



**MİKROALGLERDE BULUNAN KAROTENOİDLERİN
TAYİNİ**

Nur Tsiqah BINTI MOHD NASIR



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROALGLERDE BULUNAN KAROTENOİDLERİN TAYİNİ

Nur Tsiqah BINTI MOHD NASIR

Doç. Dr. Saliha ŞAHİN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2017

Her Hakkı Saklıdır

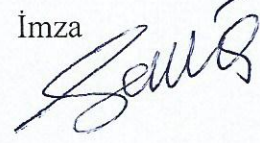
TEZ ONAYI

Nur Tsiqah BINTI MOHD NASIR tarafından “Mikroalglerde Bulunan Karotenoidlerin Tayini” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

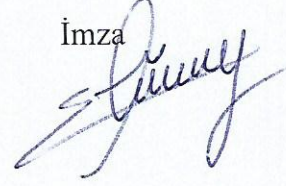
Başkan: Doç. Dr. Saliha ŞAHİN
Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı

İmza



Üye: Doç. Dr. Elif TÜMAY ÖZER
Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı

İmza

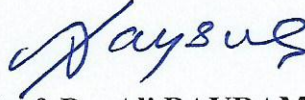


Üye: Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK
İstanbul Medeniyet Üniversitesi,
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

24.05/2017

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

05/05/2017

Nur Tsiqah BINTI MOHD NASIR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROALGLERDE BULUNAN KAROTENOİDLERİN TAYİNİ

Nur Tsiqah BINTI MOHD NASIR

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

Bu tez kapsamında, *Chlorella vulgaris* mikroalginden ana karotenoidlerin ekstraksiyonu için ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) yöntemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon zamanı, etanol hacmi, ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranı gibi ekstraksiyon faktörleri ve kombinasyonları yanıtlı yüzey analiz yöntemi (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. Optimal verim elde etmek için beş seviyeli dört faktörlü merkezi kompozit dizayn (CCD) kullanılmıştır. Ekstraksiyon zamanı (15-155 dk), etanol hacmi (%35-95, v/v), ekstraksiyon sıcaklığı (15-75°C) ve sıvı/katı oranı (30-150 mL/g) dahil olmak üzere dört bağımsız faktör optimize edilmiştir. *Chlorella vulgaris* mikroalginin ekstraksiyon koşulları spektroskopik ve kromatografik yanıt değerleri kullanılarak optimize edilmiştir. Spektroskopik yöntem altında toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite (ABTS ve CHROMAC yöntem) miktarları yanıt değeri olarak alınırken ekstraksiyon zamanı, etanol hacmi, ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranı etkileri incelenmiştir. Bu spektroskopik yönteminde optimum ekstraksiyon koşullarını optimize etmek için çok yanıtlı yüzey analiz yöntemi kullanılmıştır. Kromatografik yöntem altında ise karotenoidler (lutein, β -karoten, α -karoten gibi) HPLC analiz ile nicel olarak tespit edilmiş ve optimum ekstraksiyon koşullarını optimize etmek için tek yanıtlı yüzey analiz yöntemi kullanılmıştır. Çalışmalarımız, gelecekteki mikroalglerin antioksidan iyileşmesini değerlendirmek için yeni geliştirilmiş yöntemimizin (CHROMAC) kullanılması ve karotenoid analizi için temel çalışmalar olarak kabul edilebilir.

Anahtar kelimeler: *Chlorella vulgaris*, karotenoid, ultrasonik destekli ekstraksiyon, HPLC, merkezi kompozit dizayn, yanıtlı yüzey analizi

2017, x + 63 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF CAROTENOIDS IN MICROALGAE

Nur Tsiqah BINTI MOHD NASIR

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

In this thesis, ultrasonic-assisted extraction (UAE) was applied on the extraction of main carotenoids from the microalgae *Chlorella vulgaris*. The extraction parameters such as extraction time, ethanol volume, extraction temperature and liquid/solid ratio and their combinations were optimized using response surface methodology (RSM). A five-level-four factors experiment central composite design (CCD) was employed in order to achieve optimal output. Four independent parameters were optimized, including extraction time (15-155 min), ethanol volume (35-95%, v/v), extraction temperature (15-75°C) and liquid/solid ratio (30-150 mL/g). *Chlorella vulgaris* has been optimized in term of spectroscopic and chromatographic methods. Under spectroscopic method, total phenolic content and antioxidant capacity (ABTS and CHROMAC method) were considered response parameters while the effects of extraction time, ethanol volume, extraction temperature and liquid/solid ratio were studied. Multiresponse surface methodology was employed to optimize the optimum extraction conditions in this spectroscopic method. Under chromatographic method, carotenoids such as lutein, β -carotene and α -carotene was quantitatively determined by HPLC method and response surface methodology was employed to optimized the optimum extraction conditions. This thesis can be considered as the foundation studies for analysis of carotenoid and the use of our new developed method (CHROMAC) to evaluate the antioxidant recovery of microalgae in the future.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, carotenoids, ultrasonic-assisted extraction, HPLC, central composite design, response surface methodology

2017, x + 63 pages.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez kapsamında *Chlorella vulgaris* mikroalginin spektroskopik, kromatografik ve kemometrik çalışmaları Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Kromatografi Araştırma Laboratuvarı ve Doğal Ürünler Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca benden ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgisi ve deneyimlerini ihtiyaç duyduğum her an benimle paylaşan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Saliha ŞAHİN'e,

Tez çalışmam boyunca bilgi ve varlığıyla desteklerini esirgemeyen değerli hocam Dr. Önder AYBASTIER'e,

Tüm çalışmalarım boyunca hiç bir zaman yardımlarını eksik etmeyen sevgili laboratuvar arkadaşlarım Çiğdem YÜKSEL ve Büşra KARKAR'a,

Yüksek lisans akademik hayatım boyunca idari ve bilimsel olarak her zaman desteklerini esirgemeyen U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde bulunan çok değerli hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarımı OUAP(F)-2013/12 nolu proje ile destekleyen U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ayrıca teşekkür ederim.

Ayrıca, hayatımda sahip olmaktan en çok mutluluk duyduğum, çok değerli babam Mohd Nasir MAHMOOD, annem Fadilah MOHAMED'e, ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım, iyi ki varsınız.

Nur Tsiqah BINTI MOHD NASIR

05/05/2017

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR..... | iii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ..... | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | ix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | x |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI..... | 3 |
| 2.1. Alg..... | 3 |
| 2.1.1. Makroalg..... | 3 |
| 2.1.2. Mikroalg..... | 3 |
| 2.1.3. Mikroalgler kullanım alanları..... | 4 |
| 2.2. <i>Chlorella vulgaris</i> | 4 |
| 2.3. Karotenoidler..... | 5 |
| 2.3.1. Karotenoidlerin Önemi..... | 7 |
| 2.3.2. Karotenoidlerin Analizi..... | 8 |
| 2.3.2.1. Örnek alma..... | 8 |
| 2.3.2.2. Örnek hazırlama..... | 9 |
| 2.3.2.3. Ekstraksiyon..... | 9 |
| 2.3.2.4. Saponifikasyon..... | 10 |
| 2.3.2.5. Kromatografik ayırma..... | 10 |
| 2.3.2.6. Tanımlama (İdentifikasyon)..... | 11 |
| 2.3.2.7. Kantitatif tayini..... | 11 |
| 2.3.3. Karotenoidlerin tayin edilmesi..... | 12 |
| 2.3.3.1. HPLC-DAD ile karotenoidlerin tayini..... | 13 |
| 2.4. Yanıtlı yüzey analiz yöntemleri..... | 13 |
| 2.4.1. Deneysel dizayn..... | 14 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM..... | 15 |
| 3.1. Materyal..... | 15 |
| 3.1.1. Çalışmada kullanılan aletler..... | 15 |
| 3.1.1.1. Mör ötesi-görünür bölge (UV/VIS) spektrofotometresi..... | 15 |
| 3.1.1.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD)..... | 15 |
| 3.1.1.3. pH metre..... | 15 |
| 3.1.1.4. Analitik terazi..... | 16 |
| 3.1.1.5. Saf su cihazı..... | 16 |
| 3.1.1.6. Isıtıcı karıştırıcı..... | 16 |
| 3.1.1.7. Ultrasonik banyo..... | 16 |
| 3.1.1.8. Liyofilizatör..... | 16 |
| 3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroalg türü..... | 16 |
| 3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler..... | 16 |
| 3.1.3.1. Kimyasallar..... | 16 |
| 3.1.3.1.1 Analitik saflıktaki kimyasallar..... | 17 |
| 3.1.3.1.2. Diğer kimyasallar..... | 17 |
| 3.1.3.1.3. Sarf malzemeler..... | 18 |

| | |
|--|----|
| 3.1.3.2. Çözeltiler..... | 18 |
| 3.1.3.2.1. Toplam fenol, toplam antioksidan kapasite tayinlerinde kullanılan çözeltiler..... | 18 |
| 3.1.3.2.2. Standart karotenoid bileşikleri ile kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması..... | 19 |
| 3.2. Yöntem..... | 19 |
| 3.2.1. Örnek hazırlama işlemleri..... | 19 |
| 3.2.1.1. <i>Chlorella vulgaris</i> ESP-6 izolasyonu, tanımlama ve biyokütle üretimi..... | 19 |
| 3.2.1.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon çalışmaları..... | 19 |
| 3.2.1.3. Ekstraksiyon için çözücü seçimi..... | 20 |
| 3.2.2. Spektroskopik yöntemler..... | 20 |
| 3.2.2.1. Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayini..... | 20 |
| 3.2.2.2. ABTS yöntemi ile antioksidan kapasite tayini..... | 21 |
| 3.2.2.3. CHROMAC yöntemi ile antioksidan kapasite tayini..... | 21 |
| 3.2.2.4. Klorofil <i>a</i> ve <i>b</i> tayini..... | 22 |
| 3.2.2.5. Toplam karotenoid tayini..... | 23 |
| 3.2.3. Kromatografik yöntemler..... | 23 |
| 3.2.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD)..... | 23 |
| 3.2.4. Kemometrik yöntemler..... | 24 |
| 3.2.4.1. Yanıtlı yüzey analiz yöntemi (Response surface methodology)..... | 24 |
| 3.2.4.1.1. Merkezi kompozit dizayn..... | 24 |
| 4. BULGULAR..... | 28 |
| 4.1. Spektroskopik yöntemler..... | 28 |
| 4.1.1. Toplam fenolik madde miktarları..... | 28 |
| 4.1.2. Antioksidan kapasite miktarları..... | 28 |
| 4.1.3. Ekstraksiyon çözücü seçimi..... | 29 |
| 4.2. Kromatografik yöntemler..... | 29 |
| 4.2.1. Ekstraksiyon çözücü seçimi..... | 31 |
| 4.3. Kemometrik yöntemler..... | 32 |
| 4.3.1. Spektroskopik ölçümler için optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi..... | 32 |
| 4.3.1.1. Spektroskopik ölçümler için yüzey analiz grafikleri..... | 35 |
| 4.3.1.2. Spektroskopik ölçümler için optimum koşulları geçerliliği..... | 37 |
| 4.3.2. Kromatografik ölçümler için optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi..... | 37 |
| 4.3.2.1. Kromatografik ölçümler için yüzey analiz grafikleri..... | 41 |
| 4.3.2.2. Kromatografik ölçümler için optimum koşulların geçerliliği..... | 44 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ..... | 45 |
| 5.1. Spektroskopik yöntemler..... | 45 |
| 5.1.1. Ekstraksiyon çözücü seçimi..... | 45 |
| 5.1.2. Kemometrik yöntemler..... | 46 |
| 5.1.2.1. Spektroskopik ölçümler için optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi..... | 46 |
| 5.1.2.2. Spektroskopik ölçümler için yüzey analiz grafikleri..... | 47 |
| 5.1.2.2.1. Toplam fenolik madde miktarı için yüzey analiz grafikleri..... | 47 |
| 5.1.2.2.2. Antioksidan kapasite için yüzey analiz grafikleri..... | 48 |
| 5.1.2.3. Ekstraksiyon parametrelerin optimizasyonu ve modelin validasyonu..... | 49 |

| | |
|--|----|
| 5.2. Kromatografik yöntemler..... | 50 |
| 5.2.1. Ekstraksiyon çözücü seçimi..... | 50 |
| 5.2.2. Kemometrik yöntemler..... | 51 |
| 5.2.2.1. Lutein için yüzey analiz grafikleri..... | 52 |
| 5.2.2.2. β -karoten için yüzey analiz grafikleri..... | 52 |
| 5.2.2.3. α -karoten için yüzey analiz grafikleri..... | 53 |
| 5.2.2.4. Ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu ve modelin validasyonu..... | 53 |
| 5.3. Sonuç..... | 54 |
| KAYNAKLAR..... | 56 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 63 |



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| Simgeler | Acıklama |
|-----------------|----------------------------------|
| c | Toplam karotenoid konsantrasyonu |
| F | Seyreltme faktörü |
| d | Işık yolu |
| N | Deney sayısı |
| k | Faktör sayısı |
| x_0 | Tekrarlanan deney sayısı |
| y | Yanıt |
| b_0 | Sabit terim |
| b_i | Doğrusal etkileşim sabiti |
| b_{ii} | Parabolik etkileşim sabiti |
| b_{ij} | Parametre etkileşim sabiti |
| x_i | Bağımsız değişken |
| x_j | Bağımsız değişken |

| Kısaltmalar | Acıklama |
|--------------------|---|
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-sülfonik asit) |
| CHROMAC | Cr (VI) indirgen antioksidan kapasite |
| CCD | Central composite design (Merkezi kompozit dizayn) |
| GC-MS | Gas chromatography-mass spectrometry (Gaz kromatografi-kütle spektrometri) |
| HPLC | High performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) |
| HPLC-DAD | High performance liquid chromatography-diode array detector (Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör) |
| HPLC-UV/VIS | High performance liquid chromatography-ultraviolet/visible (Yüksek performanslı sıvı kromatografi-ultraviyole/görünür bölge) |
| LC-MS | Liquid chromatography-mass spectrometry (Sıvı kromatografi-kütle spektrometri) |
| LC-MS/MS | Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (Sıvı kromatografi-kütle spektrometri/kütle spektrometri) |
| PDA | Photodiode array (Fotodiod serili) |
| RSM | Response surface methodology (Yanıtlı yüzey analiz yöntemi) |
| SFE | Supecritical fluid extraction (Superkritik akışkan ekstraksiyonu) |

| | |
|--------|---|
| TLC | Thin layer chromatography (İnce tabaka kromatografisi) |
| UAE | Ultrasonic-assisted extraction (Ultrasonik destekli ekstraksiyon) |
| UHPLC | Ultra high performance liquid chromatography (Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi) |
| UV | Ultraviolet (Mor ötesi) |
| UV/VIS | Ultraviolet/Visible spectrophotometry (Mor ötesi/Görünür bölge) |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 2.3.1. Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları..... | 5 |
| Şekil 3.2.1.2.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon çalışması..... | 20 |
| Şekil 4.1.3.1. <i>Chlorella vulgaris</i> ekstraktlarının spektroskopik sonuçları..... | 30 |
| Şekil 4.2.1.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda a)lutein b) α -karoten ve β -karoten için uygun çözücülerin seçimi..... | 31 |
| Şekil 4.3.1.1.1. Toplam fenolik madde miktarı için üç boyutlu yüzey analiz grafikleri a)ekstraksiyon zamanı ve etanol hacmi etkisi, b)ekstraksiyon zamanı ve sıvı/katı oranı etkisi..... | 35 |
| Şekil 4.3.1.1.2. Antioksidan kapasitesi için üç boyutlu yüzey analiz grafikleri a)ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranının ABTS yöntemine etkisi, b)ekstraksiyon zamanı ve sıvı/katı oranının CHROMAC yöntemine etkisi..... | 36 |
| Şekil 4.3.2.1.1. Lutein miktarı için üç boyutlu yüzey analiz grafikleri a)etanol hacmi ve ekstraksiyon sıcaklığı etkisi, b)etanol hacmi ve sıvı/katı oranı etkisi..... | 41 |
| Şekil 4.3.2.1.2. β -karoten miktarı için üç boyutlu yüzey analiz grafikleri a)ekstraksiyon zamanı ve sıvı/katı oranı etkisi, b)etanol hacmi ve ekstraksiyon sıcaklığı etkisi..... | 42 |
| Şekil 4.3.2.1.3. α -karoten miktarı için üç boyutlu yüzey analiz grafikleri a)etanol hacmi ve ekstraksiyon zamanı etkisi, b)etanol hacmi ve ekstraksiyon sıcaklığı etkisi..... | 43 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | Sayfa |
|----------------------|---|
| Çizelge 3.1.1.1.1. | Varian marka Cary 50 cihazının çalışma şartları.....15 |
| Çizelge 3.2.3.1.1. | HPLC-DAD için analiz çalışma koşulları.....23 |
| Çizelge 3.2.4.1.1.1. | Merkezi kompozit dizayn için faktörler ve kodlanmış seviye değerleri.....24 |
| Çizelge 3.2.4.1.1.2. | Kodlanmış seviye değerleri için merkezi kompozit dizayn.....27 |
| Çizelge 4.1.1.1. | Toplam fenolik madde tayini için kalibrasyon denklemi.....28 |
| Çizelge 4.1.2.1. | Antioksidan kapasite tayinleri için kalibrasyon denklemleri...29 |
| Çizelge 4.2.1. | HPLC analizi karotenoidlerin kalibrasyon grafikleri.....29 |
| Çizelge 4.3.1.1. | Kuadratik polinom denklemleri (ekstraksiyon zamanı; x_1 , etanol hacmi; x_2 , ekstraksiyon sıcaklığı; x_3 , sıvı/katı oranı; x_4)...32 |
| Çizelge 4.3.1.2. | Spektroskopik ölçümler için deneysel ve tahmini değerler.....33 |
| Çizelge 4.3.1.3. | Spektroskopik yanıt değerleri için ANOVA analizi sonuçları...34 |
| Çizelge 4.3.1.2.1. | Ultrasonik destekli ekstraksiyon optimum koşulları (çok yanıtlı yüzey analiz tekniği kullanılmıştır).....37 |
| Çizelge 4.3.1.2.2. | Ultrasonik destekli ekstraksiyon tahmini/deneysel toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite değerleri.....37 |
| Çizelge 4.3.2.1. | Kuadratik polinom denklemleri (ekstraksiyon zamanı; x_1 , etanol hacmi; x_2 , ekstraksiyon sıcaklığı; x_3 , sıvı/katı oranı; x_4)...38 |
| Çizelge 4.3.2.2. | Kromatografik ölçümler için deneysel ve tahmini değerler.....39 |
| Çizelge 4.3.2.3. | Kromatografik yanıt değerleri için ANOVA analizi sonuçları...40 |
| Çizelge 4.3.2.2.1. | Ultrasonik destekli ekstraksiyon optimum koşulları.....44 |
| Çizelge 4.3.2.2.2. | Ultrasonik destekli ekstraksiyon tahmini/deneysel karotenoid miktarlarının değerleri.....44 |

1. GİRİŞ

İlaç, gıda ve kozmetik endüstrilerde doğal maddelere ihtiyaç olduğundan mikroalgere büyük talep olmuştur. Mikroalgler, antik bir geçmişe sahiptir ve şimdi ise yeşil kalabilen yenilenebilir bir kaynak olarak gelişmiştir. Herhangi bir zor ortamda hayatta kalabilmek için bu yeteneklerinden dolayı mikroalgere yüksek talep olmuştur. Mikroalgler, hem deniz hem de tatlı sularda bulunabilir. Güneş ışığı veya güneş enerjisi yardımıyla mikroalgler fotosentez ve hatta yeşil biyokütle atık su dönüşümü gerçekleştirmiştir (Batista ve ark. 2013). Sıcak, soğuk, tuzluluk, foto-oksidasyon, anaerobiosis, ozmotik basınç ve ultraviyole gibi çevresel stres faktörlerinin çeşitliliğine karşılık olarak mikroalglerin dinamik hücresel homeostazisi uyum sağlamaktadır (Tandeau de Marsac ve Houmard 1993). Bu yetenek, doğal antioksidanlar gibi biyoaktif bileşiklerin üretilmesi için mikroalgleri belirgin bir hedef yapmaktadır (Castro-Puyana ve ark. 2013). Stres şartları altında mikroalglerde fenolik bileşikler, şekerler, vitaminler ve karotenoidler dahil olmak üzere antioksidan bileşikleri üretilmiştir (Brück ve ark. 2012).

Chlorella vulgaris, zengin protein, yağ, polisakkaritler, boyar madde, vitaminler ve antioksidan bileşikleri içerir; ve insanların tüketimi için tipik olarak yetiştirilen mikroalglerden biridir (Chen ve Jiang 1999). Antioksidanlar arasında ilaç endüstrisinde antioksidan olarak sürekli kullanım nedeniyle karotenoidler özel bir önem taşımaktadır (Silberstein ve Parsons 2010). *Chlorella vulgaris* biyoaktif bileşiklerin yüksek miktarda üretilebilmesi için önemli bir mikroalgdir. Chlorellaceae familyasından *Chlorella vulgaris* 1980 yılında Martinus Willem Beijerinck tarafından keşfedilmiştir (Beijerinck 1890). *Chlorella vulgaris* mikroalginin şekli ise çekirdek gibidir ve küreye benzer. Hücre duvarı sert olduğundan dış ortamlardan kendini koruyabilmektedir. *Chlorella vulgaris*, aseksüel ve yeniden hızlı üreyebilen bir autosporedir. Bu nedenle, her bir stres koşulları altında büyüyebilir. *Chlorella vulgaris*, Japonya, Almanya ve Tayvan'da popüler bir fonksiyonel gıda olarak tüketilmektedir (Brennan ve Owende 2010).

Chlorella vulgaris içerisinde çok fazla klorofil ve karotenoid bileşikler bulunmaktadır. Karotenoidler, lipofilik ve isoprenoit moleküller, deniz hayvanları, çiçekler, çeşitli

meyve ve sebze renklerinden sorumlu bileşiklerdir (Ben-Amotz ve Fishler 1998, Gouveia ve Empis 2003). Karotenoidler organik pigmentler olup kloroplast, bitkilerin kromoplastlar ve diğler bazı fotosentetik organizmalarında da bulunabilirler. Karotenoidler çift bağların sayısına göre pek çok cis-trans izomerini içerirler. Karotenoid bileşiklerinin yapılarında bulunan konjuge çift bağlarının sayısı ne kadar fazlaysa karotenoidlerin renkleri o kadar koyu olabilir. Ancak karotenoid yapılarındaki konjuge çift bağlar; oksijen, ısı, UV ışınları ile parçalanabilir ve renklerini kaybedebilirler (Cohen 2002). Karotenoidler (oksijen içeren) ksantofiller ve karotenler olarak (oksijensiz) iki gruba ayrılır. Ksantofiller (lutein ve zeaksantin gibi) hücrel fotosentetik bileşenleri olarak birincil karotenoidler şeklinde bilinmektedirler. Karotenoidler içerisinde antioksidan ve yaşlanma karşıtı özellikleri bulunan biyoaktif bileşikler olarak kabul edilmektedirler.

Bu çalışmanın amacı; mikroalglerde bulunan karotenoidlerin analizi için spektroskopik ve kromatografik yöntem geliştirme çalışmalarının yapılması ve karotenoidlerin ekstraksiyonu için optimum koşulların yüzey analiz yöntemi ile belirlenmesidir. Bu sebeple, *Chlorella vulgaris*, en uygun mikroalg olarak tercih edilmiştir. Karotenoid maddelerin kalitatif ve kantitatif tayinleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) teknik ile gerçekleştirilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi için de merkezi kompozit dizayn kullanılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Alg

Algler, tatlı ve tuzlu sularda yaşayan organizmalardır. Çoğunlukla tek hücrelidir, kök, gövde ve yaprakları yoktur. Fotosentez yapabilir, boyut ve şekil bakımından farklılık gösterirler. Algler, birçok ekosistemde önemli bir rol oynamaktadırlar. Bunlar, okyanuslar ve iç bölgelerdeki tüm balıkçılık faaliyetlerini destekleyen, su ürünleri zincirlerinin temelini oluşturan, ve nefes aldığımız havanın yaklaşık %70'inin üretiminde etkilidirler (Barsanti ve Gualtieri 2006). Yapılarındaki pigmentleri sayesinde karbondioksit ve suyu ışığın etkisiyle karbohidratlara çevirirler, böylece su ortamındaki besin değerinin ve çözülmüş oksijen oranının artmasını sağlarlar ve kendi gelişimlerini sağlayarak besin zincirinin ilk halkasını oluştururlar. Algler, makroalgler ve mikroalgler olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

2.1.1. Makroalg

Makroalgler, alg krallığının bir alt bölümüdür ve bazen deniz yosunlar olarak ifade edilmiştir. Birkaç istisna dışında, makroalgler kesinlikle bentik bitkilerdir. Yani her zaman deniz tabanına bağlanırlar. Alglerin gözle ayırt edilebilen makroskobik boyutlarda olanları makroalg olarak tanımlanmaktadır. Boyutları genelde 2 cm'den fazladır.

2.1.2. Mikroalg

Alglerin gözle görülemeyen mikroskobik boyutlarda olanları mikroalg olarak tanımlanmaktadır. Boyutları µm ile ifade edilen canlılardır. Mikroalgler, dünyadaki küresel zorluklar, iklim değişiklikleri, yenilenebilir kaynaklardaki kıtlık ve artan nüfus gibi durumlarla karşı karşıya olduğunda biyoaktif bileşikler üretebilirler. Mikroalgler, tek hücreli mikroskopik fitoplankton ve sudaki besin zincirinin birincil üreticisidir. Mikroalgler güneş ışığı yardımıyla H₂O ve CO₂'i bünyelerine alıp karmaşık organik bileşiklere dönüştürebilme, bu bileşikleri bünyelerinde muhafaza edip hücre dışına

salabilme özelliğine sahip mikroorganizmalardır (Chacón-Lee ve González-Mariño 2010, Batista ve ark. 2013). Mikroalgler, protein, karbohidrat ve yağ içeriğinin yanı sıra çok farklı antioksidan özelliğe sahip olan karotenoid bileşikleri üretirler. Geniş spektrumlu çevresel etkilere (çevresel ısı, soğuk, kuraklık, tuzluluk, foto-oksidasyon, anaerobiosis, ozmotik basınç ve UV ışınlarına maruz kalma) karşı uyum sağlayarak yaşamsal aktivelerini sürdürebilmektedirler (Tandeau de Marsac ve Houmard 1993). Bu yetenekleri, mikroalgleri biyoaktif bileşiklerin üretimi için önemli hale getirmiştir. (Castro-Puyana ve ark. 2013). Stres şartları altında mikroalglerde fenolik bileşikler ve/veya karotenoid üretiminin arttığı bilinmektedir (Brück ve ark. 2012). Mikroalgal antioksidanlar arasında ilaç, kozmetik ve fonksiyonel gıda endüstrisinde antioksidanlar olarak sürekli kullanımı nedeniyle karotenoidler özel bir öneme sahiptir (Silberstein ve Parsons 2010, Batista ve ark. 2013, Gouveia ve ark. 2010). Bu mikroorganizmalar dünya çapında yaygın olarak bulunmaktadır. Dünyada mikroalg türlerinin sayısının 200.000'den fazla olduğu tahmin edilmektedir (Norton ve ark. 1996). İnsan hayatı için gerekli olan doğal maddelerin geniş bir yelpazede potansiyel üreticileri olmasına rağmen, mikroalgler biyoteknolojinin gelişimi ile araştırma kaynağı olmuşlardır (Goyal ve Goyal 1998). Pek çok mikroalg türü (*Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus*) uzun yıllardır besin kaynağı olarak kullanılmaktadır ve hala Çin, Fiji gibi ülkelerde kullanıldığı belirtilmiştir (Prasad ve Gupta 2007).

2.1.3. Mikroalgler kullanım alanları

Mikroalgler biyokütle olarak çeşitli alanlarda kullanılabilir. Bunlar:

- İnsan ve hayvan besleme
- Su kültürü
- Terapötik uygulama
- Biyoyakıt üretimidir

2.2. *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris, tek hücreli bir mikroalgdir. Protein, vitamin, polisakkarit, klorofil ve karotenoid gibi birçok biyoaktif bileşikleri içermektedir. Hücre duvarı, hemikelüloz

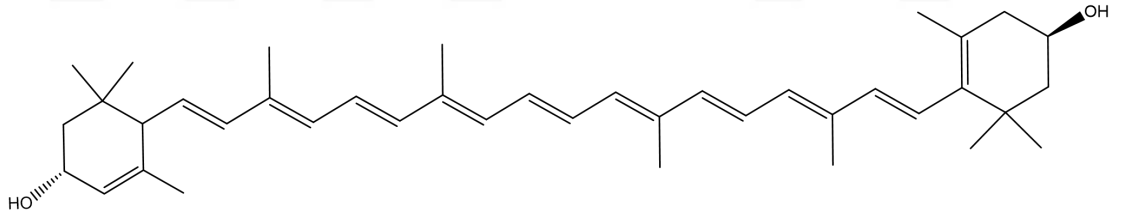
(%25) ve alkali çözünmez sert duvar olarak iki ana bölümden oluşmaktadır (Abo-Shady ve ark. 1993, Sui ve ark. 2012). *Chlorella vulgaris*, %51-58 protein, %12-17 karbohidrat ve %14-22 yağ içermektedir.

2.3. Karotenoidler

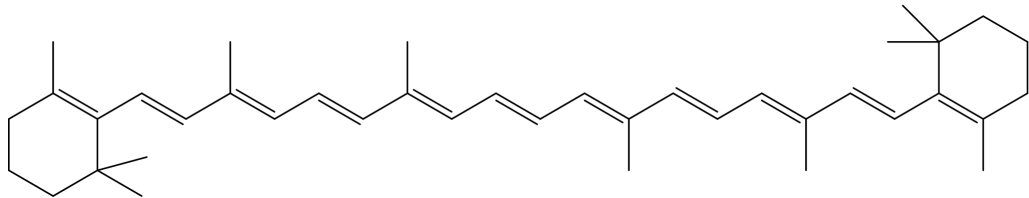
Karotenoidler, organik pigmentlerdir. Kloroplast, bitkilerin kromoplastlar ve diğer bazı fotosentetik organizmalarda da bulunabilirler. Günümüzde, 700'ün üzerinde bilinen karotenoid vardır. Karotenoidler çift bağların sayısına göre pek çok cis-trans izomerini içerirler. Ancak karotenoid yapılarındaki konjuge çift bağlar, oksijen, ısı, UV ışınları ile parçalanabilir ve oksidasyona uğrayabilirler (Cohen 2002). Karotenoidler yapılarına göre iki temel gruba ayrılırlar:

- Ksantofiller: Karotenlerin oksijenli türevleri olup, epoksi, hidroksi, keton, karboksilik, glikozid, allenik, ya da asetilen grupları içermektedir.
- Karotenler : Oksijensiz hidrokarbonlardan oluşan pigmentlerdir.

Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları Şekil 2.3.1'de verilmektedir.

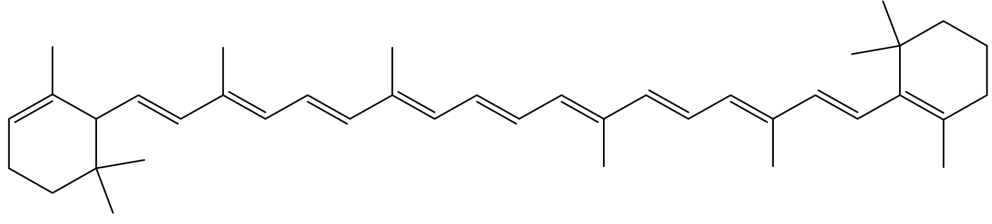


Lutein

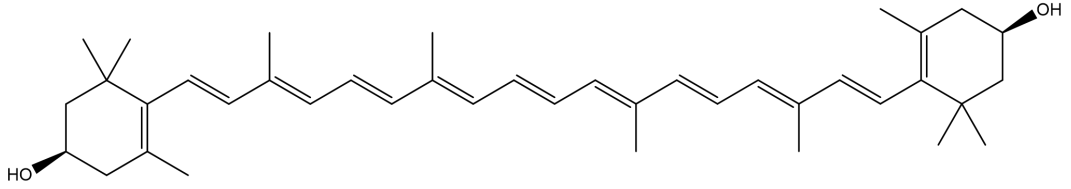


β-karoten

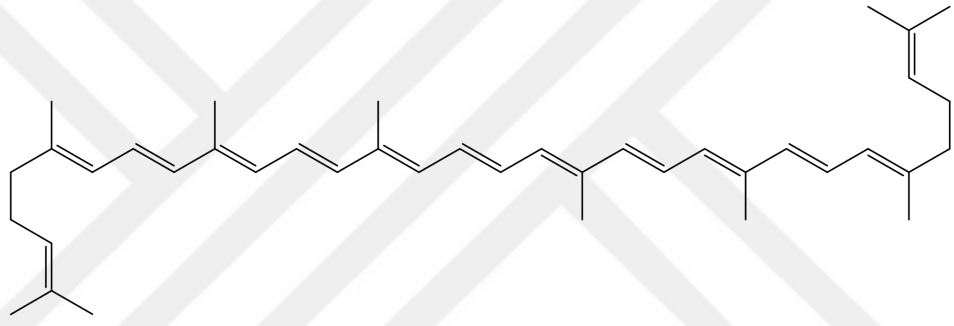
Şekil 2.3.1. Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları



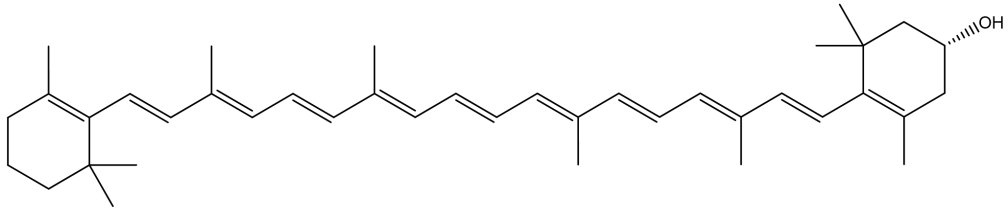
α -karoten



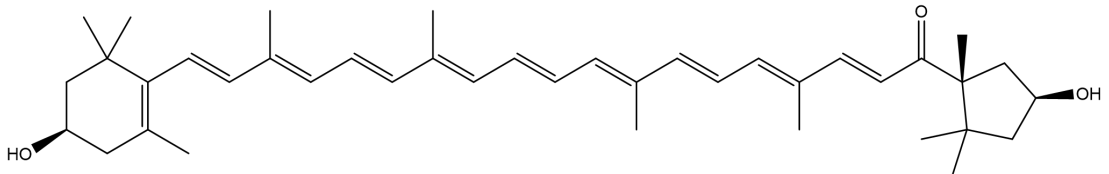
Zeaksantin



Likopen

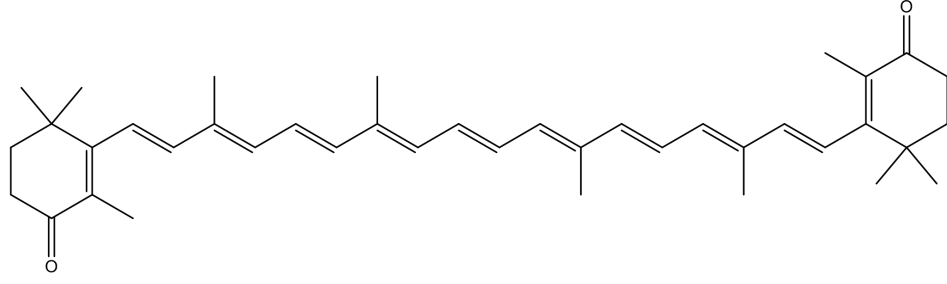


β -kriptoksantin

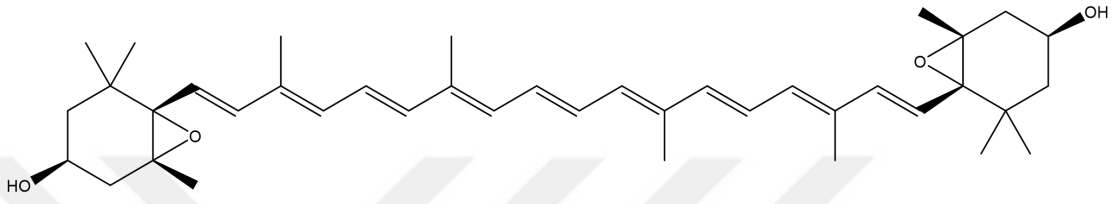


Kapsantin

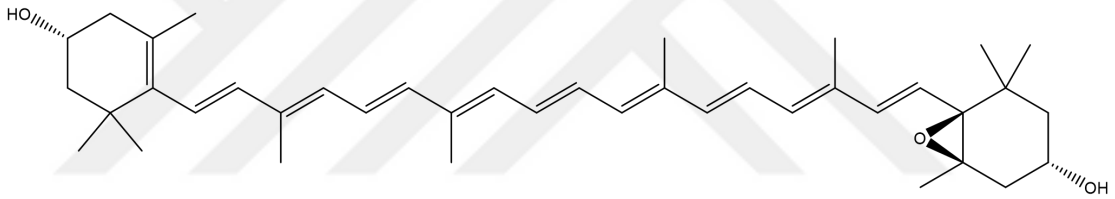
Şekil 2.3.1. Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları (devamı)



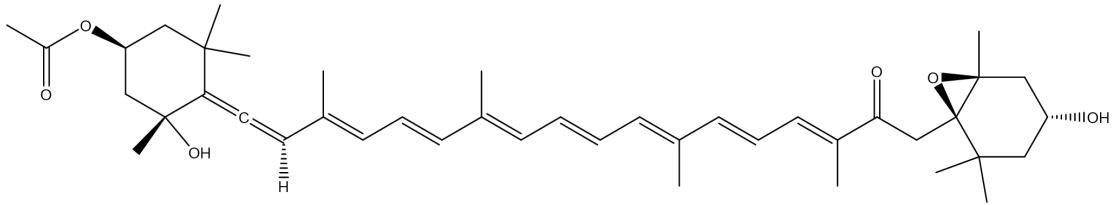
Kantaksantin



Violaksantin



Anteraksantin



Fukosantin

Şekil 2.3.1. Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları (devamı)

2.3.1. Karotenoidlerin Önemi

Hastalıkların önlenmesinde karotenoid ve karotenoid metabolitlerinin rolünün anlaşılması çok zordur. Çünkü karotenoidlerin biyoyararlılık özellikleri pek çok faktöre

(absorpsiyon, dağılım, ulaşım ve depolama vb.) bağlı olarak değişmektedir (Yeum ve Russell 2002). Renk pigmenti içeren sebze ve meyveler, başlıca karotenoid besin kaynaklarıdır. Sarı-turuncu sebzeler ve meyveler β -karoten ve α -karoten açısından, turuncu meyveler α -kriptoksanthin açısından, koyu yeşil sebzeler ise lutein ve domates, domates ürünleri de likopen açısından zengindirler (Rao ve Rao 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalar karotenoidlerin hastalık önleme özelliklerini belirlemek için yapılmaktadır.

β -karoten ve bazı karotenoidlerin insan sağlığı üzerine etkileri Mayne tarafından 1996 yılında araştırılmıştır. Çeşitli reaktif oksijen türleri, kanser, diyabet, kardiyovasküler gibi dejeneratif hastalıkların oluşumuna sebep olmaktadır (Ariga 2004). Yapılan çalışmalarda β -karoten içeriği zengin olan gıdaların tüketilmesi ile kardiyovasküler hastalık risklerinin azaldığı belirlenmiştir (Kardinaal ve ark. 1993, Gaziano 1994). Karotenoidlerin singlet moleküler oksijenini giderme özelliği çok iyi bilinmektedir (Conn ve ark. 1991, Edge ve ark. 1997). Karotenoidler, birçok radikal ile tepkimeye girerek, elektron transferi ile radikal karotenoid katyonunu oluştururlar (Mortensen ve ark. 2001). Yapılan çalışmalarda likopenin belirli organları kemokoruyucu etkisi hayvan modellerinde akciğer ve prostat koruyucu etkisi şeklinde uygulanmaktadır (Conn ve ark. 1991).

2.3.2. Karotenoidlerin Analizi

Karotenoidlerin analizi için genel prosedür örnek alma, örnek hazırlama, ekstraksiyon, saponifikasyon, kromatografik ayırma, tanımlama (identifikasyon) ve kantitatif tayinidir (Rodriguez-Amaya ve Kimura 2004).

2.3.2.1. Örnek alma

Horwitz (1988) örnek almayı, laboratuvara gönderilen herhangi birşey örnekleme sürecinin bir parçası olarak laboratuvar numunesinin bir test numunesine indirgenmesi olarak tanımladı. Örnek almanın amacı, maddenin tümünün tatmin edici bir biçimde temsil edilebilmesidir (Pomeranz ve Meloan 1994).

2.3.2.2. Örnek hazırlama

Numune hazırlama işleminin amacı, laboratuvarında bulunan büyük numuneyi homojenleştirmek ve daha sonra, analiz için boyutu ve miktarı azaltmaktır (Pomeranz ve Meloan 1994).

2.3.2.3. Ekstraksiyon

Karotenoidlerin mikroalglerden ekstrakte edilmesi için gereken maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerine dikkat edilmelidir. İyi bir ekstraksiyon işlemi için tüm karotenoidleri gıda matrisinden alıp onları değişmeden çözelti ortamına alabilmek önemlidir. Karotenoidler doğal ürünler olduğu için ekstraksiyon yöntemi, analiz edilecek mikroalgere uyacak şekilde uyarlanmalıdır. Maddenin doğasına, ekstraksiyon çözücüsünün kolaylığına, ekstrakte edilen bileşiklerin özelliklerine göre ekstraksiyon yöntemi seçilmektedir. Karotenoidlerin alglerden ekstraksiyonu durumunda verimli ekstraksiyon için mekanik bir bozulma veya ön işleme tutulması gerekmektedir. Ultrasonik destekli, süperkritik akışkan ve mikrodalga ekstraksiyonu gibi çeşitli ekstraksiyon teknikleri getirilmiştir. Bunların arasında, ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE), endüstriyel üretim için ucuz, ekonomik ve uygun teknik olup doğal biyoaktif bileşiklerin ekstrakte edilmesi için yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Şahin ve ark. 2013). UAE'nin etkinliği, klasik ekstraksiyona kıyasla biyoaktif bileşiklerin, örneğin antioksidanların ekstraksiyonu için daha yüksek geri kazanım verimi sağladığı biçiminde gösterilmiştir (Pingret ve ark. 2012).

Özellikle ultrasonik destekli ekstraksiyon, yüksek verimlilik ve ekstraksiyon oranı açısından antioksidanların ekstraksiyonu için yaygın olarak uygulanmıştır (Galvan D'Alessandro ve ark. 2012, Jacotet-Navarro ve ark. 2015, Chen ve ark. 2015). Karotenoidlerin alglerden ekstrakte edilmesi için asetona (etil alkol veya aseton: etil alkol) kıyasla daha polar çözücüler kullanılabilir. Etanol ve etanol/su çözücüsü kullanılarak karotenoidlerin ekstraksiyonu için sayısız çalışmalar yapılmıştır (Arvayo-Enríquez ve ark. 2013). Ekstraksiyon çözücüsü olarak etanol kullanılmasının daha etkili, düşük maliyetli, erişim kolaylığı ve gıda, ilaçlarda doğrudan kullanımı için güvenliği

olduğu kanıtlanmıştır (Albu ve ark. 2004, Xu ve Bao 2014, Dailey ve Vuong 2015). Karotenoidlerin analizi için düşük kaynama noktası olan organik çözücüler seçilir. Etanol, metanol, aseton ve kloroform en çok tercih edilen organik çözücülerdir. Seçilen zc ile verimli bir şekilde numunede bulunan tüm karotenoidler ekstrakte edilmelidir. rnek, genellikle 1-2 dakika ile uygun bir mekanik karıştırıcıda bir çözücü ile ya da havanda homojenize edilir. Başka bir alternatif yol vorteks kullanılabilir. Ancak bu yöntem yalnızca ince öğütülmüş numuneleri kolayca ekstrakte etmek için kullanılmalıdır.

2.3.2.4. Saponifikasyon

Saponifikasyon, klorofiller ve istenmeyen lipidlerin uzaklaştırılmasında etkili bir yöntemdir. Çoğu meyve ve sebze için orta düzeyde saponifikasyon koşulları kullanılır. Azot veya argon gibi inert bir atmosfer altında ekstraktların alkollü potasyum veya sodyum hidroksit (etanol veya metanolde %5-10 w/v) ile karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Ayrıca saponifikasyon da yağ esterleri hidrolize edilir ve karotenoidler serbest kalır.

Saponifikasyon işlemi, klorofil ve istenmeyen lipidlerin ortamdaki uzaklaştırmak için yapılır. Elde edilen organik çözücüye % 10 metanol-KOH karışımı belirli hacimlerde eklenir. Elde edilen karışım, oda sıcaklığında karanlıkta gece boyunca bırakılır, ve daha sonra alkali ortamdaki uzaklaştırmak üzere su ile yıkanır. Özellikle yıkama suyuna daha fazla polar olanlardan karotenoidler olabilir bu nedenle yıkama işleminde daha dikkatli olunmalıdır. Saponifikasyondan sonra ortamdaki suyu gidermek için susuz sodyum sülfat ile kullanılır.

2.3.2.5. Kromatografik ayırma

Kromatografi (kompleks karışımların ayrıştırılması veya analizi için taşarlanmış teknikler), biyolojik bileşenlerin kolondan elsyonla ayrılmasıyla saflaştırma için uygulanmaktadır. Karotenoid ayırma için en önemli yöntem olan kolon kromatografisinin yerini yakın zamanda ince tabaka kromatografisi almıştır.

Karotenoidlerin tayin edilmesi için genellikle terz faz HPLC cihazı tercih edilmektedir. C18 ve C30 HPLC kolonlarının karotenoid tayinlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Mobil faz olarak da hem gradient hem izokritik çözücü sistemleri kullanılmaktadır.

2.3.2.6. Tanımlama (İdentifikasyon)

Herhangi bir maddenin tanımlanması fiziksel yöntemlerle (spektral) ve/veya kimyasal yöntemlerle yapılabilir. Fiziksel yöntemler, geniş uygulanabilirlik, numunenin bütünlüğünün korunması, hızlı tespitler, mükemmel sonuç tekrarlanabilirliği ve yüksek hassasiyet gibi sayısız avantajlar sağlamıştır. Karotenoidler, belirli reaktifler ile farklı fonksiyonel gruplara karşı reaksiyon karakteristiği gösterir. Karotenoidler için yapılan kimyasal araştırmalar, uzun süre (saat, gün), büyük miktarlarda madde gerektiren, geri dönüşümsüz tüketen ve sınırlı yapısal bilgiler gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bunun için karotenoidlerin kimyasal yapısının belirlenmesi için fiziksel yöntemler kullanılır. Karotenoidlerin en önemli özelliği karotenoid kromoforunun bir fonksiyonu olan absorpsiyon özelliğidir. Karotenoidlerin en önemli tanımlama süreci, farklı solventlerle yapılan absorpsiyon spektrumunun belirlenmesidir. Absorpsiyon özellikleri kolon kromatografisi veya TLC ile araştırılmaktadır. Karotenoidlerin tanımlanması, pigment molekülündeki farklı fonksiyonel grupları bulgulayan kimyasal testlerle de yapılabilir.

2.3.2.7. Kantitatif tayini

Çözeltide bulunan karotenoidler Lambert-Beer yasasına uyumlu olacak şekilde spektroskopik olarak tayin edilebilir. Böylece karotenoidlerin absorbansı doğrudan konsantrasyon ile orantılı olacaktır. Ancak istenen çözücü içindeki molar absorpsiyon katsayıları elde edilmelidir. HPLC ile nicel analizde aşağıdaki gerçekler göz önünde bulundurulmalıdır:

- Karotenoidler farklı dalga boyunda absorpsiyon yapabilir ve farklı absorpsiyon katsayısına sahiptir.
- Absorpsiyonda çözücü etkisi önemlidir. Absorpsiyon katsayıları ve λ_{maks} değerleri çözücü ortamına bağlıdır.

- Kalibrasyon için gerekli olan karotenoid standartların elde edilmesi ve temini zordur.

2.3.3. Karotenoidlerin tayin edilmesi

Karotenoidlerin ilk analizi, ince tabaka kromatografisi (TLC) ile nitel bir biçimde belirlenmiştir. Fakat en önemli sorun bir ayırmaya ihtiyaç duyulmasıdır (Hodisan ve ark. 1997). Bu nedenle, kütle dedektörlerini kullanmak karotenoidlerin analizi için zaman kazandırdığı için diğer tekniklerden daha büyük avantajlar sağlamıştır (Sander ve ark. 1994). Bununla birlikte, karotenoidleri tanımlamak için kullanılan en yaygın teknik HPLC-UV/VIS'dir. Ancak, β -kriptoksantin ve zeaksantin gibi karotenoidlerin yapısal benzerlikleri nedeniyle HPLC-UV/VIS analizlerinde sıkıntı yaşanabilir. Dolayısıyla, diğer tamamlayıcı saptama yöntemlerini kullanmak gereklidir (Su ve ark. 2002). LC-MS (Wang ve ark. 2010), SFE (Kadam ve ark. 2013), HPLC-DAD (Cha ve ark. 2010, Castro-Puyana ve ark. 2013, Zou ve ark. 2013, Aman ve ark. 2005) ve UHPLC (Pacini ve ark. 2015, Suzuki ve ark. 2015) ile karotenoidlerin belirlenmesine ilişkin bir çok çalışma yapılmıştır.

Karotenoid tanımlama, kütle spektrumu ile yayınlanan iyon parçacıklarının veya kütle spektrumunun karşılaştırılmasıyla kütle spektrometrisine bağlı sıvı kromatografi ile teyit edilebilir. Bilinmeyen tepe noktalarında ise çevrimiçi fotodiod serili (PDA) veya UV-Vis dedektörünün ve LC-MS/MS'nin birleşimi, tanımlanmaları için değerli verileri sağlayabilir. Karotenoidlere görünür bölgede ışığı absorbe edilmesi özelliğini verdiği için diğer pratik sonuçları da vardır. Kromatogramlar her bileşenin λ_{maks} 'ında ve her bileşiğin absorpsiyon spektrumu eşzamanlı olarak izlenebilir. Bunun için HPLC çalışması sırasında çevrimiçi olarak tespit edilebilen tanımlama için ilk kriterdir. Belirli bir bileşik için izleme dalga boyundaki absorbansın, absorpsiyon katsayılarının bilinmekte olduğu λ_{maks} 'daki absorbansa oranı bir karışımdaki farklı bileşenlerin nicel analizine izin verir.

Karotenoidler genellikle hidrofobik moleküllerdir. Diğer bileşik sınıflarında olduğu gibi kutupsal fonksiyonel grupların varlığı, HPLC üzerindeki davranışın önemli bir

belirleyicisidir. Son grupların doğası, molekülün genel boyutunu ve şeklini değiştirir. Doygunluğun derecesi de etkidir ve farklı şekillere sahip olan E/Z izomerleri, bazı sistemlerde iyi çözülmüştür. Son olarak, bazı optik izomerler kiral faz kolonları üzerinde çözülebilir.

Uygun bir HPLC prosedürü seçerken iyi bir başlangıç noktası, önce benzer bileşenlerin ayrılması için yayınlanan bir metodu kullanmak veya gerektiğinde uyarlanabilen tanıdık bir genel yöntem kullanmaktadır. Tercih edilen bir yöntem optimize edilip standardize edildiğinde bunu rutin bir yöntem olarak kullanmak büyük bir avantajdır. Daha sonra farklı analizlerle karşılaştırılabilir ve birbiriyle ilişkilendirilebilir.

2.3.3.1. HPLC-DAD ile karotenoidlerin tayini

C18 kolonları, özellikle kısa zincirler ve düşük molekül ağırlıklı olan çok çeşitli analitler için iyi bir ayırım sağlamaktadır. Ancak daha uzun alkil zincirleri olan C30 kolonları, uzun zincirli analitler için daha iyi seçicilik sağlamaktadır. Bu nedenle C30 sabit fazlar, klasik C8 ve C18'e göre moleküler şekil ayırımında ve seçicilikte önemli ve çoğu zaman daha üstün genel iyileştirme göstermektedir. C30 kolonlar, daha az polar karotenlerin geometrik izomerlerinin daha iyi ayrılması ve yüksek çözünürlüğü için daha avantajlıdır. Ancak gıdalardan ksantofiller ve karotenler dahil olmak üzere karotenoidlerin genel analizine uygulandığında, polimerik C30 paketlemeleri geleneksel C18 kolonlarla elde edilenlere benzer profiller verir, fakat kromatografik süreler daha uzundur (Daood ve ark. 2014). Genel olarak, terz faz C8, C18 veya C30 bağlı faz kolonları kullanılan HPLC yöntemi, biyolojik ortamdan saflaştırılan basit özütlerde karotenoidlerin ayrılması için tercih edilen bir tekniktir.

2.4. Yanıtlı yüzey analiz yöntemleri

Yanıtlı yüzey analiz yöntemleri (RSM), çok değişkenli bir sistem için en uygun koşulları elde etmek için deneysel bir tasarım ve optimizasyon içeren etkili bir tekniktir. Bu yöntem bitkilerin antioksidan bileşiklerinin optimizasyonunda başarıyla uygulanmıştır (Şahin ve ark. 2013). Optimizasyon üzerine yapılan araştırma

çalışmalarının çoğu, yalnızca bir faktörün olduğu yerde odaklanmış (Lai ve ark. 2014) fakat bu yaklaşım zaman alıcı, pahalı ve değişkenler arasındaki etkileşimin değerlendirilmesine izin vermemektedir (Matshedisso ve ark. 2015). Çok yanıtlı yüzey yöntemi ise birden fazla bireysel parametrenin ve etkileşimlerinin değerlendirilmesi için etkili bir yöntem olarak düşünülmüştür (Baş ve Boyacı 2007). Bu teknik, bir takım ilgili yanıtların çeşitli parametrelerden etkilendiği süreçleri geliştirme, iyileştirme ve optimize etme konusunda yardımcı olur (Baş ve Boyacı 2007). RSM, birçok literatür araştırmasında başarıyla uygulanmıştır (Aybastier ve ark. 2011, Kong ve ark. 2012, Şahin ve ark. 2013).

2.4.1. Deneysel dizayn

Merkezi kompozit dizayn (CCD), yanıtlı yüzey analiz yöntemlerinden biri olup; optimizasyon, geniş yelpazedeki faktörlerin hızlı bir şekilde taranmasına izin verdiği gibi her faktörün rolünü de göstermektedir (Aybastier ve ark. 2011). CCD, analitik prosedürlerin geliştirilmesi için en çok kullanılan simetrik ikinci dereceden deneysel tasarımıdır (Bezerra ve ark. 2008). Merkezi kompozit dizayn (CCD), bir dizi 'yıldız noktası' ile zenginleştirilen tam faktöriyel veya kesirli faktöriyel tasarımdan oluşan deneysel tasarımdan biridir. RSM ile CCD, değişkenleri optimize etmek ve tatmin edici sonuçlar vermek için en güvenilir ve verimli tekniklerden biridir (Aybastier ve Demir 2010). Böylece karotenoidlerin ultrasonik destekli ekstraksiyonu ile optimize edilmesi, RSM ve CCD ile gerçekleştirilebilir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan aletler

3.1.1.1. Mor ötesi-görünür bölge (UV/VIS) spektrofotometresi

Çalışmada Varian marka Cary 50 (Avustralya) model UV/VIS spektrometre kullanılmıştır. Ölçümler 1 cm kuvarz hücreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasındaki çalışma şartları Çizelge 3.1.1.1.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1.1.1.1. Varian marka Cary 50 cihazının çalışma şartları

| | | |
|------------------------|-----------------|---------------|
| Ölçüm birimi | Absorbans | |
| Ölçüm aralığı | Alt değer:0,0 | Üst değer:3,0 |
| Dalgaboyu aralığı (nm) | 200-800 | |
| Tarama hızı | 0,5 nm aralıklı | |
| Örnekleme aralığı | Otomatik | |

3.1.1.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD)

Chlorella vulgaris mikroalginde bulunan karotenoid bileşikleri HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. Karotenoid bileşiklerin HPLC-DAD ile analizinde, Agilent Technology Series 1200 HPLC sistem (Waldbronn, Almanya) model kullanılmıştır.

3.1.1.3. pH metre

Çalışmada HANNA HI 221 model pH metre kullanılmıştır.

3.1.1.4. Analitik terazi

Deneysel çalışmalar sırasında çözelti hazırlama işlemleri için Radwag Wagi Electroniczne AS220/C/2 marka analitik terazi kullanılmıştır.

3.1.1.5. Saf su cihazı

Analizler sırasında kullanılan su, ELGA DV25 marka saf su cihazından (su saflığı 18,2MΩ × cm) sağlanmıştır.

3.1.1.6. Isıtıcı karıştırıcı

Deneysel çalışma sırasında çözeltilerin hazırlanması için VELP SCIENTIFICIA marka ısıtıcı karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.1.7. Ultrasonik banyo

Deneysel çalışmalar sırasında örneklerin ekstrakte edebilmesi için United marka ultrasonik banyo kullanılmıştır.

3.1.1.8. Liyofilizatör

Deneysel çalışmalar sırasında örneklerin liyofilize edilebilmesi için LABCONCO marka liyofilizatör kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroalg türü

Bu çalışmada mikroalg olarak *Chlorella vulgaris* analiz edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

3.1.3.1. Kimyasallar

3.1.3.1.1. Analitik saflıktaki kimyasallar

- Merck, Metanol
- Merck, Etanol
- Merck, Aseton
- Sigma-Aldrich, Trimetil amin
- Merck, Tert-bütıl metil eter
- Sigma-Aldrich, Sodyum karbonat
- Riedel-de Haen, Sodyum hidroksit
- Merck, Sodyum potasyum tartarat
- Merck, Bakır sülfat
- Merck, Potasyum persülfat
- Merck, Sodyum dihidrojen fosfat
- Merck, Fosforik asit
- Merck, Potasyum dikromat
- Merck, 1,5-difenilkarbazit
- Merck, Monosodyum hidroksit
- Merck, Hidroklorik asit
- Merck, Sitrik asit

3.1.3.1.2. Diğer kimyasallar

- Sigma-Aldrich, Gallik Asit
- Sigma-Aldrich, Folin-Ciocalteu fenol reaktifi
- Sigma-Aldrich, ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-sülfonik asit))
- Acros, Troloks (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)
- Sigma-Aldrich, β -karoten
- Sigma-Aldrich, Lutein
- Sigma-Aldrich, α -karoten

3.1.3.1.3. Sarf malzemeler

- 10-100 μ L aralıklı mikropipet (Eppendorf)
- 100-1000 μ L aralıklı mikropipet (Eppendorf)
- 500-5000 μ L aralıklı mikropipet (Eppendorf)

3.1.3.2. Çözeltiler

3.1.3.2.1. Toplam fenol, toplam antioksidan kapasite tayinlerinde kullanılan çözeltiler

- Lowry A çözeltisi (0,1 M NaOH - %2 Na₂CO₃ (w/v)): 0,4 g NaOH ve 2 g Na₂CO₃ suda çözülerek hacmi saf su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- Lowry B çözeltisi (%1 NaKC₄H₄O₆ ve %5 Cu₂SO₄ (w/v)): 1 g NaKC₄H₄O₆ ve 0,5 g Cu₂SO₄ suda çözülerek hacmi saf su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- Lowry C: 50 mL Lowry A ve 1 mL Lowry B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 7 mM ABTS stok çözeltisi: 0,1920 g ABTS tartılıp saf su çözülmüş, 0,0331 g K₂S₂O₈ ilave edilerek karıştırılmış ve sonra hacmi saf su ile balon jodede 50 mL'ye tamamlanmış, karanlıkta 12-16 saat bekletilmiştir.
- pH 2,8 tamponu: 6,24 g NaH₂PO₄.2H₂O tartılıp 0,68 mL H₃PO₄ (%85, w/v) ilave edilerek hacmi saf su ile balon jodede 1L'ye tamamlanmıştır.
- 3,4 x 10⁻⁴ M Cr⁶⁺ çözeltisi: 0,005 g K₂Cr₂O₇ tartılıp hacmi pH 2,8 tamponu ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 3,4 x 10⁻⁴ M 1,5-difenilkarbazit çözeltisi: 0,1 g 1,5-difenilkarbazit, 70 mL aseton, 30 mL tampon ilave edilerek hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 20,63 mL alınıp pH 2,8 tamponu ile hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- 0,1 M sitrik asit çözeltisi: 1,0507 g sitrik asit tartılıp 10 mL 0,1 N NaOH ilave edilerek hacmi su ile balon jodede 50 mL'ye tamamlanmıştır.
- 6 M HCl çözeltisi: 6,44 mL %35 HCl'den alıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- pH 1,2 tamponu çözeltisi: 1,45 mL 0,1 M sitrik asit ve 8,55 mL 6 M HCl karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.3.2.2. Standart karotenoid bileşikleri ile kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD) cihazı için standart karotenoid bileşikleri ile kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir standart karotenoidlerin derişimi 0-10 mg/L standart çözeltileri hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada yöntemler dört ana başlıkta toplanabilir. Bunlar;

- Örnek hazırlama işlemleri,
- Spektroskopik yöntemler,
- Kromatografik yöntemler,
- Kemometrik yöntemler.

3.2.1. Örnek hazırlama işlemleri

Tez kapsamında *Chlorella vulgaris* mikroalg ile çalışılmıştır. Bu mikroalg İstanbul Medeniyet Üniversitesi'nde bulunan Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK tarafından temin edilmiştir. *Chlorella vulgaris* mikroalg belirli koşullarda kültüre edilmiştir (Nasir ve ark. 2017). Kültür edilen mikroalg hasat edildikten sonra ekstraksiyon işlemleri yapılmıştır.

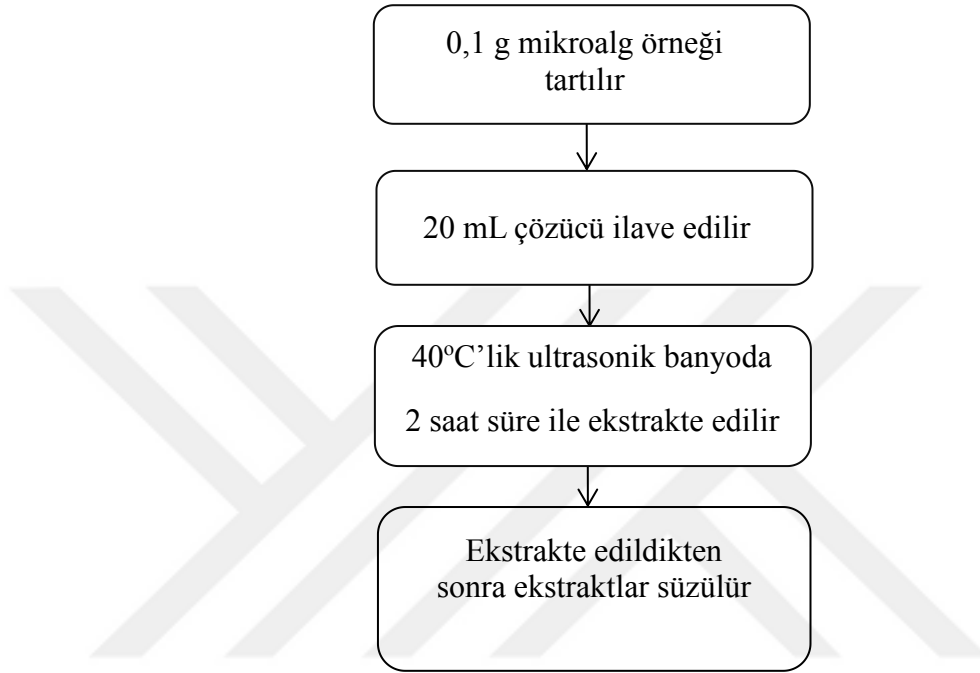
3.2.1.1. *Chlorella vulgaris* ESP-6 izolasyonu, tanımlama ve biyokütle üretimi

Chlorella vulgaris mikroalginin izolasyon, tanımlama ve biyokütle üretimi Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK tarafından yapılmıştır (Nasir ve ark. 2017).

3.2.1.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon çalışmaları

Chlorella vulgaris kültüre edildikten sonra örnekler liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen örneklerden belirli miktarlarda tartılarak çözücü ekstraksiyonu

gerçekleştirilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon, sıcaklık kontrollü ultrasonik banyo kullanılarak yapılmıştır. Aynı zamanda ekstraksiyon sıcaklığı termometre ile kontrol edilmiştir. Her bir ekstraksiyon çalışması karanlıkta yapılmıştır. Ekstraksiyon çalışması Şekil 3.2.1.2.1’de verilmiştir.



Şekil 3.2.1.2.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon çalışması

3.2.1.3. Ekstraksiyon için çözücü seçimi

Chlorella vulgaris ekstraksiyonu işlemlerinde uygun çözücünün seçimi için farklı derişimlerde metanol, etanol ve aseton (%100, %80, %60 (v/v)) çözeltileri kullanılmıştır. Çözücü seçimi için uygulanan ekstraksiyon çalışması Bölüm 3.2.1.2’de açıklanmıştır.

3.2.2. Spektroskopik yöntemler

3.2.2.1. Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde miktarının tayin edilmesi için standart galik asit kalibrasyon grafiği ile karşılaştırarak gerçekleştirilmiştir. Örneklere (0,2 mL) 1,8 mL saf su ve 2,5

mL Lowry C çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra 0,25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Karışım, 30 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiş ve 750 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Örnekler için toplam fenolik madde miktarları hesaplanan kalibrasyon denklemi kullanılarak “mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g liyofilize alg” şeklinde hesaplanmıştır (Güçlü ve ark. 2006, Şahin ve ark. 2013).

3.2.2.2. ABTS yöntemi ile antioksidan kapasite tayini

Chlorella vulgaris türünden elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite tayini ABTS yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Apak ve ark. 2008, Şahin ve ark. 2013). Hazırlanan 7 mM ABTS çözeltisi etanolle 1:10 oranında seyreltilmiştir. ABTS yönteminde bu seyreltilmiş ABTS çözeltisi kullanılmıştır. Kör örnek için 4 mL etanol ve 1 mL ABTS karıştırılarak 6 dakika sonunda 734 nm dalga boyunda absorbans değeri okunmuştur ($A_{k\ddot{o}r}$). Ekstraktlara (0,2 mL) 3,8 mL etanol ve 1 mL ABTS çözeltisi ilave edilerek karıştırılmış, 6 dakika sonunda 734 nm de absorbans değeri okunmuştur ($A_{\ddot{o}rnek}$). Ölçümler sonucunda ekstraktlar için % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_{k\ddot{o}r} - A_{\ddot{o}rnek}}{A_{k\ddot{o}r}} \times 100 \quad (3.2.2.2.1)$$

ABTS yönteminde standart madde olarak troloks kullanılmıştır. Her bir standart troloks çözeltisinin 734 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek troloks derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Ekstraktlar için antioksidan kapasite değerleri hesaplanan kalibrasyon denklemi kullanılarak “mg troloks eşdeğeri (TE)/g liyofilize alg” şeklinde hesaplanmıştır.

3.2.2.3. CHROMAC yöntemi ile antioksidan kapasite tayini

Chlorella vulgaris ekstraktlarının antioksidan kapasite tayini CHROMAC yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Şahin ve Demir 2013). Analiz tüplerine 0,2 mL ekstrakt, 0,3 mL saf su, 3,5 mL tampon çözeltisi (pH 2,8 fosfat tamponu) ve 0,5 mL $K_2Cr_2O_7$ ($3,4 \times 10^{-4}$ M) eklenmiştir. 1 dk inkübasyondan sonra yaklaşık 0,5 mL 1,5-difenilkarbazit

($3,4 \times 10^{-4}$ M) eklenip iyice karıştırılmıştır. 50 dakika karanlıkta reaksiyonun tamamlanması için bekletilmiştir. Örneğin absorbansı 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür ($A_{\text{örnek}}$). Daha sonra analiz tüpüne 0,5 mL saf su, 3,5 mL tampon çözeltisi (pH 1,2 tamponu) ve 0,5 mL $K_2Cr_2O_7$ ($3,4 \times 10^{-4}$ M) eklenmiştir. 1 dk inkübasyondan sonra yaklaşık 0,5 mL 1,5-difenilkarbazit ($3,4 \times 10^{-4}$ M) eklenip iyice karıştırılmıştır. 50 dakika karanlıkta reaksiyonun tamamlanması için bekletilmiştir. Kör çözeltinin absorbansı 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür ($A_{\text{kör}}$).

$$\text{Absorbans} = A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}} \quad (3.2.2.3.1)$$

Standart olarak farklı derişimlerdeki troloks çözeltileri kullanılarak ölçüm alınmış ve yukarıdaki eşitliğe göre absorbans değerleri ile kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak ekstraktların antioksidan kapasite değerleri “mg troloks eşdeğeri (TE)/g liyofilize alg” şeklinde hesaplanmıştır.

3.2.2.4. Klorofil *a* ve *b* tayini

Klorofil *a* ve *b* miktarının tayin edilmesi için UV/VIS spektrofotometre kullanılarak ekstraktların 665,2 nm ve 652,4 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Wellburn (Wellburn 1994) tarafından önerilen aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır:

$$C_a = 16.72 \times A_{665.2} - 9.16 \times A_{652.4} \quad (3.2.2.4.1)$$

$$C_b = 34.09 \times A_{652.4} - 15.28 \times A_{665.2} \quad (3.2.2.4.2)$$

C_a , klorofil *a* derişimi, $A_{665.2}$, 665,2 nm dalga boyundaki absorbansı, $A_{652.4}$, 652,4 nm dalga boyundaki absorbansı ve C_b , klorofil *b* derişimidir. Klorofil *a* ve *b* miktarları “mg/g liyofilize alg” şeklinde hesaplanmıştır.

3.2.2.5. Toplam karotenoid tayini

Biehler göre (Biehler ve ark. 2010) toplam karotenoid tayini gerçekleştirilmiştir.

$$c (M) = \frac{A_{450} \times F \times d}{135310} \quad (3.2.2.5.1)$$

(A_{450} , 450 nm deki absorbans; F , seyreltme faktörü; 135310: Molar sönüm katsayısı; d , ışık yolu (cm))

3.2.3. Kromatografik yöntemler

3.2.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD)

Hazırlanan *C. vulgaris* ekstraktları Agilent Technology Series 1200 HPLC sistem (Waldbronn, Germany) ile kromatografik olarak analiz edilmiştir. Kromatografik ayırma için YMC Carotenoid C30 (250x4.6 mm, 5µm, YMC Co., Ltd) kolon kullanılmıştır. Analizde 20 µL'lik enjeksiyon hacminde 1,0 mL/dk akış hızı ile çalışılmıştır. Mobil faz olarak %95 metanol-%5 H₂O (H₂O: %0,05 trimetilamin içeriyor) (çözücü A) ve tert-bütil metil eter (çözücü B) çözücülerini kullanılmıştır. Standart karotenoid bileşiklerinin 450 nm deki alıkonma süreleri ve UV spektrumları karşılaştırılarak örneklerdeki karotenoid miktarları bulunmuştur. HPLC-DAD için analiz çalışma koşulları Çizelge 3.2.3.1.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.2.3.1.1. HPLC-DAD için analiz çalışma koşulları

| Süre (dk) | % B |
|-----------|-----|
| 0 | 5 |
| 15 | 20 |
| 20 | 30 |
| 30 | 40 |
| 40 | 75 |
| 45 | 5 |

3.2.4. Kemometrik yöntemler

Chlorella vulgaris mikroalginin ekstraksiyon şartlarının optimizasyonu için spektroskopik ve kromatografik değerler için yanıtli yüzey analiz yöntemleri (Response surface methodology) kullanılmıştır. Kemometrik yöntemler de genel olarak yapılan çalışmalarda bir tek yanıt değeri için optimum koşullar belirlenirken bu çalışmada spektroskopik yanıt değeri için ortak optimum koşullar belirlenmiştir. Kromatografik yanıt değeri için tek yanıtli yüzey analiz tekniği kullanılmıştır. Buna göre her bir kromatografik yanıt değeri için optimum koşullar belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmaları için 5 seviyeli merkezi kompozit dizayn kullanılmıştır.

3.2.4.1. Yanıtli yüzey analiz yöntemi (Response surface methodology)

3.2.4.1.1. Merkezi kompozit dizayn

Chlorella vulgaris örneklerinin ekstraksiyon şartlarının optimizasyonu için yanıtli yüzey analiz yöntemlerinden biri olan merkezi kompozit dizayn yöntemi kullanılmıştır.

Yanıtli yüzey analiz yöntemlerinde, matematiksel ve deneysel veriler istatistiksel teknik ile araştırılır. Nicel veri kullanılarak çoklu regresyon analizi yapılır. Çalışmada optimum koşulların belirlenmesi için faktör olarak ekstraksiyon zamanı, etanol hacmi, ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranı seçilmiştir. Merkezi kompozit dizayn için kullanılan faktörler ve kodlanmış seviye değerleri Çizelge 3.2.4.1.1.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.2.4.1.1.1. Merkezi kompozit dizayn için faktörler ve kodlanmış seviye değerleri

| Faktör | Kodlanmış seviyeler | | | | |
|-----------------------------|---------------------|----|----|-----|-----|
| | -2 | -1 | 0 | 1 | 2 |
| Ekstraksiyon zamanı (dk) | 15 | 50 | 85 | 120 | 155 |
| Etanol hacmi (% v/v) | 35 | 50 | 65 | 80 | 95 |
| Ekstraksiyon sıcaklığı (°C) | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 |
| Sıvı/katı oranı (mL/g) | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 |

Merkezi kompozit dizaynda faktörler ve 5 seviye aralığı belirlendikten sonra deney sayısı (N) hesaplanır:

$$N = 2^k + 2k + x_0 \quad (3.2.4.1.1.1)$$

k , faktör sayısı ve x_0 , tekrarlanan deney sayısını ifade eder. Çalışmada beş seviyeli dört faktörlü merkezi kompozit dizayn uygulanmıştır. Ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için 30 deney ($k=4$; $x_0=6$) yapılmıştır. Formüldeki 2^k full faktoriyel veya fraksiyonlu faktoriyel dizayndaki deney sayılarını, $2k$ star dizayn deney sayısını ve 1 ise orta seviyedeki deney sayısını gösterir. 2^k 'daki seviyeler (-1) ve (+1), $2k$ 'dakiler $\pm\alpha$, 1'deki ise (0) dir. α değeri dairesel ve ortagonal dizayna göre farklı seviyeler alır. Dairesel dizaynda α aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\alpha = \pm \sqrt[4]{2^k} \quad (3.2.4.1.1.2)$$

Kodlanmış seviyeler için merkezi kompozit dizayn Çizelge 3.2.4.1.1.2'de verilmiştir. Merkezi kompozit dizaynda her bir faktörün parabolik etkileride incelenebilir. Çizelge 3.2.4.1.1.2'de verilen çizelgede son altı deney orta seviyede tekrarlanan deneylerdir. Bu deneyler merkezi kompozit dizaynda tekrarlanan deneylerin hatasının bulunmasını sağlar. Diğer deneysel dizayn yöntemlerinde tekrarlanan deneyler yoktur.

Çizelge 3.2.4.1.1.2'de verilen çizelgedeki seviyelere göre hazırlanan 30 ekstrakt için toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite miktarları spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. Ayrıca 30 tane ekstraktta bulunan karotenoid bileşikleri kromatografik yöntemle tayin edilmiştir. Yapılan 30 ekstrakt için elde edilen spektroskopik ve kromatografik yanıt değerleri için Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease inc. USA) programı kullanılarak ANOVA analizi yapılmıştır. Spektroskopik yanıt değerleri için çok yanıtlı yüzey analiz yöntemi, kromatografik yanıt değerleri için tek yanıtlı yüzey analiz hesaplamaları yapılmıştır.

Deneysel verilerde ANOVA analizi yapılarak aşağıdaki ikinci dereceden denklem ile spektroskopik ve kromatografik tahmin değerleri hesaplanmıştır.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} x_i x_j \quad (3.2.4.1.1.3)$$

y , yanıt; b_0 , sabit terim; b_i , doğrusal etkileşim sabiti; b_{ii} , parabolik etkileşim sabiti; b_{ij} , parametre etkileşim sabiti, x_i ve x_j bağımsız değişkenleri temsil etmektedir.



Çizelge 3.2.4.1.1.2. Kodlanmış seviye değerleri için merkezi kompozit dizayn

| Deney | Faktörler | | | |
|-------|--------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|
| | x_1 | x_2 | x_3 | x_4 |
| | Ekstraksiyon zamanı (dk) | Etanol hacmi (% v/v) | Ekstraksiyon sıcaklığı (°C) | Sıvı/katı oranı (mL/g) |
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | -1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | 1 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 14 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 15 | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 17 | -2 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | -2 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | -2 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | -2 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 0 | 0 | 0 | 0 |

4. BULGULAR

Bu çalışmada sunulan araştırma bulguları üç ana başlıkta toplanabilir. Bunlar;

- Spektroskopik yöntemler,
- Kromatografik yöntemler,
- Kemometrik yöntemler

4.1. Spektroskopik yöntemler

Chlorella vulgaris türünün toplam fenolik madde, toplam karotenoid, klorofil *a* ve *b*, antioksidan kapasite miktarları tayini spektroskopik yöntemlerle yapılmıştır.

4.1.1. Toplam fenolik madde miktarları

Chlorella vulgaris türün toplam fenolik madde miktarı tayininde kullanılan kalibrasyon grafiğine ait sonuçlar Çizelge 4.1.1.1’de verilmektedir.

Çizelge 4.1.1.1. Toplam fenolik madde tayini için kalibrasyon denklemi

| Yöntem | Gallik asit derişimi (mg/L) | Kalibrasyon denklemi | Regresyon katsayısı |
|--------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Folin | 0-30 | $y = 0,0132x - 0,0145$ | 0,9900 |

4.1.2. Antioksidan kapasite miktarları

Chlorella vulgaris türün antioksidan kapasite tayinlerinde kullanılan kalibrasyon grafiklerine ait sonuçlar Çizelge 4.1.2.1’de verilmektedir.

Çizelge 4.1.2.1. Antioksidan kapasite tayinleri için kalibrasyon denklemleri

| Yöntem | Troluks derişimi (mg/L) | Kalibrasyon denklemleri | Regresyon katsayısı |
|---------|----------------------------|----------------------------|------------------------|
| ABTS | 0,3-1,0 | $y = 8,9183x - 1,0785$ | 0,9995 |
| CHROMAC | 10-100 | $y = 0,0034x + 0,0321$ | 0,9906 |

4.1.3. Ekstraksiyon çözücü seçimi

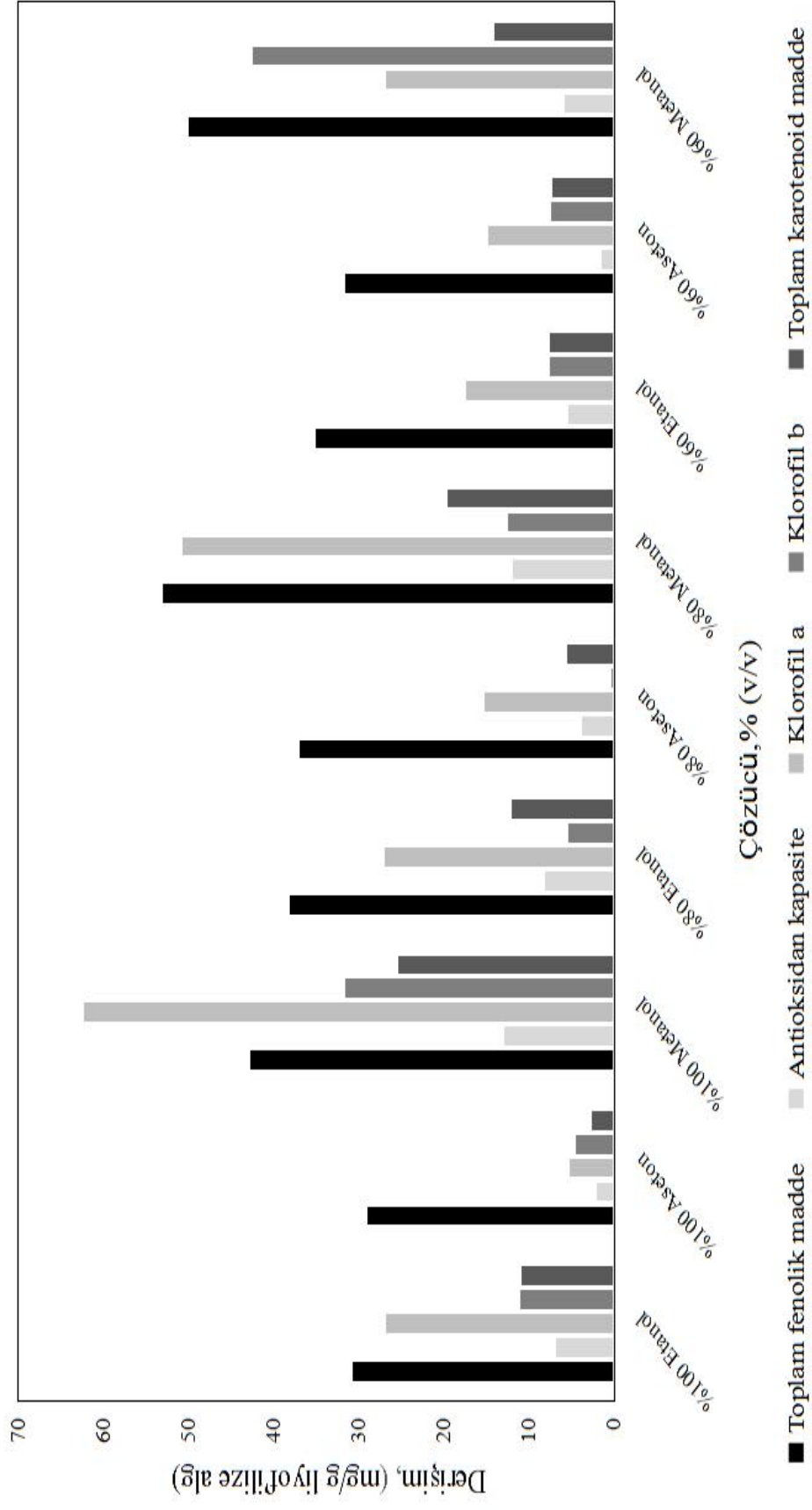
Chlorella vulgaris ekstraksiyonu işlemlerinde uygun çözücünün seçimi için farklı derişimlerde metanol, etanol ve aseton (%100, %80, %60 (v/v)) çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktların klorofil *a* ve *b*, toplam karotenoid, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite miktarları Şekil 4.1.3.1’de gösterilmiştir.

4.2. Kromatografik yöntemler

HPLC-DAD cihazı için standart karotenoid bileşikleri ile kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. HPLC-DAD cihazında 450 nm dalga boyunda ölçülen pik alan değerleri ile karotenoid derişimleri arasında kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklere ait değerler Çizelge 4.2.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.2.1. HPLC analizi için karotenoidlerin kalibrasyon grafikleri

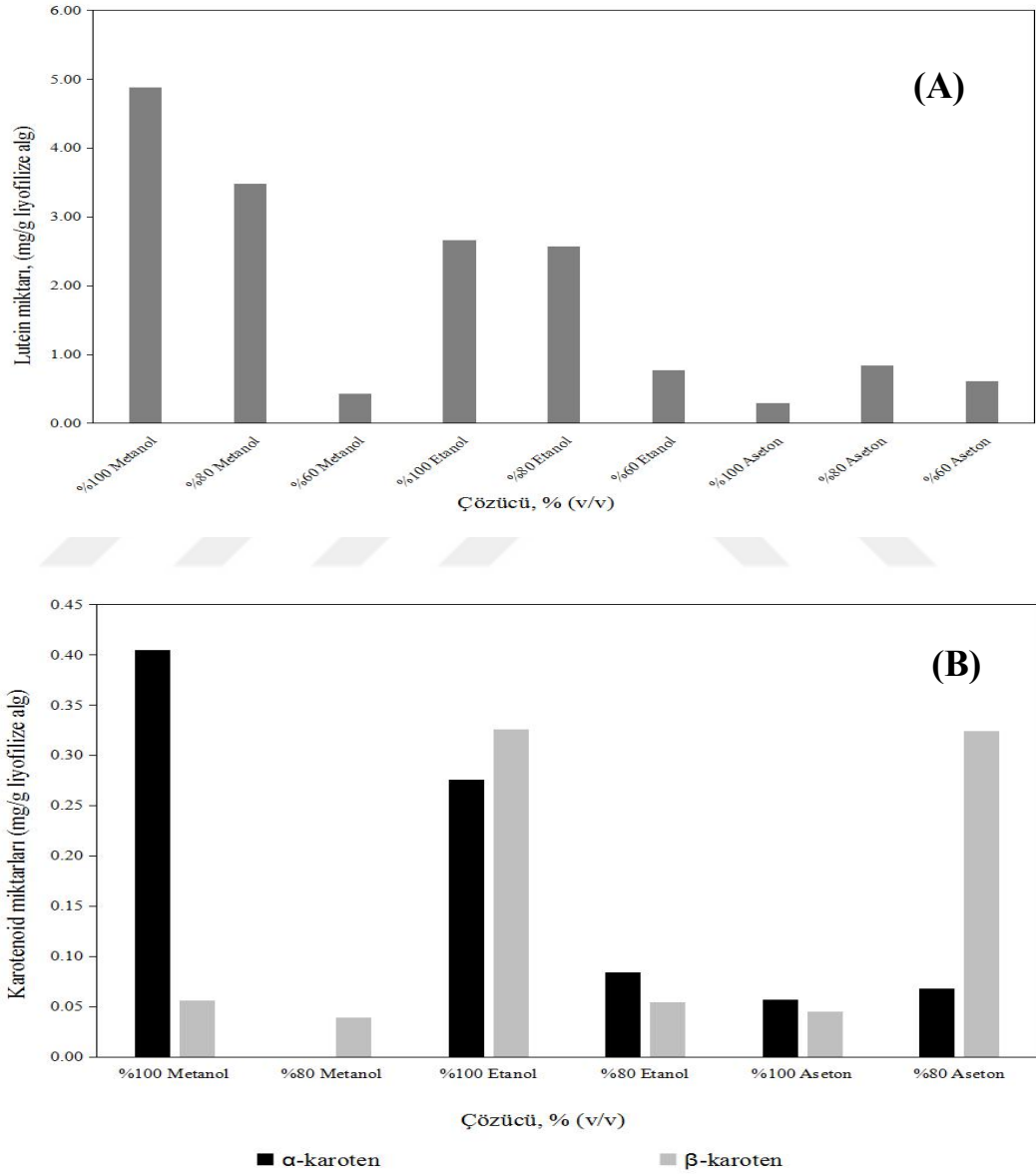
| Karotenoid | Derişim (mg/L) | Kalibrasyon denklemleri | Regresyon katsayısı |
|-------------------|-------------------|----------------------------|---------------------|
| β -karoten | 0,25-10 | $y = 154,46x - 19,5$ | 0,998 |
| Lutein | 0,25-10 | $y = 71,224x - 1,9159$ | 0,998 |
| α -karoten | 0,25-10 | $y = 118,09x - 17,225$ | 0,999 |



Şekil 4.1.3.1. *Chlorella vulgaris* ekstraktlarının spektroskopik sonuçları

4.2.1. Ekstraksiyon çözücü seçimi

Chlorella vulgaris mikroalginde bulunan karotenoidlerin ultrasonik destekli ekstraksiyonda uygun çözücülerin seçimi için farklı derişimlerde metanol, etanol ve aseton (%100, %80, %60 (v/v)) çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlarda bulunan lutein, β -karoten ve α -karoten miktarları Şekil 4.2.1.1’de verilmiştir.



Şekil 4.2.1.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda a)lutein b) α -karoten ve β -karoten için uygun çözücülerin seçimi.

4.3. Kemometrik yöntemler

4.3.1. Spektroskopik ölçümler için optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi

Çizelge 3.2.4.1.1.1 ve 3.2.4.1.1.2’de verilen seviyelere göre hazırlanan 30 ekstrakt için toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite miktarları spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. Yapılan 30 ekstrakt için elde edilen spektroskopik yanıt değerleri için Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease inc. USA) programı kullanılarak ANOVA analizi yapılmıştır. Spektroskopik yanıt değerleri için çok yanıtlı yüzey analiz yöntemi hesaplamaları yapılmıştır. Deneysel verilerde ANOVA analizi yapılarak Çizelge 4.3.1.1’de verilen ikinci dereceden denklemler ile spektroskopik ve tahmini değerler hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3.1.1. Kuadratik polinom denklemleri (ekstraksiyon zamanı; x_1 , etanol hacmi; x_2 , ekstraksiyon sıcaklığı; x_3 , sıvı/katı oranı; x_4)

| Yanıtlar | Kuadratik polinom denklemleri |
|---------------------------------|--|
| Toplam fenolik madde (mg GAE/g) | $y = 68,97 + 4,21x_2 - 12,56x_4 + 10,31x_1x_2 - 6,65x_1x_4 + 5,39x_1^2 + 6,50x_2^2 + 7,41x_3^2 - 7,08x_4^2$ |
| ABTS (mg TE/g) | $y = 59,61 - 3,93x_2 + 3,77x_3 + 5,60x_1x_2 - 4,69x_2x_4 - 7,25x_3x_4 + 4,82x_1^2 + 4,75x_2^2 + 2,67x_3^2 - 4,20x_4^2$ |
| CHROMAC (mg TE/g) | $y = 211,26 - 16,38x_2 + 20,51x_3 - 17,94x_4 + 28,97x_1x_2 - 14,99x_1x_4 - 18,49x_2x_3 + 16,53x_2x_4 + 9,36x_2^2 - 21,80x_4^2$ |

Buna göre spektroskopik yöntemlerle bulunan deneysel değerler ve ANOVA analizi sonucu bulunan tahmini değerler Çizelge 4.3.1.2’de verilmiştir.

Spektroskopik yanıt değerleri için Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease inc. USA) programı kullanılarak ANOVA analizi yapıldığında bulunan sonuçlar Çizelge 4.3.1.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3.1.2. Spektroskopik ölçümler için deneysel ve tahmini değerler

| Deney | Toplam fenolik madde miktarı | | Antioksidan kapasite miktarı (mg TE/g liyofilize alg) | | | |
|-------|------------------------------|---------|---|---------|----------|---------|
| | (mg GAE/g liyofilize alg) | | ABTS | | CHROMAC | |
| | Deneysel | Tahmini | Deneysel | Tahmini | Deneysel | Tahmini |
| 1 | 71,76 | 77,62 | 58,24 | 61,08 | 235,73 | 230,45 |
| 2 | 79,32 | 77,08 | 58,03 | 52,26 | 229,64 | 210,89 |
| 3 | 69,81 | 77,75 | 58,16 | 54,25 | 160,26 | 143,67 |
| 4 | 124,43 | 118,43 | 62,90 | 67,82 | 217,31 | 240,01 |
| 5 | 113,53 | 104,54 | 92,62 | 87,64 | 313,36 | 296,65 |
| 6 | 93,55 | 92,71 | 70,90 | 75,43 | 279,68 | 297,36 |
| 7 | 79,50 | 86,21 | 72,48 | 75,14 | 116,70 | 135,90 |
| 8 | 118,04 | 115,61 | 87,70 | 85,32 | 272,97 | 252,50 |
| 9 | 73,97 | 77,47 | 78,08 | 81,52 | 167,19 | 189,82 |
| 10 | 54,20 | 50,33 | 72,65 | 70,69 | 126,37 | 110,30 |
| 11 | 67,72 | 71,41 | 59,75 | 55,93 | 183,73 | 169,17 |
| 12 | 75,45 | 85,50 | 61,45 | 67,49 | 186,69 | 205,55 |
| 13 | 78,41 | 87,25 | 83,31 | 79,10 | 278,92 | 259,34 |
| 14 | 55,70 | 48,82 | 59,91 | 64,88 | 181,35 | 200,09 |
| 15 | 59,43 | 62,73 | 41,00 | 47,83 | 143,82 | 164,72 |
| 16 | 68,54 | 65,53 | 58,14 | 56,00 | 212,97 | 221,37 |
| 17 | 102,88 | 89,40 | 77,76 | 79,23 | 199,23 | 206,87 |
| 18 | 82,09 | 91,65 | 81,80 | 78,58 | 256,86 | 243,95 |
| 19 | 82,29 | 86,55 | 84,99 | 86,45 | 270,15 | 281,47 |
| 20 | 111,56 | 103,39 | 73,96 | 70,75 | 232,56 | 215,97 |
| 21 | 102,64 | 95,13 | 62,76 | 62,75 | 186,58 | 192,75 |
| 22 | 98,48 | 102,08 | 79,59 | 77,83 | 286,22 | 274,77 |
| 23 | 63,81 | 65,76 | 45,30 | 47,23 | 148,19 | 159,94 |
| 24 | 21,39 | 15,53 | 42,06 | 38,36 | 105,20 | 88,18 |
| 25 | 74,59 | 68,97 | 58,87 | 59,61 | 217,61 | 211,26 |
| 26 | 69,09 | 68,97 | 61,21 | 59,61 | 224,99 | 211,26 |
| 27 | 70,26 | 68,97 | 57,42 | 59,61 | 198,22 | 211,26 |
| 28 | 68,54 | 68,97 | 54,59 | 59,61 | 198,93 | 211,26 |
| 29 | 59,30 | 68,97 | 64,04 | 59,61 | 194,48 | 211,26 |
| 30 | 72,06 | 68,97 | 61,54 | 59,61 | 233,31 | 211,26 |

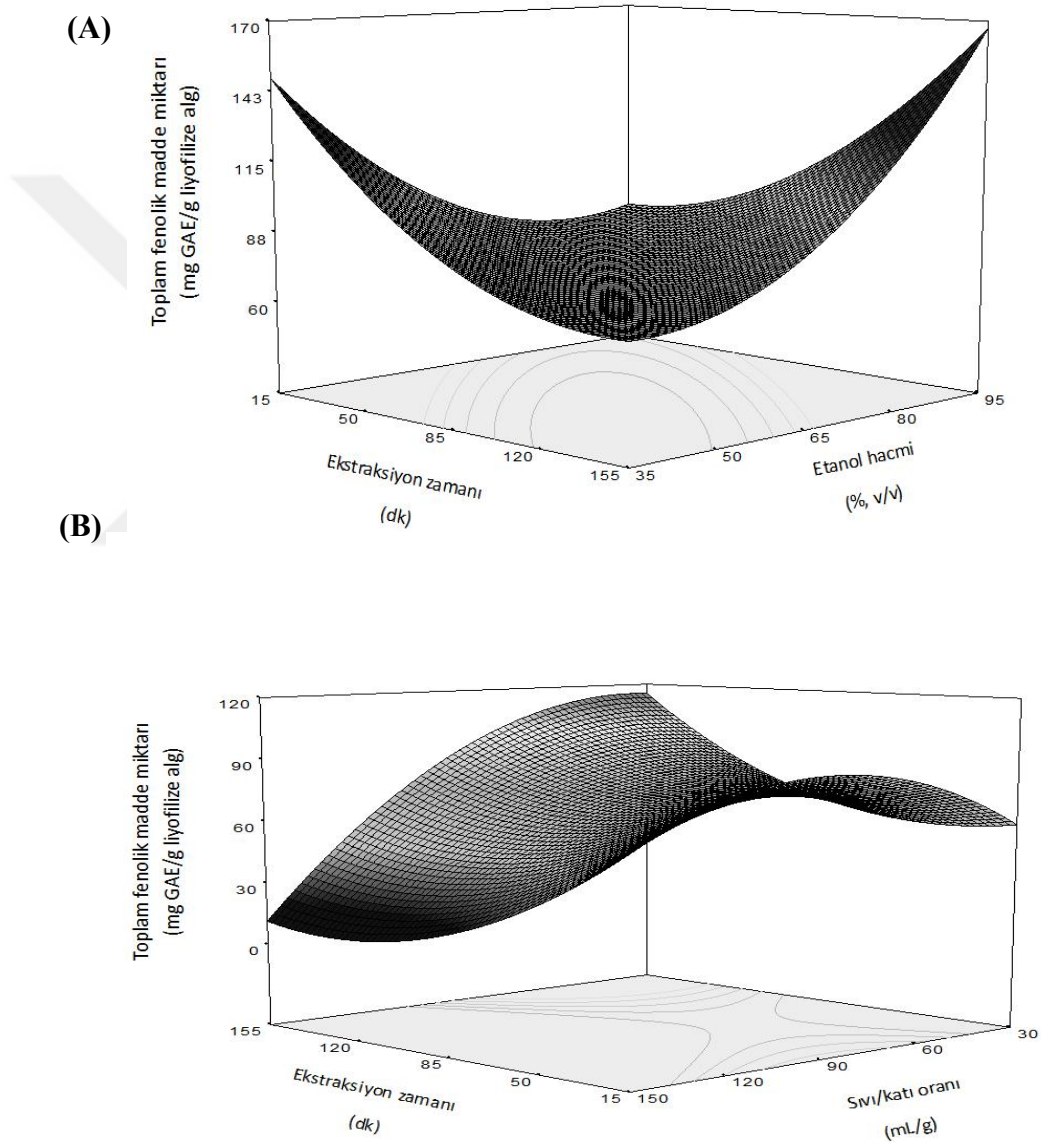
Çizelge 4.3.1.3. Spektroskopik yanıt değerleri için ANOVA analizi sonuçları

| Yöntem | Folin (R ² = 0,9160) | | | | | ABTS (R ² = 0,9201) | | | | | CHROMAC (R ² = 0,9049) | | | | |
|--------------------|---------------------------------|----------|--------|----------|----------|--------------------------------|---------|--------|----------|----------|-----------------------------------|----------|---------|----------|----------|
| | DF | SS | MS | F değeri | P değeri | DF | SS | MS | F değeri | P değeri | DF | SS | MS | F değeri | P değeri |
| Model | 14 | 12662,26 | 904,45 | 11,69 | <0,0001 | 14 | 4623,18 | 330,23 | 12,34 | <0,0001 | 14 | 73002,51 | 5214,47 | 10,19 | <0,0001 |
| Lack of fit | 10 | 1024,09 | 102,41 | 3,75 | 0,0787 | 10 | 344,88 | 34,49 | 3,05 | 0,1148 | 10 | 6354,74 | 635,47 | 2,41 | 0,1720 |
| Pure error | 5 | 136,52 | 27,30 | | | 5 | 56,45 | 11,29 | | | 5 | 1318,91 | 263,78 | | |

DF Serbestlik derecesi, SS karelerin toplamı, MS ortalamaların karesi

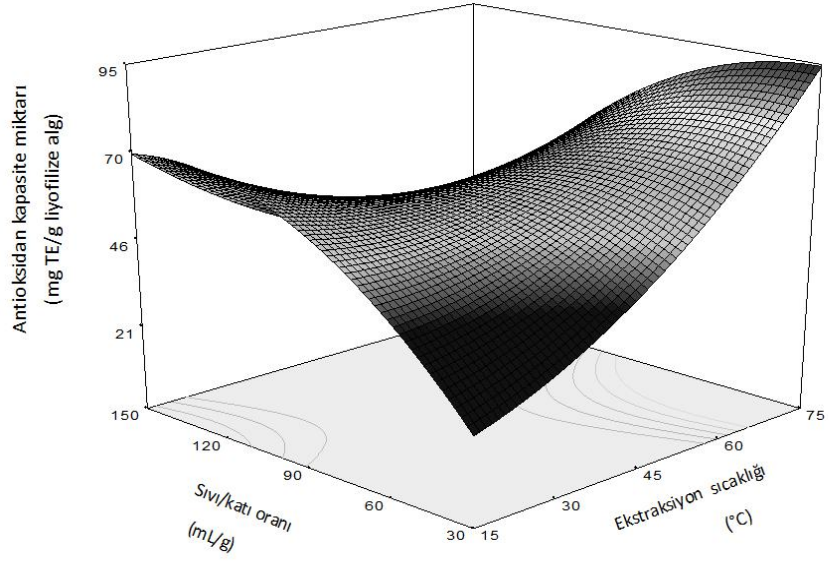
4.3.1.1. Spektroskopik ölçümler için yüzey analiz grafikleri

Ultrasonik destekli ekstraksiyonda etkili faktörlerin (ekstraksiyon zamanı, etanol hacmi, ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranı) ANOVA analizine göre toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite sonuçları üzerindeki etkisini gösteren yüzey analiz grafikleri Şekil 4.3.1.1.1 (toplam fenolik madde) ve 4.3.1.1.2'de (antioksidan kapasite) verilmiştir.

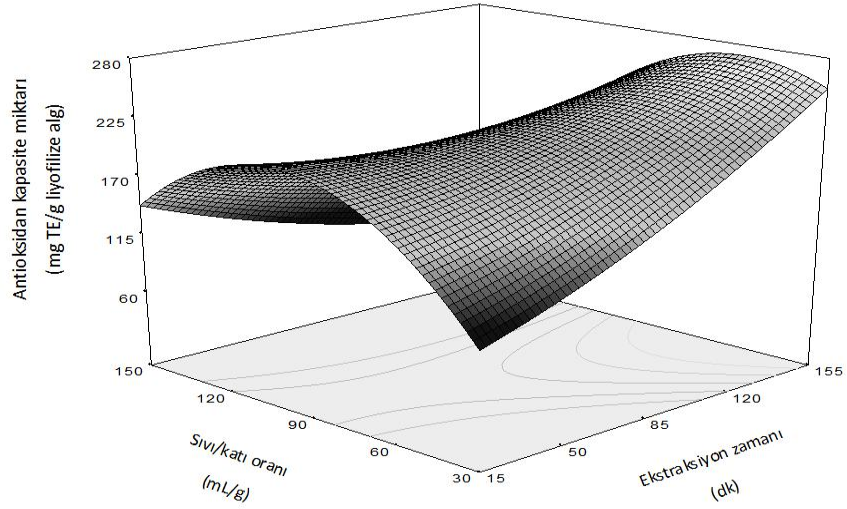


Şekil 4.3.1.1.1. Toplam fenolik madde miktarı için üç boyutlu yüzey analiz grafikleri a)ekstraksiyon zamanı ve etanol hacmi etkisi, b)ekstraksiyon zamanı ve sıvı/katı oranı etkisi.

(A)



(B)



Şekil 4.3.1.1.2. Antioksidan kapasitesi için üç boyutlu yüzey analiz grafikleri
a)ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranının ABTS yöntemine etkisi,
b)ekstraksiyon zamanı ve sıvı/katı oranının CHROMAC yöntemine etkisi.

4.3.1.2. Spektroskopik ölçümler için optimum koşulların geçerliliği

ANOVA analizine göre spektroskopik ölçümler için bulunan optimum ultrasonik destekli ekstraksiyon koşulları Çizelge 4.3.1.2.1’de, tahmini/deneysel toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite değerleri Çizelge 4.3.1.2.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.3.1.2.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon optimum koşulları (çok yanıtlı yüzey analiz tekniği kullanılmıştır)

| Yanıt | Optimum ultrasonik destekli ekstraksiyon koşulları | | | |
|---------|--|---------------------|-----------------------------|------------------------|
| | Ekstraksiyon zamanı (dk) | Etanol hacmi (%v/v) | Ekstraksiyon sıcaklığı (°C) | Sıvı/katı oranı (mL/g) |
| Folin | 146 | 71 | 72 | 62 |
| ABTS | | | | |
| CHROMAC | | | | |

Çizelge 4.3.1.2.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon tahmini/deneysel toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite değerleri

| Yanıt | Maksimum değerler | |
|--|-------------------|-------------|
| | Tahmini | Deneysel |
| Toplam fenolik madde (mg GAE/g liyofilize alg) | 135,01 | 133,70±3,84 |
| ABTS (mg TE/g liyofilize alg) | 101,79 | 101,19±1,82 |
| CHROMAC (mg TE/g liyofilize alg) | 325,66 | 325,26±1,93 |

4.3.2. Kromatografik ölçümler için optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi

Çizelge 3.2.4.1.1.1 ve 3.2.4.1.1.2’de verilen seviyelere göre hazırlanan 30 ekstrakt için karotenoid miktarları kromatografik yöntemle belirlenmiştir. Yapılan 30 ekstrakt için elde edilen kromatografik yanıt değerleri için Design

Expert 7.0.0 (Stat-Ease inc. USA) programı kullanılarak ANOVA analizi yapılmıştır. Kromatografik yanıt değerleri için yanıtlı yüzey analiz yöntemi hesaplamaları yapılmıştır. Deneysel verilerde ANOVA analizi yapılarak Çizelge 4.3.2.1’de verilen ikinci dereceden denklemler ile kromatografik ve tahmini değerler hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3.2.1. Kuadratik polinom denklemleri (ekstraksiyon zamanı; x_1 , etanol hacmi; x_2 , ekstraksiyon sıcaklığı; x_3 , sıvı/katı oranı; x_4)

| Yanıt | Kuadratik polinom denklemleri |
|-------------------|---|
| Lutein | $y = 1,15 + 0,81x_2 + 0,31x_3 + 0,30x_4 - 0,23x_1x_4 + 0,44x_2x_3 + 0,25x_2x_4 - 0,27x_3x_4 + 0,16x_3^2$ |
| β -karoten | $y = 0,023 + 0,020x_2 + 0,015x_3 + 0,0069x_4 + 0,0095x_1x_2 - 0,0070x_1x_4 + 0,022x_2x_3 - 0,013x_3x_4 + 0,028x_2^2 + 0,006x_3^2$ |
| α -karoten | $y = 0,030 + 0,035x_2 + 0,024x_3 + 0,0072x_4 + 0,010x_1x_2 + 0,013x_1x_3 - 0,013x_1x_4 + 0,032x_2x_3 - 0,0079x_3x_4 + 0,025x_2^2 + 0,0085x_3^2$ |

Buna göre kromatografik yöntemle bulunan deneysel değerler ve ANOVA analizi sonucu bulunan tahmini değerler Çizelge 4.3.2.2’de verilmiştir.

Kromatografik yanıt değerleri için Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease inc. USA) programı kullanılarak ANOVA analizi yapıldığında bulunan sonuçlar Çizelge 4.3.2.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3.2.2. Kromatografik ölçümler için deneysel ve tahmini değerler

| Deney | Lutein miktarı (mg/g liyofilize alg) | | α -karoten miktarı (mg/g liyofilize alg) | | β -karoten miktarı (mg/g liyofilize alg) | |
|-------|---|---------|--|---------|---|---------|
| | Deneysel | Tahmini | Deneysel | Tahmini | Deneysel | Tahmini |
| 1 | 0,650 | 0,380 | 0,030 | 0,033 | 0,032 | 0,039 |
| 2 | 0,510 | 0,740 | 0,014 | 0,012 | 0,032 | 0,023 |
| 3 | 0,780 | 0,640 | 0,014 | 0,012 | 0,010 | 0,005 |
| 4 | 0,860 | 0,980 | 0,025 | 0,031 | 0,026 | 0,027 |
| 5 | 0,260 | 0,410 | 0,025 | 0,007 | 0,070 | 0,046 |
| 6 | 1,040 | 1,290 | 0,031 | 0,037 | 0,028 | 0,039 |
| 7 | 2,140 | 2,410 | 0,100 | 0,110 | 0,090 | 0,100 |
| 8 | 3,570 | 3,270 | 0,200 | 0,180 | 0,140 | 0,130 |
| 9 | 1,440 | 1,500 | 0,078 | 0,082 | 0,089 | 0,082 |
| 10 | 1,140 | 0,930 | 0,018 | 0,010 | 0,040 | 0,038 |
| 11 | 2,940 | 2,750 | 0,077 | 0,075 | 0,072 | 0,069 |
| 12 | 2,550 | 2,160 | 0,032 | 0,042 | 0,055 | 0,063 |
| 13 | 0,500 | 0,440 | 0,026 | 0,024 | 0,030 | 0,037 |
| 14 | 0,490 | 0,390 | 0,010 | 0,003 | 0,013 | 0,002 |
| 15 | 3,900 | 3,440 | 0,150 | 0,140 | 0,120 | 0,110 |
| 16 | 3,040 | 3,370 | 0,160 | 0,160 | 0,110 | 0,120 |
| 17 | 1,230 | 1,460 | 0,022 | 0,025 | 0,022 | 0,030 |
| 18 | 1,810 | 1,760 | 0,022 | 0,023 | 0,017 | 0,018 |
| 19 | 0,096 | 0,001 | 0,050 | 0,059 | 0,086 | 0,096 |
| 20 | 2,900 | 3,200 | 0,200 | 0,200 | 0,180 | 0,180 |
| 21 | 0,860 | 1,170 | 0,023 | 0,016 | 0,016 | 0,017 |
| 22 | 2,530 | 2,400 | 0,100 | 0,110 | 0,069 | 0,076 |
| 23 | 0,920 | 0,680 | 0,010 | 0,012 | 0,008 | 0,013 |
| 24 | 1,480 | 1,900 | 0,038 | 0,040 | 0,037 | 0,040 |
| 25 | 1,600 | 1,150 | 0,026 | 0,030 | 0,018 | 0,023 |
| 26 | 0,980 | 1,150 | 0,023 | 0,030 | 0,021 | 0,023 |
| 27 | 0,990 | 1,150 | 0,034 | 0,030 | 0,019 | 0,023 |
| 28 | 1,090 | 1,150 | 0,033 | 0,030 | 0,018 | 0,023 |
| 29 | 1,090 | 1,150 | 0,025 | 0,030 | 0,031 | 0,023 |
| 30 | 1,160 | 1,150 | 0,036 | 0,030 | 0,031 | 0,023 |

Çizelge 4.3.2.3. Kromatografik yanıt değerleri için ANOVA analizi sonuçları

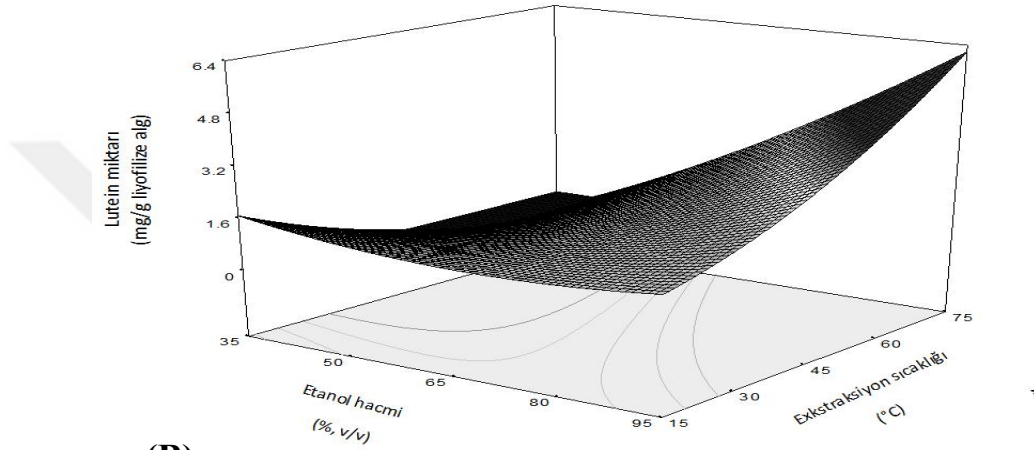
| Yöntem | Lutein ($R^2 = 0,9406$) | | | | | β -karoten ($R^2 = 0,9657$) | | | | | α -karoten ($R^2 = 0,9834$) | | | | |
|--------------------|---------------------------|-------|-------|--------------------|--------------------|-------------------------------------|---------|----------|--------------------|--------------------|--------------------------------------|---------|----------|--------------------|--------------------|
| | DF | SS | MS | <i>F</i> değeri | <i>p</i> değeri | DF | SS | MS | <i>F</i> değeri | <i>p</i> değeri | DF | SS | MS | <i>F</i> değeri | <i>p</i> değeri |
| Model | 14 | 27,71 | 1,98 | 16,96 | <0,0001 | 14 | 0,052 | 0,0037 | 30,16 | <0,0001 | 14 | 0,086 | 0,0062 | 63,36 | <0,0001 |
| Lack of fit | 10 | 1,49 | 0,15 | 2,84 | 0,1305 | 10 | 0,0017 | 0,00017 | 4,28 | 0,0612 | 10 | 0,0013 | 0,00013 | 4,53 | 0,0547 |
| Pure error | 5 | 0,26 | 0,052 | | | 5 | 0,00019 | 0,000039 | | | 5 | 0,00015 | 0,000029 | | |

DF serbestlik derecesi, *SS* karelerin toplamı, *MS* ortalamaların karesi

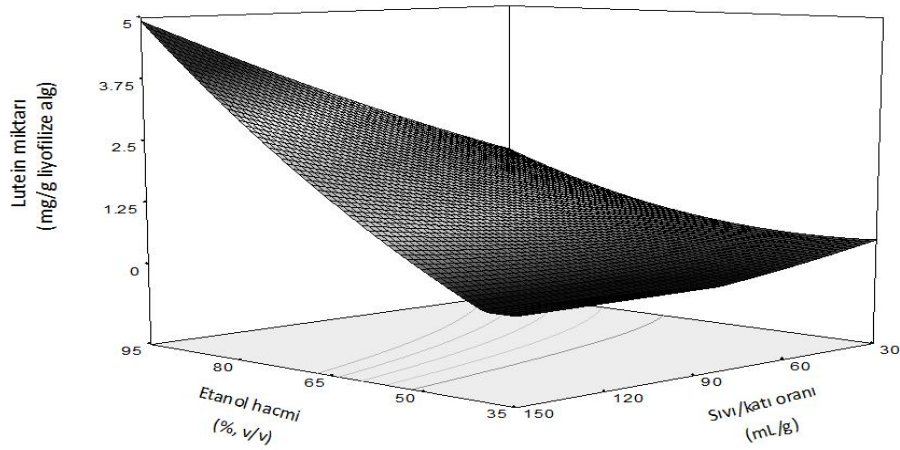
4.3.2.1. Kromatografik ölçümler için yüzey analiz grafikleri

Ultrasonik destekli ekstraksiyonda etkili faktörlerin (ekstraksiyon zamanı, etanol hacmi, ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranı) ANOVA analizine göre karotenoid miktarların sonuçları üzerindeki etkisini gösteren yüzey analiz grafikleri Şekil 4.3.2.1.1 (lutein miktarı), 4.3.2.1.2 (β -karoten miktarı) ve 4.3.2.1.3'te (α -karoten miktarı) verilmiştir.

(A)

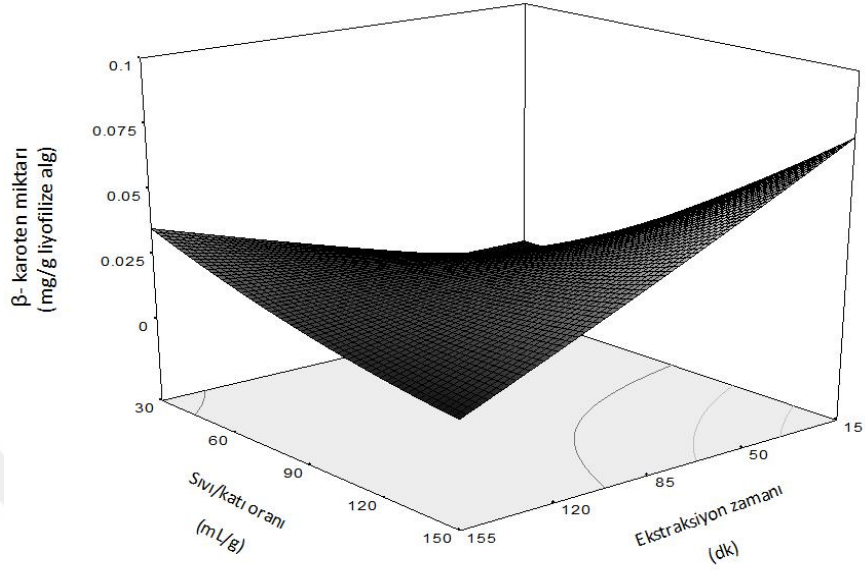


(B)

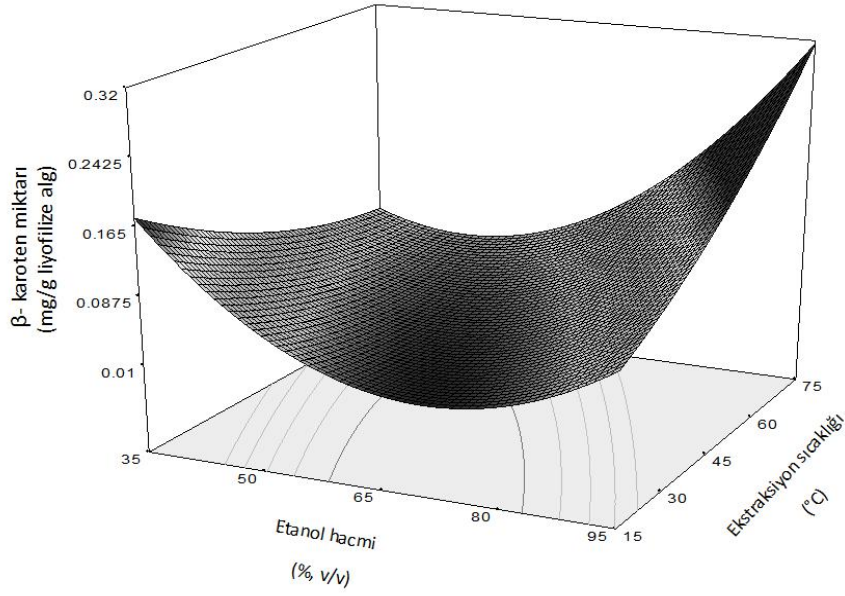


Şekil 4.3.2.1.1. Lutein miktarı için üç boyutlu yüzey analiz grafikleri a) etanol hacmi ve ekstraksiyon sıcaklığı etkisi, b) etanol hacmi ve sıvı/katı oranı etkisi.

(A)

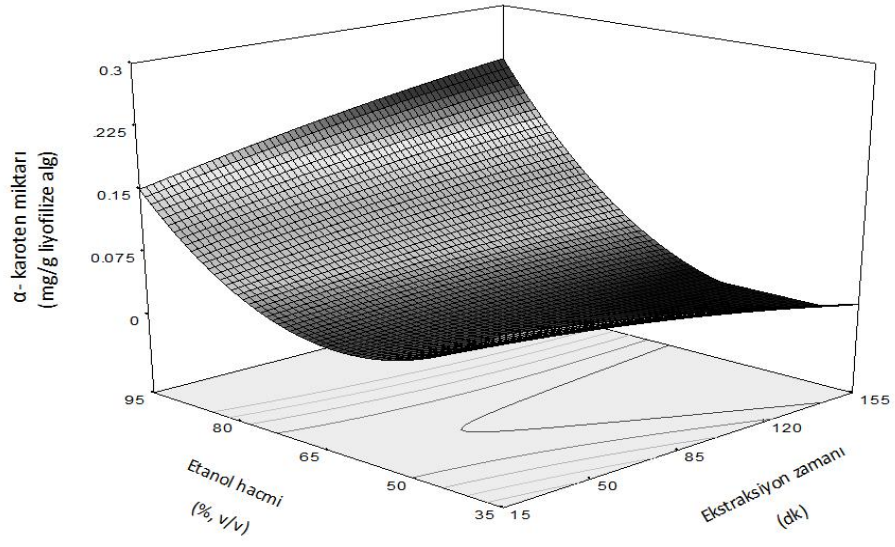


(B)

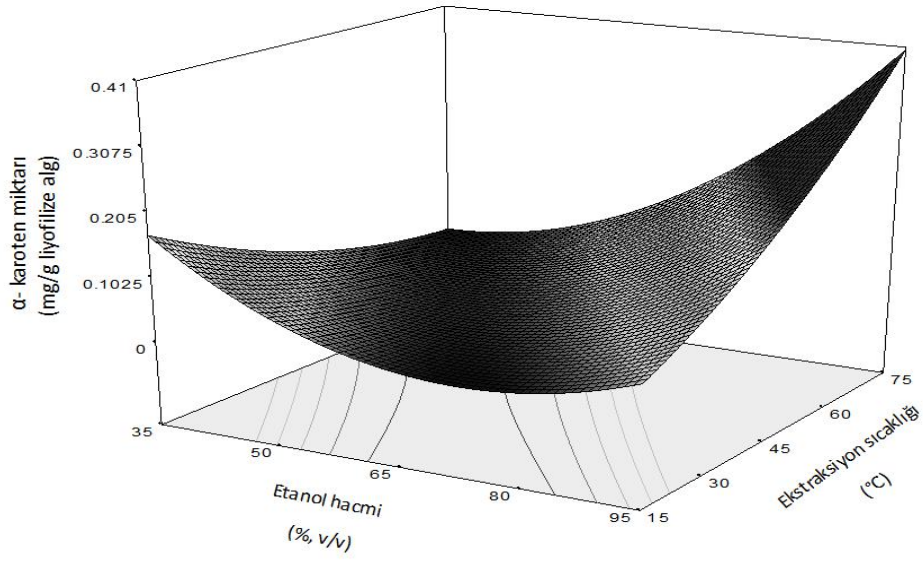


Şekil 4.3.2.1.2. β-karoten miktarı için üç boyutlu yüzey analiz grafikleri a)ekstraksiyon zamanı ve sıvı/katı oranı etkisi, b)etanol hacmi ve ekstraksiyon sıcaklığı etkisi.

(A)



(B)



Şekil 4.3.2.1.3. α -karoten miktarı için üç boyutlu yüzey analiz grafikleri a) etanol hacmi ve ekstraksiyon zamanı etkisi, b) etanol hacmi ve ekstraksiyon sıcaklığı etkisi.

4.3.2.2. Kromatografik ölçümler için optimum koşulların geçerliliği

ANOVA analizine göre kromatografik ölçümler için bulunan optimum ultrasonik destekli ekstraksiyon koşulları Çizelge 4.3.2.2.1’de, tahmini/deneysel karotenoid miktarlarının değerleri Çizelge 4.3.2.2.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.3.2.2.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon optimum koşulları

| Yanıt | Optimum ultrasonik destekli ekstraksiyon koşulları | | | |
|-------------------|--|---------------------|-----------------------------|------------------------|
| | Ekstraksiyon zamanı (dk) | Etanol hacmi (%v/v) | Ekstraksiyon sıcaklığı (°C) | Sıvı/katı oranı (mL/g) |
| Lutein | 81 | 88 | 69 | 114 |
| β -karoten | 85 | 94 | 66 | 103 |
| α -karoten | 88 | 87 | 71 | 108 |

Çizelge 4.3.2.2.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon tahmini/deneysel karotenoid miktarlarının değerleri

| Yanıt | Maksimum değer (mg/g liyofilize alg) | |
|-------------------|--------------------------------------|-------------|
| | Tahmini | Deneysel |
| Lutein | 4,828 | 4,844±0,780 |
| β -karoten | 0,260 | 0,258±0,020 |
| α -karoten | 0,274 | 0,275±0,040 |

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada sunulan bulguların tartışma ve sonuç bölümü iki ana başlıkta özetlenebilir. Bunlar;

- Spektroskopik yöntemler,
- Kromatografik yöntemler,

5.1. Spektroskopik yöntemler

Chlorella vulgaris mikroalginin toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite ölçümleri sırasıyla Folin, ABTS, CHROMAC yöntemleriyle başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemler için çizilen kalibrasyon grafikleri Çizelge 4.1.1.1-4.1.2.1'de verilmiştir.

5.1.1. Ekstraksiyon çözücü seçimi

Elde edilen ekstraktların klorofil *a* ve *b*, toplam karotenoid, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite miktarları Şekil 4.1.3.1'de gösterilmiştir. Test edilen çözücüde *Chlorella vulgaris* ekstraktlarının antioksidan kapasite, klorofil *a* ve toplam karotenoid miktarı için %100 metanol en verimli çözücü olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda sırasıyla klorofil *b* ve toplam fenolik madde miktarı için %60, %80 metanol en verimli çözücü olarak belirlenmiştir. Ancak farklı derişim aralığına bakıldığında en iyi ekstraksiyon çözücüsü *Chlorella vulgaris* için ilk olarak %100 metanol ve ikinci en iyi ekstraksiyon çözücüsü %80 etanoldür. Çözücü derişiminin artmasıyla ekstraksiyon verimi de artmıştır (Nasir ve ark. 2017).

Literatürde (Jespersen ve Christoffersen 1987) klorofilin ekstrakte edilmesi için etanolünde metanol kadar etkili olduğu gösterilmiştir. Aseton, hekzan, su ve farklı derişimlerdeki etanol çözüçüleri (%50-100 (v/v)) karşılaştırıldığında en yüksek ekstraksiyon verimini %90 etanol çözücüsünün verdiği bildirilmiştir (Cha ve ark. 2010). Wright ve Mantoura (1997) rutin deniz örnekleri için aseton yerine metanolü daha tercih edilmiştir (Jeffrey ve ark. 1997). Hammadde olarak *Chlorella vulgaris* klorofil

ekstraksiyonu için etanol, en iyi yeşil çözücüdür (Kong ve ark. 2012). Ancak gıda katkı maddelerindeki çözücün emniyetini dikkate alarak ve metanolun daha yüksek toksisiteye sahip olması nedeniyle ekstraksiyon çözücüsü olarak çalışmalarımızda etanol çözücüsü tercih edilmiştir.

5.1.2. Kemometrik yöntemler

5.1.2.1. Spektroskopik ölçümler için optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi

Chlorella vulgaris mikroalginden ultrasonik destekli ekstraksiyon üzerinde faktörlerin etkisini araştırmak için çok yanıtli yüzey analiz yöntemi kullanılmıştır. Toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite miktarları açısından ekstraksiyon faktörlerinin optimizasyonu için merkezi kompozit dizayn kullanılmıştır (Nasir ve ark. 2017).

Chlorella vulgaris mikroalginden toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite miktarları en uygun kombinasyon faktörlerini belirlemek için ekstraksiyon faktörleri incelenmiştir. Faktör olarak ekstraksiyon zamanı (15-155 dk), etanol hacmi (%35-95, v/v), ekstraksiyon sıcaklığı (15-75°C) ve sıvı/katı oranı (30-150 mL/g) kullanılmıştır. Bu faktörler için belirlenen seviye değerleri Çizelge 3.2.4.1.1.1'de verilmiştir. Bu seviye değerleri belirlenirken literatürde yapılan çalışmalara göre uygun çalışma aralığı seçilmiştir (Singh ve ark. 2015, Kong ve ark. 2012, Deenu ve ark. 2013). Toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite miktarlarının deneysel ve tahmini değerleri Çizelge 4.3.1.2'de gösterilmiştir.

Kemometrik yöntemlerde yapılan 30 deney arasında (Çizelge 4.3.1.2), deney 4'te (ekstraksiyon zamanı 120 dk, etanol hacmi %80 (v/v), ekstraksiyon sıcaklığı 30°C ve sıvı/katı oranı 60 mL/g) en yüksek toplam fenolik madde miktarı (124,43 mg GAE/g) elde edilmiştir. Deney 24'te (ekstraksiyon zamanı 85 dk, etanol hacmi %65 (v/v), ekstraksiyon sıcaklığı 45°C ve sıvı/katı oranı 150 mL/g) en düşük toplam fenolik madde miktarı (21,39 mg GAE/g) elde edilmiştir. Deney 5'te ise (ekstraksiyon zamanı 50 dk, etanol hacmi %50, (v/v), ekstraksiyon sıcaklığı 60°C ve sıvı/katı oranı 60 mL/g) ABTS

yöntemi (92,62 mg TE/g) ve CHROMAC yöntemi için (313,36 mg TE/g) en yüksek antioksidan kapasite miktarları, ayrıca deney 15'te (ekstraksiyon zamanı 50 dk, etanol hacmi %80, (v/v), ekstraksiyon sıcaklığı 60°C ve sıvı/katı oranı 120 mL/g) ABTS yöntemi (41 mg TE/g) ve deney 24'te (ekstraksiyon zamanı 85 dk, etanol hacmi %65, (v/v), ekstraksiyon sıcaklığı 45°C ve sıvı/katı oranı 150 mL/g) CHROMAC yöntemi için (105,20 mg TE/g) en düşük antioksidan kapasite miktarları elde edilmiştir (Nasir ve ark. 2017).

Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease inc. USA) programı kullanılarak toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite miktarlarının ANOVA analizi sonuçları Çizelge 4.3.1.3'de verilmiştir. Yanıtlar ve faktörler arasındaki gerçek ilişkiyi tanımlamak için kullanılan *p*-değeriyle (Folin, ABTS ve CHROMAC için <0,0001) kuadratik polinom modelinin büyük önemi olduğunu ve %95 güven seviyesinde anlamlı olduğu bulunmuştur. *F*-değeri de (Folin, ABTS ve CHROMAC yöntemleri için sırasıyla 11,69, 12,34 ve 10,19) %95 güven düzeyinde anlamlıdır.

5.1.2.2. Spektroskopik ölçümler için yüzey analiz grafikleri

5.1.2.2.1. Toplam fenolik madde miktarı için yüzey analiz grafikleri

Chlorella vulgaris mikroalginde antioksidan bileşiklerin ultrasonik destekli ekstraksiyon üzerine ekstraksiyon zamanı, etanol hacmi, ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranı etkisi araştırılmıştır. Çizelge 4.3.1.3'de listelenen *F*-değerleri ve *p*-değerleri, her biri katsayısı belirtecek şekilde belirlenmiştir. Tahmini toplam fenolik madde miktarı ile ölçülen fenolik madde miktarları arasında yüksek bir doğrusal ilişki ($R^2 = 0,9160$) gözlenmiştir (Nasir ve ark. 2017).

Toplam fenolik madde miktarı için kuadratik polinom denklemi Çizelge 4.3.1.1'de verilmiştir. *F*-değerinin büyüklüğü ne kadar büyükse ve *p*-değeri ne kadar küçükse ($p < 0,05$) karşılık gelen katsayı daha etkilidir. Buna göre x_2 (etanol hacmi), x_4 (sıvı/katı oranı), x_1x_2 , x_1x_4 , x_1^2 , x_2^2 , x_3^2 ve x_4^2 , en önemli faktörler bulunmuştur. Ancak x_1

(ekstraksiyon zamanı), x_3 (ekstraksiyon sıcaklığı), x_1x_3 , x_2x_3 , x_2x_4 , x_3x_4 ise daha az etkiye sahiptir.

Toplam fenolik madde miktarları yüzey analiz grafikleri Şekil 4.3.1.1.1'de verilmiştir. Grafiğe bakıldığında etanol hacmi artıkça toplam fenolik madde miktarı artıyor ve ekstraksiyon zamanı artıkça toplam fenolik madde miktarı azalıyor (Şekil 4.3.1.1.1.a). Şekil 4.3.1.1.1.a'ya göre yüksek etanol hacmi kullanıldığında antioksidan maddeler daha yüksek verimle ekstrakte edildiği için toplam fenolik madde miktarı da artmıştır. Şekil 4.3.1.1.1.b'de gösterilen ekstraksiyon zamanı ve sıvı/katı oranının etkisine bakıldığında sıvı/katı oranı 90 mL/g değerine ulaşınca toplam fenolik madde miktarı artmıştır. Ekstraksiyon zamanı azaldıkça toplam fenolik madde miktarı da azalmıştır. Şekil 4.3.1.1.1.b'de ise daha yüksek sıvı/katı oranı kullanıldığında ise hedef bileşiklerin difüzyonunu sağlamak uygulanan ultrasonik kavitasyon azalacağı için toplam fenolik madde miktarı da azalmaktadır (Tsiaka ve ark. 2015).

5.1.2.2.2. Antioksidan kapasitesi için yüzey analiz grafikleri

Çizelge 4.3.1.3'deki verilere göre antioksidan kapasite yöntemleri için ANOVA sonuçları yüksek regresyon değerleri ($R^2 = 0,9201$ ABTS için ve $0,9049$ CHROMAC için) göstermiştir. Antioksidan kapasitesi yöntemleri için kuadratik polinom denklemleri Çizelge 4.3.1.1'de verilmiştir. x_2 , x_3 , x_1x_2 , x_2x_4 , x_3x_4 , x_1^2 , x_2^2 , x_3^2 , x_4^2 ABTS için ve x_2 , x_3 , x_4 , x_1x_2 , x_1x_4 , x_2x_3 , x_2x_4 , x_2^2 , x_4^2 CHROMAC için, en önemli faktörler bulunmuştur. Ancak x_1 , x_4 , x_1x_3 , x_1x_4 , x_2x_3 ABTS için ve x_1 , x_1x_3 , x_3x_4 , x_1^2 , x_3^2 CHROMAC için, ultrasonik destekli ekstraksiyonun antioksidan kapasite değerleri üzerinde önemsiz faktörler olarak bulunmuştur (Nasir ve ark. 2017).

Antioksidan kapasitesi için yüzey analiz grafikleri Şekil 4.3.1.1.2'de verilmiştir. ABTS yöntemi için ikili etkileşim olarak ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranının etkisi Şekil 4.3.1.1.2.a'da gösterilmiştir. Tüm sıvı/katı oranlarında ekstraksiyon sıcaklığının artması ile antioksidan kapasitesinde bir artış gözlenmiştir. Yüksek sıcaklıkta (75°C) ve yüksek sıvı/katı oranında (65 mL/g) en yüksek antioksidan kapasite gözlenmiştir. CHROMAC yöntemi için ekstraksiyon zamanı, sıvı/katı oranının etkisi Şekil

4.3.1.1.2.b'de gösterilmiştir. Daha yüksek ekstraksiyon zamanında en yüksek antioksidan kapasitesi gözlenmiştir. Sıvı/katı oranı arttıkça (eksponensiyel) antioksidan kapasite değeri giderek artmakta (170 mg TE/g liyofilize alg) fakat daha sonra azalış göstermektedir. Sıcaklığın arttırılmasıyla kütle aktarım hızı da artacağı için yüksek antioksidan maddelerinin çözünürlüğü de artacaktır (Yolmeh ve ark. 2014). Elde edilen yüzey analiz grafiğinde de sıcaklık arttıkça antioksidan kapasite değeri artmaktadır.

5.1.2.3. Ekstraksiyon parametrelerin optimizasyonu ve modelin validasyonu

Chlorella vulgaris mikroalgi için yüksek toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite miktarları elde edilmesi için bulunan optimum ultrasonik destekli ekstraksiyon şartları Çizelge 4.3.1.2.1'de verilmektedir. Maksimum toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite miktarları için ekstraksiyon zamanı (x_1) 146 dakika, etanol hacmi (x_2) %71, v/v, ekstraksiyon sıcaklığı (x_3) 72°C ve sıvı/katı oranı (x_4) 62 mL/g bulunmuştur. Belirlenen optimum koşullarda ekstraksiyon çalışması yapıldığında en yüksek optimum tahmini sonuç (toplam fenolik madde için; 135,01 mg GAE/g liyofilize alg ve ABTS için, 101,79 mg TE/g liyofilize alg; CHROMAC için, 325,66 mg TE/g liyofilize alg) hesaplanmıştır. Deneysel olarak toplam fenolik madde miktarı 133,70 mg GAE/g liyofilize alg ve antioksidan kapasite miktarları 101,19 mg TE/g liyofilize alg (ABTS), 325,26 mg TE/g liyofilize alg (CHROMAC) bulunmuştur. Bulunan tahmini değerler deneysel değerler karşılaştırıldığında uyumlu bulunmuştur (Nasir ve ark. 2017).

Literatürde verilen başka bir çalışmada toplam fenolik madde miktarı 227-689 mg GAE/g ve antioksidan kapasite miktarı 455-756 mg TE/g bulunmuştur (Hernández-Carranza ve ark. 2016). Bildiğimiz kadarıyla mikroalglerden antioksidan bileşiklerin spektroskopik çalışmaları ile ilgili literatürde yayın bulunmamaktadır. Ancak farklı matris içeren farklı karotenoidler için bu değerlerin uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla çok yanıtlı yüzey analizi ile bulunan optimum ekstraksiyon koşullarında tahmin edilen değerler ile elde edilen deneysel değerler arasında yüksek korelasyon değerleri bulunmuştur. Sonuç olarak *Chlorella vulgaris* mikroalginin toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite miktarlarını için optimum ekstraksiyon koşullarını

belirlemek için merkezi kompozit dizayn modeli doğru ve güvenilir olarak kabul edilmiştir.

5.2. Kromatografik yöntemler

Chlorella vulgaris mikroalginden karotenoid miktarlarının tayini için HPLC analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem için çizilen kalibrasyon grafikleri Çizelge 4.2.1'de verilmiştir.

5.2.1. Ekstraksiyon çözücü seçimi

Chlorella vulgaris mikroalginde bulunan karotenoidlerin ultrasonik destekli ekstraksiyonda uygun çözücülerin seçimi için farklı derişimlerde metanol, etanol ve aseton (%100, %80, %60 (v/v)) çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlarda bulunan lutein, β -karoten ve α -karoten miktarları Şekil 4.2.1.1'de verilmiştir.

Lutein (Şekil 4.2.1.1.a) ve α -karoten (Şekil 4.2.1.1.b) için daha yüksek karotenoid miktarları %100 metanol ile elde edilmiştir. Ancak β -karoten için en iyi %100 etanol ile ekstrakte edildiği Şekil 4.2.1.1.b'de gösterilmiştir. HPLC analizi sonuçlarına göre *Chlorella vulgaris* mikroalginde yüksek miktarda lutein ve ardından β -karoten bulunmuştur. Yapılan bu tez çalışmasında *Chlorella vulgaris* mikroalginde α -karoten ilk defa yüksek miktarda belirlenmiştir. Literatürde böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak bir literatür çalışmasında (Yuan ve ark. 1997) α -karoten miktarı (0,02 mg/g) çok düşük bir miktarda bulunmuştur. Şekil 4.2.1.1.a'ya göre metanol, *Chlorella vulgaris* mikroalginden tüm karotenoid bileşenlerin ekstrakte edilmesi için çok etkili bir çözücüdür. β -karoten ve α -karoten ekstraksiyonu için %60 metanol, etanol veya aseton kullanıldığında kromatografik olarak bu karotenoidler tayin edilememiştir. α -karoten için ikinci en yüksek ekstraksiyon çözücüsü %100 etanoldür. Bu sonuçlar, literatür çalışmasıyla (Cha ve ark. 2010) karşılaştırıldığında uyumlu bulunmuştur. Bu literatür çalışmasında en yüksek karotenoid ekstraksiyon verimi %90 etanol ile elde edilmiştir. Diğer çözücülere kıyasla etanol, hidrofobik karotenoidlerin ekstrakte edilmesi için çok uygun bir çözücüdür. *Chlorella vulgaris*, orta derecede yüksek polariteli bileşiklere

sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle daha az toksik olan etanol en uygun ekstraksiyon çözücüsü seçilmiştir.

5.2.2. Kemometrik yöntemler

Chlorella vulgaris mikroalginden temel karotenoidlerin ekstraksiyonu için optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi için merkezi kompozit dizayn yöntemi kullanılmıştır. Yapılan 30 deney için kromatografik yöntemle bulunan deneysel değerler ve ANOVA analizi sonucu bulunan tahmini değerler Çizelge 4.3.2.2’de verilmiştir. Deneysel yanıtlara göre lutein miktarı 0,096 mg/g’dan 3,90 mg/g’a, α -karoten 0,010 mg/g’dan 0,20 mg/g’a ve β -karoten 0,008 mg/g’dan 0,180 mg/g’a kadar değişiklik göstermiştir. Çizelge 4.3.2.2’ye bakıldığında maksimum lutein miktarı (3,90 mg/g) için ekstraksiyon zamanı 50 dk, etanol hacmi %80 (v/v), ekstraksiyon sıcaklığı 60°C ve sıvı/katı oranı 120 mL/g olduğu bulunmuştur. Bu arada, en az lutein miktarı ise (0,096 mg/g) ekstraksiyon zamanı 85 dk, etanol hacmi %35 (v/v), ekstraksiyon sıcaklığı 45°C ve sıvı/katı oranı 90 mL/g’da elde edilmiştir. Bu sonuçlar, lutein veriminin ekstraksiyon zamanına, etanol hacmine, ekstraksiyon sıcaklığına ve sıvı/katı oranına olan duyarlılığını yansıtmaktadır. α -karoten için ekstraksiyon zamanı 85 ve 120 dk, etanol hacmi %80 ve 95 (v/v), ekstraksiyon sıcaklığı 45°C ve 60°C, ve sıvı/katı oranı 60, 90 mL/g’de sırasıyla en yüksek verim gözlenmiştir (0,2 mg/g). Etanol hacmi ve sıvı/katı oranı azaldıkça en düşük α -karoten değeri elde edilmiştir (0,010 mg/g). β -karoten için ise ekstraksiyon zamanı 85 dk, etanol hacmi %95 (v/v), ekstraksiyon sıcaklığı 45°C ve sıvı/katı oranı 90 mL/g’da çalışıldığında en yüksek verim elde edilmiştir (0,140 mg/g). Etanol hacmi ve sıvı/katı oranı azaldıkça en düşük β -karoten değeri elde edilmiştir (0,008 mg/g).

Çizelge 4.3.2.3’de lutein, β -karoten ve α -karoten verimleri için p -değeri <0,0001 bulunmuştur. Kuadratik polinom modelinin yanıt ve değişkenler arasındaki gerçek ilişkiyi tanımlamak için anlamlı olduğu bulunmuştur. Modelin F -değerleri (sırasıyla, lutein, β -karoten ve α -karoten için 16,96, 30,16 ve 63,36) %95 güven aralığında anlamlı bulunmuştur. Sırasıyla, lutein, β -karoten ve α -karoten için lack-of-fit p -değerleri 0,1305, 0,0612 ve 0,0547 bulunması modelin geçerliliğini göstermektedir.

5.2.2.1. Lutein için yüzey analiz grafikleri

Ultrasonik destekli ekstraksiyonda etkili faktörlerin (ekstraksiyon zamanı, etanol hacmi, ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranı) ANOVA analizine göre lutein miktarları üzerindeki etkisini gösteren yüzey analiz grafikleri Şekil 4.3.2.1.1'de verilmiştir. En yüksek lutein miktarı yüksek sıcaklık ve yüksek etanol hacmi kullanıldığında elde edilmiştir.

Çizelge 4.3.2.3'de lutein için yüksek regresyon katsayısı ($R^2 = 0,9406$) bulunmuştur. Çizelge 4.3.2.1'e bakıldığında x_2 (etanol hacmi), x_3 (ekstraksiyon sıcaklığı), x_4 (sıvı/katı oranı), x_1x_4 , x_2x_3 , x_2x_4 , x_3x_4 , ve x_3^2 en anlamlı değişkenler olarak bulunmuştur ($p < 0,05$). Ancak x_1 (ekstraksiyon zamanı), x_1x_2 , x_1x_3 , x_1^2 , x_2^2 ve x_4^2 en az etkili değişkenler olarak bulunmuştur ($p > 0,05$). Ekstraksiyon sıcaklığı arttığında, karotenoid verimi de artmaktadır. Optimizasyon koşullarının belirlenmesinde etanol hacmi önemli bir faktördür. *Haematococcus pluvialis* mikroalginde bulunan karotenoidlerin geri kazanımında etanol hacmi en fazla etkili faktör olarak bulunmuştur (Reyes ve ark. 2014).

5.2.2.2. β -karoten için yüzey analiz grafikleri

Ultrasonik destekli ekstraksiyonda etkili faktörlerin (ekstraksiyon zamanı, etanol hacmi, ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranı) ANOVA analizine göre β -karoten miktarları üzerindeki etkisini gösteren yüzey analiz grafikleri Şekil 4.3.2.1.2'de verilmiştir. Çizelge 4.3.2.1'de β -karoten miktarı için x_2 (etanol hacmi), x_3 (ekstraksiyon sıcaklığı), x_4 (sıvı/katı oranı), x_1x_2 , x_1x_4 , x_2x_3 , x_3x_4 , x_2^2 , x_3^2 en önemli değişkenlerdir. x_1 (ekstraksiyon zamanı), x_1x_3 , x_2x_4 , x_1^2 ve x_4^2 değişkenlerinin ise β -karoten miktarı üzerinde çok az etkisi vardır.

Şekil 4.3.2.1.2.a'de en yüksek β -karoten miktarı yüksek sıvı/katı oranı ve düşük ekstraksiyon zamanı kullanıldığında elde edilmiştir. Şekil 4.3.2.1.2.b'de en yüksek β -karoten miktarı yüksek sıcaklık ve yüksek etanol hacmi kullanıldığında elde edilmiştir.

Yüksek etanol hacmiyle birlikte yüksek ekstraksiyon sıcaklığının kullanılması, *Chlorella vulgaris* mikroalginden yüksek miktarda karotenoid elde edilebileceği sonucuna varılabilir.

5.2.2.3. α -karoten için yüzey analiz grafikleri

Ultrasonik destekli ekstraksiyonda etkili faktörlerin (ekstraksiyon zamanı, etanol hacmi, ekstraksiyon sıcaklığı ve sıvı/katı oranı) ANOVA analizine göre α -karoten miktarları üzerindeki etkisini gösteren yüzey analiz grafikleri Şekil 4.3.2.1.3'de verilmiştir. Çizelge 4.3.2.1'de α -karoten miktarı için x_2 (etanol hacmi), x_3 (ekstraksiyon sıcaklığı), x_4 (sıvı/katı oranı), x_1x_2 , x_1x_3 , x_1x_4 , x_2x_3 , x_3x_4 , x_2^2 , x_3^2 en önemli değişkenlerdir. Aynı zamanda, x_1 , x_2x_4 , x_1^2 , x_4^2 değişkenlerinin ise α -karoten miktarı üzerinde çok az etkisi vardır.

Şekil 4.3.2.1.3.a'da yüksek ekstraksiyon zamanı ve yüksek etanol hacminde yüksek α -karoten miktarı elde edilmiştir. Şekil 4.3.2.1.3.b'de yüksek ekstraksiyon sıcaklığı ve yüksek etanol hacminde yüksek α -karoten miktarı elde edilmiştir.

5.2.2.4. Ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu ve modelin validasyonu

Yüksek sıcaklık, çözünürlük ve çözücü viskozitesinin karotenoid verimi üzerinde olumlu etkileri vardır. Ancak yüksek sıcaklıklarda karotenoidlerin izomerizasyonu ve bozunması gerçekleşebilir. α -karoten ve β -karoten için 95°C ve 150°C'de izomerizasyon ve bozunmanın gerçekleştiği keşfedilmiştir (Chen ve ark. 1994). 98°C'de sıcaklıkta trans luteinin cis izomerlerine dönüştüğü belirlenmiştir (Aman ve ark. 2005). Buna göre yüksek sıcaklıklarda çalışıldığında izomerizasyon ve bozunma etkileri ile karşılaşılabilir. Ancak yapılan bu çalışmada karotenoidler için optimum sıcaklık aralığı 66-71°C olarak bulunmuş ve bu sıcaklıkta yapılan ekstraksiyon çalışmasının HPLC analizinde izomer ürünlere rastlanmamıştır. Yapılan literatür çalışmasında belirlediğimiz optimum sıcaklık değerlerinin karotenoidlerin izomerleşmesine veya bozunmasına neden olmadığı çünkü karotenoidlerin baskın olarak trans konfigürasyonda olduğu ortaya koyulmuştur (Von Doering ve ark. 1995).

Deneysel sonuçlara ve istatistiksel analizlere dayanarak istenen yanıtlarla optimum düzeydeki değişkenlerin belirlenmesi için ekstraksiyon değişkenlerinin optimizasyonu yapılmıştır. En yüksek ekstraksiyon verimini elde etmek için optimum koşullar belirlenmiştir. Luteinin ekstraksiyonu için optimum koşulları şöyledir: ekstraksiyon zamanı, 81 dk; etanol hacmi, %88 (v/v); ekstraksiyon sıcaklığı, 69°C; sıvı/katı oranı, 114 mL/g, tahmin edilen maksimum lutein verimi 4,828 mg/g'dır. Luteinin deneysel değeri, 4,844±0,780 mg/g'dır. β-karotenin ekstraksiyonu için optimum koşullar: ekstraksiyon zamanı, 85 dk; etanol hacmi, %94 (v/v); ekstraksiyon sıcaklığı, 66°C; sıvı/katı oranı, 103 mL/g, tahmin edilen maksimum β-karoten verimi 0,260 mg/g'dır. β-karotenin deneysel değeri ise 0,258±0,020 mg/g bulunmuştur. α-karoten için optimum koşullar: ekstraksiyon zamanı, 88 dk; etanol hacmi, %87 (v/v); ekstraksiyon sıcaklığı, 71°C; sıvı/katı oranı, 108 mL/g, tahmin edilen maksimum verimi 0,274 mg/g'dır. α-karotenin deneysel değeri, 0,275±0,040 mg/g'dır. Deneysel değerler ve tahmini değerler uyumlu bulunmuştur. Mükemmel bir korelasyon (%95 güven aralığında) tahmin edilen ve deneysel değerler arasındaki model validasyonunu doğrulamıştır. Dolayısıyla, merkezi kompozit dizayn ile temel karotenoidlerin (lutein, β-karoten, α-karoten) maksimum verimle ekstraksiyonu için optimum koşullar doğru ve güvenilir olarak belirlenebilir.

5.3. Sonuç

Bu tez çalışması, mikroalglerden spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle ekstraksiyon koşullarını optimize etmeyi amaçlayan özgün bir çalışmadır. Spektroskopik olarak antioksidan miktarları ABTS ve CHROMAC yöntemleriyle tayin edilmiştir. Karotenoid miktarları ise HPLC analizi ile tayin edilmiştir. *Chlorella vulgaris* mikroalginden ultrasonik destekli ekstraksiyon kullanarak antioksidan miktarların optimize edilmesi için çok yanıtlı yüzey analizi başarıyla incelenmiştir. Karotenoid miktarları için optimizasyonda ise tek yanıtlı yüzey analizi başarıyla incelenmiştir. Merkezi kompozit dizayn, ultrasonik destekli ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu için etkili bir dizayn yöntemi olarak bulunmuştur. En yüksek antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde miktarları için en uygun koşullar

Çizelge 4.3.1.2.1’de verilmiştir. En yüksek karotenoid verimi elde etmek için ise en optimum koşullar Çizelge 4.3.2.2.1’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre UAE yöntemi, mikroalglerden karotenoid ekstrakte edilmesi için etkili yöntemidir. İstatistiksel dizayn metodolojisi, zaman süresinin kısılmasına ve ekstraksiyon optimizasyonu için esnekleşmesine yardımcı olmuştur. Karotenoid bileşiklerinin belirlenmesi için *Chlorella vulgaris* üzerinde daha fazla çalışma yapılabilir. Ancak, *Chlorella vulgaris* mikrolalginde bulunan karotenoidler hakkındaki sınırlı bilgilerimizle en çok aranan üç ana karotenoid (lutein, β -karoten, α -karoten) başarılı bir şekilde bulunmuştur. Bu koşullarda *Chlorella vulgaris* türünde α -karoten ilk defa yüksek miktarlarda tayin edilmiştir. Bununla ilgili literatürde herhangi bir çalışma ile karşılaşılmamıştır. Bu çalışma aynı zamanda *Chlorella vulgaris* mikroalginin önemli karotenoid ve antioksidan bileşiği içerdiği için iyi ve yenilenebilir bir kaynak olarak düşünülebileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abo-Shady, A.M., Mohamed, Y.A., Lasheen, T. 1993.** Chemical composition of the cell wall in some green algae species. *Biologia Plantarum*, 35:629-632.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., Mason, T.J. 2004.** Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11:262-265.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, S.E. 2008.** Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160:413–419.
- Aman, R., Schieber, A., Carle, R. 2005.** Effect of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of β -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:9512-9518.
- Ariga, T. 2004.** The antioxidative function preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *Biofactors*, 21:197-201.
- Arvayo-Enriquez, H., Mondaca-Fernández, I., Gortárez-Moroyogui, P., López-Cervantes, J., Rodríguez-Ramírez, R. 2013.** Carotenoids extraction and quantification: a review. *Analytical Methods*, 5:2916-2924.
- Aybastier, Ö., Demir, C. 2010.** Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene-divinylbenzene copolymer using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63:170–178.
- Aybastier, Ö., Şahin, S., Işık, E., Demir, C. 2011.** Determination of total phenolic content in *Prunella L.* by horseradish peroxidase immobilized onto chitosan beads. *Analytical Methods*, 3:2289-2297.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2006.** Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology. CRC Press, New York, USA, 301 pp.
- Baş, D., Boyacı, I.H. 2007.** Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78:836–845.
- Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, M.N., Franco M.J., Raymunda, A. 2013.** Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2:164-173.
- Beijerinck, M.W. 1890.** Culturversuche mit zoochlorellen lichenengoniden und anderen niederen Algen I-III. *Botanische Zeitung*, 48:726-740.

- Ben-Amotz, A., Fishler, R. 1998.** Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis β -carotene in vegetables and fruit commonly consumed in Israel. *Food Chemistry*, 62(4):515-520.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A. 2008.** Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76:965–977.
- Biehler, E., Mayer, F., Hoffmann, L., Krause, E., Bohn, T. 2010.** Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 75:55-61.
- Brennan, L., Owende, P. 2010.** Biofuels from microalgae- A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14:557-577.
- Brück, W.M., Reisse, S., Garbe, D., Brück T.B. 2012.** Industry potential of marine bioactive components: downstream processing and vehicles for efficient delivery in situ: Marine bioactive compounds: sources, characterization and applications, Ed.: Hayes, M, Springer, New York, pp. 129-158.
- Castro-Puyana, M., Herrero, M., Urreta, I., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibanez, E., Suarez-Alvarez, S. 2013.** Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405:4607–4616.
- Cha, K.H., Lee, H.J., Koo, S.Y., Song, D.G., Lee, D.U., Pan, C.H. 2010.** Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:793:797.
- Chacón-Lee, T.L., González-Mariño, G.E. 2010.** Microalgae for “healthy” foods- Possibilities and challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9:655–675.
- Chen, B.H., Chen, T.M., Chien, J.T. 1994.** Kinetic model for studying the isomerization of α - and β -carotene during heating and illumination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42:2391-2397.
- Chen, F., Jiang, Y. 1999.** Microalgal biotechnology. China Light Industry Press, Beijing, China, 348 pp.
- Chen, M., Zhao, Y., Yu, S. 2015.** Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172:543–550.

- Cohen, L.A. 2002.** A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene and cancer chemoprevention. *Experimental Biology and Medicine*, 227:864-868.
- Conn, P.F., Schalch, W., Truscott, T.G. 1991.** The singlet oxygen and carotenoid interaction. *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology*, 11:41-47.
- Dailey, A., Vuong, Q.V. 2015.** Optimization of aqueous extraction conditions for recovery of phenolic content and antioxidant properties from macadamia (*Macadamia tetraphylla*) skin waste. *Antioxidants*, 4:699-718.
- Daood, H.G., Bencze, G., Palotás, G., Pék, Z., Sidikov, A., Helyes, L. 2014.** HPLC analysis of carotenoids from tomatoes using cross-linked C18 columns and MS detection. *Journal of Chromatographic Science*, 52:985-991.
- Deenu, A., Naruenartwongsakul, S., Kim, S.W. 2013.** Optimization and economic evaluation of ultrasound extraction of lutein from *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18:1151-1162.
- Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G. 1997.** The carotenoids as anti-oxidants- a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41:189-200.
- Galvan D'alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K. 2012.** Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93:42-47.
- Gaziano, J.M. 1994.** Antioxidant, vitamins and coronary artery disease risk. *American Journal of Medicine*, 97(Suppl.3A):18-21.
- Gouveia, L., Empis, J. 2003.** Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4:227-233.
- Gouveia, L., Marques, A.E., Sousa, J.M., Moura, P., Bandarra, N.M. 2010.** Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients. *Food Science and Technology Bulletin Functional Foods*, 7:21-37.
- Goyal, D., Goyal, S.K. 1998.** Biotechnological potential of microalgae: Advances in Phycology, Ed.: Verma, B.N., Kargupta, A.N., Goyal, S.K., APC Publications Pvt. Ltd, New Delhi, India, pp: 1-21.
- Güçlü, K., Altun, M., Özyürek, M., Karademir, S.E., Apak, R. 2006.** Antioxidant capacity of fresh, sun- and sulphited-dried Malatya apricot (*Prunus armeniaca*) assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and folin methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 41:76-85.

Hernandez-Carranza, P., Ávila-Sosa, R., Guerrero-Beltran, J.A., Navarro-Cruz, A.R., Corona-Jimenez, E., Ochoa-Velasco, C.E. 2016. Optimization of antioxidant compounds extraction from fruit by-products: Apple pomace, orange and banana peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40:103-115.

Hodisan, T., Socaciu, C., Ropan, I., Neamtu, G. 1997. Carotenoid composition of Rosa canina fruits determined by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16(3):521-528.

Horwitz, W. 1988. Focus on sampling: Sampling and preparation of sample for chemical examination. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71:241-245.

Jacotet-Navarro, M., Rombaut, N., Fabiano-Tixier, A.S., Danguien, M., Bily, A., Chemat, F. 2015. Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids from rosemary. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27:102–109.

Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. 1997. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO Publishing, Paris, 661 pp.

Jespersen, A.M., Christoffersen, K. 1987. Measurements of chlorophyll a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. *Archiv für Hydrobiologie*, 109:445–454.

Kadam, S.U., Tiwari, B.K., O'Donnel, C.P. 2013. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:4667-4675.

Kardinaal, A.F.M., Kok, F.J., Ringstad, J., Gomez-Aracena, J., Mazaev, V.P., Kohlmeier, L., Martin, B.C., Aro, A., Kark, J.D., Delgado-Rodriguez, M., Riemersma, R.A., Vant Veer, P., Huttunen, J.K., Martin-moreno, J.M. 1993. Antioxidants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study. *The Lancet*, 342:1379-1384.

Kong, W., Liu, N., Zhang, J., Yang, Q., Hua, S., Song, H., Xia, C. 2012. Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 51:2006–2013.

Lai, J., Wang, H., Wang, D., Fang, F., Wang, F., Wu, T. 2014. Ultrasonic extraction of antioxidants from chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit using RSM and their characterization. *Molecules*, 19:9019-9032.

- Matshediso, P.G., Cukrowska, E., Chimuka, L. 2015.** Development of pressurized hot water extraction (PHWE) For essential compounds from *Moringa oleifera* leaf extracts. *Food Chemistry*, 172:423-427.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. 2001.** The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385:13-19.
- Nasir, N.T.B.M., Şahin, S., Çakmak, Z.E., Çakmak, T. 2017.** Optimization of ultrasonic-assisted extraction via multiresponse surface for high antioxidant recovery from *Chlorella* sp. (Chlorophyta). *Phycologia*, 56(5). Doi:10.2216/16132.1 (Baskıda).
- Norton, T.A., Melkonian, M., Andersen, R.A. 1996.** Algal biodiversity. *Phycologia*, 35:308-326.
- Pacini, T., Fu, W.Q., Gudmundsson, S., Chiaravalle, A.E., Brynjolfsan, S., Palsson, B.O., Astarita, G., Paglia, G. 2015.** Multidimensional analytical approach based on UHPLC-UV-Ion Mobility-MS for the screening of natural pigments. *Analytical Chemistry*, 87:2593-2599.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Le Bourvellec, C., Renard, C.M.G.C., Chemat, F. 2012.** Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, 111:73–81.
- Pomeranz, Y., Meloan, C.E. 1994.** Food analysis: Theory and practice, Chapman and Hall, New York, USA, 778 pp.
- Prasad, V., Gupta, R.K. 2007.** Food, feed and nutraceutical applications of algae: Advances in Applied Phycology, Ed.: Gupta, R.K., Pandey, V.D., Daya Publishing House, New Delhi, India, pp: 131-141.
- Rao, A.V., Rao, L.G. 2007.** Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55:207-216.
- Reyes, F.A., Mendiola, J.A., Ibáñez, E., Del Valle, J.M. 2014.** Astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using CO₂-expanded ethanol. *Journal of Supercritical Fluids*, 92:75–83.
- Rodriguez-Amaya, D.B., Kimura, M. 2004.** Harvestplus handbook for carotenoid analysis. International Food Policy Research Institute (IFPRI), Washington, DC, USA, 58 pp.
- Sander, L.C., Sharpless, K.E., Craft, N.E., Wise, S.A. 1994.** Development of engineered stationary phase for the separation of carotenoid isomers. *Analytical Chemistry*, 66(10), 1667-1674.

Silberstein, J.L., Parsons, J.K. 2010. Evidence-based principles of bladder cancer and diet. *Urology*, 75:340–346.

Singh, D., Barrow, C.J., Mathur, A.S., Tuli, D.K., Puri, M. 2015. Optimization of zeaxanthin and β -carotene extraction from *Chlorella saccharophila* isolated from New Zealand marine waters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4:166-173.

Su, Q., Rowley, K.G., Balazs, N.D. 2002. Carotenoids: Separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 781:393-418.

Sui, Z., Gizaw, Y., Bemiller, J.N. 2012. Extraction of polysaccharides from a species of *Chlorella*. *Carbohydrate Polymers*, 90:1-7.

Suzuki, K., Kamimura, A., Hooker, S.B. 2015. Rapid and highly sensitive analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) with the first derivative spectrum chromatogram (FDSC) technique. *Marine Chemistry*, 176:96-109.

Şahin, S., Aybastier, Ö., Işık, E. 2013. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. *Food Chemistry*, 141:1361–1368.

Şahin, S., Demir, C. 2013. Antioksidan kapasite tayini yöntemi. Patent No. TPE-2013/06324.

Tandeau De Marsac, N., Houmard, J. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Letters*, 104:119–189.

Tsiaka, T., Zoumpoulakis, P., Sinanoglou, V.J., Makris, C., Heropoulos, G.A., Calokerinos, A.C. 2015. Response surface methodology toward the optimization of high-energy carotenoid extraction from *Aristeus antennatus* shrimp. *Analytica Chimica Acta*, 877:100–110.

Von Doering, W.E., Sotiriou-Leventis, C., Roth, W.R. 1995. Thermal interconversions among 15-cis-, 13-cis-, and all-trans- β -carotene: Kinetics, Arrhenius parameters, thermochemistry, and potential relevance to anticarcinogenicity of all-trans- β -carotene. *Journal of the American Chemical Society*, 117:2747-2757.

Wang, C.C., Chang, S.C., Inbaraj, B.S., Chen, B.H. 2010. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 120:184-192.

- Wellburn, A.R. 1994.** The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307–313.
- Wright, S.W., Mantoura, R.F.C. 1997.** Guidelines for collection and pigment analysis of field samples: Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods, Ed.: Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W., UNESCO Publishing, Paris, pp: 429-446.
- Xu, H.Y., Bao, Y.H. 2014.** Response surface optimization of extraction and antioxidant activity of total flavonoids from seed shell of *Juglans mandshurica*. *Food of Science Technology Research*, 20:715-724.
- Yeum, K.J., Russell, R.M. 2002.** Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual Review of Nutrition*, 22:483-504.
- Yolmeh, M., Habibi Najafi, M.B., Farhoosh, R. 2014.** Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 155:319–324.
- Yuan, J., Zhang, Y., Shi, X., Gong, X., Chen, F. 1997.** Simultaneous determination of carotenoids and chlorophylls in algae by high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*, 15:133-135.
- Zou, T.B., Jia, Q., Li, H.W., Wang, C.X., Wu, H.F. 2013.** Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Marine Drugs*, 11:1644-1655.

ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı : Nur Tsiqah BINTI MOHD NASIR

Doğum Yeri ve Tarihi : Kuala Lumpur, 28.09.1990

Yabancı Dili : İngilizce, Malayca, Türkçe

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Sains Seri Puteri Kız Lisesi, 2006

Lisans : Malaya Üniversitesi Fen-Edebiyat
Fakültesi Kimya Bölümü, 2009

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Araştırma görevlisi, Malaya Üniversitesi, 2012

İletişim (e-posta) : cqahsan@gmail.com

Yayımları : Nasir, N.T.B.M., Şahin, S., Çakmak, Z.E.,
Çakmak, T. 2017. Optimization of ultrasonic-
assisted extraction via multiresponse surface for
high antioxidant recovery from *Chlorella* sp.
(Chlorophyta). *Phycologia*, 56(5).
Doi:10.2216/16132.1 (Baskıda).