (1) yapılmıştır. Hesaplamalarda kültürlerin 450 nm 'deki absorbsansına bakılmış ve büyüme eğrileri çıkarılmıştır (Şekil 3.1 ve 3.2).

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{\Delta t} \quad (1)$$

μ : spesifik büyüme hızı

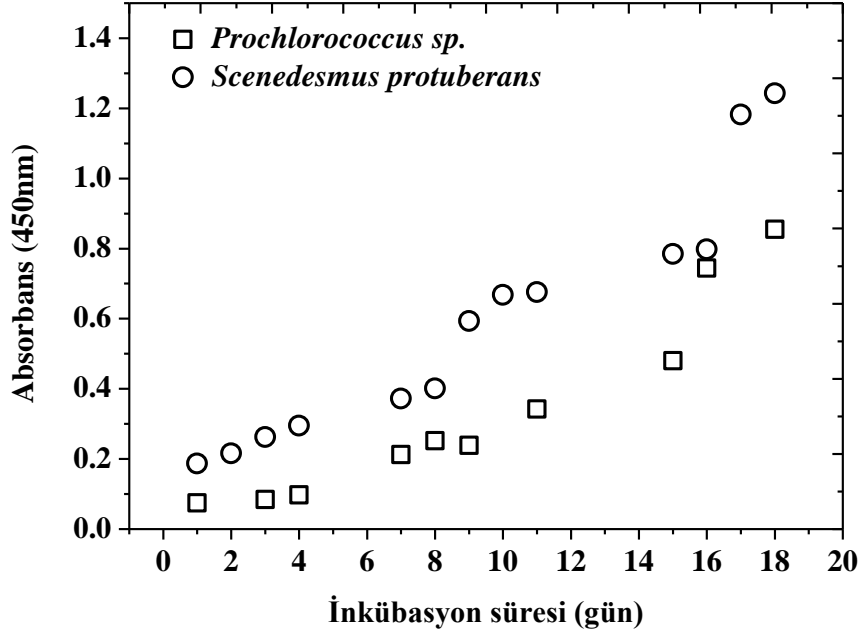
x_2 : t_2 anındaki hücre derişimi

x_1 : t_1 anındaki hücre derişimi

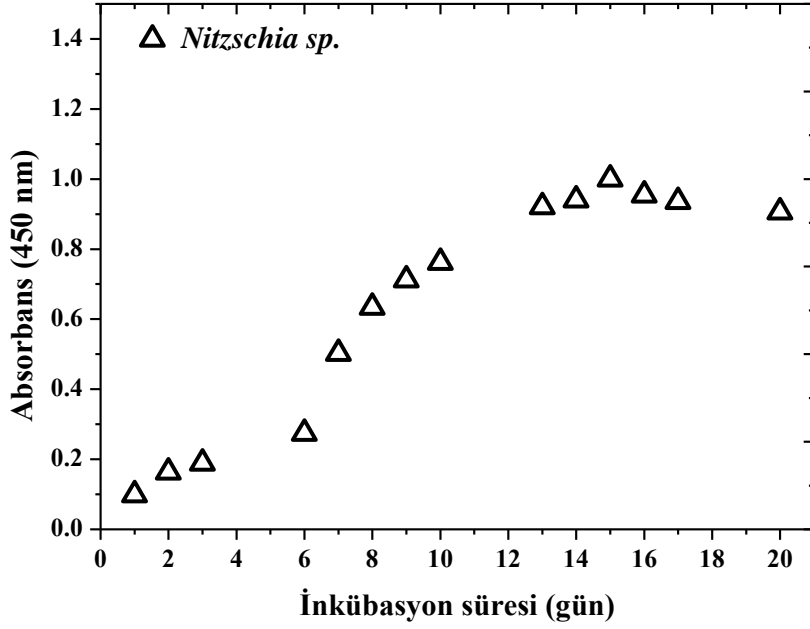
Δt : t_2-t_1

Büyüme eğrilerinden de görüldüğü gibi mikroalgler farklı büyüme hızlarına sahiptir. *Scenedesmus protuberans*'ın büyüme hızı diğer mikroalgler ile kıyaslanığında daha yüksektir. Büyüme hızı biyomasın üretimi açısından oldukça önemli bir faktördür. Bir mikroalg türünden önemli bir biyomolekül izole edilecekse hem büyüme hızının hem de üreteceği bu biyomolekülün miktarının fazla olması istenir.

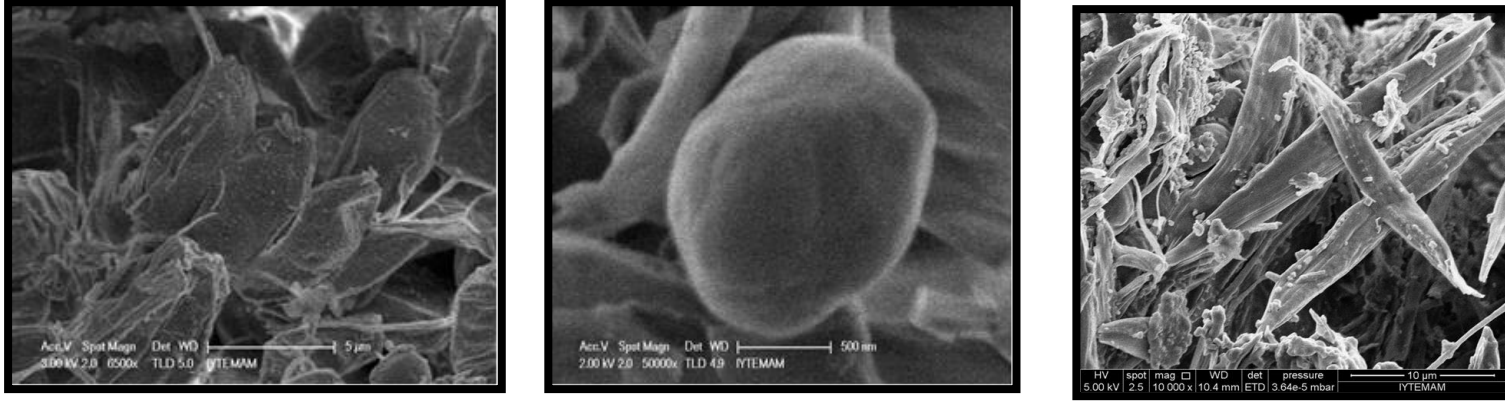
Diğer bir önemli etken ise kullanılan mikroalgin morfolojik yapısıdır. Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de görüldüğü gibi mikroalglerin farklı morfolojik yapıları vardır ki bu, hücre duvarının ya da yapısının farklı olduğunu gösterir. Aynı zamanda içindeki maddelerin ekstraksiyonuna da etki eder. Bunun nedeni, istenen maddelerin ekstraksiyonu için hücre duvarının aşılması yani parçalanması gerekir ve sonrasında iyi bir çözügenin kullanılması ile tüm maddeler elde edilebilir. Bu nedenle ekstraksiyon için ultrasonik banyo tercih edilmiştir.



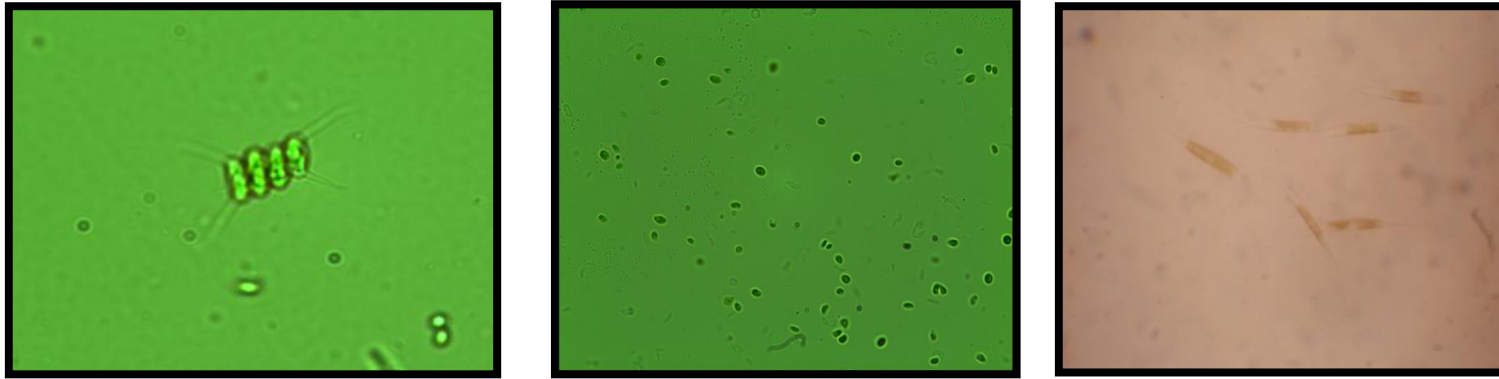
Şekil 3.1. Yeşil mikroalgelere ait büyüme eğrileri



Şekil 3.2. Kahverengi mikroalge ait büyüme eğrisi



Şekil 3.3. (a) *Scenedesmus protuberans* ($\times 6500$), (b) *Prochlorococcus* sp. ($\times 50000$) ve (c) *Nitzschia* sp. ($\times 10000$) için alınan SEM görüntüleri



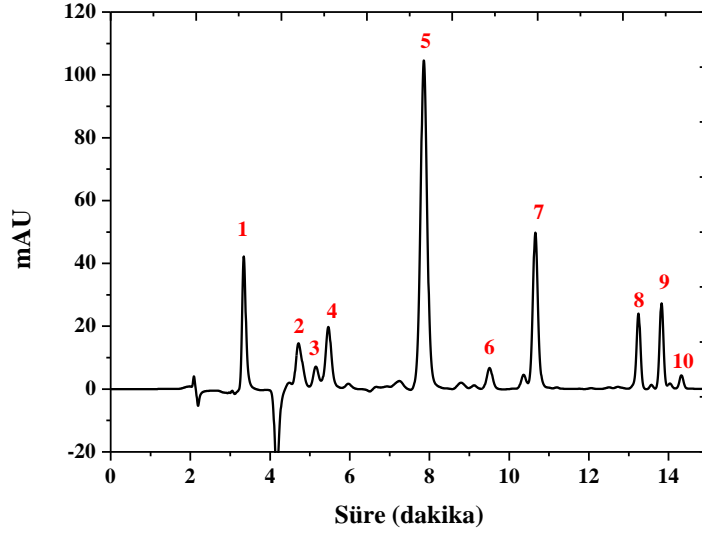
Şekil 3.4. (a) *Scenedesmus protuberans* ($\times 40$), (b) *Prochlorococcus* sp. ($\times 40$) ve *Nitzschia* sp. ($\times 40$) için alınan optik mikroskop görüntüleri

3.2. Yeşil Mikroalglerde Bulunan Karotenoidlerin HPLC-DAD ile Analizi

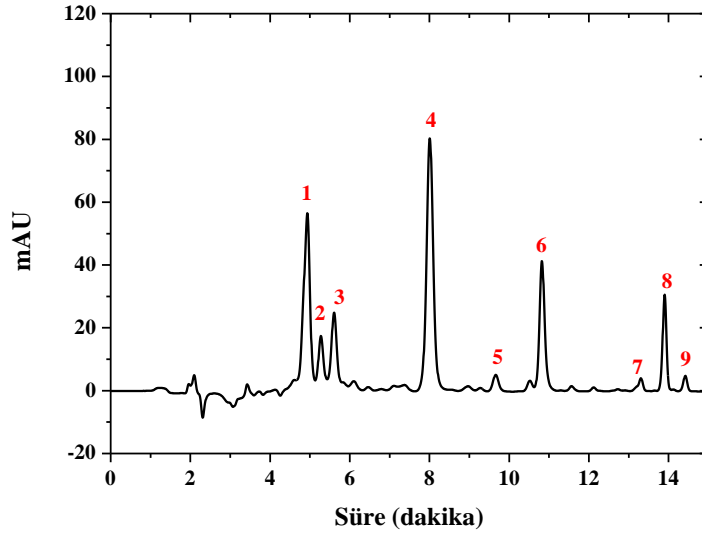
DAD dedektörü karotenoidler gibi karışık olan maddelerin ayrılmasında kullanılan önemli bir araçtır. Tüm spektrum kaydedilerek elde edilen veriler literatür değerleri ve mevcut standart maddeler ile kıyaslanır ve bu sayede bilinmeyen maddelerin tanımlanması sağlanır. Bu çalışmada HPLC-DAD ile elde edilen spektrumlar sayesinde tanımlanamayan karotenoidler literatür değerleriyle (Britton 2004) kıyaslanmıştır. *Scenedesmus protuberans* ekstraktından elde edilen kromatogram (Şekil 3.6) *Prochlorococcus sp.* ekstraktında bulunan karotenoidler ile ve elde edilen kromatogramla bazı benzerlikler göstermektedir. Sadece, ikincisinde sabunlaştırma işlemi daha kısa sürdüğünden dolayı klorofil b gözlenmektedir. Yine de geliştirilen yöntem ile karotenoidler birbirinden iyi bir şekilde ayrılmıştır ve ayırım karmaşık değildir.

Absorpsiyon özellikleri karotenoidlerin tanımlanmasında ilk sırada gelen önemli bir unsurdur. Karotenoidler, yapılarında bulundurduğu konjuge çift bağlar sayesinde UV-Görünür bölgede kuvvetli ve şiddetli absorpsiyon özelliği göstermektedir. Elde edilen spektrumdan, (1) en yüksek absorpsiyon verdiği dalgaboyu, (2) spektral şekil ve (3) absorpsiyon şiddeti (Britton 2004) elde edilir. Daha sonra bu veriler kütle sepkrumları ile de desteklenir. Şekil 3.11, 3.12 ve 3.13, mikroalg (*Prochlorococcus sp.*, *Scenedesmus protuberans* ve *Nitzschia sp.*) ekstraktlarından elde edilen karotenoidlere ait absorpsiyon piklerini göstermektedir. Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3'de ise adı geçen karotenoidlerin absorpladığı karakteristik dalga boylarına ait bilgiler verilmektedir. Veriler, literatür değerleri (Britton 2004) ve mevcut standart maddelerle kıyaslandığında, değerlerin oldukça iyi eşleştiği görülmüştür.

Kullanılan kromatografik koşullar sayesinde yeşil mikroalglerde bulunan karotenoidlerin 15.0 dakika gibi kısa bir zamanda başarılı bir şekilde ayrıldığı görülür (Şekil 3.5 ve 3.6). Ksantofiller ilk 10.0 dakikada gelirken karotenlerin daha sonra geldiği gözlenmiştir. Kullanılan gradient yöntem sayesinde karotenler son beş dakikalık zaman diliminde görülebilmektedir.



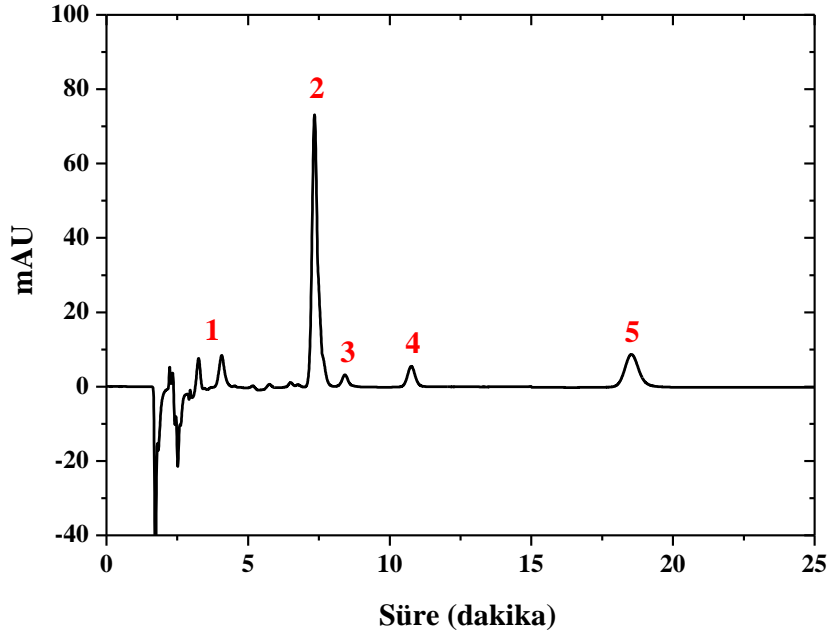
Şekil 3.5. *Prochlorococcus sp.*'nin HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı (gradient yöntem, 450 nm, 1 mL/min akış hızı, 25°C kolon sıcaklığı) (1) klorofil b, (2) neoksantin, (3) violaksantin, (4) 9- or 9-cis-violaksantin (5) lutein, (6) 9- or 9-cis-lutein, (7) trans-beta-apo-8'-karotenal, (8) α -karoten, (9) β -karoten, (10) 9- or 9-cis-karoten.



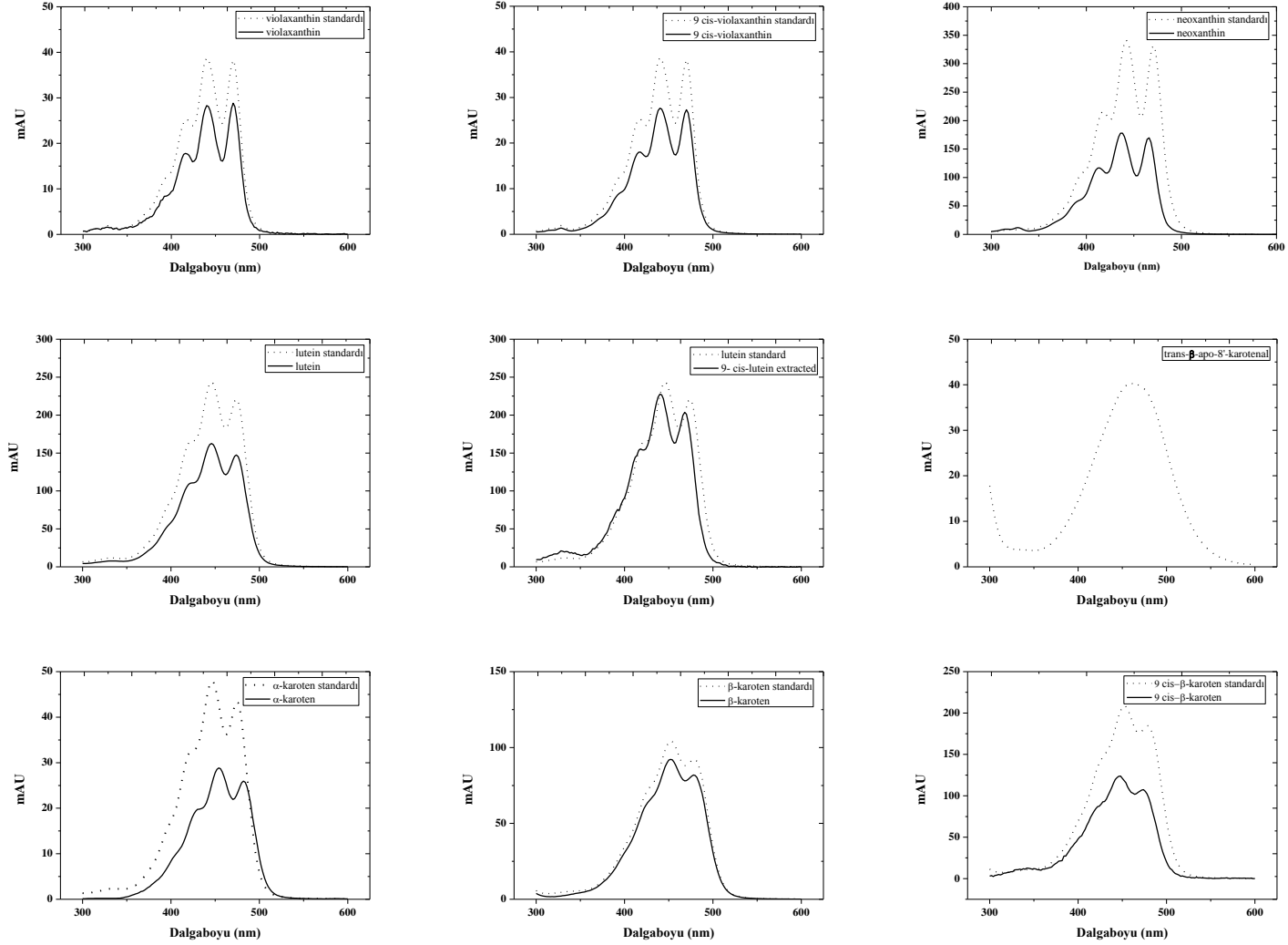
Şekil 3.6. *Scenedesmus protuberans*'in HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı (gradient yöntem, 450 nm, 1 mL/min akış hızı, 25°C kolon sıcaklığı) (1) loroksantin, (2) violaksantin, (3) 9- or 9-cis-violaksantin (4) lutein, (5) 9- or 9-cis-lutein, (6) trans-beta-apo-8'-karotenal, (7) α -karoten, (8) β -karoten, (9) 9- or 9-cis-karoten.

3.3. Kahverengi Mikroalgde Bulunan Karotenoidlerin HPLC-DAD ile Analizi

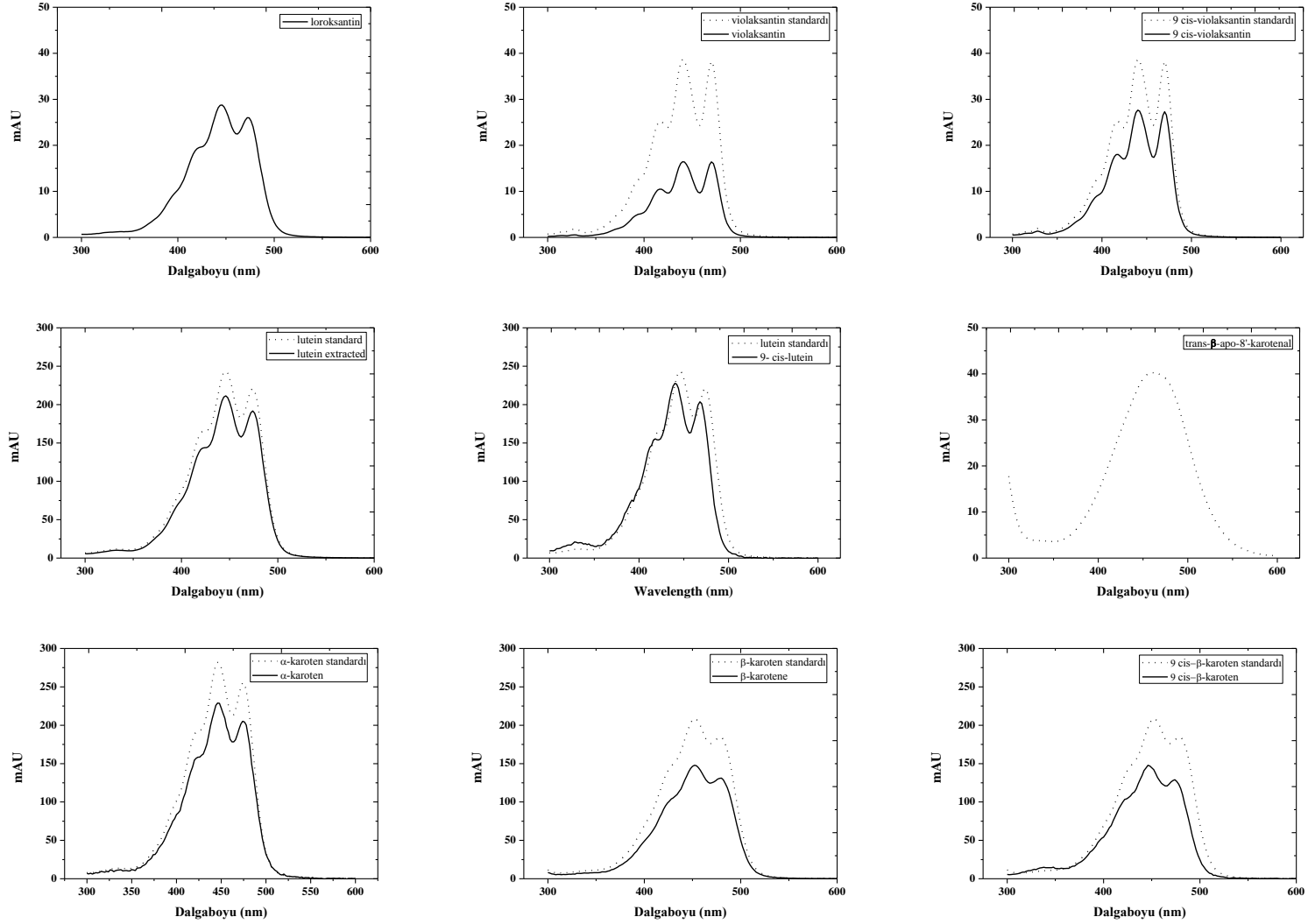
Kahverengi mikroalgte (*Nitzschia sp.*) bulunan karotenoidlerin analizi için oldukça basit, kısa ve izokratik bir yöntem geliştirilmiştir. Şekil 3.7 *Nitzschia sp.*'ye ait ekstraktan elde edilen kromatogramı göstermektedir. Tüm karotenoidlerin kolayca ve iyi bir şekilde birbirinden ayrıldığı açıkça görülmektedir. DAD dedektörü sayesinde elde edilen spektroskopik veriler incelendiğinde, ilk dakikalarda gelen piklerin mikroalgde bulunan klorofillerden kaynaklandığı düşünülmektedir.



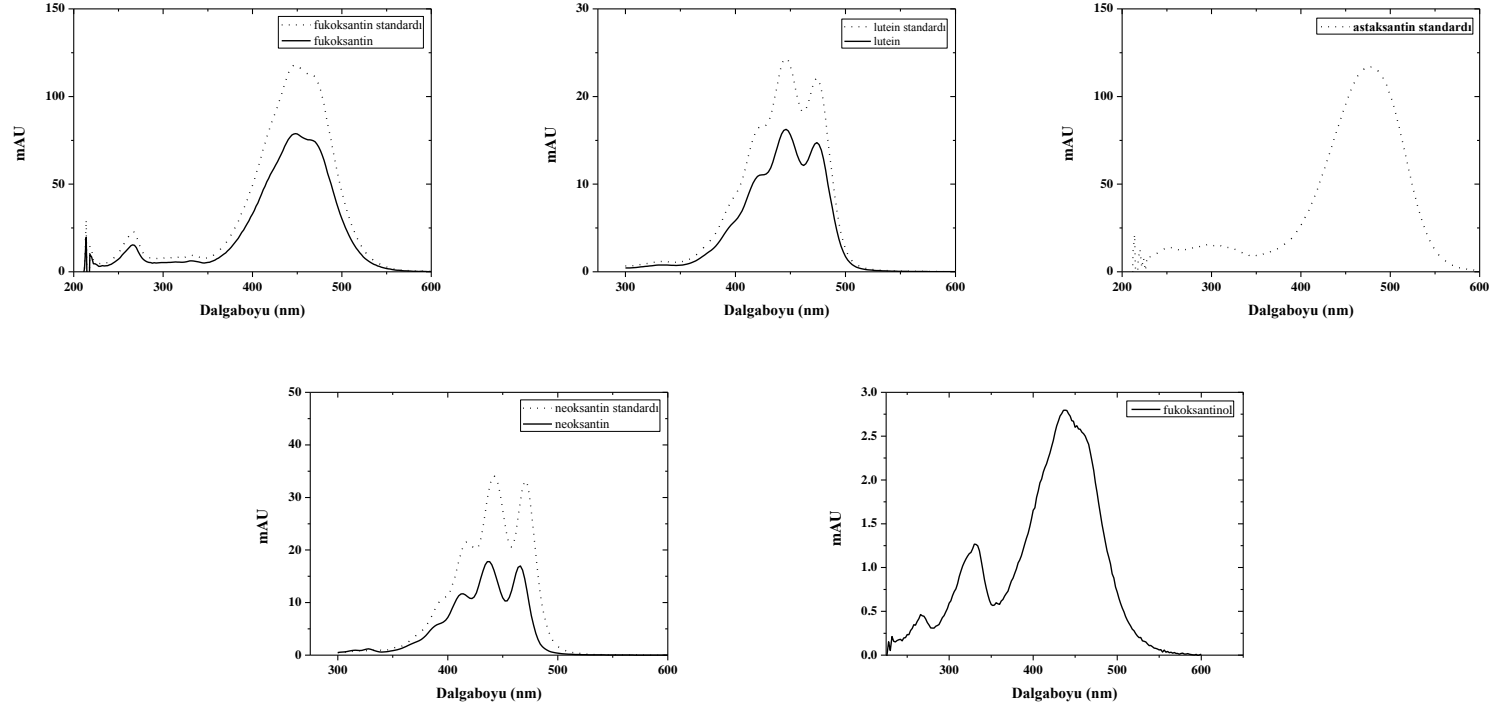
Şekil 3.7. *Nitzschia sp.*'nin HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı (izokratik yöntem, 450 nm, 1 mL/min akış hızı, 25°C kolon sıcaklığı) (1) klorofil b (2) fucoxanthin, (3) fukoksantinol (4) neoksantin, (5) astaksantin



Şekil 3.8. *Prochlorococcus sp.*'den ekstrakte edilen karotenoidlere ve mevcut standartlarına ait absorpsiyon spektrumları



Şekil 3.9. *Scenedesmus protuberans*'dan ekstrakte edilen karotenoidlere ve mevcut standartlarına ait absorpsiyon spektrumları



Şekil 3.10. *Nitzschia sp.*'den ekstrakte edilen karotenoidlere ve mevcut standartlarına ait absorbans spektrumları

Tablo 3.1. *Prochlorococcus sp.*'deki karotenoidlerin deneme niteliğinde tanımlanması

Pik no	Madde	λ (literatür)*			λ (gözlenen)			λ (standartlar)		
1	Klorofil b	452			453					
2	Neoksantin	418	442	471	418	440	471	418	440	471
3	Violaksantin	419	440	470	417	440	470	418	440	470
4	9-or 9'-cis-violaksantin	414	436	464	418	440	470			
5	Lutein	422	445	474	423	446	474	424	446	474
6	9-or 9'-cis-lutein	420	442	470	418	440	470			
7	**İç standart	458			456			456		
8	α -karoten	423	444	473	423	446	474	423	446	474
9	β -karoten	428	450	478	452 478			452 478		
10	9- or 9'-cis-karoten	422	448	474	423	446	474	423	446	474

* Britton 2004

** trans-beta-apo-8'-karotenol

Dalgaboyu (λ) nm cinsinden verilmiştir.

Tablo 3.2. *Scenedesmus protuberans*'daki karotenoidlerin deneme niteliğinde tanımlanması

Pik no	Madde	λ (literatür)*			λ (gözlenen)			λ (standartlar)		
1	Loroksantin	446 474			446 474					
2	Violaksantin	419	440	470	417	440	470	418	440	470
3	9-or 9'-cis-violaksantin	414	436	464	418	440	470			
4	Lutein	422	445	474	423	446	474	424	446	474
5	9-or 9'-cis-lutein	420	442	470	418	440	470			
6	**İç standart	458			456			456		
7	α -karoten	423	444	473	423	446	474	423	446	474
8	β -karoten	428	450	478	452 478			452 478		
9	9- or 9'-cis-karoten	422	448	474	423	446	474	423	446	474

* Britton 2004

** trans-beta-apo-8'-karotenol

Dalgaboyu (λ) nm cinsinden verilmiştir.

Tablo 3.3. *Nitzschia sp.*'deki karotenoidlerin deneme niteliğinde tanımlanması

Pik no	Madde	λ (literatür)			λ (gözlenen)			λ (standartlar)		
1	Klorofil b	452			453					
2	Fucoxanthin	420	444	467	418	446	467	418	446	467
3	Fukoksantinol	452			438 452			438 452		
4	***İç standart	478			478			478		
5	Neoksantin	418	442	471	418	440	471	418	440	471

* Britton 2004

*** astaksantin

Dalgaboyu (λ) nm cinsinden verilmiştir.

3.4. Mikroalglerde Bulunan Karotenoidlerin LC/MS (APCI) ile Analizi

HPLC cihazlarında UV-VIS dedektörleri en sık kullanılan dedektörlerdir. Fakat karotenoidlerin UV-VIS spektrumları, özellikle yapısal olarak birbirine benzeyen karotenoidler için çok büyük benzerlikler gösterir. Bu da karotenoidlerin tanımlanmasında zorluklara neden olur. Bu nedenle başka analitik tekniklerin de kullanılması ve bu verileri desteklemesi gerekir (Su 2002). UV-VIS dedektörü dışında kütle dedektörleri bu anlamda karotenoidlerin molekül kütlesi ve parçalanma biçimleri hakkında oldukça önemli bilgiler verir.

Karotenoidlerin kütle analizi için kullanılan elektron iyonizasyon (EI), hızlı atom bombardımanı (FAB), matriks yardımcı lazer iyonizasyon (MALDI), elektrosprey (ESI) ve atmosferik basınçlı kimyasal iyonlaştırmalı iyonizasyon (APCI) gibi çeşitli iyonlaştırma teknikleri vardır. İçlerinden APCI tekniği karotenoid analizinde oldukça hassas sonuçlar verdiği için öne çıkar (Rivera 2011, Hao 2005). Bu teknik sadece ksantofilleri değil aynı zamanda karotenleri ve karotenoid esterlerini de iyonlaştırmak için oldukça uygundur (Rezanka 2009, Kurz 2008 ve Weller 2003).

Bazı iyonlar karotenoidlerin yapısı hakkında oldukça önemli bilgiler verir. Mesela, $[M-106]^+$, $[M-106]^+$ ve $[M+H-106]^+$ uzun konjuge bağlı zincirde ksilen molekülünün ayrılması ile elde edilir. Ayrıca, eğer bir karotenoid hidroksil grubu içeriyorsa yine karakteristik olarak $[M-17]^+$ ya da $[M+H-18]^+$ iyonlarının varlığı bunun ispatıdır. Bazı karotenoidler aynı parçalanma iyonlarını verse bile bunların iyon şiddetinin, yapıları ayırmada kullanılabileceği bildirilmiştir.

Tablo 3.4. *Prochlorococcus sp.* ekstraktına ait LC-MS-APCI (pozitif mod) değerleri

Pik No	Karotenoid	m/z (gözlenen)	m/z (literatür)*
2	Neoksantin	601.5 [M+H] ⁺ , 583.5 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 565.4 [M+H-2H ₂ O] ⁺	600 [M] ⁺ , 582 [M-H ₂ O] ⁺ , 564 [M-2H ₂ O] ⁺
3	Violaksantin	601.5 [M+H] ⁺ , 583.5 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 509.4 [M+H-92] ⁺	600 [M] ⁺ , 582 [M-H ₂ O] ⁺ , 508 [M-92] ⁺
4	9-or-9'-cis-violaksantin	601.5 [M+H] ⁺	600 [M] ⁺
5	Lutein	569.5 [M+H] ⁺ , 551.5 [M+H-H ₂ O] ⁺	568 [M] ⁺ , 550 [M-H ₂ O] ⁺
6	9-or 9'-cis-lutein	569.5 [M+H] ⁺	568 [M] ⁺
8	α-karoten	537.4 [M+H] ⁺ , 519.4 [M+H-H ₂ O] ⁺	536 [M] ⁺ , 518 [M-H ₂ O] ⁺
9	β-karoten	537.4 [M+H] ⁺ , 519.4 [M+H-H ₂ O] ⁺	536 [M] ⁺ , 518 [M-H ₂ O] ⁺
10	9-or 9'-cis-β-karoten	537.4 [M+H] ⁺ , 519.4 [M+H-H ₂ O] ⁺	536 [M] ⁺ , 518 [M-H ₂ O] ⁺

* Britton 2004

Tablo 3.5. *Scenedesmus protuberans* ekstraktına ait LC-MS-APCI (pozitif mod) değerleri

Pik No	Karotenoid	m/z (gözlenen)	m/z (literatür)*
1	Loroksantin	585.5 [M+H] ⁺ , 567.4 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 549.5 [M+H-2H ₂ O] ⁺	584 [M] ⁺ , 566 [M-H ₂ O] ⁺ , 548 [M-2H ₂ O] ⁺
2	Violaksantin	601.5 [M+H] ⁺ , 583.5 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 509.4 [M+H-92] ⁺	600 [M] ⁺ , 582 [M-H ₂ O] ⁺ , 508 [M-92] ⁺
3	9-or-9'-cis-violaksantin	601.5 [M+H] ⁺	600 [M] ⁺
4	Lutein	569.5 [M+H] ⁺ , 551.5 [M+H-H ₂ O] ⁺	569 [M] ⁺ , 550 [M-H ₂ O] ⁺
5	9-or 9'-cis-lutein	569.5 [M+H] ⁺	568 [M] ⁺
7	α-karoten	537.4 [M+H] ⁺ , 519.4 [M+H-H ₂ O] ⁺	536 [M] ⁺ , 518 [M-H ₂ O] ⁺
8	β-karoten	537.4 [M+H] ⁺ , 519.4 [M+H-H ₂ O] ⁺	536 [M] ⁺ , 518 [M-H ₂ O] ⁺
9	9-or 9'-cis-β-karoten	537.4 [M+H] ⁺ , 519.4 [M+H-H ₂ O] ⁺	536 [M] ⁺ , 518 [M-H ₂ O] ⁺

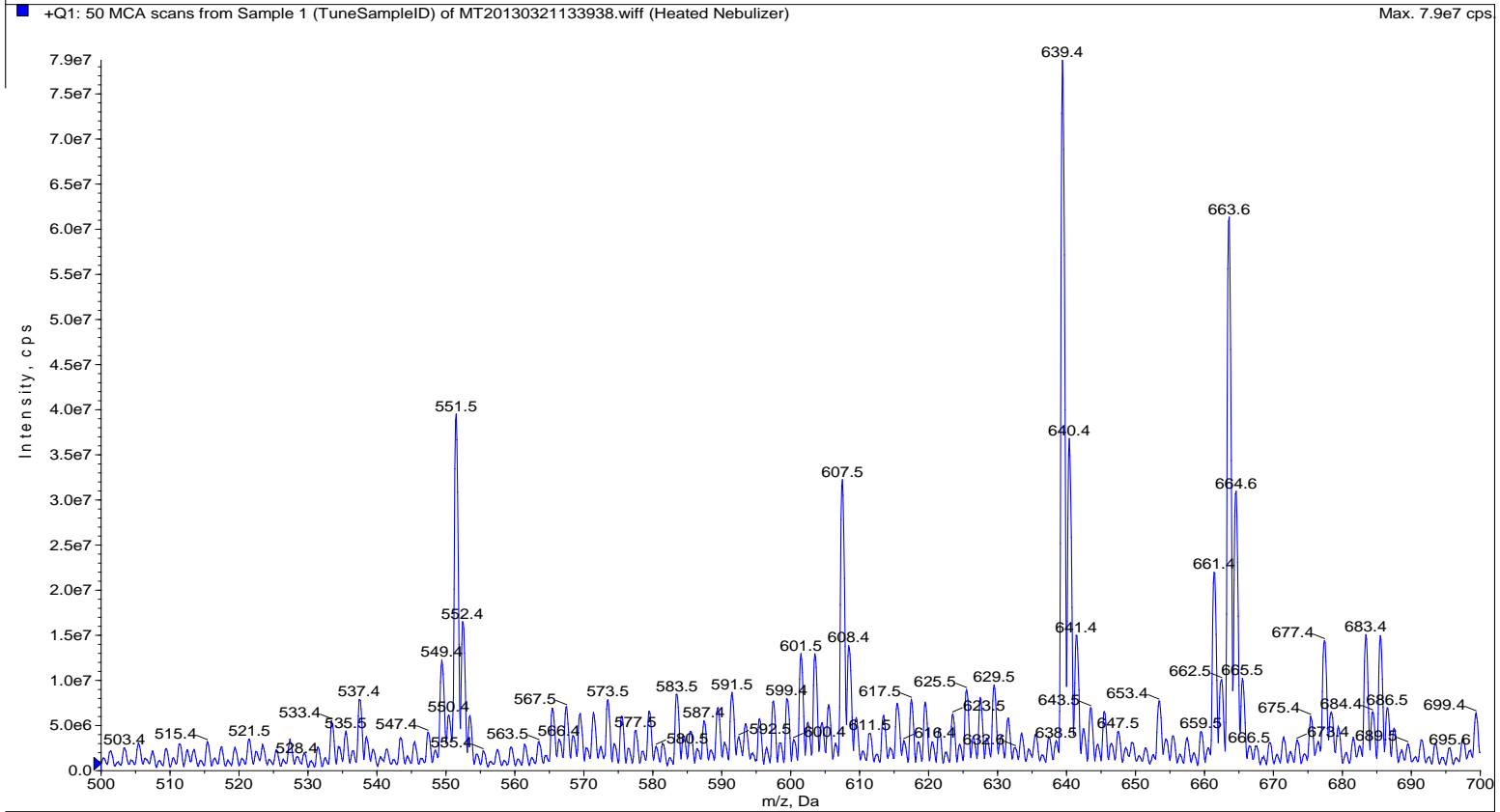
* Britton 2004

Tablo 3.6. *Nitzschia sp.* ekstraktına ait LC-MS-APCI (pozitif mod) değerleri

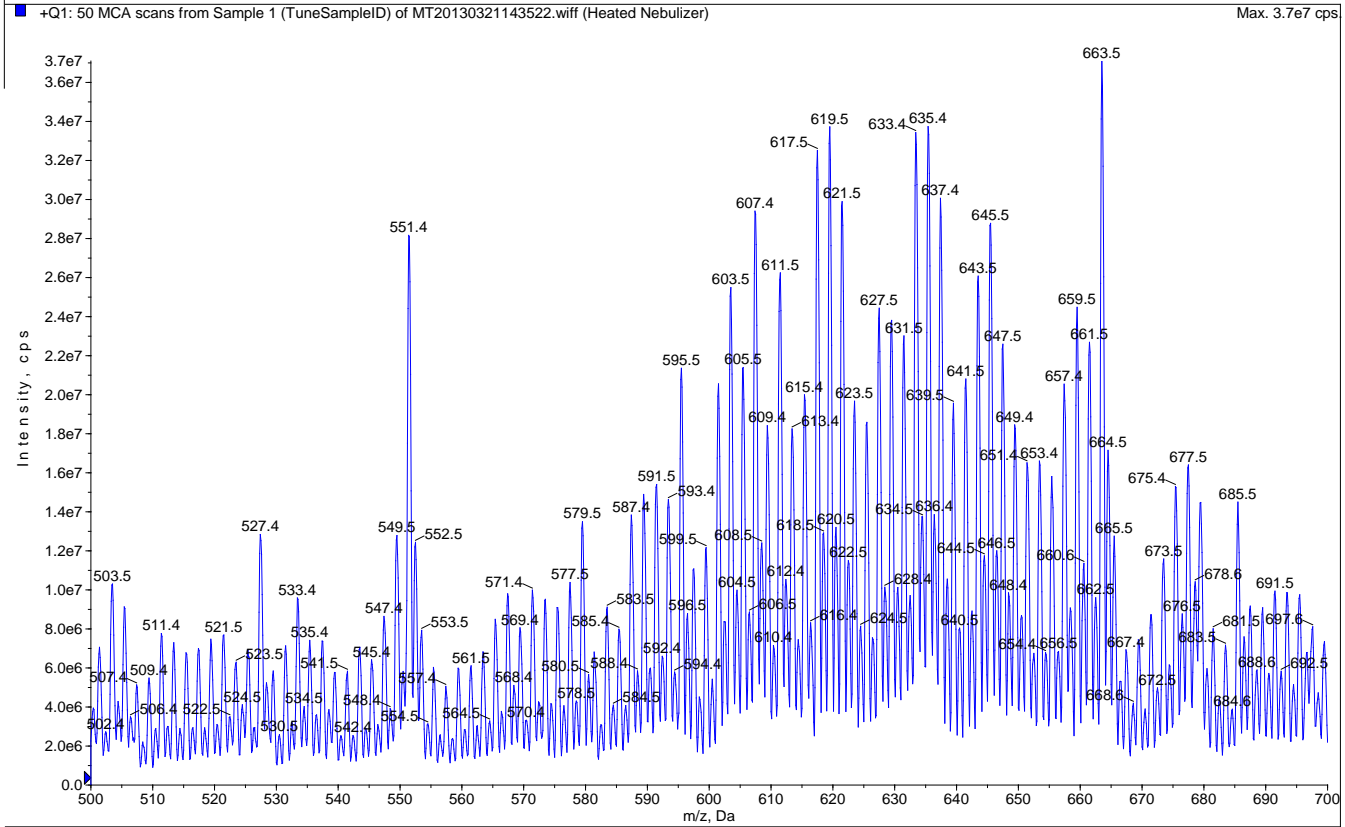
Pik No	Karotenoid	m/z (gözlenen)	m/z (literatür)*
2	Fucoxanthin	658.7 [M+H] ⁺ , 640.7 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 622.8 [M+H-2H ₂ O] ⁺	658 [M] ⁺ , 640 [M-H ₂ O] ⁺ , 622 [M-2H ₂ O] ⁺
3	Fukoksantinol	617.6 [M+H] ⁺ , 599.6 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 581.8 [M+H-2H ₂ O] ⁺	616 [M] ⁺ , 598 [M-H ₂ O] ⁺ , 580 [M-2H ₂ O] ⁺
4	Neoksantin	601.6 [M+H] ⁺ , 583.5 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 565.5 [M+H-2H ₂ O] ⁺	600 [M] ⁺ , 582 [M-H ₂ O] ⁺ , 564 [M-2H ₂ O] ⁺

* Britton 2004

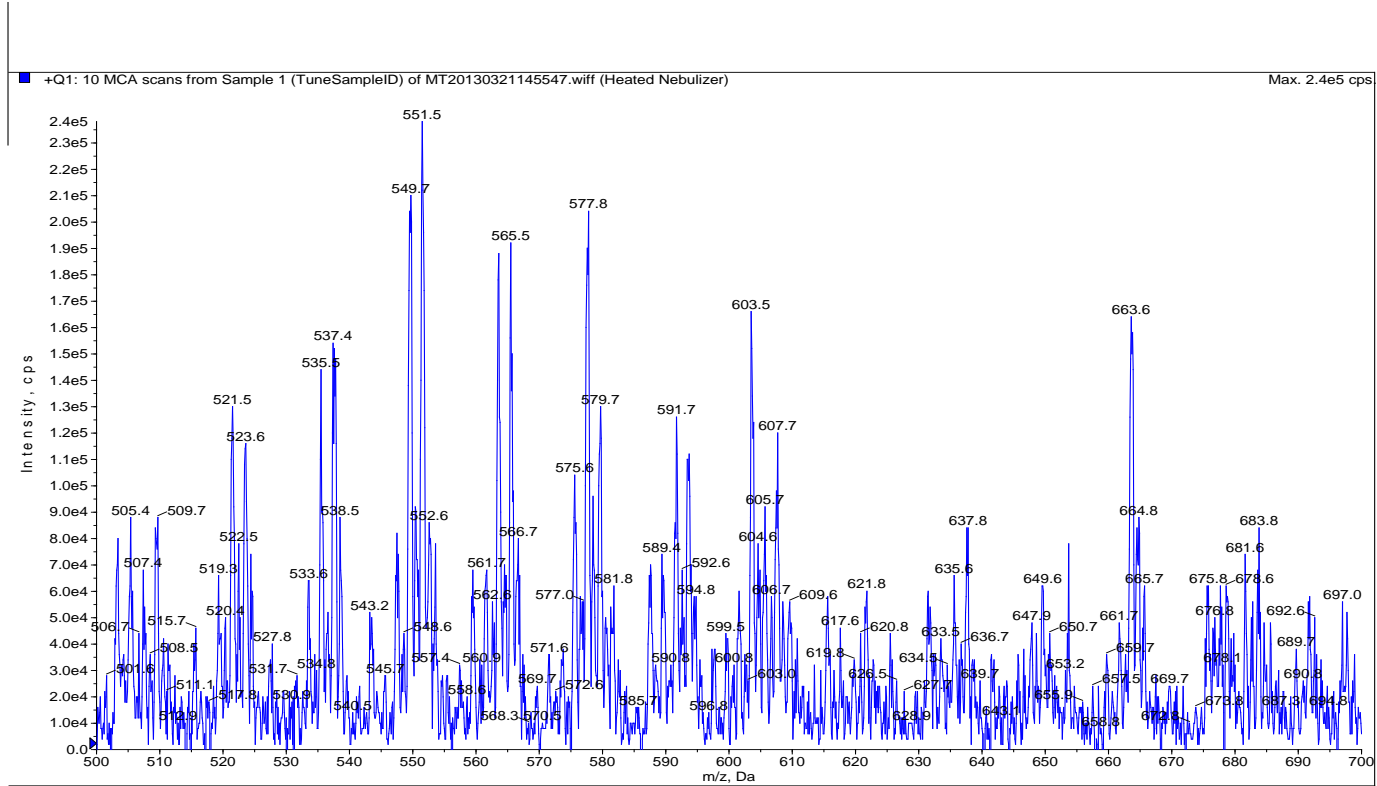
Bu çalışmada, öncelikle DAD dedektöründen elde edilen veriler ile mikroalg ekstraktlarına ait ktle spektrumlarından (şekil 3.11, 3.12 ve 3.13) elde edilen ktle değerleri de kullanarak olası karotenoidler saptanmış ve bu karotenoidlerin standartları satın alınmıştır. Mikroalgelere ait (*Prochlorococcus sp*, *Scenedesmus protuberans* ve *Nitzschia sp.*) LC-MS-APCI (pozitif mod) verileri (sırasıyla Tablo 3.4, 3.5 ve 3.6) literatür değerleriyle karşılaştırılmıştır. Ancak, bazı cis-karotenoidlerin standartları bulunmadığından dolayı bunlar için sadece deneme niteliğinde literatür değerleri kullanarak tanımlama yapılmıştır. Son olarak, mikroalglerin analizi için geliştirilen yöntemlere ait validasyon ve sistem uygunluk parametre değerleri yeşil mikroalgler için Tablo 3.7 ve 3.8, kahverengi mikroalge ait değerler ise Tablo 3.9'da özetlenmiştir.



Şekil 3.11. *Prochlorococcus sp.* ekstraktından elde edilen kütle spektrumu



Şekil 3.12. *Scenedesmus protuberans* ekstraktından elde edilen kütle spektrumu



Şekil 3.13. *Nitzschia sp.* ekstraktından elde edilen kütle spektrumu

Tablo 3.7. *Prochlorococcus sp.*'de bulunan karotenoidleri ayırmak için önerilen LC yönteminin sistem uygunluğu testleri ve validasyon parametreleri (gradyent yöntem: 70:25:5 MeOH:MTBE:H₂O, 450 nm, akış hızı:1.0 mL/dak)

Karotenoidler	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r^2	Regreyon denklemleri	Peak saflığı (%)	Kapasite faktörü (k')	Seçicilik faktörü (α)	Miktar (mg/g)
Neoksantin	0.0106	0.035	0.9997	$y=221.5x-103.67$	99.3	1.43	1.87	0.45
Violaksantin	0.0136	0.045	0.9998	$y=128x-59.33$	98.9	1.60	1.12	1.39
9-or 9'-cis-violaksantin		standart madde mevcut değil			97.5	2.10	1.31	TE
Lutein	0.0032	0.011	0.9998	$y=301.94x-26.27$	99.5	3.11	1.49	2.54
9-or 9'-cis-lutein		standart madde mevcut değil			97.5	3.91	1.27	TE
α -karoten	0.0194	0.064	0.9997	$y=696x-333.67$	98.6	5.67	1.27	0.24
β -karoten	0.0221	0.073	0.9995	$y=402.5x-194$	99.1	5.99	1.06	0.3
9- or 9'-cis-karoten	0.0297	0.098	0.9995	$y=298.5x-144.33$	97.6	6.25	1.04	0.13

TE: Tayin edilemedi

Tablo 3.8. *Scenedesmus protuberans*'ta bulunan karotenoidleri ayırmak için önerilen LC yönteminin sistem uygunluğu testleri ve validasyon parametreleri (gradyent yöntem: 70:25:5 MeOH:MTBE:H₂O, 450 nm, akış hızı:1.0 mL/dak)

Karotenoidler	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r^2	Regreyon denklemleri	Peak saflığı (%)	Kapasite faktörü (k')	Seçicilik faktörü (α)	Miktar (mg/g)
Loroksantin		standart madde mevcut değil			98.9	1.43	1.00	TE
Violaksantin	0.0136	0.045	0.9998	$y=128x-59.33$	98.7	1.59	1.11	1.47
9-or 9'-cis-violaksantin		standart madde mevcut değil			97.6	2.15	1.21	TE
Lutein	0.0032	0.011	0.9998	$y=301.94x-26.27$	99.5	3.15	1.47	2.45
9-or 9'-cis-lutein		standart madde mevcut değil			97.4	3.97	1.26	TE
α -karoten	0.0194	0.064	0.9997	$y=696x-333.67$	98.6	5.68	1.27	0.093
β -karoten	0.0221	0.073	0.9995	$y=402.5x-194$	99.2	6.05	1.08	0.55
9- or 9'-cis-karoten	0.0297	0.098	0.9995	$y=298.5x-144.33$	97.4	6.25	1.03	0.19

TE: Tayin edilemedi

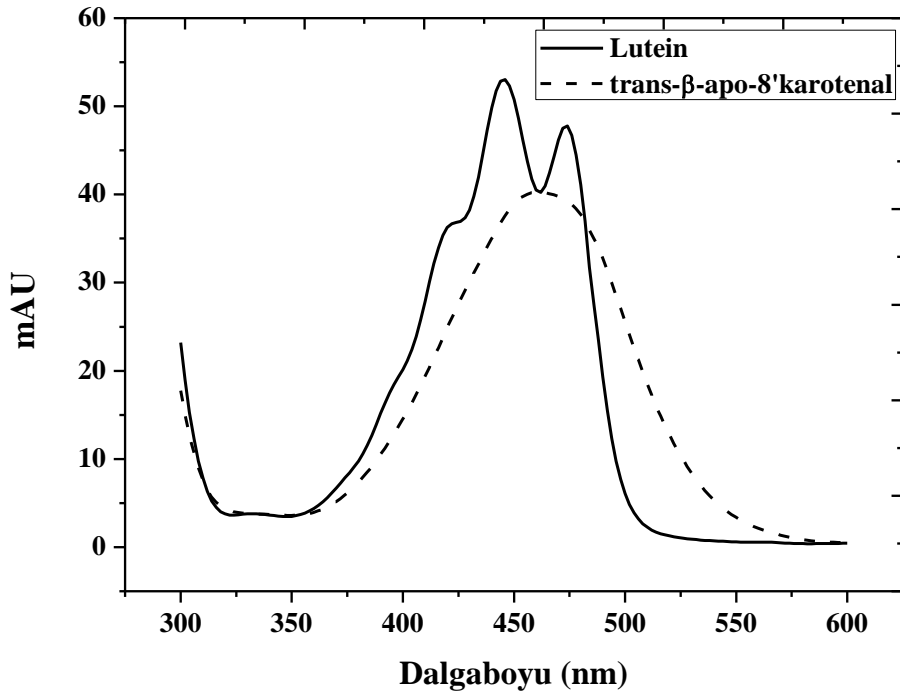
Tablo 3.9. *Nitzschia sp.*'de bulunan karotenoidleri ayırmak için önerilen LC yönteminin sistem uygunluğu testleri ve validasyon parametreleri (isokratik yöntem: 70:30-MeOH:ACN, 450 nm, akış hızı:1.0 mL/dak)

Karotenoidler	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r^2	Regreyon denklemleri	Peak saflığı (%)	Kapasite faktörü (k')	Seçicilik faktörü (α)	Miktar (mg/g)
Fucoxanthin	0.0017	0.0056	0.9998	$y=181.02x+29.54$	99.8	2.75	2.65	6.58
Fukoksantinol		standart madde mevcut değil			96.1	2.90	1.05	TE
Neoksantin	0.0185	0.061	0.9995	$y=234.5x+56.12$	97.5	4.38	1.59	0.94

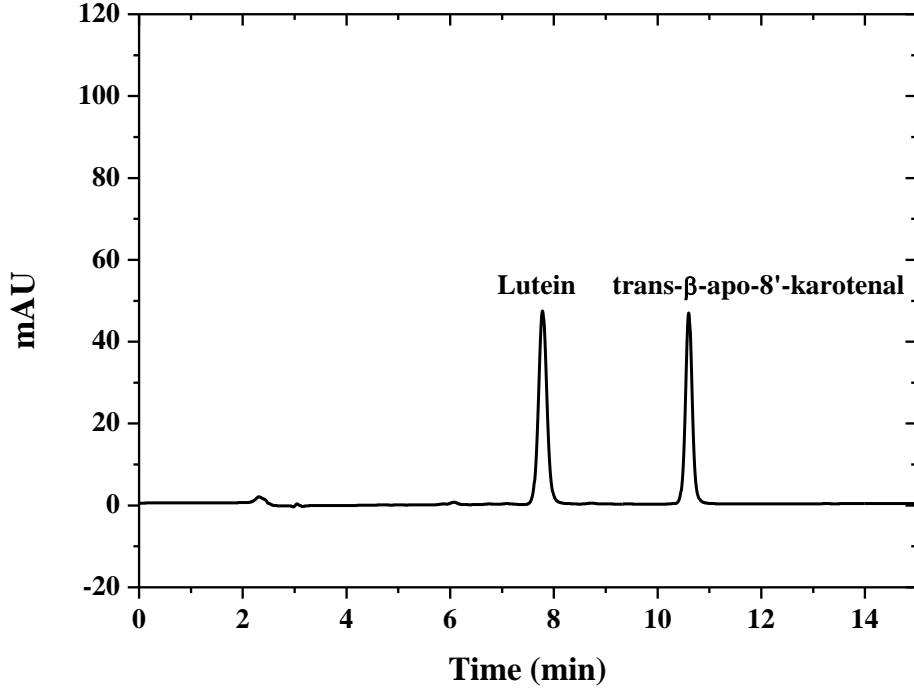
TE: Tayin edilemedi

3.5. Yeşil Mikroalglerden Lutein Ekstraksiyonu İçin Uygun Koşulların Belirlenmesi

Mikroalgler yapısal olarak birbirinden tamamen farklı olduklarından içerdikleri maddelerin de farklı olması ya da en azından bu maddelerin miktarının aynı olmaması beklenir. Her bir tür yeni bir malzeme olarak değerlendirilmelidir. Bu nedenle, bir malzemedeki spesifik bir madde ekstrakte edilecek ise o maddeyi en yüksek miktarda almak için bazı koşulların optimize edilmesi gerekir. Şekil 3.14'de lutein ve analizinde kullanılan iç standarda ait absorptans spektrumları görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre luteinin maksimum absorptans verdiği dalgaboyu 446.0 nm olarak belirlenmiştir. Bu nedenle lutein tayini için tüm analizler bu dalgaboyunda gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.15'de ise bu dalgaboyunda lutein standardı ve iç standarda ait HPLC kromatogramı bulunmaktadır.



Şekil 3.14. Lutein ve trans-β-apo-8'-karotenale (iç standart) ait absorptans spektrumu



Şekil 3.15. Lutein ve trans-beta-apo-8'-karotenale (iç standart) ait HPLC kromatogramı (gradient yöntem, 450 nm, 1 mL/min akış hızı, 25°C kolon sıcaklığı)

3.5.1. Çözgen Bileşiminin Lutein Ekstraksiyonuna Olan Etkisi

Literatürde karotenoidlerin ekstraksiyonu için kullanılan çok sayıda çözgen bulunmaktadır. Bu çözgenler tek başlarına kullanılabileceği gibi ikili, üçlü ve bazen dördü karışım halinde de olabilmektedir. Karotenoidlerin ekstraksiyonu için genelde tetrahidrofuran, diklorometan, metanol, etanol, aseton, hekzan ve bunların farklı bileşimleri kullanılmaktadır (Prasad 2011, Dias 2010, Wang 2010). Çözgen seçimi daha çok ekstraksiyonu yapılacak olan malzemenin yapısına ve karotenoid bileşimine göre değişir (Britton 1995). Uygun çözgen seçilmesi durumu istenilen maddenin etkin bir şekilde ekstrakte edilmesini sağlar. Bu nedenle, çalışmada kullanılan yeşil mikroalglerden en yüksek miktarda lutein elde etmek amacıyla farklı bileşenli çözgen sistemleri denenmiştir.

Yapılan ön denemelerde çözümler öncelikle tek başlarına kullanılmış ve yeterli ayırma yetkinliği elde edilememiştir. Bu nedenle en iyi sonuç verenler ikili çözümler bileşimi olarak yeniden denenmiştir.

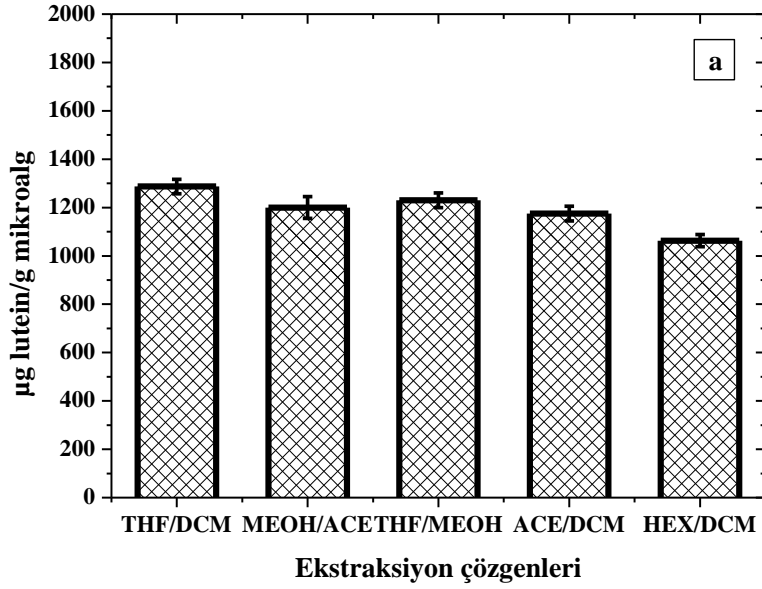
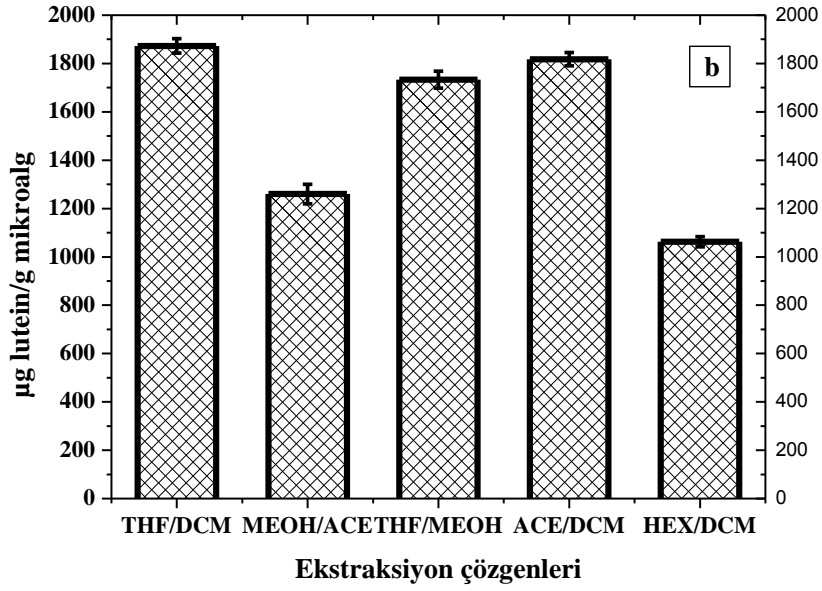
Şekil 3.16, yeşil mikroalglerden luteinin (1:1) THF/DCM (tetrahidrofuran/diklorometan), MEOH/ACE (metanol/aseton), THF/MEOH (tetrahydrofurane/metanol), ACE/DCM (aseton/diklorometan) ve HEX/DCM (hekzan/diklorometan) gibi farklı çözümler bileşimleri ile olan ekstraksiyonuna ait sonuçları göstermektedir. Belirtilen koşullarda yapılan deney sonuçlarına göre, en uygun çözümler bileşimi THF/DCM olarak bulunmuştur. Bunun, luteinin her iki çözümlerde olan yüksek çözünürlüğünden kaynaklandığı düşünülmektedir (Craft and Soares 1992). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise bu çözümler bileşimi kullanılmıştır.

3.5.2. Sabunlaştırma Süresinin Lutein Ekstraksiyonuna Etkisi

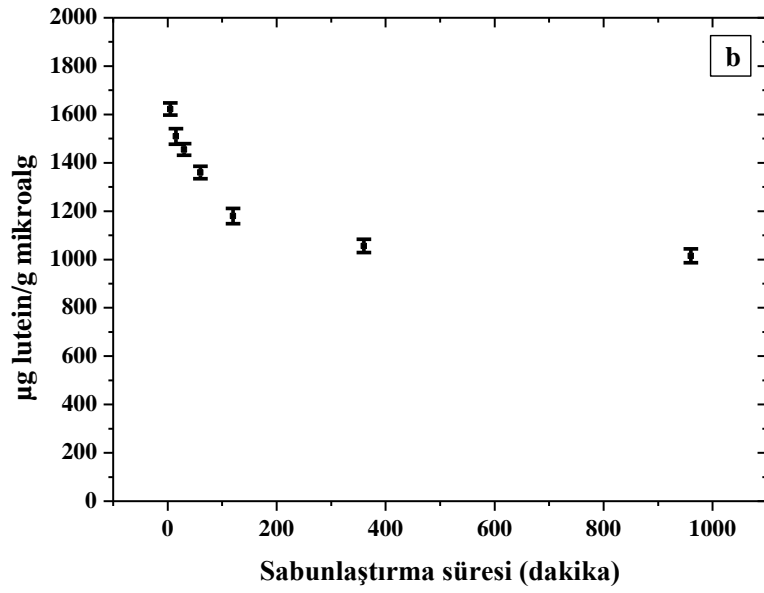
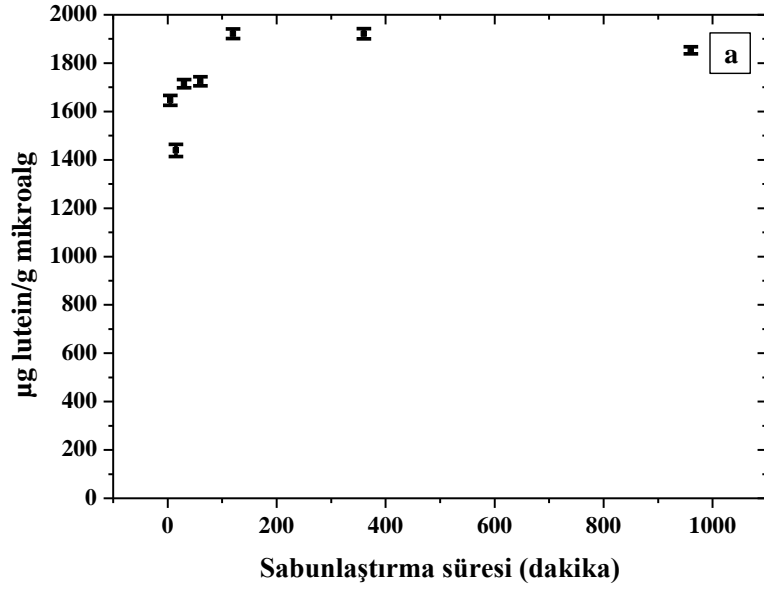
Sabunlaştırma işleminin en önemli amacı ortamda bulunan yağlar ve klorofilleri uzaklaştırmasıdır. Aynı zamanda mevcut karotenoid esterlerini de serbest hale getiren bu işlem, ayırımı ve analizi de kolaylaştırır (Britton 1995a, Bechtold ve Mussak 2009).

Mikroalglerin yapıları farklı olduğundan, içerdikleri yağlar, klorofiller ve karotenoid esterleri de farklı olacaktır. Bu nedenle sabunlaştırma işlemi her bir örnek için optimize edilmelidir. Şekil 3.17 bu çalışmada kullanılan yeşil mikroalglerin lutein ekstraksiyonu için yapılan sabunlaştırma işlemine ait deney sonuçlarını göstermektedir. Elde edilen verilerden her iki mikroalgde bulunan serbest ya da bağlı karotenoidlerin farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlara göre *Prochlorococcus sp.*'de bulunan lutein büyük ihtimalle serbest haldedir. Çünkü bu mikroalg için 5 dakika gibi kısa bir süre sabunlaştırma işlemi için yeterli olmuştur. Uzayan sürelerde lutein miktarındaki azalma luteinin bozunmuş olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan *Scenedesmus protuberans*'dan en yüksek verimle lutein elde etmek için 2 saatlik bir sabunlaştırma süresi gerekmektedir. Bu bilgi, *Scenedesmus protuberans*'da bulunan luteinin daha çok ester formunda olduğunun işareti olabilir.

a



Şekil 3.16. İkili çözen bileşiminin lutein ekstraksiyonuna etkisi (a) *Prochlorococcus sp.* (b) *Scenedesmus protuberans*. Deney koşulları : 0.25 g mikroalg, 10.0 mL çözen, 10.0 dakika ekstraksiyon x 3, 16.0 saat sabunlaştırma, 25 °C.



Şekil 3.17. Sabunlaştırma süresinin lutein ekstraksiyonuna etkisi (a) *Prochlorococcus sp.*(b)*Scenedesmus protuberans*. Deney koşulları : 0.25 g mikroalg, 10.0 mL THF/DCM çözgen, 10.0 dakika ekstraksiyon x 3, 25 °C.

3.5.3. Ekstraksiyon Süresinin Lutein Eldesine Etkisi

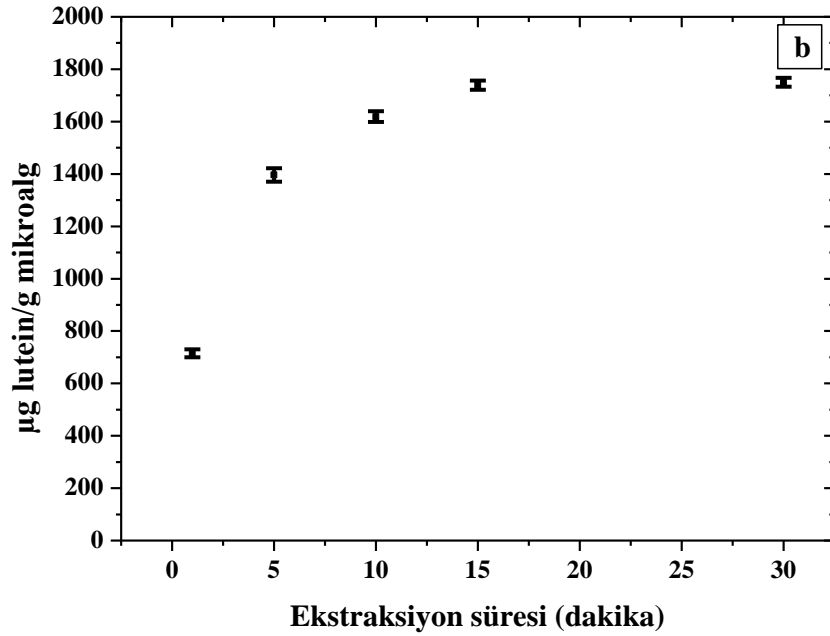
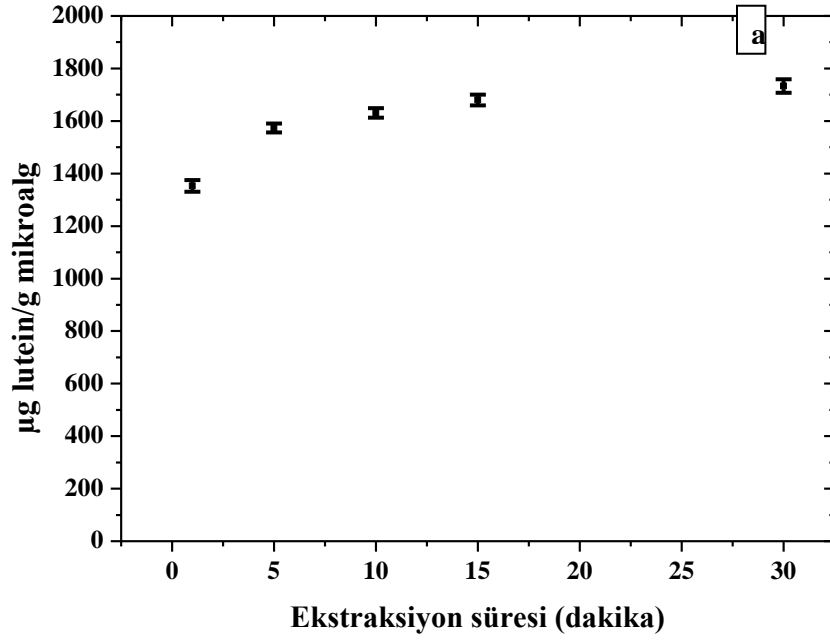
Katı sıvı ekstraksiyonlarında sırasıyla beş önemli adımın etkili olduğu düşünülür: (i) çözünenin katı yüzeyine temas etmesi; (ii) çözünenin gözenekli yapıya nüfuz etmesi; (iii) istenen maddenin çözünen tarafından çözünmesi; (iv) maddenin katı yüzeyine difüzyonu; ve (v) çözünen maddenin tüm çözünele transferi. Bu basamakların her biri ekstraksiyon süresini etkileyen ya da sınırlayan bileşenler olarak düşünülebilir. İstenen maddenin çözünele çözünmesi için ekstraksiyon süresinin mutlaka araştırılması gerekir (Strati ve Oreopoulou 2011). Bu amaçla 25.0°C'de THF/DCM kullanılarak mikroalglerden lutein elde edilmesinde ekstraksiyon süresinin etkisi irdelenmiştir. Şekil 3.18'de görüldüğü gibi, lutein ekstraksiyonu zamana bağlı olarak değişmektedir. İlk dakikalarda artan lutein miktarı daha sonra dengeye ulaşarak sabitlenmektedir. Her iki mikroalg için de 15.0 dakikalık ekstraksiyon süresi yeterli görünmektedir. Zaten 30 dakikanın üzerine çıkan ultrasonik ekstraksiyonda sıcaklık kontrolü yeterli olmadığından, 15 dakikalık sürenin uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

3.5.4. Sıcaklığın Lutein Ekstraksiyonuna Etkisi

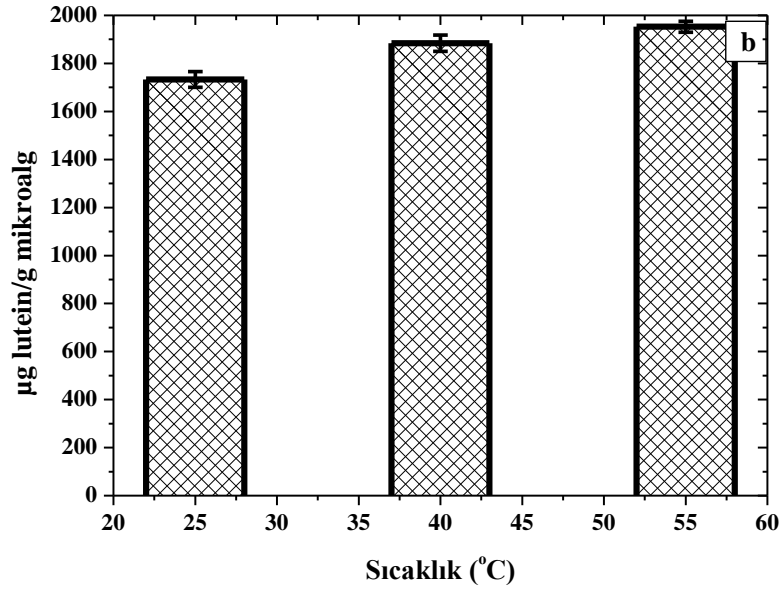
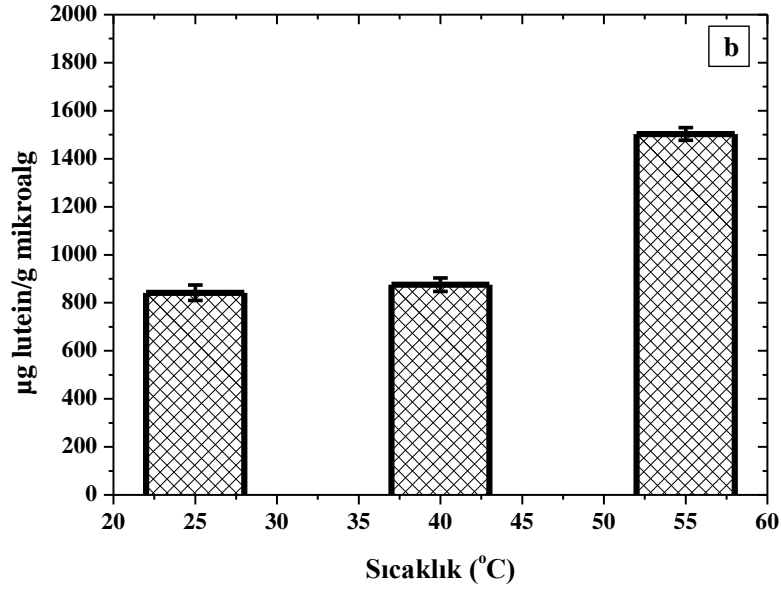
Genelde, çok yüksek olmayan sıcaklıkların ekstraksiyon üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu düşünülür. Sıcaklık belirli bir artıştan sonra istenilen maddelerin bozunmasına neden olabilir. Ekstraksiyon sıcaklığının seçiminde göz önünde bulundurulması gereken en önemli unsur, kullanılan çözünenlerin kaynama sıcaklıklarıdır. Ayrıca, karotenoidlerde bozunma ve izomerleşme meydana geldiğinden yüksek sıcaklıklara çıkılmamış, 25, 40 ve 55 °C'de denemeler yapılmıştır. Her iki mikroalg için elde edilen sonuçlar Şekil 3.19'da verilmektedir. Seçilen sıcaklık aralığına göre karotenoidlerde herhangi bir bozunma olduğu düşünülmektedir. Sonuçlar sıcaklık arttığı zaman her iki mikroalgte bulunan luteinin miktarında az da olsa bir artış meydana geldiğini göstermiştir. Ancak bu artış *Prochlorococcus sp.* için daha barizdir. Bunun, mikroalgın ultrasonik ekstraksiyon sırasında sıcaklık artışıyla beraber hücre duvarının parçalanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Büyük ihtimalle, hücre duvarı yırtılmış ve böylece tüm pigmentler çözünele kolaylıkla çözünebilmiştir.

3.5.5. Ekstraksiyon Sayısının Lutein Eldesine Etkisi

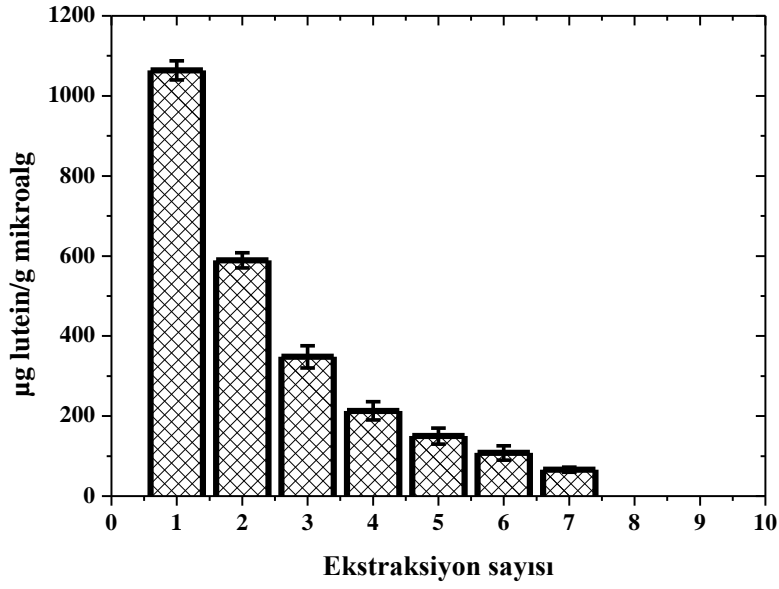
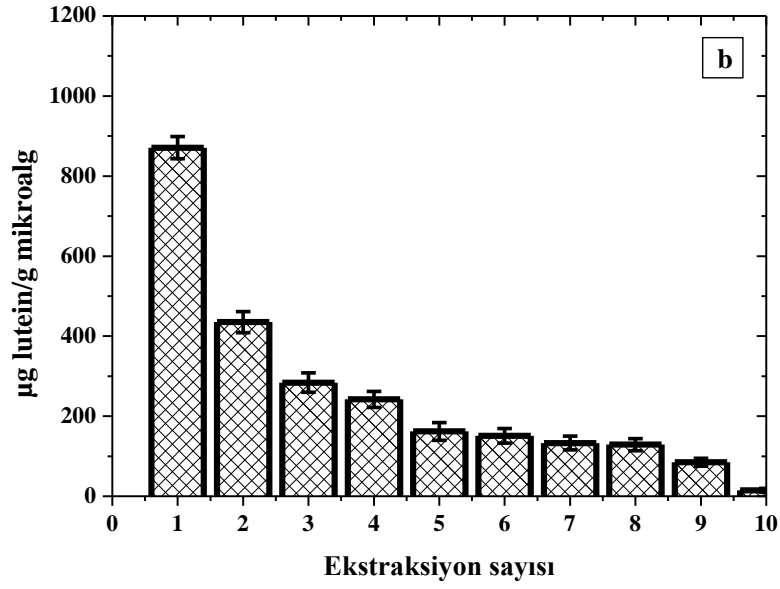
Luteinin tamamını ekstrakte edebilmek amacıyla renk görülmeyene dek ekstraksiyon işlemi sürdürülmüştür. Bu nedenle her bir mikroalg için on kez ekstraksiyon yapılmıştır. Şekil 3.20'de görüldüğü üzere ekstraksiyon sayısı oldukça önemlidir. Sonuçlara göre *Scenedesmus protuberans*'tan yedinci ekstraksiyon sonunda artık lutein elde edilemezken *Prochlorococcus sp.* için durum farklıdır. Hücrelerin parçalanıp parçalanmadığını kontrol etmek amacıyla optik mikroskop ile incelemeler yapılmıştır. Yapılan gözlemlerde *Scenedesmus protuberans*'ın tamamen parçalandığı ancak *Prochlorococcus sp.* hücrelerinin hala sağlam olduğu görülmüştür. Ancak ekstraksiyon öncesindeki incelemelerle kıyaslandığında *Prochlorococcus sp* hücrelerinde boşalma ve rengin önemli ölçüde azaldığı da gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında yeşil mikroalglerin ekstraksiyon grafikleri daha iyi anlaşılabilir.



Şekil 3.18. Ekstraksiyon süresinin lutein eldesine etkisi (a) *Prochlorococcus sp.* (b) *Scenedesmus protuberans*. Deney koşulları : 0.25 g mikroalg, 10.0 mL THF/DCM, 15.0 dakika ekstraksiyon x 3, 25°C (*Prochlorococcus sp.* için 5.0 dakika ve *Scenedesmus protuberans* için 2.0 saat sabunlaştırma)



Şekil 3.19. Sıcaklığın lutein ekstraksiyonuna etkisi (a) *Prochlorococcus sp.* (b) *Scenedesmus protuberans*. Deney koşulları: 0.25 g mikroalg, 10.0 mL THF/DCM, 15.0 dakika ekstraksiyon x 3 (*Prochlorococcus sp.* için 5.0 dakika ve *Scenedesmus protuberans* için 2.0 saat sabunlaştırma)



Şekil 3.20. Ekstraksiyon sayısının lutein eldesine etkisi (a) *Prochlorococcus sp.* (b) *Scenedesmus protuberans*. Deney koşulları : 0.25 g mikroalg, 10.0 mL THF/DCM, 15.0 dakika ekstraksiyon, 25°C (*Prochlorococcus sp.* için 5.0 dakika ve *Scenedesmus protuberans* için 2.0 saat sabunlaştırma)

3.6. Metot Validasyonu

Literatürde yer alan çalışmalar, karotenoidlere ait çok az sayıda standart ya da sertifikalı referans madde olduğunu göstermektedir. Bunların birçoğu kullanılan malzemenin yapısı ve içeriği bakımından kısıtlı olduğundan gerçek örneği çok iyi temsil etmemektedir (Kimura 2007, Dias 2008). Ayrıca bazıları artık ticari olarak üretilmemektedir. Bitkilerin yapısı mikroalglerle benzer olduğundan mikroalglerden karotenoid elde edilmesine yönelik yöntemlerin validasyonu için karışık sebze ekstraktı olan sertifikalı bir referans madde seçilmiştir (BCR 485, CRM-Mixed Vegetables). Yapılan analizlerin sonuçları Tablo 3.10'da özetlenmiştir. Elde edilen değerler sertifikalı referans maddede bulunan karotenoid miktarı ile oldukça uyumludur.

Tablo 3.10. Mikroalglerdeki karotenoid tayini için sertifikalı referans madde (BCR 485, CRM-Mixed Vegetables) kullanılarak yapılan metot validasyon sonuçları

Karotenoidler	BCR 485 (mg/kg)	Miktar (mg/kg)	
	Referans madde	5 dakikalık sabunlaştırma	2 saatlik sabunlaştırma
Lutein	12.5 ± 0.8	12.5 ± 0.1	12.6 ± 0.2
α-karoten	10.5 ± 0.6	10.5 ± 0.3	10.5 ± 0.5
β-karoten	23.7 ± 1.5	23.7 ± 0.6	23.7 ± 0.9

3.7. Farklı Azot Kaynaklarının Yeşil Mikroalglerde Bulunan Lutein Miktarına Etkisi

Mikroalglerin yetiştirilmesinde nitrat, nitrit, amonyum ve üre gibi çeşitli azot kaynaklarının kullanıldığı bildirilmiştir. Bunların arasında, düşük molekül ağırlıklı ve organik bir molekül olan üre ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) önemli bir yere sahiptir (Becker 2004). Bunun nedeni ürenin aynı zamanda hem N hem de C kaynağı olmasıdır. Literatürde bu özelliği nedeniyle yetiştirilen *S. Platensis*, *Neochloris oleoabundans* ve *Chlorella sp.* gibi çeşitli mikroalgler bulunmaktadır (Li 2008, Becker 2004, Rangel-Yagui 2004, Sánchez-Luna 2004, Soletto 2005, Hsieh ve Wu 2009). Bu çalışmada, benzer şekilde farklı azot kaynakları kullanılarak bunların *Prochlorococcus sp.* ve *Scenedesmus protuberans*'ın büyüme hızına ve ürettiği lutein miktarına olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.11 ve 3.12'de gösterilmektedir.

Azot kaynağı olarak üre kullanıldığında mikroalgler daha çok lutein üretmiştir. Bazı yayınlarda ise mikroalglerin yetiştirilmesinde amonyumun mükemmel bir azot kaynağı olduğu bildirilmiştir (Goldman 1977, Stengel ve Soeder 1975). Diğer yandan, *Chlorella protothecoides* için amonyumun uygun bir azot kaynağı olmadığı ve pH'nın hızlı bir şekilde düşmesinden dolayı hücrelerin öldüğünden bahsedilmiştir. Yeşil mikroalglerde nitrat yerine kullanılan ürenin oldukça olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür (Shi 2000). Fakat üre kullanıldığında hücrelerin büyüme hızında yavaşlama olduğu da bildirilmiştir. Bunun nedeninin, ürenin diğerleri gibi anorganik değil organik bir bileşik olması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu, organik azot kaynağı kullanıldığında mikroalglerdeki biyosentez mekanizmasının farklı olmasından da kaynaklanabilir. Diğer bir neden, ürenin hem azot hem de karbon kaynağı olması olabilir. Azot kaynağı olarak üre kullanıldığında, bu madde, amonyak ve bikarbonata hidrolize olmakta ve mikroalgler yetişirken ortamdaki pH'da çok büyük değişimler meydana gelmemektedir (Perez-Garcia 2011).

Tablo 3.11. Farklı azot kaynakları ile yetiştirilen *Prochlorococcus sp.*'nin büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı

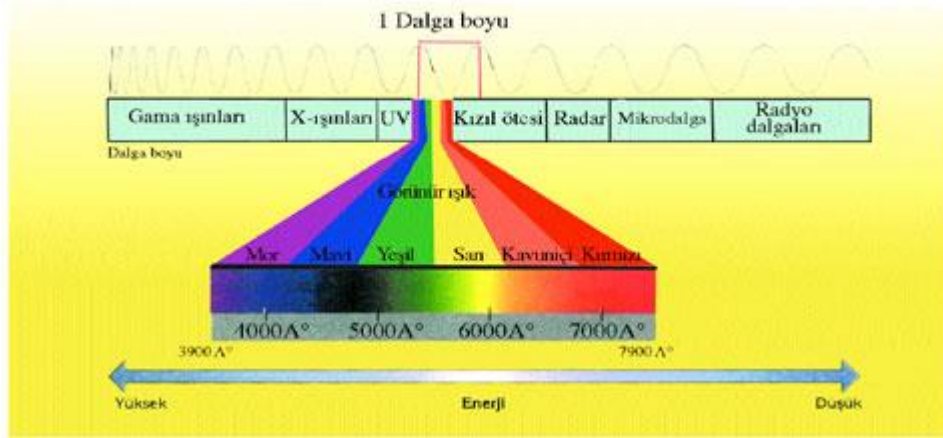
Azot kaynağı	Log faz (gün)	μ_{max} (gün ⁻¹)	Lutein (mg/g)
NaNO ₃	4-8	0.110	2.54 ± 0.13
NaNO ₂	4-8	0.376	1.82 ± 0.10
NH ₄ Cl	3-9	0.262	0.42 ± 0.11
CH ₄ N ₂ O	4-8	0.122	3.31 ± 0.17

Tablo 3.12. Farklı azot kaynakları ile yetiştirilen *Scenedesmus protuberans*'nin büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı

Azot kaynağı	Log faz (gün)	μ_{max} (gün ⁻¹)	Lutein (mg/g)
NaNO ₃	1-30	0.419	2.45 ± 0.16
NaNO ₂	1-30	0.108	2.17 ± 0.20
NH ₄ Cl	1-11	0.173	0.70 ± 0.15
CH ₄ N ₂ O	1-30	0.080	3.86 ± 0.11

3.8. Farklı Işık Kaynaklarının Yeşil Mikroalglerde Bulunan Lutein Miktarına Etkisi

Görünür bölge elektromanyetik spektrumun 380 ve 750 nm arasındaki enerji bölgesini kapsar (Şekil 3.21). Bu bölge mikroalglerde gerçekleşen fotosentetik olaylar için oldukça önemlidir (Kommareddy ve Anderson 2003). Bu bölgedeki enerji sayesinde, mikroalgler fotosentez ile çeşitli organik molekülleri sentezleyebilirler. Fotosentetik organizmaların absorpsiyon enerjileri içerdikleri pigmentlere bağlıdır. Mikroalglerde bulunan başlıca pigmentler klorofiller, fikobilinler ve karotenoidlerdir. Adı geçen pigmentlerin fotonik özellikleri Tablo 3.13'de verilmektedir (Masojidek 2004).



Şekil 3.21. Elektromanyetik spektrum ve görünür bölgedeki ışığın özellikleri

Tablo 3.13. Mikroalglerde bulunan başlıca pigmentlerin fotonik özellikleri
(Kaynak: Masojidek 2004)

Pigment grubu	Renk	Absorpsiyon bantları (nm)	Pigmentler
Klorofiller	Yeşil	450-475 630-675	Hidrofobik Klorofil a Klorofil b Klorofil c ₁ , c ₂ , d
Fikobilinler	Mavi, kırmızı	500-650	Hidrofilik Fikosiyenin Fikoeritrin Allofikosiyenin
Karotenoidler	Sarı, turuncu	400-550	Hidrofobik β-Karoten α-Karoten Lutein Violaksantin Fukoksantin

Bu pigmentlerden en önemlisi klorofil a'dır. Bunlara ek olarak klorofil b, c ve karotenoidler de ayrı bir önem taşır. Klorofil b ve klorofil c'nin görevi ışığı absorplayıp bu enerjiyi klorofil a'ya geçirmektir. Diğer taraftan karotenoidler klorofilin yapısını ve bütünlüğünü korumak amacıyla fazla enerjiyi bertaraf eder. Karotenoidler kırmızı, sarı ve turuncu renklidir; bu renkteki ışığı absorbe etmezler. Bunun yerine bu renklerin tamamlayıcısı olan mor/mavi ve mavi/yeşil bölgede absorpsiyon yaparlar (Kommareddy ve Anderson 2003). Fikobilinler ise suda çözünen ve daha çok mavi-yeşil alglerde bulunan fikosiyenin gibi maddelerden oluşan pigment grubudur.

Bu çalışmada, mikroalglerde bulunan lutein miktarını artırmak amacıyla farklı dalga boylarında ışık veren floresan lambalar (kırmızı ve mavi) kullanılmıştır. Normal koşullarda beyaz floresan lamba kullanılarak yetiştirilen mikroalgler belirli bir bölgede ışık veren kaynaklar ile yetiştirilmiştir. Tablo 3.14 ve 3.15'teki veriler, kullanılan ışık kaynaklarının yeşil mikroalglerde bulunan lutein miktarında ticari anlamda fark yaratacak ölçüde artışa yol açmadığını göstermektedir.

Tablo 3.14. Farklı dalgaboyunda ışık kaynakları ile yetiştirilen *Prochlorococcus sp.*'nin büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı

Işık kaynağı	Log faz (gün)	μ_{max} (gün ⁻¹)	Lutein (mg/g)
Kırmızı	1-6	0.347	1.73
Mavi	1-20	0.153	1.57
Beyaz	1-20	0.116	1.86

Tablo 3.15. Farklı dalgaboyunda ışık kaynakları ile yetiştirilen *Scenedesmus protuberans*'ın büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı

Işık kaynağı	Log faz (gün)	μ_{max} (gün ⁻¹)	Lutein (mg/g)
Kırmızı	1-7	0.100	1.24
Mavi	1-20	0.090	2.04
Beyaz	1-20	0.099	1.36

3.9. Oksidatif Stres Koşullarının Yeşil Mikroalglerde Bulunan Lutein Miktarına Etkisi

Mikroalglerde bulunan karotenoidlerin pek çok görevi vardır. Bunların başında, antioksidan özellikleri sayesinde oksidatif stresle mücadele etmek gelir (Demming-Adams 2002). Fernández-Sevilla vd. (2010) H₂O₂ ve NaClO'nun Fe²⁺ iyonu varlığında büyüme ortamına eklenmesinin lutein üretimini artırdığını bildirmiştir. Bunun nedeni, Fenton Reaksiyonu adı verilen bu reaksiyon sonucunda hidroksil radikalının oluşması ve luteinin antioksidan özelliği sayesinde bu etki ile mücadele etmesidir. Lutein miktarındaki artışın savunma mekanizması tarafından geliştirildiği düşünülmüştür.

Bu çalışmada Fe²⁺ varlığında ortama NaOCl eklendiğinde *Prochlorococcus sp.*'de lutein birikiminin meydana geldiği gözlenmiştir. Tablo 3.16'da özetlenen sonuçlara göre, bahsi geçen maddelerin eklenmesi bu mikroorganizmada strese neden olmuş ve lutein sentezini tetiklemiş olabilir.

Tablo 3.16. Oksidatif stres koşullarında yetiştirilen *Prochlorococcus sp.*'nin büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı

BBM ortamında bulunan oksidatif stres kaynakları	Log faz (gün)	μ_{max} (gün ⁻¹)	Lutein (mg/g)
no ·OH and ¹ O ₂	1-20	0.411	2.51 ± 0.17
0.1 mM H ₂ O ₂ + 0.1 mM Fe ²⁺	1-20	0.137	1.92 ± 0.12
0.1 mM NaClO + 0.1 mM Fe ²⁺	1-20	0.147	4.53 ± 0.22
0.1 mM H ₂ O ₂ + 0.1 mM NaOCl	1-20	0.170	2.92 ± 0.19

T

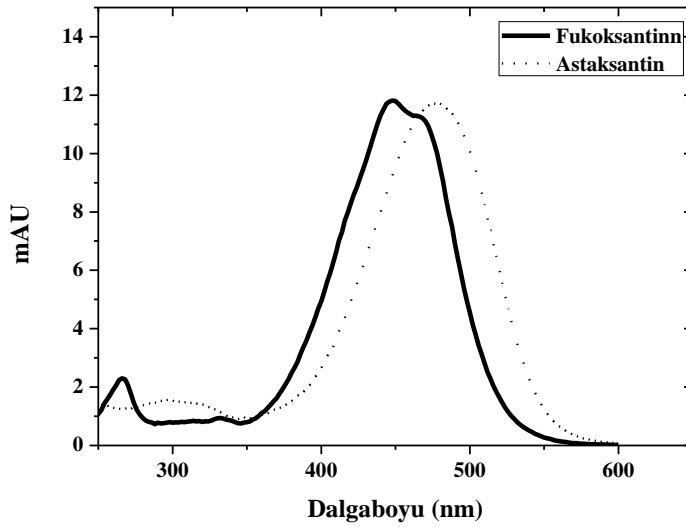
Tablo 3.17. Oksidatif stres koşullarında yetiştirilen *Scenedesmus protuberans*'in büyüme hızı ve içerdiği lutein miktarı

BBM ortamında bulunan oksidatif stres kaynakları	Log faz (gün)	μ_{max} (gün ⁻¹)	Lutein (mg/g)
no ·OH ve ¹ O ₂	1-30	0.116	2.47 ± 0.14
0.1 mM H ₂ O ₂ + 0.1 mM Fe ²⁺	1-20	0.107	2.06 ± 0.17
0.1 mM NaClO + 0.1 mM Fe ²⁺	1-20	0.097	2.06 ± 0.20
0.1 mM H ₂ O ₂ + 0.1 mM NaOCl	1-20	0.077	2.21 ± 0.13

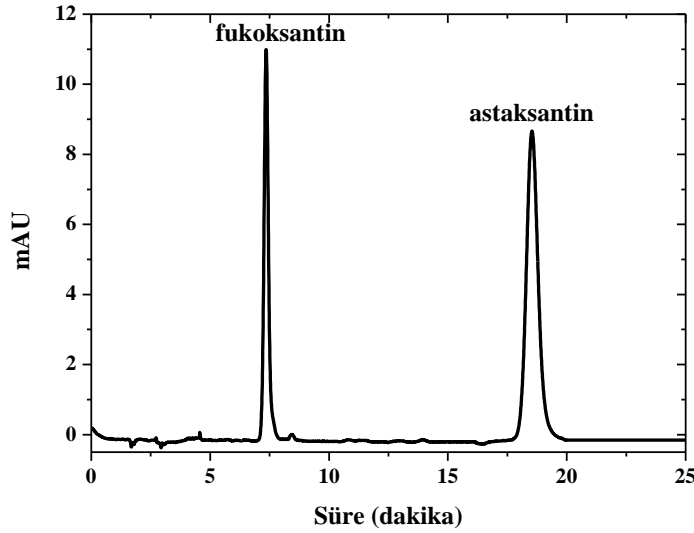
Ancak Tablo 3.17'deki sonuçlar incelendiğinde durumun *Scenedesmus protuberans* için aynı olmadığı göze çarpmaktadır. Kullanılan oksidatif stres kaynakları bu mikroalgdeki lutein biyosentezini artırmamıştır. Büyük ihtimalle, *Scenedesmus protuberans* maruz kaldığı bu koşullar ile başa çıkamamış, hem büyüme hızı hem de lutein miktarında azalma meydana gelmiştir. Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere her örnek farklı yapıya sahip olduğundan farklı koşullara değişik cevaplar vermesi olasıdır.

3.10. Kahverengi Mikroalgten Fukoksantin Ekstraksiyonu İçin Uygun Koşulların Belirlenmesi

Fukoksantin ve astaksantin (iç standart) için HPLC-DAD ile elde edilen absorbands spektrumları Şekil 3.22'de görülmektedir. Analizler 450.0 nm'de yapılmıştır. Fukoksantin ve astaksantin standartlarına ait HPLC kromatogramı Şekil 3.23'te verilmiştir.



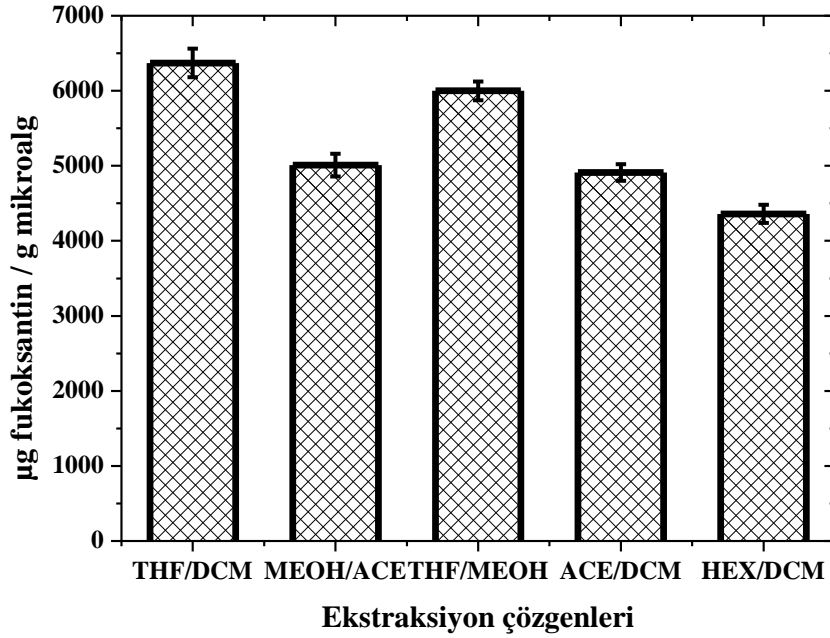
Şekil 3.22. Fukoksantin ve astaksantine (iç standart) ait absorbands spektrumları



Şekil 3.23. Fukoksantin ve astaksantine (iç standart) ait HPLC kromatogramı (isokratik yöntem, 450 nm, 1 mL/min akış hızı, 25°C kolon sıcaklığı)

3.10.1. Çözgen Bileşiminin Fukoksantin Ekstraksiyonuna Etkisi

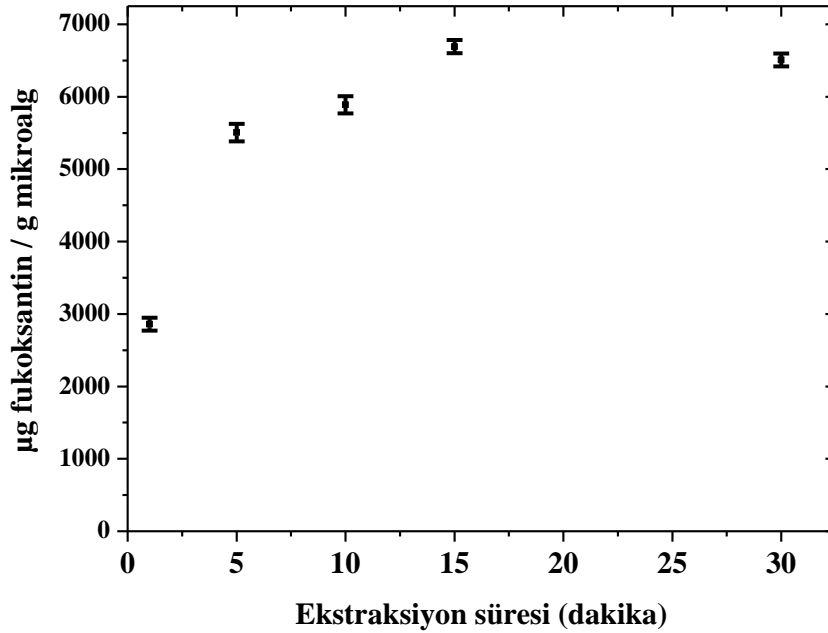
Nitzschia sp.'den fukoksantin ekstrakte edilmesi için çözgen bileşimi olarak (1:1) THF/DCM (tetrahidrofuran/diklorometan), MEOH/ACE (metanol/aseton), THF/MEOH (tetrahidrofuran/metanol), ACE/DCM (aseton/diklorometan) ve HEX/DCM (hekzan/diklorometan) kullanılmıştır. Yeşil mikroalglerin ekstraksiyonunda olduğu gibi en iyi sonuç veren THF/DCM bileşimi, bu mikroalg için de Şekil 3.24'te görüldüğü gibi benzer sonuçlar vermiştir. Bunun nedeni, büyük olasılıkla, oldukça polar olan fukoksantin bu çözgen bileşiminde çok iyi çözünmesidir. Fukoksantin ekstraksiyonuna yönelik daha sonraki deneylerde bu çözgen bileşimi kullanılmıştır.



Şekil 3.24. İkili çözgen bileşiminin *Nitzschia sp.*'den fukoksantin ekstraksiyonuna etkisi (Deney koşulları : 0.25 g mikroalg, 10.0 mL çözgen, 10.0 dakika ekstraksiyon x 3, 25 °C)

3.10.2. Ekstraksiyon Süresinin Fukoksantin Eldesine Etkisi

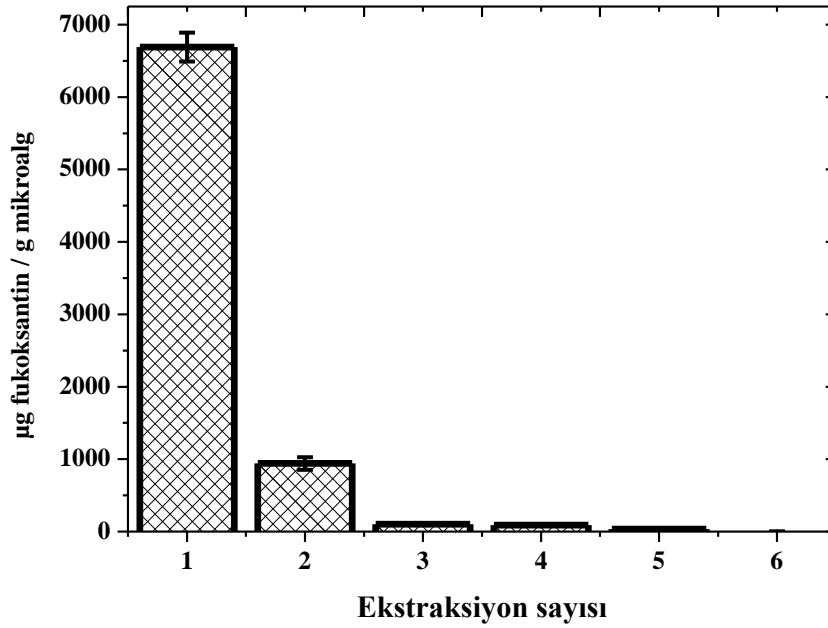
Nitzschia sp.'den fukoksantin ekstraksiyonunda sürenin etkisini belirlemek amacıyla kahverengi mikroalg THF:DCM (1:1) kullanılarak ve 25.0°C'de üç kez ekstrakte edilmiştir. Şekil 3.25'te de görüldüğü gibi 15 dakikalık ekstraksiyon süresi fukoksantin elde edilmesi için yeterlidir. Bu da, gerek ultrasonik ekstraksiyon açısından gerekse sarfiyat bakımından avantajlı bir durumdur. Ekstraksiyon süresinin kısa olması toplam işlem süresini kısaltacaktır. Ayrıca, ultrasonik ekstraksiyon sırasında otuz dakikadan sonra sıcaklık kontrolü, titreşim nedeniyle arttığından, zor olmaktadır. Daha sonraki deneylerde ekstraksiyon on beş dakika süreyle yapılmıştır.



Şekil 3. 25. Ekstraksiyon süresinin *Nitzschia sp.*'den fukoksantin eldesine etkisi (Deney koşulları: 0.25 g mikroalg, 10.0 mL THF/DCM x 3 ekstraksiyon, 25°C)

3.10.3. Ekstraksiyon Sayısının Fukoksantin Eldesine Etkisi

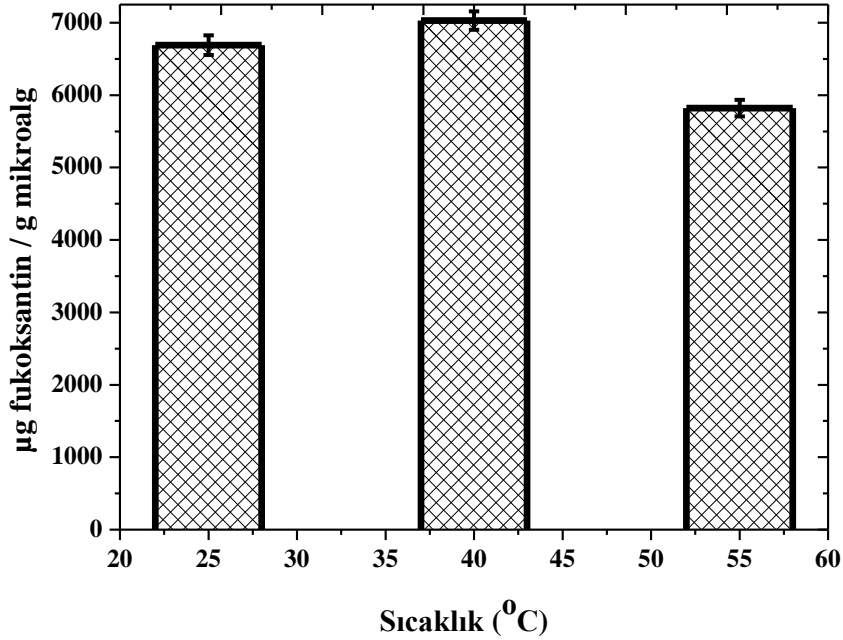
Elde edilen fukoksantin miktarını artırmak amacıyla renk görülmeyene dek devam edilmiş ve arka arkaya altı kez ekstraksiyon yapılmıştır. Şekil 3.26'da gösterilen sonuçlara göre *Nitzschia sp.*'deki fukoksantin % 95'inin ilk ekstraksiyonda çözültüye geçtiği bulunmuştur. Yapılan mikroskopik incelemelerde de hücredeki rengin ilk ekstraksiyon sonunda önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 3.26. Ekstraksiyon sayısının *Nitzschia sp.*'den fukoksantin elde edilmesindeki etkisi (Deney koşulları: 0.25g mikroalg, 10.0 mL THF/DCM, 15 dakika ekstraksiyon, 25°C)

3.10.4. Sıcaklığın Fukoksantin Ekstraksiyonuna Etkisi

Genelde sıcaklığın ekstraksiyona olumlu etkileri bulunmaktadır. Bunun nedeni sıcaklığın artmasıyla beraber moleküllerin kinetik enerjisinin de artması ve aynı zamanda maddelerin çözen molekülleriyle olan etkileşiminin de artışı olabilir. Ancak, sıcaklık yüksek olduğunda bu defa bazı maddelerin bozunmasına ya da izomerleşmesine neden olur. Bu çalışmada, kahverengi mikroalgten fukoksantin ekstraksiyonuna sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla üç farklı sıcaklıkta ekstraksiyon yapılmıştır (25, 40 ve 55°C). Elde edilen sonuçlara göre (Şekil 3.27) sıcaklık 40°C'ye yükseltildiğinde ekstrakte edilen fukoksantin miktarında önemli bir artış gözlenmezken daha yüksek sıcaklığa çıkıldığında bu miktarın düştüğü gözlenmiştir. Büyük bir olasılıkla fukoksantininn bir kısmı bozunmakta ya da izomerleşmektedir.



Şekil 3.27. Sıcaklığın *Nitzschia sp*'den ekstrakte edilen fukoksantin miktarına olan etkisi (Deneysel koşullar: 0.25g mikroalg, 10.0 mL THF/DCM, 15 dakika ekstraksiyon x 3)

3.11. Farklı Azot Kaynaklarının Kahverengi Mikroalgdeki Fukoksantin Miktarına Etkisi

Farklı azot kaynaklarının mikroalglerde bulunan lutein üzerindeki etkilerinden daha önce bahsedilmişti. Ancak literatürde bu kaynakların fukoksantin miktarına olan etkisine dair herhangi bir çalışma bildirilmemiştir. Bu amaçla, fukoksantin üreten *Nitzschia sp.*'nin yetiştirilmesinde farklı azot kaynaklarının mikroalgin büyüme hızına ve ürettiği fukoksantin miktarına olan etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 3.18'de özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, aynı miktarda azot içeren azot kaynaklarından nitrit kullanıldığında mikroalgin büyüme hızı sabit kalırken fukoksantin miktarında önemli bir değişiklik meydana gelmiştir. Bunun nedeninin, nitritin doğrudan -buna bağlı olarak nitrat/nitrit çevrimine gerek duyulmadan- hazır olarak ortamda bulunması olduğu düşünülmektedir. Muhtemelen, daha az enerji gerektirdiğinden süreç kendiliğinden olmakta ve sonuç olarak daha fazla miktarda fukoksantin üretilmektedir (Perez-Garcia 2011).

Tablo 3.18. Farklı azot kaynakları ile yetiştirilen *Nitzschia sp.*'nin büyüme hızı ve içerdiği fukoksantin miktarı

Azot kaynağı	Log faz (gün)	μ_{max} (gün ⁻¹)	Fukoksantin (mg/g)
NaNO ₃	1-17	0.134	6.58 ± 0.14
NaNO ₂	1-20	0.134	9.85 ± 0.19
NH ₄ Cl	1-17	0.167	3.74 ± 0.11
CH ₄ N ₂ O	1-20	0.141	3.35 ± 0.10

3.12. Farklı Azot Kaynaklarının Kahverengi Mikroalgdeki Fukoksantin Miktarına Etkisi

Oksidatif stres koşullarında yetiştirilen *Nitzschia sp.*'nin ürettiği fukoksantin miktarlarına ait sonuçlar (Tablo 3.19) oldukça dikkat çekicidir. NaOCl ortamına eklenen Fe²⁺'nin varlığı sonucunda oluşan oksidatif stres ürünleri bu mikroalgi strese maruz bırakmıştır. Bu hem büyüme hızının düşmesinden hem de fukoksantin miktarının çarpıcı bir şekilde artmasından anlaşılabilir.

Strese maruz kalan *Nitzschia sp.* hücrelerini korumak amacıyla fukoksantin biyosentezini artırmış olmalıdır. Büyük olasılıkla, mikroalg diğer koşulları stres olarak algılamamış ve bu nedenle bir savunma mekanizması geliştirmemiştir. Bu konu hakkında literatürde olgunlaşmış bilgi olmasa da, bu çalışmanın sonuçları, belirtilen koşullar altında *Nitzschia sp.*'nin strese girdiği ve yüksek miktarda fukoksantin ürettiğini göstermiştir.

Tablo 3.19. Oksidatif stres koşullarında yetiştirilen *Nitzschia sp.*'nin büyüme hızı ve içerdiği fukoksantin miktarı

F/2 ortamında bulunan oksidatif stres kaynakları	Log faz (gün)	μ_{max} (gün ⁻¹)	Fukoksantin (mg/g)
$\cdot OH$ ve 1O_2 yok	1-17	0.136	6.58 ± 0.17
0.1 mM H ₂ O ₂ + 0.1 mM Fe ²⁺	1-17	0.171	6.62 ± 0.12
0.1 mM NaClO + 0.1 mM Fe ²⁺	1-20	0.118	10.19 ± 0.22
0.1 mM H ₂ O ₂ + 0.1 mM NaOCl	1-17	0.178	7.79 ± 0.19

3.13. Farklı Işık Kaynaklarının Kahverengi Mikroalgdeki Fukoksantin Miktarına Etkisi

Nitzschia sp.'nin yetiştirilmesinde farklı dalgaboyunda ışık kullanıldığında (Tablo 3.20) fukoksantin miktarında önemli bir değişiklik olmamıştır. Ancak dikkat çekici olan, kırmızı ışık kullanıldığında bu mikroalgün büyüme hızında bir artış görülmesidir. Büyük ölçekli üretimler planlandığında büyüme hızının önemli bir parametre olduğu düşünülürse, üretim sırasında kırmızı ışık kullanılmasının daha avantajlı olacağı söylenebilir.

Tablo 3.20. Farklı dalgaboyunda ışık kaynakları ile yetiştirilen *Nitzschia sp.*'nin büyüme hızı ve içerdiği fukoksantin miktarı

Işık kaynağı	Log faz (gün)	μ_{max} (gün ⁻¹)	Fukoksantin (mg/g)
Kırmızı	1-10	0.316	5.97 ± 0.16
Mavi	1-12	0.260	5.49 ± 0.19
Beyaz	1-12	0.238	5.67 ± 0.17

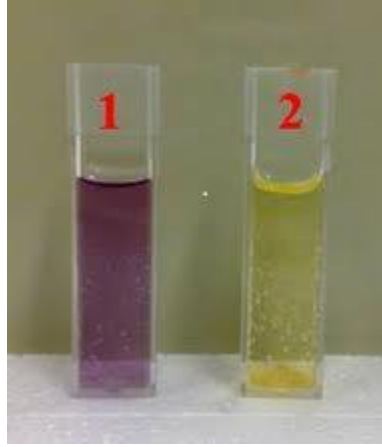
3.14. Karotenoidlerin Antioksidan Aktivitelerinin DPPH Yöntemiyle Belirlenmesi

Bu çalışmada antioksidan aktiviteyi gözlemek amacıyla öncelikle DPPH çözeltisinin derişimine karar verilmiştir. Literatürde kullanılan değerler (Li vd. 2011) göz önüne alınmış ve 30µM DPPH çözeltisi kullanılmıştır. Lutein standardı (5.0 mg/L) kullanılarak spektrofotometre (Varian Cary 50) ile zamana bağlı DPPH absorbans ölçümleri yapılmıştır. Buradaki amaç, akış enjeksiyon sisteminde DPPH'nin absorbansında fark edilebilir düzeydeki azalmayı gözlemlemektir. Ön denemelere ait sonuçlar Tablo 3.21'de verilmiştir.

Tablo 3.21. DPPH ve luteine ait reaksiyonun zamana bağlı absorbans değişimi

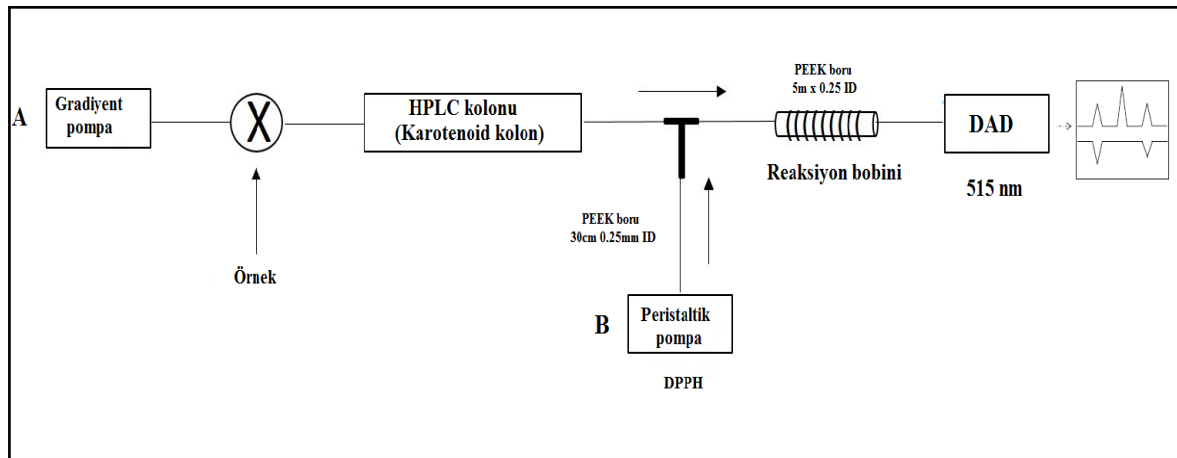
Reaksiyon süresi (dakika)	DPPH Absorbansı (515 nm)
0	0.942
0.5	0.887
1	0.865
2	0.806
5	0.794
10	0.783
15	0.765
30	0.508

Bu sonuçlara göre, lutein ile reaksiyona giren DPPH'nin absorbansında, yaklaşık iki dakika içerisinde azalma başlamıştır. Şekil 3.29'daki mor renkli çözelti (1) DPPH'ye, sarı çözelti (2) ise lutein ile reaksiyona giren DPPH'ye aittir.



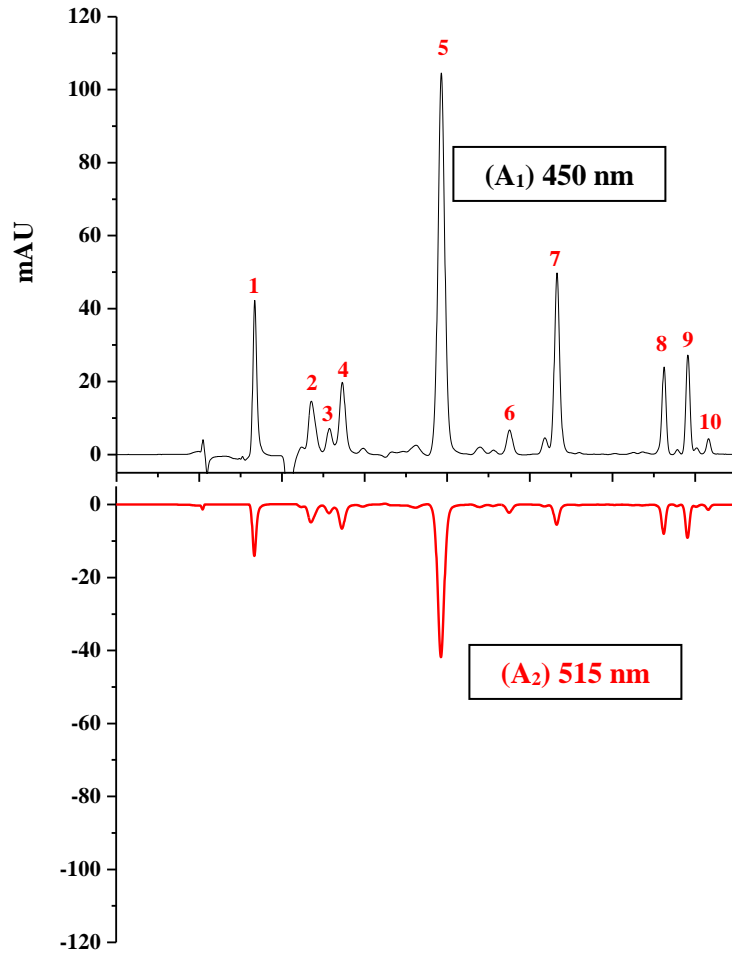
Şekil 3.28. DPPH'nin lutein ile reaksiyonu öncesi ve sonrasında çözeltinin rengi
(1) DPPH çözeltisi, (2) lutein ile reaksiyona giren DPPH çözeltisi

Bu çalışmada, mikroalglerden elde edilen ekstraktlardaki karotenoidlerin antioksidan aktivitelerinin de belirlenmesi planlanmıştır. Özellikle oksijen, ışık ve yüksek sıcaklıklara karşı oldukça hassas olan karotenoidlerin antioksidan aktivitelerinin de beklemeksizin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, akış-enjeksiyon analiz (FIA) sistemi kurulmuş (Şekil 3.30) ve mikroalgden elde edilen organik ekstrakt HPLC'ye ve hat üzerinde (on-line) FIA sistemine gönderilmiştir. PEEK (5 m x 0.25 mm ID) boru reaksiyon bobini olarak kullanılmış ve karotenoidlerin absorbans değerlerinin DPPH ile reaksiyon verince düştüğü görülmüştür. Böylelikle, karotenoidlerin göreceli olarak gösterdiği antioksidan aktivite on-line olarak görülmüştür.

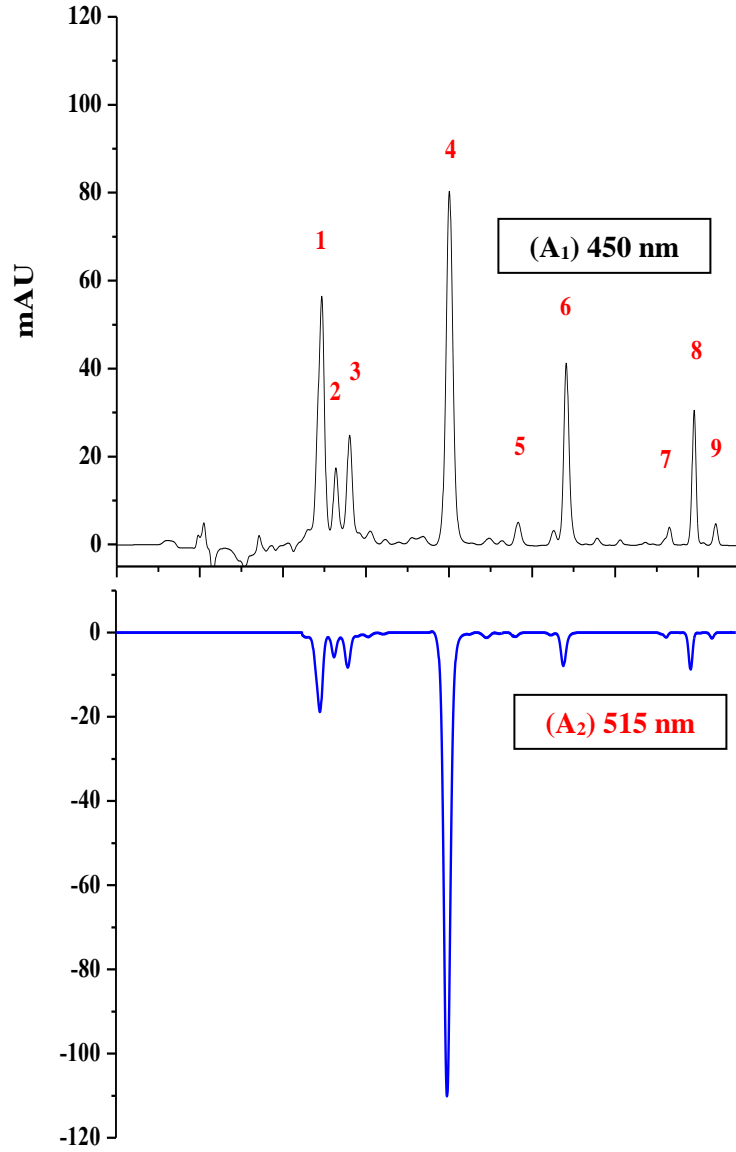


Şekil 3.29. Karotenoidlerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan HPLC - Akış Enjeksiyon Sistemi

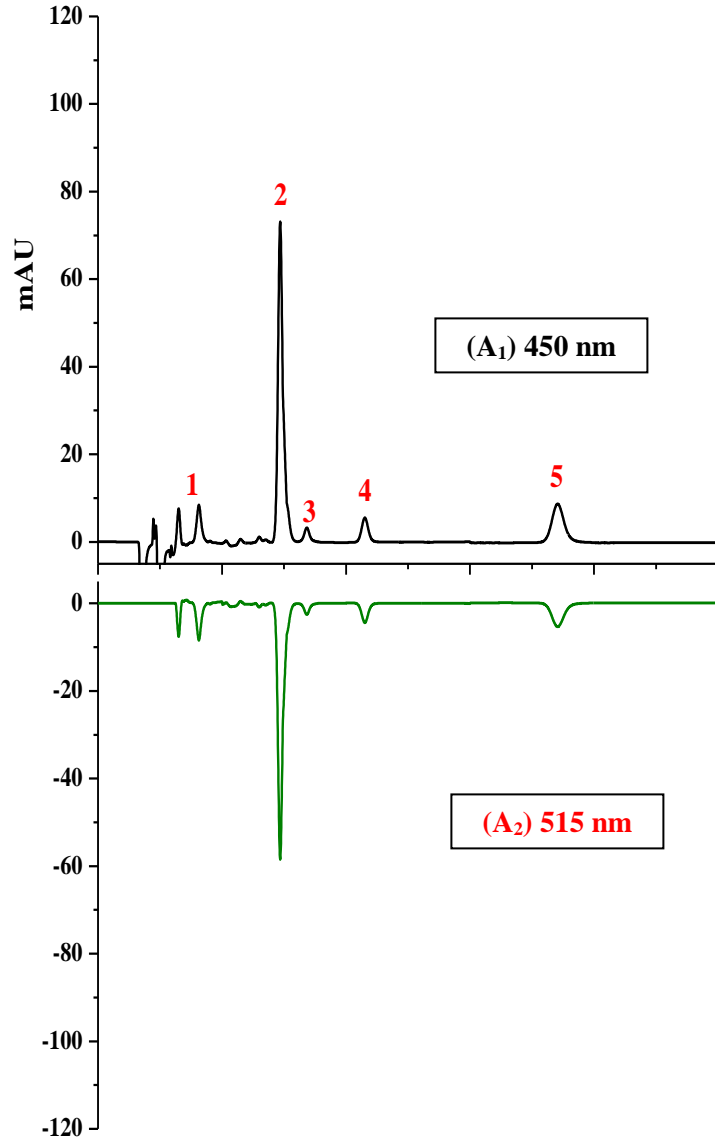
Her mikroalg türü için spesifik HPLC yöntemi kullanılmıştır. Mobil faz 0.8 mL/min akış hızına ayarlanmıştır. Kolon çıkışında bir peristaltik pompa yardımıyla T-hattına dahil edilen DPPH (30µM) ise 0.2 mL/min akış hızında tutulmuş ve toplam akış hızı 1.0 mL/min olarak sabit kalmıştır. Buna göre, elde edilen kromatogramlar Şekil 3.31, 3.32 ve 3.33'te verilmiştir.



Şekil 3.30. (A₁) *Prochlorococcus sp.*'nin 450 nm'de HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı (A₂) *Prochlorococcus sp.*'nin DPPH yöntemiyle 515 nm'de HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı



Şekil 3.31. (A₁) *Scenedesmus protuberans*'ın 450 nm'de HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı
(A₂) *Scenedesmus protuberans*'ın DPPH yöntemiyle 515 nm'de HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı



Şekil 3.32. (A₁) *Nitzschia sp.*'nin 450 nm'de HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı
(A₂) *Nitzschia sp.*'nin DPPH yöntemiyle 515 nm'de HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramı

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

Son yıllarda önem kazanan çalışma alanlarından biri, gıda ürünlerinde insan sağlığı açısından önemli bir pigment grubu olan karotenoidlerin çeşit ve derişimlerinin doğru bir şekilde belirlenmesidir. Mikroalglerden karotenoid eldesi üzerinde de çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Normal koşullar altında da karotenoid üreten bazı mikroalgler, çeşitli stres koşullarına maruz bırakıldıklarında daha fazla karotenoid üretmektedir. Bu durum, mikroalg biyoteknolojisi açısından da incelenmesi gereken bir olguya işaret etmektedir. Mikroalglerin yapıları birbirinden farklı olduğundan ve üretilen karotenoidler ve/veya miktarları da farklı olacaktır. Bahsedilen bu değişiklikleri takip edebilmek için pek çok araştırmacı yeni analiz yöntemlerine ihtiyaç duymaktadır.

Karotenoid analizlerinde karşılaşılan önemli sorunlardan biri, birçok karatenoid için ticari standart olmamasıdır. Bu alanda yapılacak her katkı, yeni türlerin bulunması/saflaştırılması, yeni türlerin sağlık ve gıda sektöründe uygulama alanı bulması ve analitik standart olarak kullanılması bağlamında da öneme sahiptir.

Bu projede kullanılan yeşil mikroalglerde (*Prochlorococcus sp.* için 2.54 mg/g ve *Scenedesmus protuberans* için 2.45 mg/g) önemli miktarda lutein olduğu görülmüş; diğer taraftan kahverengi (*Nitzschia sp.*) mikroalgte ise fazla miktarda fukoksantin (6.58 mg/g) bulunmuştur. Çoğu mikroalg türü stress koşullarında biyosentez mekanizmalarını değiştirmektedir. Bu nedenle, farklı azot kaynakları, oksidatif stres koşulları ve farklı ışık kaynaklarının yeşil mikroalglerde bulunan lutein miktarına; kahverengi algte ise bu koşulların fukoksantin miktarına olan etkisi araştırılmıştır. Kullanılan farklı kaynaklar ile veya uygulanan bazı stres koşulları sayesinde bu miktarlar arttırılmıştır.

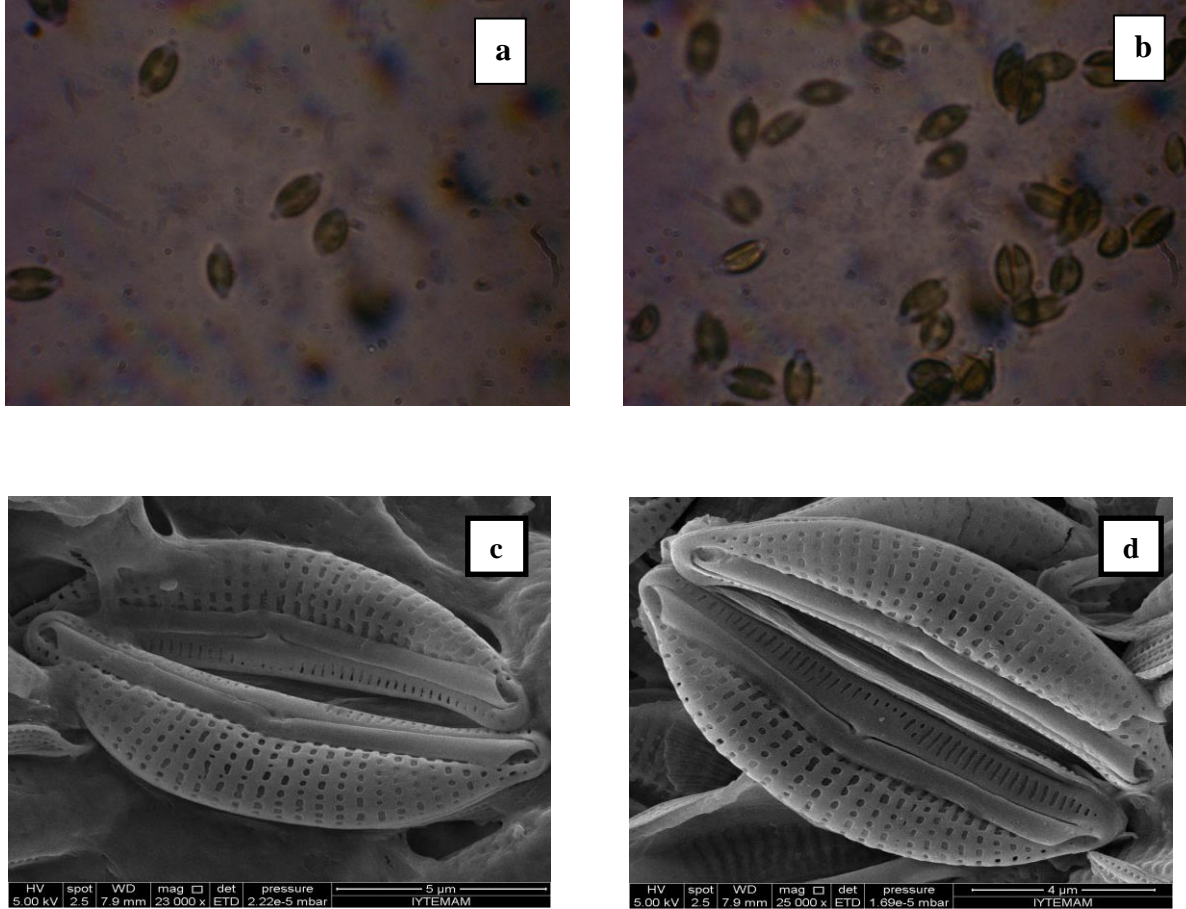
Proje ekibi, bu alandaki çalışmalarını bundan sonra da devam ettirecektir. Proje kapsamında elde edilen bulgular ve çeşitli ülkelerde, mikroalglerden karotenoid üretiminin endüstriyel ölçekte de yapılıyor olması, Proje ekibinin bundan sonraki çalışmalarına yol gösterecektir. Bu anlamda bazı çalışmalar tamamlanmış ve özellikle fukoksantin ticarileşmesi için yeni bir proje önerisi hazırlamıştır. Proke ekibi, bu amaçla yeni bir proje ile başta KOSGEB olmak üzere çeşitli kuruluşlara başvurmak için bazı girişimlerde bulunmuştur. Kısmi destek sağlanması amacıyla SOLGAR, GNC ve KEMIN Industries gibi bazı önde gelen kuruluşlarla

irtibata geçmiştir. Fukoksantin ticarileşmesi amacıyla ülkemize özgü bazı endemic mikroalg türlerinin izolasyonuna yönelik çalışmalar yapılacak ve bu türlerden en yüksek miktarda fukoksantin elde edilmesine çalışılacaktır. Son olarak, önerilecek proje sonucunda uluslararası patent alınması hedeflenmiştir.

EK A

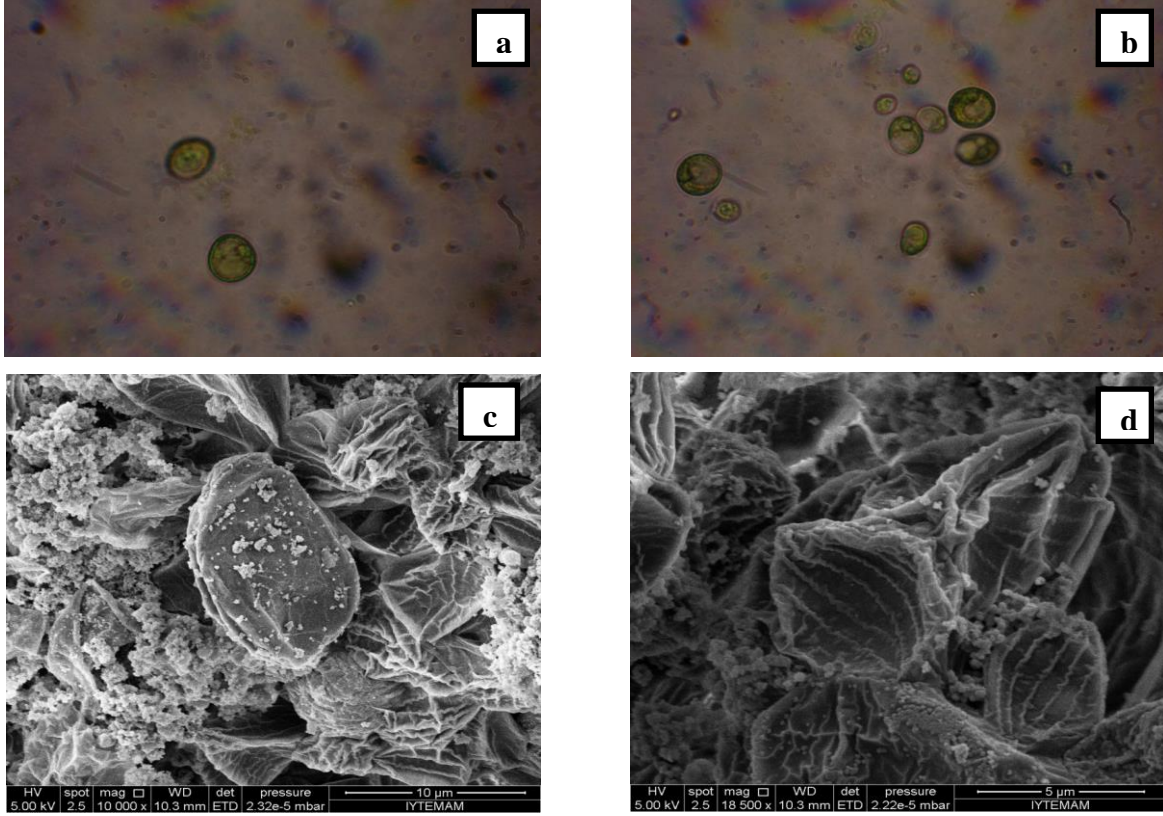
Çalışmada Kullanılan Diğer Mikroalg Türleri

Projede adı geçen mikroalgler dışında iki farklı mikroalg daha kullanılmıştır. Bunlardan biri yeşil bir mikroalg türü olan *Neochloris alveolaris*, diğeri ise kahverengi bir mikroalg olan *Cymbella sp.*'dir. Bunlara ait optik mikroskop ve SEM görüntüleri Şekil A1 ve Şekil A2'de verilmiştir.



Şekil A1. *Cymbella* için optik mikroskop (a,b x 40) ve SEM görüntüleri (c x 23000, d x 25000)

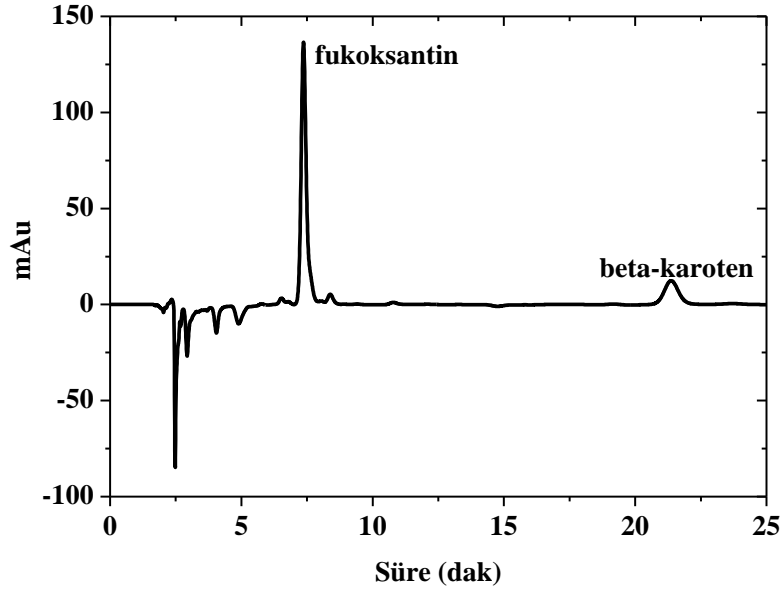
Mikroalgler stok kültürlerden öncelikle deneme amaçlı olarak, sadece yeterli miktarda yetiştirilmiş ve karotenoid içeriklerine bakıldıktan sonra yoğun üretime geçilmiştir. Bu mikroalgler önceden geliştirilen yöntemler ile ekstrakte edilmiş ve HPLC-DAD ile analizleri yapılmıştır.



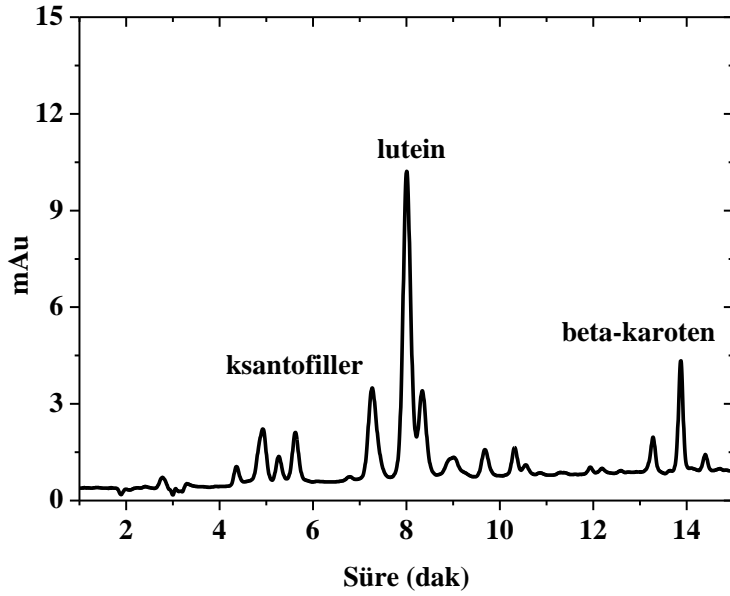
Şekil A2. *Neochloris alveolaris* için optik mikroskop (a,b x40) ve SEM görüntüleri (c x10000, d x18500)

HPLC-DAD ile yapılan analizlerden elde edilen kromatogramlar Şekil A3 ve Şekil A4'te gösterilmiştir. Ancak *Neochloris alveolaris*'te bulunan karotenoid içeriği ve miktarı çok az olduğundan bu mikroalg ile diğer yeşil mikroalglerde yapıldığı gibi optimizasyon çalışmaları yapılmamıştır ve üretime devam edilmemiştir.

Son olarak, seçilen diğer bir kahverengi mikroalg türü olan *Cymbella sp.*, *Nitzschia sp.*'ye oranla daha az fukoksantin içermektedir. Buna rağmen karşılaştırmalı çalışma planlanmış, ancak bu mikroalgin yoğun kültür halinde yetiştirilmesinde başta kirlilik olmak üzere önemli sıkıntılar yaşanmıştır. Kirliliğin giderilememesi ve kültürün aksenik olarak yetiştirilememesinden dolayı üretim durdurulmuştur.



Şekil A3. *Cymbella*'nin HPLC-DAD kullanılarak elde edilen kromatogramı (isokratik analiz, 70:30-Metanol:Asetonitril, 450 nm, akış hızı:1 mL/min)



Şekil A4. *Neochloris alveolaris*'in HPLC-DAD kullanılarak elde edilen kromatogramı (gradient analiz, 70:25:5-Metanol:Metil *tert*-butil eter:Su)

REFERANSLAR

- Astorg, P. 1997. Food Carotenoids and Cancer Prevention: An Overview of Current Research. *Trends in Food Science & Technology*. 8 (12):406-413.
- Bechtold, T. and R. Mussak. 2009. *Handbook of Natural Colorants*, John Wiley & Sons, New York.
- Becker, E. W. 1993. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Vol. 10: Cambridge University Press.
- Blanco, A. M., J. Moreno, J. A. Del Campo, J. Rivas, and M. G. Guerrero. 2007. Outdoor Cultivation of Lutein-Rich Cells of *Muriellopsis* sp. in Open Ponds. *Applied microbiology and biotechnology*. 73 (6):1259-1266.
- Britton, G. 1991 Carotenoids. *Methods Plant Biochemistry*. 7:473-518.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. 1995. *Carotenoids*. Birkhauser Verlag, vol.1A, 210-214, Basel.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. 1996. *Carotenoids*. Birkhauser Verlag, vol.1B, 13-62, Basel.
- Bushway, R. J. 1985. Separation of Carotenoids in Fruits and Vegetables by High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*. 8 (8):1527-1547.
- Chiu, C. J., and A. Taylor. 2007. Nutritional Antioxidants and Age-Related Cataract and Maculopathy. *Experimental Eye Research*. 84 (2):229-245.
- Craft, N. E., and J. H. Soares. 1992. Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and Beta-Karoten in Organic-Solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40 (3):431-434.
- Craft, N. E., and J. H. Soares. 1992. Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein And Beta.-Karoten in Organic Solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40 (3):431-434.
- Davies, B.H. 1976. "Carotenoids" In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Vol. 2, Goodwin, T.W. (Ed.), Academic Press, London, New York, San Francisco. 38– 165.
- Dawson, M.I. and P.D. Hobbs. 1994. "Synthetic chemistry of retinoids" In *Retinoids*, Sporn, M.B. Eds., Raven Press, New York, 5.
- Del Campo, J. A., H. Rodríguez, J. Moreno, M. Vargas, J. n. Rivas, and M. G. Guerrero. 2001. Lutein Production by *Muriellopsis* sp. in an Outdoor Tubular *Photobioreactor*. *Journal of Biotechnology*. 85 (3):289-295.

- Del Campo, J. A., J. Moreno, H. Rodríguez, M. Angeles Vargas, J. n. Rivas, and M. G. Guerrero. 2000. Carotenoid Content of Chlorophycean Microalgae: Factors Determining Lutein Accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*. 76 (1):51-59.
- Delgado-Vargas, F., A. R. Jimenez, and O. Paredes-Lopez. 2000. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40 (3):173-289.
- Demmig-Adams, B., and W. W. Adams. 2002. Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. *Science*. 298 (5601):2149-2153.
- Dias, M. G., L. Oliveira, M. Camões, B. Nunes, P. Versloot, and P. J. Hulshof. 2010. Critical Assessment of Three High Performance Liquid Chromatography Analytical Methods for Food Carotenoid Quantification. *Journal of Chromatography A*. 1217 (21):3494-3502.
- Falconer, M., E., M. J. Fishwick and D. G. Land D. 1964. Karoten oxidation and off-flavor development in dehydrated carrot. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 15, 857, 1964.
- Fernández-Sevilla, J. M., F. A. Fernández, and E. M. Grima. 2010. Biotechnological Production of Lutein and Its Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86 (1):27-40.
- Frickel, F. 1984. "Chemistry and Physical Properties of Retinoids" In the *Retinoids*, Vol. 1, Sporn, M.B. Eds. Academic Press, Orlando. 7.
- Fung, A., N. Hamid, and J. Lu. 2013. Fucoxanthin Content and Antioxidant Properties of *Undaria Pinnatifida*. *Food Chemistry*. 136 (2):1055-1062.
- Goldman, J. C. 1977. Biomass Production in Mass Cultures of Marine Phytoplankton at Varying Temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 27 (2):161-169.
- Granado, F., B. Olmedilla, and I. Blanco. 2003. Nutritional and Clinical Relevance of Lutein in Human Health. *British Journal of Nutrition*. 90 (3):487-502.
- Hao, Z., B. Parker, M. Knapp, and L. L. Yu. 2005. Simultaneous Quantification of α -Tocopherol and Four Major Carotenoids in Botanical Materials by Normal Phase Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1094 (1):83-90.
- Hart, D. J., and K. J. Scott. 1995. Development and Evaluation of a Method for the Analysis of Carotenoids in Foods, and the Measurement of the Carotenoid Content of Vegetables and Fruits Commonly Consumed in the UK. *Food Chemistry*. 54 (1):101-111.
- Heber, D., and Q. Y. Lu. 2002. Overview of Mechanisms of Action of Lycopene. *Experimental Biology and Medicine*. 227 (10):920-923.
- Hsieh, C.-H., and W.-T. Wu. 2009. Cultivation of Microalgae for Oil Production with a Cultivation Strategy of Urea Limitation. *Bioresource Technology*. 100 (17):3921-3926.
- Hurst, W.J., 2008. Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals. CRC Press, USA.

- Isler, H. and Gutmann, U.S., Carotenoids, Birkhauser Verlag, Basel, 1971.
- Jaswir, I., D. Noviendri, H. M. Salleh, M. Taher, and K. Miyashita. 2011. Isolation of Fucoxanthin and Fatty Acids Analysis of *Padina Australis* and Cytotoxic Effect of Fucoxanthin on Human Lung Cancer (H1299) Cell Lines. *African Journal of Biotechnology*. 10 (81):18855-18862.
- Jin, E., J. E. Polle, H. Lee, S. Hyun, and M. Chang. 2003. Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13 (2):165-174.
- Kimura, M., and D. B. Rodriguez-Amaya. 1999. Sources of Errors in the Quantitative Analysis of Food Carotenoids by. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*. 49 (3):58S-66S.
- Kimura, M., and D. B. Rodriguez-Amaya. 1999. Sources of Errors in the Quantitative Analysis of Food Carotenoids by. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*. 49 (3):58S-66S.
- Kimura, M., C. N. Kobori, D. B. Rodriguez-Amaya, and P. Nestel. 2007. Screening and Methods for Carotenoids in Sweetpotato, Cassava and Maize for Plant Breeding Trials. *Food Chemistry*. 100 (4):1734-1746.
- Klauri, H., Bauernfeind, J.C. (1981). "Carotenoids as Food Colors". In *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors* (J.C.Bauernfeind, ed.), 47-317, Academic Press, New York.
- Kurz, C., R. Carle, and A. Schieber. 2008. HPLC-DAD-MS Characterisation of Carotenoids from Apricots and Pumpkins for the Evaluation of Fruit Product Authenticity. *Food Chemistry*. 110 (2):522-530.
- Le Marchand, L., J. H. Hankin, L. N. Kolonel, G. R. Beecher, L. R. Wilkens, and L. P. Zhao. 1993. Intake of Specific Carotenoids and Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2: 183-187.
- Lesellier, E., C. Marty, C. Berset, and A. Tchaplal. 1989. Optimization of the Isocratic Non-Aqueous Reverse Phase (NARP) Separation of trans-cis alpha-Karotens and beta-Karotens. *HRC-Journal of High Resolution Chromatography*. 12 (7):447-454.
- Li, Y., M. Horsman, B. Wang, N. Wu, and C. Q. Lan. 2008. Effects of Nitrogen Sources on Cell Growth and Lipid Accumulation of Green Alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81 (4):629-636.
- Maeda, H., M. Hosokawa, T. Sashima, K. Funayama, and K. Miyashita. 2005. Fucoxanthin from Edible Seaweed, *Undaria pinnatifida*, Shows Antiobesity Effect through Ucp1 Expression in White Adipose Tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 332 (2):392-397.
- Masojidek, J., M. Koblizek, and G. Torzillo. 2004. 2 Photosynthesis in Microalgae. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*: 20.
- Mise, T., M. Ueda, and T. Yasumoto. 2011. Production of Fucoxanthin-Rich Powder from *Cladosiphon okamuranus*. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 3 (1):73-76.

- Nguyen, M. L., and S. J. Schwartz. 1998. Lycopene Stability during Food Processing. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 218 (2):101-105.
- Nomura, T., M. Kikuchi, A. Kubodera, and Y. Kawakami. 1997. Proton-Donative Antioxidant Activity of Fucoxanthin with 1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH). *IUBMB Life*. 42 (2):361-370.
- Peng, J., J.-P. Yuan, C.-F. Wu, and J.-H. Wang. 2011. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Marine Drugs*. 9 (10):1806-1828.
- Perez-Garcia, O., F. M. Escalante, L. E. de-Bashan, and Y. Bashan. 2011. Heterotrophic Cultures of Microalgae: Metabolism and Potential Products. *Water Research*. 45 (1):11-36.
- Pfander, H., R. Riesen, and U. Niggli. 1994. and SFC of Carotenoids - Scope and Limitations. *Pure and Applied Chemistry*. 66 (5):947-954.
- Pomeranz, Y., Meloan CE. 1994. *Food Analysis: Theory and Practice*, 3rd edition. Chapman & Hall, New York.
- Prasad, K. N., L. Y. Chew, H. Khoo, B. Yang, A. Azlan, and A. Ismail. 2011. Carotenoids and Antioxidant Capacities from *Canarium odontophyllum miq.* Fruit. *Food Chemistry*. 124 (4):1549-1555.
- Quackenbush, F. W., and R. L. Smallidge. 1986. Nonaqueous Reverse Phase Liquid-Chromatographic System for Separation and Quantitation of Provitamins-A. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 69 (5):767-772.
- Rao A.V., L.G. Rao. 2004. Lycopene and Human Health. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 2:127-136.
- Rao A.V., L.G. Rao. 2007. Carotenoids and Human Health. *Pharmacological Research*. 55:207-216.
- Rao A.V., M. R. Ray, L.G. Rao. 2006. Lycopene. *Advances in Food & Nutrition Research*. 51:99-164.
- Rangel-Yagui, C. d. O., E. D. G. Danesi, J. C. M. de Carvalho, and S. Sato. 2004. Klorofil Production from *Spirulina platensis*: Cultivation with Urea Addition by Fed-Batch Process. *Bioresource Technology*. 92 (2):133-141.
- Rezanka, T., J. Olsovska, M. Sobotka, and K. Sigler. 2009. The Use of APCI-MS with and Other Separation Techniques for Identification of Carotenoids and Related Compounds. *Current Analytical Chemistry*. 5 (1):1-25.
- Richmond, A. 1990. Large Scale Microalgal Culture and Applications, pp. 269-330. In Round, M. and S. Chapman (Eds.). *Progress in Phycological Research*. Biopress, Bristol.

- Rivera, S., F. Vilaró, and R. Canela. 2011. Determination of Carotenoids by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Effect of Several Dopants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 400 (5):1339-1346.
- Rodriguez-Amaya, D.B. 1999a. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. ILSI Press, Washington DC.
- Sachindra, N. M., E. Sato, H. Maeda, M. Hosokawa, Y. Niwano, M. Kohno, and K. Miyashita. 2007. Radical Scavenging and Singlet Oxygen Quenching Activity of Marine Carotenoid Fucoxanthin and Its Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (21):8516-8522.
- Sánchez, J., J. Fernández, F. Ación, A. Rueda, J. Pérez-Parra, and E. Molina. 2008. Influence of Culture Conditions on the Productivity and Lutein Content of the New Strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*. 43 (4):398-405.
- Sánchez-Luna, L. D., A. Converti, G. C. Tonini, S. Sato, and J. de Carvalho. 2004. Continuous and Pulse Feedings of Urea as a Nitrogen Source in Fed-Batch Cultivation of *Spirulina platensis*. *Aquacultural Engineering*. 31 (3):237-245.
- Schiedt, K., S. Liaaen-Jensen (1995) Isolation and analysis. In Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. (eds), *Carotenoids: Isolation and Analysis*, vol 1A. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 81-108.
- Scott, K. J. 1992. Observations on Some of the Problems Associated with the Analysis of Carotenoids in Foods by. *Food Chemistry*. 45 (5):357-364.
- Shi, X. M., F. Chen, J. P. Yuan, and H. Chen. 1997. Heterotrophic Production of Lutein by Selected *Chlorella* Strains. *Journal of Applied Phycology*. 9 (5):445-450.
- Shi, X. M., H. J. Liu, X. W. Zhang, and F. Chen. 1999. Production of Biomass and Lutein by *Chlorella protothecoides* at Various Glucose Concentrations in Heterotrophic Cultures. *Process Biochemistry*. 34 (4):341-347.
- Shi, X. M., X. W. Zhang, and F. Chen. 2000. Heterotrophic Production of Biomass and Lutein by *Chlorella protothecoides* on Various Nitrogen Sources. *Enzyme and Microbial Technology*. 27 (3-5):312-318.
- Soletto, D., L. Binaghi, A. Lodi, J. Carvalho, and A. Converti. 2005. Batch and Fed-Batch Cultivations of *Spirulina platensis* using Ammonium Sulphate and Urea as Nitrogen Sources. *Aquaculture*. 243 (1):217-224.
- Stengel, E., and C. Soeder. 1975. Control of Photosynthetic Production in Aquatic Ecosystems. Cambridge University Press. Cambridge. England.

- Strati, I. F., and V. Oreopoulou. 2011. Effect of Extraction Parameters on the Carotenoid Recovery from Tomato Waste. *International Journal of Food Science and Technology*. 46 (1):23-29.
- Su, Q., K. Rowley, C. Itsiopoulos, and K. O'dea. 2002. Identification and Quantitation of Major Carotenoids in Selected Components of the Mediterranean Diet: Green Leafy Vegetables, Figs and Olive Oil. *European Journal of Clinical Nutrition*. 56 (11):1149-1154.
- Wang, C., S. Chang, B. S. Inbaraj, and B. Chen. 2010. Isolation of Carotenoids, Flavonoids and Polysaccharides from *Lycium barbarum L.* and Evaluation of Antioxidant Activity. *Food Chemistry*. 120 (1):184-192.
- Wei, D., F. Chen, G. Chen, X. Zhang, L. Liu, and H. Zhang. 2008. Enhanced Production of Lutein in Heterotrophic *Chlorella protothecoides* by Oxidative Stress. *Science in China Series C: Life Sciences*. 51 (12):1088-1093.
- Weller, P., and D. E. Breithaupt. 2003. Identification and Quantification of Zeaxanthin Esters in Plants Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (24):7044-7049.
- Wijffels R. H. 2007. Potential of sponges and microalgae from marine biotechnology. *Trends in Biotechnology* 26:26-31
- Yan, X., Y. Chuda, M. Suzuki, and T. Nagata. 1999. Fucoxanthin as the Major Antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a Common Edible Seaweed. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 63 (3):605-607.
- Zailanie, K., and H. Purnomo. 2011. Fucoxanthin Content of Five Species Brown Seaweed from Talango District, Madura Island. *Journal of Agricultural Science and Technology A*: 1103.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. AHMET EMİN EROĞLU
Proje No:	110T099
Proje Başlığı:	Çeşitli Mikroalglerin Karotenoid İçeriklerinin Kromatografik/Spektroskopik Yöntemlerle Araştırılması ve Ekstrakte Edilecek Karotenoidlerin Antioksidan Aktivitelerinin Akış Enjeksiyon Analiz Sistemiyle Belirlenmesi
Proje Türü:	Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	MELTEM DALAY
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. KİMYA B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/10/2010 - 01/07/2013
Onaylanan Bütçe:	266931.0
Harcanan Bütçe:	216946.93
Öz:	<p>Mikroskobik canlılardan olan mikroalglerin biyoteknolojisi, bu türlerin içerdiği çeşitli faydalı bileşikler nedeniyle, hızla önem kazanmıştır. Biyolojik çeşitlilikleri göz önüne alındığında mikroalgler, pek çok yeni ürün için kaynak olarak düşünülebilir. Özellikle tıp, farmakoloji, kozmetik ve gıda endüstrisinde çok çeşitli uygulama alanı bulabilir. Önemli bir pigment ve antioksidan kaynağı olan karotenoidler, mikroalglerden üretilen ürünlerin arasındadır. Biyoteknolojik ürünlerin doğal üretim teknolojileri, sentetik yollarla yapılan üretimlere göre daha çok tercih edilmektedir. Karotenoidlerin mikroalgler tarafından üretilmesi ise düşük maliyet, kolaylık ve çeşitlilik açısından özellikle Avrupa, Avustralya, Amerika ve Uzakdoğu'da alternatif bir araştırma alanı haline gelmiştir. Çeşitli karotenoidleri ve/veya bir karotenoidi fazla miktarda üreten yeni tür organizmaların bulunmasına özel önem verilmektedir. Ancak, ülkemizde karotenoidlerin ya da belirli bir karotenoidin biyosentezi hakkında bilgi ve teknolojiler yetersizdir. Bu durum, bu alanda yapılacak araştırmaların önemini göstermektedir. Bu projede, çeşitli mikroalglerden karotenoid eldesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen karotenoidler arasında ticari öneme sahip lutein ve fukoksantin ile daha ayrıntılı deneyler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, pek çok yeni çalışmaya yön verebilecek niteliktedir. Örneğin, günümüzde luteinin ticari olarak üretilmesine yönelik çalışmalar hala devam etmektedir. Bu anlamda, bu çalışmada lutein miktarını artırmak amacıyla bazı yollar izlenmiş ve olumlu sonuçlara ulaşılmıştır.</p> <p>Bunun dışında, fukoksantin ile ilgili yapılan denemeler sonucunda literatürde daha önce yer almayan veriler elde edilmiştir. Mikroalglerden fukoksantin eldesine yönelik çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Ancak projede elde edilen sonuçların gerek literatüre, gerekse ticari anlamda üretime oldukça önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.</p> <p>Son olarak, karotenoidlerin antioksidan aktivitelerini, saflaştırma işlemlerine gerek kalmadan görebilmek amacıyla yeni bir akış enjeksiyon sistemi geliştirilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Karotenoidler, mikroalgler, ekstraksiyon, kromatografi, spektroskopi, akış enjeksiyon sistemi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Effect of Oxidative Stress and Type Nitrogen Source on Production of Lutein in Novel Microalgae (Bildiri), 2- Study on Ultrasound Assisted Extraction of Fucoxanthin From a Novel Microalga (Bildiri), 3- Novel Microalgae as Potential Source of Lutein: Optimization of Solvent Extraction Conditions (Bildiri)