



**FARKLI OKSİDATİF STRES ORTAMLARINDA
MİKROALGLERDE BULUNAN
KAROTENOİDLERİN ANALİZİ**

Çiğdem YÜKSEL



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI OKSİDATİF STRES ORTAMLARINDA MİKROALGLERDE
BULUNAN KAROTENOİDLERİN ANALİZİ**

Çiğdem YÜKSEL

Doç. Dr. Saliha ŞAHİN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2018

TEZ ONAYI

Çiğdem YÜKSEL tarafından hazırlanan “FARKLI OKSİDATİF STRES ORTAMLARINDA MİKROALGLERDE BULUNAN KAROTENOİDLERİN ANALİZİ” 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.

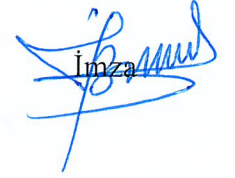
Danışman: Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

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

Üye: Prof. Dr. Belgin İZGİ
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Anabilim Dalı

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


İmza


İmza

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

12.12.2018

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 bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

26/01/2018

İmza

Ad ve Soyadı

Ciğdem YÜKSEL



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI OKSİDATİF STRES ORTAMLARINDA MİKROALGLERDE BULUNAN KAROTENOİDLERİN ANALİZİ

Çiğdem YÜKSEL

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

Mikroalgler, tek hücreli mikroskobik ve fotosentetik mikroorganizmalardır. Yapılarında protein, yağ, karbohidrat, aminoasit ve karotenoid gibi biyoaktif bileşenleri içerdiği bilinmektedir. Bu biyoaktif bileşenlerden biri olan karotenoidlerin antioksidan etki göstermesi, antioksidanların kanser, alzheimer, kalp hastalıkları gibi hastalıkları önlemesi ve mikroalglerin besin piramidinde enerjinin ve besinin kullanılabilirliğinde öncül olması nedeniyle çalışmada Chlorophyta grubuna ait *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgi ile çalışılmıştır. Farklı oksidatif stres koşullarında (1, 5 ve 20 µM H₂O₂) karotenoid miktarları, bunların toplam fenolik madde miktarı (mg gallik asit/g örnek) ve antoksidan kapasite değerleri (mg troloks/g örnek) araştırılmıştır. Uygulanan oksidatif stres miktarı sabitken karotenoid miktarlarında inkübasyon sürelerinde etkili olduğu gözlenmiş ve karotenoid miktarlarında bu sıralama 2>24>72 saat olduğu tespit edilmiştir. Aynı inkübasyon süresinde HPLC-DAD analizi sonuçlarında ise 1 µM H₂O₂ oksidatif stresine maruz bırakılan mikroalg örneklerinde en yüksek karotenoid miktarları elde edilmiş olup ve 20 µM doz uygulanan mikroalg örneklerinde ise toksik doz olabileceği düşünülmüştür. Oksidatif stres koşulları değiştirildiğinde karotenoid miktarlarının ve karotenoidin yapısının değişebildiği tespit edilmiştir. Spektroskopik ve kromatografik çalışmalar kemometrik çalışmayla da desteklenmiştir. Mikroalg örneklerinde karışım halinde bulunan karotenoid bileşiklerini ayırma işlemi gerekmeden ve çok sayıda deney yapmadan çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS) ve temel bileşen regresyonu (PCR) kullanılarak karotenoid miktarları başarıyla tahmin edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Mikroalg, *Chlamydomonas reinhardtii*, karotenoid, oksidatif stres, Folin, CHROMAC, PLS, PCR

2018, x + 72 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

ANALYSIS OF CAROTENOIDS IN MICROALGAE UNDER DIFFERENT OXIDATIVE STRESS ENVIRONMENTS

Çiğdem YÜKSEL

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Microalgae are unicellular microscopic and photosynthetic microorganisms. They contain bioactive components such as protein, fat, carbohydrate, amino acid and carotenoid. Because of the antioxidant capacities of these bioactive compounds, which are used to prevent diseases such as cancer, Alzheimer's disease and heart diseases and also because *Chlamydomonas reinhardtii* belonging to the Chlorophyta group is the precursor of energy and nutrients in food pyramid, this microalgae has been studied in the this study. The amounts of carotenoid, total phenolic contents (mg gallic acid/g sample) and antioxidant capacities of samples (mg trolox/g sample) were investigated under different oxidative stress conditions (1, 5 and 20 μM H_2O_2). Carotenoids were observed to be more effective at the same incubation time when carotenoid amounts level was detected to be 2 h > 24 h > 72 h. In the same incubation period, HPLC-PDA results showed highest amounts of carotenoids in microalgae exposed to 1 μM H_2O_2 oxidative stress and it was thought that toxic dose might be 20 μM H_2O_2 for *Chlamydomonas reinhardtii*. It has been determined that the amounts of carotenoids structures can change when oxidative stress conditions are changed. Spectroscopic and chromatographic studies have also been supported by chemometric studies. Carotenoid quantities were estimated using partial least squares regression (PLS) and principal component regression (PCR) analysis without separation mixtures of carotenoid compounds and without extensive experimentation in microalgae samples.

Key words: Microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, carotenoid, oxidative stress, Folin, CHROMAC, PLS, PCR

2018, xi + 72 pages.

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım boyunca bana sonsuz bir manevi güç veren ve tezimin sağlıklı bir şekilde ilerlemesinde ve akademik olarak gelişmemde önemli bir desteği olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Saliha ŞAHİN'e,

Bilgisini, önerilerini ve yardımlarını esirgemekten kaçınmayan Sayın Dr. Önder AYBASTIER'e,

Deneyisel çalışmalarım esnasında her zaman yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Büşra KARKAR'a ve Eftal DORKEN'e ,

Hayatım boyunca yanımda olan ve her daim destekçim olan, maddi ve manevi olarak sonsuz katkıları bulunan; anneme, babama ve kardeşime,

Sonsuz saygı ve sevgilerimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT | ii |
| ÖNSÖZ | iii |
| SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | x |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI | 3 |
| 2.1. Alg..... | 3 |
| 2.1.1. Mikroalg..... | 4 |
| 2.1.1.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mikroalgi | 7 |
| 2.2. Karotenoidler | 8 |
| 2.2.1. Karotenoidlerin tayin edilmesi..... | 16 |
| 2.3. Kemometrik yöntemler | 18 |
| 2.3.1. Çok değişkenli kalibrasyon teknikleri | 21 |
| 2.3.2. Verilerin analize hazırlanması | 21 |
| 2.3.3. PCR kalibrasyon tekniği | 21 |
| 2.3.4. PLS kalibrasyon tekniği | 21 |
| 2.4. Oksidatif stres | 22 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 27 |
| 3.1. Materyal | 27 |
| 3.1.1. Çalışmada kullanılan aletler | 27 |
| 3.1.1.1. Mor ötesi-görünür bölge (UV/VIS) spektrofotometresi | 27 |
| 3.1.1.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD)..... | 27 |
| 3.1.1.3. Liyofilizatör | 27 |
| 3.1.1.4. pH metre | 28 |
| 3.1.1.5. Analitik terazi | 28 |
| 3.1.1.6. Saf su cihazı | 28 |
| 3.1.1.7. Ultrasonik banyo | 28 |
| 3.1.1.8. Isıtıcı karıştırıcı | 28 |
| 3.1.1.9. Santrifüj | 28 |
| 3.1.1.10. Vorteks karıştırıcı | 28 |
| 3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroalg türü | 29 |
| 3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler | 29 |
| 3.1.3.1. Kimyasallar..... | 29 |
| 3.1.3.2. Çözeltiler | 30 |
| 3.2. Yöntem | 32 |
| 3.2.1. Örnek hazırlama işlemleri | 32 |
| 3.2.1.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon | 33 |
| 3.2.2. Spektroskopik yöntemler | 33 |
| 3.2.2.1. Folin-Ciocalteu yöntemi | 33 |
| 3.2.2.2. CHROMAC yöntemi..... | 34 |
| 3.2.3. Kromatografik yöntemler | 35 |
| 3.2.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-..... | 35 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| DAD) | 35 |
| 3.2.4. Kemometrik yöntemler | 35 |
| 4. BULGULAR | 43 |
| 4.1. Spektroskopik yöntemler | 43 |
| 4.1.1. Folin-Ciocalteu yöntemi | 43 |
| 4.1.2. CHROMAC yöntemi | 44 |
| 4.2. Kromatografik yöntemler | 45 |
| 4.2.1. HPLC –DAD sonuçları | 45 |
| 4.3. Kemometrik yöntemler | 49 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 55 |
| KAYNAKLAR | 65 |
| ÖZGEÇMİŞ | 72 |



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|-----------------------------------|
| % | Yüzde sembolü |
| (NH ₂) ₂ CO | Üre |
| µL | Mikrolitre |
| µm | Mikrometre |
| µM | Mikromolar |
| µmol/L | Mikromolar |
| C ₁₈ | 18 karbonlu zincir |
| C ₃₀ | 30 karbonlu zincir |
| C ₄₀ H ₅₆ | Karoten yapı örneği |
| C ₅ | 5 karbonlu zincir |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | Kalsiyum klorür di hidrat |
| cm | Santimetre |
| CO ₂ | Karbon dioksit |
| Cr ⁶⁺ | Krom (VI) iyonu |
| CuSO ₄ | Bakır (II) sülfat |
| dk | Dakika |
| E | Lüks birimi, aydınlanma şiddeti |
| g | Gram |
| H ₂ O | Su |
| H ₂ O ₂ | Hidrojen peroksit |
| HCl | Hidroklorik asit |
| \bar{y}_i | i. örneğin tahmini değeri |
| k' | Kapasite faktörü |
| K ₂ Cr ₂ O ₇ | Potasyum dikromat |
| K ₂ HPO ₄ | Dipotasyum hidrojen fosfat |
| KH ₂ PO ₄ | Potasyum dihidrojen fosfat |
| L | Litre |
| LOD | Tayin limiti |
| LOQ | Ölçüm limiti |
| M | Molarite |
| M | Kalibrasyon örneklerinin sayısı |
| mg | Miligram |
| MgSO ₄ .7 H ₂ O | Magnezyum sülfat hepta hidrat |
| mL | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| mM | Milimolar |
| mol/L | Molarite |
| mΩ | Miliohm |
| N | Azot |
| Na ₂ CO ₃ | Sodyum karbonat |
| NaCl | Sodyum klorür |
| NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O | Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat |
| NaKC ₄ H ₄ O ₆ | Sodyum potasyum tartarat |
| NaNO ₃ | Sodyum nitrat |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| NH ₄ Cl | Amonyum klorür |

| | |
|-----------------------------|---------------------------|
| nm | Nanometre |
| O ₂ ⁻ | Süperoksit anyon radikali |
| OH [·] | Hidroksil radikali |
| P | Fosfor |
| r ₁₂ | Korelasyon katsayısı |
| R ² | Regresyon katsayısı |
| s | Saniye |
| v | Hacim |
| v/v | Hacim/hacim |
| w/v | Kütle/hacim |
| y _i | i. örneğin ölçülen değeri |
| α | Alfa |
| α | Seçicilik faktörü |
| β | Beta |
| γ | Gama |
| ξ | Ksi |

Kısaltmalar

Açıklama

| | |
|----------------------|---|
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) |
| BBC | British broadcasting corporation |
| BHT | 2,6-di-ter-bütül-p-kresol |
| BKT | B-karoten oksijenaz |
| <i>C.reinhardtii</i> | <i>Clamydomonos reinhardtii</i> |
| CHYb | Karoten β-hidroksilaz |
| CRTISO | Karoten izomeraz |
| CUPRAC | Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite |
| DAD | Fotodiyot serili dedektörü |
| DD | Diadinoksantin |
| DFK | 1,5-difenilkarbazit |
| DMAPP | Dimetilalil pirofosfat |
| DMOA | Dimetiloktilamin |
| DNA | Deoksiribo nükleik asit |
| DPPH | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil |
| DT | Diatoksantin |
| EDTA | Etilen diamin tetra asetik asit |
| FRAP | Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü |
| FTIR | Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi |
| GC | Gaz kromatografisi |
| GGDP | Geranilgeranil difosfat |
| GGPP | Geranil geranil pirofosfat |
| HPLC | Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi |
| HQ | Hidrokinon |
| IPP | İsopentenil pirofosfat |
| LC | Sıvı kromatografisi |
| LCYb | Likopen β-siklaz |
| LCYe | Likopen ε-siklaz |

| | |
|-----------|--|
| M.Ö. | Milattan önce |
| MeOH | Metanol |
| MS | Kütle spektroskopisi |
| MS/MS | Kütle spektroskopisi/Kütle spektroskopisi |
| MTBE | Ter bütil metil eter |
| MVA | Mevalonik asit |
| NIPALS | Nonlinear iterative partial least squares |
| P450b-CHY | Sitokrom P450: β -hidroksilaz |
| P450e-CHY | Sitokrom P450e: ϵ -hidroksilaz |
| PCR | Temel bileşen regresyonu |
| PDS | Fitoen disaturaz |
| PLS | Kısmi en küçük kareler regresyonu |
| PPDP | Prefitoen difosfat |
| PSY | Fitoen sentaz |
| PTPaz | Protein tirozin fosfataz |
| RMSECV | Çapraz validasyon ortalama karekök hataları |
| ROS | Reaktif oksijen türleri |
| SOV | Sodyum ortovanadat |
| TAP | Tris-asetat-fosfat |
| TEA | Trietilamin |
| TLC | İnce tabaka kromatografisi |
| Troloks | 6-hidroksi 2,5,7,8 Tetrametilkroman-2-karboksilik asit |
| UHPLC | Ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi |
| UV | Ultraviyole |
| UV-VIS | Ultraviyole- görünür bölge |
| VDE | Violaksantin de-epoksidaz |
| ZDS | Z-karoten desaturaz |
| ZEP | Zeaksantin epoksidaz |
| Z-ISO | 15-cis- ζ -karoten izomeraz |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| Şekil 2.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mikroalgi..... | 7 |
| Şekil 2.2. a) İzopren Ünitesi b) Karotenoid Yapısı | 9 |
| Şekil 2.3. Mikroalglerden karotenoid biyosentezi (PSY: fitoen sentaz, IPP: isopentenil pirofosfat, DMAPP: dimetilalil pirofosfat, GGPP: geranil geranil pirofosfat, PDS: fitoen disaturaz, Z-ISO: 15-cis-ζ-karoten izomeraz, ZDS: ζ-karoten desaturaz, CRTISO: karoten izomeraz, LCYb: likopen β-siklaz, LCYe: likopen ε-siklaz, P450b-CHY: sitokrom P450: β-hidroksilaz, P450e-CHY: sitokrom P450e: ε-hidroksilaz, CHYb: karoten β-hidroksilaz, BKT: β-karoten oksijenaz, ZEP: zeaksantin epoksidaz, VDE: violaksantin de-epoksidaz | 15 |
| Şekil 2.4. Yapılan bu araştırmada kullanılan karotenoidlerin UV-VIS spektrumu | 20 |
| Şekil 3.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon çalışması | 33 |
| Şekil 4.1. 2 saat boyunca 1 µM H ₂ O ₂ oksidatif stres altındaki <i>C. reinhardtii</i> mikroalg ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı. Dedeksiyon 450 nm'de gerçekleştirildi. Pik sıralaması 1.Neoksantin, 2.Lutein, 3. Zeaksantin, 4. α-karoten, 5. β-karoten..... | 46 |
| Şekil 4.2. Kalibrasyon dizaynı için seçilen optimum PCR ve PLS bileşen sayısı | 50 |
| Şekil 5.1. <i>C.reinhardtii</i> mikroalginde bulunan karotenoidlerin oluşumu | 56 |
| Şekil 5.2. <i>C. reinhardtii</i> mikroalginde bulunan neoksantin miktarlarına H ₂ O ₂ etkisi | 60 |
| Şekil 5.3. <i>C. reinhardtii</i> mikroalginde bulunan lutein miktarlarına H ₂ O ₂ etkisi | 60 |
| Şekil 5.4. <i>C. reinhardtii</i> mikroalginde bulunan zeaksantin miktarlarına H ₂ O ₂ etkisi | 61 |
| Şekil 5.5. <i>C. reinhardtii</i> mikroalginde bulunan α-karoten miktarlarına H ₂ O ₂ etkisi | 61 |
| Şekil 5.6. <i>C. reinhardtii</i> mikroalginde bulunan β-karoten miktarlarına H ₂ O ₂ etkisi | 62 |
| Şekil 5.7. Yapılan bu araştırmada örnekte bulunan karotenoidlerin UV-VIS spektrumu | 63 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|-------|
| Çizelge 2.1. Besin kaynağı olarak mikroalg içerikleri (% kuru ağırlık) | 5 |
| Çizelge 2.2. Mikroalg kullanım alanları | 6 |
| Çizelge 2.3. Karotenoidlerin sınıflandırılması | 10 |
| Çizelge 2.4. Bazı mikroalglerde bulunan başlıca karotenoid bileşikleri..... | 16 |
| Çizelge 3.1. Varian marka Cary 50 UV/VIS spektrofometre cihazının çalışma koşulları | 27 |
| Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar | 29 |
| Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar | 30 |
| Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler | 30 |
| Çizelge 3.5. HPLC-DAD için analiz çalışma koşulları | 35 |
| Çizelge 3.6. Kalibrasyon dizaynı (Kodlanmış değerler) | 37 |
| Çizelge 3.7. Kalibrasyon dizaynı (Gerçek derişim değerleri, mg/L) | 38 |
| Çizelge 3.8. Kalibrasyon dizaynının korelasyon katsayıları | 38 |
| Çizelge 3.9. I. validasyon set dizaynı (Kodlanmış değerler) | 39 |
| Çizelge 3.10. I. validasyon set dizaynı (Gerçek derişim değerleri, mg/L) | 40 |
| Çizelge 3.11. II. validasyon set dizaynının korelasyon katsayıları | 40 |
| Çizelge 3.12. II. Validasyon set dizaynı (Kodlanmış değerler) | 41 |
| Çizelge 3.13. II. Validasyon set dizaynı (Gerçek derişim değerleri, mg/L) | 42 |
| Çizelge 3.14. II. Validasyon set dizaynının korelasyon katsayıları | 42 |
| Çizelge 4.1. Folin-Ciocalteau yöntemi için kalibrasyon grafiğı | 43 |
| Çizelge 4.2. Farklı oksidatif strese maruz bırakılmış olan <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mikroalg numunelerinde bulunan toplam fenolik madde miktarı (mg gallik asit/g örnek) | 44 |
| Çizelge 4.3. CHROMAC yöntemi için kalibrasyon grafiğı | 44 |
| Çizelge 4.4. Farklı oksidatif strese maruz bırakılmış olan <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mikroalg numunelerinde bulunan antioksidan kapasite değerleri (mg troloks asit/g örnek) | 45 |
| Çizelge 4.5. Karotenoidlerin HPLC-DAD cihazı ile analizi için belirlenen analitik parametreler | 47 |
| Çizelge 4.6. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mikroalg numunelerinde bulunan karotenoid miktarları (mg/g örnek) | 48 |
| Çizelge 4.7. PCR yöntemi ile bulunan tahmini karotenoid derişimleri (mg/L).... | 51 |
| Çizelge 4.8. PLS yöntemi ile bulunan tahmini karotenoid derişimleri (mg/L)..... | 52 |
| Çizelge 4.9. Kalibrasyon ve validasyon setleri için PCR ve PLS ile hesaplanan ortalama karekök hata değerleri | 53 |
| Çizelge 4.10. Gerçek örnekler için PCR ve PLS ile hesaplanan ortalama karekök hata değerleri | 54 |

1. GİRİŞ

Sucul ortamlarda birincil üretici konumunda olan algler makro ve mikro olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Rodriguez ve ark. 2017). Makroalg ile ilgili ilk bilgiler M.Ö. 2700'lü yıllarda Çinli Shen-Nung'un "Materia Medica" adlı eserinde eski medeniyetlerde Yunanlı Dioscorides'in algleri ilaç olarak kullandığından bahsetmesiyle elde edilmiştir. Mikroalgler ise II. Dünya Savaşı'nın ardından yaşanan kıtlık sebebiyle 1948 yılında Standford, Essen ve Tokya'da kullanılmaya başladığı görülmüştür (Becker 2007). Daha sonra Romalılar ve Mısırlılarda kozmetik amaçlı kullanılmış olup, günümüzde mikroalglerin başlıca gıda, biyoteknoloji, enerji, kimya sanayi gibi pek çok alanda yaygın kullanıma sahip olduğu görülmektedir (Dufosse' ve ark. 2005).

Mikroalgler, tek hücreli mikroskopik ve fotosentetik mikroorganizmalar olmaları sebebiyle sucul ortamlarda güneş ışığı yardımı ile farklı formlardaki organik bileşikler sentezleyebilirler (Uslu 2011, Guedes ve ark. 2011). Bu organik bileşiklerin protein, yağ, karbohidrat, aminoasit ve karotenoid gibi biyoaktif bileşenleri içerdiği bilinmektedir (Abd El Baky ve El-Baroty 2013, Hamed 2016). İçerdiği biyoaktif bileşenlerden biri olan karotenoidler meyve ve sebzelerde de bulunmaktadır (Edge ve ark. 1997). Karotenoidler; antioksidan etki göstermesi bakımından pek çok araştırmanın konusu haline gelmiştir.

Antioksidanlar, vücudumuzdaki kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan veya dış etkenler tarafından oluşan hücrelere zarar veren serbest radikalleri etkisiz hale getirerek kanser, alzheimer, kalp hastalıkları gibi hastalıkları önleyen moleküllerdir (Gaparovic ve ark. 2010). Vücudumuzda ise oksidan - antioksidan dengesi bulunmaktadır. Bu nedenle vücudumuzdaki antioksidan savunma mekanizması yetersiz kaldığında bu hastalıklar meydana gelmektedir ve bunları önlemek içinde karotenoidlerin kullanıldığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda likopenin meme (MCF-7), akciğer (NCI-H226) ve diğer bazı kanser hücrelerini inhibe ettiği, lutein'in kolon kanseri riskini azalttığı, lutein ve zeaksantin ise göz sağlığına iyi geldiğinden bahsedilmiştir (Gökbulut ve Şarer 2008). Karotenoidler doğal yollarla alglerden, sebze ve meyvelerden izole edilebildiği gibi sentetik yollarla da üretilmektedir (Varela ve ark. 2015). Son yıllarda yapılan

çalışmalarda hastalıklara karşı koruyucu etki göstermesi sebebiyle karotenoid üretiminin arttırılması önem kazanmıştır.

Kültür ortamında oksidatif stres etkisi için kullanılan besleyici elementler ve konsantrasyonları mikroalgal büyüme ve biyokimyasal yapı üzerinde değişikliklere neden olabilmektedir (Minhas ve ark. 2016). Bu çalışmadaki amacımız artan şiddette oksidatif stres uygulandığında mikroalglerdeki karotenoid miktarlarında değişim olup olmayacağını göstermek ve hem spektroskopik hem kromatografik yöntem ile tayin ettiğimiz karotenoid miktarlarını daha az çözelti ve mataryel kullanarak kemometrik yöntem ile de tayininin gerçekleştirilebilir olduğu göstermektir. Yapılan bu çalışmada bu amaçla, besin piramidinde mikroalglerin üretici olarak enerjinin ve besinin kullanılabilirliğinde öncül olması nedeniyle ve de kullanılabilirliğinin artması için bu çalışmada *Chlorophyta* familyasına ait *C.reinhardtii* mikroalgi ile çalışılmıştır.

Chlamydomonas reinhardtii mikroalgine logaritmik büyüme evresinde iken kontrol grubu haricinde farklı koşullarda oksidatif stres (1, 5 ve 20 μM H_2O_2) uygulanmaya başlanılmış ve uygulamadan sonraki 2, 24 ve 72. saatlerde hasat edilen mikroalg örnekleri kullanılmıştır.

Tüm ekstrakte edilen mikroalg örneklerinin toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan kapasite miktarlarına Folin-Ciocalteu yöntemi ve CHROMAC yöntemi kullanılarak bakılmıştır. Daha sonra örneklere HPLC-DAD cihazında geliştirilen gradient çözücü programı uygulanarak var olan karotenoidler ve miktarları tayin edilmiştir. Yapılan spektroskopik ve kromatografik çalışmalar kemometrik çalışmayla da desteklenmiştir. Karotenoidlerin kantitatif tayininde, üst üste çakışan spektrumların ya da kromatogram piklerinin bulunması nedeniyle çok değişkenli kalibrasyon teknikleri ile karışım içindeki bileşenlerin miktarı tahmin edilebilmektedir. Yaptığımız bu çalışmada da karışım halindeki karotenoid bileşiklerinin ve örnekte bulunan karotenoid bileşenlerini ayırma işlemi gerekmeden çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS) ve temel bileşen regresyonu (PCR) kullanılarak içeriğindeki karotenoid miktarları tahmin edilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Alg

Algler, fotosentetik organizmadır. Algler, karmaşık üreme sistemleri olmayan prokaryotik ya da ökaryotik ilkel bitkisel organizmalar olarak da tanımlanmaktadır (Dufosse' ve ark. 2005).

Algler sucul ortamlarda birincil üretici canlılardır. Yapılarında bulunan fotosentetik pigmentler sayesinde karbondioksit ve suyu kullanarak ışık enerjisini kimyasal bağ enerjisine çevirirler. Böylece su ortamında besin zincirinin ilk halkasını oluştururlar. Algler; karbonhidratları, proteinleri, esansiyel aminoasitleri, vitaminleri ve biyoaktif molekülleri içerdiği ve ürettiği için birçok canlının besin kaynağı olarak da kullanılabilir (Duan 2013).

Algler genellikle içerdikleri renk pigmentlerine göre altıya ayrılırlar (Aktar ve Cebe 2010);

1. Pyrophyta (Ateş rengi algler)
2. Euglenophyta (Kamçılı algler)
3. Phaeophyta (Kahverengi algler)
4. Chlorophyta (Yeşil algler)
5. Rhodophyta (Kırmızı algler)
6. Chryophyta (Altın sarısı algler)

Yapılan bu çalışmada kullanılan *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgi Chlorophyta (Yeşil Algler) grubuna girmektedir. Chlorophyta, hem tatlı hem de tuzlu sularda yaşayabilen, bir ya da çok hücreli organizmalar olduğu bilinmektedir. 2-8 mikrometre boyutunda, küre ya da elips biçimindedirler. Klorofil taşıdıkları ve fotosentez yaptıkları için bitkilere benzerler. Birçok bilim adamı tarafından, bitkiler alemindeki türlerin atası kabul edilmektedirler. Yeşil alglerin klorofil a ve b, karoten, ksantofil ve lutein gibi pigment maddeleri taşıdığı bilinmektedir.

Algler boyutlarına göre ise makroalg ve mikroalg olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Makroalgler alglerin gözle ayırt edilebilen makroskobik boyutta olanları iken mikroalgler ise alglerin gözle görülemeyen mikroskobik boyutta olanlarıdır (Rodriguez ve ark. 2017). Makroalglerin boyutları yaklaşık 2 cm, mikroalglerin boyutları µm ile ifade edilmektedir (Christaki ve ark. 2013, Ejike ve ark. 2017).

Makroalg kullanımı ile ilgili ilk bilgiler M.Ö. 2700'lü yıllarda Çinli Shen-Nung'un "Materia Medica" adlı eserinde eski medeniyetlerde Yunanlı Dioscorides'in algleri ilaç olarak kullandığından bahsetmesiyle elde edilmiştir. Daha sonraları Romalılar ve Mısırlılarda kozmetik amaçlı, Uzak Doğu ülkelerinde gıda amaçlı, Avrupa ülkelerinde ise gübre olarak kullanıldığı bilinmektedir. Mikroalgler ise II.Dünya Savaşı'nın ardından yaşanan kıtlık sebebiyle 1948 yılında Standford (ABD), Essen (Almanya) ve Tokya'da (Japonya) kullanılmaya başladığı görülmüştür (Becker 2007).

Günümüzde ise 221 alg türü ticari olarak 35 ülkede gıda, biyoteknoloji, enerji, kimya sanayi gibi birçok alanda kullanıldığı bilinmektedir (Özdemir ve Erkmen 2013).

2.1.1. Mikroalg

Mikroalgler; tek hücreli mikroskopik ve fotosentetik mikroorganizmalardır. Fotosentetik özelliğe sahip olmaları nedeniyle de H₂O ve CO₂'i bünyelerine alıp güneş ışığı yardımı ile farklı formlardaki organik bileşiklere dönüştürebilmektedir. Çoğu mikroalg ökaryot olmasına rağmen, bazı prokaryot mikroalglerde bulunmaktadır (Uslu 2011, Guedes ve ark. 2011, Olasehinde ve ark. 2017). Bu mikroorganizmalar sucul her yerde bulunabilmektedir. Tatlı sularda (göletler, kanallar, su birikintileri ve göller), denizlerde ve çok tuzlu sularda bile uygun koşullar sağlandığında yaşamlarını sürdürebilmektedir (Williams and Laurens 2010). Mikroalglerin biyolojik çeşitliliği çok fazla ve dünyada yaklaşık 800.000 mikroalg türü olduğu bilinmektedir. Fakat, bununla birlikte bazı literatürlerde de yaklaşık 35.000 türün var olduğu bildirilmiştir (Ebenezer ve ark. 2012, Olasehinde ve ark. 2017).

Mikroalglerin güneş ışığı ve CO₂'i kullanmaları karada yaşayan bitkiler ile benzerlik göstermektedir. Fakat karada yaşayan bitkilere göre mikroalglerin saatler içerisinde bölünerek çoğalmaları ve yıl boyunca üretilibilmeleri sebebiyle ürün verimliliği daha fazla olmaktadır (Siaut ve ark. 2007).

Mikroalglerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri ve gelişimleri ise çevresel faktörlere (sıcaklık, tuzluluk, pH, ışık, foto-oksidasyon, anaerobiosis ve ozmotik basınç) ve kültür ortamında kullanılan elementlere bağlı olarak değişmektedir (Sukenik 1991, Brown ve ark. 1993). Mikroalgler üreyebilmeleri için organik karbon bileşiklerine gereksinim duymamaktadır. Üremeleri için karbon kaynağı olarak karbondioksit ve bikarbonat, azot kaynağı olarak amonyum tuzları ve üre gerekmektedir. Gelişimleri için ise fosfat, sodyum klorür, magnezyum, bakır, klor ve sülfat iyonları gerekmektedir. Karbondioksit, su ve inorganik tuzların yanında fotosentetik büyüme için ışık ve aynı zamanda ortamın sıcaklığı da önem kazanmaktadır. Bu durum karada yaşayan bitkilerle kıyaslandığında daha maliyetli bir sistem ile üretimi gerçekleştirdiğini göstermektedir (Grobbelaar 2004, Kim ve ark. 2016).

Mikroalglerin protein, yağ, karbohidrat, aminoasit ve karotenoid gibi biyoaktif bileşenleri içerdiği bilinmektedir (Abd El Baky ve El-Baroty 2013, Hamed 2016). Besin kaynağı olarak kullanılan bazı mikroalglerin içerikleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir (Spolaore ve ark. 2006).

Çizelge 2.1. Besin kaynağı olarak mikroalg içerikleri (% kuru ağırlık)

| Mikroalg türü | Protein | Karbonhidrat | Yağ |
|----------------------------------|----------------|---------------------|------------|
| <i>Anabaena cylindrica</i> | 43-56 | 25-30 | 4-7 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 48 | 17 | 21 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 51-58 | 12-17 | 14-22 |
| <i>Dunaliella salina</i> | 57 | 32 | 6 |
| <i>Porphyridium cruentum</i> | 28-39 | 40-57 | 9-14 |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | 50-56 | 10-17 | 12-14 |
| <i>Spirulina sp.</i> | 60-71 | 13-16 | 6-7 |
| <i>Synechococcus sp.</i> | 63 | 15 | 11 |

Tek hücreli alglerden ilk kez *Chlorella vulgaris*'in Beijerinck (1890) tarafından üretilmiş ve tek hücreli alg kültürü kullanımı Warburg tarafından geliştirilmiştir (Warburg 1919, Yılmaz 2006). Daha sonra birçok ülke tarafından kullanılarak mikroalg endüstrisi gelişmeye başlamıştır. Mikroalgler; içerdiği proteinler, besinler, mineraller, yağ asitleri ve karotenoidler nedeniyle bileşik sentezi için geniş bir doğal kaynak olması biyoteknolojik öneme sahip kılmıştır. Ticari olarak bazı karotenoid bileşiklerinin üretiminin ve ürün veriminin artışının sağlanmaya çalışılması bu durumu desteklemektedir (Becker 2007, Cha ve ark. 2008, Goiris ve ark.2015).

Mikroalg kullanım alanlarını Dufosse' ve arkadaşları Çizelge 2.2.'de gösterildiği gibi gıda, farmasötik, boyar madde ve ticari üretim olarak dört gruba ayırmaktadırlar (Dufosse' ve ark. 2005).

Çizelge 2.2. Mikroalg kullanım alanları

| Gıda | Farmasötik |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Fonksiyonel gıda - Gıda katkı maddesi (Emülgatör, Kalınlaştırıcı) - Tatlılar | <ul style="list-style-type: none"> - Antibiyotik - Antibakteriyel - Dökme maddesi - Bağlayıcı madde - Sert ve yumuşak kapsül kabuğu - Teşhis ajanları |
| Boyar Madde | Ticari Üretim |
| <ul style="list-style-type: none"> - Yiyecek (Dondurmalar, Jöleler. - Şekerleme - Meyve Suları - Kozmetik (Rujlar, Kremeler, Losyonlar) - Eczacılıkla ilgili ürünler | <ul style="list-style-type: none"> - Hidrokarbonlar (Yakıt) - Adsorbentler - Enzimler ve diğer araştırma yapılan malzemeler |

Mikroalglerin besin maddesi olarak kullanımının yanında biyokütlesinin de önemi bulunmaktadır. Bu durum;

- Güneş enerjisini en etkili kullanan bir biyolojik sistem olan mikroalglerden organik madde sentezlenmesi,
 - İçerdiği biyoaktif bileşenler (protein, karbonhidrat, karotenoidler ve doymamış yağ asitleri) nedeniyle ticari öneme sahip olması,
 - Her türlü ortama uyum sağlayıp çok kolay ve hızlı büyüebilmesi,
 - Mikroalglerin antioksidan özelliğe sahip olan karotenoid bileşiklerini üretmesi
- şeklinde özetlenebilir (Abd El Baky ve El-Baroty 2013).

2.1.1.1. *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgi

Tek hücreli ve iki kamçılı *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgi yeşil algler diye bilinen Chlorophyta grubuna aittir. Genellikle 10 µm boyutunda, 3 µm genişliğinde oval bir hücre şekline sahip organizmadır (Şekil 2.1). Bu organizmalar; kloroplast, pirenoidler ve ışığı algılayan göz petleri içerir. Tatlı suda, nemli topraklarda, denizde ve kar altında olmak üzere birçok farklı ortamda yaşayabilmektedir. *Chlamydomonas reinhardtii*, yeşil mikroalgler sınıfı içinde tüm genom haritası ve bölünme döngüsü çıkarılmıştır (Rochaix 1995, Sirisha ve ark. 2014, Erdoğan ve ark. 2014, Çakmak ve ark. 2015).



Şekil 2.1. *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgi (Nenninger, https://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2009/C_reinhardtii.html, 2009.)

Chlamydomonas reinhardtii mikroalginin yetiştirilmesi için uygun ortam koşulları şu şekildedir.

Hazırlanışı: 940 mL saf suya aşağıdaki bileşikler ilave edilir.

| <u>mL</u> | <u>Stok solüsyonu.....</u> | <u>g/400 mL H₂O</u> |
|-----------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| 10..... | NaNO ₃ | 10,0 |
| 10..... | CaCl ₂ .2H ₂ O | 1,0 |
| 10..... | MgSO ₄ .7 H ₂ O | 3,0 |
| 10..... | K ₂ HPO ₄ | 3,0 |
| 10..... | KH ₂ PO ₄ | 7,0 |
| 10..... | NaCl | 1,0 |

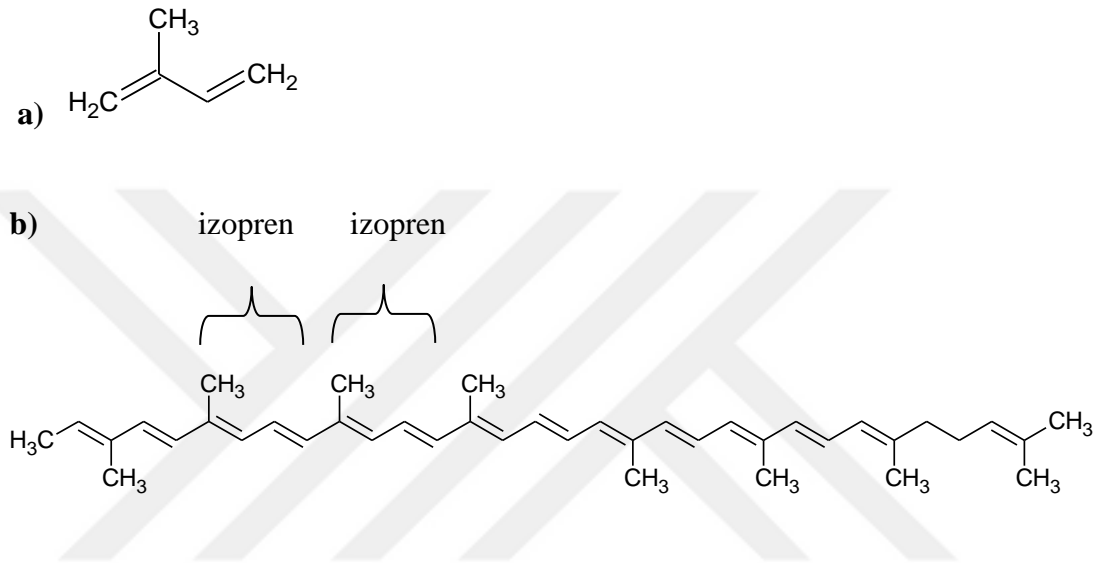
İsteğe bağlı olarak 15 g/L agar, 1 damla %1'lik FeCl₃ solüsyonu ve 2 mL iz elementleri solüsyonu ilave edilebilir (Sukatar 2002). Uygun sürelerde *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgi büyüdüktan sonra ortamdan alınarak hasat edilir.

2.2. Karotenoidler

Karotenoidler, bitkilerde ve hayvansal kaynaklı sebze ve meyvelerde bulunan sarıdan kırmızıya kadar değişen renklerden sorumlu doğal pigmentlerdir (Sander ve ark. 2000, Türkcan ve Ökmen 2012). Tüm fotosentetik organizmalarda sentezlenebilen ayrıca bazı fotosentetik olmayan bakteriler, mayalar ve funguslar tarafından da sentezlenebilen fakat hayvanlar tarafından sentezlenemeyen doğal bileşiklerdir (Rao ve Rao 2007, Cazzonelli 2011, Türkcan ve Ökmen 2012, Ye ve Bhatia 2012).

Yağda çözünebilen renk pigmentleri olan sekiz C₅ izoprenoid zincirinden oluşan karotenoidlerin genel formülü C₄₀H₅₆ olup, yapılarında fazla sayıda çift bağ bulundurmaktadır (Şekil 2.2.). Karotenoidler yapılarında bulunan bu kromofor gruplar nedeniyle renkli pigmentlerdir. Belirli bir renk oluşumu için en az yedi konjuge çift bağ içermesi gerekmektedir. Yapılarında bulunan konjuge çift bağ sayısı arttıkça da karotenoidin renk yoğunluğu da artmaktadır. Beş konjuge çift bağ içeren fitoen renksiz, on bir çift bağ içeren ve aynı zamanda domateste bulunan likopenin ise kırmızı renkli olduğu bilinmektedir. Aynı sayıda çift bağ içeren karotenoidler , siklizasyon nedeniyle farklı renk tonlarında bulunabilmektedir. Konsantrasyona ve molekülün yapısına bağlı

olarak karotenoidlerin renkleri değişebilmektedir. Ayrıca farklı karotenoid karışımlarının bir arada bulunmasıyla da farklı renk tonları elde edilmektedir (Rodriguez-Amaya ve Kimura 2004, Aksan 2005, Ata 2013). Karotenoidler 400-500 nm dalgaboyu aralığında maksimum absorpsiyon yapabilmektedirler. Bu nedenle ultraviyole- görünür (UV-VIS) bölge spektrumları oldukça karakteristiktir (Britton ve ark. 2004, Erdoğan ve ark. 2015).



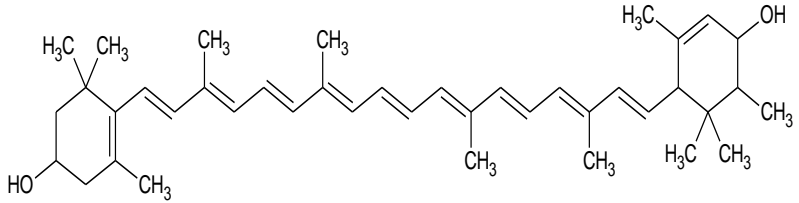
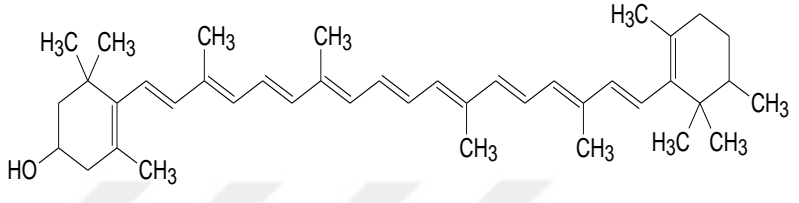
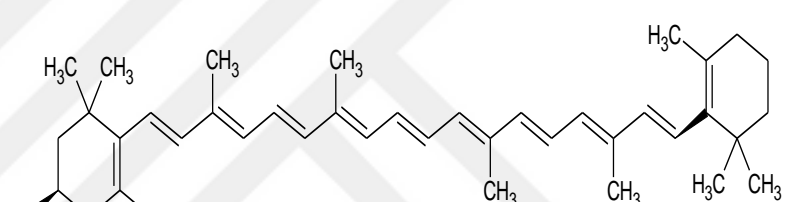
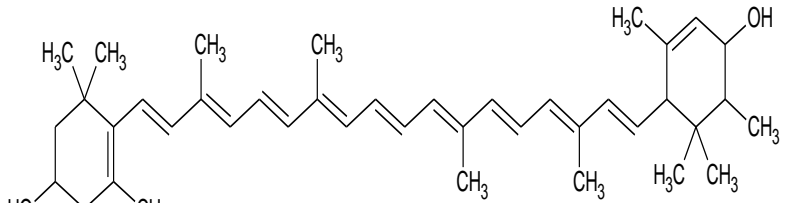
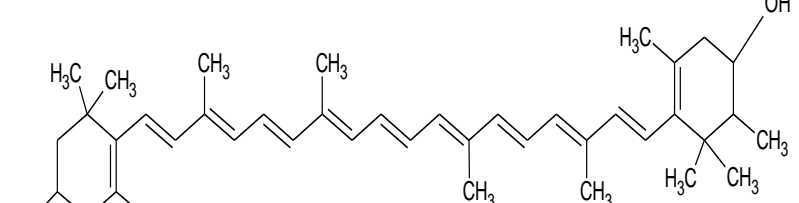
Şekil 2.2. a) İzopren Ünitesi b) Karotenoid Yapısı (Vargas ve ark. 2000, Aksan 2005)

Genel olarak karotenoidler karotenler, ksantofiller, karotenoid ketonlar ve karotenoid asitler olarak dört grupta toplanmaktadır (Türkcan ve Okmen 2012, Butnariu 2016) (Çizelge 2.3.). Karotenoidin yapısı oksijensiz hidrokarbonlardan oluşuyorsa karoten, eğer yapısında oksijen türevleri olup epoksi-, hidroksi-, keton-, karboksilik-, glikozid-, allenik- ya da asetilen grupları içeriyorsa ksantofil adı verilmektedir (Buszewski ve ark. 1999, Britton ve ark. 2004, Abd El Baky ve El-Baroty 2013).

Çizelge 2.3. Karotenoidlerin sınıflandırılması

| | | |
|--|------------------------------------|--|
| <p>Karotenler (Hidrokarbon yapıları)</p> | <p>α-karoten</p> | |
| | <p>β-karoten</p> | |
| | <p>γ-karoten</p> | |
| | <p>σ-karoten</p> | |

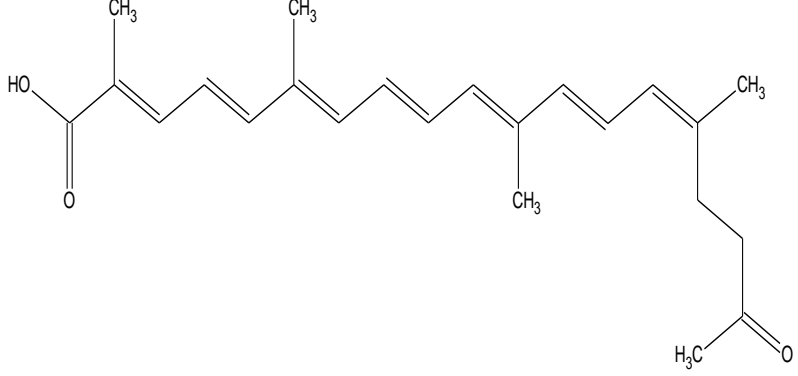
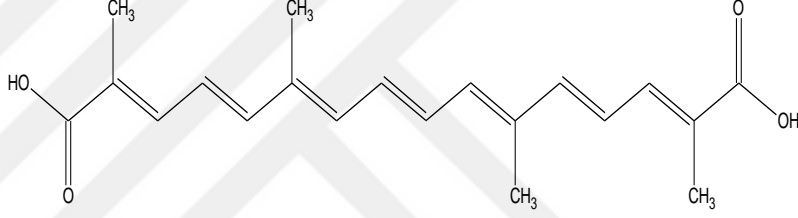
Çizelge 2.3. Karotenoidlerin sınıflandırılması (devam)

| | | |
|---------------------------------------|------------------------|--|
| | Lutein |  |
| Ksantofiller (Karotenoid alkoller) | β -kriptoksanin |  |
| | α -kriptoksanin |  |
| | Lutein |  |
| | Flavoksanin |  |

Çizelge 2.3. Karotenoidlerin sınıflandırılması (devam)

| | | |
|---------------------|--------------|--|
| Karotenoid ketonlar | Violaksantin | |
| | Astaksantin | |
| | Kapsantin | |
| | Fukoksantin | |

Çizelge 2.3. Karotenoidlerin sınıflandırılması (devam)

| | | |
|--------------------|----------|---|
| Karotenoid asitler | Biksin |  |
| | Krosetin |  |

Karotenoidler yağda çözünebilen pigmentler oldukları için lipofiliktir. Suda çözünmemektedir. Aseton, benzen, tetrahidrofuron, kloroform gibi yağı çözen çözücülerde çözünmektedir. Özellikle petrol eteri ve heksanda daha hızlı çözünmekte olduğu bilinmektedirler. Ksantofiller ise , metanol ve etanolde iyi çözünmektedirler.

Karotenoidler uyarılmış oksijeni bağlayıp serbest radikallerin oluşumunu önleyerek oksidatif strese cevap vermekte ve pek çok hastalığa karşı önlem amaçlı kullanılmaktadır. Karotenoidler oksijen, sıcaklık, ışık, pH, su aktivitesi ve sülfidlerin etkisiyle oksidatif olarak parçalanarak kolayca izomerize ve okside olmaktadır. Dolayısı ile çoklu doymamış bir yapıya sahip olan karotenoidler proses ve depolama sırasında izomerizasyona uğramaktadır (Van Breeman 1996, Yafeai ve ark. 2018).

Son yıllarda artan hastalıklar (Alzheimer, kanser, kardiovasküler hastalık, ve yaşa bağlı makuler bozulma gibi kronik hastalıkların önlenmesinde vb.) nedeniyle karotenoidlerin

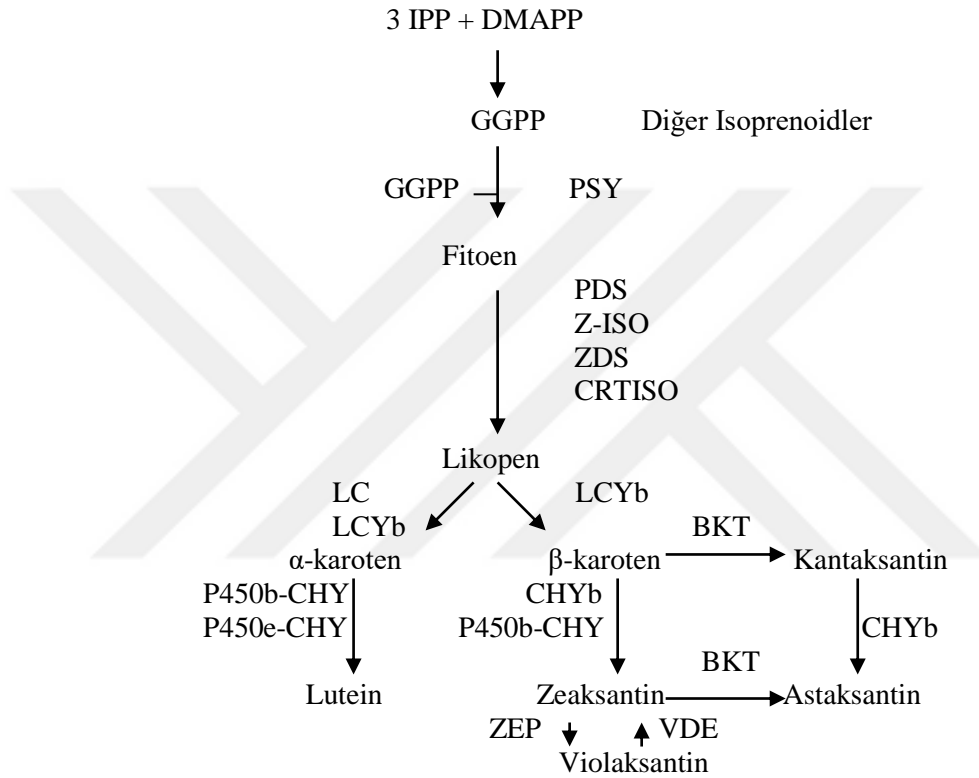
antioksidan özellik göstermesi birçok çalışmanın ilgi odağı haline gelmiştir. Provitamin A; büyüme, embriyo gelişimi ve görme fonksiyonlarını düzenlemede rol aldığı bilinmekte ve β -karoten, zeaksantin, β -kriptoksantin gibi terminal β -halka grupları içeren kısıtlı sayıda karotenoid bu etkiden sorumlu olarak görülmektedir. Bu nedenle β -karotenin ticari üretiminin yüksek olduğu görülmektedir (Von Elbe ve Schwartz 1996, Edge ve ark. 1997, Gökbulut ve Şarer 2008). Kaynaklarda 600'den fazla karotenoidin var olduğu ve besinlerde en yaygın bulunanlarının β -karoten, likopen, lutein ve kriptoksantin karotenoidlerinin olduğu belirtilmiştir. Karotenoidlerin besin yoluyla ya da ilaç yoluyla alınması ile bazı hastalıklar önlenmeye çalışılmaktadır (Olasehinde ve ark. 2017).

Karotenoidlerin ticari potansiyelinin yüksek olduğu 2011 yılında BBC araştırması tarafından raporlanmıştır. Bu araştırmaya göre 2010-2018 yılları arasında en büyük ticari öneme sahip olacak karotenoidler sırayla β -karoten > lutein > kapsantin > zeaksantin olarak belirtilmiştir. Bu karotenoidler gerek doğal kaynaklardan gerekse sentetik olarak ticari olarak üretilmeye başlanmıştır. Ticari olarak *Dunaliella salina* mikroalginden üretilen β -karoten en bilinen karotenoidlerden biri olmuştur (Arvela ve ark. 2014).

Başlıca karotenoid besin kaynakları sebze ve meyvelerdir. Sebze ve meyvelerde en yaygın bulunan karotenoidler, fitoflavin, likopen, γ -karoten, β -karoten, α -karoten, ξ -karoten, β -kriptoksantin, α -kriptoksantin, zeaksantin, lutein, violaksantin ve astaksantin'dir. Bitkilerde ise yaygın olarak, zeaksantin, lutein antheraksantin, violaksantin ve neoksantin bulunmaktadır (Aksan 2005). Sarı-turuncu sebze ve meyveler β -karoten ve α -karoten bakımından, koyu yeşil sebzeler lutein bakımından zengin olduğu bilinmektedir. Yeşil yapraklı sebzelerde bulunan karotenoidlerin rengi klorofil tarafından maskelendiği için sarı, turuncu ve kırmızı renk pigmentleri görülmemektedir (Ata 2013).

Karotenoidler bitkilerden sentezlenebildiği gibi alglerden ve mikroorganizmalardan da sentezlenebilen doğal pigmentlerdir. Karotenoidler, mevalonik asit (MVA) aracılığıyla sentezlenmektedir. Mikroalglerden sentezlenen karotenoidlerin çoğu 40 karbonlu polien

zincirli yapıya sahiptirler. Tüm izoprenoid bileşiklerinde sentezin ilk basamağında, iki molekül geranilgeranil difosfat (GGDP) molekülünden prefitoen difosfat (PPDP) aracılığıyla fitoen oluşmaktadır ve her mikroalge özgü olan karotenoidler gerekli enzimler kullanılarak sentezlenebilmektedir (Britton 2004, Türkcan ve Okmen 2012). Mikroalglerin biyosentez şeması Şekil 2.3.'de gösterilmektedir (Cordero ve ark. 2011, Varela ve ark. 2015).



Şekil 2.3. Mikroalglerden karotenoid biyosentezi (PSY: fitoen sentaz, IPP: isopentenil pirofosfat, DMAPP: dimetilalil pirofosfat, GGPP: geranil geranil pirofosfat, PDS: fitoen disaturaz, Z-ISO: 15-cis- ζ -karoten izomeraz, ZDS: ζ -karoten desaturaz, CRTISO: karoten izomeraz, LCYb: likopen β -siklaz, LCYe: likopen ε -siklaz, P450b-CHY: sitokrom P450: β -hidroksilaz, P450e-CHY: sitokrom P450e: ε -hidroksilaz, CHYb: karoten β -hidroksilaz, BKT: β -karoten oksijenaz, ZEP: zeaksantin epoksidaz, VDE: violaksantin de-epoksidaz)

Çizelge 2.4.'de birkaç mikroalgde bulunan başlıca karotenoidler verilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda farklı mikroalg türlerinin karotenoid içeriklerinin de farklı olduğu görülmektedir (Olasehinde ve ark. 2017).

Çizelge 2.4. Bazı mikroalglerde bulunan başlıca karotenoid bileşikleri

| Mikroalg türü | Karotenoid bileşiği | Referans |
|---------------------------------|---|-----------------------------|
| <i>Dunaliella salina</i> | β -karoten | Pisal ve Lele 2004 |
| <i>Haematococcus pluvialis</i> | Astaksantin , kantaksantin, lutein | Akın 2005 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Kantaksantin, astaksantin | Cha ve ark. 2008 |
| <i>Scenedesmus almeriensis</i> | Lutein, β -karoten | Macías-Sánchez ve ark. 2010 |
| <i>Coelastrella striolata</i> | Astaksantin, kantaksantin, β -karoten | Abe ve ark. 2007 |
| <i>Chlorella ellipsoidea</i> | Zeaksantin | Koo ve ark. 2012 |
| <i>Phormidium autumnale</i> | Neoksantin, violaksantin, lutein | Rodrigues ve ark. 2014 |
| <i>Spirulina pacifica</i> | β -karoten, β -kriptoksantin zeaksantin | Careri ve ark. 2001 |
| <i>Neochloris oleoabundans</i> | Lutein, kantaksantin, zeaksantin, astaksantin monoesterleri | Puyana ve ark. 2013 |
| <i>Chlamydomonas acidophila</i> | Violaksantin, lutein, zeaksantin, β -karoten | Cuaresma ve ark. 2006 |

2.2.1. Karotenoidlerin tayin edilmesi

Karotenoidlerin antioksidan özellik göstermesi ve hastalıkların önlenmesinde payının olması nedeniyle günümüzde büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir. Bu amaçla birçok araştırmacı tarafından meyve, sebze ve mikroorganizmalar (alg, bakteri, fungi) kullanılarak karotenoidlerin tayini gerçekleştirilmiştir. Karotenoidlerin tayini kromatografik ve kemometrik yöntemler ile gerçekleştirilebilmektedir. Kromatografik yöntemle gerçekleştirilen karotenoid miktar analizlerinde HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi), LC-MS/MS (sıvı kromatografisi-tandem kütle spektroskopisi) ve UHPLC (ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) kullanılmakta olduğu görülmektedir (Van Breeman 1996, Pupin ve ark. 1999, Rivera ve ark. 2011, Mitrowska ve ark. 2012, Maurer ve ark. 2014,). Kromatografik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle numunenin analize hazır hale getirilmesi daha sonrada analite uygun bir kolon ve mobil faz seçimi gerekmektedir. Bu kısımda numunede bulunan karotenoidin kayıpsız bir şekilde analize hazırlanması oldukça önemli olmaktadır.

Portakal suyunda karotenoid analizi yapılan bir çalışmada öncelikle örnekler iyice karıştırılıp homojenize edilmiş ve metanol (% 0,1 2,6-di-ter-bütil-p-kresol (BHT) içeren) ilave edilerek ekstrakte edilmiştir. Daha sonra saponifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sıvı haldeki bu çözeltilerden 1,5 mL alınarak filtreden (13 mm x 0,45 µm) geçirilerek HPLC (Hawlett-Packard 1100 sistemi, Fotodiyot array dedektörü (DAD),USA) analizi gerçekleştirilmiştir. 20 µL numune enjekte edilip dakikada 1 ml/dakika akış hızıyla C30 YMC kolonundan (5 µm, 250 x 4,6 mm) geçirilerek numunede bulunan karotenoidlerin ayrımı yapılmıştır. Mobil faz olarak; 0 dakika: % 90 MeOH + % 5 MTBE+ % 5 su, 12 dakika: % 95 MeOH + % 5 MTBE, 25 dakika: % 89MeOH + % 11 MTBE, 40 dakika: % 75 MeOH + % 25 MTBE, 60 dakika: % 50 MeOH + % 50 MTBE, 62 dakika: % 90 MeOH + % 5 MTBE + % 5 su kullanılarak gradient elüsyon gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada karotenoidlerin bazılarının daha apolar yapıda olması nedeniyle kolonda tutulmasını sağlamak için metanol % 0,1 BHT içermekte , TMBE ise % 0,05 trietilamin içermektedir. Yapılan analiz 62 dakika sürmüş olup, 31 tane karotenoid (apokarotenoid ve izomerleri, neoksantin ve izomerleri, cis-violaksantin ve izomerleri, violaksantin, luteoksantin, mutatoksanin, lutein, zeaksantin, alfa ve beta kriptoksantin, α-karoten, β-karoten, ξ-karoten ve cis-β-karoten) tayini yapılmıştır (Melendez-Martinez ve ark. 2005).

Yapılan başka bir çalışmada brokoli (*Brassica oleracea*), havuç (*Daucus carota*), marul (*Lactuca sativa*), domates (*Solanum lycopersicum*) ve mısırdada (*Zea mays*) karotenoid tayini UHPLC (Agilent Technologies, DAD) sistemi kullanılarak yapılmıştır. Numuneler yaklaşık 100 g olacak şekilde tartılmış ve üzerlerine saf su (1:1, w/w) ilave edilerek blenderdan geçirilmiştir. Mobil faz olarak; çözücü A, asetonitril: su: heksan (75:23:2, v/v/v) ve çözücü B, asetonitril: bütanol: heksan (90:8:2, v/v/v, % 0,1 asetik asit v/v) kullanılmıştır. Yapılan kantitatif analizde gradient sistemle çalışılmıştır. Gradient program; 0,5 dakika % 100 çözelti A, 1 dakika % 80 çözelti A, 8,5. dakikaya kadar 100% çözelti B ve 13,5. dakikaya kadar % 100 çözelti A olarak uygulanmıştır. Kolon sıcaklığı 40⁰C olup Waters C18 kolonu (1,8 µm, 2,1 x 100 mm) kullanılmış ve 0,5 mL/dakika akış hızında çalışma gerçekleştirilmiştir. Brokolide lutein, β-karoten ve violaksantin; havuçta α-karoten, β-karoten ve lutein; mısırdada β-kriptoksantin, lutein ve

zeaksantin; domateste ise β -karoten, likopen, fitoen ve fitofluen karotenoidleri tayin edilmiştir (Maurer ve ark. 2014).

Tarımsal atıklar kullanılarak üretilen mikroalgler üzerinde karotenoid analizi yapılan bir çalışmada ise öncelikle mikroalgler kültüre edilmiş ve daha sonra karotenoidler için ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Karotenoid analizi için HPLC-DAD-MS/MS (Shimadzu) sistemi kullanılmış olup C30 YMC kolon (5 μ m, 250 x 4,6 mm) ile analizler yapılmıştır. Mobil faz olarak metanol (çözücü A) ve ter-butil metil eter (çözücü B) kullanılmış ve gradient program ile çalışılmıştır. Karotenoid analizinin sonunda lutein, β -karoten ve zeaksantin izomerlerine rastlanmıştır (Rodrigues ve ark. 2014).

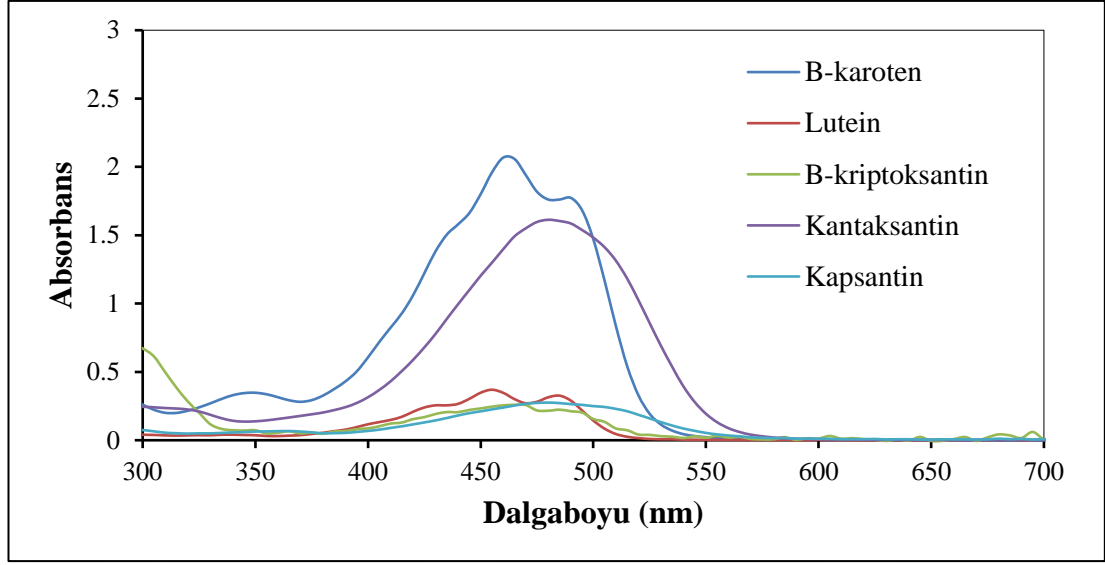
Yapılan başka bir çalışmada HPLC sistem kullanılarak kolonun ve mobil fazın karotenoid analizleri üzerine olan etkisine bakılmıştır. Analizler Agilent Technologies 1100 serisi HPLC sistemi, UV-VIS dedektör ve 15 tane farklı özellikte C18 kolonu kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Karotenoidlerden bazılarının daha az polar olması nedeniyle özellikle C18 kolonda tutunması zor olduğu ve iyi bir ayırımın gerçekleştirilemeyeceğine değinilmiştir. Bu nedenle sabit fazda bulunan silanol grupların aktivitesi düşürülerek daha az polar yapıda olması sağlanmıştır. Bunun için de mobil faz olarak kullanılan çözücüye % 0,05 trietilamin eklenerek sabit fazın hidrofobikliği artırılmış yani silanol grupların aktivitesi düşürülerek kolon daha apolar hale getirilmiş, β -karoten ve likopen gibi karotenoidlerin tayini gerçekleştirilmiştir (Ligor ve ark. 2014).

2.3. Kemometrik Yöntemler

Kromatografik yöntemler kullanılarak yapılan karotenoid analizlerinde genellikle polarlığı daha az çözücüler kullanılmakta ve sulu ürünlerde liyofilizasyon işlemine gerek duyulmaktadır. Ters faz kromatografi kullanılarak yapılan çalışmalarda iyi bir ayırımın sağlanabilmesi için hidrofobi, silanol aktivite, moleküllerin yapıları ve polar seçiciliğe dikkat edilmektedir. Karotenoidlerin yapıları nedeniyle apolar yapıda özellik göstermesi nedeniyle kullanılan C18 kolonları bazı karotenoidleri tayin etmede yetersiz kalmaktadır. Böyle durumlarda silanol aktiviteyi en aza indirebilmek için sabit (durgun)

faza uygun modifierler seçilerek ilave edilmektedir. Kolonun yüzeyi daha küçük silanlarla değiştirilerek silanol grupların aktivitesi düşürülmektedir. Uygun modifierlerin ilave edilmesi demek silanol aktivitesini düşürmek yani aynı zamanda sabit fazın hidrofobikliğini arttırmak demektir. Bunun için çoğunlukla mobil faza trietilamin, amonyum tuzları ve dimetiloktilamin (DMOA) eklenerek sabit fazın silanol aktivitesi düşürülmüş ve daha apolar olan karotenoidlerin tayini biraz daha mümkün kılınmıştır. Genellikle C30 kolonu kullanılarak karotenoidlerin analizlerinin özellikle izomerlerin daha iyi ayırımı yapıldığı da görülmektedir (Mitrowska ve ark. 2012, Aral 2013, Ligor ve ark. 2014).

Karotenoid tayinleri kemometrik yöntemler kullanılarak da yapılabilmektedir. Kemometrik yöntemlerin gelişmekte olan uygulama alanlarından birisi de çok değişkenli kalibrasyon teknikleri olmuştur. Kemometrik yöntemlere göre; HPLC-DAD, GC-MS, LC-MS, UV/VIS gibi cihazlardan elde edilen verilerin çok değişkenli olması sebebiyle de yapılacak kalibrasyonun da çok değişkenli olması gerekmektedir. Özellikle kantitatif tayinlerin yapılması gerektiğinde, üst üste çakışan kromatogram piklerinin ya da spektrumlarının bulunması durumunda (Şekil 2.4.) çok değişkenli kalibrasyon teknikleri ile karışım içinde bulunan bileşenlerin miktarları tahmin edilebilmektedir. Bu tekniklerin en önemli avantajlarından biri karışımdaki bileşenlere herhangi bir ayırma gerçekleştirmeden analizi gerçekleştirebilmesidir. Çok değişkenli kalibrasyon metotları olarak kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS) ve temel bileşen regresyonu (PCR) yaygın olarak kullanılmaktadır (Şahin ve Demir 2016).



Şekil 2.4. Yapılan bu araştırmada kullanılan karotenoidlerin UV-VIS spektrumu

Turunç meyvesinde karotenoid analizi gerçekleştirilen başka bir kemometrik çalışmada FTIR-HPLC verileri kullanılarak PLS ile karotenoid miktarları tahmin edilmiştir. Bu çalışmada meyve numunelerinin aylık FTIR analizleri yapılmıştır. Bazı absorpsiyon bölgelerinde aylık olarak bakıldığında artma ve azalma gözlenmiş ve buna göre çalışmada meyve numunelerinde aylık olarak karbonhidrat, organik asitler, karotenoidler ve fenolik maddelerin miktarlarında değişme olduğu düşünülmektedir. Meyve numunelerinin HPLC analizleri yapıldığında da karotenoid miktarlarında da değişimler olduğu gözlenmiş. Meyve numunelerinden elde edilen çok değişkenli FTIR verileri kalibrasyon ve validasyon olmak üzere iki dizayn grubuna ayrılmıştır. Kalibrasyon dizaynı için FTIR verisi (X matrisi) ve HPLC analizleri sonucunda bulunan karotenoid miktarları (y) kullanılarak PLS modeli oluşturulmuştur ($y = Xb$). Validasyon dizaynı için FTIR verisi kullanılarak karotenoid miktarları PLS ile tahmin edilmiştir. Elde edilen alfa-karoten, anteraksantin, beta-karoten, beta-kriptoksantin, lutein, violaksantin ve zeaksantin değerleri PLS modeli ile kıyaslandığında yaklaşık % 90 oranında (her bir karotenoid için ayrı hesaplanmıştır) tahmin edilebilmiştir. (Kim ve ark. 2015).

2.3.1. Çok değişkenli kalibrasyon teknikleri

Çok değişkenli kalibrasyon teknikleri için hesaplamalarda ilk önce optimum bileşen sayısı belirlenir. Optimum bileşen sayısı yapılan deneylerde karışım ortamında kaç tane bileşen olduğunu belirtir. Bölüm 3.2.4'te açıklandığı gibi hazırlanan kalibrasyon seti çözeltileri bölüm 3.2.3.1'de belirtildiği gibi HPLC ile analiz edilir. Daha sonra elde edilen kromatogram verileri ($X_{6750 \times 25}$) kullanılarak temel bileşen sayısı belirlenir. PLS ve PCR kalibrasyon tekniklerinde temel bileşen sayısı çapraz validasyon (cross-validation) yöntemi ile belirlenir. Çapraz validasyon işleminde i . Örnek verisi kullanılmadan PCR ve PLS algoritmaları kullanılarak çapraz validasyon ortalama karekök hataları (Root mean square error of cross-validation; RMSECV, M ; kalibrasyon örneklerinin sayısı, y_i ; i . örneğin ölçülen değeri, \bar{y}_i ; i . örneğin tahmini değeri) hesaplanır.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (y_i - \bar{y}_i)^2}{M}} \quad (1)$$

2.3.2. Verilerin analize hazırlanması

Elde edilen ham kromatogram verileri merkezileştirme işlemi yapılarak PCR ve PLS analizi uygun hale getirilir. Merkezileştirme işleminde her bir kolonun ortalama değeri alınır ve her bir değer bu ortalama değerinden çıkartılır.

2.3.3. PCR kalibrasyon tekniği

PCR kalibrasyon tekniği için kullanılan algoritma ayrıntılı olarak literatürde verilmiştir (Brereton 2003). Çok değişkenli kalibrasyon tekniğinde amaç temel bileşen sayısını kullanarak karışımında bulunan bileşenlerin konsantrasyonlarının hesaplanmasıdır.

2.3.4. PLS kalibrasyon tekniği

PLS tekniği, çok değişkenli kalibrasyon teknikleri içinde en fazla tercih edilen tekniktir.

PLS hesaplamalarında NIPALS (nonlinear iterative partial least squares) algoritması kullanılır.(Van Nederkassel ve ark. 2005, Christin ve ark. 2008).

2.4. Oksidatif stres

Serbest radikaller (reaktif oksijen türleri, ROS); immunolojik reaksiyonlar, UV ışınları, ilaçlar, yağ oksidasyonu, radyasyon, sigara, alkol, stres ve biyokimyasal redoks reaksiyonları gibi pek çok yolla oluşabilmektedir. Vücudumuzda kimyasal reaksiyonlar sonucu veya dış etkenler sebebiyle oluşan bu serbest radikaller kararsız yapıda bulunmaktadır. Kararlı hale gelebilmek için bu moleküller lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine saldırarak hasara neden olmaktadır (Marxen ve ark. 2007). Serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu kararsız moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere organizmalarda antioksidan savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Antioksidanlar, hücelere zarar veren serbest radikalleri etkisiz hale getirerek kanser, kalp hastalıkları, diyabet, akut renal yetmezlik, akciğer hastalıkları, bronşit ve alkolik karaciğer hastalıkları gibi pek çok hastalığa neden olabilecek zincir reaksiyonlarını önleyen moleküllerdir. Fakat bazı durumlarda vücudun var olan antioksidan savunma mekanizması serbest radikallerin etkisini tamamen önleyememekte ve oksidatif stres diye adlandırılan durum meydana gelmektedir. Kısacası, vücudumuzda oksidan - antioksidan dengesi bulunmaktadır (Yılmaz 2010, El-Bahr 2013).

Reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalinden (OH^{\cdot}) oluşmaktadır. Tokoferol, askorbik asit, karotenoid gibi enzimatik olan veya olmayan küçük moleküller ise serbest radikallere kendi elektronlarını vererek radikalleri süpürür ve okside olmalarını engellerler (Liu ve ark. 2007, Khalil ve ark. 2010, Chang ve ark. 2013). Oksidatif hasara engel olmaları sebebiyle antioksidan maddeler içeren gıdalar günümüzde pek çok çalışmanın araştırma konusu olmuştur. Karotenoidlerin antioksidan özellik gösterdikleri, bitkilerde ve hayvansal kaynaklı sebze ve meyvelerde bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca bazı mikroorganizmalardan sentezlenebilmekte ve karotenoid miktarlarının artırılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Mikroalgler, içerdikleri karotenoid nedeniyle doğal antioksidanların umut verici kaynaklarından biri olarak görülmektedir. Mikroalglerin

günümüzde en önemli kaynakları Chlorophyceae ailesine ait *Dunaliella* ve *Haematococcus* iki tür mikroalgi sırayla β -karoten ve astaksantin karotenoidlerinin ticari olarak üretimi için kullanılmaktadır (Goiris ve ark. 2015). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda mikroalglerde antioksidan içeriğini arttırabilmek için ışık, pH ve besin stresi gibi oksidatif strese neden olan faktörlerin karotenoidler üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Hedef mikroalg olarak *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* ve *Chlorella vulgaris* seçilen başka bir çalışmada üç mikroalg türünün kültür ortamına besin stresi (azot ve fosfor etkisi) uygulanmıştır. Böylece mikroalglerde antioksidan üretimini optimize etmek için azot ve fosfor varlığında antioksidan aktivite, toplam fenolik içerik, karotenoid miktarı, vitamin E ve C miktarında kıyaslamalar yapılmıştır. Bunun için öncelikle 1 mM N ve 1 mM P içeren mikroalgler kültür ortamında beş gün geliştirilip içerisinden 100 mL alınmış ve farklı derişimlerde azot ve fosfor (5 mM N ve 0,25 mM P; 0,2 mM N ve 0,05 mM P; 1 mM N ve 0,01 mM P) eklenerek 8 gün kültüre edilmiştir. Tüm veriler üç hedef mikroalg için kontrol grubu ile kıyaslandığında azot ve fosfor stresi uygulanan numunelerde özellikle azot stresine maruz bırakılan mikroalglerde antioksidan aktivitesi, toplam fenol miktarı ve toplam karotenoid miktarında azalma olduğu görülmüştür. Karotenoidler antioksidan özellik göstermesi nedeniyle hem karotenoid hem de fenolik içeriklerinin de azaldığı gözlenmiştir. Tokoferoller ve askorbik asit seviyeleri ise özellikle fosfor besin sınırlamasında daha yüksek değerlere ulaştığı sonucuna varılmıştır (Goiris ve ark.2015).

Gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise hedef mikroalg olarak denizel diatom *Phaeodactylum tricornutum* seçilmiş ve alleokimyasal hidrokinonun (HQ) büyüme, fotosentez ve diğer fizyolojik düzeyler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Algal patlamaların önüne geçebilmek ve kontrolünü sağlamak amacıyla birçok farklı alleokimyasal izole edildiği belirtilen çalışmada hidrokinon ile oksidatif strese maruz bırakılan denizel algdeki etkisi araştırılmıştır. Araştırma dört farklı inkübasyon süresinde (24, 48, 72 ve 96 saat) gerçekleştirilmiş ve aynı zamanda hidrokinon miktarları da arttırılmıştır. Hidrokinon miktarının artışı (özellikle 3×10^{-7} mol/L üzerinde) bütün inkübasyon sürelerinde fotosentezi ve solunumu engellemesi sebebiyle

alglerde öldürücü potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir. Yine gerçekleştirilen bu çalışmada 72 ve 144 saat hidrokinoon miktarı artırılarak inkübasyona maruz bırakılan denizel algde klorofil a, karotenoid ve karotenoidin klorofil a'ya oranı karşılaştırılmıştır. Hidrokinoon miktarı arttıkça karotenoid ve klorofil a miktarı miktarı azalmasına rağmen inkübasyon süresi arttıkça karotenoid ve klorofil a miktarının arttığı görülmektedir. Karotenoidin klorofil a'ya oranı da hidrokinoon miktarı arttıkça azalma göstermektedir (Yang ve ark. 2013).

Mikroalglerin yüksek ışık yoğunluğu, yüksek tuz derişimi, artan pH ve besin stresi gibi belli koşullara maruz bırakıldığında yüksek antioksidan içeriğine sahip bir birikimi olduğu bilinmektedir. Hedef mikroalg olarak *Dunaliella bardawil* ve *Chlorella ellipsoidea* mikroalgleri kullanılan bir çalışmada ise oksidatif stres kaynağı olarak pH etkisinin büyüme ve pigment içeriğini nasıl etkilediği incelenmiştir. Çalışmada kültür ortamında alglerin büyümesini etkileyen en önemli faktörlerden birinin hidrojen iyon derişimi olduğu ve bu sebeple mikroorganizmalardan sentezlenen biyoaktif bileşenlerin biyosentezinin de etkileneceği düşünülmüştür. Bu çalışmada *Dunaliella* mikroalg türü ticari olarak β -karoten üretiminde kullanılması, *Chlorella* mikrolaginin ise ticari olarak gıda üretiminde kullanılması sebebiyle seçilmiştir. Mikroalgler on gün boyunca kültür ortamında $78 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda ve 28 ± 2 °C'de inkübe edilmiştir. Mikrolagler (*D. Bardawil* 4–9 ve *C. ellipsoidea* 4–10) geniş bir pH aralığında test edilmiştir. *D. bardawil* mikroalginde pH 7,5'de biyoaktif bileşenlerin miktarı büyük ölçüde artmıştır. *C. Ellipsoidea* mikrolalginde ise pH 4'de en yüksek protein içeriğine sahipken, pH sırayla 4, 6 ve 7,5 olarak arttırıldığında da pigment içeriğinin de arttırdığı görülmüştür. *D. bardawil* mikroalgi pH 9 ortamında iken β -karoten, E ve C vitamini birikiminin en yüksek değere ulaştığı sonucuna varılmış olup, *C. Ellipsoidea* mikrolalginde ise pH 6 da en yüksek miktarlar elde edilmiştir. pH 10'da ise mikroalglerin büyümesinin inhibe olduğu görülmektedir. Mikroorganizmalar tarafından kullanılan karbonun formu karbonat iyonu ve bikarbonat iyonu olduğu belirtilmektedir. Yüksek alkali ortamda ise mikroalglerin kullanacağı karbon formunun kalmayışı ile ortamda serbest serbest radikallerin artmasına neden olmakta ve bu durum hücreleri oksidatif strese maruz kaldığını göstermektedir (Khalil ve ark 2010).

Yeşil alglerden *Haematococcus lacustris* mikroalgi ile çalışılmış olan çalışmada mikroalgden astaksantin üretiminde sodyum ortovanadatın etkisi araştırılmıştır. Astaksantin üretimini besin eksikliği (azot ve fosfor), yüksek ışık ve yüksek tuz derişimlerine bağılı stresler uygulanarak yaygın bir şekilde üretimi değıştirilebildiğı bilinmektedir. Bu çalışmada ise protein tirozin fosfatazların (PTPaz) nonspesifik bir inhibitörü olan sodyum ortovanadat (SOV) ile oksidatif stresin astaksantin üretimindeki etkisi incelenmiştir. 24°C’de 40 µE/m²s ışık yoğunluğunda ortamın pH’si 6.5 ± 0.5 olacak şekilde oksidatif stres kaynağı olarak kullanılan SOV derişimi kültür ortamında 2 ve 5 gün içinde arttırılarak *Haematococcus lacustris* alginde büyüme miktarı ve toplam karotenoid miktarı incelenmiştir. 2.günde algde büyüme miktarı ve toplam karotenoid miktarında artış gözlenmesine rağmen, 5.günde bu artışın daha fazla olduğı sonucuna varılmıştır. Test edilen konsantrasyon aralığında , sodyum ortovanadat (SOV) konsantrasyonları arttırıldıkça *Haematococcus lacustris* alginde belirli bir miktara kadar (5,0 mM SOV) büyüme gözlenirken daha yüksek miktarlarda (>5,0 mM SOV) ise inhibisyon etkisi yaratmaktadır. Yapılan bu çalışmada SOV derişimi arttırıldıkça *Haematococcus lacustris* alginde toplam karotenoid miktarının arttığı belirlenmiştir. Bu durumda aynı zamanda toplam karotenoid miktarının % 80’ini astaksantin oluşturması nedeniyle de astaksantin miktarıda arttığı belirtilmiştir. Çevresel oksidatif strese ek olarak SOV derişiminin arttırılması ile PTPaz’ın astaksantin üretimini uyarabilen bir oksidatif stres faktörü olabileceğı düşünölmektedir (Tran ve ark. 2009).

Yapılan başka bir çalışmada ise oksidatif stres kaynağı olarak farklı derişimlerdeki azot kaynakları kullanılmış olup hedef mikroalg ise yeşil alglerden *Nannochloropsis oculata* seçilmiştir. Bu mikroalg türü genellikle balık çiftliklerinde balıkların beslenmesinde kullanılmaktadır. Azot kaynaklarının alg kültürlerinde büyümeyi ve biyokimyasal yapıyı etkilediğı yapılan araştırmalarda belirtilmektedir. Bu amaçla yapılan bu çalışmada da içerdiği pigmentler nedeniyle azot ile oksidatif stres uygulandıında karotenoidlerin ve klorofil a üretiminin nasıl etkileneceğı incelenmiştir. *N. Oculata* türü mikroalg F/2 kültür ortamı ile zenginleştirilmiş deniz suyunda 18±1°C sabit sıcaklıkta 882 ve 441 µmol/L derişimindeki azot kaynakları kullanılarak toplam karotenoid (β-karoten, violaksantin, kantaksantin, astaksantin, vokeriyaksantin ve zeaksantin) ve klorofil a düzeyleri TLC (ince tabaka kromatografisi) yöntemi ile belirlenerek

karşılaştırılmıştır. Mikroalg kültürleri için en önemli azot kaynaklarından NaNO_3 (Nitrat-N), NH_4Cl (Amonyum-N) ve $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (Üre-N) kullanılmıştır. Toplam karotenoid ve klorofil a düzeyleri bakımından en yüksek değerler $882 \mu\text{mol/L}$ nitrat azotu (NO_3^- -N) ile hazırlanan örneklerde elde edilmiştir. NH_4^+ -N (amonyum azotu) ve NO_3^- -N (nitrat azotu) ile elde edilen büyüme ve biyokimyasal yapı açısından benzer sonuçlar bulunmuştur. Fakat yapılan bu çalışmada üre azotunun bu tür için uygun bir kaynak olmadığı anlaşılmıştır (Durmaz 2006).

Başka bir doktora çalışmasında hedef mikroalg olarak denizel diatom *Fragilariopsis cylindrus* seçilmiştir. Oksidatif stres kaynağı olarak ışık ve demirin pigment üzerine olan etkisi incelenmiştir. Çalışmada denize vuran güneş ışınları ve bazı besinler sonucu alg patlaması olayının meydana gelmesi nedeniyle ışığın etkisinin pigmente etki edeceği düşünülmüş ve belirli süre boyunca (0, 1, 4, 12 ve 24 saat) mikroalgler kültür ortamında üç farklı şiddette ışığa ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, $150 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ve $500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) maruz bırakılmıştır. Pigment içeriği olarak klorofil a, c1, c2, c3, fukosantin, diadinoksantin (DD), cis-fukosantin, diatoksantin (DT) ve β -karoten miktarları kıyaslandığında $150 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ve $500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 'de en yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Farklı derişimdeki demir formuna (0 – 1000 nM Fe-EDTA) maruz bırakılan mikroalgde ise 60 mM derişime kadar antioksidan madde olan pigment miktarlarını arttırıp oksidatif hasarı önleyebilmekte olduğu sonucuna varılmıştır (Bennett 2012).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan aletler

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

Bu çalışmada Varian marka Cary 50 UV/VIS spektrofotometre modeli (Avustralya) kullanılmıştır. 1 cm'lik kuvarz küvet kullanılarak numune ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Analizin çalışma koşulları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Varian marka Cary 50 UV/VIS spektrofotometre cihazının çalışma koşulları

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

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

Bu çalışmada *Chlamydomonas reinhardti* mikroalginde bulunan karotenoidlerin HPLC-DAD ile kromatografik analizi için Agilent Technology Series 1200 HPLC system (Waldbronn, Almanya) modeli YMC Carotenoid C30 (250x4,6 mm, 5 µm, YMC Co., Ltd) kolonu kullanılarak yapılmıştır.

3.1.1.3. Liyofilizatör

Çalışmada *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg numunelerinin liyofilize edilebilmesi için Labconco marka Freezone 2.5 Plus model liyofilizatör kullanılmıştır.

3.1.1.4. pH metre

Bu çalışmada HANNA HI 221 model pH metre kullanılmıştır.

3.1.1.5. Analitik terazi

Yapılan çalışmalar esnasında çözelti hazırlamak için Mettler Toledo marka MS105DU model $\pm 0,00001$ g hassasiyetli analitik terazi kullanılmıştır.

3.1.1.6. Saf su cihazı

Yapılan çalışmalarda kullanılan saf su Elga Purelab marka Option Q DV25 model saf su cihazı kullanılarak (su saflığı $18,2 \text{ m}\Omega \times \text{cm}$) temin edilmiştir.

3.1.1.7. Ultrasonik banyo

Gerçekleştirilen deneyler esnasında mikroalg numunelerinin ekstraksiyonu için termostat ayarlı United marka ultrasonik banyo kullanılmıştır.

3.1.1.8. Isıtıcı karıştırıcı

Yapılan çalışmalar sırasında çözeltilerin hazırlanması için VELP SCIENTIFICIA marka ısıtıcı karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.1.9. Santrifüj

Bu çalışmada Hermle marka Z 206 A model santrifüj kullanılmıştır.

3.1.1.10. Vorteks karıştırıcı

Yapılan çalışmalar sırasında Wisd marka VM-10 model vorteks karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroalg türü

Bu çalışmada mikroalg olarak *Chlamydomonas reinhardtii* kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

3.1.3.1. Kimyasallar

Analitik saflıktaki kimyasallar

Bu deneysel çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

| Kimyasal Adı | Firma | Katalog Numarası |
|--------------------------|----------------|------------------|
| Etanol | Merck | 100983 |
| Metanol | Merck | 106007 |
| Aseton | Merck | 100013 |
| Diklorometan | Merck | 106044 |
| Ter-bütıl metil eter | Merck | 101845 |
| Trimetil amin | Sigma-Aldrich | 808352 |
| Sodyum karbonat | Sigma-Aldrich | 13418 |
| Sodyum hidroksit | Riedel-de Haen | S181200 |
| Sodyum potasyum tartarat | Sigma-Aldrich | 217255 |
| Sodyum dihidrojen fosfat | Merck | 141677 |
| Bakır sülfat | Sigma-Aldrich | 12849 |
| Potasyum dikromat | Sigma-Aldrich | 209244 |
| 1,5-difenilkarbazit | Merck | 64271 |
| Sitrik asit | Merck | 100244 |
| Hidroklorik asit | Merck | 100314 |
| Fosforik asit | Merck | 100563 |
| Folin-Ciocalteu reaktifi | Sigma-Aldrich | F9252 |

Diğer kimyasallar

Bu deneysel çalışmada kullanılan diğer kimyasallar Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar

| Kimyasal Adı | Firma | Katalog Numarası |
|--|----------------------|-------------------------|
| Gallik asit | Sigma-Aldrich | G7384 |
| Troloks (6-hydroxy-2,5,7,8 tetramethylchroman-2-carboxylic acid) | Sigma-Aldrich | 238813 |
| Lutein | Extrasynthese | 0306 S |
| Astaksantin | Dr.Ehrenstorfer GmbH | CA10307000 |
| Neoksantin | Sigma-Aldrich | 54764 |
| Zeaksantin | Dr.Ehrenstorfer GmbH | CA17947500 |
| β -karoten | Sigma-Aldrich | C4582 |
| α -karoten | Sigma-Aldrich | 40395 |
| β -kriptoksantin | Extrasynthese | 0317 S |

Sarf malzemeler

Bu deneysel çalışmada kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

| Malzeme adı | Marka | Model |
|-------------------------------|--------------|--------------|
| Mikropipet (10-100 μ L) | Eppendorf | Research |
| Mikropipet (100-1000 μ L) | Eppendorf | Research |
| Mikropipet (500-5000 μ L) | Eppendorf | Research |

3.1.3.2. Çözeltiler

Toplam fenol tayininde kullanılan çözeltiler

-Folin-Ciocalteu çözeltisi: Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak 1/3 (%v/v) oranında saf su ile seyreltme yapılarak hazırlanmıştır.

-Lowry A çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 2 g Na₂CO₃ az miktarda saf suda çözülerek hacmi balon jodede 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

-Lowry B çözeltisi: 0,5 g CuSO₄ ve 1 g NaKC₄H₄O₆ az miktarda saf suda çözülerek hacmi balon jodede 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

-Lowry C çözeltisi: 50 mL Lowry A çözeltisi ve 1 mL Lowry B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.

Toplam antioksidan kapasite tayinlerinde kullanılan çözeltiler

- pH 2,8 tamponu çözeltisi: 6,24 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp az miktarda saf suda çözülerek 0,68 mL H_3PO_4 (%85, w/v) ilave edilerek hacmi saf su ile balon jodede 1L'ye tamamlanmıştır.

-Sitrik asit çözeltisi (0,1 M): 1,0507 g sitrik asit tartılıp, 10 mL 0,1 N NaOH ilave edilerek hacmi balon jodede 50 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

-HCl çözeltisi (6 M): 6,44 mL %37 HCl'den (d: 1,19 g/mL) alınıp kullanılarak hacmi saf su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

- pH 1,2 tamponu çözeltisi: 1,45 mL 0,1 M sitrik asit ve 8,55 mL 6 M HCl karıştırılarak hazırlanmıştır.

- Cr^{6+} çözeltisi ($3,4 \times 10^{-4}$ M): 0,005 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ tartılıp pH 2,8 tamponu kullanılarak hacmi balon jodede 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

- 1,5-Difenilkarbazit çözeltisi ($3,4 \times 10^{-4}$ M): 0,1 g 1,5-difenilkarbazit tartılıp üzerine 30 mL tampon ve 70 mL aseton ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltden 20,63 mL alınarak pH 2,8 tamponu ile hacmi 250 mL'ye tamamlanarak $3,4 \times 10^{-4}$ M'lik çözelti hazırlanmıştır.

Standart karotenoid bileşikleri ile kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Kromatografik yöntem ile numune analizinde kullanılmak üzere standart karotenoid bileşikleri ile kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir standart karotenoid bileşiği diklorometan ile çözülerek derişimi 0,25- 0,5- 1- 2- 4- 6- 8-10 mg/L olacak şekilde kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır.

Kemometrik çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Kemometrik yöntem ile numune analizinde kullanılmak üzere diklorometan ile çözülerek standart bileşiklerden 5 mg/L'lik bir karışım hazırlanmıştır. Daha sonra 5

mg/L'lik karışımdan seyreltmeler yapılarak kalibrasyon ve validasyon setlerinde kullanılacak olan 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1 mg/L 3 mL karışımlar hazırlanmıştır. Bu çözelti karışımlarının hazırlanışı bölüm 3.2.4'te ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada yöntemler dört ana başlıkta toplanabilir. Bunlar;

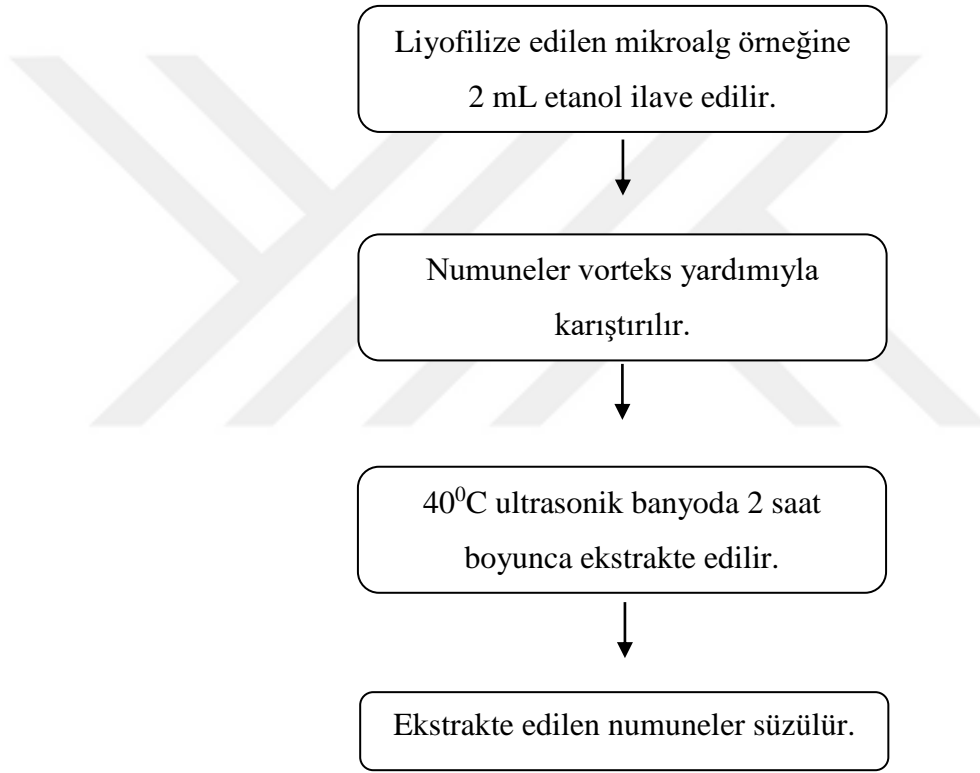
- Örnek hazırlama işlemleri
- Spektroskopik yöntemler
- Kromatografik yöntemler
- Kemometrik yöntemler

3.2.1. Örnek hazırlama işlemleri

Tez kapsamında *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgi ile çalışılmıştır. Bu mikroalg İstanbul Medeniyet Üniversitesi'nde bulunan Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK tarafından temin edilmiştir. *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgi TAP (Tris-acetate-phosphate) ortamında kültüre edilmiştir. Mikroalglerin farklı sürelerde sayımı için kontrol ortamında inkübasyona bırakılan 5 günlük mikroalg kültüründen bir miktar alınarak $A_{680}=0.1$ olacak şekilde stok kültürden belli miktarlarda alg kültürü alınarak yeni kültür başlatılmıştır. Steril kabinde ekim işleminden sonra yeni ekimi yapılmış örnekler 100 $\mu\text{mol foton/m}^2\text{s}$ şiddetinde sürekli ışık altında 120 rpm hızda 23°C sıcaklıkta çalkalamalı inkübatörde kültüre alınmıştır. İçerisinde 100 mL sıvı büyüme kültürü bulunan 250 mL erlen içerisinde kültüre alınan mikroalglerin büyümeleri $A_{680}=1.0$ absorbans değerine ulaştıklarında üç tekrarlı üç gruba ayrılmıştır. Kontrol grubunun yanında kültürlerle 1 mM, 5 mM ve 20 mM konsantrasyonda H_2O_2 uygulaması yapılmıştır ve uygulamadan sonraki 2, 24 ve 72. saatlerde hasat edilmiştir. Mikroalgin hasat edilme işlemleri Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK tarafından yapılmıştır. Elde edilen örnekler liyofilize edilinceye kadar -24°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.1.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Chlamydomonas reinhardtii mikroalgine ait numuneler yaklaşık bir saat liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen numunelere 2 mL etanol ilave edilip vorteks kullanılarak karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sıcaklık kontrollü ultrasonik banyo kullanılarak ekstraksiyon çalışması tamamlanmıştır. Ekstraksiyon çalışması esnasında termometre ile sıcaklık kontrol edilmiş ve çalışma karanlıkta yapılmıştır. Ekstraksiyon çalışması Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon çalışması

3.2.2. Spektroskopik yöntemler

3.2.2.1. Folin-Ciocalteu yöntemi

Şekil 3.1.'de gösterildiği gibi ekstrakte edilen örneklerden 200 µL tüpe alınıp, üzerine 1,8 mL saf su konulmuştur. Kör örnek hazırlanırken ise bu kısımda tüpe sadece 2 mL

saf su konulmuştur. Daha sonra deneysel çalışma öncesi taze hazırlanan Lowry C çözeltisinden (50 mL Lowry A +1 mL Lowry B çözeltisi) 2,5 mL ilave edilip, tüp karıştırılmıştır. Karıştırılan tüplere 0,25 mL Folin-Ciocalteu reaktifinden konulduktan sonra tekrar karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dakika boyunca karanlıkta reaksiyonun tamamlanması beklenmiş ve UV-VIS spektrofotometresinde 750 nm dalgaboyunda ölçümler yapılmıştır. Toplam fenolik madde miktarını tayin edebilmek için standart madde olarak gallik asit kullanılmıştır. Gallik asit çözeltileri hazırlanmış (0,1-0,5-1-5-10-15-20-30-40-50-60 mg/L) ve Folin-Ciocalteu yöntemi uygulanmıştır. Her bir standart çözelti için değeri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon denklemi kullanılarak örnekte bulunan toplam fenolik madde miktarı 'mg gallik asit/g örnek' olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.2. CHROMAC yöntemi

Bu çalışmada mikroalg örneklerinin antioksidan kapasite değerlerini tayin etmek için CHROMAC yöntemi kullanılmıştır (Şahin ve Demir 2013). Şekil 3.1'de gösterildiği gibi ekstrakte edilen örneklerden 200 µL tüpe alınıp, üzerine 0,3 mL saf su konulmuştur. Daha sonra deneysel çalışma öncesi taze hazırlanan 3,5 mL pH 2,8 tamponu konulup karıştırılmıştır. Kör örnek hazırlanırken ise 0,5 mL saf su konulup, 3,5 mL tampon çözeltisi (pH 1,2 tamponu) eklenmiştir. Üzerine taze hazırlanmış $K_2Cr_2O_7$ çözeltisinden ($3,4 \times 10^{-4} M$) 0,5 mL ilave edilip 1 dakika bekledikten sonra 0,5 mL taze hazırlanmış olan 1,5-difenilkarbazit ($3,4 \times 10^{-4} M$) çözeltisi eklenip, karıştırılmıştır. 50 dakika boyunca karanlıkta reaksiyonun tamamlanması beklenir ve UV-VIS spektrofotometresinde reaksiyon sonucu oluşan kompleksin maksimum absorpsiyon yaptığı 540 nm dalgaboyunda ölçümler yapılmıştır. Kör örneğin absorbansı 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür ($A_{k\ddot{o}r}$).

$$\text{Absorbans} = A_{k\ddot{o}r} - A_{\ddot{o}rnek} \quad (1)$$

Antioksidan kapasite miktarlarını belirlemek için standart madde olarak troloks kullanılmıştır. Troloks çözeltileri hazırlanmış (5-10-15-20-30-40-50-60-70 mg/L) ve CHROMAC yöntemi uygulanmıştır. Her bir standart çözelti için değeri grafiğe

geçirilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon denklemi kullanılarak örnekte bulunan antioksidan kapasite değeri ‘mg troloks/g örnek’ olarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Kromatografik yöntemler

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

Ekstrakte edilen *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg numunelerinin kromatografik analizleri için Agilent 1200 HPLC system (Waldbronn, Almanya) model kullanılmıştır. Karotenoidlerin kromatografik analizi YMC Carotenoid C30 (250x4.6 mm, 5µm, YMC Co., Ltd) kolonu kullanılarak yapılmıştır. 1,0 mL/dk akış hızı ile 20 µL’lik enjeksiyon hacminde gradient çözücü programı uygulanarak analiz gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak %95 metanol-%5 H₂O (H₂O: %0,05 trimetilamin içermektedir.) (çözücü A) ve tert-bütül metil eter (çözücü B) çözücüleri kullanılmıştır. Uygulanan HPLC-DAD analiz çalışma koşulları Çizelge 3.5.’de verilmiştir. Standart karotenoid bileşiklerinin UV-VIS spektrumları ve alıkonma zamanları karşılaştırılarak mikroalg numunelerindeki karotenoid bileşiklerinin varlığı tespit edilmiştir. Standart karotenoid bileşiklerinden oluşturulan kalibrasyon grafikleri yardımıyla da karotenoid miktarları belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. HPLC-DAD için analiz çalışma koşulları

| Zaman (dakika) | %B | %A |
|----------------|----|----|
| 0 | 5 | 95 |
| 15 | 20 | 80 |
| 20 | 30 | 70 |
| 30 | 40 | 60 |
| 40 | 75 | 25 |
| 45 | 5 | 95 |

3.2.4. Kemometrik yöntemler

Ekstrakte edilen *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg numunelerinde düşük seviyelerde bulunan ve spektroskopik olarak ayırımı gerçekleştirilemeyen karotenoidlerin miktarları kemometrik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Öncelikle

25 örnek (standart maddeler kullanılarak farklı derişimde karışımlardan oluşan) kullanılarak çok değişkenli kalibrasyon dizaynı hazırlanmıştır. -2'den +2'ye kadar kodlanmış değerlerden oluşan 5 seviyeli bir kalibrasyon dizaynı oluşturulmuştur. Kalibrasyon ve validasyon setleri β -karoten, zeaksantin, neoksantin, lutein ve α -karoten standart maddeleri kullanılarak farklı derişimlerde her bir tüpte son hacim 3 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Oluşturulan -2, -1, 0, 1 ve 2 seviyeleri 0,2- 0,4- 0,6- 0,8 ve 1 mg/L derişimleri ile kodlanmıştır (Çizelge 3.6. ve Çizelge 3.7.). Bu kalibrasyon dizaynının kolonlar arası korelasyon katsayısı sıfırdır (Çizelge 3.8.). Kalibrasyon dizaynı için fark vektörü [2013] ve dairesel üretici $-2 \rightarrow 1 \rightarrow 2 \rightarrow -1$ seçilmiştir. Karotenoid miktarlarını tahmin edebilmek için iki bağımsız validasyon set dizaynı oluşturulmuştur (Çizelge 3.9, Çizelge 3.10, Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13). İki validasyon set dizaynı 25 kromatogram içermektedir. I. validasyon set dizaynının (Çizelge 3.11) kolonlar arası korelasyon katsayısı $r_{12}=0$, II. validasyon set dizaynının (Çizelge 3.14) ise $r_{12}=1$ 'dir. I. validasyon set dizaynının fark vektörü [3102] ve dairesel üretici $-2 \rightarrow 1 \rightarrow 2 \rightarrow -1$ seçilerek oluşturulmuştur. II. validasyon set dizaynı, kalibrasyon dizaynı tablosunun birinci sütunu seçilerek uygulanmıştır. Tasarlanan çok değişkenli kalibrasyon dizaynı literatürdeki gibi tanımlanmıştır (Şahin ve Demir 2016).

Çizelge 3.6. Kalibrasyon dizaynı (Kodlanmış değerler)

| Deney | β -karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α -karoten |
|-------|------------------|------------|------------|--------|-------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | -2 | 2 | 2 | -1 |
| 3 | -2 | 2 | 2 | -1 | 2 |
| 4 | 2 | 2 | -1 | 2 | 0 |
| 5 | 2 | -1 | 2 | 0 | 1 |
| 6 | -1 | 2 | 0 | 1 | -1 |
| 7 | 2 | 0 | 1 | -1 | -1 |
| 8 | 0 | 1 | -1 | -1 | -2 |
| 9 | 1 | -1 | -1 | -2 | -1 |
| 10 | -1 | -1 | -2 | -1 | 0 |
| 11 | -1 | -2 | -1 | 0 | 2 |
| 12 | -2 | -1 | 0 | 2 | -2 |
| 13 | -1 | 0 | 2 | -2 | -2 |
| 14 | 0 | 2 | -2 | -2 | 1 |
| 15 | 2 | -2 | -2 | 1 | -2 |
| 16 | -2 | -2 | 1 | -2 | 0 |
| 17 | -2 | 1 | -2 | 0 | -1 |
| 18 | 1 | -2 | 0 | -1 | 1 |
| 19 | -2 | 0 | -1 | 1 | 1 |
| 20 | 0 | -1 | 1 | 1 | 2 |
| 21 | -1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 22 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 |
| 23 | 1 | 2 | 1 | 0 | -2 |
| 24 | 2 | 1 | 0 | -2 | 2 |
| 25 | 1 | 0 | -2 | 2 | 2 |

Çizelge 3.7. Kalibrasyon dizaynı (Gerçek derişim değerleri, mg/L)

| Deney | β -karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α -karoten |
|-------|------------------|------------|------------|--------|-------------------|
| 1 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 |
| 2 | 0,6 | 0,2 | 1,0 | 1,0 | 0,4 |
| 3 | 0,2 | 1,0 | 1,0 | 0,4 | 1,0 |
| 4 | 1,0 | 1,0 | 0,4 | 1,0 | 0,6 |
| 5 | 1,0 | 0,4 | 1,0 | 0,6 | 0,8 |
| 6 | 0,4 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 0,4 |
| 7 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 0,4 | 0,4 |
| 8 | 0,6 | 0,8 | 0,4 | 0,4 | 0,2 |
| 9 | 0,8 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,4 |
| 10 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | 0,6 |
| 11 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 1,0 |
| 12 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 1,0 | 0,2 |
| 13 | 0,4 | 0,6 | 1,0 | 0,2 | 0,2 |
| 14 | 0,6 | 1,0 | 0,2 | 0,2 | 0,8 |
| 15 | 1,0 | 0,2 | 0,2 | 0,8 | 0,2 |
| 16 | 0,2 | 0,2 | 0,8 | 0,2 | 0,6 |
| 17 | 0,2 | 0,8 | 0,2 | 0,6 | 0,4 |
| 18 | 0,8 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 0,8 |
| 19 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 0,8 | 0,8 |
| 20 | 0,6 | 0,4 | 0,8 | 0,8 | 1,0 |
| 21 | 0,4 | 0,8 | 0,8 | 1,0 | 0,8 |
| 22 | 0,8 | 0,8 | 1,0 | 0,8 | 0,6 |
| 23 | 0,8 | 1,0 | 0,8 | 0,6 | 0,2 |
| 24 | 1,0 | 0,8 | 0,6 | 0,2 | 1,0 |
| 25 | 0,8 | 0,6 | 0,2 | 1,0 | 1,0 |

Çizelge 3.8. Kalibrasyon dizaynının korelasyon katsayıları

| | β -karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α -karoten |
|-------------------|------------------|------------|------------|--------|-------------------|
| β -karoten | 1 | | | | |
| Zeaksantin | 0 | 1 | | | |
| Neoksantin | 0 | 0 | 1 | | |
| Lutein | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| α -karoten | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Çizelge 3.9. I. validasyon set dizaynı (Kodlanmış değerler)

| Deney | β -karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α -karoten |
|-------|------------------|------------|------------|--------|-------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | -2 | -1 | -2 | -2 |
| 3 | -2 | -1 | -2 | -2 | 2 |
| 4 | -1 | -2 | -2 | 2 | 0 |
| 5 | -2 | -2 | 2 | 0 | 1 |
| 6 | -2 | 2 | 0 | 1 | -2 |
| 7 | 2 | 0 | 1 | -2 | 1 |
| 8 | 0 | 1 | -2 | 1 | 1 |
| 9 | 1 | -2 | 1 | 1 | -1 |
| 10 | -2 | 1 | 1 | -1 | 0 |
| 11 | 1 | 1 | -1 | 0 | 2 |
| 12 | 1 | -1 | 0 | 2 | 1 |
| 13 | -1 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| 14 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| 15 | 2 | 1 | 2 | 2 | -2 |
| 16 | 1 | 2 | 2 | -2 | 0 |
| 17 | 2 | 2 | -2 | 0 | -1 |
| 18 | 2 | -2 | 0 | -1 | 2 |
| 19 | -2 | 0 | -1 | 2 | -1 |
| 20 | 0 | -1 | 2 | -1 | -1 |
| 21 | -1 | 2 | -1 | -1 | 1 |
| 22 | 2 | -1 | -1 | 1 | 0 |
| 23 | -1 | -1 | 1 | 0 | -2 |
| 24 | -1 | 1 | 0 | -2 | -1 |
| 25 | 1 | 0 | -2 | -1 | -2 |

Çizelge 3.10. I. validasyon set dizaynı (Gerçek derişim değerleri, mg/L)

| Deney | β -karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α -karoten |
|-------|------------------|------------|------------|--------|-------------------|
| 1 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 |
| 2 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 |
| 3 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 1,0 |
| 4 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 1,0 | 0,6 |
| 5 | 0,2 | 0,2 | 1,0 | 0,6 | 0,8 |
| 6 | 0,2 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 0,2 |
| 7 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 0,2 | 0,8 |
| 8 | 0,6 | 0,8 | 0,2 | 0,8 | 0,8 |
| 9 | 0,8 | 0,2 | 0,8 | 0,8 | 0,4 |
| 10 | 0,2 | 0,8 | 0,8 | 0,4 | 0,6 |
| 11 | 0,8 | 0,8 | 0,4 | 0,6 | 1,0 |
| 12 | 0,8 | 0,4 | 0,6 | 1,0 | 0,8 |
| 13 | 0,4 | 0,6 | 1,0 | 0,8 | 1,0 |
| 14 | 0,6 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 1,0 |
| 15 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,2 |
| 16 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,2 | 0,6 |
| 17 | 1,0 | 1,0 | 0,2 | 0,6 | 0,4 |
| 18 | 1,0 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 1,0 |
| 19 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 1,0 | 0,4 |
| 20 | 0,6 | 0,4 | 1,0 | 0,4 | 0,4 |
| 21 | 0,4 | 1,0 | 0,4 | 0,4 | 0,8 |
| 22 | 1,0 | 0,4 | 0,4 | 0,8 | 0,6 |
| 23 | 0,4 | 0,4 | 0,8 | 0,6 | 0,2 |
| 24 | 0,4 | 0,8 | 0,6 | 0,2 | 0,4 |
| 25 | 0,8 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,2 |

Çizelge 3.11. I. validasyon set dizaynının korelasyon katsayıları

| | β -karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α -karoten |
|-------------------|------------------|------------|------------|--------|-------------------|
| β -karoten | 1 | | | | |
| Zeaksantin | 0 | 1 | | | |
| Neoksantin | 0 | 0 | 1 | | |
| Lutein | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| α -karoten | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Çizelge 3.12. II. Validasyon set dizaynı (Kodlanmış değerler)

| Deney | β -karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α -karoten |
|-------|------------------|------------|------------|--------|-------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | -2 | -2 | -2 | -2 | -2 |
| 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 6 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 7 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 11 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 12 | -2 | -2 | -2 | -2 | -2 |
| 13 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 14 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 15 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 16 | -2 | -2 | -2 | -2 | -2 |
| 17 | -2 | -2 | -2 | -2 | -2 |
| 18 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 19 | -2 | -2 | -2 | -2 | -2 |
| 20 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 21 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 22 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 23 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 24 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 25 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Çizelge 3.13. II. Validasyon set dizaynı (Gerçek derişim değerleri, mg/L)

| Deney | β -karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α -karoten |
|-------|------------------|------------|------------|--------|-------------------|
| 1 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 |
| 2 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| 4 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 5 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 6 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| 7 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 9 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 10 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| 11 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| 12 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| 13 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| 14 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 15 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 16 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| 17 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| 18 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 19 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| 20 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 21 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| 22 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 23 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 24 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 25 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |

Çizelge 3.14. II. Validasyon set dizaynının korelasyon katsayıları

| | β -karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α -karoten |
|-------------------|------------------|------------|------------|--------|-------------------|
| β -karoten | 1 | | | | |
| Zeaksantin | 1 | 1 | | | |
| Neoksantin | 1 | 1 | 1 | | |
| Lutein | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| α -karoten | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

4. BULGULAR

Bu çalışmada elde edilen bulgular dört ana başlıkta toplanabilir. Bunlar;

- Spektroskopik yöntemler
- Kromatografik yöntemler
- Kemometrik yöntemler

4.1. Spektroskopik yöntemler

4.1.1. Folin-Ciocalteu yöntemi

Bu çalışmada ekstrakte edilen (Şekil 3.1.) *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg numunelerinin Folin-Ciocalteu yöntemi ile içeriğinde bulunan toplam fenolik madde miktarı belirlenmiştir. UV-VIS spektrofotometresinde 750 nm dalgaboyunda ölçümler yapılmıştır. Toplam fenolik madde miktarını tayin edebilmek için standart madde olarak gallik asit kullanılarak (0,1-60 mg/L gallik asit derişimi aralığında) kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Çizelge 4.1.). Kalibrasyon denklemleri kullanılarak farklı oksidatif strese maruz bırakılan mikroalg numunelerinde bulunan toplam fenolik madde miktarı ‘mg gallik asit/g örnek’ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.1. Folin-Ciocalteu yöntemi için kalibrasyon grafiği

| | Gallik asit derişimi (mg/L) | y=mx+b | R ² |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------|
| Toplam fenolik madde miktarı | 0,1 - 60 | y = 0,0289x - 0,0185 | 0,9973 |

Çizelge 4.2. Farklı oksidatif strese maruz bırakılmış olan *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg numunelerinde bulunan toplam fenolik madde miktarı (mg gallik asit/g örnek)

| Zaman | Örnekler | Toplam fenolik madde miktarı (mg gallik asit/g örnek) |
|---------|------------------------------------|---|
| 2 saat | Kontrol | 0,33±0,01 |
| | 1µM H ₂ O ₂ | 0,46±0,01 |
| | 5µM H ₂ O ₂ | 0,32±0,01 |
| | 20µM H ₂ O ₂ | 0,30±0,01 |
| 24 saat | Kontrol | 0,36±0,02 |
| | 1µM H ₂ O ₂ | 0,41±0,01 |
| | 5µM H ₂ O ₂ | 0,37±0,01 |
| | 20µM H ₂ O ₂ | 0,35±0,01 |
| 72 saat | Kontrol | 0,34±0,01 |
| | 1µM H ₂ O ₂ | 0,47±0,02 |
| | 5µM H ₂ O ₂ | 0,35±0,01 |
| | 20µM H ₂ O ₂ | 0,31±0,01 |

Ortalama ± standart sapma

4.1.2. CHROMAC yöntemi

Tez kapsamında yapılan bu çalışmada Şekil 3.1’de gösterildiği gibi ekstrakte edilen mikroalg numunelerinin CHROMAC yöntemi ile antioksidan kapasite değerlerini tayin edilmiştir. UV-VIS spektrofotometresinde 540 nm dalgaboyunda ölçümler yapılmıştır. Antioksidan kapasite miktarlarını belirlemek için standart madde olarak troloks kullanılarak (5-70 mg/L) kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Çizelge 4.3.). Kalibrasyon denklemi kullanılarak oksidatif strese maruz bırakılan mikroalg numunelerinde bulunan antioksidan kapasite değeri ‘mg troloks/g örnek’ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.3. CHROMAC yöntemi için kalibrasyon grafiği

| | Troloks derişimi (mg/L) | y=mx+b | R ² |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------|----------------|
| Antioksidan kapasite değeri | 5 - 70 | y = 0,0035x + 0,0964 | 0,9923 |

Çizelge 4.4. Farklı oksidatif strese maruz bırakılmış olan *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg numunelerinde bulunan antioksidan kapasite değerleri (mg troloks asit/g örnek)

| Zaman | Örnekler | Antioksidan kapasite değeri (mg troloks asit/g örnek) |
|---------|------------------------------------|---|
| 2 saat | Kontrol | 6,86 ±0,10 |
| | 1µM H ₂ O ₂ | 7,55±0,40 |
| | 5µM H ₂ O ₂ | 6,95±0,06 |
| | 20µM H ₂ O ₂ | 5,47±0,59 |
| 24 saat | Kontrol | 6,76±0,37 |
| | 1µM H ₂ O ₂ | 7,07±0,24 |
| | 5µM H ₂ O ₂ | 6,93±0,11 |
| | 20µM H ₂ O ₂ | 6,58±0,05 |
| 72 saat | Kontrol | 7,49±0,05 |
| | 1µM H ₂ O ₂ | 9,17±0,16 |
| | 5µM H ₂ O ₂ | 8,52±0,60 |
| | 20µM H ₂ O ₂ | 7,49±0,07 |

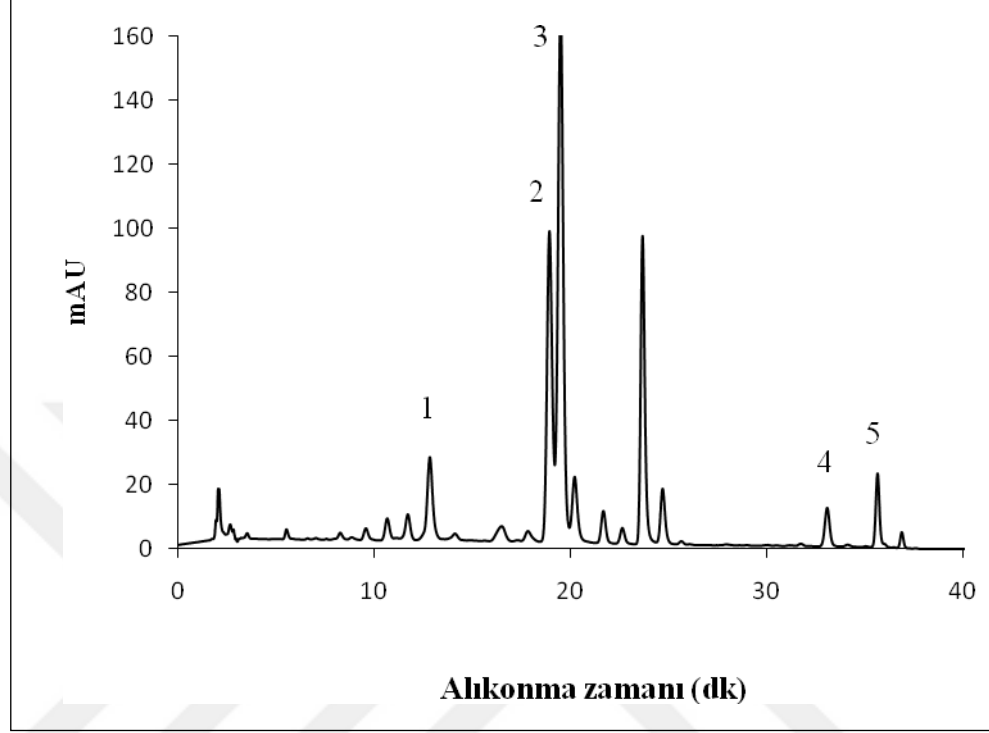
Ortalama ± standart sapma

4.2. Kromatografik yöntemler

4.2.1. HPLC –DAD sonuçları

Yapılan bu çalışmada farklı oksidatif strese maruz bırakılmış olan *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg numunelerinde bulunan bazı karotenoidlerin varlığı belirlenmiş olup, miktarları tayin edilmiştir. Öncelikle karotenoid tayini için önce mobil faz seçimi yapılmış ve temin edilen standart maddeler ile HPLC-DAD cihazında yöntem geliştirilmiştir. Analiz sırasında gradient çözücü programı uygulanmış ve karotenoidler 450 nm dalgaboyunda tayin edilmiştir. Standart bileşiklerden oluşturulan belirli derişimdeki (10 mg/L) karışıma HPLC-DAD cihazında gradient çözücü programı uygulanarak kromatogram oluşturulmuştur (Şekil 4.1.). Standart karotenoid bileşiklerinin UV spektrumları ve alıkonma zamanları karşılaştırılarak mikroalg numunelerindeki karotenoid bileşiklerinin varlığı tespit edilmiştir. Daha sonra standart karotenoid bileşikleri kullanılarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur (Çizelge 4.5.). Farklı oksidatif strese maruz bırakılmış olan *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg

numunelerinde bulunan karotenoid miktarları kalibrasyon denklemleri yardımıyla hesaplanmıştır (Çizelge 4.6.).



Şekil 4.1. 2 saat boyunca 1 μ M H₂O₂ oksidatif stres altındaki *C. reinhardtii* mikroalg ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı. Dedeksiyon 450 nm’de gerçekleştirildi. Pik sıralaması 1.Neoksanlin, 2.Lutein, 3. Zeaksantin, 4. α -karoten, 5. β -karoten

Çizelge 4.5. Karotenoidlerin HPLC-DAD cihazı ile analizi için belirlenen analitik parametreler

| Karotenoidler | Derişim (mg/L) | y=mx+b | R² | LOD (mg/L) | LOQ (mg/L) | Peak purity (%) | Kapasite faktörü (k') | Seçicilik faktörü (α) |
|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Astaksantin | 0,25-10 | y = 153,6x - 86,365 | 0,995 | 0,01 | 0,07 | 99,87 | 4,19 | 1,12 |
| Lutein | 0,25-10 | y = 71,224x - 1,9159 | 0,998 | 0,02 | 0,06 | 99,88 | 5,04 | 1,19 |
| Kantaksantin | 0,25-10 | y = 277,49x - 148,09 | 0,994 | 0,02 | 0,05 | 99,91 | 6,03 | 1,31 |
| β-kriptoksantin | 0,25-10 | y = 57,735x - 22,287 | 0,997 | 0,02 | 0,06 | 99,98 | 7,94 | 1,17 |
| β-karoten | 0,25-10 | y = 154,46x - 19,5 | 0,998 | 0,06 | 0,21 | 99,99 | 10,56 | 1,04 |
| α-karoten | 0,25-10 | y = 118,09x - 17,225 | 0,999 | 0,02 | 0,06 | 98,52 | 9,53 | 1,11 |
| Zeaksantin | 0,25-10 | y = 265,7x - 23,055 | 0,998 | 0,04 | 0,12 | 99,50 | 6,00 | 1,06 |
| Neoksantin | 0,25-10 | y = 35,158x + 2,4447 | 0,997 | 0,01 | 0,02 | 96,89 | 3,15 | 1,15 |

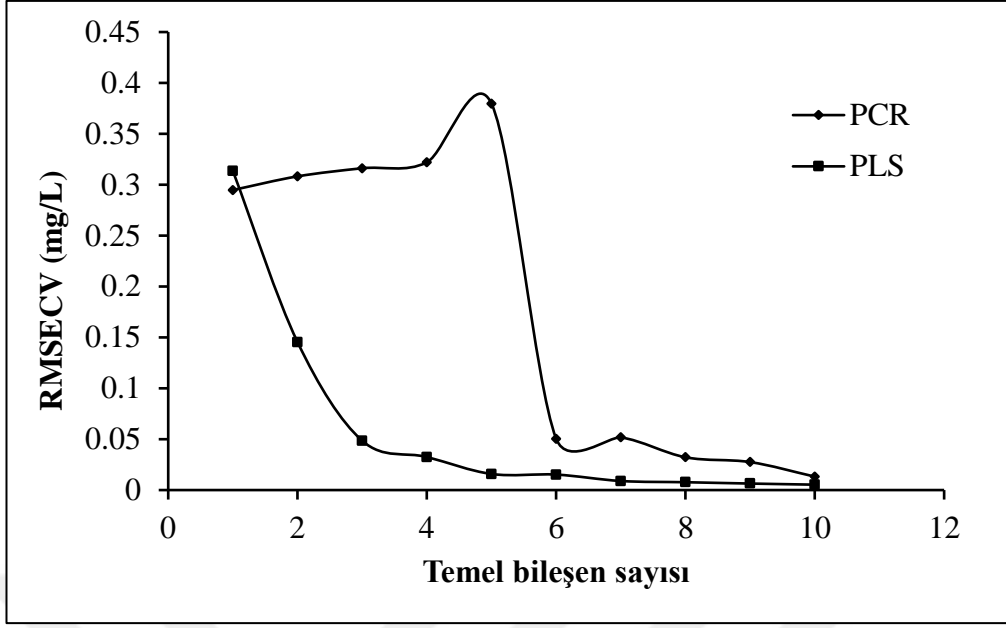
Çizelge 4.6. *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg numunelerinde bulunan karotenoid miktarları (mg/g örnek)

| Zaman | Örnekler | Neoksantin | Lutein | Zeaksantin | α -karoten | β -karoten |
|---------|--|------------|-----------|------------|-------------------|------------------|
| 2 saat | Kontrol | 0,87±0,01 | 2,63±0,22 | 0,02±0,01 | 0,11±0,01 | 0,15±0,01 |
| | 1 μ M H ₂ O ₂ | 1,99±0,14 | 5,75±0,37 | 0,10±0,01 | 0,25±0,01 | 0,29±0,01 |
| | 5 μ M H ₂ O ₂ | 1,34±0,05 | 4,03±0,19 | 0,05±0,01 | 0,17±0,01 | 0,19±0,01 |
| | 20 μ M H ₂ O ₂ | 1,02±0,05 | 3,25±0,28 | 0,03±0,01 | 0,10±0,01 | 0,11±0,01 |
| 24 saat | Kontrol | 0,52±0,03 | 1,76±0,16 | 0,01±0,01 | 0,09±0,01 | 0,10±0,01 |
| | 1 μ M H ₂ O ₂ | 1,63±0,14 | 3,85±0,34 | 0,08±0,01 | 0,17±0,01 | 0,20±0,02 |
| | 5 μ M H ₂ O ₂ | 0,95±0,01 | 2,27±0,21 | 0,02±0,01 | 0,08±0,01 | 0,11±0,01 |
| | 20 μ M H ₂ O ₂ | 0,84±0,03 | 1,99±0,16 | 0,02±0,01 | 0,05±0,01 | 0,09±0,01 |
| 72 saat | Kontrol | 0,58±0,01 | 1,82±0,02 | 0,02±0,01 | 0,10±0,01 | 0,11±0,01 |
| | 1 μ M H ₂ O ₂ | 0,37±0,02 | 1,22±0,08 | 0,02±0,01 | 0,07±0,01 | 0,09±0,01 |
| | 5 μ M H ₂ O ₂ | 0,24±0,01 | 0,55±0,02 | x | x | 0,06±0,01 |
| | 20 μ M H ₂ O ₂ | 0,13±0,01 | 0,10±0,01 | x | x | x |

Ortalama \pm standart sapma, x: Tayin edilemedi.

4.3. Kemometrik yöntemler

Kemometrik yöntemler için çok değişkenli kalibrasyon tekniğine göre hazırlanan kalibrasyon ve validasyon setlerinde bulunan 25 adet çözeltinin HPLC kromatogramları alındı. Elde edilen kromatografik veriler, ön işlem teknikleri ile analize hazırlandıktan sonra çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS) ve temel bileşen regresyonu (PCR) analizleri ile her bir çözeltide bulunan karotenoid miktarları bulunmuştur. PCR ve PLS analizleri için MATLAB version 8.1.0.604 (R2013a) (MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) programı kullanılmıştır. PCR ve PLS algoritmalarında karışım içinde bulunan maddelerin kantitatif tayininde önemli bir faktör olan optimum bileşen sayısı değeri hesaplandı. Şekil 4.2’de kalibrasyon dizaynı için seçilen optimum bileşen sayısı değeri PCR için 6 ve PLS için 5 olarak seçilmiştir. Her bir karotenoid için ortalama karekök hata değerleri hesaplandı ve PCR ve PLS sonuçları karşılaştırıldı. Kalibrasyon dizaynı için PCR yöntemi ile bulunan tahmini karotenoid derişimleri Çizelge 4.7’de, PLS yöntemi ile bulunan tahmini karotenoid derişimleri Çizelge 4.8’de gösterilmiştir. Çizelge 4.9.’de ise kalibrasyon ve validasyon setleri için PCR ve PLS ile hesaplanan ortalama karekök hata değerleri verilmiştir. Daha sonra farklı H₂O₂ konsantrasyonlarında oksidasyona uğratılmış *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginde bulunan karotenoidler HPLC ile analiz edilmiştir. Ayrıca bu gerçek örneklerde bulunan karotenoid miktarları, PCR ve PLS yöntemleri ile tahmin edilerek gerçek ve tahmini derişim değerleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.10).



Şekil 4.2. Kalibrasyon dizaynı için seçilen optimum PCR ve PLS bileşen sayısı

Çizelge 4.7. PCR yöntemi ile bulunan tahmini karotenoid derişimleri (mg/L)

| Deney | β-karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α-karoten |
|--------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|------------------------------------|
| 1 | 0,63 | 0,60 | 0,59 | 0,63 | 0,60 |
| 2 | 0,55 | 0,18 | 0,99 | 0,99 | 0,40 |
| 3 | 0,21 | 0,98 | 0,99 | 0,40 | 1,02 |
| 4 | 1,00 | 0,98 | 0,39 | 0,98 | 0,60 |
| 5 | 1,03 | 0,43 | 0,98 | 0,62 | 0,76 |
| 6 | 0,41 | 0,99 | 0,59 | 0,81 | 0,36 |
| 7 | 1,01 | 0,59 | 0,82 | 0,39 | 0,36 |
| 8 | 0,60 | 0,82 | 0,40 | 0,41 | 0,26 |
| 9 | 0,74 | 0,43 | 0,40 | 0,19 | 0,36 |
| 10 | 0,39 | 0,43 | 0,20 | 0,41 | 0,61 |
| 11 | 0,45 | 0,19 | 0,40 | 0,62 | 1,01 |
| 12 | 0,23 | 0,43 | 0,59 | 0,97 | 0,23 |
| 13 | 0,42 | 0,58 | 0,99 | 0,19 | 0,24 |
| 14 | 0,55 | 0,98 | 0,21 | 0,21 | 0,81 |
| 15 | 1,04 | 0,18 | 0,20 | 0,81 | 0,23 |
| 16 | 0,21 | 0,18 | 0,82 | 0,18 | 0,59 |
| 17 | 0,23 | 0,82 | 0,20 | 0,61 | 0,34 |
| 18 | 0,73 | 0,18 | 0,59 | 0,40 | 0,78 |
| 19 | 0,22 | 0,58 | 0,39 | 0,80 | 0,76 |
| 20 | 0,61 | 0,43 | 0,83 | 0,82 | 1,04 |
| 21 | 0,38 | 0,81 | 0,82 | 0,98 | 0,79 |
| 22 | 0,76 | 0,81 | 0,99 | 0,80 | 0,58 |
| 23 | 0,78 | 0,99 | 0,83 | 0,62 | 0,22 |
| 24 | 1,06 | 0,82 | 0,59 | 0,17 | 1,01 |
| 25 | 0,76 | 0,58 | 0,20 | 0,98 | 1,02 |

Çizelge 4.8. PLS yöntemi ile bulunan tahmini karotenoid derişimleri (mg/L)

| Deney | β-karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α-karoten |
|--------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|------------------------------------|
| 1 | 0,62 | 0,60 | 0,59 | 0,63 | 0,61 |
| 2 | 0,58 | 0,19 | 0,99 | 1,00 | 0,38 |
| 3 | 0,20 | 0,98 | 1,00 | 0,39 | 0,99 |
| 4 | 1,00 | 0,98 | 0,39 | 0,98 | 0,60 |
| 5 | 1,01 | 0,43 | 1,00 | 0,62 | 0,80 |
| 6 | 0,41 | 0,99 | 0,59 | 0,81 | 0,37 |
| 7 | 1,00 | 0,59 | 0,81 | 0,40 | 0,37 |
| 8 | 0,59 | 0,82 | 0,39 | 0,41 | 0,22 |
| 9 | 0,80 | 0,43 | 0,39 | 0,19 | 0,38 |
| 10 | 0,40 | 0,43 | 0,21 | 0,41 | 0,62 |
| 11 | 0,40 | 0,18 | 0,39 | 0,62 | 1,00 |
| 12 | 0,20 | 0,43 | 0,59 | 0,97 | 0,21 |
| 13 | 0,40 | 0,58 | 0,99 | 0,19 | 0,22 |
| 14 | 0,59 | 0,99 | 0,20 | 0,21 | 0,81 |
| 15 | 0,99 | 0,18 | 0,21 | 0,81 | 0,21 |
| 16 | 0,19 | 0,19 | 0,81 | 0,18 | 0,61 |
| 17 | 0,21 | 0,82 | 0,21 | 0,60 | 0,36 |
| 18 | 0,80 | 0,18 | 0,59 | 0,40 | 0,82 |
| 19 | 0,20 | 0,59 | 0,39 | 0,80 | 0,80 |
| 20 | 0,59 | 0,43 | 0,81 | 0,82 | 1,00 |
| 21 | 0,41 | 0,82 | 0,81 | 0,98 | 0,80 |
| 22 | 0,81 | 0,81 | 1,00 | 0,80 | 0,61 |
| 23 | 0,80 | 0,98 | 0,82 | 0,61 | 0,21 |
| 24 | 1,01 | 0,81 | 0,59 | 0,18 | 0,99 |
| 25 | 0,80 | 0,58 | 0,21 | 0,98 | 1,00 |

Çizelge 4.9. Kalibrasyon ve validasyon setleri için PCR ve PLS ile hesaplanan ortalama karekök hata değerleri

| Karotenoid derişimleri için ortalama karekök hata (RMSE) değerleri (mg /L) | | | | | | |
|---|--------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|------------------------------------|
| | | β-karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α-karoten |
| PCR | Kalibrasyon seti | 0,0348 | 0,0201 | 0,0136 | 0,0168 | 0,0300 |
| | Validasyon seti 1 | 0,2656 | 0,2822 | 0,2901 | 0,2856 | 0,2701 |
| | Validasyon seti 2 | 0,2009 | 0,2850 | 0,3057 | 0,2607 | 0,2895 |
| PLS | Kalibrasyon seti | 0,0083 | 0,0189 | 0,0107 | 0,0155 | 0,0166 |
| | Validasyon seti 1 | 0,0083 | 0,0189 | 0,0107 | 0,0155 | 0,0166 |
| | Validasyon seti 2 | 0,0084 | 0,0194 | 0,0130 | 0,0122 | 0,0136 |

Çizelge 4.10. Gerçek örnekler için PCR ve PLS ile hesaplanan ortalama karekök hata değerleri

| Karotenoid derişimleri için ortalama karekök hata (RMSE) değerleri (mg /L) | | | | | | |
|---|------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|------------------------------------|
| | | β-karoten | Zeaksantin | Neoksantin | Lutein | α-karoten |
| PCR | Gerçek örnekler | 0,5812 | 1,4323 | 0,1579 | 0,1866 | 0,1535 |
| PLS | Gerçek örnekler | 0,0500 | 0,4300 | 0,0252 | 0,2800 | 0,1320 |

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

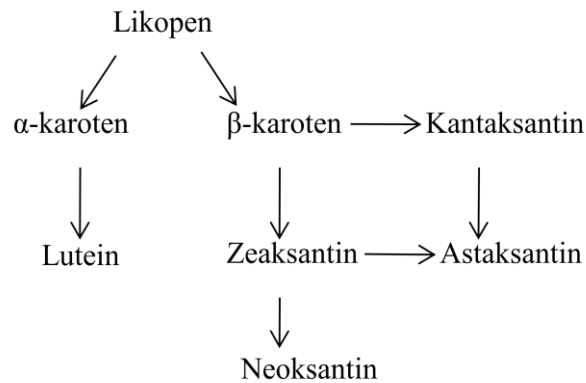
Vücudumuzda oksidan - antioksidan dengesi bulunmaktadır. Bu denge; kimyasal reaksiyonlar sonucu veya dış etkenler sebebiyle oluşan serbest radikallerin kararlı hale gelebilmek için lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine saldırarak hasar vermesiyle bozulabilir ve var olan antioksidan savunma mekanizması önleyemediğinde oksidatif stres diye adlandırılan durum meydana gelir (Gaparovic ve ark. 2010). Bu durumda dışarıdan alınan tokoferol, askorbik asit, karotenoid gibi antioksidan özelliğe sahip moleküller serbest radikallere kendi elektronlarını vererek radikalleri süpürür ve okside olmalarını engeller (Liu ve ark. 2007, Khalil ve ark. 2010, Noori 2012, Chang ve ark. 2013). Oksidanların organizma üzerindeki etkisi ise, oksidanın türüne, yoğunluğuna, çeşitli antioksidanların bileşimine, aktivitelerine ve onarım sistemlerinin yeteneğine bağlıdır (Rahal ve ark. 2014). Antioksidan maddelerin oksidatif hasarı engelleyici etkisi olması günümüzde gerçekleştirilen pek çok çalışmanın da araştırma konusu olmuştur.

Yapılan çalışmalarda antioksidanların tayini; Folin–Ciocalteu, DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC ve CHROMAC tayin metodu ile spektroskopik, kromatografik ve kemometrik yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Yaban mersini ile gerçekleştirilen bir çalışmada antioksidan tayinleri spektroskopik yöntemler kullanılarak toplam fenol tayini (Folin–Ciocalteu yöntemi) ile ABTS ve DPPH ölçümleri FT-IR ve Raman spektroskopisi ile yapılmıştır (Zheng ve ark. 2017). *Phlomis armeniaca* bitkisinde bulunan antioksidan özelliğe sahip fenolik bileşenler kromatografik yöntemlerden HPLC kullanılarak tayin edilebilmiştir (Sarıkürkçü ve ark. 2015). Kayın ağacı kabuğu (*Fagus sylvatica L.*) ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise HPLC–MS/MS ile ABTS, DPPH ve FRAP metodu kullanılarak antioksidan bir madde olan polifenol miktarları çok fazla deney yapmadan kemometrik yöntemlerle tahmin edilmeye çalışılmıştır (Hoffman ve ark. 2017).

Mikroalgler, içerdikleri karotenoid nedeniyle doğal antioksidanların umut verici kaynaklarından biri olarak görülmektedir (Goiris ve ark. 2015). Besin piramidinde mikroalgler üretici sınıfına girdiği için yani enerjinin ve besinin kullanılabilirliğinde

öncül olması nedeniyle ve de kullanılabilirliğinin sağlanabilmesi için bu çalışmada *Chlorophyta* familyasına ait *C.reinhardtii* mikroalgi ile çalışılmıştır.

Mikroalglerin karotenoid sentezlemesi sırasında oksidatif stres (ışık, pH, azot, fosfor gibi) uyguladığında biyosentezinde farklılıklar meydana gelmektedir. Mikroalglerden karotenoid biyosentezinin ilk aşamasında izopentenildifosfat (IPP), dimetilallildifosfata (DMAPP) izomerize olmakta ve sonra geranilgeranildifosfatsentaz (GGPPsentaz) enzimi ile 20 karbonlu geranilgeranildifosfat (GGPP) meydana gelmektedir. GGPP'nin fitoen sentaz (PSY) enzimi kondenzasyonu ile fitoen oluşmaktadır. Fitoen denatürasyona uğrayarak likopeni oluşturmakta ve diğer karotenoidlerin oluşumu sırasında da iki farklı halkalaşma reaksiyonuna uğramaktadır. Halkalaşma reaksiyonu oluşan karotenoidler ise oksidatif strese uğratıldığında yapılarında bulunan enzimler aracılığıyla birbirine dönüşmektedir. *C. reinhardtii*, *Volvox carteri* veya *Chlorella vulgaris* genomlarında benzersiz bir PSY kodlayan gen bulunmuştur, ancak diğer bazı *Chlorophyta* grubuna ait mikroalglerde (*D. salina* gibi) stres koşullarına karşı farklı olarak düzenlenmiş bir tepkinin sonucu olarak PSY gen ailelerinin iki sınıfı mevcut olduğu görülmektedir. Kısaca bahsetmek gerekirse, her mikroalge özgü olan karotenoidler gerekli enzimler kullanılarak sentezlenebilmektedir (Britton 1992, Türkcan ve Ökmen 2012). Mikroalglerin biyosentez şemasına göre bakıldığında bu karotenoidlerden α -karotenin luteine, β -karotenin de zeaksantin ve neoksantine dönüşebildiği görülmektedir (Şekil 5.1.) (Cordero ve ark. 2011, Varela ve ark. 2015, Butnariu 2016).



Şekil 5.1. *C.reinhardtii* mikroalginde bulunan karotenoidlerin oluşumu

Bu çalışmada *C.reinhardtii* mikroalgi farklı konsantrasyonlarda farklı zamanlarda H₂O₂ ile oksidasyona uğratılıp karotenoid bileşikleri tayin edilmiştir. Karotenoid bileşiklerinin tayin edilmesinde kullanılan yöntemler üç başlıkta toplanabilir. Bunlar;

- Spektroskopik yöntemler
- Kromatografik yöntemler
- Kemometrik yöntemler

Farklı konsantrasyonlarda (1, 5 ve 20 µM H₂O₂) oksidatif strese uğratılan ve ekstrakte edilen *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg örnekleri spektroskopik yöntemlerden Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak içeriğinde bulunan toplam fenolik madde miktarı ile CHROMAC yöntemi kullanılarak antioksidan kapasite miktarları tayin edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan kapasite miktarları verilerinin korelasyon katsayısı 0,58 bulunmuştur. Bu durum sonuçların birbiriyle uyumlu olduğunu göstermektedir. Zaman sabitken H₂O₂ derişimi arttırıldığında toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan kapasite miktarları azalmıştır (Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.4.). En yüksek miktarlar ise 72 saat boyunca 1 µM H₂O₂ oksidatif stres uygulanan örneklerden elde edilmiştir. Bu durum 72 saat sonunda hücre yıkımında olduğu için karotenoid maddelerin ortamda fazla olduğunu göstermektedir.

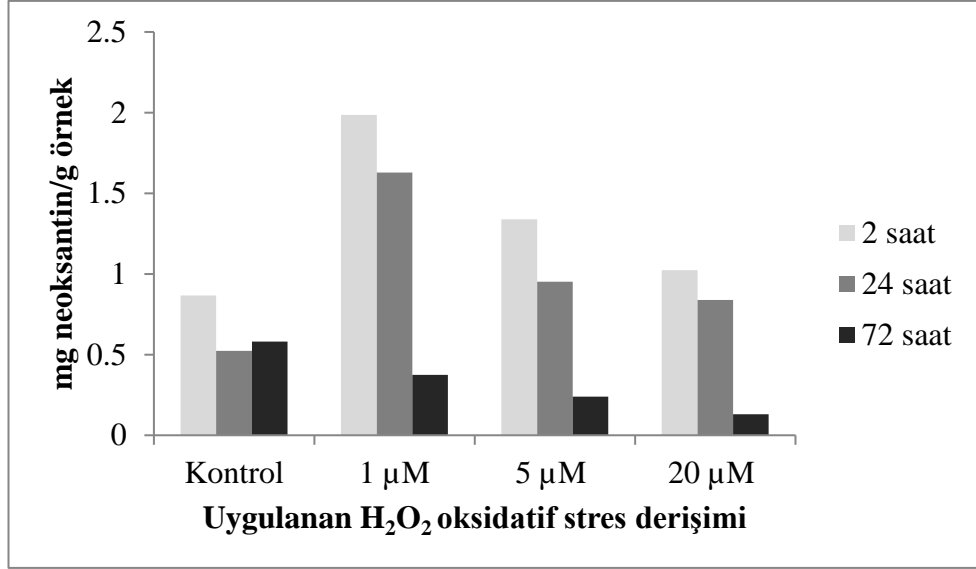
Kromatografik olarak antioksidanların tayininin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle HPLC-DAD cihazında yöntem geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bunun için daha önce yapılan çalışmalar incelenmiştir. Ters faz kromatografi kullanılarak yapılan çalışmalarda iyi bir ayırımın sağlanabilmesi için hidrofobi, silanol aktivite, moleküllerin yapıları ve polar seçiciliğe dikkat edilmektedir. Öncelikle analite uygun bir kolon ve hareketli (mobil) faz seçimi gerekmektedir. Yapılan birkaç çalışmada karotenoidlerin daha az polar yapıda olması nedeniyle genellikle polarlığı daha az çözücüler kullanılmakta ve sulu ürünlerde liyofilizasyon işlemine gerek duyulmaktadır (Rodriguez-Amaya 2014). Karotenoid tayini için kolonlar üzerinde yapılan bir çalışmada kolonların silanol aktiviteleri ve hidrofobikliği karşılaştırılmıştır. Silanol aktivite arttıkça hidrofobiklik azalmaktadır. β-karoten ve likopen, luteinden daha hidrofobik olması nedeniyle C18 kolonu ile yapılan tayinlerde alıkonma süreleri daha kısa olmaktadır ve bu durum bazı C18 kolonlarda çok iyi bir ayırma sağlayamadığı

pikin simetrisinin bozulduğu, pik kuyruklanmasına neden olduğu görülmüştür. C30 kolonlarında ise kolonda karotenoidlerin özellikle daha az polar yapıdakilerin tutunması sağlanacağından alıkonma süreleri daha fazla ve analizlerin daha uzun olduğu görülmüştür (Ligor ve ark. 2014). Yapılan çalışmalarda silanol aktiviteyi en aza indirebilmek için sabit (durgun) faza uygun modifierler ilave edilmektedir. Kolonun yüzeyi daha küçük silanlarla değiştirilerek silanol grupların aktivitesi düşürülmektedir. Bunun için çoğunlukla mobil faza trietilamin (TEA), amonyum tuzları ve dimetiloktilamin (DMOA) eklenerek sabit fazın silanol aktivitesi düşürülmekte ve daha az polarlıktaki karotenoidlerin daha iyi ayrılmasını yani pik kuyruklanmalarını engellemektedir (Aral 2013, Ligor ve ark. 2014). Yaptığımız bu çalışmada ise ilk etapta XBridge C18 (3,5 µm, 4,6×250 mm; Waters) kolonu ile denemeler yapılmıştır ama daha iyi ayrımların sağlanabilmesi için YMC Carotenoid C30 kolonu (5 µm, 4,6×250 mm) ile çalışılmış ve pik kuyruklanmalarının önüne geçebilmek için mobil faza modifier olarak TEA eklenmiştir.

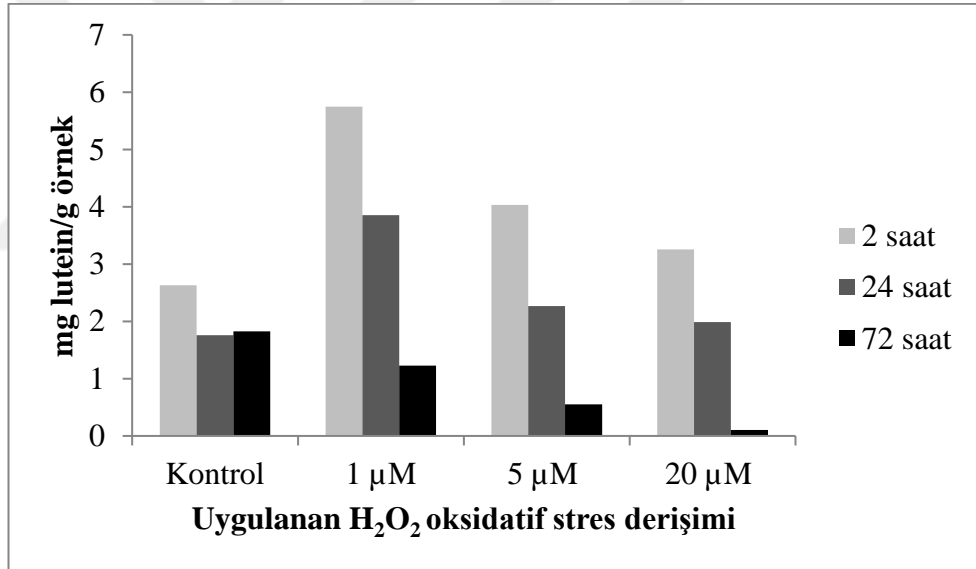
Hareketli faz seçiminde ise ters faz kromatografi kullanıldığı için polar çözücüler kullanılmıştır. Karotenoidlerin etkili bir şekilde ayrılması için yapılan araştırmalardan HPLC-DAD cihazı ve YMC kolonu kullanılarak yapılan bir çalışmada hareketli faz olarak; %3 (v/v) su ve 0,05 M amonyum asetat içeren metanol (çözücü A) ile %100 TBME (çözücü B, %0,05 TEA veya %0,1 BHT içeren) kullanılmıştır. Bu yöntem ile trans-neoksantin, trans-violaksantin, cis-neoksantin, trans-zeaksantin, trans-lutein, trans-β-karoten ve cis-β-karoten gibi birçok karotenoid tayin edilebilmiştir (Taylor ve ark. 2006). Yapılan başka bir çalışmada ise yine hareketli faz olarak; metanol (%0,1 amonyum asetat içeren) ve TBME kullanılmıştır ve 39 tane karotenoidin ayrımı gerçekleştirilmiştir (Melendez-Martinez ve ark. 2013). Gerçekleştirilen bu gibi araştırmalardan faydalanarak bu çalışmada da karotenoid bileşiklerinin tayini için HPLC-DAD cihazında yöntem geliştirilmiştir.

Bu çalışmada 1,0 mL/dk akış hızı ile 20 µL'lik enjeksiyon hacminde geliştirilen yöntem ile gradient çözücü programında çalışılmıştır (Çizelge 3.5.) ve karotenoidler 450 nm dalgaboyunda tayin edilmiştir. Hareketli faz olarak %95 metanol- %5 H₂O (H₂O: %0,05 trimetilamin içermektedir.) (çözücü A) ve tert-bütül metil eter (çözücü B) çözücülerini

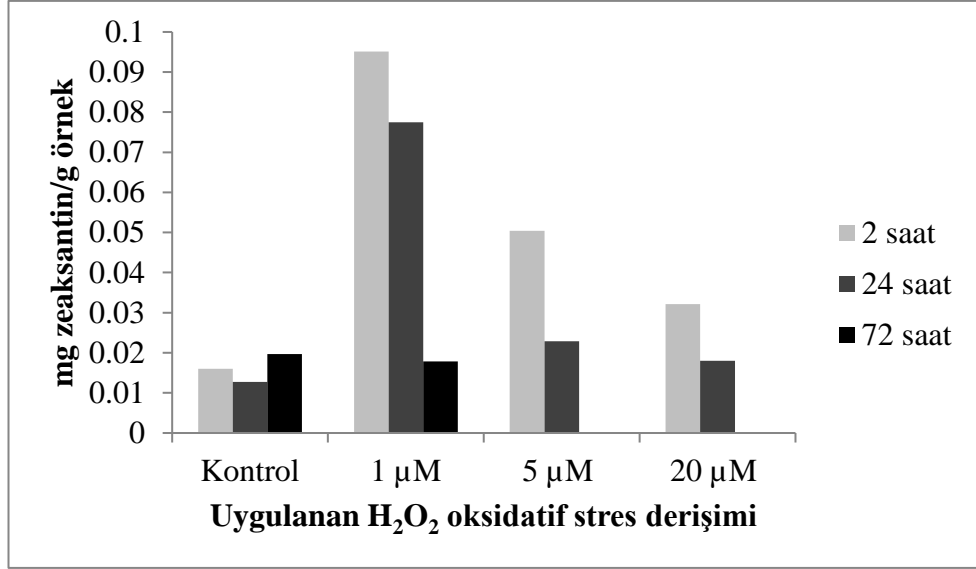
kullanılmıştır. Standart bileşiklerden oluşturulan belirli derişimdeki (10 mg/L) karışıma HPLC-DAD cihazında gradient çözücü programı uygulanarak analiz edilmiştir (Şekil 4.1.). HPLC-DAD yönteminin doğrusallığı 0,25-10 mg/L derişim aralığında karotenoidlerin tayini için araştırılmıştır. Farklı karotenoid bileşikleri kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiklerinden her biri için regresyon katsayıları elde edilmiştir. Çizelge 4.5’de görüldüğü gibi *C.reinhardtii* mikroalginde bulunan bazı karotenoidlerin (Lutein, β -karoten, α -karoten, zeaksantin, neoksantin) tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) değerleri hesaplandı. Bu yöntemle oluşturulan kromatogramda farklı karotenoid piklerinin en az % 96,89 oranında saf olarak ayrıldığı görülmektedir. Elde edilen bu değerler karotenoid bileşiklerinin HPLC-DAD metodu ile ayırımının başarılı olduğunu göstermiştir. Daha sonra farklı oksidatif stres ortamlarında üretilen *C.reinhardtii* mikroalginde bulunan karotenoidlerin uygun ekstraksiyon koşulları sağlanarak analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.2.-5.6.’de karotenoid miktarlarının H_2O_2 derişimi ve zamana bağlı değişimi gösterilmiştir. Mikroalge oksidatif stres olarak uygulanan H_2O_2 miktarı inkübasyon süresi aynıyken arttırıldığında karotenoid miktarı azalmaktadır. Fakat bu miktarların mikroalgin oksidasyona uğramamış halindeki karotenoid derişiminden daha yüksek olduğu görülmektedir. H_2O_2 miktarı sabitken ise karotenoid miktarlarındaki sıralama 2>24>72 saat olduğu tespit edilmiştir. Burada 72 süreyle inkübasyona bırakılan karotenoid miktarı en fazla 2. Saatte olduğu görülmüştür. H_2O_2 , toksik hücre metaboliti olmasının yanı sıra oksidatif strese karşı hücre savunma mekanizmasına uyarıcı etkisi olan sinyal verici bir moleküldür (Chang ve ark.2013). Normal koşullarda hücre ortamında μM seviyesinde H_2O_2 , 12 saatte parçalanmaktadır (Koman ve ark. 2015). Buna göre mikroalgde bulunan antioksidan savunma mekanizmasında devreye girmesiyle karotenoid miktarları artmaktadır. 72 saatten sonra hücre yıkımı başlaması nedeniyle de karotenoid miktarlarında azalmalar gözlenmektedir.



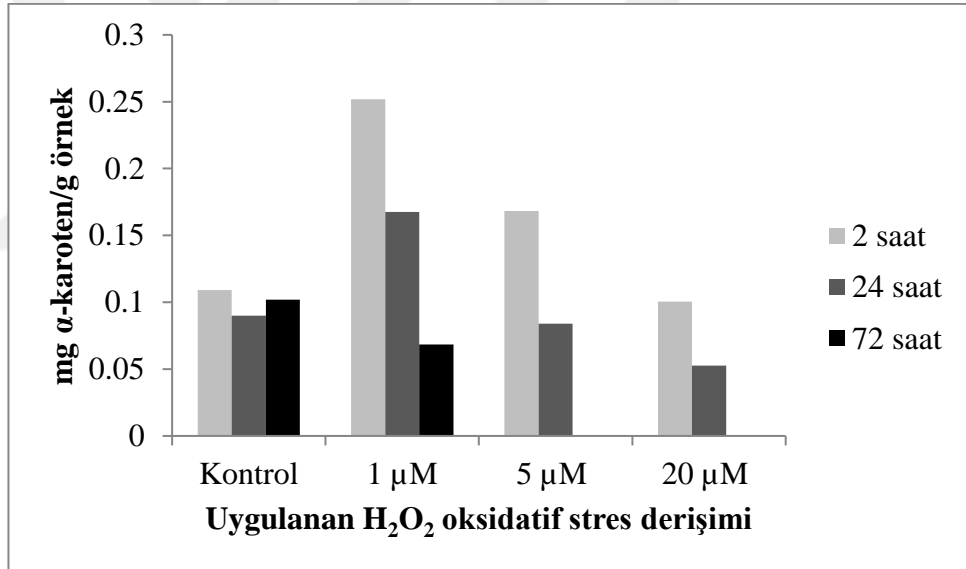
Şekil 5.2. *C. reinhardtii* mikroalginde bulunan neoksantin miktarlarına H_2O_2 etkisi



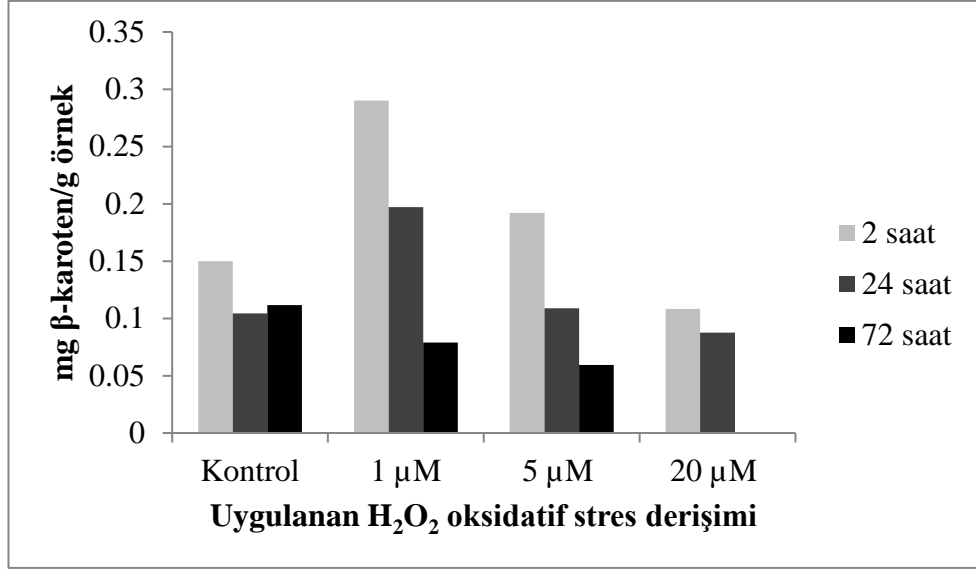
Şekil 5.3. *C. reinhardtii* mikroalginde bulunan lutein miktarlarına H_2O_2 etkisi



şekil 5.4. *C. reinhardtii* mikroalginde bulunan zeaxantin miktarlarına H_2O_2 etkisi

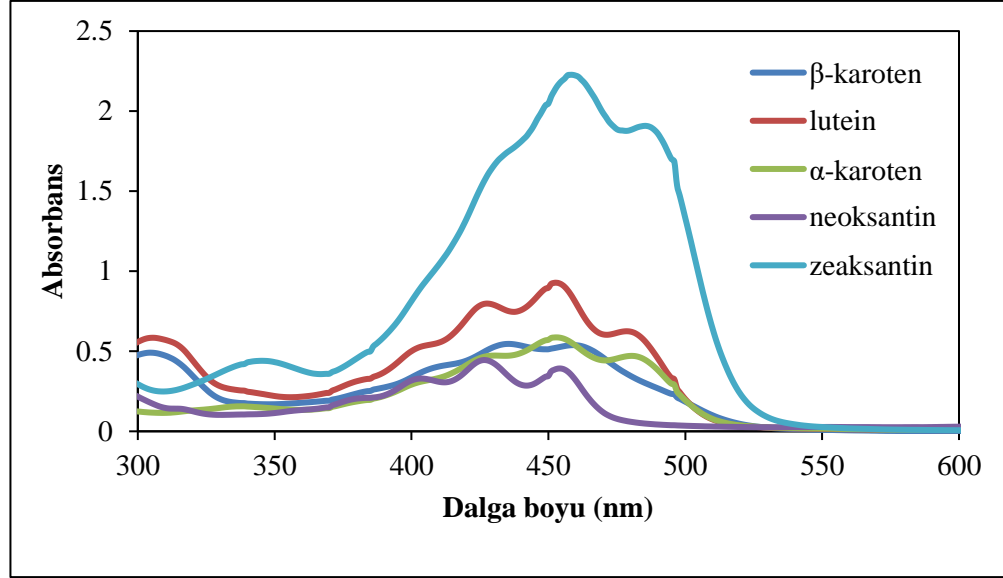


şekil 5.5. *C. reinhardtii* mikroalginde bulunan α -karoten miktarlarına H_2O_2 etkisi



şekil 5.6. *C. reinhardtii* mikroalginde bulunan β -karoten miktarlarına H₂O₂ etkisi

Yapılan spektroskopik ve kromatografik çalışmalar kemometrik çalışmayla da desteklenmiştir. Özellikle kantitatif tayinlerde, üst üste çakışan spektrumların ya da kromatogram piklerinin bulunması durumunda çok değişkenli kalibrasyon teknikleri ile karışım içindeki bileşenlerin miktarı tahmin edilebilmektedir. Yaptığımız bu çalışmada karışım halindeki şekil 5.7.’deki karotenoid bileşiklerinin ve örnekte bulunan karotenoid bileşenlerini ayırma işlemi gerekmeden çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS) ve temel bileşen regresyonu (PCR) kullanılarak içeriğindeki karotenoid miktarları tahmin edilmiştir. Bunun için öncelikle çok değişkenli kalibrasyon tekniğine göre 5 tane standart karotenoid bileşiklerinden farklı konsantrasyonlarını içeren kalibrasyon ve validasyon setlerinde bulunan 25 adet çözeltinin HPLC kromatogramları alınmıştır. PLS ve PCR algoritmalarında karışım içinde bulunan maddelerin kantitatif tayini için optimum bileşen sayısı değeri hesaplandı. Elde edilen kromatografik veriler, ön işlem teknikleri ile analize hazırlandıktan sonra PLS ve PCR analizleri ile her bir çözeltide bulunan karotenoid miktarları bulunmuştur (izelge 4.7.-4.8.). Her bir karotenoid için % hata değerleri hesaplanmıştır. Tahmini konsantrasyonlar için % hata değerlerine bakıldığında kalibrasyon seti için PLS hata değerleri PCR hata değerlerinden daha düşük bulunmuştur.



Şekil 5.7. Yapılan bu araştırmada örnekte bulunan karotenoidlerin UV-VIS spektrumu

PLS ve PCR sonuçlarının geçerliliği iki validasyon seti (I. validasyon ve II. Validasyon seti) hazırlanarak kontrol edilmiştir. Bilinen konsantrasyonlarda hazırlanan 25 adet karotenoid çözeltilisinin absorbans değerleri kullanılarak PLS ve PCR kalibrasyon modeline uygulandı ve her iki validasyon set için gerçek değerden sapmayı gösteren hata değerleri hesaplanmıştır. Test 1 ve test 2'nin hata değerleri karşılaştırıldığında test 1'hatalarının daha az olduğu görülmüştür. Buna göre başarılı bir kemometrik tayin yapabilmek için korelasyon katsayısı 1 olan test kullanılmalıdır. Ayrıca test setler için PLS hata değerleri PCR hata değerlerine göre daha düşüktür. Elde edilen sonuçlara göre; mikroalglerde bulunan karotenoidlerin miktar tayinlerinin kemometrik yöntemlerle belirlenmesinde en uygun metod PLS metodudur.

Son zamanlarda yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında mikroalglerde antioksidan içeriğini arttırabilmek için ışık, pH ve besin stresi gibi oksidatif strese neden olan faktörlerin karotenoidler üzerindeki etkisi incelenmektedir ve alglere oksidatif stres uygulandığında hücre büyüme profilleri, klorofil tayinleri (spektroskopik), yağ içerik tayinleri (spektroskopik), spektroskopik toplam karotenoid tayinleri yapılmıştır. Fakat; oksidatif stres uygulandığında kromatografik ve kemometrik olarak karotenoid tayini yapılmamıştır. Biz de bu çalışmada farklı oksidatif stres koşullarında mikroalglerdeki karotenoidlerin üzerine etkisi spektroskopik ve kromatografik olarak incelenmiştir ve çok sayıda deney yapmadan kemometrik yöntemlede karotenoid miktarlarının tahmin

edilebildiği ortaya konulmuştur. Ayrıca mikroalge oksidatif stres uygulayarak istenen karotenoid bileşinin daha çok sentezlenmesinin sağlanabileceği görülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abd El Baky, H.H., El-Baroty, G.S. 2013.** Healthy Benefit of Microalgal Bioactive Substances. *Journal of Aquatic Science*, 1(1): 11-23.
- Abe, K., Hattori, H., Hirano, M. 2007.** Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. *Food Chemistry*, 100(2):656-661.
- Akın, O. 2005.** *Haematococcus pluvialis* mikroalginden astaksantin ekstraksiyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İzmir.
- Aksan, E. 2005.** Çeşitli mayalardan karotenoidlerin elde edilmesi ve sucukta renklendirici olarak kullanım olanaklarının araştırılması. *Doktora Tezi*, ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.
- Aktar, S., Cebe, G.,E. 2010.** General spesifications, using areas of algae and their importance on pharmacy. *Ankara J. Fac. Pharm*, 39(3): 237-264.
- Aral, H. 2013.** Farklı polaritelere sahip amid-silika kolon dolgu materyallerinin sentezi ve HPLC ile çeşitli polar bileşiklerin ayrılmasında kullanılması. *Doktora Tezi*, DÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Diyarbakır.
- Arvela, P.M., Hachemi, I. Murzin, D. Yu. 2014.** Comparative study of the extraction methods for recovery of carotenoids fromalgae: extraction kinetics and effect of different extraction parameters. *J Chem Technol Biotechnol*, 89: 1607–1626.
- Ata, M.Y. 2013.** Mikroorganizmalarda pigment üretimi ve eczacılıkta kullanımı. *Bitirme Ödevi*, ERÜ, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kayseri.
- Becker, E.W. 2007.** Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25: 207–210.
- Bennett, J.M. 2012.** Effects of light and iron on growth and physiology of a polar diatom, *Fragilariopsis cylindrus*. *Master of Science*, The University of Charleston, Marine Biology, South Carolina.
- Brereton, R. G., 2003.** Chemometrics data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 489 pp.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H.P. 2004.** Carotenoids; Handbook Springer.
- Brown, M.R., Garland, C.D., Jeffrey, S.W., Jameson, I.D., Leroi, J.M. 1993.** The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*, 5: 285-296.
- Buszewski, B., Jezierska, M., Welniak, M., Kaliszan, R. 1999.** Comparative study of retentio behavior and selectivity. *Journal of Chromatography A*, 845:433-445.

- Butnariu, M. 2016.** Methods of analysis (extraction, separation, identification and quantification) of carotenoids from natural products. *J Ecosys Ecograph*, 6: 2157-7625.
- Careri, M., Furlattini, L., Mangia, A., Musci, M., Anklam, E., Theobald, A., Holst, C. 2001.** Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach. *Journal of Chromatography A*, 912: 61–71.
- Cazzonelli, C.I. 2011.** Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*, 38: 833–847.
- Cha, K.H., Koo, S.Y., Lee, D. 2008.** Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 10521–10526.
- Chang, H.L., Kang, C.Y., Lee, T.M. 2013.** Hydrogen peroxide production protects *Chlamydomonas reinhardtii* against light-induced cell death by preventing singlet oxygen accumulation through enhanced carotenoid synthesis. *Journal of Plant Physiology*, 170: 976–986.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneri, P. 2013.** Functional properties of carotenoids originating from algae. *Sci Food Agric*, 93: 5–11.
- Christin, C., Smilde, A. K., Hoefsloot, H. C. J., Suits, F., Bischoff, R., Horvatovich, P. L. 2008.** Optimized time alignment algorithm for LC-MS data: correlation optimized warping using component detection algorithm-selected mass chromatograms. *Analytical Chemistry*, 80: 7012–7021.
- Cordero, B.F., Couso, I., León, R., Rodríguez, H., Vargas, M.Á. 2011.** Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91: 341–351.
- Cuaresma, M., Garbayo, I., Vega, J.M., Vilchez, C. 2006.** Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 158–162.
- Çakmak, Z.E., Ölmez, T.T., Çakmak, T., Menemen, Y., Tekinay, T. 2015.** Antioxidant response of *Chlamydomonas reinhardtii* grown under different element regimes. *Phycological Research*, 63: 202–211.
- Çelikel, N., Kımık, Ö., Gönç, S., Kavas, G. 2006.** Mikroalglerin gıdalarda renk verici madde (pigment) kaynağı olarak kullanımı. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- Duan, E. 2013.** Bazı deniz makroalglerinden (*Ulva sp.*, *Cystoseira sp.* ve *Corallina sp.*) fermente sıvı organik gübre üretimi ve taze fasülye (*Phaseolus vulgaris*) verimine etkisinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, GÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Giresun.

- Dufosse', L., Galaup P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C., Ravishankar, G.A. 2005.** Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 389–406.
- Durmaz, Y. 2006.** Azot kaynakları ve konsantrasyonlarının *Nannochloropsis oculata* (Droop, 1955) (Eustigmatophyceae)'nin büyüme ve pigment kompozisyonuna etkisi. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23(3-4): 295–299.
- Ebenezer, V., Medlin, L.K., Ki, J.S. 2012.** Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. *Mar Biotechnol*, 14: 129–142.
- Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G. 1997.** New trends in photobiology (invited review) the carotenoids as anti-oxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41: 189-200.
- Ejike, C.E.C.C., Collins, S.A., Balasuriya, N., Swanson, A.K., Mason, B., Udenigwe, C.C. 2017.** Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. *Trends in Food Science & Technology*, 59: 30-36.
- El-Bahr, S.M. 2013.** Biochemistry of free radicals and oxidative stres. *Science International*, 111-117.
- Erdoğan, A., Çağır, A., Dalay, M.C., Eroğlu, A.E. 2015.** Composition of carotenoids in *Scenedesmus protuberans*: application of chromatographic and spectroscopic methods. *Food Anal. Methods*, 8: 1970–1978.
- Gasparovic, A.C., Lovakovic, T., Zarkovic, N. 2010.** Oxidative stress and antioxidants: biological response modifiers of oxidative homeostasis in cancer. *Period biol*, 112: 433–439.
- Goiris, K., Colen, W.V., Wilches, I., León-Tamariz, F., Cooman, L., Muylaert, K. 2015.** Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research*, 7: 51–57.
- Gökbulut, A., Şarar, E. 2008.** Karotenoitler ve sağlık. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 37(3): 235 – 256.
- Grobbelaar, J.U., 2004.** Algal Nutrition: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology, Ed.: Richmond, A., Australia, pp: 97-115.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M., Malcata, F.X. 2011.** Microalgae as sources of carotenoids. *Mar. Drugs*, 9: 625-644.
- Hamed, I. 2016.** The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5.
- Hofmann,T., Tálos-Nebehaj, E., Albert, L., Németh, L. 2017.** Antioxidant efficiency of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark polyphenols assessed by chemometric methods. *Industrial Crops & Products*, 108: 26-35.

Khalil, Z., Asker, M.M., El-Sayed, S., Kobbia, I.A. 2010. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World J Microbiol Biotechnol*, 26: 1225–1231.

Kim, G., Mujtaba, G., Lee, K. 2016. Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production. *The Korean Society of Phycology*, 31: 257-266.

Kim, S.W., Ahn, M.S., Kwon, Y.K., Song, S.Y. 2015. Monthly metabolic changes and PLS prediction of carotenoid content of citrus fruit by combined Fourier transform infrared spectroscopy and quantitative HPLC analysis. *Plant Biotechnol Rep.*, 9:247-258.

Koman, V.B., Santschi, C., Moos, N. R., Slaveykova, V.I., Martin, O.J.F. 2015. Portable oxidative stress sensor: dynamic and non-invasive measurements of extracellular H₂O₂ released by algae. *Biosensors and Bioelectronics*, 68: 245–252.

Koo, S.Y., Cha, K.H., Song, D.G., Chung, D., Pan, C.H. 2012. Optimization of pressurized liquid extraction of zeaxanthin from *Chlorella ellipsoidea*. *J Appl Phycol*, 24: 725–730.

Ligor, M., Kovacova, J., Gadzala-Kopciuch, R.M., Studzinska, S., Bocian, S., Lehotay, J., Buszewski, B. 2014. Study of RP HPLC retention behaviours in analysis of carotenoids. *Chromatographia*, 77:1047-1057.

Liu, W., Au, D.W.T., Anderson, D.M., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S. 2007. Effects of nutrients, salinity, pH and light:dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 346: 76–86.

Macías-Sánchez, M.D., Fernandez-Sevilla, J.M., Ación Fernández, F.G., Cerón García, M.C., Grima, M.E. 2010. Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chemistry*, 123(3): 928–935.

Maurer, M.M., Mein, J.R., Chaudhuri, S.K., Constant, K.H. 2014. An improved UHPLC-UV method for separation and quantification of carotenoids in vegetable crops. *Food Chemistry*, 165: 475–482.

Melendez-Martinez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M., Heredia, F.J. 2005. Color and carotenoid profile of Spanish Valencia late ultrafrozen orange juices. *Food Research International*, 38:931-936.

Melendez-Martinez, A.J., Stinco, C.M., Liu, C., Wang, X.D. 2013. A simple HPLC method for the comprehensive analysis of cis/trans (Z/E) geometrical isomers of carotenoids for nutritional studies. *Food Chemistry*, 138: 1341–1350.

Mitrowska, K., Vincent, U., Von Holst, C. 2012. Separation and quantification of 15 carotenoids by reversed phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection with isoestic wavelength approach. *Journal of Chromatography A*, 1233:44-53.

- Nenninger, K. 2009.** https://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2009/C_reinhardtii.html.
- Noori, S. 2012.** An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Scientific Reports*, 1: 8.
- Olasehinde, T.A., Olaniran, A.O., Okoh, A.I. 2017.** Therapeutic potentials of microalgae in the treatment of alzheimer's disease. *Molecules*, 22: 480.
- Özdemir, N., Erkmen, J. 2013.** Yenilenebilir biyoplastik üretiminde algerin kullanımı. *The Black Sea Journal of Sciences*, 3(8): 89-104.
- Pisal, D.S., Lele, S.S. 2004.** Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4: 476-483.
- Pupin, A.M., Dennis, M.J., Toledo, M.C.F. 1999.** HPLC analysis of carotenoids in orange juice. *Food Chemistry*, 64: 269-275.
- Puyana, M.C., Herrero, M., Urreta, I., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Alvarez, S.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. *Anal Bioanal Chem*, 405: 4607-4616.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. 2014.** Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*, Article ID 761264.
- Rao, A.V., Rao, L.G. 2007.** Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55: 207-216.
- Rivera, S., Vilaró, F., Canela, R. 2011.** Determination of carotenoids by liquid chromatography/mass spectrometry: effect of several dopants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(5): 1339-1346.
- Rochaix, J.D. 1995.** *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu. Rev. Genet.*, 29: 209-230.
- Rodrigues, D.B., Flores, É.M.M., Barin, J.S., Mercadante, A.Z., Lopes, E.J., Zepka, L. 2014.** Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, 65: 144-148.
- Rodriguez, R.P., Borroto, Y.S., Espinosa, E.A.M., Verhelst, S. 2017.** Assessment of diesel engine performance when fueled with biodiesel from algae and microalgae: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69: 833-842.
- Sahin, S., Demir, C. 2016.** Determination of antioxidant properties of fruit juice by partial least squares and principal component regression. *International Journal of Food Properties*, 19: 1455-1464.
- Sander, L.C., Sharpless, K.E., Pursch, M. 2000.** C30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 880:189-202.

- Sarıkürkcü, C., Uren, M.C., Tepe, B., Cengiz, M., Kocak, M.S. 2015.** *Phlomis armeniaca*: Phenolic compounds, enzyme inhibitory and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 78: 95–101.
- Siaut, M., Heijde, M., Mangogna, M., Montsant, A., Coesel, S., Allen, A., Manfredonia, A., Falciatore, A., Bowler, C. 2007.** Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornutum*. *Gene*, 406: 23–35.
- Sirisha, V.L., Sinha, M., D’Souza, J.S. 2014.** Menadione-induced caspase-dependent programmed cell death in the green *Chlorophyte Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Phycol.*, 50: 587–601.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006.** Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101: 87-96.
- Sukatari, A., 2002.** Alg Kültür Yöntemleri. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Bornova, İzmir, 168.
- Sukenik, A. 1991.** Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Bioresource Technol.*, 35(3): 263-269.
- Taylor, K.L., Brackenridge, A.E., a, Vivier, M.A., Oberholster, A. 2006.** High-performance liquid chromatography profiling of the major carotenoids in *Arabidopsis thaliana* leaf tissue. *Journal of Chromatography A*, 1121: 83–91.
- Tran, N.P., Park, J.K., Kim, Z.H., Lee, C.G. 2009.** Influence of sodium orthovanadate on the production of astaxanthin from green algae *Haematococcus lacustris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14: 322-329.
- Türkcan, O., Ökmen, G. 2012.** Mikrobiyal karotenoidler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(1): 115-122.
- Uslu, L. 2011.** Besleyici element kompozisyonundaki değişikliklerin mikroalgelerde yağ içeriğine etkisi. *Doktora Tezi*, ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı, Adana.
- Van Breeman, R.B. 1996.** Peer reviewed: innovations in carotenoid analysis using LC/MS. LC/MS can be used to determine thermally labile carotenoids such as lutein and β -carotene. *Analytical Chemistry*, 68(9): 299-304.
- Van Norderkassel A. M., Daszykowski, M., Massart, D. L., Vander Heyden, Y. 2005.** Prediction of total green tea antioxidant capacity from chromatograms by multivariate modeling. *Journal of Chromatography A*, 1096: 177–186.
- Varela, C.O., Pereira, H., Vila, M., Leon, R. 2015.** Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. *Photosynth Res.*
- Vargas, F.D., Jiménez, A.R., López, O.P. 2000.** Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains- characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3): 173–289.

Von Elbe, J.H., Schwartz, S.J. 1996. Colorants: Food Chemistry, Ed.: Fennema, O.R., New York, USA, pp: 651-765.

Warburg, O., 1919. Über die Geschwindigkeit der Kohlensäurezusammensetzung in lebenden Zellen. *Biochemische Zeitschrift*, 100: 230–270.

Williams, P.J.le B., Laurens, L.M.L. 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy Environ. Sci.*, 3: 554–590.

Yafeai, A.A., Angelik, M., Böhm, V. 2018. Characterization of carotenoids and vitamin e in *R. Rugosa* and *R. Canina*: comparative analysis. *Food Chemistry*, 242: 435-442.

Yang, C., Zhou, J., Liu, S., Fan, P., Wang, W., Xia, C. 2013. Allelochemical induces growth and photosynthesis inhibition, oxidative damage in marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 444: 16–23.

Ye, V.M., Bhatia, S.K. 2012. Metabolic engineering strategies for the production of beneficial carotenoids in plants. *Food Sci. Biotechnol.*, 21: 1511-1517.

Yılmaz, H.K. 2006. Mikroalg üretimi için fotobiyoreaktör tasarımları. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23(1/2): 327-332.

Yılmaz, İ. 2010. Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(2): 143-153.

Zheng, X., Hu, Y., Anggreani, E., Lu, X. 2017. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of blueberries using fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy and raman spectroscopy. *Food Measure*, 11: 1909–1918.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Çiğdem YÜKSEL

Doğum yeri ve tarihi : BURSA/ 17 Haziran 1991

Yabancı dili : İngilizce

Eğitim durumu (Kurum ve Yılı)

Lise : Bursa Osmangazi Cem Sultan Lisesi (2009)

Lisans : UÜ. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

Yüksek Lisans :

Çalıştığı Kurum /Kurumlar ve Yıl : Bursa Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı (2017-..)

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

Yayınları* : “*Chlamydomonas Reinhardtii* Mikroalginde Bulunan Karotenoid Bileşiklerinin HPLC-DAD Cihazı ile Tayini İçin Metot Geliştirilmesi” XIV. Ulusal Spektroskopi Kongresi (Poster/Elazığ/29-31 Mayıs 2015).