

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AFYONKARAHİSAR İLİ JEOTERMAL SU
KAYNAKLARINDAN İZOLE EDİLEN MİKROALGAL TÜRLER
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Biyomüh. Merve ŞENSOY

**Farmakognozi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2019

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AFYONKARAHİSAR İLİ JEOTERMAL SU
KAYNAKLARINDAN İZOLE EDİLEN MİKROALGAL TÜRLER
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Biyomüh. Merve ŞENSOY

**Farmakognozi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU**

ANKARA

2019

**AFYONKARAHİSAR İLİ JEOTERMAL SU KAYNAKLARINDAN İZOLE
EDİLEN MİKROALGAL TÜRLER ÜERİNDE FARMAKOGNOZİK
ARAŞTIRMALAR**

Öğrenci: Biyomüh. Merve ŞENSOY

Danışman: Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU

Bu tez çalışması 03/07/2019 tarihinde, jürimiz tarafından “Farmakognozi Yüksek Lisans Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. A. Ahmet BAŞARAN*

(Hacettepe Üniversitesi)



Tez danışmanı: *Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU*

(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: *Prof. Dr. Zeliha Ş. AKDEMİR*

(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: *Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL*

(Ankara Üniversitesi)



Üye: *Doç. Dr. Didem ŞÖHRETOĞLU*

(Hacettepe Üniversitesi)



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

26 Temmuz 2019



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- x Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

27/06/2019

MERVE ŞENSOY

i"“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

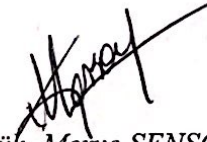
(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir * Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.


Biyomüh. Merve ŞENSOY

TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimleriyle tez çalışmam boyunca bana ilham veren, sevgi ve sabrını benden hiç esirgemeyen, cesaretim her kırıldığında beni yeniden güçlendiren ve desteğini her an hissettiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU'na,

Çalışmalarım boyunca Farmakognozi Anabilim Dalı'nın tüm imkânlarından yararlanmamı sağlayan anabilim dalı başkanlarımız Sayın Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU, Sayın Prof. Dr. Arif Ahmet BAŞARAN ve şuan ki anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Funda Nuray YALÇIN'a,

Tez çalışmam için siyanobakterilerin izole edilmesi, tayini ve kültivasyonu ile fikosiyaninlerin saflaştırılmasında yardımcı olan ve laboratuvar ortamlarından yararlanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Meltem CONK DALAY ve Sayın Zeliha DEMİREL'e (Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, İzmir),

Elde ettiğim hekzan ekstrelerinde UPC² sistemi ile β -karoten miktar tayini yapılmasını sağlayan Sayın Prof. Dr. Neşe KIRIMER, Sayın Doç. Dr. Fatih GÖGER (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eskişehir) ve Sayın Uzm. Bio. Süleyman YUR'a (AUBİBAM, Eskişehir),

Tez çalışmalarımın her safhasında bana destek olan ve deneyimlerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Dr. Ecz. Zeynep DOĞAN ile birlikte motivasyonumun artmasında büyük katkıları olan Farmakognozi Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine ve öğretim elemanı arkadaşlarıma,

Bu süreçte manevi desteklerini her an hissettiren, tez çalışmalarımın İzmir ve Ankara ayağında evim ve ailem olan dostlarım Damla ÇİÇEK KARADAĞ ve Duygu ACIÖZ ile KARŞI ve ACIÖZ ailelerinin her bir ferdine,

Tükenmek bilmeyen sabırları, sevgileri, bana olan inançları için günüşiğim anneme, inancımın kaynağı babama ve gözümün nuru kardeşime teşekkür ederim.

Biyomüh. Merve ŞENSOY

ÖZET

Şensoy, M., Afyonkarahisar İli Jeotermal Kaynaklarından İzole Edilen Mikroalgal Türler Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019.

Mikroalgler evrendeki en eski yaşam formlarından biridir. Mikroalg kaynaklı bileşikler antioksidan, antikanser, antienflamatuvar, antiobezite, antianjiyogenik, anti HIV, antiviral, antiparazitik, antimikrobiyal, nöroprotektif, antifungal ve enzim inhibisyon etkileri gösterir. Mikroalglerin bir sınıfı olan siyanobakteriler ise yeni, biyolojik olarak aktif bileşiklerin keşfi için oldukça önemli olan organizma gruplarından biridir. Tez çalışmamızda, Afyonkarahisar ilinin üç farklı bölgesindeki jeotermal su kaynaklarından dört siyanobakterinin izolasyonu yapılmış ve 16S ribozomal RNA analizi ile tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen türlerin *Geitlerinema*, *Oscillatoria* ve *Leptolyngbya* cinslerine ait olduğu saptanmıştır. Kültür yöntemi ile çoğaltılan biyokütlelerin karotenoit profillerini belirlemek, antioksidan ve sitotoksik etkilerini araştırmak için hekzan ekstraktları elde edilmiştir. Kuru biyokütlelerin sulu ekstraktlarından C-fikosiyanin saflaştırılmış, antioksidan ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Karotenoitler ve C-fikosiyaninlerin antioksidan kapasitelerinin tayini DPPH ve ABTS radikali süpürücü etkinlikleri test edilerek gerçekleştirilmiştir. Sitotoksik etkileri ise HeLa kanser hücre serisi ve L929 sağlıklı hücre serisi üzerinde MTT metodu kullanılarak tayin edilmiştir. İzole edilen dört siyanobakteri türünden *Leptolyngbya* sp. (a), en yüksek miktarda β -karoten ve C-fikosiyanin içeriğine sahiptir ve karotenoitlerinin DPPH radikalini süpürme etkinliği ile bu türden elde edilen C-fikosiyaninin ABTS radikalini süpürme etkinliği diğer türlerden daha yüksek bulunmuştur. Dört türün karotenoitleri ve C-fikosiyaninleri L929 sağlıklı hücrelerine ve HeLa kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermemiştir. Elde edilen sonuçlar, dünyada biyoteknolojik ve ticari uygulamalarda en önde gelen *Spirulina* siyanobakterisi ile yapılan benzer çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Tez çalışmamız dünyada sağlık, gıda ve kozmetik gibi endüstrilerde yaygın olarak kullanılan *Spirulina* türlerine içeriğindeki karotenoitler ve fikosiyanin ile alternatif olabilecek yerli türlerin tespiti, içerdikleri bileşiklerin biyoaktivitelerinin ortaya koyulması bakımından önemli bir çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: *Leptolyngbya* sp., siyanobakteri, karotenoit, C-fikosiyanin, UPC².

ABSTRACT

Sensoy, M., Pharmacognosic Researches on Isolated Microalgal Species from Geothermal Springs of Afyonkarahisar Province, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Pharmacognosy Programme Master of Science Thesis, Ankara, 2019. Microalgae are one of the oldest life forms in the universe. Microalgae based compounds show antioxidant, anticancer, antiinflammatory, antiobesity, antiangiogenic, anti HIV, antiviral, antiparasitic, antimicrobial, neuroprotective, antifungal and enzyme inhibitory effects. Cyanobacteria, which is a class of microalgae, are one of the important group of organisms for the discovery of biologically active new compounds. In our thesis work, four cyanobacteriae were isolated from three different geothermal springs of Afyonkarahisar province and they were identified with 16S ribosomal RNA analysis. It was found that isolated species are *Geitlerinema* sp., *Oscillatoria* sp., *Leptolyngbya* sp. (a) and *Leptolyngbya* sp. (b). Cyanobacteriae were cultured and hexane extracts were used to determine of their carotenoid profiles as well as antioxidant and cytotoxic effects. C-phycoyanins were purified from aqueous extracts of four dry cyanobacteria masses and their antioxidant and cytotoxic effects were determined. For determining antioxidant effects, DPPH and ABTS radical scavenging methods were used. MTT method was used to determine cytotoxic effect against to HeLa cancer cell and L929 healthy cell lines. Isolated *Leptolyngbya* sp. (a) shows higher content of β -carotene and C-phycoyanin; besides carotenoids and C-phycoyanin's of this cyanobacteria show higher capacity to scavenge DPPH and ABTS radicals among other isolated species. Cytotoxic effect results show neither carotenoids nor C-phycoyanins posses significant cytotoxic effect to HeLa and L929 cell lines. Results were compared with the similar researches on *Spirulina* species which is leading cyanobacteria for biotechnologic and commercial applications all over the world. Our thesis work is an important study in terms of determination of native species, that can be alternative to *Spirulina* which is widely used in industries such as health, food and cosmetics in the world, with their carotenoid and phycoyanin content and revealing bioactivity of their compounds.

Keywords: *Leptolyngbya* sp., cyanobacteria, carotenoid, C-phycoyanin, UPC².

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Siyanobakteriler	3
2.1.1. <i>Spirulina</i> sp.	6
2.1.2. <i>Geitlerinema</i> sp.	7
2.1.3. <i>Oscillatoria</i> sp.	8
2.1.4. <i>Leptolyngbya</i> sp.	10
2.2. Algal Pigmentler	12
2.2.1. Klorofiller	13
2.2.2. Karotenoitler	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Gereçler	25
3.1.1. Mikroalg İzolasyon ve Kültür Çalışmalarında Kullanılan Aletler	25
3.1.2. Kimyasal Çalışmalarda Kullanılan Aletler	25
3.1.3. Biyolojik Etki Çalışmalarında Kullanılan Aletler	26
3.2. Yöntemler	27
3.2.1. Su Örnekleri Alınması	27
3.2.2. Su Örnekleri Analizi	27
3.2.3. Mikroalg İzolasyon Çalışmaları	27
3.2.4. Mikroalg Tanımlama Çalışması	28

3.2.5.	Mikroalg Üretim Çalışmaları	30
3.2.6.	Karotenoit Ekstraksiyon Çalışmaları	32
3.2.7.	Hekzan Ekstrelerinin Karotenoit Profillerinin İnce Tabaka Kromatografisi ile Analizi	34
3.2.8.	Hekzan Ekstrelerinin Karotenoit Profillerinin HPLC ile Analizi	35
3.2.9.	UPC ² ile Hekzan Ekstrelerinde β -Karoten Miktar Tayini	35
3.2.10.	Kuru Siyanobakteri Biyokütlelerinde β -Karoten Miktar Tayini	36
3.2.11.	C- Fikosiyanin Elde Edilmesi için Sulu Ekstrelerin Hazırlanması ve C-Fikosiyaninin Saflaştırılması	40
3.2.12.	C- Fikosiyanin Saflık Tayini	43
3.2.13.	Biyolojik Etki Çalışmaları	43
4.	BULGULAR	47
4.1.	Mikroalg İzolasyon Çalışmalarına ait Bulgular	47
4.2.	Karotenoitlerin Elde Edilmesine ait Bulgular	47
4.3.	Karotenoitlerin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) Bulguları	48
4.4.	Karotenoitlerin HPLC-DAD Çalışmalarına Ait Bulgular	50
4.5.	UPC ² Çalışmaları ile β -Karoten Miktar Tayinine Ait Bulgular	55
4.6.	Kuru Siyanobakteri Biyokütlelerinde β -karoten Miktarına ait Bulgular	60
4.7.	C-Fikosiyanin Elde Edilmesine ait Bulgular	61
4.8.	Biyolojik Etki Çalışmalarına Ait Bulgular	64
4.8.1.	Karotenoitlerin DPPH Radikalini Süpürücü Etkinlik Bulguları	65
4.8.2.	Karotenoitlerin ABTS Radikalini Süpürücü Etkinlik Bulguları	67
4.8.3.	Karotenoitlerin Sitotoksik Etki Çalışmalarına ait Bulgular	67
4.8.4.	C-Fikosiyaninlerin DPPH Radikalini Süpürücü Etkinlik Bulguları	69
4.8.5.	C-Fikosiyaninlerin ABTS Radikalini Süpürücü Etkinlik Bulguları	69
4.8.6.	C-Fikosiyaninlerin Sitotoksik Etki Çalışmalarına ait Bulgular	70
5.	TARTIŞMA	71
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	79
7.	KAYNAKLAR	81
8.	EKLER	
	EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER ve KISALTMALAR

AA	Askorbik asit
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
Arg	Arginin
Asn	Asparajin
Asp	Aspartat
AU	Absorbance unit
BG11	Mavi-Yeşil Mikroalg Üretim Ortamı
BHA	3- <i>ters</i> -Butil-4-hidroksianizol
CH₃OH	Metanol
CO₂	Karbondioksit
Csy	Sistein
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EtOAc	Etil asetat
g	Gram
H₂O	Su
HeLa	İnsan Servikal Epidermoid Karsinoma
His	Histidin
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
IC₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration
Ile	İzolösin
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
L929	Fare Fibroblast
Lys	Lizin
mA	Miliamper
MEM	Minimum Essential Medium
MeOH	Metanol
Met	Metiyonin
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar

nm	Nanometre
PBS	Phosphate Buffered Saline
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Thr	Threonin
UPC²	Ultrapformance Convergence Chromatography
UV	Ultra-violet
V	Volt
Val	Valin
W	Watt

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Tez çalışmamızda izole edilen <i>Geitlerinema</i> türüne ait mikroskopik görüntüler.	7
2.2. Tez çalışmamızda izole edilen <i>Oscillatoria</i> türüne ait mikroskopik görüntüler.	9
2.3. Tez çalışmamızda izole edilen <i>Leptolyngbya</i> türlerine ait mikroskopik görüntüler.	11
2.4. Miksoksantofil kimyasal yapısı.	16
2.5. Ekinenon kimyasal yapısı.	16
2.6. β -karoten kimyasal yapısı.	17
2.7. Lutein kimyasal yapısı.	17
2.8. C-Fikosiyanin kimyasal yapısı.	20
3.1. İzole edilen siyanobakterilerin üretimi.	31
3.2. Karotenoit ekstraksiyon aşamaları.	39
3.3. C-Fikosiyanin elde etme aşamaları.	38
3.4. C-Fikosiyanin saflaştırma aşamaları.	39
3.5. Bradford protein tayin yöntemi.	40
4.1. Karotenoit karışımları ve standart bileşiklerin ince tabaka kromatogramı.	48
4.2. Karotenoit karışımları ve standart bileşiklerin ince tabaka kromatogramı (UV ₂₅₄ nm'deki görünümü).	49
4.3. Karotenoit karışımları ve standart bileşiklerin ince tabaka kromatogramı (UV ₃₆₆ nm'deki görünümü).	49
4.4. <i>Geitlerinema</i> sp. karotenoit karışımı ve standart bileşiklere ait HPLC kromatogramı.	51
4.5. β -Karoten standardı (A) ve <i>Geitlerinema</i> sp. karotenoit karışımının β -karoten piki'ne (B) ait UV spektrumları.	51
4.6. <i>Oscillatoria</i> sp. karotenoit karışımı ve standart bileşiklere ait HPLC kromatogramı.	52
4.7. Lutein standardı (A), <i>Oscillatoria</i> sp. karotenoit karışımı lutein piki (B), β -Karoten standardı (C) ve <i>Oscillatoria</i> sp. karotenoit karışımı β -karoten piki'ne ait UV spektrumları.	52

4.8. <i>Leptolyngbya</i> sp. (a) karotenoit karışımı ve standart bileşiklere ait HPLC kromatogramı.	53
4.9. Lutein standardı (A), <i>Leptolyngbya</i> sp. (a) karotenoit karışımı lutein piki (B), β -Karoten standardı (C) ve <i>Leptolyngbya</i> sp. (a) karotenoit karışımı β -karoten piki'ne ait UV spektrumları.	53
4.10. <i>Leptolyngbya</i> sp. (b) karotenoit karışımı ve standart bileşiklere ait HPLC kromatogramı.	54
4.11. Lutein standardı (A), <i>Leptolyngbya</i> sp. (b) karotenoit karışımı lutein piki (B), β -Karoten standardı (C), <i>Leptolyngbya</i> sp. (b) karotenoit karışımı β -karoten piki (D) UV spektrumları.	54
4.12. β -karoten standart bileşiğine ait UV spektrumu.	56
4.13. β -karoten standart bileşiğine ait UPC ² kromatogramı.	56
4.14. β -karoten kalibrasyon eğrisi.	57
4.15. <i>Geitlerinema</i> sp.'den elde edilen karotenoit karışımına ait UPC ² kromatogramı.	57
4.16. <i>Oscillatoria</i> sp.'den elde edilen karotenoit karışımına ait UPC ² kromatogramı.	58
4.17. <i>Leptolyngbya</i> sp. (a)'dan elde edilen karotenoit karışımına ait UPC ² kromatogramı.	58
4.18. <i>Leptolyngbya</i> sp. (b)'den elde edilen karotenoit karışımına ait UPC ² kromatogramı.	59
4.19. Siyanobakterilerden elde edilen karotenoit karışımlarında bulunan β -karoten miktarları.	60
4.20. Siyanobakterilerden elde edilen C-fikosiyeninlerin fraksiyonlarının SDS-PAGE jeli görüntüsü.	63
4.21. Siyanobakteri türlerinin C-fikosiyenin miktarları.	63
4.22. Karotenoit karışımlarının ve standart bileşiklerin biyootografik yöntem ile DPPH süpürücü etkinlik tayini görünümü.	65
4.23. Karotenoit karışımlarının DPPH radikalini süpürücü etkinlikleri.	66
4.24. Askorbik asitin DPPH radikalini süpürücü etkinliği.	66
4.25. Karotenoitlerin ABTS radikalini süpürücü etkinlik bulguları.	67
4.26. Karotenoit karışımlarının HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.	68
4.27. C-Fikosiyeninlerin ABTS radikalini süpürücü etkinlik bulguları.	69

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Siyanobakterilerde bulunan pigmentlerin spektral özellikleri.	5
2.2. Mikroalglerden elde edilen pigmentlerin ana kullanım alanları.	12
2.3. C-Fikosiyaninin antitümöral olarak kullanıldığı <i>in vitro</i> çalışmalar.	22
2.4. C-Fikosiyaninin antitümöral olarak kullanıldığı <i>in vivo</i> çalışmalar.	24
3.1. Mikroalg izolasyon çalışmalarında kullanılan BG11 kültür ortamı içeriği.	29
3.2. Mikroalg izolasyon çalışmalarında kullanılan Allen kültür ortamı içeriği.	30
3.3. UPC ² sisteminde kullanılan mobil faz gradienti.	36
3.4. SDS-PAGE sisteminde kullanılan jellerin içerikleri.	42
3.5. SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltilerin içerikleri.	43
4.1. Siyanobakteri türlerinden elde edilen karotenoit karışımlarının HPLC-DAD analizleri.	50
4.2. Siyanobakterilerden elde edilen karotenoit karışımlarında bulunan β -karoten miktarları.	59
4.3. Siyanobakteri kuru biyokütlelerinde bulunan β -karoten miktarları.	61
4.4. C-Fikosiyanin elde edilmesi için kullanılan kuru biyokütle miktarları ve kullanılan tampon hacimleri.	61
4.5. Diyaliz ve Sephadex G50 basamakları sonucu elde edilen C-fikosiyanin miktarları ve verimleri.	62
4.6. Siyanobakteri türlerinin C-fikosiyanin miktarları ve oranları.	62
5.1. Tez çalışmamızda izole edilen siyanobakteri türleri.	72
5.2. Siyanobakterilerin β -karoten miktarları.	74
5.3. İzole edilen siyanobakterilerin C-fikosiyanin miktar ve oranları.	76

1. GİRİŞ

Mikroalgler, deniz ve tatlı su sistemlerinde bulunan, boyutları 0.2-2.0 µm arasında değişen mikroskobik ve fotosentetik organizmalardır (1, 2). Prokaryot veya ökaryot olabilirler ve çoğunlukla tek hücrelidirler. Tek hücreler veya küçük koloniler halinde yaşarlar (2). Basit yapılarından dolayı hızla çoğalabilir ve zorlu çevresel koşullarda yaşayabilirler (1).

Mikroalgler proteinler, amino asitler, polisakkaritler, trigliseritler, yağ asitleri, vitaminler ve pigmentler gibi sağlık açısından önemi olan yararlı bileşikler içerir (2, 3). Bu yararlı bileşiklerin mikroalglerden elde edilmesinin avantajı, mikroalglerin minimum maliyetle sadece su ve atmosferik CO₂'i kullanarak üretiminin mümkün olmasıdır (2).

Mikroalg kaynaklı yararlı bileşiklerin antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar, antiobezite, antianjiyogenik, anti HIV, antiviral, antiparazitik, antimikrobiyal, nöroprotektif, antifungal ve enzim inhibisyon etkileri taşıdığı çeşitli araştırmalarda belirtilmiştir (2-5).

Araştırmalar tuzlu su mikroalglerinden elde edilmiş antioksidanların diyetle alınmasının, organizmaları kanser, diyabet, arterosikloz, damar hastalıkları, iskemik beyin gelişimi, metabolik sendromlar, gastorintestinal ve karaciğer rahatsızlıkları gibi kronik bozuklukların yanı sıra Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı koruduğunu ve aynı zamanda mikroalglerden elde edilen pigmentlerin immün sistemi uyarıcı (örneğin; antikör üretimini destekleyici) ve astım, ülser, artirite karşı antiinflamatuvar özellikleri olduğunu göstermiştir (1).

Mikroalgler dört sınıfa ayrılır:

1. Sarı-kahverengi algler (*Chromophytes*)
2. Yeşil algler (*Clorophytes*)
3. Kırmızı algler (*Rhodophytes*)
4. Mavi-yeşil algler (*Cyanophytes*)

Biyoteknolojik ve ticari uygulamalarda *Cyanophyceae* familyasına ait *Spirulina* mavi-yeşil algi (siyanobakterisi) kullanımı ile önde gelmektedir (2). Dünya çapındaki üretiminin 3000 ton kuru ağırlık/yıl olduğu tahmin edilen ve endüstriyel boyutta üretilen tek siyanobakteri türüdür ve aynı zamanda Japonya, Tayvan ve Meksika'da sağlıklı gıda olarak ticarileşmiştir (2, 3, 6).

Yeni araştırmalar doğal kaynaklardan ilaç olabilecek kimyasal bileşikler üzerine yoğunlaşmıştır. Siyanobakteriler yeni, biyolojik olarak aktif bileşiklerin keşfi için oldukça önemli olan organizma gruplarından biridir (5). Siyanobakteriler çevrelerindeki yüksek sıcaklık, yüksek pH ve znmemiş fosfor gibi ortam koşullarına uyum sağlamak için çeşitli sekonder metabolitleri üretir hale gelmiştir (4). Siyanobakteri gibi kültürü yapılabilen mikroorganizmaların avantajı, hedeflenen metabolitin üretilmesi için uygun ve sürdürülebilir kaynak olmalarıdır (5). Bu metabolitlerin, antioksidan, sitotoksik, antiviral, nöroprotektif, antienflamatuvar ve antiparazitik etkileri gibi etkilere sahip olduğu bilinmektedir (2-5).

Siyanobakterilerin sekonder metabolitler bakımından zengin olmaları ve birçok farklı kullanım uygulaması olan β -karoten ve C-fikosiyanin içeriğine sahip olmaları sebebiyle biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda rol almaları (4) alışmamızda siyanobakterileri ele almamızın nedenidir. Çalışmamızın amacı; Afyonkarahisar ilinin farklı jeotermal su kaynaklarından izole edilecek yerel siyanobakteri türlerinin kültürde çoğaltılarak, karotenoit ve C-fikosiyanin içeriklerinin tayin edilmesi, serbest radikal süpürücü ve sitotoksik etkilerinin araştırılması; bulguların, çok yaygın kullanımı olan *Spirulina* cinsi ile karşılaştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Siyanobakteriler

Siyanobakteriler, mavi-yeşil algler, dünya üzerinde bulunan en eski yaşam formlarındandır (4). Algler benzeyen oluşumları, bakteriofil yerine klorofil içermeleri, alglerde ve yüksek bitkilerde olduğu gibi fotosentetik oksijen üretiminde iki fotosistemli mekanizmayı kullanmaları nedeniyle mavi-yeşil algler olarak sınıflandırılmıştır (7). Siyanobakteriler özel rolleri olan fotosentetik pigmentler ve biyometabolitlerin geniş ve zengin kaynağı olan gram negatif ve adaptasyonu yüksek fotoototrofik prokaryotlardır (8). Klorofil a ve diğer yardımcı pigmentler aracılığı ile güneş ışığını enerjiye çeviren (7) ve azot fiksasyonu yapan (4) prokaryotik organizmalardır. Yaşam alanları göller, akarsular, havuzlar, atık sular, kaynak suları, nehirler gibi sulak alanlar olduğu gibi çöl toprağında bile bulunabilirler (4, 7). Çoğu akuatik çevrenin azot, karbon ve oksijen dinamiklerinde ana rol oynarlar. Çok geniş sıcaklık aralığında canlılıklarını sürdürebilseler de optimum büyüme için ılık sıcaklıkları tercih ederler. Genel olarak bazik koşulları tercih ederler. Bu koşullar altında inorganik karbonun çoğu ökaryotik alglerin kullanamayacağı karbonat formundadır. Siyanobakterilerin ise CO₂ ve bikarbonat için ayrı membran taşınım sistemi olan inorganik karbon konsantrasyon mekanizması vardır. Bazı siyanobakteriler yüksek tuz konsantrasyonlarına yüksek tolerans gösterir ve yüksek ozmolariteye sahip ortamlarda yaşar (7).

Yapısal çalışmalar, siyanobakterilerin prokaryotik olduğunu ortaya koymaktadır. Çekirdeğe ve diğer organellere sahip değildir ve gram-negatif bakterilerde tipik olan peptidoglikan hücre duvarı mevcuttur. Ayrıca diğer bakterilerden farklı olmalarını sağlayan bazı özelliklere de sahiptirler; bunlardan en öne çıkanları fotosentetik aygıt ve oksijen üretimidir (7). Mikroalglerdeki ışık pigmentleri multiprotein kompleksleri içinde bulunur. Pigmentlerin kromoforları Fotosistem I (PSI) ve Fotosistem II (PSII) komplekslerini oluşturan proteinlere bağlıdır. İki ana anten kompleksi vardır: (a) tilakoidlerdeki reaksiyon merkezine (RC) direk eklenmiş ışık tutan klorofil/karotenoit- bağlı kompleksler (LHCs) ve (b) iki ya da dört farklı fikobiliproteinden oluşan ve PSII 'ye bu fikobiliproteinlerle bağlı olan fikobilizomlar (PBS). Anten komplekslerinin modelleri mikroalg gruplarına göre

değişmektedir. *Cyanophytes*'lerde fikobilizomlar enerjiyi ilk olarak reaksiyon merkezi 2'ye transfer ederler ve *Cyanophytes*'ler, yani siyanobakteriler klorofil/karotenoit-bağlı komplekslerden yoksundur (2). Membran-bağlı organellerden yoksun olsalar da özel fonksiyonları olan çeşitli hücresel yapılara ve inklüzyonlara sahiptir ve bunlar ekolojik varlıklarında önemlidir. Bunlar içinde fikobilizomları içeren fotosentetik tilakoid zarlar ve kompleks kıvrımlı ve bazen birçok kopyası bulunan dairesel DNA'yı içeren nükleoid bölge ya da hücrenin merkezinde bulunan sentroplazma sayılabilir. Hücreler, karbon deposu olan glikojen (poliglikoz) granülleri; arjinin ve aspartikten içeren azot deposu olan siyanofisin granülleri; ribuloz 1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz oluşan ve bu fotosentetik enzim ile birlikte azot deposu olarak rol oynayan karboksizom ve polifosfat granüllerini içeren depo cisimciklerini içerir. Bu inklüzyonlar, hücrelerin uygun şartlar altında enerji ve besinin fazlasını biriktirmelerini sağlar. Kaynakların az olduğu durumlarda ise hücreler canlılıklarını sürdürmek ve çoğalmak için biriktirdikleri enerji ve besini kullanabilir (7).

Mikroalglerin en dikkat çekici karakteristikleri pigment olarak adlandırılan ve fotosentetik sistemlerinin parçası olan renkli kimyasal bileşiklerdir (1). Antioksidan, antikarsinojenik, antiinflamatuar, antiobezite, antianjiyogenik ve nöroprotektif etkiler gösterirler (3). Mikroalglerde üç sınıf pigment bulunur:

1. Klorofiller (kuru ağırlığın % 0.5-1.0'i)
2. Karotenoitler (kuru ağırlığın ortalama % 0.1-0.2'si, bazı türlerde β -karoten % 14'e kadar çıkar)
3. Fikobiliproteinler (kuru ağırlığın % 8'ine kadar çıkar) (1, 2).

Tüm siyanobakteriler klorofil-a içerir ve çoğu karakteristik mavi-yeşil renklerini veren fikosiyanın ve allofikosiyanın adındaki mavi fikobiliproteinlere sahiptir. Çoğu takson hücrelerin kırmızı ve bazen siyah görünmesini sağlayan fikoeritrin adı verilen fikobiliproteini de içerir. Fikobiliproteinler, tilakoid zar üzerinde bulunan fikobilizomlarda yer alır. Fikobilizomlar ışığın, solar enerji merkezlerine, özellikle fotosistem II'ye transferinde ışın rehberi olarak oldukça etkilidir (7).

Tablo 2.1. Siyanobakterilerde bulunan pigmentlerin spektral özellikleri (2).

Pigment	Renk	Maksimum Absorbsiyon (nm)	Omuz Absorbsiyonu (nm)	Maksimum Floresans Emisyonu (nm)
^a Klorofil a	Mavi-yeşil	430/662	-	668
^a α -karoten	Sarı	447/475	422	-
^a β -karoten	Sarı-Turuncu	454/480	426	-
^b Fikoeritrosiyanin	Turuncu	568/570	595	625
^b C-fikosiyanin	Mavi	520	-	640
^b C-fikoeritrin	Pembe	560	565	577
^a Aseton ^b Tampon				

Siyanobakteriler UV radyasyonuna karşı yüksek toleransa sahiptir ve bu reaktif dalga boyunun toksik etkilerini yok etmek veya azaltmak için dört ana strateji geliştirmiştir. Bazı türler UV maruziyetinden habitat seçimleri ile kaçınırlar; çoğu tür sitonemin (UV-A dalgaboyunda pik absorpsiyonu vardır) ve mikrosporin benzeri aminoasitleri de (UV-B dalgaboyunda pik absorpsiyonu vardır) içeren UV-koruyuculara sahiptir. Tüm siyanobakteriler, UV maruziyetinin zararlı foto ürünleri olan reaktif oksijen türleri için etkili süpürücüler olan β -karoten, miksoksantofil, ekinenon, ossilloksantin ve kantaksantin gibi karotenoitleri üretir. Siyanobakterilerin reaktif oksijen türlerine karşı süperoksit dismutaz gibi çeşitli enzimatik savunmaları vardır. Ayrıca, UV'den dolayı zarar görmüş proteinleri tanımlayıcı ve onarıcı çeşitli hasar tamir edici mekanizmaları bulunmaktadır (7). Siyanobakterilerde bulunan pigmentlerin spektral özellikleri Tablo 2.1.'de gösterilmektedir.

Zengin sekonder metabolit kaynağı olan siyanobakteriler biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda yer alır. Son zamanlarda siyanobakteriler, anti-HIV'den, antikanser, antivirale kadar farklı biyolojik aktiviteleri olan farmakolojik aktif bileşiklerin kaynağı olarak ilgi çekmektedir. Tüm siyanobakteriyel sekonder metabolitlerin biyosit, biyogübre, kozmetik, biyoyakıt, biyoremediasyon, şelatör ve besin takviyesi alanlarında potansiyel uygulamaları bulunmaktadır. Siyanobakteriyel sekonder metabolitlerin farmakolojik aktiviteleri üzerindeki araştırmalar, antitümoral, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antiparazitik ve enzim inhibisyon özellikleri gibi

tıbbi yararlılıkları konusuna odaklanmıştır. Tıbbi alanda keşfedilmiş prokaryotik kaynaklı marin doğal ürünlerin % 40'ı siyanobakterilerden elde edilmiştir (4).

2.1.1. *Spirulina* sp.

Alem	: <i>Eubacteria</i>
Alt- alem	: <i>Negibacteria</i>
Filum	: <i>Cyanobacteria</i>
Sınıf	: <i>Cyanophyceae</i>
Alt- sınıf	: <i>Oscillatoriophycidae</i>
Takım	: <i>Spirulinales</i>
Familya	: <i>Spirulinaceae</i>
Cins	: <i>Spirulina</i> (9).

Spirulina kelimesi Latince heliks ya da spiral kelimesinden türemiştir ve organizmanın fiziksel konfigürasyonunu vurgulamaktadır. Bu siyanobakteri türü, gıda ve gıda takviyesi olarak kullanımından dolayı çok iyi bilinen bir türdür ve tropik bölgelerde önemli bir diyet kaynağı olarak görülmektedir. Aztekler *Spirulina*'yı düzenli olarak tüketmiştir.

Son zamanlarda *Spirulina* kelimesinin gıda takviyesi olarak kullanılan türler için uygun olmadığı, yerine 30'dan fazla farklı türü içeren bir cins olan *Arthrospira* kullanılması konusunda tartışmalar vardır. Tüm bu türler insanlar tarafından tüketilebilir, yüksek besin değerlerine sahiptir ve bununla birlikte potansiyel terapötik değerleri bulunmaktadır.

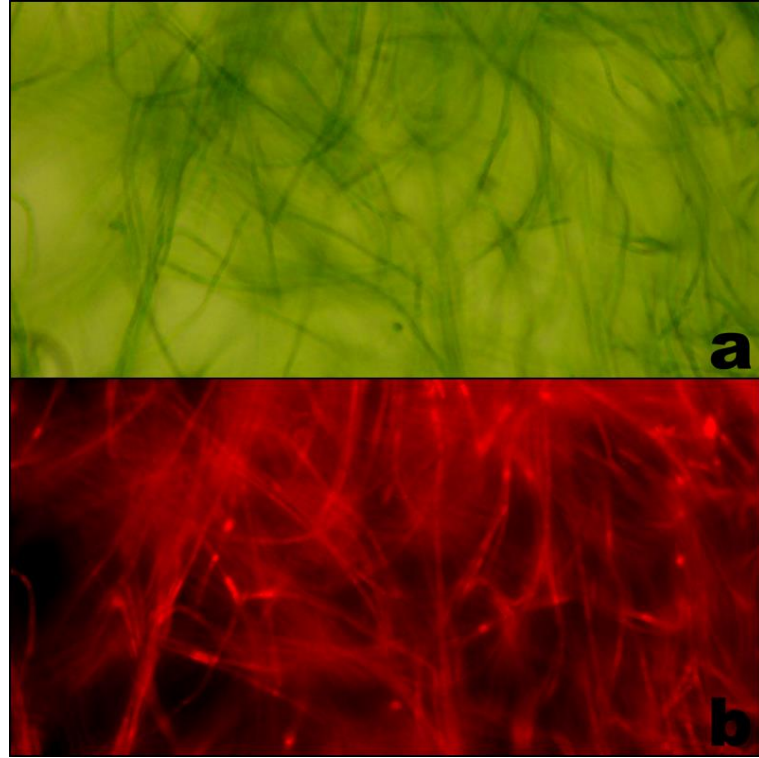
Arthrospira platensis (*Spirulina platensis*), filamentlerin (trikomlar) uzun eksenini boyunca dönme şeklinde kayması şeklinde hareket eder. Kayma hareketi katı veya yarı katı bir substrat üzerinde herhangi bir görünür flajel ya da diğer yapı olmaksızın özitleme ile gerçekleşir.

Spirulina bazik özellik gösteren (pH 9-11) göllerin kenarlarında katmanlar oluşturur. Deniz suyundan 1.5 kat daha fazla tuzlu ortamlara karşı toleransı vardır. Yüksek karbonat/bikarbonat ve yüksek pH değerlerine sahip göllerde baskın tür olarak bulunur. Bununla birlikte sıcak sularda (32-45 °C) çoğalabilir ve 60 °C dereceye kadar yaşamını sürdürebilir (10).

2.1.2. *Geitlerinema* sp.

Alem	: <i>Eubacteria</i>
Alt- alem	: <i>Negibacteria</i>
Filum	: <i>Cyanobacteria</i>
Sınıf	: <i>Cyanophyceae</i>
Alt- sınıf	: <i>Oscillatoriophycidae</i>
Takım	: <i>Oscillatoriales</i>
Familya	: <i>Coleofasciculaceae</i>
Cins	: <i>Geitlerinema</i> (11).

Geitlerinema türleri genellikle çamur tabakalarında, toprakta veya çeşitli sucul habitatlarda makrofitlerin (kirlenmemiş sularda) üzerinde bulunur; nadiren tekli filamentler şeklindedir. *Geitlerinema splendidum* en yaygın türdür (12). Tez çalışmamızda izole edilen *Geitlerinema* cinsine ait mikroskopik görüntüler Şekil 2.1.'de verilmiştir.



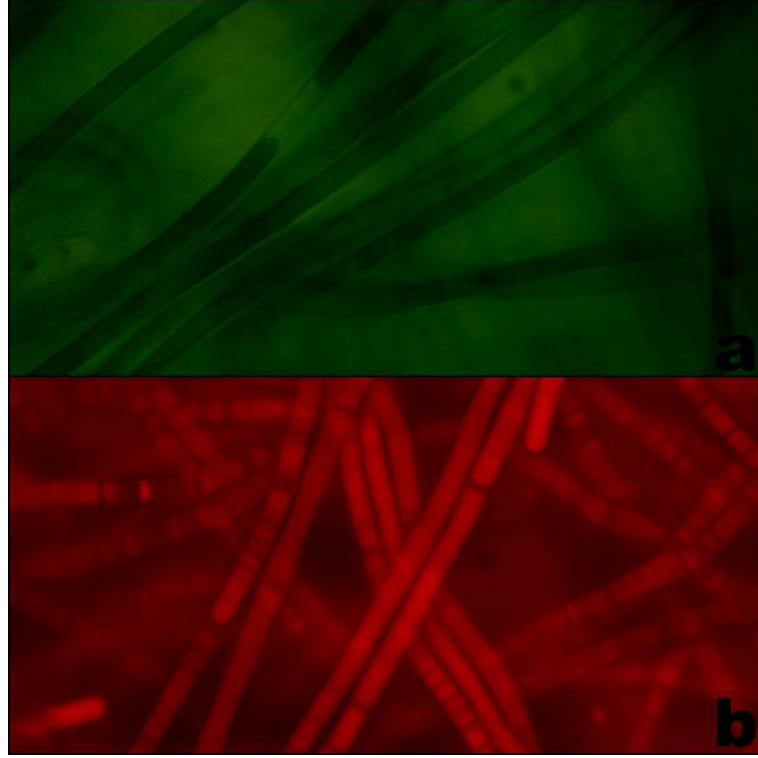
Şekil 2.1. Tez çalışmamızda izole edilen *Geitlerinema* türüne ait mikroskopik görüntüler: a) Işık mikroskobu (40x) görüntüsü b) Floresans mikroskobu (40x) görüntüsü.

Tallus ince, hassas, genellikle parlak mavi-yeşil, nadiren mor ya da kahverengidir. Dağınık, çoğu zaman demet benzeri genellikle ince makroskobik katman oluşumu gözlenir ve ara sıra izole trikoma meydana gelir. Trikoma 1-4 µm genişliğinde, genellikle paralel düzende, silindirik, düz, bazen hafifçe bükülmüş ya da düzensizce vida benzeri kıvrılmış (özellikle sonlarda), kılıfsız, çoğu çapraz duvarlarda daralma gözlenmez, nadiren daralma görülür. Trikoma hareketlidir. Hareket, boylamasına eksen yönünde kayma şeklindedir. Bu harekete ayırt edici saat yönünde veya saat yönünün tersine rotasyon, dalgalanma (osilasyon) ve dairesel hareketler eşlik edebilir. Genellikle, hücrelerin boyu eninden uzundur, hücre bölünmesinden önce boy enden birkaç kat daha uzundur. Hücre içeriğinde dağınık geniş siyanofisin granülleri ya da bölgesel karetonoid cisimcikleri bulunur. Tilakoidler eş merkezli şekilde düzenlenmiştir, uzunlamasına hücre duvarlarına periferik ve paralel uzanır. Apikal hücreler konik, kancalı ya da eğiktir; fakat genellikle sivri ya da yuvarlak, bazen de küresel ya da düz, silindirik ve yuvarlaktır. Üreme, hareketli hormogonia içindeki trikoma bölünmesi yoluyla gerçekleşir (12).

2.1.3. *Oscillatoria* sp.

Alem	: <i>Eubacteria</i>
Alt- alem	: <i>Negibacteria</i>
Filum	: <i>Cyanobacteria</i>
Sınıf	: <i>Cyanophyceae</i>
Alt- sınıf	: <i>Oscillatoriophycidae</i>
Takım	: <i>Oscillatoriales</i>
Familya	: <i>Oscillatoriaceae</i>
Cins	: <i>Oscillatoria</i> (13).

Oscillatoria sığ su birikintilerinde, farklı substratlardan (çamur, bitki, taş, kum) oluşmuş tabakalarda, bataklıklarda bulunur (12). Tez çalışmamızda izole edilen *Oscillatoria* cinsine ait mikroskobik görüntüler Şekil 2.2.'de verilmiştir.



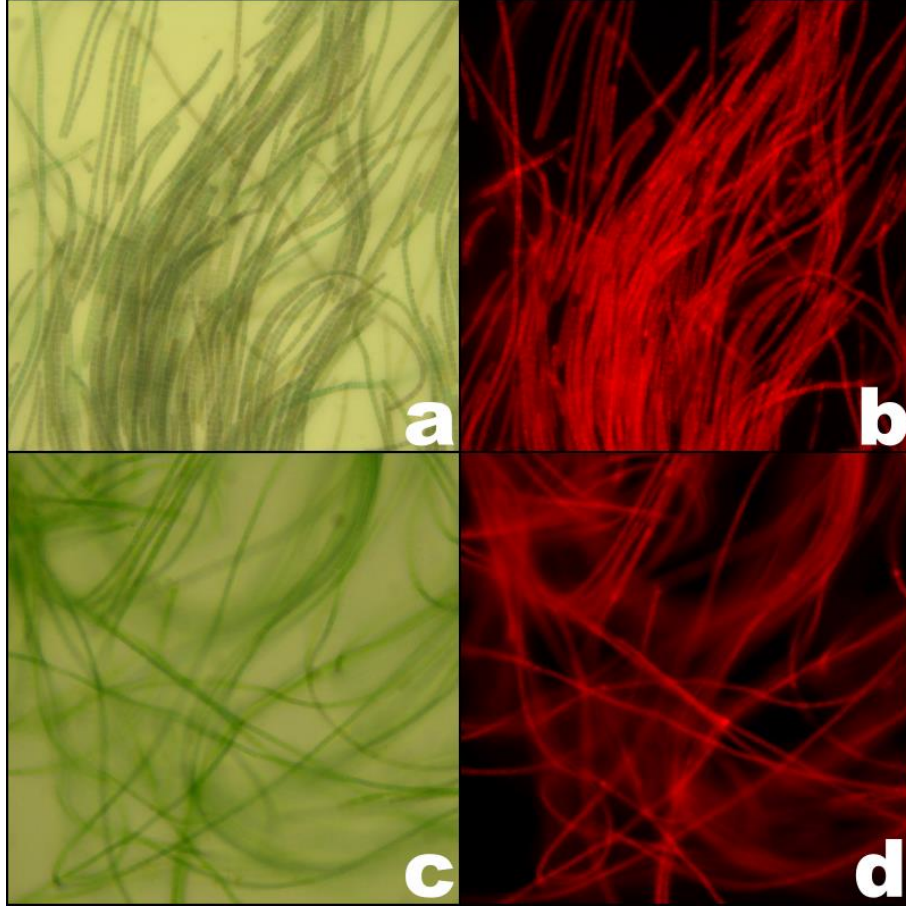
Şekil 2.2. Tez çalışmamızda izole edilen *Oscillatoria* türüne ait mikroskobik görüntüler: a) Işık mikroskobu (40x) görüntüsü b) Floresans mikroskobu (40x) görüntüsü.

Tallus genellikle düz, makroskobik, pürüzsüz, katmanlı, nadiren kayışimsı, tabaka halinde, daha az sıklıkta tekil trikomlar halindedir. Trikomlar düz veya düzensiz dalgalı, silindirik, bazen sonlarda vida benzeri kıvrımlı, kayma veya sağ veya sola rotasyonlar şeklinde hareketli, genellikle 6.8 μm genişliğinden büyük (70 μm 'ye kadar), sıkışık olmayan özelliğindedir. Genellikle katmanlar bulunmaz fakat uygun olmayan şartlarda meydana gelmeleri olasıdır. Hücreler kısa ve disk şeklindedir. Uzunlukları genişliklerinin yarısı ya da yarısından daha kısadır. Hücre içeriğinde, aerotoplaz bulunmaz, genellikle homojendir ya da bazen büyük, göze çarpan granüller bulunur. Hücre bölünmesi trikom eksenine çapraz olarak hızlı sekanslar şeklinde meydana gelir. Üreme kısa hareketli hormogonia içinde trikom bozunması (bazen tamamen) ile gerçekleşir (12).

2.1.4. *Leptolyngbya* sp.

Alem	: <i>Eubacteria</i>
Alt- alem	: <i>Negibacteria</i>
Filum	: <i>Cyanobacteria</i>
Sınıf	: <i>Cyanophyceae</i>
Alt- sınıf	: <i>Synechococcophycidae</i>
Takım	: <i>Synechococcales</i>
Familya	: <i>Leptolyngbyaceae</i>
Cins	: <i>Leptolyngbya</i> (14).

Leptolyngbya birçok morfotip ve ekotip içeren bir siyanobakteri cinsidir (12). Toprak yüzeyi, gelgit altı stromatolitler, Antartika'nın kıyı bölgeleri ve arkeolojik kazı bölgeleri gibi çok farklı çevre habitatlarında bulunan en yaygın siyanobakteri cinslerinden biridir (15). Bazı türlerinin termal ve mineral sularda ya da ıslak kaya yüzeylerinde karasal olarak yetişebildiği de belirtilmiştir (12). Tez çalışmamızda izole edilen *Leptolyngbya* cinsine iki türe ait mikroskopik görüntüler Şekil 2.3.'te verilmiştir.



Şekil 2.3. Tez çalışmamızda izole edilen *Leptolyngbya* türlerine ait mikroskobik görüntüler: a) *Leptolyngbya* sp. (a) ışık mikroskobu (40x) görüntüsü b) *Leptolyngbya* sp. (a) floresans mikroskobu (40x) görüntüsü c) *Leptolyngbya* sp. (b) ışık mikroskobu (40x) görüntüsü d) *Leptolyngbya* sp. (b) floresans mikroskobu (40x) görüntüsü.

Leptolyngbya filamentleri nadiren tektir, genellikle gevşek pul benzeri kümeler ya da tabaka şeklinde görülür. Serbestçe yüzer halde ya da bir substrata bağlıdır, nadiren demet halinde ya da daha yaygın olarak koloniler (tallus) şeklinde bulunur. Hücreler bükümlü, dalgalı, bazen de düz ve uzundur. Fakültatif, sıkı, ince hiyalin tabakaları mevcuttur; dallanma nadirdir fakat yalancı dallar şeklinde oluşumlar gözlenebilir. Trikomlar 0.5-3.5 µm genişliğinde, hareketli veya hareketsiz, ya da zorla farkedilebilecek titreşim hareketine sahiptir. Hücreler silindriktir. Hücre boyu eninden genellikle uzundur; boyun enden kısa olduğu ya da izodiyametik yapılar da gözlenebilir. Hücre içeriği genellikle homojendir. Bazen fark edilebilir kromoplazma ve sentroplazma bulunur. Gaz veziküllerinden yoksundur. Üreme trikom fragmentasyonu ile meydana gelir (12).

Leptolyngbya cinsine ait üyelerin farmasötik uygulamaları vardır. *Leptolyngbya* türleri; taşıdıkları kobamid A, dolastatin 12 ve palmirolit gibi biyoaktif bileşikler nedeniyle, akciğer karsinoma ve meme kanserinin tedavisi için yeni antikanser ilaçların keşfinde kullanılan kaynaklardır (16).

2.2. Algal Pigmentler

Mikroalglerdeki sınıflandırma, imza niteliği taşıyan pigmentlerine göre yapılmıştır. Pigmentler mikroalglerin fotosentez ve pigmentasyon metabolizmalarında önemli role sahiptir (2). Sıcaklık, ışık ve diğer mikroorganizmaların varlığında kolayca bozunabilirler (3).

Mikroalglerdeki pigmentler üç sınıfa ayrılır: klorofiller, karotenoitler ve fikobiliproteinler (1, 2). Tüm mikroalgal gruplar klorofil-a içerir. Fikobiliproteinler (fikoeritrin, fikosiyenin, allofikosiyenin) kırmızı ve mavi-yeşil alglere (siyanobakteriler) spesifiktir (2).

Tablo 2.2. Mikroalglerden elde edilen pigmentlerin ana kullanım alanları (2).

Biyoaktif Pigmentler	Aktivite	Kullanım Alanları
β-karoten	Antioksidan Antikanser Serbest radikal süpürme Boyar madde	Sağlık uygulamaları Gıda boyası Nutrasötik
Lutein	Antioksidan Katarakt ve yaşa bağlı makular dejenerasyon önleyici Antikanser	Göz hastalıkları Sağlık sektörü
Kantaksantin	Doğal boya	Gıda sektörü
Fikosiyenin	Antiinflamatuvar Antioksidan Antiviral Antikanser Radikal süpürme	Besin takviyesi Kozmetik Sağlık uygulamaları Doğal boya

Pigmentlerin, gıda katkısı, kozmetik ve ilaç endüstrileri ile biyomedikallerde kullanım alanları vardır (2). Tablo 2.2.'de mikroalglerden elde edilen pigmentlerin ana kullanım alanları gösterilmektedir. Bu pigmentlerin az miktarlarda etkili boyama özellikleri, ilaç ve kozmetik sanayinde kullanımlarını önemli kılmaktadır. Bu sektörlerde floresans tabanlı indikatör, immün testlerde biyokimyasal işaretleyici ve cilt kremlerinde kollajen sentezini uyarıcı olarak kullanılabilirler (1). Ticari olarak en değerli olan pigment grubu karotenoitler (1, 2) ve fikobiliproteinlerdir (2). Bir karotenoit olan luteinin ticari kaynağı kadife çiçeğidir (*Tagetes erecta* L.); fakat lutein içeriğinin düşük olması luteince zengin alternatif kaynak arayışına sebep olmaktadır. Mikroalglerin yüksek büyüme hızı ve kadife çiçeğinden daha fazla serbest lutein içeriği vardır. Mikroalglerin lutein üretim hızının bu bitkiden üç ila altı kat daha fazla olduğu kayıtlıdır (17).

2.2.1. Klorofiller

Klorofil, fotosentezden sorumlu olması nedeniyle doğada oldukça yaygın bulunan yeşil bir pigmenttir. Mikroalglerde, absorpsiyon spektrumu ve dolayısıyla renk tonu bakımından farklılık gösteren çeşitli klorofil türleri – *klorofil a, b, c, d ve f* bulunur. Klorofil a mavi-yeşil, klorofil b parlak yeşil, klorofil c sarı-yeşil, klorofil d orman yeşili ve klorofil f zümrüt yeşili renklerine sahiptir. Klorofil a tüm mikroalgal gruplarda bulunurken klorofil b özellikle *Chlorophytada*, klorofil c ise *Rhodophytada* bulunur. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar, klorofillerin antitumörjenik özelliklerine bağlı olarak kanserden koruyucu özellikleri olduğunu göstermiştir. Gıda, yem, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde kullanılmak üzere ticari üretimi yapılmaktadır (1).

2.2.2. Karotenoitler

Karotenoitler 600'den fazla üyesi olan lipofilik pigmentlerdir. Bitki ve mikroorganizmalarda ışığın yakalanması ve ışığın zararlı etkilerinden korunmada ana rol oynarlar (18). Gıda renklendiricisi, ilaç ve sağlığı destekleyici değerli bileşikler olarak kullanımları sebebiyle, dünya çapında karotenoitlere olan talep artmaktadır (17).

490-600 nm aralığında çok geniş ışık absorpsiyonları vardır. Mavi spektral alandan 415 ve 480 nm arasında üç veya iki maksimum absorbans ve bir omuzlu geniş absorpsiyona sahiptir (2). Karotenoitler üç izopentenil pirofosfat ünitesinin, 20 karbonlu prekürsör geranilgeranil difosfatı oluşturmak üzere, bir dimetilallil difosfata kademeli eklenmesi yoluyla sentezlenirler. İzopentenil pirofosfat ve dimetilallil difosfat metileritritol fosfat yolağından türerler. Geranilgeranil difosfatın iki molekülü fitoen sentaz yardımıyla biyosentetik yolağın ilk karotenoidi olan fitoeni oluşturmak için bir araya gelir. Fitoen daha sonra likopeni oluşturmak üzere desatüre olur ve neredeyse diğer karotenoitlerin hepsi likopenden türer (19). Diğer fotosentetik pigmentlerden farklı olarak, karotenoitler C₃₀ metil-dallanmış hidrokarbon iskeletine sahiptir (17). Karotenoit iskeletindeki çifte bağların değişmesi polien zincirlerini meydana getirir. Karotenoitleri diğer moleküllerden ayıran ve onlara elektrokimyasal özelliklerini veren konjuge çifte bağ sistemleridir. Bu değişken tek ve çift bağ sisteminde, π -elektronları tüm polien zinciri boyunca serbest bulunur. Polien zinciri, bu grup moleküllerin elektronik spektrumları, fotofiziksel ve fotokimyasal özellikleri için karakteristiktir. Konjuge sistem uzadıkça, uyarımları daha kolaylaşır ve ışığın daha geniş dalga boyları absorblanabilir (19). Bilinen tüm siklik ve asiklik karotenoitlerin rengi molekül içindeki çifte bağların uzun serilerine bağlıdır (20).

Tek veya çifte bağların değişimi, her karotenoitin çok sayıda geometrik izomerinin olmasını sağlamaktadır. Işık da karotenoitlerin *cis*-, *trans*- izomerlerinin oluşmasında etkilidir. İzomerik form molekülün şeklini belirler ve çözünürlük ve absorblanabilirlik gibi özelliklerinin değişmesine sebep olabilir. Karotenoitlerin *trans*-formları *cis*- formlarına göre daha karardır, kristalize ve agrega olmaya eğilimleri yüksektir. Bu yüzden *cis*- formları daha kolay absorblanabilir ve taşınabilir. Bazı karotenoitlerin ucunda bulunan β ya da ϵ halkası gibi son gruplar ve oksijenizasyon karotenoitlerin özelliklerini etkileyen unsurlardandır (19).

Karotenoitler hidrofobik moleküller olduğu için hücrelerde, çift katmanlı zarlar gibi lipofilik bölgelerde bulunurlar. Hidroksil grupları gibi polar gruplar karotenoitlerin hidrofobik yapısını düşürür ve zara göre yerleşimlerini değiştirir. Likopen ve β -karoten, hidrofobik çevrelerini korumak için zar yüzeyine paralel sıralanırken; daha polar olan lutein gibi ksantofiller, hidroksil gruplarını daha hidrofilik çevrede tutmak için zar yüzeyine dikey olarak sıralanırlar. Bu farklılıklar

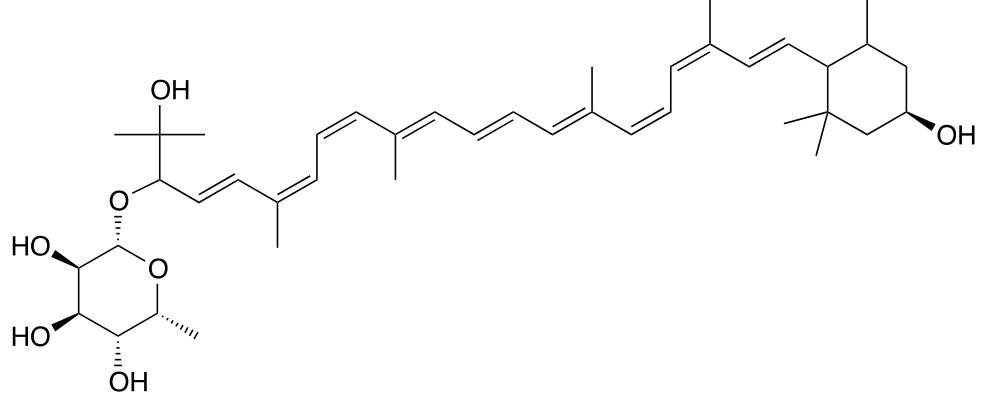
membranın fiziksel doğasını etkileyebileceği gibi fonksiyonunu da etkileyebilir. Karotenoitler, sucul çevrelerde hareket etmelerini kolaylaştırmak için proteinlerle kompleks oluşturabilir. Ayrıca lipoproteinlerin hidrofobik bölgeleri ile etkileşime girebilirler (19).

Organik çözücülerde çözünebildikleri gibi lipozomlarla ve siklodekstrin gibi siklik oligosakkaritlerle bağıntılı bulduklarında hidrofilik ortamlarda da çözünebilirler. Uç gruplarına hidroksil eklenmesi karotenoiti daha polar hale getirir ve çözünlüğünü etkiler. Karotenoitler matriks içinde göreceli olarak stabildir (17), çözelti halinde ise artan sıcaklığa, oksijene, asit ve ışığa duyarlıdır ve oksidatif bozulmaya uğrarlar (17, 19). Bu nedenle karotenoit içeren her matriks ayrı olarak değerlendirilmelidir (17).

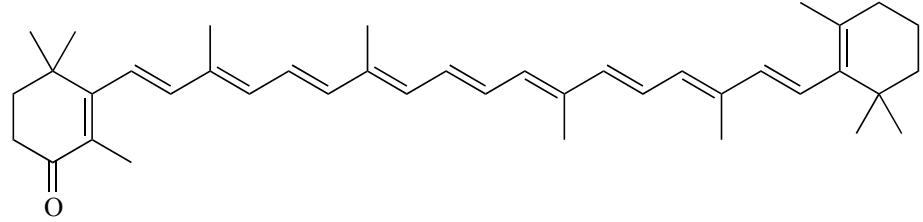
Kimyasal olarak karotenoitler iki gruba ayrılabilir: karotenler (hidrokarbonlar; örneğin α -karoten, β -karoten, likopen) ve ksantofiller (oksijenli moleküller; örneğin astaksantin, lutein, kantaksantin). Karotenoitler arasında diğer bir ayırım ise primer ve sekonder karotenoitler olarak yapılabilir. β -karoten ve lutein gibi primer karotenler fotosentetik aygıtın yapısal ve fonksiyonel bileşenleridir ve fotosenteze doğrudan katılırlar. Işık toplama rolleri olduğu kadar filtreleme, söndürme veya süpürme yoluyla fotoprotektif rol de oynarlar. Astaksantin ve kantaksantin gibi sekonder karotenoitler fotosentetik aygıtın bir parçası değildir. Kloroplastlarda sentezlenir ve sitoplazmada birikirler. Yüksek ışık yoğunluğu, besin yoksunluğu, sıcaklık değişimleri, pH değerleri, yüksek tuz konsantrasyonları ve oksidatif stres gibi çevresel ve kültür ortamı faktörleri sekonder metabolitlerin fazla üretimini sağlar. Böylece mikroalglerin bu etkenlere adaptasyonu sağlanmış olur. Karotegenesis işlemi ile üretilen karotenoitler sadece filtreleme yoluyla fotoprotektif pigmentler olarak rol oynayıp sadece kendilerini korurlar (örneğin, zararlı radyasyondan) (1).

Karotenoitlerin yüksek bitkilerde ve bazı alg cinslerinde ksantofil döngüsünün anahtar rol oynadığı primer fonksiyonları, fotosentetik organizmaları güneş ışığından korumaktır. Ksantofil döngüsü, fotosentetik antendeki fazla enerjinin termal dağılımı için violaksantinın anteraksantin aracılığıyla zeaksantine tersinir dönüşümüdür. *Cyanophyta*'da ksantofil döngüsü bulunmadığı için zeaksantin, β -karotenden üretilmektedir. Bununla birlikte, ksantofil döngüsünün olmaması sebebiyle anteraksantin ve violaksantin de *Cyanophyta*'da bulunmamaktadır. Aynı zamanda

Cyanophyta üyelerinde astaksantin de yoktur (18). Mavi-yeşil alglerde sentezlenen karotenoitler eşsizdir. Ana pigmentler β -karoten, ekinenon ve miksoksanstofildir. Miksoksanstofil diğer hiçbir fotosentetik bitki, meyve, çiçek ve kökte bulunmaz (20). Miksoksanstofil ve ekinenon bileşiklerine ait formüller Şekil 2.4. ve 2.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Miksoksanstofil kimyasal yapısı.



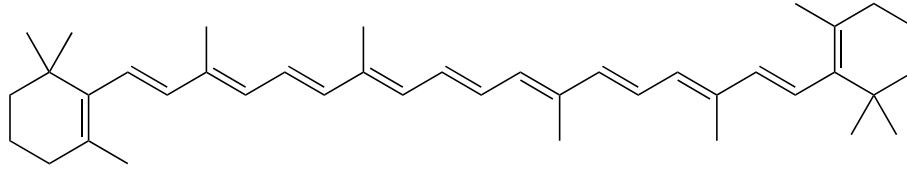
Şekil 2.5. Ekinenon kimyasal yapısı.

Yapılan bir araştırmada, Hindistan sularından izole edilen *Oscillatoria sp.* CCNM 2007 türünde miksoksanstofil, zeaksantin, kantaksantin, ekinenon, α -karoten ve β -karoten; *Geitlerinema sp.* CCNM 2010 türünde miksoksanstofil, zeaksantin, kantaksantin, ekinenon ve β -karoten ve *Oscillatoria sp.* CCNM 2012 türünde ise miksoksanstofil, zeaksantin, kantaksantin, ekinenon, α -karoten ve β -karoten karotenoitlerine rastlanmıştır (18).

Karotenler

Karotenler, molekül başına 40 karbon atomu olan, çeşitli sayıda hidrojen atomları içeren ve başka hiçbir element içermeyen çoklu doymamış hidrokarbonlardır.

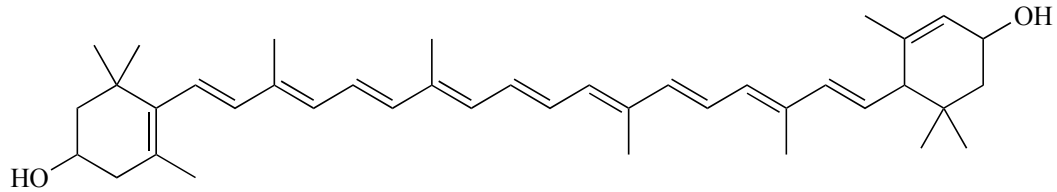
Bazı karotenler, molekülün bir veya iki ucundan hidrokarbon halkası ile sonlanır. Mikroalglerde *beta* ve *alfa* karoten olmak üzere iki ana karoten bulunur. *Beta*-karoten yağda çözünen, turuncu-sarı renkli, A vitamini prekürsörü olarak bilinen bir karotenoitdir (2). Şekil 2.6.'te β - karoten kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.6. β -karoten kimyasal yapısı.

Ksantofiller

Ksantofiller okside olmuş karoten türevleridir. Ksantofil grubu çok sayıda pigment içerir (2). Lutein, terapötik özellikleri olan ksantofillerden biridir. Luteine ait kimyasal yapı Şekil 2.7.'de gösterilmiştir. Bazı kanser türleri, kardiyovasküler hastalıklar ve retinal deformasyonun önlenmesi amacıyla kullanılması önerilmektedir (17).



Şekil 2.7. Lutein kimyasal yapısı.

Luteinin hücredeki rolü yapıyı korumak ve fotosistemin fonksiyonunu sağlamaktır (21). Lutein ve zeaksantin ksantofilleri, ışık absorpsiyonu ve hasar verici oksijen türevlerini süpürme etkileri ile primat gözlerindeki makula için önem teşkil eder. Lutein, zeaksantin ve zeaksantin steoizomeri olan 3R, 3'S (= *mezo*)- zeaksantin makula lutea pigmentini oluşturur, yüksek görüş keskinliğinden sorumlu sarı bölgeyi yaratırlar (19). Lutein sarı renkli olduğu için spektrumun mavi ışık kısmını etkili bir şekilde absorblar. Mavi ışık, fotooksidatif hasarı indükleyerek retinaya zarar verebilir. Lutein gözde mavi ışık filtresi olarak rol oynar ve gözde yeteri kadar lutein bulunduğu mavi ışık absorblanır ve fotooksidasyon minimize edilir (17).

Fikobiliproteinler

Fikobiliproteinler mikroalglerden elde edilen, suda çözünebilen ve oldukça dikkat çeken doğal fotosentetik pigmentlerdir (20-22).

Fikobiliproteinler, tetropirol prostetik gruplarda bulunan bilin yapısına kovalent bağlı ışık toplayıcı proteinlere aittir (23). Protein ve fikobilin denilen açık zincirli tetrapirellere ait kovalent bağlı sistein aminoasitli kromoforların bileşiminden oluşmaktadırlar (1).

Tüm fikobilinler benzer üç boyutlu yapıya sahiptir. Her bir fikobilin genellikle eşit miktarda bulunan α ve β alt ünitelerinden (polipeptitler) meydana gelir. Moleküler ağırlıkları elde edildikleri organizmaya bağlı olarak çeşitlilik gösterir. α alt ünitesinin moleküler ağırlığı 12.000-20.000 dalton arasında iken, β alt ünitesinin moleküler ağırlığı 15.000-22.000 dalton arasındadır (24).

Fikobiliproteinler mikroalglerin pigmentasyon metabolizmasında önemli rol oynarlar (22). Klorofil α (430 nm) absorpsiyonunun ötesindeki aralık için güneş enerji kollektörleri olarak görev alır (23), fotosentez esnasında ışık enerjisini yakalarlar (1). Azot yokluğunda bozdukları için hücre fonksiyonları için gerekli olmadıkları kabul edilmiştir. Bu yüzden fikobiliproteinler azot depolama kaynağı olarak düşünülmektedir (25).

Işık absorpsiyonlarına ve bilin tiplerine göre genellikle dört alt sınıfa ayrılırlar: fikoeritrinler (pembe-mor, $\lambda_{maks} = 540-570$ nm), fikosiyaninler (mavi, $\lambda_{maks} = 610-620$ nm), fikoeritrosiyaninler (turuncu, $\lambda_{maks} = 560-600$ nm) ve allofikosiyaninler (mavi-yeşil, $\lambda_{maks} = 650-655$ nm) (23). 490-600 nm arasında çok geniş ışık absorpsiyonları vardır. Pigmentin sınıfına göre bir veya iki maksimum absorpsiyon ve bazen omuz verirler. Fikosiyanin sarı spektral aralıkta 555-670 nm arası absorpsiyon verir; aynı zamanda 640 nm'de floresans emisyonu gösterir (2). Fikobiliproteinler ışık adsorpsiyonu ve enerji transfer süreçlerine katılmak için bir araya gelerek fikobilizom denilen supramoleküler kompleksi oluştururlar (23).

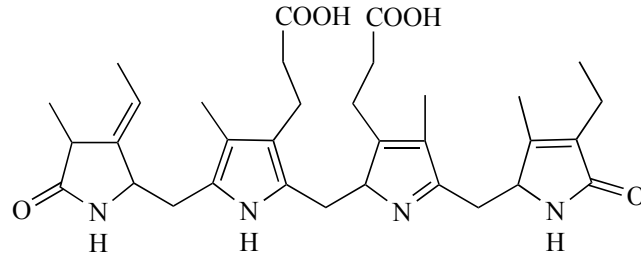
Fikobiliproteinlerin ticari olarak gıda, kozmetik, biyoteknoloji, farmakoloji ve tıp alanlarında yaygın kullanımı vardır (2). Fikobiliproteinler, immünoglobulinler, protein A ve avidin ile bağlanır. Bu özelliği ile histolojik uygulamalarda, floresan mikroskopu uygulamalarında, immünolojik testlerde ve floresanla aktive hücre ayırmaları uygulamalarında kullanılır (25). Doğal gıda boyası olmalarının yanında

fikobiliproteinlerin floresan işaretleyici ve antioksidan özellikleri vardır. Aynı zamanda kimyasal yapılarına bağlı olarak reaktif oksijen türlerini nötralize etme ve şelatlayıcı özellikleri ile oksidatif stresi azaltma rollerine de sahiptirler (1). Antioksidan, antikarsinogenik, antiinflamatuvar, nöroprotektif, hepatoprotektif, anti-obezite özellikleri ile birçok biyolojik fonksiyon gösterirler (21, 22).

C-Fikosiyanin

Fikosiyanin, mavi rengi ve yapısında bulunan protein ve fikosiyanobilin adı verilen protein olmayan içeriği ile karakterize fikobiliprotein ailesinden bir proteindir (25). Fikosiyanin siyanobakterilerde, *Rhodophyceae* ve *Cryptophyceae*'de bulunur. Bulunduğu türe göre C-fikosiyanin ve R-fikosiyanin olarak adlandırılır. C-fikosiyanin, R-fikosiyanine göre daha yaygın ve çok bulunur (4) ve birçok siyanobakteriye mavimsi rengini veren ve mavi-yeşil alg olarak adlandırılmalarına sebep olan bileşik fikosiyanindir (26).

Suda çözünebilen bir protein olan C-fikosiyanin'den ilk defa 1928 yılında Lemberg tarafından bahsedilmiştir ve siyanobakterilerde bulunan ana fikobiliproteindir (24). Siyanobakterilerin biyokimyasal kompozisyonu ve pigment içeriği siyanobakteri türünden türüne değişir ve birçok fizikokimyasal parametreden etkilenir (27). Siyanobakteri olan *Spirulina platensis*'in kuru ağırlığının %20 'sine kadarını oluşturur. C-fikosiyanininin α alt ünitesi α -84 sisteine kovalent bağlı bir fikosiyanobilin içerirken, β alt ünitesi apoprotein β -84 ve β -155 sisteinine bağlı iki fikosiyanobilin içerir (24). α ve β alt üniteleri pH 5-6'da hegzamerik $(\alpha\beta)_6$, pH 7'de ise trimerik $(\alpha\beta)_3$ konformasyonda bulunur. α ve β alt ünitelerinde sadece fikosiyanobilin kromoforu bulunur (2). Şekil 2.8.'de C-fikosiyaninin kimyasal yapısı verilmiştir. 615 ve 620 nm'de maksimum absorpsiyon gösterdiği, maksimum floresans emisyonununun 640 nm civarında olduğu ve moleküler ağırlığının 70-110 kDa arasında olduğu bilinmektedir (22). Farklı siyanobakteri türlerinde C-fikosiyaninin moleküler ağırlığı oligomerler için 81 ila 215 kDa ve α , β alt üniteleri için 15.2 ve 24.4 kDa aralığında belirtilmiştir. Çoğu durumda, alt üniteler trimerler olarak organize olmuştur (3).



Şekil 2.8. C-Fikosiyanin kimyasal yapısı.

C-Fikosiyanin, nutrasötik, kozmetik ve ilaç sanayilerinde büyük ticari değere sahip bir fikobiliproteindir (22). Fikosiyaninin ticari üretimi *Spirulina*, *Synechococcus*, *Anabaena*, *Nostoc* ve *Oscillatoria* siyanobakterileri kullanılarak yapılmaktadır (1, 2, 27). Fikosiyanin saflığı A620/A280 absorbans oranına göre tespit edilir (25, 28). 620 nm'deki absorbans fikosiyanine, 280 nm'deki absorbans toplam proteine karşılık gelmektedir. Fikosiyanin, A620/A280 oranı ≤ 0.7 ise gıda saflığında, A620/A280 oranı 0.7 ile 3.9 aralığında ise reaktif saflığında, A620/A280 oranı ≥ 4.0 ise analitik saflıkta olarak tanımlanır (25). C-Fikosiyaninin kilogram fiyatı saflık derecesine göre 500 – 100.000 USD arasındadır (28).

C-Fikosiyaninin Biyolojik Etkileri

Antioksidanlar, oksidasyon olayını, reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerini önleyen veya geciktiren maddelerdir. Antioksidanlar, organizmanın savunma mekanizmasında serbest radikallerin saldırılarına karşı ana rol oynar. Gıdaların, ilaçların ve kozmetik ürünlerin stabilizasyonu için de kullanılır. Antioksidanlar içsel ve dışsal olarak ikiye ayrılır. İçsel antioksidanlar dışsal antioksidanlarla birlikte sistemi serbest radikallerden korur. Dışsal antioksidanlar, bakteri, alg ve bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilir. Bu kaynaklardan biri de siyanobakterilerdir (29).

Antioksidanların, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellediği ve/veya onları süpürdüğü bilinmektedir. Antioksidan sistem ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak bilinmektedir. ROS ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, şeker hastalığı, enflamasyon hastalıkları gibi hastalıklarla olduğu kadar yaşlanma süreci ile de ilgilidir. C-Fikosiyaninin antioksidan özelliği ilk olarak 1998 yılında Kübalı araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar, C-fikosiyaninin hidroksil radikalini ($\cdot\text{OH}$), alkoksil radikalini ($\text{RO}\cdot$)

ve süperoksit anyonunu ($O_2^{\cdot-}$) süpürdüğünü belirtmiştir. C-Fikosiyanin aynı zamanda lipit peroksidasyonunu da inhibe eder. Buna ek olarak C-fikosiyaninin antiinflamatuvar özelliklerini de ilk defa tanımlamışlardır. Daha sonraları dünya genelinde diğer araştırmacılar, bir önceki bulguları doğrulamış ve C-fikosiyaninin tekli oksijeni (1O_2), hipokloröz asidi (HOCl), peroksil radikalini (ROO^{\cdot}), $^{\cdot}OH$, peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), nitrik oksit ($^{\cdot}NO$) ve hidrojen peroksidi (H_2O_2) süpürdüğünü keşfetmişlerdir. C-Fikosiyanin aynı zamanda 2,2- azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS $^{2+}$) ve 1,1- difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) gibi doğal olmayan radikalleri de süpürmektedir. Farklı ışık koşullarında, C-fikosiyanin bifonksiyonel aktivite gösterir; $^{\cdot}OH$ üretebilir ve karanlıkta $^{\cdot}OH$ yakalayabilir. C-Fikosiyanin konsantrasyonu arttığında ROS üretimi önlenir. Bununla birlikte, mavi ışığın DPPH, $^{\cdot}OH$ ve HOCl radikallerine karşı süpürme aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir (25).

Bir çalışmada *Geitlerinema sp.* TRV57 türünden fikosiyanin ekstre edilmiş ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi için fosfomolibdenum testi, ferrik iyon indirgeme gücü testi, DPPH radikal süpürme aktivitesi, hidrojen peroksit serbest radikal süpürme testi, anti lipit peroksidasyon testi gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Tüm antioksidan çalışmalarında askorbik asit standart antioksidan olarak kullanılmıştır. DPPH süpürme aktivitesi, 3 ml pigment örneğinin 1 ml 0.1 mM metanollü DPPH'a eklenerek 30 dk sonra 517 nm'de absorbansı ölçülerek bulunmuştur. Fikosiyaninin süpürme oranı 200 μ g/ml konsantrasyonda % 78.75, 5 μ g/ml konsantrasyonda ise % 68.75 bulunmuştur. *Spirulina*'dan elde edilen fikosiyaninin DPPH süpürme aktivitesi ise % 25 olarak belirtilmiştir. Bu çalışma *Geitlerinema sp.*' den elde edilen fikosiyanin pigmentinin iyi bir antioksidan bileşik olduğunu ortaya koymuş ve araştırmacılar elde edilen bu pigmentin farmasötik ve nutrasötik bileşik olarak kullanılabileceğini bildirmiştir (29).

Başka bir çalışmada *Geitlerinema* cinsinden elde edilen fikosiyaninin serbest radikal süpürücü etkisi araştırılmıştır. 100 μ g/ml C-fikosiyanin eşit oranda 0.1 mM etanollü DPPH ile karıştırılmış ve 30 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Askorbik asit standart antioksidan olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak C-fikosiyanin 200 μ g/ml konsantrasyonda % 72.85 ± 2.1 aktivite göstermiştir. Aynı konsantrasyonda askorbik asitin ise % 99.82 ± 1.9 aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (8).

Doğal ürünler kanser kemoterapisinin temelini oluşturmaktadır ve siyanobakteriler doğal ürünler için zengin bir kaynaktır. Siyanobakteriler tarafından üretilen doğal bileşiklerin arasında C-fikosiyaninin kanser çalışmalarında ilginç sonuçlar ortaya koyduğu çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (Tablo 2.3. ve 2.4.) (24).

Tablo 2.3. C-Fikosiyaninin antitümöral olarak kullanıldığı *in vitro* çalışmalar.

Kanser Tipi / Hücre Hattı	C-Fikosiyaninin Etkisi	Kaynak
Sıçan histiyositik tümörü – Wistar sıçanlarının /AK-5 assitinden elde edilmiştir	Kaspaz-3 ve ROS aktivasyonu ile apoptoz uyarımı Bcl-2 aşırı ekspresyonu ile ROS inhibisyonu	(24)
İnsan Kronik Miyeloid Lösemi / K562	Hücre proliferasyonunda % 49'luk azalma Apoptoz Antiapoptotik protein Bcl-2 downregülasyonu Proapoptotik protein Bax'da değişim gözlenmemiştir	(24)
İnsan Servikal Epidermoid Karsinoma/ HeLa ve Çin hamster yumurtalığı /CHO	HeLa proliferasyonunda azalma CHO proliferasyonunda değişim görülmemiştir (selektivite) Bcl-2 ekspresyonunda azalma Kaspaz-2, -3, -4, -6, -8 ve -10 aktivasyonu Sitokrom C'nin mitokondriden salınımı	(24)
Baş ve boyun skuamöz karsinoma/ 686LN ve 686LN-M4C1 K562 HT-29 Kontrol Hücreleri: Lenfosit B, T/ROMI1788 VE C5/MJ	686LN-M4C1 hücreleri üzerinde yüksek proliferasyon inhibisyonu ve kansersiz hücre çoğalması üzerinde minör inhibisyon C-Fikosiyanin/ β alt ünitesi ile β tubülin ve GAPDH arasında etkileşim Mikrotübül ve aktin filamentlerinin depolimerizasyonu Apoptozda artış Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 'de artış	(24)
Meme kanseri/ MCF-7	Hücre proliferasyonunda azalma Kaspaz-9 ekspresyonu Sitokrom C salınımı Bcl-2 ekspresyonunun downregülasyonu	(24)

Tablo 2.3. C-Fikosiyaninin antitümöral olarak kullanıldığı *in vitro* çalışmalar (Devam).

Kanser Tipi / Hücre Hattı	C-Fikosiyaninin Etkisi	Kaynak
HepG2	Hücre proliferasyonunda azalma Apopitoz ve nekroz ROS artışı Mitokondrial zarar Sitokrom C salınımı Kaspaz- 3 aktivasyonu Hücre döngüsü arresti (G2/M)	(24)
Kolorektal Adenokarsinom/ HT-29 Akciğer Adenokarsinom/ A549	Apopitoz Antioksidan ve antiproliferatif aktivite DNA fragmentasyonu	(24)
Yumurtalık Adenokarsinom/ SKOV-3	Apopitozda %1.6 dan %19.8'e artış Kaspaz-3, -8 ve -9 aktivitelerinde artış ROS artışı HSP60 proteinleri, nükleolin, PSME3, Prdx-4 ve PPase artışı mtSSB proteininde artış	(24)

DNA: Deoksiribonükleik asit; ROS: Reaktif oksijen türleri; Bcl-2: B hücre lenfoma 2; GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz; PPase: Sitoplazmik inorganik fosfotaz; Prdx-4: Peroksiredoksin-4; PSME3: İnsan proteazom aktivatör-3 kompleksi alt ünitesi; MDR1: Multi-drug rezistans-1 geni; HSP60: Isı şoku proteini-60; mtSSB: Mitokondriyal tek zincirli bağlayıcı protein.

Tablo 2.4. C-Fikosiyaninin antitümöral olarak kullanıldığı *in vivo* çalışmalar.

Hayvan Modeli	Hücre Hattı	C-Fikosiyanin Etkisi	Kaynak
MCF-7 enjeksiyonlu BALB/c fareleri	MCF-7	Bağışıklık organlarında ağırlık artışı İmmünoisit proliferasyonunda artış Pro-apoptik Fas proteini ekspresyonunda artış Tümör ağırlığında azalma Anti-apoptik proteinler ve CD44 ekspresyonunda azalma	(24)
A549 enjeksiyonlu yetişkin sıçanlar	Akciğer kanseri (A549)	<i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> hücre çoğalmasının inhibisyonu; C-Fikosiyanin ve ATRA kombinasyonu ile antitümöral etkide artış C-Fikosiyanin+ATRA: CDK-4 ekspresyonunda azalma; Kaspaz-3 ekspresyonunda artış; apoptoz; bağışıklık uyarımı; TNF geninin upregülasyonu; Bcl-2 ve Siklin genlerinin downregülasyonu	(24)

ATRA: all-trans retionik asit; Bcl-2: B hücre lenfoma 2; TNF: tümör nekroz faktörü; CDK-4: Siklin bağımlı kinaz 4; CD44: hücre-yüzey glikoproteini.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Mikroalg İzolasyon ve Kültür Çalışmalarında Kullanılan Aletler

Akvaryum Pompası	: Champion
Hassas Terazi	: Mettler Toledo AL240
İnkübatör	: Gerhardt Thermoshake
Kültür Dolabı	: Uğur
Liyofilizatör	: Edwards-Modulyo
Lüks Metre	: Lutron LX-105
Manyetik Karıştırıcı	: Biosan Magnetic Stirrer MSH 300
Membran Filtre Ünitesi	: Sartorius SM 16309
Mikroskop	: Olympus CH40
Otoklav	: Hirayama HICLAVE HVE-50
pH Metre	: Mettler Toledo
Santrifüj	: Amersham Biosciences Ultraspec 1100 pro

3.1.2. Kimyasal Çalışmalarda Kullanılan Aletler

Derin Dondurucu	: (- 20 °C) Arçelik
Elektroforez	: Consort EV 243
Hassas Terazi	: Sartorius CP224S, Shimadzu AUW220D, Denver Instrument SI-234
Kromatografi Tankı	: Camag (cam küvet, 22x23x8 cm)
Liyofilizatör	: Christ Alpha 1-2 LD plus
Manyetik Karıştırıcı	: Heidolph
Mikro Plaka Okuyucu	: BIO-TEK, µQuant (MQX 200)
Otomatik Pipetler	: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (Gibson ve Transferpette)
Rotavapor	: Büchi R 200, Büchi R 210
Santrifüj	: Amersham Biosciences Ultraspec 1100 pro
Spektrofotometre	: Ultraspec 1100 pro

Ultrasonik Banyo	: Transsonic 570
UPC ²	: Waters Acquity UPC ² Sistemi
UV Lamba	: Camag
HPLC Sistemi	: Waters (Waters 600 pompa, Waters 600 controller, Waters 996 photodiode array dedektör)

3.1.3. Biyolojik Etki Çalışmalarında Kullanılan Aletler

CO ₂ İnkübatörü	: Sanyo MCO-18AIC (UV)
Çalkalamalı Su Banyosu	: Major Science
Derin Dondurucu	: (-20 °C) Arçelik (-80 °C) Nüve Direct freze 290
Etüv	: Elektro-mag
Hassas Terazî	: Sartorius CP224S, Shimadzu AUW220D, Denver Instrument SI-234
İnverted Mikroskop	: Leica DMIL LED
Laminar Air Flow Kabini	: Chemocell LRCx-UV (Teknomar)
Mikroplaka Okuyucu	: BIO-TEK, µQuant (MQX 200)
Otoklav	: Autoclave HS 9041
Otomatik Pipetler	: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (Gibson ve Transferpette)
Santrifüj	: UniGen 15D, Herolab
Ultrasonik Banyo	: Transsonic 570

3.2. Yöntemler

3.2.1. Su Örnekleri Alınması

Afyonkarahisar ilinde bulunan 2 farklı termal su havzasından 2013 yılı Ocak ayında su numuneleri alınmıştır.

Heybeli termal su havzası Afyonkarahisar-Konya karayolu üzerinde bulunup Afyonkarahisar merkezine 30 kilometre mesafededir. Bu havzada yer alan Heybeli termal tesislerinin ana su çıkış merkezinden 5 litre temiz su ve atık su merkezinden 5 litre atık su numuneleri alınmıştır. Aynı havzada yer alan Pazarağaç termal tesisinin ana su çıkış merkezinden de 5 litre temiz su alınmıştır. Numunelerin alındığı iki termal tesisteki suyun sıcaklıkları 30-56.5 °C arasındadır.

Ömer-Gecek termal su havzası Afyonkarahisar-Kütahya karayolu üzerinde bulunup Afyonkarahisar merkezine 14-18 kilometre uzaklıkta yer almaktadır. Suyun sıcaklığı 46-71 °C'dir. Gecek termal kaplıcasının suyun ana çıkış merkezinden 5 litre temiz su numunesi alınmıştır.

Mikroalg izolasyon çalışmalarında elde edilecek mikroalg çeşitliliğini arttırmak amacıyla atık sulardan da numune alınması hedeflenmiştir; ancak Heybeli termal tesisleri dışında diğer termal tesislerin atık suları kapalı sistem ile deşarj edildiği için sadece Heybeli termal tesislerinden atık su numunesi alınabilmektedir.

3.2.2. Su Örnekleri Analizi

Her bir kaynaktan alınan su numunelerinin (2.5 litre) kimyasal analizleri İzmir Su ve Kanalizasyon İdaresi Genel Müdürlüğü bünyesindeki Çevre Koruma ve Kontrol Dairesi Başkanlığı'na bağlı laboratuvarda gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Mikroalg İzolasyon Çalışmaları

Afyonkarahisar ilinin iki farklı termal su havzasından alınan dört su örneğinden tek tür mikroalg elde etme çalışmaları Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü Mikroalg Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Gecek termal, Heybeli termal ve Pazarağaç termallerinin kuyu çıkış noktalarından alınan termal su örnekleri ve Heybeli termal atık su çıkışından alınan su örneği kültür ortamı hazırlamak için kullanılmıştır. Sular membran sistemi ile 0.45 µm

Whatman filtreden süzöldükten sonra BG11 (Blue-Green medium) ve Allen katı ve sıvı kÖltür ortamları hazırlanmıştır. Bu ortamların içerikleri Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.'de verilmiştir. Hazırlanan ortamlar otoklavda 121 °C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra petri kaplarına aktarılan katı ortamların oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Sıvı ortamlar ise steril test tüplerine 5 ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

Alınan 4 su numunesinden, öze kullanılarak petrilerdeki katı kÖltür ortamlarına çizgi ekim gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan petriler, 30 °C'de, 100 lüks ışık şiddeti altında 10 gün boyunca kÖltür dolabında inkübe edilmiştir. 10 gün sonunda petrilerdeki üreme gözlemlenmiştir. Baskın türlerin koloni oluşturduğu gözlenerek, petri kabının bu bölgelerinden alınan örneklerin öze yardımıyla yeni ortama ekimi yapıp, 10 günlük inkübasyon sürecine devam edilmiştir. Bu işlem birçok kez tekrarlanmıştır.

Su örneklerindeki türleri tek türe indirgeyebilmek için, petrilere alınan örnekler tüpler içindeki sıvı kÖltür ortamlarına transfer edilmiştir. Tüpler çalkalamalı inkübatörde, 30 °C'de, 100 lüks ışık şiddeti altında 10 gün boyunca inkübe edilmiştir. 10. günün sonunda mikroskobik inceleme yapılmış ve kÖltürün durumuna bakılmıştır. KÖltür tek türe indirgenene kadar sıvı ortamdan-katı ortama, katı ortamdan-sıvı ortama alma işlemlerine devam edilmiştir. Her aşamada inkübasyon süreci devam etmiş ve mikroskobik inceleme yapılmıştır. İzolasyon çalışmaları 4 ay sürmüştür.

3.2.4. Mikroalg Tanımlama Çalışması

Mikroalg izolasyon çalışmaları sonucu alınan 4 farklı su numunesinden 4 farklı mikroalg elde edilmiştir. Bu mikroalglerin tanımlanması için her biri kendi termal sularında olmak üzere BG11 kÖltür ortamı steril olarak hazırlanmıştır. 100 ml'lik erlenlerde 90 ml kÖltür ortamına 10 ml inokülasyon yapılmıştır. Erlenler çalkalamalı inkübatörde, 30 °C'de, 100 lüks ışık şiddeti altında 15 gün boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süreci sonunda, 16S ribozomal RNA geninin 500 baz çiftlik bir bölümünün veya hepsinin PCR ile çoğaltılması ve DNA dizi analizi yapılarak, dizi verilerinin onaylanmış mikrobiyal dizileri içeren dizi veri tabanlarındaki dizilerle karşılaştırılması yöntemi kullanılarak, mikroalglerin hangi gruba ait oldukları REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'nde tespit edilmiştir.

Tablo 3.1. Mikroalg izolasyon çalışmalarında kullanılan BG11 kültür ortamı içeriği.

<u>Ortam</u>	<u>Kimyasal İçerik</u>	<u>Stok</u>
Termal su (ml/1000 ml)		Termal su (g/1000 ml)
10	NaNO ₃	150
10	K ₂ HPO ₄	4
10	MgSO ₄ .7H ₂ O	7.5
10	CaCl ₂ .2H ₂ O	3.6
10	Sitrik asit	0.6
10	Ferrik Amonyum Sitrat	0.6
10	EDTA (disodyum magnezyum tuzu)	0.1
10	Na ₂ CO ₃	2
1	<u>İz Metal Çözeltisi</u>	<u>Distile su (g/1000 ml)</u>
	H ₃ BO ₃	2.86
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.390
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.0494

Tablo 3.2. Mikroalg izolasyon çalışmalarında kullanılan Allen kültür ortamı içeriği.

<u>Ortam</u>	<u>Kimyasal İçerik</u>	<u>Stok</u>
Termal su (ml/1000 ml)		Termal su (g/1000 ml)
10	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.25
5	MgSO ₄ .7H ₂ O	3.75
5	K ₂ HPO ₄	3.75
5	Na ₂ CO ₃	2
10	NaSiO ₃ .7H ₂ O	2.9
1	Sitrik Asit	3
1	<u>PIV Metal Solüsyonu</u> 1000 ml termal suya 0.750 g Na ₂ EDTA ilave edilir ve çözüldükten aşağıdaki maddeler ilave edilir.	-
	FeCl ₃ .6H ₂ O	97 mg
	MnCl ₂ .4H ₂ O	41 mg
	ZnCl ₂	5 mg
	CoCl ₂ .6H ₂ O	2 mg
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	4 mg

3.2.5. Mikroalg Üretim Çalışmaları

Tür tanımlaması çalışmaları sonucu mikroalglerin siyanobakteri grubuna ait olduğu tespit edilen türler, tez çalışmamızın diğer aşamalarında kullanılmak üzere çoğaltılmıştır. Kültür ortamı olarak, siyanobakterilerin ürediği ortamlardan biri olan BG11 ortamı seçilmiştir. Ortam dört farklı su örneğinde yaşayan siyanobakterilerin termal su kaynakları kullanılarak hazırlanmıştır.

Petrilerde bulunan kolonilerden BG11 sıvı ortamı içeren 10 ml'lik test tüplerine ateş yanında öze yardımıyla aktarım yapılmıştır. 10 gün sonunda 10 ml'lik tüpler alt kültürleme yolu ile tekrar çoğaltılıp, inkübasyona bırakılmıştır. 10 gün inkübasyonda kalan tüplerdeki steril sıvı, BG11 içeren 100 ml'lik erlenlere

aktarılmıştır. 100 ml'lik erlenlerin inkübasyonu tamamlandıktan sonra 250 ml'lik erlenlere aktararak ölçek büyütme devam edilmiştir. 250 ml'lik erlenlerden birkaçı stok kültür olarak muhafaza edilirken, diğerleri 2 litrelik şişelere ölçek büyütme amacıyla aşı kültürü olarak kullanılmıştır.

2 litrelik kültürler hava beslemesi için, 10 ml hacimli cam pipetlerin ucu kesilmiş ve içinde pamuk bulunan 5 mm iç çapa sahip silikon hortum bağlanmıştır. Tüm bağlantıların dış ortama temas edecek kısımları pamuk ve alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra sterilizasyon için 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Sterilizasyonun havalandırma esnasında devam etmesi için havalandırma hortumunun pipetle olan bağlantısına 0.45 µm şırınga filtresi bağlanmıştır.

250 ml'lik aşı kültürlerinden 200 ml alınarak 1800 ml termal suda BG11 içeren kültür ortamına aktararak hacim 2 litreye tamamlanmıştır. Ekimleri yapılan siyanobakteriler 25 mmol m⁻² s⁻¹ ışık şiddeti, 2 litre/dakika havalandırma hızı ve 28 ± °C sıcaklıkta 16 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.1.). 16 günlük üretim periyodu 5 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.1. İzole edilen siyanobakterilerin üretimi.

Üretim periyodunu tamamlamış kültür ortamları 1500 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek ortam sıvısının ayrılması sağlanmıştır. Santrifüj edilen biyokütleler 2 kez distile su ile yıkanarak tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda elde edilen biyokütleler buzdolabında dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir. Elde

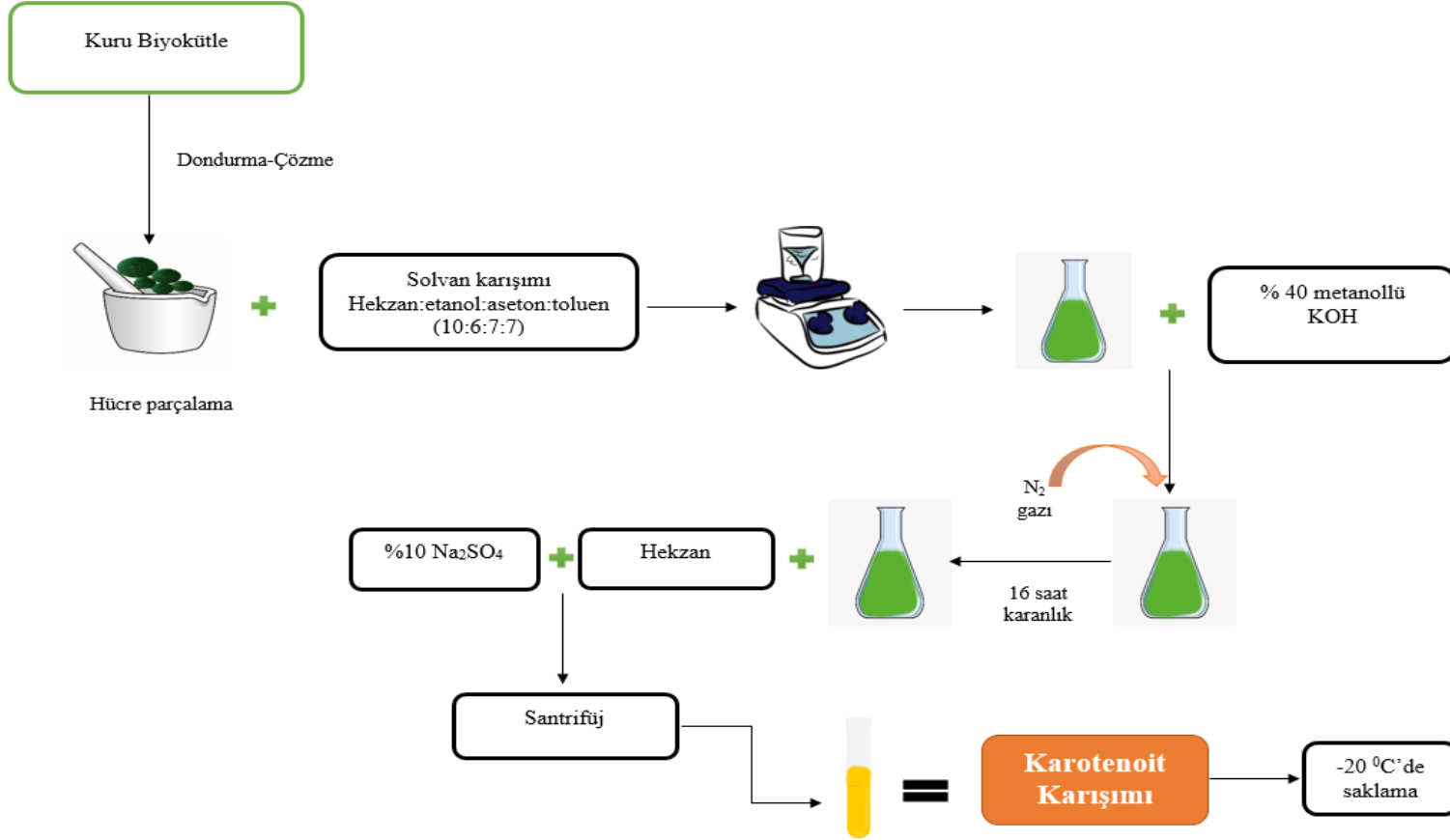
edilen kuru biyokütle tez çalışmamızın diğer aşamalarında kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.6. Karotenoit Ekstraksiyon Çalışmaları

Kurutulmuş biyokütlelerin, kimyasal ve biyolojik etki çalışmalarında kullanılmak üzere karotenoitlerin elde edilmesi için hekzan ekstraktları hazırlanmıştır. Elde edilen siyanobakteri hekzan ekstraktlarında karotenoit profillerinin karşılaştırılması için kantaksantin, β -karoten ve astaksantin standartları ile *Spinacea oleracea* hekzan ekstresi kullanılmıştır.

Liyofilize siyanobakteri biyokütlelerinden 2 g tartılarak -20 °C'de dondurulmuş biyokütleler hücre duvarının parçalanması için havanda dövülmüştür. Bu işlem üç kere tekrarlanmıştır. Biyokütlelerin üzerine 60 ml hekzan:etanol:aseton:toluen (10:6:7:7) solvan karışımı eklenmiş ve 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından, saponifikasyon için karışıma oda sıcaklığında 4 ml % 40'lık metanollü potasyum hidroksit karışımına eklenmiş ve oksidasyonu engellemek için karışımdan azot gazı geçirilmiştir. 16 saat karanlık ortamda bekletilmiştir. 16 saat sonunda 60 ml hekzan eklenerek 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. % 10'luk sodyum sülfat çözeltisi eklenerek iki faz oluşuncaya kadar beklenmiştir. Karotenoitleri içeren üst faz bir erlende toplanmıştır. Alt faz tekrar ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Ekstraksiyon işlemi üç kez tekrarlanmıştır (30).

Toplanan süpernatant, hücre kalıntılarında ayrılması için 4500 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra birleştirilen ekstraktların, rotavaporda vakum altında 40 °C'de çözücüleri uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstraktlar tez çalışmamızda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. Ekstraksiyon aşamaları Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Karotenoit ekstraksiyon aşamaları.

İspanak (*Spinacea oleracea*) tez çalışmamızda karotenoitler için standart olarak kullanılmak üzere marketten satın alınmıştır. Bitki küçük parçalara ayrıldıktan sonra liyofilizatörde kurutulmuştur. 20 g kuru bitki -20 °C’de dondurulmuş ve donmuş bitki ekstraksiyonun verimini arttırmak için havanda dövülmüştür. Bu işlem üç kere tekrarlanmıştır.

Dondurma-çözme işleminin sonunda 600 ml hekzan:etanol:aseton:toluen (10:6:7:7) solvan karışımı eklenmiş ve 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından, saponifikasyon için oda sıcaklığında, karışıma 40 ml % 40’lık metanollü potasyum hidroksit karışıma eklenmiş ve karışıma oksidasyonu engellemek için karışımdan azot gazı geçirilmiştir. 16 saat karanlık ortamda bekletilmiştir. 16 saat sonunda 600 ml hekzan eklenerek 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. % 10’luk sodyum sülfat çözeltisi eklenerek iki faz oluşuncaya kadar beklenmiştir. Karotenoitleri içeren üst faz bir erlende toplanmıştır. Alt faz tekrar ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Ekstraksiyon işlemi üç kez tekrarlanmıştır (30).

Toplanan süpernatant, hücre kalıntılarında ayrılması için 4500 g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra birleştirilen ekstrelerin, rotavaporde vakum altında 40 °C’de çözücüleri uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstre tez çalışmamızda karotenoit standartı olarak kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır. Ekstraksiyon aşamaları Şekil 3.2.’de verilmiştir.

3.2.7. Hekzan Ekstrelerinin Karotenoit Profillerinin İnce Tabaka Kromatografisi ile Analizi

Dört farklı siyanobakteri türünden elde edilen karotenoit karışımlarının standartlarla ve birbirleriyle karşılaştırılması için ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır. Adsorban olarak alüminyum tabanlı hazır silika jel plak (Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.20 mm, Merck, Art. 5554) ve solvan sistemi olarak petrol eteri: siklohekzan: etil asetat: aseton: etanol (60:16:10:10:6) kullanılmıştır (31). Numuneler, pastör pipeti kullanılarak plağın alt ucundan 1 cm yukarısına ve tatbik noktaları arasında en fazla 1 cm olacak şekilde tatbik edilmiştir. Kromatografi tankına koyulan plağın 7- 10 cm

sürüklenmesi beklenmiştir. Lekeler, UV₂₅₄ ve UV₃₆₆ nm’de (Camag UV lambası) gözlenen floresans ile belirlenmiştir.

3.2.8. Hekzan Ekstrelerinin Karotenoit Profillerinin HPLC ile Analizi

Dört farklı siyanobakteri türünden elde edilen karotenoit karışımlarında bulunan karoten ve ksantinleri, standartlarla karşılaştırarak belirlemek ve karotenoit profilleri arasındaki farkları görebilmek için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılmıştır.

HPLC sisteminde kullanılan kolon Hichrom- Nucleosil 100-5 C18 ve mobil faz ise - izokratik asetonitril:diklorometan:metanol (70:20:10)’dür (32). Enjeksiyon hacmi 20 µl, akış hızı 1.0 ml/dk, kolon sıcaklığı oda sıcaklığı ve dalga boyu 210-600 nm olarak belirlenmiştir.

Standart olarak kullanılan β -karoten ve kantaksantin Sigma-Aldrich Chemie GmbH’den satın alınmıştır. Lutein standartı olarak, piyasada gıda takviyesi olarak satılan ticari bir ürün kullanılmıştır. Tüm ekstre ve standartlar kloroformda çözülerek HPLC örnekleri hazırlanmıştır.

3.2.9. UPC² ile Hekzan Ekstrelerinde β -Karoten Miktar Tayini

UPC², mobil fazlardan birinin CO₂ olduğu, süperkritik akışkan kromatografisi ve ultra performans sıvı kromatografisi prensiplerine dayanan bir kromatografisi sistemidir. HPLC ile elde edilen kromatogramlarda 4 siyanobakteri türünden hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen karotenoit karışımlarında major bileşiğin β -karoten olduğu tespit edilmiştir. UPC² sistemi ile ekstrelerde β -karoten miktar tayini yapılmıştır.

UPC² sisteminde kullanılan kolon HSS C18 SB (3x100 mm, 1.8 µm)ve mobil faz ise A: CO₂, B: Etanol’dür. Enjeksiyon hacmi 2 µl, akış hızı 1.5 ml/dk, kolon sıcaklığı 40 °C ve dalga boyu 440 nm olarak belirlenmiştir. Kullanılan dedektör photodiode array detektördür.

Dört siyanobakteriden elde edilen, karotenoit karışımları 1 mg/ ml olacak şekilde, hekzanda çözülerek UPC² örnekleri hazırlanmıştır. Standart olarak Sigma β -karoten kullanılmıştır. β -Karoten standartı kloroform içinde 1 mg/ml olacak şekilde

çözümüştür. UPC² sisteminde kullanılan mobil faz gradienti Tablo 3.3.'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. UPC² sisteminde kullanılan mobil faz gradienti.

	Zaman (dakika)	Akış hızı (ml/dk)	%A	%B
1	Başlangıç	1.5	95.0	5.0
2	5.00	1.5	80.0	20.0
3	6.00	1.5	80.0	20.0
4	6.01	1.5	95.0	5.0
5	8.00	1.5	95.0	5.0

3.2.10. Kuru Siyanobakteri Biyokütlelerinde β -Karoten Miktar Tayini

Dört siyanobakteri türünün kuru biyokütlelerinde bulunan β -karoten miktarı karotenoit karışımlarının elde edildiği kuru biyokütle miktarı ve UPC² sistemi ile tespit edilen β -karoten miktarı bulguları üzerinden hesaplanarak bulunmuştur. Bunun için aşağıda verilen formül kullanılmıştır:

Kuru biyokütleden elde edilen karotenoit karışımı (mg) x β -Karoten miktarı (mg) / Kuru Biyokütle (g)

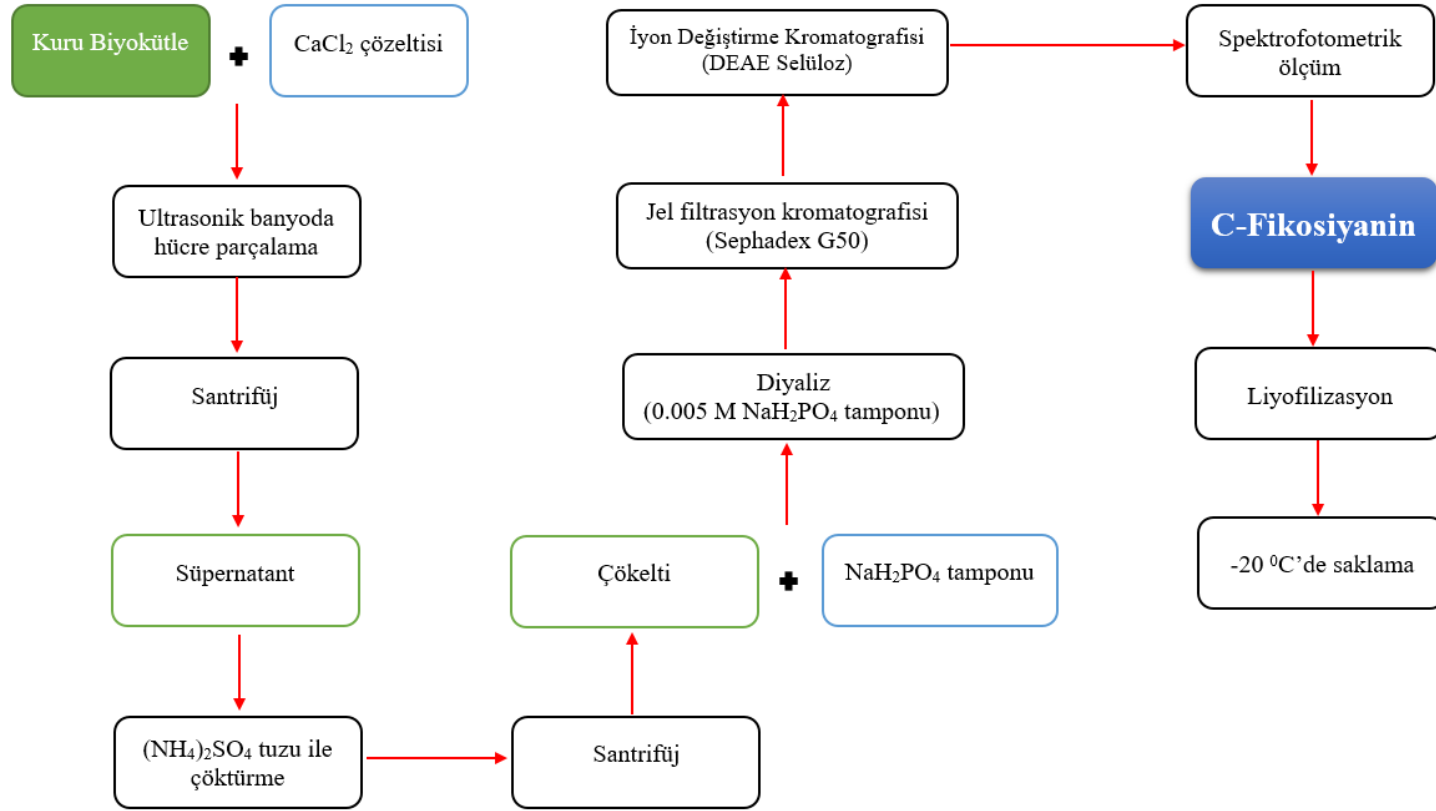
3.2.11. C- Fikosiyanin Elde Edilmesi için Sulu Ekstrelerin Hazırlanması ve C-Fikosiyaninin Saflaştırılması

Liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuş ve -20 °C’de muhafaza edilmiş kuru siyanobakteri biyokütlelerin her birinden yaklaşık 1 gr tartılarak C-fikosiyanin ekstraksiyon işlemine başlanmıştır.

C-Fikosiyaninin hücre içinden alınabilmesi için kuru biyokütleler CaCl_2 (% 1.5 ağırlık/hacim) içeren çözelti içerisine ilave edildikten sonra çalkalamalı inkübatörde 1 gece inkübe edilmiştir. CaCl_2 hücre zarlarında deformasyona neden olarak hücre içeriğinde bulunan ve suda çözünen maddelerin dışarı salınımını sağlamasına rağmen polisakkarit yoğunluğuna sahip siyanobakteri hücrelerinin CaCl_2 penetrasyonu için ultrasonik banyo kullanılmıştır ve santrifüj yardımıyla hücre parçaları uzaklaştırılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen süpernatant kademeli olarak amonyum sülfat tuzu ile doyurulmuştur. C-Fikosiyanin elde etme aşamaları Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.’te gösterilmiştir.

C-Fikosiyanin elde edilmesinde amonyum tuzlarının uzaklaştırılması amacıyla Sigma D6191 diyaliz torbaları kullanılarak diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Tampon çözelti olarak kullanılan sodyum-fosfat tamponu hazırlamak için baz olarak kullanılan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ’dan 0.78 g, asit olarak kullanılan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ’dan 1.34 g tartılarak 1 litreye tamamlanmıştır. Diyaliz torbaları kaynamış suda 1 saat bekletilmiştir ve torbaların sodyum kanallarının tamamen açılması için suya EDTA eklenmiştir. %70’lik amonyum sülfat ile çöktürme ardından gerçekleştirilen santrifüj işlemi sonucu elde edilen çökeltiliye 5 ml tampon ilave edilmiştir. Örnekler, 0.005 molar sodyum-fosfat tamponuna karşı 5 saat boyunca diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi sonucu elde edilen örneklerin spektrofotometrik ölçümleri yapılarak fikosiyanin miktarı hesaplanmıştır.

Diyaliz sonucu elde edilen örnekler Sephadex G50 dolgulu 3x30 cm’lik kolondan geçirilmiştir. Kolon hazırlamak için, 6 g Sephadex G50, 5 ml tampon ile karıştırılarak jel doyana kadar tampon eklenmeye devam edilmiş ve 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Kolon dolgu maddesi proteinde boyut ayrımı yaptığı için seyreltik ve derişik iki fraksiyon toplanmıştır.



Şekil 3.3. C-Fikosiyenin elde etme aşamaları.



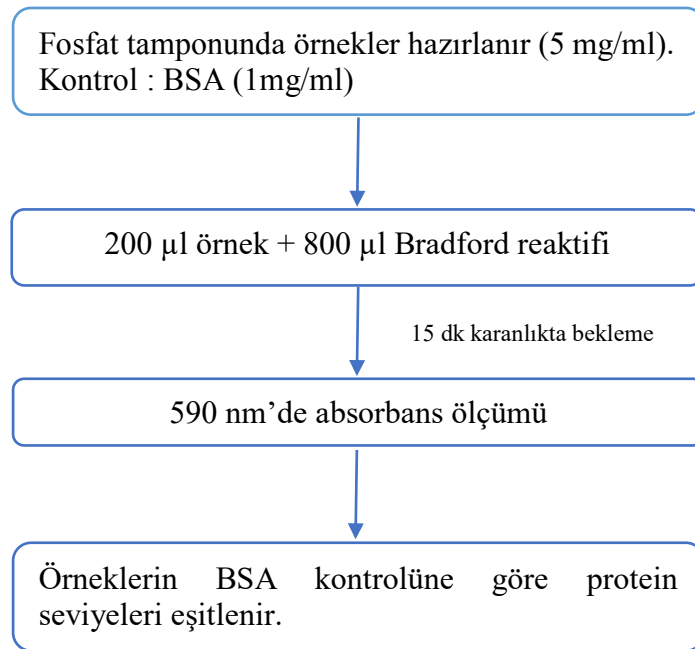
Şekil 3.4. C-Fikosiyanin saflaştırma aşamaları. a) İnkübasyon, b) Sonikasyon, c) Santrifüj, d) Amonyum sülfat tuzu ile doyurma, e) Diyaliz, f) Sephadex G50 kromatografisi ve DEAE selüloz iyon değiştirme kromatografisi g) DEAE selüloz iyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırma, h) Toplanan fraksiyonlar, i) Liyofilizasyon.

Bir önceki aşamada toplanan fraksiyonlar, DEAE-Selüloz İyon Değiştirme kolonuna yüklenerek, ayırma ve saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kolon hazırlanmasında, 5 g DEAE-Selüloz dolgu maddesi tartılıp tampon ile doyurulmuş ve 3x30 cm boyuntundaki cam kolona doldurulmuştur. Hareketli faz olarak farklı konsantrasyonlarda tampon+tuz çözeltileri kullanılmıştır. Çözelti konsantrasyonları % 1, % 2, % 2.5, % 3, % 3.5 ve % 4 olarak hazırlanmıştır. Elüsyonların saflık derecelerinin belirlenmesi için spektrofotometre yardımıyla 620 nm ve 280 nm’de absorbansları ölçülerek A620/280 oranı 3 ve 3’ün üzerinde saflık derecesine sahip elüsyonlar birleştirilmiş ve liyofilizatörde kurutulmuştur (27, 33).

3.2.12. C- Fikosiyanin Saflık Tayini

Bradford Protein Tayini

SDS-PAGE ile C-fikosiyanin saflık tayini yapmadan önce örneklerde protein varlığının tespit edilmesi gerekmektedir. Bunun için, fosfat tamponunda çözülmüş örnekten 200 µl alınarak, 800 µl Bradford reaktifi ile karıştırılmış, 15 dk karanlıkta bekletildikten sonra 590 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. 1 mg/ml BSA (bovine serum albümin) hazırlanıp kontrol olarak kullanılmıştır (34).



Şekil 3.5. Bradford protein tayin yöntemi.

Dört farklı C-fikosiyanin örneğinden 5 mg alınıp, 1 ml taponda çözülmüş ve BSA kontrolüne göre protein seviyeleri eşitlenmiştir. Bu sayede SDS-PAGE jeline eşit miktarda protein içeren örneklerin yüklenmesi sağlanmıştır. Bradford protein tayin yöntemi Şekil ‘de gösterilmiştir.

SDS-PAGE Yöntemi ile C-Fikosiyanin Saflık Tayini

SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilkamit jel elektroforezi) yöntemi ile kromatografik yöntem basamakları sonucu elde edilmiş elüsyonlardaki C-fikosiyaninin saf olup olmadığı tayin edilmiştir (35). Standart olarak Sigma P2172 C-fikosiyanin kullanılmıştır.

SDS-PAGE yöntemi için alt jel (resolüsyon yürütme jeli) ve üst jel (yükleme jeli) olmak üzere iki farklı jel hazırlanmıştır. Üst jele örnekler yüklenirken, alt jel elektrik akımı sayesinde örneklerin yürütülmesi için kullanılmıştır. Üst jel hazırlanırken akrilamid, Tris (0.5 M, pH 6.8), APS (amonyum persülfat), SDS (sodyum dodesil sülfat) ve distile su belli oranlarda karıştırılmıştır. Alt jel için ise üst jel için kullanılan aynı bileşenler kullanılmıştır; aradaki fark kullanılan Tris çözeltisinin molaritesi, 1.5 M, ve pH'sıdır, pH 8.8 (Tablo 3.4.). Hazırlanan alt jel, elektroforez plakları arasına dökülmüş ve jelin polimerleşerek donması için bir süre beklenmiştir. Donma gerçekleştikten sonra üzerine üst jel dökülmüş ve elektroforez tarağı örneklerin yüklenmesi için gerekli yuvaların oluşması için jele yerleştirilmiştir. Jelin donması beklendikten sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Jelin yürütme tamponu için 3 g Tris, 14.414 g glisin ve 1 g SDS tartılmış, 1 litre distile su içinde çözülmüş ve elektroforez sistemi içindeki hazneye boşaltılmıştır.

Örnekler jele yüklenmeden önce proteinlerin boyanması gerekmektedir. Boya çözeltisi hazırlanmıştır. Örnek:Boya (denatürasyon) çözeltisi (1:2) olacak şekilde karıştırılmış ve 5 dakika boyunca 95 °C'de bekletildikten sonra santrifüjlenen örnekler jele yüklemeye hazır hale getirilmiştir. Jele yüklemeye hazır olan örnekler ve standarttan 15'er µl alınarak yükleme yapılmıştır. 150 V, 45 mA, 7 W koşullarında 1 saat elektroforez işlemi devam etmiştir.

Tablo 3.4. SDS-PAGE sisteminde kullanılan jellerin içerikleri.

Alt jel (resolüsyon yürütme jeli)	
Bileşen	Miktar (ml)
% 40 Akrilamit	0.625
Tris-1.5 M, pH 8.8	0.625
% 10 APS (Amonyum persülfat)	0.05
% 10 SDS (Sodyum dodesil sülfat)	0.05
TEMED (N, N, N', N'- tetrametil-etilendiamin)	0.005
Distile su	3.65
Üst jel (yükleme jeli)	
Bileşen	Miktar (ml)
% 40 Akrilamit	0.625
Tris-0.5 M, pH 6.8	0.625
% 10 APS (Amonyum persülfat)	0.05
% 10 SDS (Sodyum dodesil sülfat)	0.05
TEMED (N, N, N', N'- tetrametil-etilendiamin)	0.005
Distile su	3.65

Elektroforez işlemi sonrası elde edilen jel boyama (stain) çözeltisi ile boyanarak protein hizaları görünür hale getirilmiş ve boyama çözeltisinde 20 dakika çalkalanmıştır. Boyanan jeldeki fazla boyanın arındırılması için destain solüsyonu hazırlanmış ve jel 3 saat boyunca bu solüsyonun içinde çalkalanmıştır. SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltilerin içerikleri Tablo 3.5.'te verilmiştir. İşlemler sonunda fazla boyadan arındırılmış jel üzerindeki protein bantları standart madde bantları ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 3.5. SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltilerin içerikleri.

Protein boyama (denatürasyon) çözeltisi	
Bileşen	Miktar (ml)
Distile su	3.55
Tris-0.5 M, pH 6.8	1.25
Gliserol	2.5
% 10 SDS (Sodyum dodesil sülfat)	2.0
% 5 Bromfenol mavisi	0.2
β -merkaptetanol*	0.5
* β -merkaptetanol, diğer bileşenler karıştırıldıktan sonra toplam hacim üzerine eklenir.	
Boyama çözeltisi	
Bileşen	Miktar (ml)
Glasiyel asetik asit	100
MeOH	500
Distile su	100
0.5 g Commasie mavisi, 100 ml Glasiyel asetik asit içerisinde çözülür. Çözelti üzerine MeOH ve distile su eklenerek hacim 1 litreye tamamlanır.	
Yıkama çözeltisi	
Bileşen	Miktar (ml)
Glasiyel asetik asit	25
MeOH	50
Distile su	175

3.2.13. Biyolojik Etki Çalışmaları

Radikal Süpürücü Etkinlik Tayini

Geitlerinema sp., *Oscillatoria* sp., *Leptolyngbya* sp. (a) ve *Leptolyngbya* sp. (b) siyanobakterilerinin karotenoit karışımları ile bu siyanobakterilerden izole edilmiş C-fikosiyantinlerin DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] radikallerini süpürücü etkileri araştırılmıştır.

Deneysel hataları en aza indirmek ve istatistiksel hesaplamalar için aynı anda en az üç kuyucuk olacak şekilde, en az iki tekrarlı olarak yürütülen deneyler sonunda, konsantrasyona karşı % radikal süpürücü etkinlik grafikleri çizilmiştir.

Biyootografik Yöntem ile DPPH Radikali Süpürücü Etki Tayini

Karotenoit karışımlarının DPPH radikalini süpürme etkilerine yönelik ön bilgi edinilmesi için uygulanmıştır. Buna göre DPPH radikalini metanollü 0.4 mM'lik çözeltisi hazırlanmıştır. Karotenoit karışımları ve β -karoten, kantaksantin ve astaksantin standartları pastör pipeti yardımı ile silika jel plağa (Alüminyum tabanlı hazır plak, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.20 mm, Merck, Art. 5554), plağın alt ucundan 1 cm yukarısına tatbik edilmiştir. Solvan sistemi olarak petrol eteri: sikloheksan: etilasetat: aseton: etanol (60:16:10:10:6) kullanılmış ve 10 cm boyunca sürüklenme sağlanmıştır (31).

Kuruyan plağın üzerine hazırlanan DPPH çözeltisi pülverizatör yardımı ile tatbik edilmiştir. Radikal süpürücü etki gösteren lekeler, mor zemin üzerinde sarı renkli olarak gözlenmiştir (36).

Spektroskopik Yöntem ile DPPH Radikali Süpürücü Etki Tayini

DPPH radikalini MeOH ile hazırlanan çözeltisinin spektroskopik olarak renk değişiminin ölçümüne dayanan bir tayin yöntemidir. Askorbik asit (AA) ve 3-*ters*-butil-4-hidroksianizol (BHA) referans bileşikler olarak kullanılmıştır. Dört farklı türden elde edilen karotenoit karışımlarının ve izole edilen C-fikosiyaninlerin metanol ile hazırlanan farklı konsantrasyonlarına ait çözeltilerden 200 μ l alınarak, üzerine 50 μ l 1mM DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. Karanlıkta, 30 dakika bekletildikten sonra 517 nm'de absorbansları ölçülmüştür.

DPPH radikali süpürücü etki, numune çözeltilerinin absorbansının DPPH ve çözücü içeren çözeltinin (kör) absorbansı ile karşılaştırılması sonucu tayin edilmiştir (37).

ABTS Radikali Süpürücü Etki Tayini

ABTS⁺ radikali 7 mM ABTS ve 2.45 mM potasyum persülfatın oda sıcaklığında karanlık ortamda 16 saat boyunca inkübe edilmesiyle oluşur. ABTS

çözeltilisinin absorbanası 734 nm’de ölçüm yapılarak 0.700 ± 0.050 olacak şekilde % 80’lik etanol ile ayarlanır.

Karotenoit karışımlarının ve C-fikosiyaninlerin % 80’lik etanol veya saf su içinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinden 130 µl alınmış ve üzerine 50 µl, absorbanası önceden ayarlanmış ABTS⁺ çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 6 dakika inkübe edildikten sonra 734 nm’de absorbanas ölçümü yapılmıştır. Troloks’un 0-15 µM çözeltileri referans olarak kullanılmıştır (38).

Sitotoksik Etki Tayini

Sitotoksik etki tayinleri, MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] bileşiğinin, canlı hücre mitokondrilerinde parçalanması sonucu reaksiyon göstermesine dayanan ve Mossman tarafından geliştirilen yöntemin modifiye edilmiş hali ile gerçekleştirilmiştir (37, 39, 40). Canlı hücrelerdeki dehidrogenaz enzimi MTT’yi mor renkli formazan yapısına indirger. Yöntem canlı hücrelerin oluşturduğu rengin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (39).

Tez çalışmamızda HeLa (insan servikal epidermoid karsinoma) kanser hücre serileri ve L929 (fare fibroblast) sağlıklı hücre serileri kullanılarak sitotoksik etki tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Sitotoksik etki tayin çalışmaları, hataları en aza indirmek ve istatistiksel hesaplamalar yapmak amacıyla aynı çalışmada en az 3 kuyucuk olacak şekilde yürütülmüştür. Aynı karotenoit karışımı ve C-fikosiyanin için deneyler en az 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

HeLa hücre serileri için % 10 dana serumu, % 1 L-glutamin ve % 0.5 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren MEM vasatı; L929 hücre serileri için ise %10 dana serumu, % 1 L-glutamin ve %0,5 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren DMEM vasatı kullanılmıştır. HeLa (1×10^5 hücre/ml) ve L929 (1×10^5 hücre/ml) serilerinin uygun sayıda hücre içeren süspansiyonları hazırlanmıştır. Numune dilüsyonları MEM ve DMEM vasatları ile yapılmıştır.

Hazırlanan hücre süspansiyonları 100’er µl olacak şekilde 96’lık plakalara dağıtılmış ve 24 saat, 37 °C’de ve % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Böylece hücrelerin çoğalması sağlanmıştır. İnkübasyon sürecinden sonra plakadaki kuyucuklar içindeki vasat uzaklaştırılmış ve yerine numunelerin vasat içerisinde hazırlanmış farklı

konsantrasyonlardaki çözeltilerinden 100'er µl olmak üzere kuyucuklara eklenerek, 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreci sonucunda numune çözeltileri uzaklaştırılarak 100 µl taze vasat ilave edilmiş ve bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Taze vasat ilavesinin ardından tüm kuyucuklara 10 µl MTT çözeltisi (5 mg MTT/1 ml PBS) eklenerek 4 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kuyucuklardaki vasat uzaklaştırılmıştır. Hücrelerde oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için her kuyucuğa 100 µl DMSO (dimetilsülfoksit) ilave edilmiştir. Plakaların çalkalayıcıda 5 dakikalık çalkalanmasının ardından 577/655 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür.

Sitotoksik etki tayini, kör (sadece vasat içeren kuyucuklar) absorbansı ile numune ile muamele edilmiş kuyucukların absorbansının karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. Etopozit ve sisplatinin 2-100 µg/ml konsantrasyonları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamızın bulguları; farklı jeotermal kaynaklardan elde edilen mikroalglerin tanımlamaları, tanımlanan türlerin temel metabolitlerinden olan karotenoitler ile C-fikosiyanınların çeşitli kromatografik yöntemlerle belirlenerek, elde edilmeleri, çözelti halinde ve kuru biyokütlelerdeki miktarlarının tayin edilmesi ve bu iki bileşik grubunun serbest radikal süpürücü ve sitotoksik etkilerinin araştırılması sırasıyla, çeşitli alt başlıklar altında verilmiştir.

4.1. Mikroalg İzolasyon Çalışmalarına ait Bulgular

REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'ne gönderilen örneklerde, 16S ribozomal RNA geninin 500 baz çiftlik bir bölümünün veya hepsinin PCR ile çoğaltılması ve DNA dizi analizi yapılarak, dizi verilerinin onaylanmış mikrobiyal dizileri içeren dizi veri tabanlarındaki dizilerle karşılaştırılması ile mikroalglerin tanımlaması yapılmıştır.

Yapılan tanımlama sonucunda tüm mikroalglerin siyanobakteri grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. Heybeli termal temiz su kaynağından izole edilen siyanobakteri *Geitlerinema* sp., Heybeli termal atık su kaynağından izole edilen siyanobakteri *Oscillatoria* sp., Pazarağaç termal su kaynağından izole edilen siyanobakterinin *Leptolyngbya* cinsine ait bir tür (*Leptolyngbya* sp. (a)) ve Gecek termal su kaynağından izole edilen siyanobakterinin de *Leptolyngbya* cinsine ait başka bir tür (*Leptolyngbya* sp. (b)) olduğu görülmüştür.

4.2. Karotenoitlerin Elde Edilmesine ait Bulgular

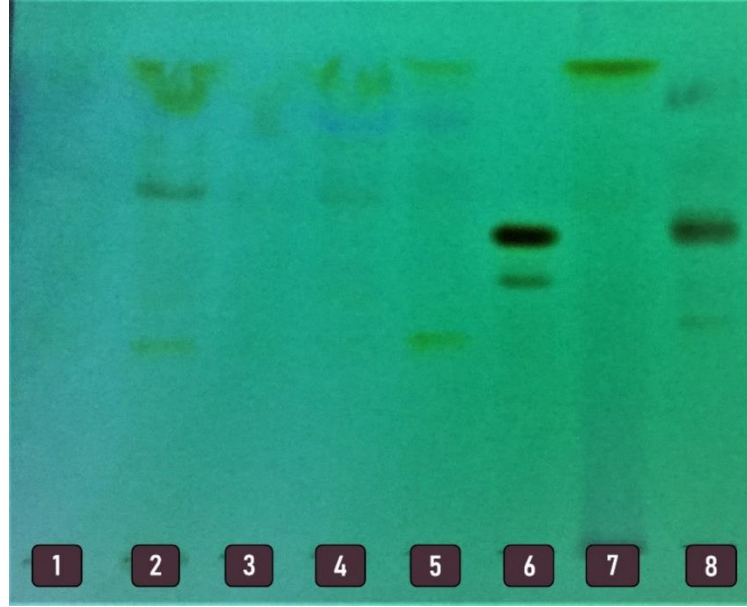
Geitlerinema, *Oscillatoria* ve *Leptolyngbya* cinslerine ait dört tür siyanobakterinin kültürü yapılmış ve elde edilen biyokütleler liyofilizasyon işlemi kullanılarak kurutulmuştur. Kurutulan biyokütlelerden 2 g alınarak hekzan ile ekstraksiyon sonucu karotenoitler elde edilmiştir. *Geitlerinema* sp.'den 22,5 mg, *Oscillatoria* sp.'den 11,4 mg, *Leptolyngbya* sp. (a)'dan 12,9 mg ve *Leptolyngbya* sp. (b)'den 13,8 mg karotenoit karışımı elde edilmiştir.

4.3. Karotenoitlerin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) Bulguları

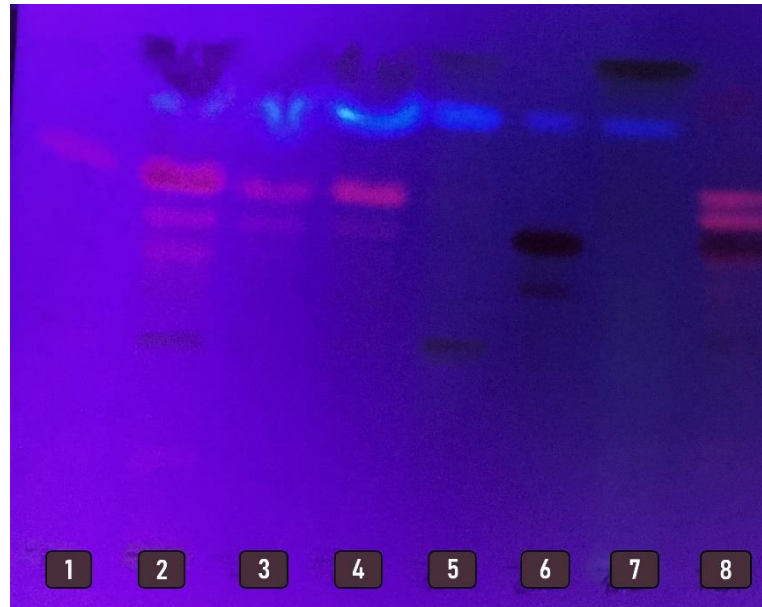
Geitlerinema sp., *Oscillatoria* sp., *Leptolyngbya* sp. (a) ve *Leptolyngbya* sp. (b) siyanobakterilerine ait karotenoitlerin standart bileşiklerle ve birbirleriyle karşılaştırılması için öncelikle ince tabaka kromatografisi çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları Şekil 4.1-4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Karotenoit karışımları ve standart bileşiklerin ince tabaka kromatogramı. 1. *Geitlerinema* sp., 2. *Oscillatoria* sp., 3. *Leptolyngbya* sp. (a), 4. *Leptolyngbya* sp. (b) ekstraktları, 5. *Spinacia oleracea* hekzan ekstresi (Lutein standardı olarak kullanılmıştır), 6. Zeaksantin standardı, 7. β -Karoten standardı, 8. Astaksantin standardı. Solvan sistemi: Petrol eteri: sikloheksan: etil asetat: aseton: etanol (60:16:10:10:6).



şekil 4.2. Karotenoit karışımları ve standart bileşiklerin ince tabaka kromatogramı (UV₂₅₄ nm'deki görünümü). 1. *Geitlerinema* sp., 2. *Oscillatoria* sp., 3. *Leptolyngbya* sp. (a), 4. *Leptolyngbya* sp. (b) ekstreri, 5. *Spinacia oleracea* hekzan ekstresi (Lutein standartı olarak kullanılmıştır), 6. Kantaksantin standartı, 7. β-Karoten standartı, 8. Astaksantin standartı.



şekil 4.3. Karotenoit karışımları ve standart bileşiklerin ince tabaka kromatogramı (UV₃₆₆ nm'deki görünümü). 1. *Geitlerinema* sp., 2. *Oscillatoria* sp., 3. *Leptolyngbya* sp. (a), 4. *Leptolyngbya* sp. (b) ekstreri, 5. *Spinacia oleracea* hekzan ekstresi (Lutein standartı olarak kullanılmıştır), 6. Kantaksantin standartı, 7. β-Karoten standartı, 8. Astaksantin standartı.

İnce tabaka kromatografisi sonucu elde edilen bulgulara göre, tüm siyanobakterilerin β -karoten içerdiği *Geitlerinema* türünün ise diğer türlerden farklı olarak lutein içermediği anlaşılmıştır. Karotenoitlerin ince tabaka kromatogramlarında astaksantin ve kantaksantin lekelerine rastlanmamıştır. *Oscillatoria* türünden elde edilen karotenoit karışımının, karotenoit bakımından diğer türlerle karşılaştırıldığında, daha fazla karotenoit çeşidi içerdiği görülmektedir.

4.4. Karotenoitlerin HPLC-DAD Çalışmalarına ait Bulgular

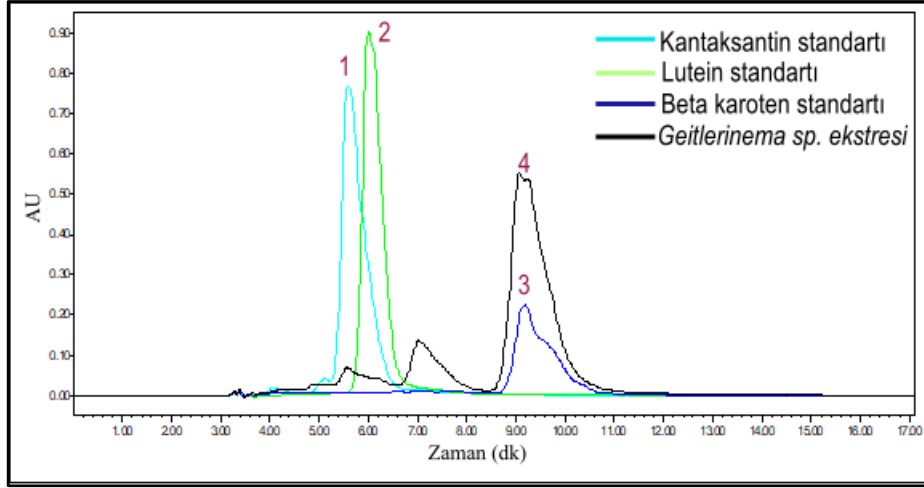
Geitlerinema sp., *Oscillatoria* sp. ve *Leptolyngbya* sp. cinslerine ait siyanobakterilerin karotenoit karışımlarının karoten ve ksantofil içeriklerinin tayini için HPLC-DAD analizleri gerçekleştirilmiştir. Dört farklı türün karotenoit içerikleri, standart olarak β -karoten, lutein ve kantaksantin kullanarak incelenmiştir.

Elde edilen kromatogramlara göre tüm siyanobakteri türlerindeki ana karotenoitin β -karoten olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1.). HPLC-DAD kromatogramlarına göre *Geitlerinema* türünün β -karoten; *Oscillatoria* türü ile *Leptolyngbya* (a) ve (b) türlerinin ise β -karoten ve lutein içerdiği görülmüştür (Tablo 4.1., Şekil 4.4.-4.11).

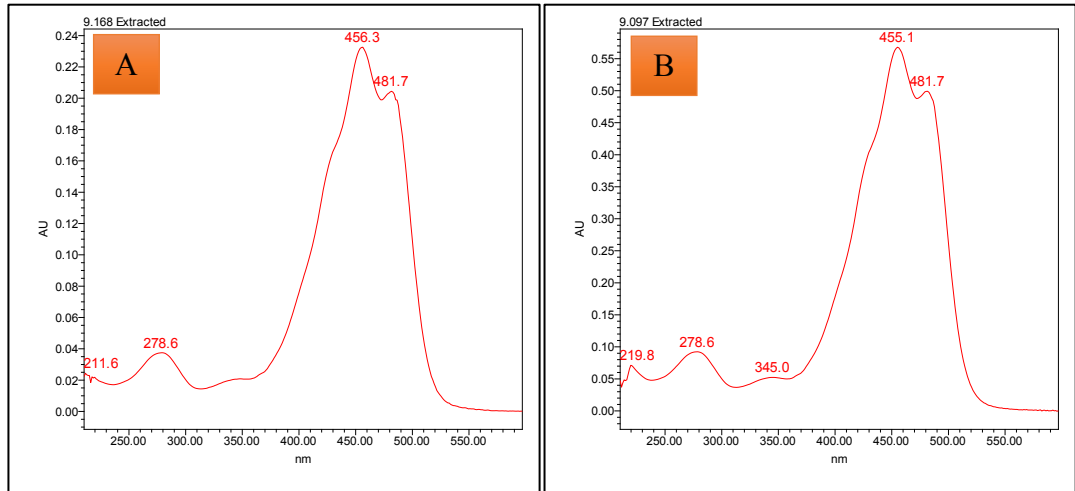
Tablo 4.1. Siyanobakteri türlerinden elde edilen karotenoit karışımlarının HPLC-DAD analizleri.

Siyanobakteri türleri / Karotenoit	<i>Geitlerinema</i> sp.	<i>Oscillatoria</i> sp.	<i>Leptolyngbya</i> sp. (a)	<i>Leptolyngbya</i> sp. (b)
β -karoten	●	●	●	●
Lutein		●	●	●

Geitlerinema türünün diğerlerinden farklı olarak lutein içermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.4. ve 4.5.).

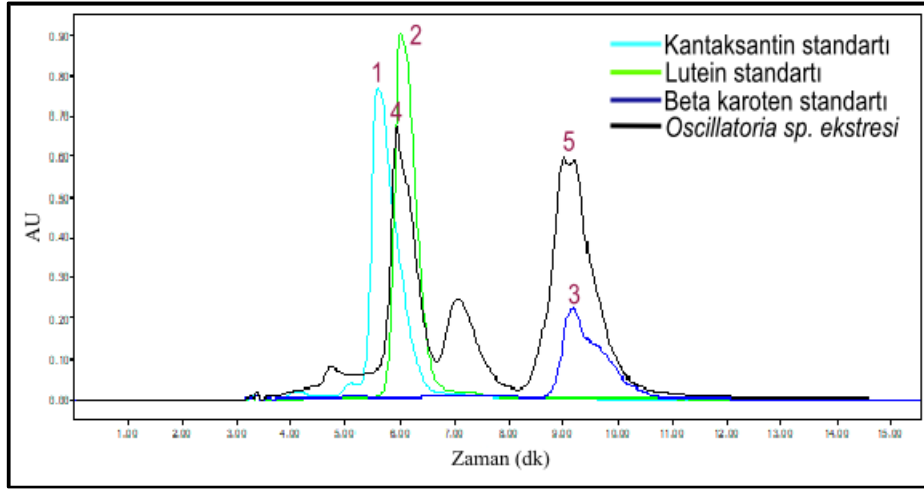


Şekil 4.4. *Geitlerinema* sp. karotenoit karışımı ve standart bileşiklere ait HPLC kromatogramı; 1. Kantaksantin standardı, 2. Lutein standardı, 3. β -Karoten standardı, 4. *Geitlerinema* sp. karotenoit karışımı (β -karoten), 450 nm.

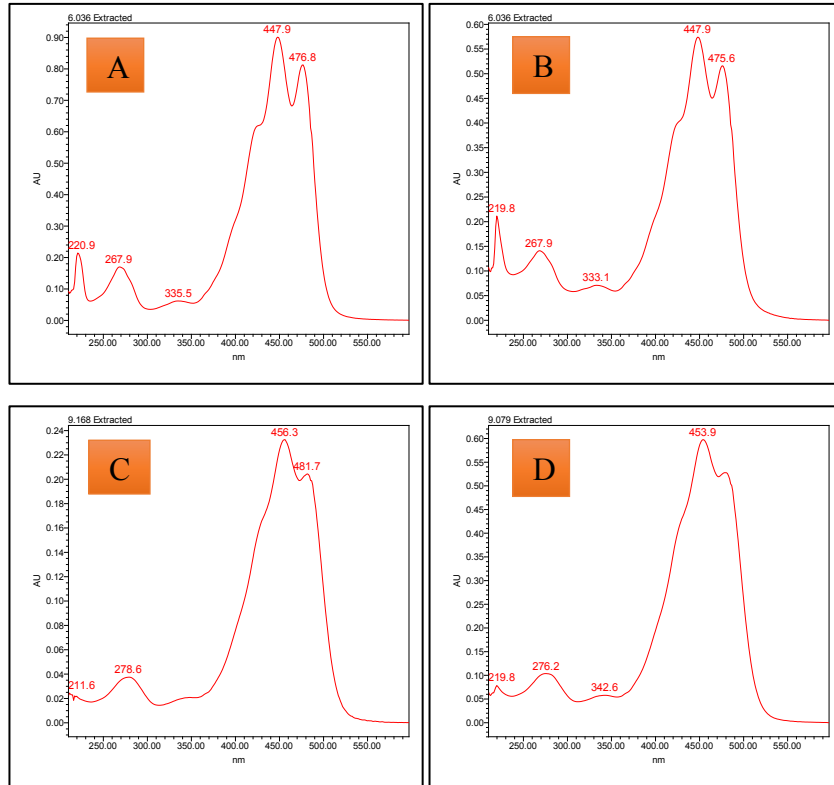


Şekil 4.5. β -Karoten standardı (A) ve *Geitlerinema* sp. karotenoit karışımının β -karoten piki'ne (B) ait UV spektrumları.

Oscillatoria sp. siyanobakterisinden elde edilen karotenoit karışımının lutein ve β -karoten içerdiği saptanmıştır (Şekil 4.6. ve 4.7.).

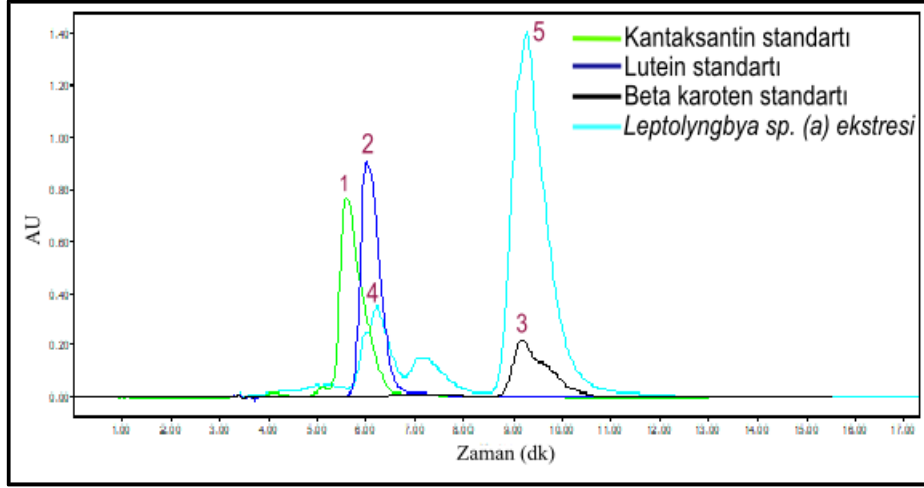


Şekil 4.6. *Oscillatoria* sp. karotenoit karışımı ve standart bileşiklere ait HPLC kromatogramı; 1. Kantaksantin standardı, 2. Lutein standardı, 3. β -Karoten standardı, 4. *Oscillatoria* sp. karotenoit karışımı (lutein), 5. *Oscillatoria* sp. karotenoit karışımı (β -karoten), 450 nm.

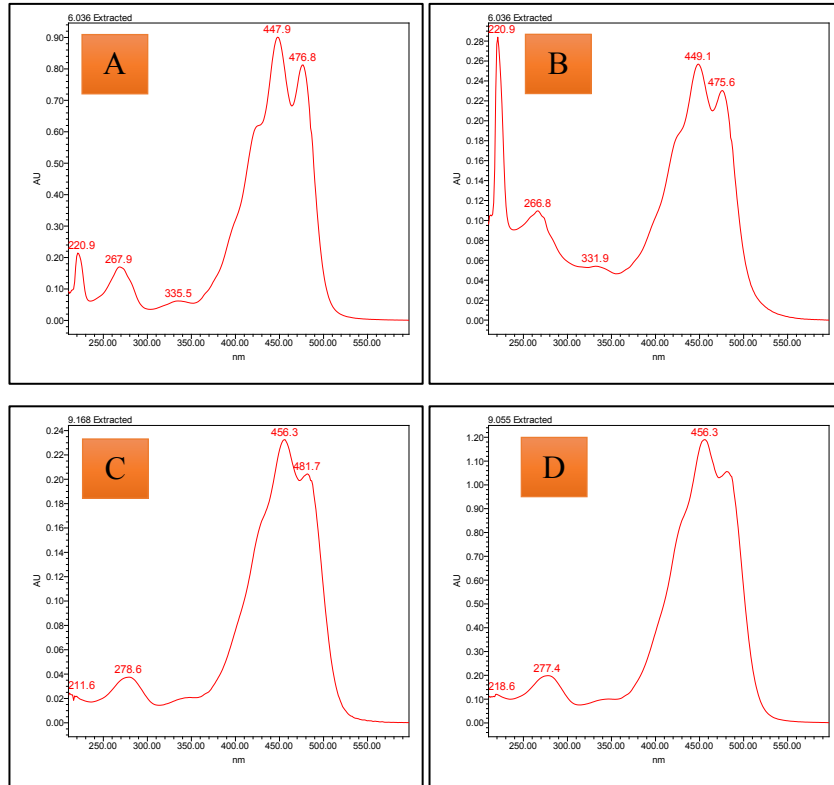


Şekil 4.7. Lutein standardı (A), *Oscillatoria* sp. karotenoit karışımı lutein piki (B), β -Karoten standardı (C) ve *Oscillatoria* sp. karotenoit karışımı β -karoten piki'ne ait UV spektrumları.

Leptolyngbya sp. (a) siyanobakterisi karotenoit karışımının lutein ve β -karoten içerdiği saptanmıştır (Şekil 4.8. ve 4.9.).

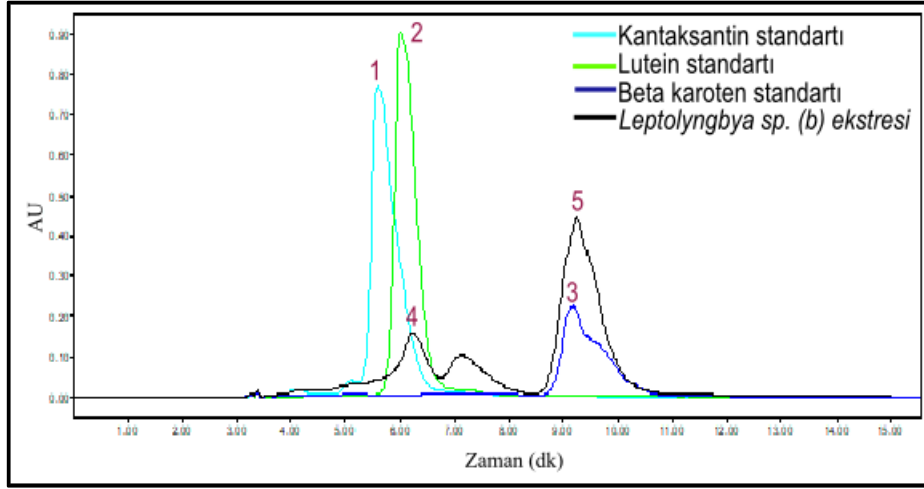


Şekil 4.8. *Leptolyngbya* sp. (a) karotenoit karışımı ve standart bileşiklere ait HPLC kromatogramı; 1. Kantaksantin standardı, 2. Lutein standardı, 3. β -Karoten standardı, 4. *Leptolyngbya* sp. (a) karotenoit karışımı (lutein), 5. *Leptolyngbya* sp. (a) karotenoit karışımı (β -karoten), 450 nm.

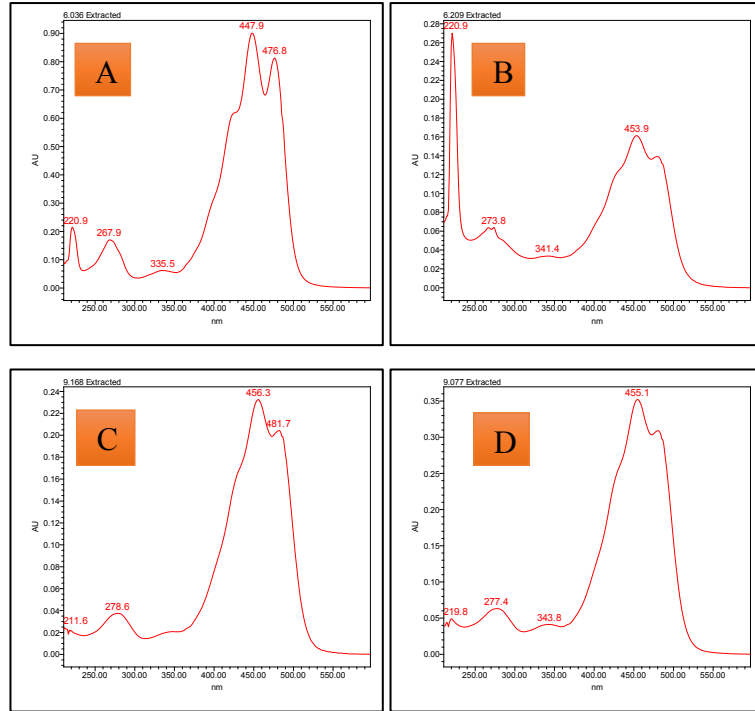


Şekil 4.9. Lutein standardı (A), *Leptolyngbya* sp. (a) karotenoit karışımı lutein piki (B), β -Karoten standardı (C) ve *Leptolyngbya* sp. (a) karotenoit karışımı β -karoten piki'ne ait UV spektrumları.

Leptolyngbya sp. (b)'ye ait karotenoit karışımının HPLC-DAD kromatogramında lutein ve β -karoten karotenoitlerine rastlanmıştır (Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.).



Şekil 4.10. *Leptolyngbya* sp. (b) karotenoit karışımı ve standart bileşiklere ait HPLC kromatogramı; 1. Kantaksantin standardı, 2. Lutein standardı, 3. β -Karoten standardı, 4. *Leptolyngbya* sp. (b) karotenoit karışımı (lutein), 5. *Leptolyngbya* sp. (b) karotenoit karışımı (β -karoten), 450 nm.



Şekil 4.11. Lutein standardı (A), *Leptolyngbya* sp. (b) karotenoit karışımı lutein piki (B), β -Karoten standardı (C), *Leptolyngbya* sp. (b) karotenoit karışımı β -karoten piki (D) UV spektrumları.

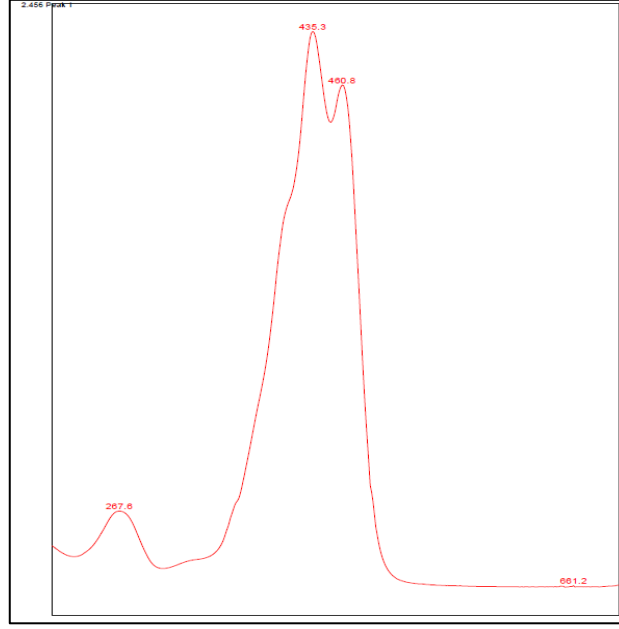
4.5. UPC² Çalışmaları ile β -Karoten Miktar Tayinine ait Bulgular

UPC², mobil fazlardan birinin CO₂ olduğu, süperkritik akışkan kromatografi ve ultra performans sıvı kromatografisi prensiplerine dayanan bir kromatografi sistemidir.

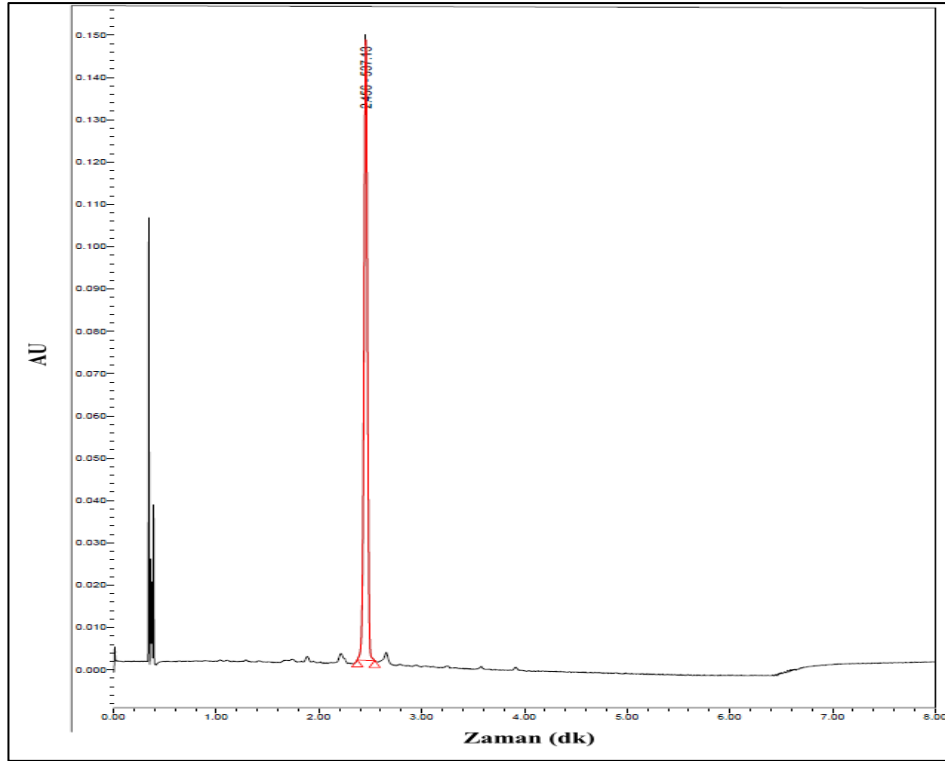
HPLC- DAD ile yapılan analizler sonucu dört farklı siyanobakteri türünün karotenoit karışımlarındaki ana ve ortak bileşiğin β -karoten olduğu tespit edilmiştir. β -Karoten miktar tayini için karotenoit karışımları, 1 mg/ml olacak şekilde çözücü olarak hekzan kullanılarak hazırlanmıştır. Standart bileşik olarak Sigma β -karoten kullanılmış ve kloroform içinde 1 mg/ml olacak şekilde çözülmüştür.

β -Karoten miktar tayini gerçekleştirmek için standart olarak kullanılan β -karotenin 0.025-0.33 mg/ml arasındaki konsantrasyonları kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. R² değeri 0.995972 olarak bulunmuştur (Şekil 4.14.).

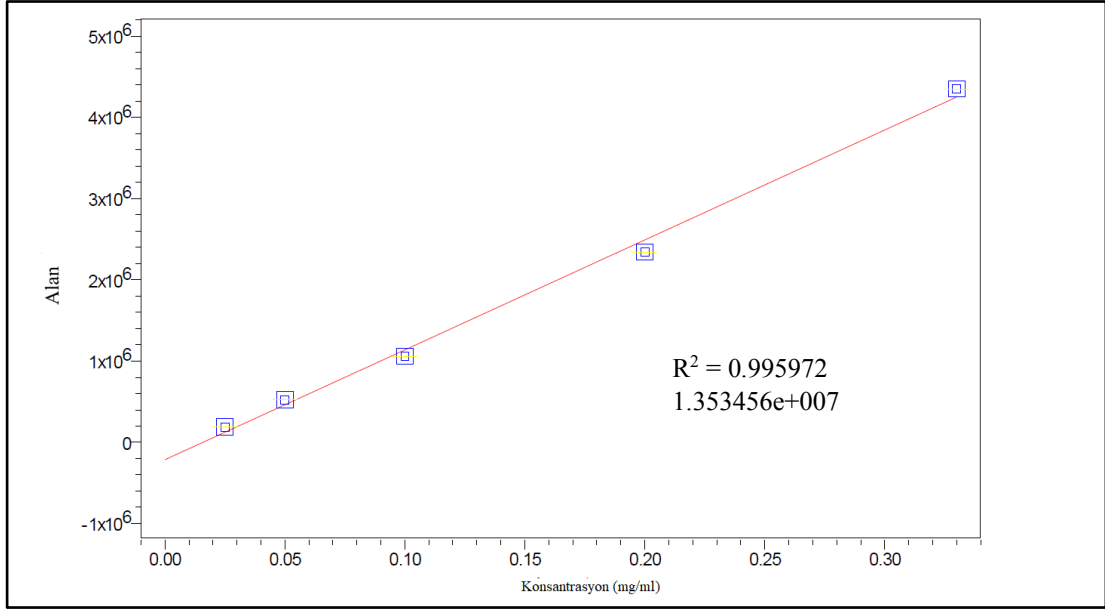
β -Karoten standart bileşiğine ait UPC² kromatogramı ve UV spektrumu Şekil 4.12. ve 4.13.'te; siyanobakterilerden elde edilen karotenoitlere ait UPC² kromatogramları ise Şekil 4.15.-4.18.'da verilmiştir.



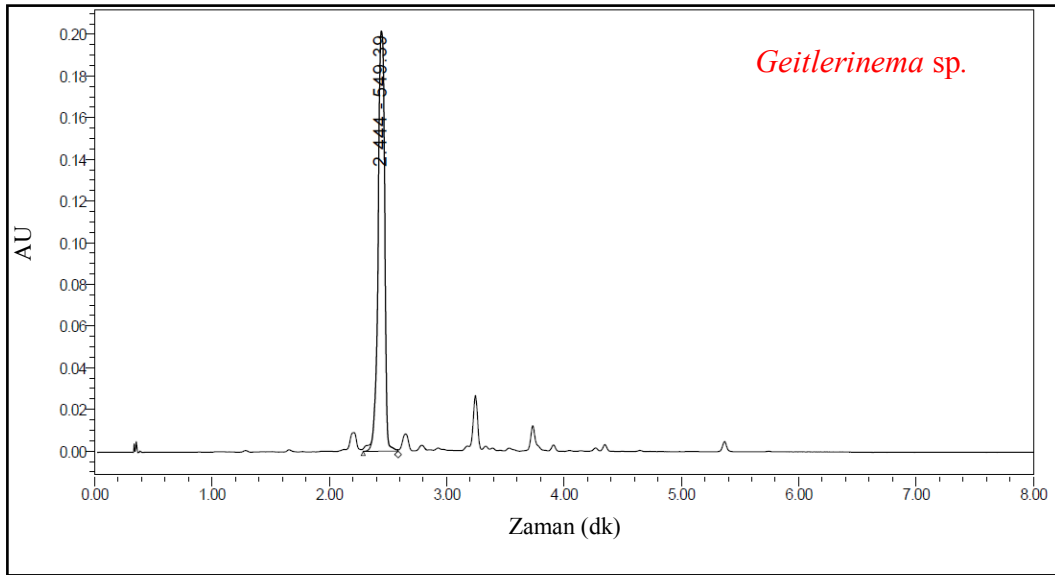
Şekil 4.12. β -Karoten standart bileşiğine ait UV spektrumu.



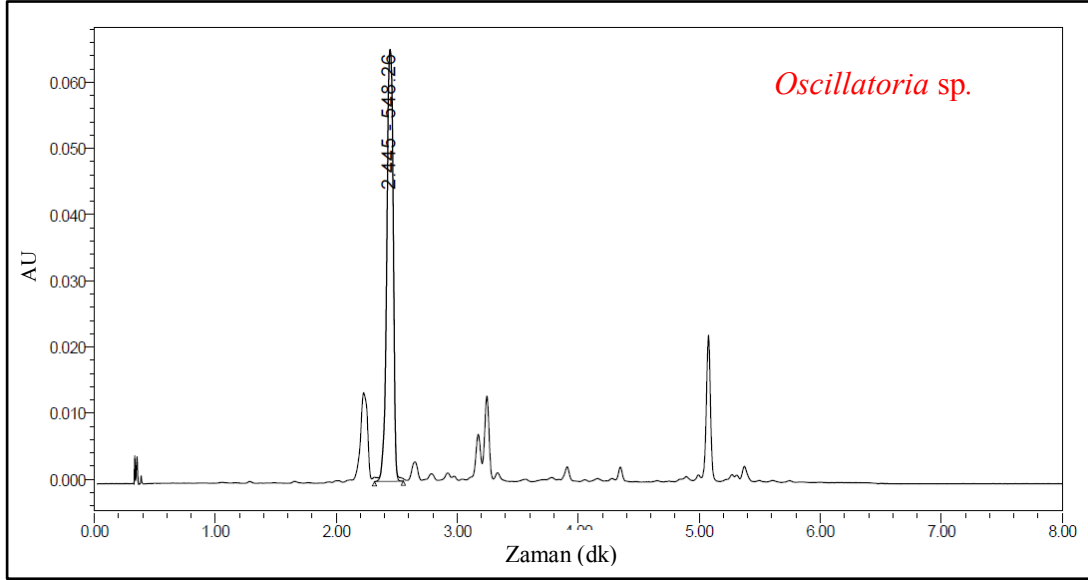
Şekil 4.13. β -Karoten standart bileşiğine ait UPC² kromatogramı.



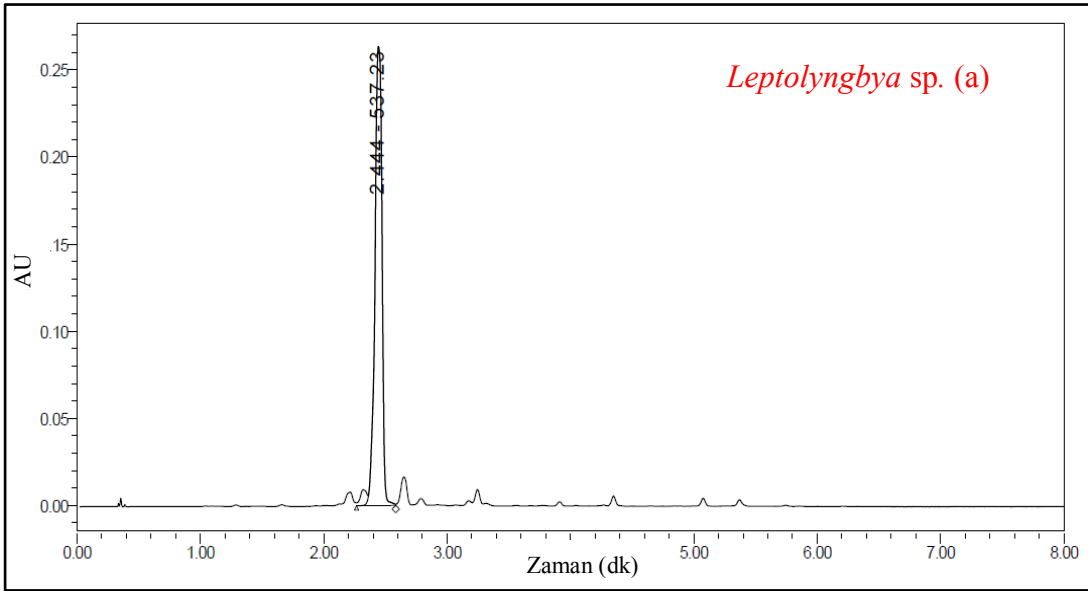
Şekil 4.14. β -Karoten kalibrasyon eğrisi.



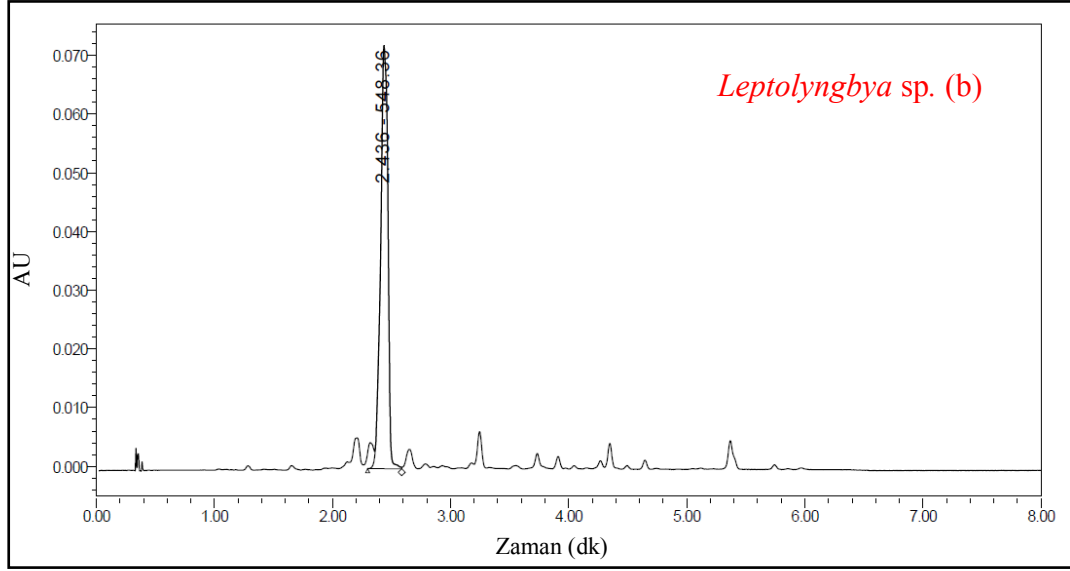
Şekil 4.15. *Geitlerinema sp.*'den elde edilen karotenoit karışımına ait UPC² kromatogramı.



Şekil 4.16. *Oscillatoria sp.*'den elde edilen karotenoit karışımına ait UPC² kromatogramı.



Şekil 4.17. *Leptolyngbya sp. (a)*'dan elde edilen karotenoit karışımına ait UPC² kromatogramı.

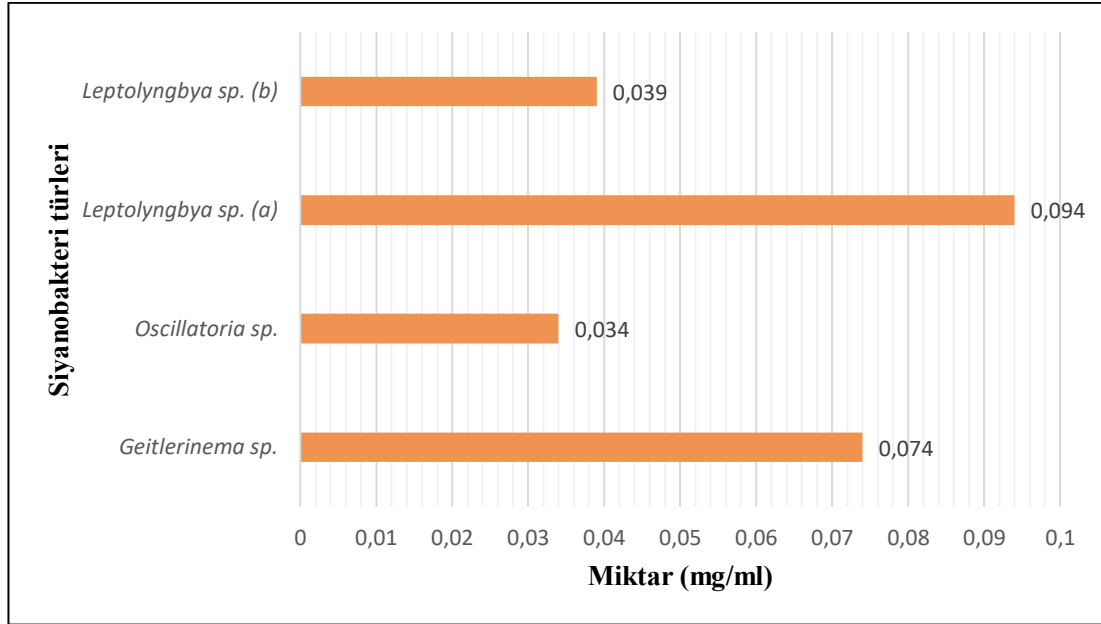


Şekil 4.18. *Leptolyngbya* sp. (b)'den elde edilen karotenoit karışımına ait UPC² kromatogramı.

Elde edilen kromatogramlarda görülen β -karoten piklerinin alanları alınarak kalibrasyon eğrisi yardımıyla örneklerde bulunan β -karoten miktarları hesaplanmıştır. Ekstrelerde tespit edilen β -karoten miktarları Tablo 4.2. ve Şekil 4.19.'da verilmiştir.

Tablo 4.2. Siyanobakterilerden elde edilen karotenoit karışımlarında bulunan β -karoten miktarları.

Siyanobakteri türü	Alınma süresi (dk)	Alan	Yükseklik	Miktar (mg/ml)
<i>Geitlerinema</i> sp.	2.444	784517	201637	0.074
<i>Oscillatoria</i> sp.	2.445	240418	65231	0.034
<i>Leptolyngbya</i> sp. (a)	2.444	1051905	263335	0.094
<i>Leptolyngbya</i> sp. (b)	2.436	310621	72100	0.039



Şekil 4.19. Siyanobakterilerden elde edilen karotenoit karışımlarında bulunan β -karoten miktarları (mg/ml).

UPC² sistemi ile yapılan miktar tayini analizine göre en yüksek β -karoten miktarı, Şekil 4.19.'de de görüldüğü gibi 0.094 mg/ml olarak *Leptolyngbya sp. (a)* heksan ekstresinde tespit edilmiştir. *Geitlerinema sp.*, *Leptolyngbya sp. (b)* ve *Oscillatoria sp.* siyanobakterilerinin β -karoten içeriği ise sırayla 0.074, 0.039 ve 0.034'tür.

4.6. Kuru Siyanobakteri Biyokütlelerinde β -Karoten Miktarına ait Bulgular

Dört siyanobakteri türünden heksan ekstraksiyonu ile elde edilen karotenoit miktarları ve UPC² sistemi ile yapılan miktar tayini bulguları kullanılarak kuru siyanobakteri türlerinde bulunan β -karoten bileşiğine ait miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Geitlerinema* kuru biyokütlesinin içerdiği β -karoten miktarı diğer türlere göre daha yüksek iken, bu bulguyu sırasıyla *Leptolyngbya (a)*, *Leptolyngbya (b)* ve *Oscillatoria* türlerinin β -karoten içerikleri takip etmiştir. Tablo 4.3., türlerin içerdiği β -karoten miktarlarını μg β -karoten/g kuru biyokütle şeklinde göstermektedir.

Tablo 4.3. Siyanobakteri kuru biyokütlelerinde bulunan β -karoten miktarları.

Siyanobakteri türü	Miktar ($\mu\text{g/g}$ kuru biyokütle)
<i>Geitlerinema</i> sp.	832.5
<i>Oscillatoria</i> sp.	193.8
<i>Leptolyngbya</i> sp. (a)	606.3
<i>Leptolyngbya</i> sp. (b)	269.1

4.7. C-Fikosiyanin Elde Edilmesine ait Bulgular

Liyofilizasyon ile kurutulmuş ve -20 °C'de muhafaza edilmiş kuru siyanobakteri biyokütlelerinin içeriğindeki C-fikosiyanin tespiti ve miktarının belirlenebilmesi için çeşitli kromatografi yöntemlerinden yararlanılmıştır. Siyanobakterilerin kuru madde miktarları ve tampon hacimleri Tablo 4.4.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.4. C-Fikosiyanin elde edilmesi için kullanılan kuru biyokütle miktarları ve kullanılan tampon hacimleri.

	<i>Geitlerinema</i> sp.	<i>Oscillatoria</i> sp.	<i>Leptolyngbya</i> sp. (a)	<i>Leptolyngbya</i> sp. (b)
Kuru Biyokütle Miktarı (g)	1.0019	1.0367	1.0727	1.0555
Tampon Hacmi (ml)	10	12	11	11

C-Fikosiyanin saflaştırma basamakları esnasında diyaliz ve Sephadex G50 kromatografi basamaklarından elde edilen miktarların ve basamakların verimliliğinin hesaplanması için aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

Miktar Hesabı:

$$[(\text{OD}_{620} - 0.474 \times \text{OD}_{652}) / 5.34] \times 10 \quad (4.1.)$$

Verim Hesabı:

$$(\text{Hesaplanan miktar} \times \text{Tampon hacmi}) / \text{Kuru biyokütle miktarı} \quad (4.2.)$$

Diyaliz işlemi ve Sephadex G50 kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonların A280, A620 ve A680 nm’de absorbanları ölçülmüştür.

Tablo 4.5. Diyaliz ve Sephadex G50 basamakları sonucu elde edilen C-fikosiyanin miktarları ve verimleri.

Siyanobakteri Türleri	Diyaliz Basamağı		Sephadex G50 Kromatografi Basamağı	
	Miktar (mg/ml)	Verim (%)	Miktar (mg/ml)	Verim (%)
<i>Geitlerinema</i> sp.	3.784783	37.77605	3.206457	32.00376
<i>Oscillatoria</i> sp.	3.943693	45.649	2.402075	27.80447
<i>Leptolyngbya</i> sp.(a)	3.885348	39.8423	1.731187	17.75246
<i>Leptolyngbya</i> sp.(b)	2.465505	25.69451	1.210239	12.612635

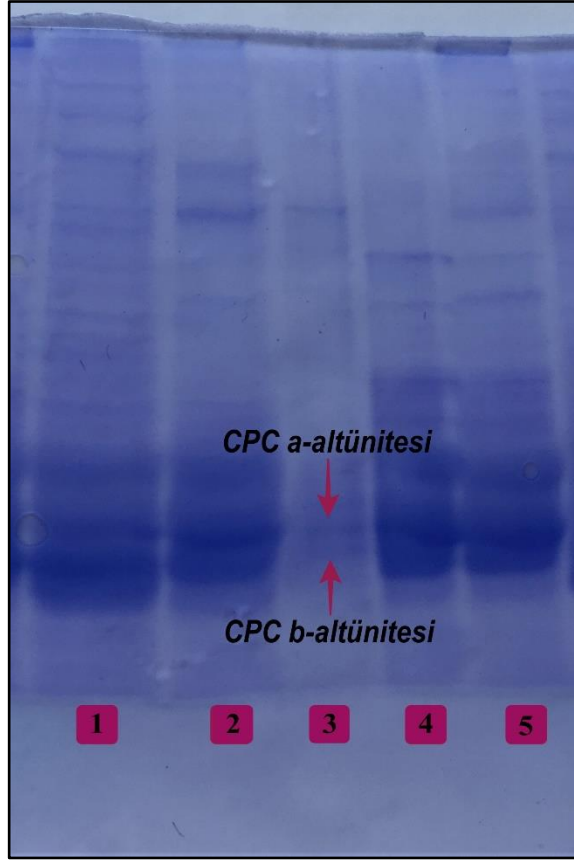
Kromatografi basamakları sonucu elde edilen ve A620/280 oranı 3 ve 3’ün üzerinde saflık derecesine sahip elüsyonların birleştirilip liyofilizatörde kurutulması sonucu elde edilen C-fikosiyanin miktarlarının tartılması ile siyanobakterilerin C-fikosiyanin miktarları ve % C-fikosiyanin içerikleri tespit edilmiştir (Tablo 4.5.).

Tablo 4.6. Siyanobakteri türlerinin C-fikosiyanin miktarları ve oranları.

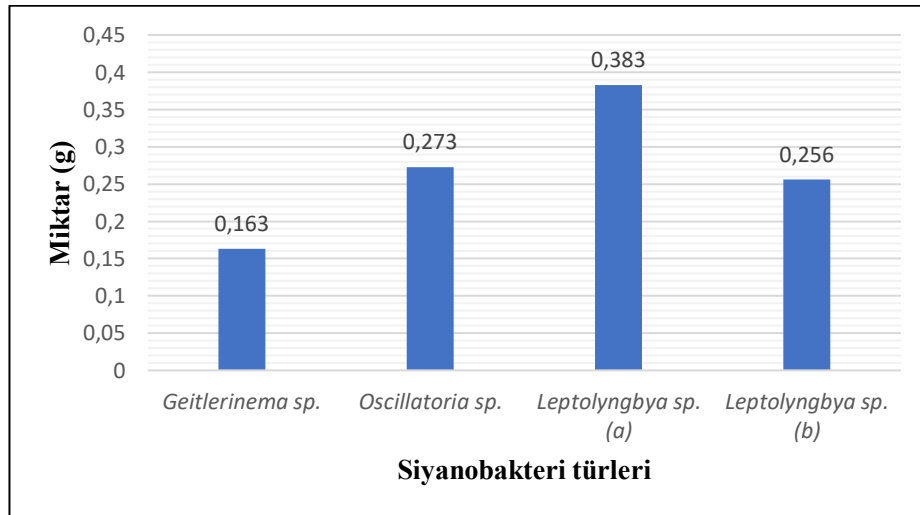
Siyanobakteri türleri	<i>Geitlerinema</i> sp.	<i>Oscillatoria</i> sp.	<i>Leptolyngbya</i> sp.(a)	<i>Leptolyngbya</i> sp.(b)
Miktar (g)	0.163	0.273	0.383	0.256
Oran (%)	16.26	26.33	35.70	24.25

Elde edilen bulgular, *Leptolyngbya* (a) türünün, C-fikosiyanin elde etmek için yürütülen diyaliz ve Sephadex G50 kromatografi basamaklarındaki veriminin *Geitlerinema* ve *Oscillatoria* türlerinden düşük, *Leptolyngbya* (b)’den yüksek olmasına rağmen, en yüksek C-fikosiyanin miktarına bu türün sahip olduğunu göstermiştir (Tablo 4.6.).

Kromatografik yöntem basamakları sonucu elde edilmiş C-fikosiyaninin fraksiyonlarının saf olup olmadığı referans bileşik olarak Sigma *Spirulina* fikosiyanin kullanılarak SDS-PAGE yöntemi ile tayin edilmiştir. Elde edilen C-fikosiyanin fraksiyonlarının SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.20.’de, miktarları ise Şekil 4.21.’de verilmiştir.



Şekil 4.20. Siyanobakterilerden elde edilen C-fikosiyaninlerin fraksiyonlarının SDS-PAGE jeli görüntüsü. 1. *Leptolyngbya* sp. (a), 2. *Leptolyngbya* sp. (b), 3. *Spirulina*'dan elde edilen standart C-fikosiyanin, 4. *Geitlerinema* sp., 5. *Oscillatoria* sp.



Şekil 4.21. Siyanobakteri türlerinin C-fikosiyanin miktarları (g).

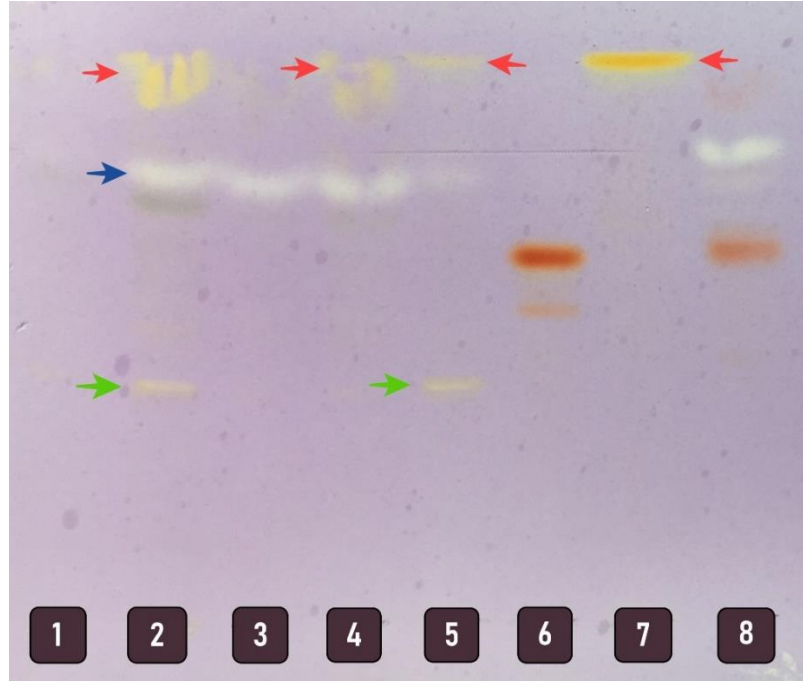
4.8. Biyolojik Etki Çalışmalarına ait Bulgular

Biyolojik etki çalışmalarında, izole edilmiş dört farklı siyanobakterinin karotenoitleri ile yine bu siyanobakterilerden elde edilmiş C-fikosiyaninlerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikale karşı radikal süpürücü etkinlikleri tayin edilmiştir. Aynı zamanda, insan servikal epidermoid karsinoma (HeLa) kanser hücreleri ve fare fibroblast (L929) kanserli olmayan normal hücrelere karşı sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Normal hücreler, kanser hücrelerine karşı görülebilecek seçiciliği gözlemek için kullanılmıştır.

Çalışmalarımızda etkisi araştırılacak olan her örnek ve konsantrasyon için en az 3 farklı kuyucuk kullanılarak meydana gelebilecek hatalar en aza indirilmeye çalışılmıştır ve etki çalışmaları farklı zamanlarda en az iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

4.8.1. Karotenoitlerin DPPH Radikalini Süpürücü Etkinlik Bulguları

Karotenoitlerin Biyootografik Yöntem ile DPPH Radikalini Süpürücü Etkinlik Bulguları



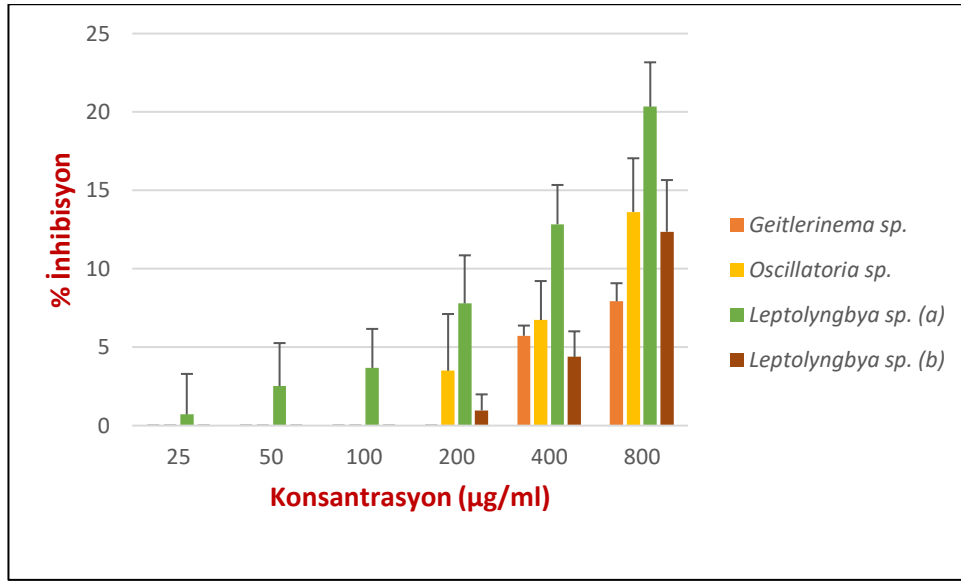
Şekil 4.22. Karotenoit karışımları ve standart bileşiklerin biyootografik yöntem ile DPPH süpürücü etkinliği tayini görünümü. 1. *Geitlerinema* sp., 2. *Oscillatoria* sp., 3. *Leptolyngbya* sp. (a), 4. *Leptolyngbya* sp. (b), 5. *Spinacia oleracea* hekzan ekstresi (Lutein standardı olarak kullanılmıştır), 6. Kantaksantin standardı, 7. β -Karoten standardı, 8. Astaksantin standardı. Yeşil ok ile gösterilen bileşik lutein, kırmızı ok ile gösterilen bileşik β -karoten iken mavi ile gösterilen bileşik bilinmemektedir.

Şekil 4.22.'de görüldüğü üzere lutein ve β -karoten bileşiklerine ait lekeler sarı rengi vererek DPPH radikalini süpürücü etkinlik göstermiştir. Aynı zamanda, mavi ok ile gösterilen bilinmeyen bileşimin de DPPH radikalini süpürücü etkinliğinin olduğu gözlemlenmiştir.

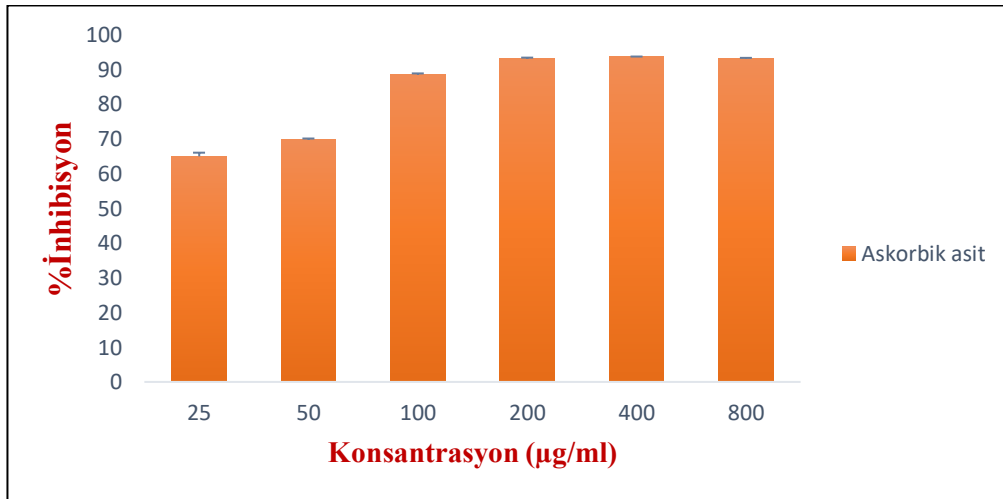
Karotenoitlerin Spektroskopik Yöntem ile DPPH Radikalini Süpürücü Etkinlik Bulguları

Geitlerinema sp., *Oscillatoria* sp., *Leptolyngbya* sp. (a) ve *Leptolyngbya* sp. (b) siyanobakterilerinden elde edilen karotenoit karışımlarından 25-800 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyonda örnek hazırlanarak DPPH radikali

süpürücü etkinlik tayini yapılmıştır. Askorbik asit referans bileşik olarak kullanılmıştır (Şekil 4.23. ve 4.24.).



Şekil 4.23. Karotenoit karışımlarının DPPH radikalini süpürücü etkinlikleri.



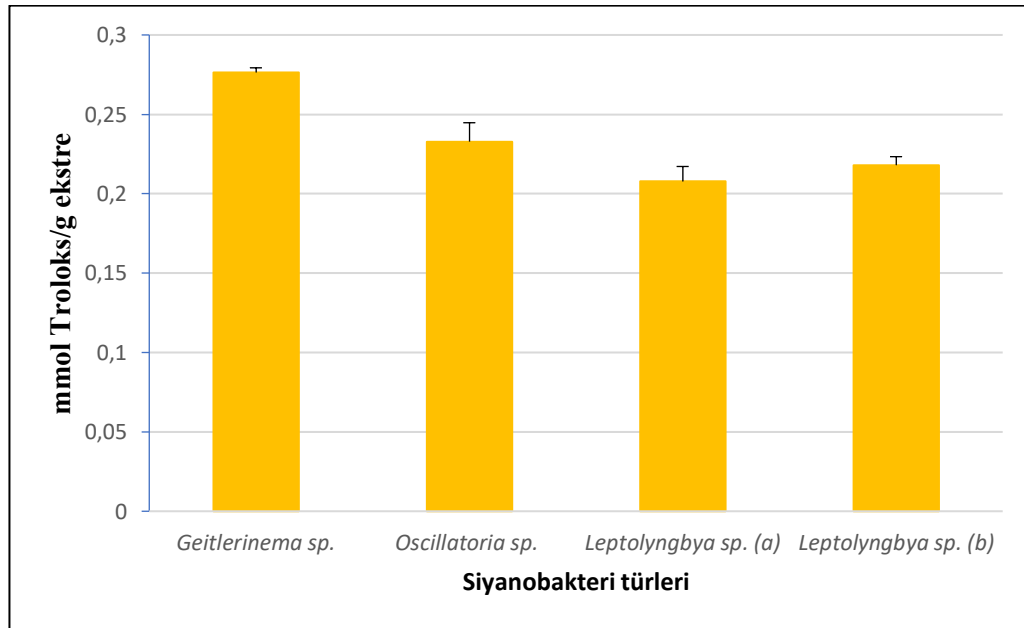
Şekil 4.24. Askorbik asitin DPPH radikalini süpürücü etkinliği.

Tüm siyanobakterilerin hekzan ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen karotenoit karışımları 400 ve 800 µg/ml konsantrasyonlarında DPPH radikalini süpürücü etkinlik göstermiştir. *Leptolyngbya* (a) türüne ait karotenoit karışımının tüm konsantrasyonlarının diğer türlere göre daha yüksek etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur. Bu türe ait karotenoit karışımının 800 µg/ml konsantrasyonda DPPH radikalini % 20.33 oranında süpürdüğü ve DPPH radikalini süpürücü etkinliğin konsantrasyona bağlı olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.23.).

4.8.2. Karotenoitlerin ABTS Radikalini Süpürücü Etkinlik Bulguları

Geitlerinema, *Oscillatoria*, *Leptolyngbya* (a) ve *Leptolyngbya* (b) türlerine ait karotenoitlerin ABTS radikalini süpürücü etkinlikleri tayin edilmiştir. Bu amaçla Troloks referans bileşik olarak kullanılmış ve sonuçlar TEAC (Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasite) değeri ile ifade edilmiştir. TEAC değeri 1 g ekstredeki Troloks'a eşdeğer antioksidan özellik gösteren bileşiklerin mmol cinsinden miktarı şeklinde belirtilmiştir.

Geitlerinema türü karotenoitlerinin TEAC değerinin dolayısıyla ABTS süpürücü etkinliğinin diğer üç türden daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.25.).



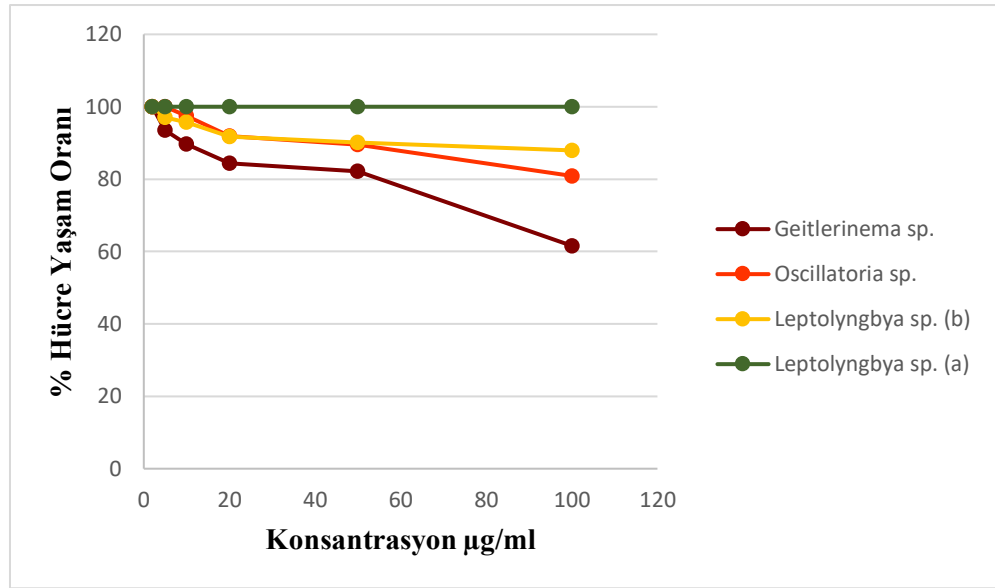
Şekil 4.25. Karotenoitlerin ABTS radikalini süpürücü etkinlik bulguları.

4.8.3. Karotenoitlerin Sitotoksik Etki Çalışmalarına ait Bulgular

İzole edilen *Geitlerinema*, *Oscillatoria*, *Leptolyngbya* (a) ve *Leptolyngbya* (b) türlerine ait karotenoit karışımlarının HeLa ve L929 hücre serilerine karşı sitotoksik etkileri incelenmiştir. Karotenoit karışımlarının sitotoksik etkileri, 100, 50, 20, 10, 5, 2 µg/ml olmak üzere farklı konsantrasyonlarda, MTT yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Referans bileşik olarak sisplatin ve etopozit kullanılmıştır.

Karotenoitlerin HeLa Hücre Serisine Karşı Sitotoksik Etki Bulguları

Geitlerinema, *Oscillatoria*, *Leptolyngbya* (a) ve *Leptolyngbya* (b) türlerinin karotenoit karışımlarının sitotoksik etkileri HeLa hücre serisine karşı incelenmiştir. *Geitlerinema*, *Oscillatoria* ve *Leptolyngbya* (b) karotenoit karışımları konsantrasyona bağlı aktivite gösterirken; *Leptolyngbya* sp. (a) karotenoit karışımının sitotoksik etkili olmadığı bulunmuştur (Şekil 4.26.).



Şekil 4.26. Karotenoit karışımlarının HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

Karotenoitlerin L929 Hücre Serisine Karşı Sitotoksik Etki Bulguları

Geitlerinema, *Oscillatoria*, *Leptolyngbya* (a) ve *Leptolyngbya* (b) türlerinin karotenoit karışımlarının sitotoksik etkileri L929 hücre serisine karşı incelenmiştir. Karotenoit karışımlarından *Geitlerinema* ve *Oscillatoria* türlerine ait olanların 100 µg/ml konsantrasyonları haricindeki konsantrasyonlarda ve diğer türlere ait olan karotenoit karışımlarının hiçbir konsantrasyonunda sitotoksik etki gözlenmemiştir. *Geitlerinema* sp. karotenoit karışımının 100 µg/ml konsantrasyonunda hücre yaşam oranı % 86; *Oscillatoria* sp. karotenoit karışımının 100 µg/ml konsantrasyonunda hücre yaşam oranı ise % 87 bulunmuştur.

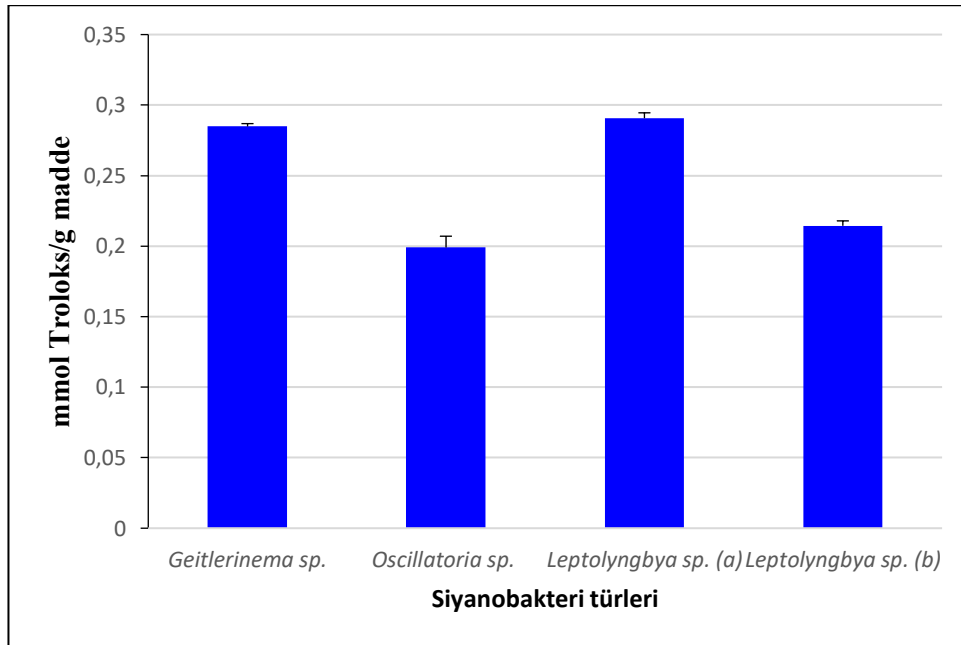
4.8.4. C-Fikosiyaninlerin DPPH Radikalini Süpürücü Etkinlik Bulguları

Geitlerinema sp., *Oscillatoria* sp., *Leptolyngbya* sp. (a) ve *Leptolyngbya* sp. (b) siyanobakterilerinden elde edilen C-fikosiyaninlerin 25-800 µg/ml konsantrasyon aralığında, 6 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanarak DPPH radikali süpürücü etkinlik tayini yapılmıştır. Askorbik asit referans bileşik olarak kullanılmıştır.

Dört türden elde edilen C-fikosiyaninlerin hiçbir konsantrasyonunda DPPH radikali süpürücü etkinlik gözlenmemiştir.

4.8.5. C-Fikosiyaninlerin ABTS Radikalini Süpürücü Etkinlik Bulguları

Geitlerinema, *Oscillatoria*, *Leptolyngbya* (a) ve *Leptolyngbya* (b) türlerinden elde edilen C-fikosiyaninlerin ABTS radikalini süpürücü etkinlikleri tayin edilmiştir. Bu amaçla Troloks referans bileşik olarak kullanılmış ve sonuçlar TEAC (Troloks Ekvivalent Antioksidan Kapasite) değeri ile ifade edilmiştir.



Şekil 4.27. C-Fikosiyaninlerin ABTS radikalini süpürücü etkinlik bulguları.

Leptolyngbya (a) türünden elde edilen C-fikosiyaninin TEAC değerinin dolayısıyla ABTS süpürücü etkinliğinin diğer üç türden elde edilen C-fikosiyaninlerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte *Geitlerinema*

türünden elde edilen C-fikosiyaninin ABTS radikalini süpürücü etkinliği ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. (Şekil 4.27.).

4.8.6. C-Fikosiyaninlerin Sitotoksik Etki Çalışmalarına ait Bulgular

İzole edilen *Geitlerinema*, *Oscillatoria*, *Leptolyngbya* (a) ve *Leptolyngbya* (b) türlerinden elde edilen C-fikosiyaninlerin HeLa ve L929 hücre serilerine karşı sitotoksik etkileri incelenmiştir. C-fikosiyaninlerin sitotoksik etkileri, 100, 50, 20, 10, 5, 2 µg/ml olmak üzere farklı konsantrasyonlarda, MTT yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Referans bileşik olarak sisplatin ve etopozit kullanılmıştır.

C-Fikosiyaninlerin HeLa Hücre Serisine Karşı Sitotoksik Etki Bulguları

Geitlerinema, *Oscillatoria*, *Leptolyngbya* (a) ve *Leptolyngbya*(b) türlerinden elde edilen C-fikosiyaninlerin hiçbirinin en yüksek konsantrasyonda dahi HeLa hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir. HeLa hücrelerinin yaşam oranı % 95-100 aralığında bulunmuştur.

C-Fikosiyaninlerin L929 Hücre Serisine Karşı Sitotoksik Etki Bulguları

Geitlerinema, *Oscillatoria*, *Leptolyngbya* (a) ve *Leptolyngbya* (b) türlerinden elde edilen C-fikosiyaninlerin sitotoksik etkileri L929 hücre serisine karşı incelenmiştir. *Geitlerinema* ve *Leptolyngbya* (a) türlerinden elde edilen C-fikosiyaninlerin 100 µg/ml konsantrasyonları haricindeki konsantrasyonlarda ve diğer türlere ait olanların hiçbir konsantrasyonunda sitotoksik etki gözlenmemiştir. *Geitlerinema* türünden elde edilen C-fikosiyaninin 100 µg/ml konsantrasyonunda hücre yaşam oranı % 89; *Leptolyngbya* (a) türünden elde edilen C-fikosiyaninin 100 µg/ml konsantrasyonunda hücre yaşam oranı ise % 86 bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Türkiye termal su kaynakları bakımından zengin bir ülkedir ve termal denilince ilk akla gelen illerden biri Afyonkarahisar'dır. Tezimiz için aldığımız su numuneleri Ömer-Gecek havzası ve Heybeli termal havzasına aittir. Termal algler üzerindeki ilk çalışma Yellowstone ulusal parkından alınan örneklerden termofilik *Phormidium* ve *Spirulina* tanımlanması olarak literatürde yer almaktadır (41). Ülkemizde ise termal kaynaklarda bulunan siyanobakteriler üzerindeki çalışmalar sınırlı kalmış ve bu çalışmalar İzmir, Aydın, Denizli, Manisa ve Zonguldak illerinde bulunan termal su kaynaklarından elde edilen siyanobakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır (41, 42). Tez çalışmamız Afyonkarahisar ili termal su kaynaklarından izole edilen mikroalglerin tanımlanması, karotenoit ve C-fikosiyanın içerikleri ile serbest radikal süpürücü ve sitotoksik etkilerinin araştırılması konusunda yapılan ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

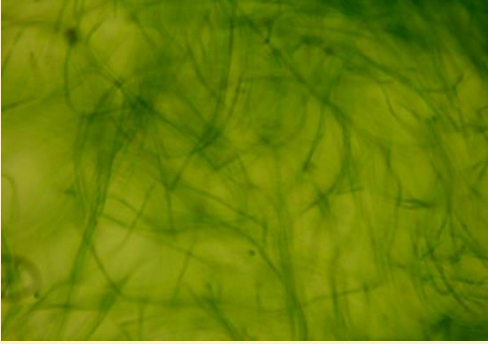

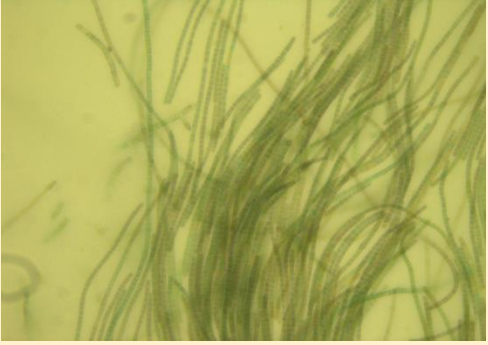
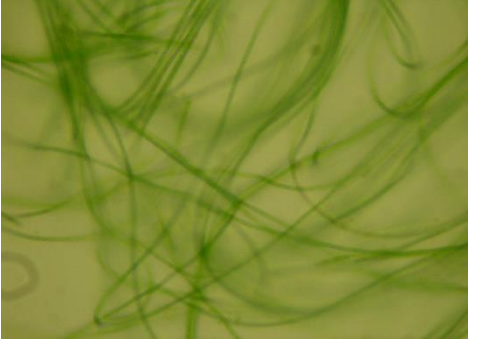
Yeni araştırmalar doğal kaynaklardan ilaç olabilecek kimyasal bileşikler üzerine yoğunlaşmıştır. Siyanobakteriler yeni, biyolojik olarak aktif bileşiklerin keşfi için oldukça önemli olan organizma gruplarından birisidir. Siyanobakteri gibi kültürü yapılabilen mikroorganizmaların avantajı, hedeflenen metabolitin üretilmesi için uygun ve sürdürülebilir kaynak olmalarıdır (5).

Tüm siyanobakteriler, UV maruziyetinin zararlı foto ürünleri olan reaktif oksijen türleri için etkili süpürücüler olan β -karoten, miksoksantofil, ekinenon, ossilloksantin ve kantaksantin gibi karotenoitleri üretir. Siyanobakterilerin reaktif oksijen türlerine karşı süperoksit dismutaz gibi çeşitli enzimatik savunmaları vardır. Ayrıca, UV'den dolayı zarar görmüş proteinleri tanımlayıcı ve onarıcı çeşitli hasar tamir edici mekanizmaları bulunmaktadır (7).

Zengin sekonder metabolit kaynağı olan siyanobakteriler biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda yer alır. Son zamanlarda siyanobakteriler, anti-HIV'den, antikanser, antivirale kadar farklı biyolojik aktiviteleri olan farmakolojik aktif bileşiklerin kaynağı olarak ilgi çekmektedir. Tüm siyanobakteriyal sekonder metabolitlerin biyosit, biyogübre, kozmetik, biyoyakıt, biyoremediasyon, şelatör ve besin takviyesi alanlarında potansiyel uygulamaları bulunmaktadır. Siyanobakteriyal sekonder metabolitlerin farmakolojik aktiviteleri üzerindeki araştırmalar, antitümoral, antimikrobiyal, antienflamatuvar, antiparazitik ve enzim inhibisyon özellikleri gibi

tıbbi yararlılıkları konusuna odaklanmıştır. Tıbbi alanda keşfedilmiş prokaryotik kaynaklı marin doğal ürünlerin % 40'ı siyanobakterilerden elde edilmiştir (4).

Tablo 5.1. Tez çalışmamızda izole edilen siyanobakteri türleri.

Siyanobakteri Türleri	Termal Kaynak	Mikroskop Görüntüsü
<i>Geitlerinema sp.</i>	Heybeli Kaplıcası- Temiz su	
<i>Oscillatoria sp.</i>	Heybeli Kaplıcası- Atık su	
<i>Leptolyngbya sp. (a)</i>	Pazarağaç Kaplıcası	
<i>Leptolyngbya sp. (b)</i>	Ömer-Gecek Kaplıcası	

Tez çalışmamızda izole edilen türler mikroalglerin siyanobakteri sınıfına ait *Geitlerinema*, *Oscillatoria* ve *Leptolyngbya* cinslerine ait dört farklı türdür. İzole ettiğimiz cinsler ve elde edilen termal kaynaklar Tablo 5.1.'de gösterilmiştir. Literatürde yer alan araştırmalar bu cinslere ait çok sayıda bileşiğin antioksidan, antienflamatuvar ve antikanser gibi birçok özellikleri olduğunu göstermiştir.

Siyanobakterilerin en çok bilinen ve kullanılan örneği olan *Spirulina* türlerinde ticari olarak en ilgi çeken pigmentler β -karoten, zeaksantin, fikosiyenin ve allofikosiyenin olarak belirtilmiştir (1). Yapılan bir çalışmada Çin ve Japonya'da ticari amaçlı yüksek hacimlerde üretilen altı farklı ticari *Spirulina platensis*, karotenoit içerikleri yönünden analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre *Spirulina platensis*'te zeaksantin, lutein, astaksantin, kantaksantin ve β -karoten karotenoitlerine rastlanmıştır (31). Tez çalışmamızda izole ettiğimiz siyanobakterilerden dördünün de β -karoten içeriğine sahip olduğu ve ayrıca *Geitlerinema* sp. hariç diğer türlerin lutein içerdiği de tespit edilmiştir. Kantaksantin ve astaksantin lekelerine İTK'da rastlanmamış, bu sonuç HPLC-DAD yöntemi ile de doğrulanmıştır. Zeaksantin referans bileşiği elimizde olmadığı için bu ksantinün tezimize konu türlerde olup olmadığı bilinmemektedir. *Oscillatoria* sp. ise diğer üç türden daha fazla karotenoit içeriğine sahip olup referans bileşikler olmadığı için karotenoit içerikleri belirlenememiştir. *Oscillatoria* türünün atık termal sudan izole edilmesi nedeniyle ortam koşullarına uyum sağlamak için daha çok sekonder metabolit ürettiği ve karotenoit çeşitliliğinin bu yüzden daha fazla olduğu düşünülmektedir.

Altı farklı ticari *Spirulina platensis* örneğinde yapılan bir çalışmada, örneklerin β -karoten miktarları en yüksek 1037.07 $\mu\text{g/g}$ kuru biyokütle ve en düşük 86 $\mu\text{g/g}$ kuru biyokütle olarak tespit edilmiştir (31). Ayrıca kemotaksonomik öneme sahip potansiyel nutrasötik bileşiklerin aydınlatılması amacıyla daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada izole edilen *Oscillatoria* sp. siyanobakterilerinde β -karoten miktarları 240 ve 260 $\mu\text{g/g}$ kuru biyokütle; *Geitlerinema* sp. siyanobakterisinde ise 450 $\mu\text{g/g}$ kuru biyokütle olarak bulunmuştur (18). Çalışmalarımızda izole ettiğimiz siyanobakteri türlerinde UPC² ile β -karoten miktar tayini yapılmıştır. Buna göre en yüksek β -karoten miktarına *Geitlerinema* sp., en düşük β -karoten miktarına ise *Oscillatoria* sp.'de rastlanmıştır. Bu sonuçlara göre elde ettiğimiz türlerdeki β -karoten miktarları, ticari *Spirulina platensis* siyanobakterilerinde tespit edilen miktarlar ile uyumludur.

Çalışmamızda izole edilen siyanobakterilerde tespit edilen β -karoten miktarlarının ise çok daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.5.). Sonuçlar; Tablo 5.2.'de de görüldüğü gibi tez çalışmamıza konu olan siyanobakterilerin β -karoten içerikleri açısından dünyadaki diğer türlerden daha zengin olduklarını açıkça ortaya koymuştur.

Tablo 5.2. Siyanobakterilerin β -karoten miktarları.

Siyanobakteri türü	β-Karoten Miktarı ($\mu\text{g/g}$ kuru biyokütle)	Kaynak
<i>Geitlerinema sp.</i>	832.5	-
<i>Oscillatoria sp.</i>	193.8	-
<i>Leptolyngbya sp. (a)</i>	606.3	-
<i>Leptolyngbya sp. (b)</i>	269.1	-
<i>Spirulina platensis</i>	86	31
<i>Spirulina platensis</i>	1037.07	31
<i>Oscillatoria sp.</i>	240	18
<i>Oscillatoria sp.</i>	260	18
<i>Geitlerinema sp.</i>	450	18

İzole edilen siyanobakterilerden elde edilen karotenoit karışımlarının hepsi 400 ve 800 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında DPPH radikalini süpürücü etkinlik göstermiştir. *Leptolyngbya sp. (a)* karotenoit karışımının etkisi diğer türlere göre daha yüksek bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.21). Bu türe ait karotenoit karışımı 800 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda DPPH radikalini % 20.33 oranında süpürmüştür.

Karotenoit karışımlarının ABTS radikalini süpürücü etkinlikleri incelendiğinde, *Geitlerinema sp.* karotenoit karışımının en yüksek etkinliği gösterdiği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.23). *Geitlerinema sp.* kuru biyokütlesinde diğer izole edilen türlere göre daha yüksek miktarda, 832.5 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık, β -karoten ihtiva etse de UPC² ile gerçekleştirdiğimiz β -karoten miktar tayininde çözelti içerisinde *Leptolyngbya sp. (a)*'dan sonra ikinci yüksek β -karoten miktarına sahiptir. *Geitlerinema sp.* karotenoit karışımında HPLC-DAD çalışmalarımızda tanımlanamayan pikler gözlenmiştir. Bu piklere sahip karotenoitlerin ABTS radikalini süpürücü etkinliklerinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *Oscillatoria sp.* karotenoit karışımı nispeten düşük miktarda β -karoten içermesine rağmen, ABTS

radikaline karşı *Leptolyngbya* sp. (a) ve *Leptolyngbya* sp. (b) karotenoit karışımlarından daha yüksek etkinlik gözlenmiştir. Bu türe ait karotenoit karışımında, İTK bulgularımıza göre izole ettiğimiz diğer türlerin karotenoit karışımlarından daha fazla karotenoit lekesine rastlanmıştır fakat standart bileşikler olmadığı için bu lekeler tanımlanamamıştır. Bu lekeleri veren bileşiklerin ABTS radikali süpürücü etkinliklerinin yüksek olduğu düşünülmektedir. *Leptolyngbya* sp. (a)'nın kuru biyokütledeki β -karoten miktarı, 606.3 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık, *Geitlerinema* sp.'den sonra en yüksek ikinci sıradadır. Ayrıca, UPC² ile gerçekleştirdiğimiz β -karoten miktar tayininde çözültü içerisinde 94 $\mu\text{g/ml}$ β -karoten miktarı ile diğer türler arasında en yüksek değere sahiptir.

Karoten ve ksantofillerin ABTS radikali süpürücü etkinliklerinin karotenoitlerin moleküler yapısı ile ilgisini ortaya koyan bir çalışma karotenlerin, ksantofillere göre ABTS radikali süpürme aktivitelerinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Konjuge çifte bağlar, yapının siklik veya asiklik olması, terminal halkalardaki fonksiyonel gruplar ABTS radikalini süpürme etkinliğini etkileyen faktörlerdir. Örneğin; karbonil gruplarının halkaya katılımının, ABTS radikali süpürme etkinliğini baskılayıcı olduğu görülmüştür (43).

Bu bilgiler ışığında *Geitlerinema* sp. karotenoit karışımının ksantofillerden çok karotenler içerdiği, *Leptolyngbya* sp. (a) karotenoit karışımının da ksantofillerce daha zengin olduğu sonucuna varılabilir. *Oscillatoria* sp. ve *Leptolyngbya* sp. (b) karotenoit karışımlarının β -karoten ile birlikte başka karoten ve ksantofillerin olması ile ABTS radikaline karşı gösterdikleri süpürücü etkinlikler açıklanabilir. Tüm karotenoitler tanımlanamadığı için ABTS radikali süpürücü etkinlik ve karotenoitlerin moleküler yapısı arasındaki ilişki hakkında bir sonuca varılamamıştır.

Tez çalışmamızda izole edilen siyanobakteri türlerinden hekzan ekstraksiyonu sonucu elde edilmiş karotenoit karışımlarının DPPH ve ABTS radikallerini süpürücü etkinlik tayinine yönelik daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamış; dolayısıyla bir karşılaştırma yapılamamıştır. Çalışmamız elde edilen türler üzerindeki ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Sitotoksik etki çalışmalarında HeLa kanser hücre serisi ve L929 sağlıklı hücre serisi kullanılmıştır. *Geitlerinema* sp. karotenoitleri, HeLa kanser hücrelerine karşı diğer türlerin karotenoit karışımlarından daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir (Bkz.

Şekil 4.25). Karotenoit karışımlarından hiçbiri L929 hücre serilerine karşı sitotoksikite göstermemişlerdir. Dört türden elde edilen karotenoit karışımlarının kompozisyonunun farklı olması ve çalışmamızda HPLC-DAD ile yapılan analizde *Geitlerinema* sp. karotenoit karışımında tanımlanamayan karotenoitlerin HeLa hücrelerine karşı daha seçici olması bu türün sitotoksik etkisinin diğerlerine göre yüksek olmasını açıklayabilir.

Spirulina siyanobakterisinden elde edilen C-fikosiyenin miktarları çeşitli kaynaklarda; *Spirulina platensis* türünde 6.5-152 mg/g kuru ağırlık, *Spirulina* sp.'de 47-101 mg/g kuru ağırlık olarak belirtilmiştir (2). Başka bir çalışmada, *Spirulina fusiformis*, *Spirulina platensis* ve *Spirulina* sp. C-fikosiyenin oranları sırasıyla, % 47, % 9.6 ve % 17.5 olarak verilmiştir (21). Tez çalışmamızda izole ettiğimiz siyanobakterilerin C-fikosiyenin miktarları ve oranları Tablo 5.3.'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre; çalışmamızda izole edilerek üretilen siyanobakterilerin C-fikosiyenin miktarları ve oranlarının, ticari olarak kullanılan *Spirulina platensis* türünden daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 5.3. İzole edilen siyanobakterilerin C-fikosiyenin miktar ve oranları.

Siyanobakteri Türleri	C-Fikosiyenin Miktarı (mg/g kuru ağırlık)	C-fikosiyenin Oranı (% kuru ağırlık)
<i>Geitlerinema</i> sp.	162	16.24
<i>Oscillatoria</i> sp.	262	26.28
<i>Leptolyngbya</i> sp. (a)	357	35.7
<i>Leptolyngbya</i> sp. (b)	242	24.28

Tez çalışmamızda izole ettiğimiz türlerden elde edilen C-fikosiyenin miktarları ve oranları literatürde yer alan diğer kaynaklarda belirtilen verilerden de daha yüksek bulunmuştur. Siyanobakterilerin jeotermal su kaynaklarından izole edilmesi, kültürünün yine jeotermal su kaynaklarında yapılması ile jeotermal suyun bileşiminin C-fikosiyenin üretimine pozitif etki ettiği düşünülmekte ve bu yüzden elde edilen C-fikosiyenin miktar ve oranlarının yüksek olduğu tahmin edilmektedir.

Araştırmalar, proteinlerin fiziko-kimyasal koşullara karşı stabilitesinin, çeşitli uygulamalarda önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Proteinlerin antioksidan etkilerinde amino asitler önemli rol oynamaktadır (8). Kükürt içeren amino asitlerin

oksidan süpürücü aktivitesi olduğu belirtilmiştir. Bazı araştırmalar özellikle protein yüzeyinde yer aldıklarında sistein (Csy) ve metiyonin (Met) amino asitlerinin oksidatif hasara karşı önemli koruyucu rolleri olduğunu göstermiştir (44). DPPH radikal süpürücü etkinlik tayininde aspartat (Asp), asparajin (Asn), threonin (Thr), valin (Val), izolösin (Ile) ve hidrofobik aminoasitler pozitif etki gösterirken; histidin (His), arginin (Arg) ve lizin (Lys) gibi polar basit amino asitler negatif etki göstermektedir. C-Fikosiyaninin, α ve β alt ünitelerini oluşturan amino asit çeşitleri ve molekül içindeki pozisyonları bileşiğin antioksidan etki göstermesinde önemlidir (8). Bir araştırmada *Spirulina fusiformis* ve *Oscillatoria* sp.'den elde edilen C-fikosiyaninlerin α alt ünitelerinin % 59 homolojiye sahipken, β alt ünitelerinin büyük farklılık gösterdiği ve yalnızca % 6 homoloji bulunduğu tespit edilmiştir. *Oscillatoria* sp.'den elde edilen C-fikosiyaninin β alt ünitesinin amino asit kompozisyonunun Thr6 ve Asp13 amino asitlerinin pozisyonu hariç diğer siyanobakteri cinslerinden farklı olduğu görülmüş ve antioksidan aktivite verileri arasındaki farklılıklar bu özelliklerine bağlanmıştır (45).

Daha önce yapılan bir çalışmada *Geitlerinema* sp. TRV57 türünden elde edilmiş olan fikosiyaninin DPPH radikal süpürücü etkisi araştırılmış ve 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda % 78.75, 5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ise % 68.75 oranında süpürücü etki gözlenmiştir. *Spirulina*'dan elde edilen fikosiyaninin DPPH süpürme aktivitesi ise % 25 olarak belirtilmiştir (29). Başka bir çalışmada *Geitlerinema* cinsinden elde edilen C-fikosiyaninin DPPH radikaline karşı serbest radikal süpürücü etkisi araştırılmış ve 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda % 72.85 \pm 2.1 inhibisyon görülmüştür (8).

Tez çalışmamızda dört farklı siyanobakteri türünden saflaştırdığımız C-fikosiyaninlerin antioksidan kapasiteleri araştırılırken DPPH radikaline karşı süpürücü etkinlik göstermedikleri tespit edilmiştir. Bunun nedeni, C-fikosiyaninlerin çalışmalarımız esnasında ısı, ışık gibi fiziko-kimyasal etkiler karşısında stabiliteilerinin azalmış olabileceğine ve DPPH süpürücü etkinlik tayininde önemli olan amino asit kompozisyonlarının ve bu aminoasitlerin molekül içindeki yerleşimlerinin radikali süpürmek için uygun olmayabileceğine bağlanabilir.

Çalışmamızda, *Geitlerinema* sp., *Oscillatoria* sp., *Leptolyngbya* sp. (a) ve *Leptolyngbya* sp. (b) türlerinden elde edilen C-fikosiyaninlerin ABTS radikalini süpürücü etkinlikleri tayin edilmiş ve *Leptolyngbya* sp. (a)'dan elde edilen C-fikosiyaninin TEAC değerinin diğer üç türden elde edilen C-fikosiyaninlerden daha

yüksek olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.24). Dört farklı türden elde edilen C-fikosiyantinlerin ABTS radikaline karşı gösterdiği etkinliğin farklı oluşu da C-fikosiyantinlerin α ve β alt ünitelerinin amino asit kompozisyonlarının farklı olabileceğini düşündürmektedir.

C-Fikosiyantin, HeLa kanser hücre serisine karşı sitotoksik etkisi üzerinde daha önce yapılmış bir çalışmada C-fikosiyantin HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini HeLa proliferasyonunu azaltma, Bcl-2 ekspresyonunu azaltma, Kazpaz-2, -3, -4, -6, -8 ve -10 aktivasyonu ile Sitokrom C'nin mitokondriden salınımı yoluyla gösterdiği bulunmuştur (24). Ticari C-fikosiyantin kullanılarak yapılan bir çalışmada, HeLa hücre serisine karşı IC₅₀ değeri 155.20 µg/ml olarak tespit edilmiştir (46). Başka bir çalışmada ise yine ticari C-fikosiyantin kullanılarak HeLa hücre serisine karşı sitotoksik etki araştırılmış ve IC₅₀ değeri 1104 µg/ml olarak tespit edilmiştir (47). Tez çalışmamızda izole ettiğimiz türlerden elde edilen C-fikosiyantinler hiçbir konsantrasyonda HeLa hücre serisine karşı belirgin sitotoksik aktivite göstermemiştir. Daha önce yapılan çalışmalar ve tezimizde elde ettiğimiz bulgulara dayanarak, C-fikosiyantin HeLa kanser hücre serisine karşı gösterdiği farklı düzeylerdeki sitotoksik etkinin kimyasal yapısındaki amino asitlerin farklı dizilimi ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamız; Afyonkarahisar ilinin jeotermal kaynaklarından izole edilerek yine jeotermal su içeren ortamlarda kültürü yapılan *Geitlerinema* sp., *Oscillatoria* sp., *Leptolyngbya* sp. (a) ve *Leptolyngbya* sp. (b) gibi siyanobakteri türlerinin kimyasal içerikleri ve bazı biyolojik etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir. Elde edilen tüm sonuçlar literatür ile uyumlu olup, bu çalışmalarını desteklemektedir.

Ayrıca çalışılan türlerin, daha önce çalışılan siyanobakteri türlerinden daha yüksek miktarda β -karoten ve C-fikosiyantin içeren türler olması nedeniyle, dünyada sağlık, gıda ve kozmetik sanayiinde yaygın olarak kullanılan *Spirulina* türüne alternatif olabilecek yeni türler bulunması ve ilaç adayı moleküllerin elde edilerek bilime kazandırılması açısından da önem arz etmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmamız sonucunda, Türkiye’de mikroalg florası daha önce hiç çalışılmamış bir bölge olan Afyonkarahisar ili jeotermal kaynaklarından, dört siyanobakteri türü izole edilmiş ve tanımlamaları yapılmıştır. Bu türler, *Geitlerinema*, *Oscillatoria* ve *Leptolyngbya* cinslerine aittir. Tanımlanan türler karotenoit profilleri, ekstre ve C-fikosiyaninlerinin antioksidan ve sitotoksik etkileri kapsamında araştırılmıştır. Elde edilen bulgular dünya çapında birçok alanda uygulaması bulunan *Spirulina* siyanobakterisinden elde edilen bulgular ile karşılaştırılmıştır.

İzole edilen siyanobakterilerin karotenoit karışımlarındaki ana karotenoitin β -karoten olduğu bulunmuştur. Lutein, *Geitlerinema* sp. dışındaki diğer üç siyanobakteride de mevcuttur. Bunun yanısıra İTK ve HPLC-DAD sonuçları ekstrelerde referans bileşikler olmadığı için tanımlanamayan karotenoitlerin olduğunu göstermiştir. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz türlerin tam karotenoit profilinin belirlenmesi için karotenoit referansları ile birlikte detaylı çalışmalar yapılması önerilmektedir. β -Karoten içeriği bakımından *Geitlerinema* sp.’nin *Spirulina*’ya alternatif tür olduğu tespit edilmiştir.

Dört farklı türden saflaştırılan C-fikosiyaninleri miktar ve verimlilik açısından ele aldığımızda *Leptolyngbya* sp. (a)’nın en yüksek miktar ve verimlilikte C-fikosiyanin içerdiği tespit edilmiştir. *Spirulina*’dan elde edilen C-fikosiyanin miktar ve verimliliği literatürden araştırılarak, türümüzün C-fikosiyanin içeriği açısından *Spirulina*’ya alternatif olabileceği görülmüştür. *Leptolyngbya* cinsine ait bu türün üretim parametreleri ile ilgili detaylı bir araştırma yapılarak üretim şartları fizibil koşullarda sağlanmalıdır.

Antioksidan etkilerin belirlenmesinde karotenoit karışımları ve C-fikosiyaninler kullanılmıştır. DPPH radikale karşı karotenoit karışımları etki gösterirken C-fikosiyaninler etki göstermemiştir. ABTS radikale karşı ise hem karotenoit karışımları hem de C-fikosiyaninler etki göstermiştir. DPPH ve ABTS radikallerini süpürücü etkinlikleri bakımından *Geitlerinema* sp. ve *Leptolyngbya* sp. (a)’dan elde edilen karotenoit karışımları ve C-fikosiyaninler ön plana çıkmıştır.

Sitotoksik etki çalışmaları elde ettiğimiz türlerdeki bileşiklerin antikanser aktiviteleri olup olmadığının belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. L929 sağlıklı hücre serisine karşı dört türün karotenoit karışımları da C-fikosiyaninleri de önemli

düzeyde sitotoksik etki göstermemiştir. Bu durum kanser ilaçları geliştirilmesinde istenen bir durumdur. *Geitlerinema* sp.'nin karotenoit karışımı HeLa kanser hücrelerine karşı zayıf bir sitotoksik etkiye sahiptir.

Karotenoitlerin ve fikosiyanınların farmakolojik özelliklerinin moleküllerin yapısı ve stabilitesine bağlı olduğu bilinmektedir. İleride *Spirulina*'ya alternatif olabilecek *Geitlerinema* sp. ve *Leptolyngbya* sp. (a)'da bulunan yararlı bileşiklerin moleküler yapılarının aydınlatılması ve stabilitelerinin sağlanması yönünde araştırmalar yapılacaktır.

Tez çalışmamız; dünyada sağlık, gıda ve kozmetik gibi endüstrilerde yaygın olarak kullanılan *Spirulina* türüne içeriğindeki karotenoitler ve fikosiyanın ile alternatif olabilecek türlerin tespiti, bu türlerin bazı biyolojik etkilerinin ortaya koyulması ve özellikle toprak özellikleri bakımından tarım yapılamayıp atıl durumda olan jeotermal alan topraklarının değerlendirilerek bu türler için üretim alanı olarak kullanılması bakımından önemli bir çalışmadır.

7. KAYNAKLAR

1. Efterpi Christaki EB, Panagiota Florou-Paneri. Chapter 14. Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. In: Kim SK, editor. Handbook of Marine Microalgae. Boston: Academic Press; 2015. p. 233-43.
2. Dumay J, Morançais M. Chapter 9 - Proteins and Pigments. In: Fleurence J, Levine I, editors. Seaweed in Health and Disease Prevention. San Diego: Academic Press; 2016. p. 275-318.
3. Cuellar-Bermudez SP, Aguilar-Hernandez I, Cardenas-Chavez DL, Ornelas-Soto N, Romero-Ogawa MA, Parra-Saldivar R. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microb Biotechnol.* 2015;8(2):190-209.
4. Haque F, Banayan S, Yee J, Chiang YW. Extraction and applications of cyanotoxins and other cyanobacterial secondary metabolites. *Chemosphere.* 2017;183:164-75.
5. Burja AM, Banaigs B., Abou-Mansour, E., Burgess, J. G., Wright, P. C. Marine cyanobacteria- a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 2001;57(46):9347-77.
6. Zarzycki PK, Ślęczka, M. M., Zarzycka, M. B., Włodarczyk, E., Baran, M. J. . Application of micro-thin-layer chromatography as a simple fractionation tool for fast screening of raw extracts derived from complex biological, pharmaceutical and environmental samples. *Analytica Chimica Acta.* 2011;688(2):168-74.
7. Vincent WF. Cyanobacteria. In: Likens GE, editor. Plankton of Inland Waters: Academic Press; 2009.
8. Patel HM, Rastogi, R. P., Trivedi, U., Madamwar, D. Structural characterization and antioxidant potential of phycocyanin from the cyanobacterium *Geitlerinema* sp. H8DM. *Algal Research.* 2018;32:372-83.
9. Guiry MD. *Spirulina Turbin ex Gomont, 1892* [Internet] 2000 [Available from: http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43080].
10. Ohmori M, Ehira S. *Spirulina: an example of cyanobacteria as nutraceuticals.* In: Sharma NK, Rai AK, Stal LC, editors. *Cyanobacteria An Economic Perspective.* UK: John Wiley & Sons, Ltd.; 2014. p. 105-6.
11. Guiry MD. *Geitlerinema (Anagnostidis & Komárek) Anagnostidis, 1989* [Internet] 2002 [Available from: http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=44059].
12. Komarek J, Johansen, J. R. . *Filamentous Cyanobacteria. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification* 2015. p. 135-235.
13. Guiry MD. *Oscillatoria Vaucher ex Gomont, 1892* [Internet] 2000 [Available from: http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43083].
14. Guiry MD. *Leptolyngbya Anagnostidis & Komárek, 1988, nom. et typ. cons.* [Internet] 2002 [Available from: http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43604].
15. Joshi D, Mohandass C, Dhale M. Effect of UV-B Radiation and Desiccation Stress on Photoprotective Compounds Accumulation in Marine *Leptolyngbya* sp. *Appl Biochem Biotechnol.* 2018;184(1):35-47.
16. Tang J, Jiang, D., Luo, Y., Liang, Y., Li, L., Shah, M. R., Daroch, M. Potential new genera of cyanobacterial strains isolated from thermal springs of western Sichuan, China. *Algal Research* 2018;31:14-20.

17. Erdogan A, Demirel, Z., Eroglu, A.E., Conk Dalay, M. Carotenoid Profile in *Prochlorococcus* sp. and Enrichment of Lutein Using Different Nitrogen Sources. *J Appl Phycol.* 2016;28:3251-7.
18. Paliwal C, Ghosh, T., George, B., Pancha, I., Maurya, R., Chokshi, K., Ghosh, A., Mishra, S. Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. *Algal Research.* 2016;15:24-31.
19. Burri BJ. Carotenoids: Chemistry, Sources and Physiology. In: Caballero B, editor. *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*. Waltham: Academic Press; 2013. p. 283-91.
20. Goodwin TW. Chapter 14 - Carotenoids: Structure, Distribution, and Function. In: Florkin M, Mason HS, editors. *Comparative Biochemistry*: Academic Press; 1962. p. 643-75.
21. Markou G, Nerantzis, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances.* 2013;31(8):1532-42.
22. Chiong T, Acquah C, Lau SY, Khor EH, Danquah MK. Chapter 12 - Microalgal-Based Protein By-Products: Extraction, Purification, and Applications. In: Singh Dhillon G, editor. *Protein Byproducts*: Academic Press; 2016. p. 213-34.
23. Dufossé L. 16 - Current and Potential Natural Pigments From Microorganisms (Bacteria, Yeasts, Fungi, Microalgae). In: Carle R, Schweiggert RM, editors. *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*. Woodhead Publishing 2016 p. 337-54.
24. Fernandes ESE, Figueira, FDS., Lettnin, AP., Carrett-Dias, M., Filgueira, DMVB., Kalil, S., Trindade, GS., Votto, APS. C-Phycocyanin: Cellular targets, mechanisms of action and multi drug resistance in cancer. *Pharmacological Reports.* 2018;70:75-80.
25. Fernandes-Rojas B, Hernandez-Juarez, J., Pedraza-Chaverri, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods* 11. 2014;11:375-92.
26. Eriksen NT. Production of phycocyanin--a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;80(1):1-14.
27. Khazi MI, Demirel Z, Conk Dalay M. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. *Journal of Applied Phycology* 2018;30:1513-23.
28. Borowitzka MA. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology.* 2013;25(3):743-56.
29. Renugadevi K, Nachiyar, C. V., Sowmiya, P., Sunkar, S. . Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp TRV57. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2018;16:27-242.
30. Kao TH, Loh CH, Inbaraj BS, Chen BH. Determination of carotenoids in *Taraxacum formosanum* by HPLC-DAD-APCI-MS and preparation by column chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;66:144-53.
31. Hynstova V, Sterbova D, Klejdus B, Hedbavny J, Huska D, Adam V. Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;148:108-18.

32. Sivathanu B, Palaniswamy S. Purification and characterization of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* by HPLC-NMR and LC-MS-APCI. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2012;2:276-82.
33. Herrera A, Boussiba S, Napoleone V, Hohlberg A. Recovery of c-phycoerythrin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *J Appl Phycol*. 1989;1:325-31.
34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
35. Okajima T, Tanabe T, Yasuda T. Nonurea Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis with High-Molarity Buffers for the Separation of Proteins and Peptides. *Analytical Biochemistry*. 1993;211(2):293-300.
36. Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn JA, Lee MY, et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*. 2002;163(6):1161-8.
37. Harput US, Genc Y, Saracoglu I. Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(5):1554-9.
38. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*. 2004;74(17):2157-84.
39. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
40. Szliszka E, Kucharska AZ, Sokol-Letowska A, Mertas A, Czuba ZP, Krol W. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:976415.
41. Ak İ, Cirik C. Blue-green algae (Cyanobacteria) and thermalism. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2017;34(2):227-33.
42. Ulcay Ozturk S, Kurt O. Algae Flora of Germencik-Alangüllü (Aydın, Turkey) Thermal Water. *Celal Bayar University Journal of Science*. 2017;13(3):601-8.
43. Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*. 1996;384:240-2.
44. Pleonsil P, Soogarun S, Suwanwong Y. Anti-oxidant activity of holo- and apo-c-phycoerythrin and their protective effects on human erythrocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;60:393-8.
45. Demirel Z, Hatipoğlu Uslu S, Nalbantsoy A, Yılmaz FF, Erbaykent Tepedelen B. A comparative study on antioxidant and cytotoxic effects of *Oscillatoria amphibia* and *Spirulina platensis* C-phycoerythrin and crude extracts. *Ege J Fish Aqua Sci*. 2012;29(1):1-7.
46. Wang Y, Jiang L, Yin Q, Liu H, Liu G, Zhu G, et al. The Targeted Antitumor Effects of CPC/CMC-CD59sp Nanoparticles on HeLa Cells in Vitro and in Vivo. *Journal of Cancer*. 2017;8(15):3001-13.
47. Jiang L, Wang Y, Zhu F, Liu G, Liu H, Ji H, et al. Molecular Mechanism of Anti-Cancer Activity of the Nano-Drug C-PC/CMC-CD59sp NPs in Cervical Cancer. *Journal of Cancer*. 2019;10(1):92-104.

8. EKLER

EK-1: Orjinallik Raporu



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Merve Sensoy
Ödev başlığı: Afyonkarahisar İli Jeotermal Su Kay...
Gönderi Başlığı: Afyonkarahisar İli Jeotermal Su Kay...
Dosya adı: Dosya boyutu:2.33M
Sayfa sayısı: 103
Kelime sayısı: 19,465
Karakter sayısı: 129,286
Gönderim Tarihi: 26-Tem-2019 04:55PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1155162710

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AFYONKARAHİSAR İLİ JEOTERMAL SU
KAYNAKLARINDAN İZOLE EDİLEN MİKROALGAL TÜRLER
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Biyomüh. Merve ŞENSOY

Farmakognozi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2019

Afyonkarahisar İli Jeotermal Su Kaynaklarından İzole Edilen Mikroalgal Türler Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar

Yazar Merve Sensoy

Gönderim Tarihi: 26-Tem-2019 04:55PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 1155162710

Dosya adı: (2.33M)

Kelime sayısı: 19465

Karakter sayısı: 129286

Afyonkarahisar İli Jeotermal Su Kaynaklarından İzole Edilen Mikroalgal Türler Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar

ORIJINALLIK RAPORU

%9

BENZERLİK ENDEKSİ

%7

İNTERNET
KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%7

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%4
2	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	%1
3	avesis.ege.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<%1
8	Submitted to Chonnam National University Öğrenci Ödevi	<%1

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Merve ŞENSOY
Doğum Yeri-Tarihi : Afyonkarahisar-12.05.1985
Uyruğu : T.C.
İletişim Bilgileri : algalbiotek@gmail.com

Eğitim Bilgileri

2010-2019 Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi- Ankara
2003-2008 Lisans : Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü- İzmir
2000-2003 Lise Öğrenimi : Anadolu Öğretmen Lisesi- Afyonkarahisar
1996-2000 Orta Öğrenimi : Milli Piyango Anadolu Lisesi- Afyonkarahisar
1991-1996 İlköğretim: Atatürk İlköğretim Okulu- Afyonkarahisar

Mesleki Denevim

2012- İşletme Yetkilisi
 Algal Biyoteknoloji Seracılık San. Tic. Ltd. Şti., Afyonkarahisar

Bilimsel Faaliveter

Uluslararası kongrelerde sunulan SCI, SCI Expanded, SSCI ve AHCI kapsamındaki; dergi özel sayılarında özeti yayımlanmış poster bildirisi

1. **Sensoy M**, Dogan Z, Conk Dalay M, Demirel Z, Saracoglu I. Microalgae: from culture medium to medicine. *Planta Med.* 2013;79(13):1272.

Diğer uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve özeti yayımlanmış poster bildirileri

1. **Sensoy M**, Dogan Z, Conk Dalay M, Demirel Z, Saracoglu I. Evaluation of carotenoid profiles and antioxidant activities of *Chlorella sp.* Cultured in various water supplies [Poster]. The 3rd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts; June 2013; Toronto.
2. **Sensoy M**, Dogan Z, Conk Dalay M, Demirel Z, Saracoglu I. Antioxidant and cytotoxic activities of isolated geothermal microalgae species [Poster]. Trends in Natural Products Research; June 2014; Olomouc.
3. **Sensoy M**, Dogan Z, Conk Dalay M, Demirel Z, Saracoglu I. Antioxidant and cytotoxic microalgae species from four local geothermal sources [Poster]. 11st

International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11); Haziran 2015; Ankara.

4. **Şensoy M**, Doğan Z, Conk Dalay M, Demirel Z, Saraçoğlu, İ. Afyonkarahisar ili jeotermal su kaynaklarından izole edilen bazı siyanobakteriler üzerinde kimyasal içerik ve biyolojik etki çalışmaları [Poster]. 23. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (23. BİHAT); Nisan 2018; Antalya.
5. **Sensoy M**, Dogan Z, Conk Dalay M, Demirel Z, Saracoglu I. Therapeutic and economic aspects of cyanobacteria from geothermal sources in Afyonkarahisar province [Poster]. 12nd International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11); Haziran 2018; Ankara.

Aldığı Destekler

1. Türkiye Cumhuriyeti Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı– Teknogirişim Sermaye Desteği Programı, 2012-2013.
Proje: Termal ısıtım seralarda mikroalgal biyokütle üretimi
2. Türkiye Cumhuriyeti Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı- Teknopazar Destek Programı, 2014.
Proje: “interCHARM2014: XXI International Perfumery and Cosmetics Exhibition” Moskova- Rusya, 22-25/10/2014 fuarına katılım.