



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEŞİTLİ DENİZ ALGLERİNİN ANTIOKSİDAN BİLEŞENLERİNİN
ve TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

Özge KARAKAŞ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Sibel YALÇIN

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

İSTANBUL-2019

Bu çalışma 24.05.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ



Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Keşer SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Fakülte



Doç. Dr. Esra ÇAPANOĐLU GÜVEN
İstanbul Teknik Üniversitesi
Kimya-Metalurji Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa’nın aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 27468 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 115Z836 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca güler yüzü ve tüm içtenlikleriyle, her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli danışman hocalarım Prof.Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ ve Doç. Dr. Sibel YALÇIN'a

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübesini esirgemeyen değerli hocam Prof.Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN'a, çalışmalarım süresince her türlü laboratuvar imkanı sağlayan başta Doç. Dr. Ayşem ARDA olmak üzere Analitik Kimya Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma,

Tezde kullandığım alglerin temini ve teşhisinde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Emine Şükran OKUDAN 'a

Yüksek lisans öğrenimim süresince yardımlarını esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Merve UZUN, Araş. Gör. Aslı Neslihan AVAN, Araş. Gör. Asiye Aslıhan AVAN, Seda UZUNBOY, Govigerel BAYARSAIKHAN ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca hep yanımda olan, her koşulda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, koşulsuz sevgilerini daima hissettiren sevgili annem Aynur KARAKAŞ ve babam Haluk KARAKAŞ' a

115Z836 nolu,'Çeşitli Deniz Yosularının Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Katı Faz Ekstraksiyonu ve Sıvı Kromatografisi ile; Antioksidan Kapasitelerinin Spektrofotometri ile Tayini' isimli araştırma projesi ile, tezim sırasında burs sağlayan TÜBİTAK'a

Tezimle aynı adı taşıyan 27468 numaralı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2019

Özge KARAKAŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xii
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR	3
2.2. DOĞAL ANTİOKSİDANLAR	4
2.2.1. C vitamini	4
2.2.2. E vitamini	4
2.2.3. Fenolik bileşikler	5
2.2.3.1. Flavonoidler	5
2.2.3.2. Fenolik asitler.....	8
2.2.3.3. Fenolik polimerler (Tanenler)	10
2.2.4. Karotenoidler	10
2.2.4.1. β - karoten.....	11
2.2.3.2. Zeaksantin ve Lutein	12
2.2.4. Klorofiller	13
2.3. DENİZ ALGLERİ.....	14
2.3.1. Alglerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması	14
2.3.1.1 Kahverengi Alglerin (<i>Phaeophyceae</i>) Genel Özellikleri	15
2.3.1.2. Kırmızı Alglerin (<i>Rhodophyceae</i>) genel özellikleri	16
2.3.1.3. Yeşil Alglerin (<i>Chlorophyceae</i>) Genel Özellikleri	17
2.3.2. Alglerin Kullanım Alanları.....	17
2.4. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ	18
2.4.1. CUPRAC (Cupric Reducing Antioksidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemi	18

2.4.2. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS Yöntemi	19
4.4.3. Folin-Ciocalteu Yöntemi	20
2.5. DENİZ ALGLERİNDE TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ VE FENOLİK BİLEŞİKLERİN BELİRLENMESİ İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR	21
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	24
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	24
3.2. KİMYASAL MADDELER	24
3.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	25
3.3. DENİZ ALG ÖRNEKLERİNİN ANALİZE HAZIRLANMASI	25
3.3.1. Alg Örneklerinin Temin Edilmesi	25
3.3.2. Alg Örneklerinin Kurutulması.....	27
3.3.3. Alg Örneklerinin Ekstraksiyonu	29
3.3.3.1. Alglerdeki Karotenoid ve Klorofil Bileşenlerinin Ekstraksiyonu	29
3.3.3.2. Alglerdeki Polifenolik Bileşenlerin Ekstraksiyonu	29
3.3.3.3. Alg Örneklerinin Hidrolizi.....	29
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	30
3.4.1. Spektrofotometrik Yöntemler.....	30
3.4.1.1. CUPRAC Yöntemi.....	30
3.4.1.2. ABTS Yöntemi	30
3.4.1.3. Folin Ciocalteu Yöntemi (Toplam Fenolik Madde Tayini).....	31
3.4.2. Kromatografik Yöntemler	31
3.4.2.1. Karotenoid ve Klorofillerin HPLC Analizi ile Belirlenmesi.....	31
3.4.2.2. Fenolik Bileşenlerin HPLC Analizi ile Belirlenmesi	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. UYGUN EKSTRAKSİYON ÇÖZÜCÜSÜNÜN SEÇİLMESİ.....	33
4.2. CUPRAC YÖNTEMİNİN BAZI ANTİOKSİDAN STANDARTLARINA UYGULANMASI, TEAC KATSAYILARININ VE B-KAROTEN EŞDEĞERİ ANTİOKSİDAN KAPASİTE (B-CEAC) KATSAYILARININ BELİRLENMESİ.....	36
4.3. ÇALIŞILAN ANTİOKSİDANLARIN HPLC KALİBRASYONLARININ SONUÇLARI	38
4.3.1. Karotenoid ve Klorofil Standartlarının HPLC ile Kalibrasyon Sonuçları.....	38
4.3.2. Çalışılan Fenolik Standartlarının HPLC ile Kalibrasyon Sonuçları.....	40
4.4. ALG ÖRNEKLERİNİN SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZ SONUÇLARI	41
4.5. ALG ÖRNEKLERİNİN HPLC ANALİZİ VE HPLC-CUPRAC YÖNTEMİ SONUÇLARI	44

4.5.1. Karotenoid ve Klorofil Bileşiklerinin HPLC Analizi ve HPLC-CUPRAC Sonuçları.....	44
4.5.2. Fenolik Bileşiklerin HPLC Analizi	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ	66



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: C vitamininin kimyasal yapısı	4
Şekil 2.2: α -tokoferol'ün kimyasal yapısı	4
Şekil 2.3: Flavonoidlerin genel yapısı.....	5
Şekil 2.4: Flavonların kimyasal yapıları.	6
Şekil 2.5: Flavonollerin kimyasal yapıları.	6
Şekil 2.6: Flavanonların kimyasal yapıları.	7
Şekil 2.7: Flavanollerin kimyasal yapıları.	7
Şekil 2.8: İzoflavonların kimyasal yapıları.	8
Şekil 2.9: Antosiyanidinlerin kimyasal yapıları.....	8
Şekil 2.10: Hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapıları.	9
Şekil 2.11: Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapıları	9
Şekil 2.12: Prosiyanidinlerin genel kimyasal yapısı	10
Şekil 2.13: β -karotenin kimyasal yapısı	12
Şekil 2.14: Zeaksantin'nin kimyasal yapısı	12
Şekil 2.15: Lutein'nin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.16: Klorofil a kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.17: ABTS ^{•+} radikal katyonunun yapısı	20
Şekil 3.1: <i>Jania Rubens</i>	27
Şekil 3.2: <i>Hypnea Musciformis</i>	27
Şekil 3.3: <i>Codium Fragile</i>	28
Şekil 3.4: <i>Caulerpa Racemosa</i> var. <i>Cylindracea</i>	28
Şekil 3.5: <i>Colpomenia Sinuosa</i>	28

Şekil 4.1: <i>Jania rubens</i> alg örneğinin (1:10 seyreltilmiş) farklı oranlarda MeOH-su içeren ekstraktlarının spektrumları.	33
Şekil 4.2 : <i>Jania Rubens</i> alg örneğinin (1:10 seyreltilmiş) farklı oranlarda EtOH-su içeren ekstraktlarının spektrumları.	34
Şekil 4.3: <i>Jania rubens</i> alg örneğinin aseton ekstraktının spektrumu.	34
Şekil 4.4: <i>C.Spongiosum f.v</i> alg örneğinin (1:10 seyreltilmiş) farklı oranlarda MeOH-su içeren ekstraktlarının spektrumları.	35
Şekil 4.5: <i>C. Spongiosum f.v</i> alg örneğinin (1:10 seyreltilmiş) farklı oranlarda EtOH-su ekstraktlarının spektrumları.....	35
Şekil 4.6: Karotenoid bileşenlerinin 450 nm de elde edilen kromatogramları: (1) Fukoksantin, (2) Violaksantin, (3) Neoksantin, (4) Astaksantin, (5) Lutein, (6) Zeaksantin, (7) α -karoten, (8) β -karoten.	39
Şekil 4.7: Klorofil bileşenlerinin 650 nm'deki kromatogramları: (1) Klorofil b, (2) Klorofil a standart karışımlarının kromatogramları.	39
Şekil 4.8: Fenolik bileşenlerinin 270 nm'deki kromatogramları:(1) Floroglusinol, (2) Gallik asit, (3) Kateşin, (4) Epikateşin, (5) Kafeik asit, (6) p-Kumarik asit, (7) Rutin (8) Hesperidin, (9) Morin.	41
Şekil 4.9: <i>Jania rubens</i> alg örneğinin (1:15 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1) Fukoksantin, (2) Lutein, (3) Zeaksantin, (4) Klorofil a, (5) β karoten).....	45
Şekil 4.10: <i>Jania rubens</i> alg örneğinin (1:15 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1) Klorofil a, (2) Feofitin a.....	45
Şekil 4.11: <i>H. Musciformis</i> alg örneğinin (1:20 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1) Fukoksantin, (2) Klorofil b, (3)Zeaksantin,(4) Klorofil a, (5) α karoten, (6) β karoten.	46
Şekil 4.12: <i>H. Musciformis</i> alg örneğinin (1:20 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1) Klorofil b, (2) Klorofil a.	46
Şekil 4.13: <i>C.Spongiosum f.v</i> alg örneğinin (1:10 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1) Fukoksantin, (2) Lutein, (3) Klorofil a, (4) β -Karoten.	47
Şekil 4.14: <i>C.Spongiosum f.v</i> alg örneğinin (1:10 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1) Klorofil a.....	47
Şekil 4.15: <i>Colpemenia sinuosa</i> alg örneğinin (1:5 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1)Fukoksantin, (2) Zeaksantin, (3) Klorofil a, (4) β karoten , (5) α -karoten	48

Şekil 4.16: <i>Colpomenia sinuosa</i> alg örneğinin (1:5 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1)Klorofil a , (2) Feofitin a.....	48
Şekil 4.17: <i>Caulerpa racemosa</i> alg örneğinin (1:10 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1)Fukoksantin, (2) Klorofil b, (3) Klorofil a, (4) α karoten, (5) β -karoten.....	49
Şekil 4.18: <i>Caulerpa racemosa</i> alg örneğinin (1:10 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1) Klorofil b, (2) Klorofil a , (3) Feofitin a.	49
Şekil 4.19: <i>Codium Fragile</i> alg örneğinin aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1) Fukoksantin, (2) violaksantin, (3) Klorofil a (4) α -karoten.	50
Şekil 4.20: <i>Codium Fragile</i> alg örneğinin aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1,2) Klorofil b, (3) Klorofil a.....	50
Şekil 4.21: <i>H. Musciformis</i> alg örneğinin %80 MeOH ekstraktının 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) Kateşin.....	53
Şekil 4.22: <i>C.Spongiosum f.v</i> alg örneğinin % 80 MeOH ekstraktının 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) Floroglusinol.	54
Şekil 4.23: <i>C.Spongiosum f.v</i> alg örneğinin % 80 MeOH ekstrakt hidrolizinin 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1)floroglusinol.....	54
Şekil 4.24: <i>Colpomenia sinuosa</i> alg örneğinin % 80 MeOH-su ekstraktının 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) Kateşin.....	55
Şekil 4.25: <i>Colpomenia sinuosa</i> alg örneğinin %80 MeOH ekstraktın hidrolizinin 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) Gallik asit.	55
Şekil 4.26: <i>Caulerpa racemosa</i> alg örneğinin %80 MeOH-su ekstraktının 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) floroglusinol.	56
Şekil 4.27: <i>Caulerpa racemosa</i> alg örneğinin %80 MeOH ekstraktın hidrolizinin 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) Floroglusinol.	56

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Kahverengi, kırmızı ve yeşil alg gruplarından toplanan çeşitli alg türlerinin listesi ve temin edilme koşulları	26
Tablo 3.2: Karotenoid bileşenlerin analizi için belirlenen HPLC metodu	31
Tablo 3.3: Fenolik bileşenlerin analizi için belirlenen HPLC metodu	32
Tablo 4.1: Karotenoid ve klorofil pigmentlerinin CUPRAC yöntemi ile elde edilen doğru denklemleri ve β -karoten eşdeğeri (β - CEAC _{CUPRAC}), troloks eşdeğeri (TEAC _{CUPRAC}) katsayıları.....	36
Tablo 4.2 : Fenolik standartların CUPRAC yöntemi ile elde edilen molar absorplama katsayıları ($\epsilon_{\text{fenolik}}$, L mol ⁻¹ cm ⁻¹) ve TEAC katsayısı değerleri.	37
Tablo 4.3: Bazı karotenoid ve klorofil bileşiklerinin HPLC ile elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.	38
Tablo 4.4: Çeşitli antioksidan standartlarının HPLC ile elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.	40
Tablo 4.5: Referans maddeler (GA ve TR) için belirlenmiş doğru denklemleri.....	42
Tablo 4.6: Alg örneklerinin %80 MeOH-su ekstraktlarının CUPRAC, ABTS yöntemleri ile belirlenmiş TAC değerleri ($\mu\text{mol TR/g}$) ile folin yöntemi ile belirlenmiş ($\mu\text{mol GA/g}$) değerleri.....	42
Tablo 4.7: Alg örneklerinin aseton ekstraktlarının CUPRAC, ABTS yöntemleri ile belirlenmiş toplam antioksidan değerleri ($\mu\text{mol TR/g}$) ile β -karoten eşdeğeri olarak belirlenen toplam antoksidan değerleri	43
Tablo 4.8: Alg örneklerinde bulunan karotenoid ve klorofil bileşenlerinin HPLC ile belirlenen miktarları ($\mu\text{g/g alg}$).	51
Tablo 4.9: HPLC-CUPRAC yöntemleri ile belirlenmiş teorik TAK değerleri ($\mu\text{mol TE /g alg}$ ve $\mu\text{mol } \beta\text{-CE /g alg}$)	52
Tablo 4.10: Alg örneklerinde HPLC ile belirlenen fenolik bileşenlerin (hidroliz öncesi ve sonrası) HPLC-CUPRAC yöntemi ile hesaplanmış teorik (bireysel ve toplam) antioksidan kapasite değerleri ($\mu\text{mol TE /g alg}$).	57

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
r	: korelasyon katsayısı
y	: pik alanı
ϵ	: molar absorplama katsayısı

Kısaltmalar	Açıklama
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif azot türleri
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ABTS•⁺	: ABTS radikal katyonu
CUPRAC	: Bakır (II)iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
TR	: Troloks
TAC	: Toplam antioksidan kapasitesi
EtOH	: Etanol
MeOH	: Metanol
Nc	: Neokuproin
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi
FC	: Folin-Ciolcalteu yöntemi
Fks	: Fukoksantin
Vks	: Violaksantin
Lt	: Lutein
Zks	: Zeaksantin
α-kar	: α karoten
β-kar	: β karoten
Klfil a	: Klorofil a
Klfil b	: Klorofil b
Ffa	: Feofitin a

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEŞİTLİ DENİZ ALGLERİNİN ANTIOKSİDAN BİLEŞENLERİNİN ve TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Özge KARAKAŞ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

II. Danışman: Doç. Dr. Sibel YALÇIN

Deniz alglerinin antioksidan aktiviteleri, başta polifenoller (fenolik asitler, flavonoidler, izoflavonlar, hidroksi benzoik asitler) olmak üzere içerdikleri polisakkaritler, pigmentler (klorofiller, karotenoidler) ve vitaminlerden ileri gelmektedir. Deniz alglerinin bu özelliklerinden yararlanılarak antioksidan içeriklerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması ile sentetik antioksidanlar yerine kullanılabilen doğal antioksidanları elde etmek için antioksidan kapasitelerinin tayin edilmeleri amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada *H. Musciformis*, *J. Rubens*, *C. Spongiosum*, *C. Sinuosa*, *C. Racemosa*, *C. Fragile* alglerinin toplam antioksidan kapasiteleri ve antioksidan özelliğine sahip bileşenleri incelendi.

Deniz yosunlarının toplam polifenol içerikleri spektrofotometrik Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlendi. Alglerin, gerek polifenolik gerekse karotenoid ve klorofil bileşenlerinden ileri gelen toplam antioksidan kapasiteleri spektrofotometrik CUPRAC (Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) ve ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asid)/TEAC (trolloks eşdeğeri antioksidan kapasite) yöntemleri ile belirlendi. Her bir bileşenin toplam antioksidan kapasiteye olan katkısını belirlemek için ters faz HPLC yöntemi kullanıldı.

Karotenoid içeriği en yüksek olan alglerden *C. Fragile* ve *C. Sinuosa* için TAK değerleri ($\mu\text{mol TR/g}$) CUPRAC yöntemi ile $4,26 \pm 0,04$ ve $2,67 \pm 0,01$, ABTS yöntemi ile ise $2,85 \pm 0,01$ ve $1,44 \pm 0,01$ olarak belirlendi. Fenolik bileşence zengin olan algler *C.Spongiosum* ve *J.Rubens* için TAK değerleri ($\mu\text{mol TR/g}$) CUPRAC yöntemi ile $7,97 \pm 0,02$ ve $7,36 \pm 0,02$, ABTS yöntemi ile $4,87 \pm 0,04$ ve $4,42 \pm 0,01$ olarak belirlendi.

Karotenoid bileşiklerin belirlenmesi için HPLC yöntemi uygulandı. Kırmızı alglerden *H. Musciformis*'in fukoksantin, klorofil a, klorofil b, zeaksantin ve fenofitin a, diğer kırmızı alg *J. Rubens*'in klorofil a, fukoksantin, klorofil b, fenofitin a, zeaksantin, lutein içerdiği belirlenmiştir. Kahverengi alglerden *C.Sinuosa*'da fukoksantin, β -karoten, klorofil a, fenofitin a, zeaksantin ve α -karoten bileşikleri, *C.Spongiosum*'da fukoksatin, lutein, klorofil a ve β -karoten bileşikleri belirlendi. Yeşil alglerden *C.Racemosa*'da fukoksantin, klorofil a ve b, α -karoten ve β -karoten, *C.Fragile*'de fukoksantin, violaksantin, klorofil b ve α -karoten bileşikleri belirlendi. *H.Musciformis*, *J.Rubens*, *C.Spongiosum*, *C.Sinuosa*, *C.Fragile*, *C.Racemosa* HPLC-CUPRAC toplam antioksidan değerleri ($\mu\text{mol TE /g alg}$) sırasıyla 0,20, 0,36, 0,20, 1,24, 5,49, 1,53 olarak bulundu. HPLC yönteminde örneklerde belirlenen fenolik bileşenler *C.spongiosum* ve *C.racemosa* da floroglusinol, *H.musciformis* ve *C.sinuosa* da ise kateşin'dir.

Mayıs 2019, 82 sayfa.

Anahtar kelimeler: Deniz algleri, Antioksidan, CUPRAC, ABTS, HPLC

SUMMARY

M.Sc. THESIS

DETERMINATION of ANTIOXIDATIVE COMPONENTS and TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY of VARIOUS MARINE ALGAE

Özge KARAKAŞ

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Sibel YALÇIN

The antioxidant activities of marine algae are mainly as a result of the presence of polysaccharides (phenolic acids, flavonoids, isoflavones, hydroxy benzoic acids), pigments, chlorophylls, carotenoids and vitamins. The aim of this study is to determine the antioxidant contents of marine algae and to determine their antioxidant capacity in order to obtain the natural antioxidants that can be used in place of synthetic antioxidants.

In this study, the total antioxidant capacity and antioxidant properties of *H. Musciformis*, *J. Rubens*, *C. Spongiosum*, *C. Sinuosa*, *C. Racemosa*, *C. Fragile* algae were investigated.

The total polyphenol content of seaweeds was determined by spectrophotometric Folin-Ciocalteu method. The total antioxidant capacity of algae, including polyphenolic, carotenoid and chlorophyll components was determined using spectrophotometric CUPRAC (Cu (II) ion-reducing antioxidant capacity) and ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) / TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity). Reverse phase HPLC method was used to determine the contribution of each component to total antioxidant capacity.

Among algae samples, carotenoid compounds found to have the highest total antioxidant capacity value ($\mu\text{mol TR / g}$) includes *C. Fragile* and *C. Sinuosa* with $4,26 \pm 0,04$ and $2,67 \pm 0,01$ (CUPRAC), $2,85 \pm 0,01$ and $1,44 \pm 0,01$ (ABTS), respectively. TAC values ($\mu\text{mol TR / g}$) for algae *C.Spongiosum* and *J.Rubens* rich in phenolic component were determined by CUPRAC method $7,97 \pm 0,02$ and $7,36 \pm 0,02$ by ABTS method $4,87 \pm 0,04$ and $4,42 \pm 0,01$.

The HPLC method was used to determine carotenoid compounds. In the red algae *H. Musciformis* algae sample, fucoxanthine, chlorophyll a, chlorophyll b, zeaxanthin and fenofitin were found. However, in red algae *J. Rubens* sample, chlorophyll a, fucoxanthine, chlorophyll b, fenofitin a, zeaxanthin and lutein were found. Brown algae *C.Sinuosa* fukoksantin, β -carotene, chlorophyll a, fenofitin a, zeaxanthin and α -carotene compounds, *C.spongiosum* algae fucoxatin, lutein, chlorophyll a and β -carotene compounds were found. Green algae *C.Racemosa*, Fucoxanthine, chlorophyll a and b, α -carotene and β -carotene. In *C.Fragile*, fucoxanthine, violaxanthin, chlorophyll b and α -carotene compounds were confirmed. The HPLC-CUPRAC total antioxidant values ($\mu\text{mol TE / g}$ algae) of *H.musciformis*, *J.rubens*, *C.Spongiosum*, *C.Sinuosa*, *C. Fragile*, *C.Racemosa* were found as 0.20, 0.36.0.20, 1.24, 5.49, 1.53, respectively. Using HPLC method, the phenolic compound found in *C.Spongiosum* and *C.Racemosa* was floroglusinol while Catechin was found in *H.Musciformis* and *C.Sinuosa*.

May 2019, 82 pages.

Keywords: Algae, antioxidant, CUPRAC, ABTS, HPLC

1. GİRİŞ

Reaktif oksijen türlerinin organizmada bulunan veya gıda olarak alınan antioksidanlarla dengelenememesi durumunda oluşan oksidatif stres, biyolojik yapıların oksidatif hasarına sebep olmaktadır. Bu oluşan hasarlar kalp-damar hastalıkları, kanser ve şeker hastalığı gibi hastalıklara neden olmaktadır (Fang ve diğ., 2002).

Antioksidanlar, vücudu bu reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasara karşı korumada etkilidirler. Genel olarak lipit içeren gıdalarda kullanılan butillenmiş hidroksianisol (BHA) ve butillenmiş hidroksitoluen (BHT) gibi sentetik antioksidanların zararlı etkilerinden dolayı kullanımı sınırlandırılmaktadır, bunların yerine doğal antioksidanlar tercih edilmektedir (Duan ve diğ., 2006). Bitkiler, basit fenolikler, fenolik asitler, antosiyaninler, hidroksisünamik asit türevleri ve flavonoidler gibi çeşitli fenolik bileşikler grubunu içerirler. Bitkilerde bulunan tokoferol, fenolikler ve β -karoten gibi doğal antioksidanlar, gıda endüstrisinde lipid peroksidasyonunu engellemek için kullanılır ve insan vücudunu serbest radikallerden koruyabilir ve birçok kronik hastalığın ilerlemesini engelleyebilirler (Qi ve diğ., 2005).

Algler, insanların ve hayvanların beslenmesinde kullanılan önemli biyoaktif madde kaynaklarıdır. Doğal antioksidanlar arasında bulunan fenolik antioksidanlar deniz yosunlarında da yaygın olarak bulunur (Duan ve diğ., 2006). Klorofiller, karotenoidler, E vitamini gibi tokoferol türevleri ve bitki kaynaklı antioksidanlarla yapısal olarak ilişkili olan ilgili izoprenoidler bazı deniz organizmalarında bulunmuştur. Kateşinler (epigallokateşin, epikateşin ve kateşin gallat gibi), flavonoller ve flavonol glikozitler gibi polifenolik bileşik, kırmızı ve kahverengi alglerde tanımlanmıştır (Yoshie ve diğ., 2000; Santoso ve diğ., 2002; Yoshie-Stark ve diğ., 2003). Astaksantin, fukoksantin, β -karoten, lutein ve zeaksantin gibi alglerden elde edilebilen karotenoidler de doğal antioksidan kaynakları olarak kullanılabilirler. Gıda, kozmetik ve eczacılık gibi birçok alanlarda uygulamalar bulunmaktadır (Christaki ve diğ., 2012).

Bu çalışmada deniz alg örneklerinin toplam antioksidan kapasitesi, CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) ve ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asid) yöntemleri ile belirlenerek sonuçlar karşılaştırıldı. Toplam fenolik madde miktarı için ise Folin-Ciocalteu yöntemi uygulandı.

Çalışılan alglerin içerdiği fenolik bileşenler ve karotenoidler yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleri ile belirlendi. Standart maddeler ve PDA (Foto diyot dizisi) dedektör kullanılarak gerçekleştirilen HPLC analizleri sonucunda alg örneklerindeki antioksidan bileşenleri kalitatif ve kantitatif olarak belirlenerek değerlendirildi.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. SERBEST RADİKALLER VE ANTIOKSİDANLAR

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip moleküller olarak tanımlanır. Genellikle kararsız ve çok reaktiflerdir. Serbest radikaller oksijen ve azot kaynaklı olabilirler, bunlar reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) olarak ifade edilmektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda fizyolojik ve patolojik koşullarda oluşan serbest radikallerden; reaktif oksijen türlerini süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), peroksil (ROO^{\bullet}), hidroksil (OH^{\bullet}), hidroperoksil (HO_2^{\bullet}), alkoksi (RO^{\bullet}) radikalleri oluşturmaktadır. Reaktif azot türlerini ise azot oksit (NO^{\bullet}), Azot dioksit (NO_2^{\bullet}) oluşturmaktadır. Genellikle oksidanlar olarak adlandırılan hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen (1O_2), hipokloröz asit ($HOCl$), peroksinitrit ($ONOO^-$), nitrik asit (HNO_2) ve diazot trioksit (N_2O_3) ise serbest radikaller arasında gösterilmezler (Fang ve diğ., 2002).

Yüksek konsantrasyonlarda ROS hücre yapılarında, nükleik asitlerde, lipitlerde ve proteinlerde hasara yol açmaktadır ve bu oluşan hasarlar kanser, kalp damar hastalıkları gibi çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Bazı serbest radikaller metabolik reaksiyonlar sırasında açığa çıkabildiği gibi kirlilik, radyasyon, sigara dumanı gibi çevresel faktörler de serbest radikal oluşumuna neden olabilir (Kaur ve Kapoor, 2001).

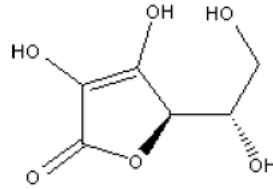
Potansiyel biyolojik hasara neden olan serbest radikallerin zararlı etkisi oksidatif stres olarak adlandırılır. Biyolojik sistemde serbest radikal artışında, endojen glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPO), glutatyon reduktaz (GRx), glutatyon s transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve diğer antioksidanlar (A,C,E vitaminler, flavonoidler) oksidanları nötralize etmede yetersiz kalır ise antioksidan ve oksidan arasındaki denge bozulur. Bu dengenin oksidanlar yönünde bozulması oksidatif stres olarak ifade edilir ve bu durum doku hasarlarına yol açmaktadır.

Antioksidanlar radikal oluşumunu önleyen ve oluşan radikalleri etkisiz hale getiren moleküllerdir. Antioksidanlar gıdaların bozunmasını önlemek ve besin değerini korumak amacıyla da kullanılır. Ayrıca yağlarda, havadaki oksijenin neden olduğu otooksidasyonu yavaşlatmak için kullanılarak kalitesi ve raf ömrü uzatılır. Sebze ve meyveler içerdikleri antioksidanlar sayesinde çeşitli hastalıklara karşı koruma sağlarlar.

2.2. DOĞAL ANTIOKSİDANLAR

2.2.1. C vitamini

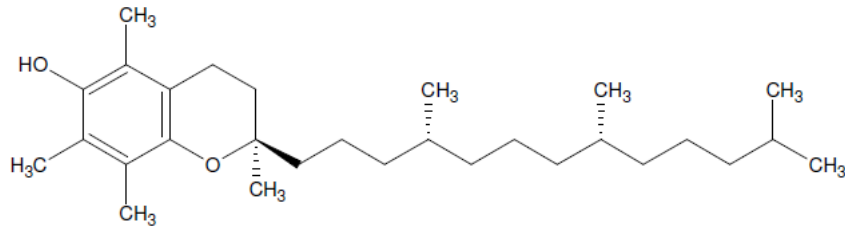
C vitamini diğer bir ifadeyle askorbik asit bitkilerde yaygın olarak bulunan, suda çözünebilen vitamindir. Birçok bitki ve bazı hayvanlar tarafından sentezlenebilmekte olup insanlar tarafından sentezlenememektedir. Doğada birçok sebze ve meyvelerde bulunmaktadır. C vitamini limon, portakal, greyfurt, çilek, kivi gibi meyvelerde, ıspanak, lahana, karnabahar, tere turp gibi sebzelerde bulunmaktadır. C vitamini bağ dokusu oluşumunda ve aynı zamanda göstermiş olduğu antioksidan özelliğinden dolayı serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonların önlenmesinde de rol oynamaktadır (Güçlü ve diğ., 2005).



Şekil 2.1: C vitamininin kimyasal yapısı

2.2.2. E vitamini

Doğada α , β , γ , ve δ -tokoferol ile α , β , γ , ve δ tokotrienol olmak üzere 8 tip Vitamin E bulunur. Biyolojik olarak etkisi en fazla olan alfa tokoferoldür. Tokoferoller bitkisel organizmalar tarafından sentezlenebilir. Tokoferollerin antioksidan etkileri 6 numaralı karbon atomuna bağlı -OH grubundan ileri gelmektedir En önemli E vitamini kaynakları bitkisel yağlar, ceviz, fındık ve kurubaklagiller'dir (Rizvi ve diğ., 2014).



Şekil 2.2: α -tokoferol'ün kimyasal yapısı

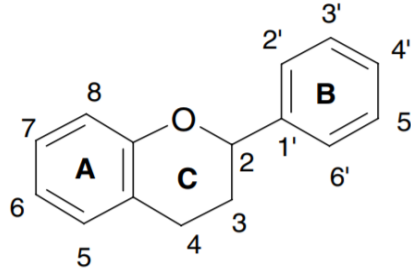
2.2.3. Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler 8000'den fazla çeşide sahip meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerin gösterdikleri antioksidan etkilerden dolayı kanser, kardiyovasküler hastalıklar, şeker hastalığı ve nörodejeratif hastalıklara karşı koruyucu rolleri bulunmaktadır (D'Archivio ve diğ., 2007).

Fenolik bileşikler flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik polimerler (tanenler) olmak üzere üç gruba ayrılırlar.

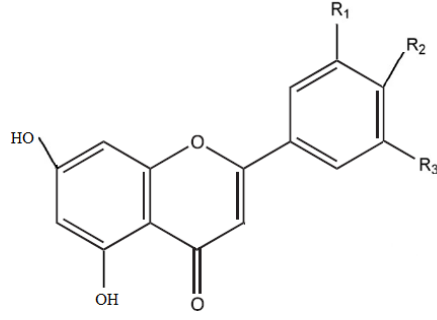
2.2.3.1. Flavonoidler

Flavonoidler difenilpropan (C₆-C₃-C₆) iskeletine sahip on beş karbon atomundan oluşan düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Flavonoidler doğada yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerdir. Flavonoidler antosiyaninler ve antoksantrinler olarak sınıflandırılır. Antoksantrinler ise Flavonlar, flavonoller, flavanoller, flavanlar, izoflavonlar ve dihidrokalkonlar olarak 6 gruba ayrılırlar.



Şekil 2.3: Flavonoidlerin genel yapısı.

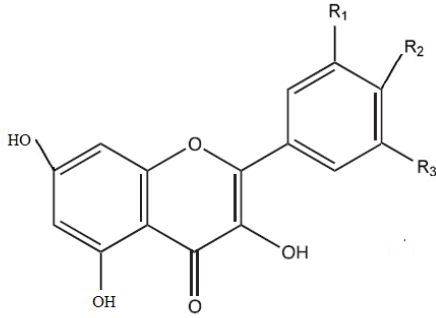
Flavonlar, C₂ ve C₃ karbonları arasında çift bağa sahip ve C₃ konumunda hidroksil grubu içermeyen molekül yapısına sahiptir. Flavonlar gıdalarda aglikonları olarak bulunurlar ve yaklaşık olarak 100 flavon tanımlanmıştır. Flavonlar en çok maydanoz, enginar ve kerevizde bulunmaktadır. Başlıca flavonlar apigenin, luteolindir



	R ₁	R ₂	R ₃
Apigenin	H	OH	H
Luteolin	OH	OH	H

Şekil 2.4: Flavonların kimyasal yapıları.

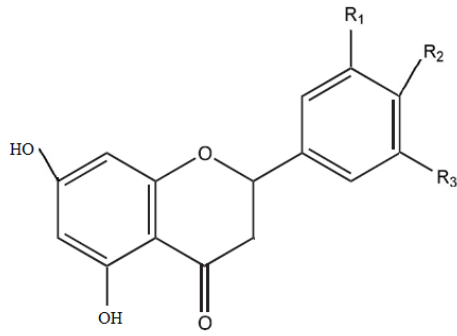
Flavonoller, C₂ ve C₃ karbonları arasında çift bağa sahip ve C₃ konumunda ise bir hidroksil grubu içeren flavonoidlerdir. Flavonoller birçok meyve ve sebze de yaygın olarak bulunurlar. Kuarsetin, mirisetin, kamferol ve izoramnetin en önemli flavonollerdendir. Yaban mersini, soğan, kırmızı üzümde bulunmaktadırlar.



	R ₁	R ₂	R ₃
Kuarsetin	OH	OH	H
Kamferol	H	OH	H
Mirisetin	OH	OH	OH

Şekil 2.5: Flavonollerin kimyasal yapıları.

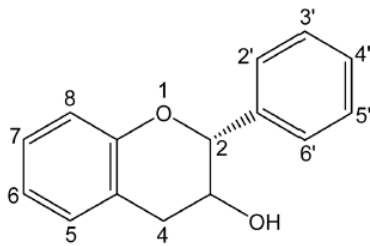
Flavanonlar, C₂ ve C₃ arasında doymuş bir hidrokarbon zinciri bulunduran flavanonlar aynı zamanda dihidroflavonlar olarak adlandırılırlar. Flavanonlar en yaygın olarak portakal, greyfurt gibi meyvelerde bulunur. Başlıca flavanonlar naringenin, hesperidin ve eridictol'dur.



	R ₁	R ₂	R ₃
Naringenin	H	OH	H
Hesperidin	OH	OCH ₃	H

Şekil 2.6: Flavanonların kimyasal yapıları.

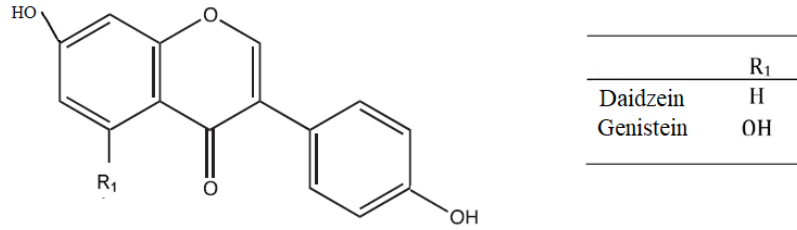
Flavanoller aynı zamanda flavan-3-ol olarak bilinirler. Hem flavan-3-ol hem de flavan 3,4-dioller olarak doğada bulunabilirler, flavan 3,4-diol genellikle ağaçlarda bulunur nadiren meyvelerde bulunur. Flavan-3-ol ayrıca proantosiyanidinler, flavan-3,4-dioller de lökoantosiyanidinler olarak da adlandırılır. Flavanoller birçok meyve de özellikle üzüm, elma böğürtlen gibi meyvelerde bulunur. En önemli flavanoller kateşin ve epikateşin'dir ve çoğunlukla yeşil çay, şeftali, kırmızı şarap ve elmada bulunurlar.



	3	5	7	3'	4'	5'
(+)- Kateşin	β OH	OH	OH	OH	OH	-
(-)- Epikateşin	α OH	OH	OH	OH	OH	-
(-)- Epigallokateşin	α OH	OH	OH	OH	OH	OH

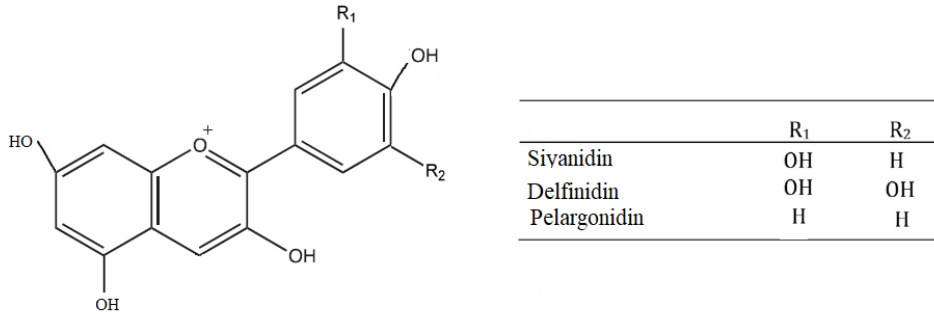
Şekil 2.7: Flavanollerin kimyasal yapıları.

İzoflavonlar, flavonların izomeridirler ve çoğunlukla baklagillerde özellikle de soya fasulyesinde bulunmaktadır. İzoflavonların en önemli olanları genistein ve daidzein'dir.



Şekil 2.8: İzoflavonların kimyasal yapıları.

Antosiyaninler meyvelerin, çiçeklerin ve sebzelerin kırmızı, mavi, ve mor renginden sorumludurlar. Antosiyaninler kırmızı şarapta, bazı sebzelerde (lahana, fasulye, soğan, turp) bulunur ancak en çok meyvelerde bulunmaktadır. Besin içerikleri genellikle renk yoğunluklarıyla orantılıdır ve meyveler olgunlaştıkça besin değerleri de artmaktadır (Manach ve diğ., 2004).



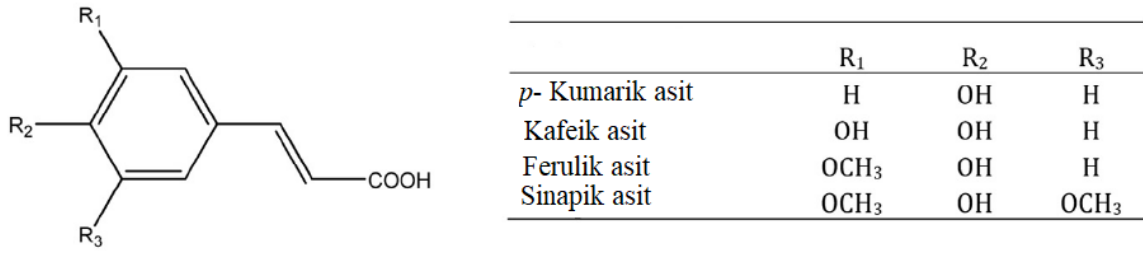
Şekil 2.9: Antosiyanidinlerin kimyasal yapıları.

2.2.3.2. Fenolik asitler

Fenolik asitler, hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

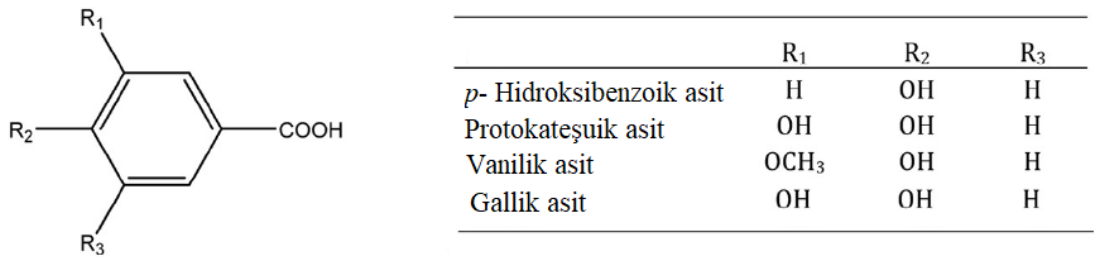
Hidroksisinnamik asitler, C6-C3 fenilpropan yapısında olup yapısındaki aromatik halkaya bağlanan hidroksil grubunun konumu ve sayısına göre adlandırılırlar. Kafeik asit, ferulik asit

p-kumarik asit ve sinapik asitler en çok bilinen hidroksisinnamik asitlerdir. Birçok meyve ve sebze, sinamik asitler (özellikle kafeik asit), antioksidanlar kadar yüksek bir potansiyel sergileyen ester türevleri (klorojenik asit, sinnamoil kinik asitler) halinde bulunur (Manach ve diğ.,2004; Ignat ve diğ., 2011).



Şekil 2.10: Hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapıları.

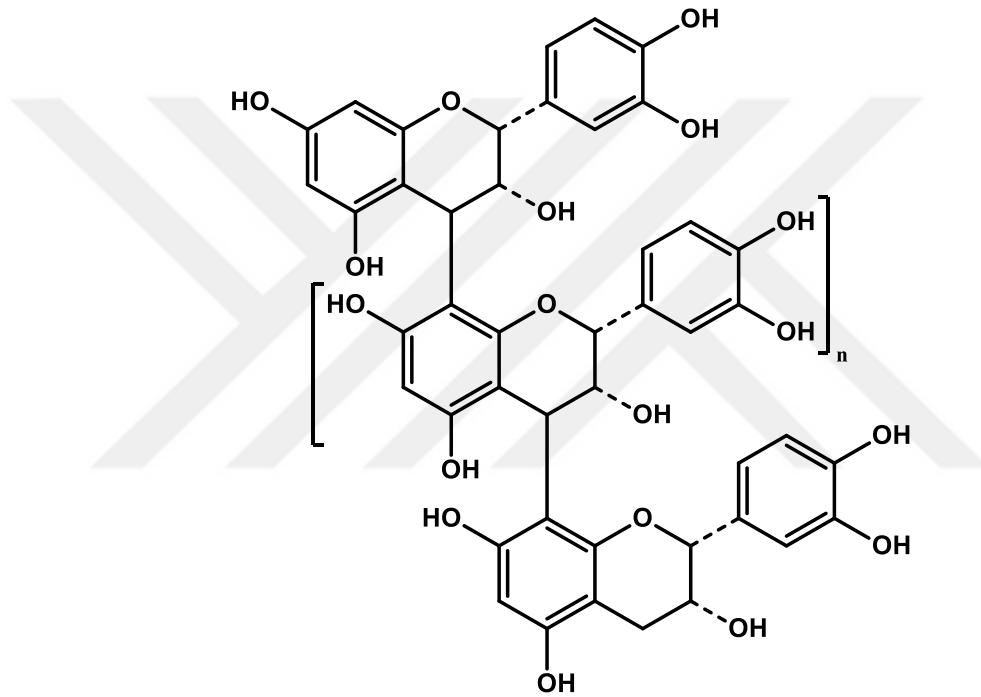
Hidroksibenzoik asitler, C₆-C₁ fenilmetan yapısındadır. Bunlardan birkaçı; gallik asit, vanilik asit ve salisilik asit'tir. Hidroksibenzoik asitler hidrolize edilebilir tanenler gibi yapıların bileşenlerini oluşturur. Hidroksibenzoik asitler bitkilerde kırmızı meyveler,soğan haricinde genellikle düşük miktarlarda bulunur. Çay ise önemli bir gallik asit kaynağıdır.



Şekil 2.11: Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapıları

2.2.3.3. Fenolik polimerler (Tanenler)

Fenolik polimerler (Tanenler) yüksek molekül ağırlıklı bileşikler olup yapılarına göre hidrolize olan ve hidrolize olmayan (kondanse tanenler) olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Hidrolize olabilen fenolik gruplarla esterlenmiş hidroksil grupları ile merkezi bir çekirdek olarak karbonhidratlar (genellikle D-glukoz) içerir. Kondanse tanenler ise merkezi bir karbonhidrat çekirdeğine sahip değildir ve karbon-karbon bağlarıyla bağlanmış oligomerler ve flavanoid birimlerinin kompleksleridir (Goel ve diğ., 2005).



Şekil 2.12: Prosiyanidinlerin genel kimyasal yapısı

2.2.4. Karotenoidler

Karotenoidler, bitkiler, algler ve fotosentetik bakteriler tarafından sentezlenebilen doğal pigmentlerdir; çeşitli meyve ve sebzelerde sarı, turuncu ve kırmızı renklerden sorumludur (Namitha ve Negi, 2010). Karotenoidler, genellikle 8 izopren bileşiğinin bir araya gelmesiyle oluşmuş izoprenoitlerdir. Genel formülleri $C_{40}H_{56}$ 'dır. Doğada 600'den fazla karotenoid bulunmakta olup bunlar yağda çözünebilen renk pigmentleridir. Karotenoidlerin yapılarında çok sayıda konjuge çift bağ bulunur. Karotenoidlerin renk verme özellikleri yapılarında bulunan bu konjuge çift bağlardan kaynaklanmaktadır ve konjuge bağ sayısı arttıkça renk

yoğunluğu da artmaktadır. Aynı zamanda bu konjuge çift bağları antioksidan etkilerini belirlemektedir. Karotenoidler oksijen, pH, su aktivitesi ve sülfidlerin etkisiyle oksidatif olarak parçalanmaktadır. Oksijen konjuge çift bağları okside ederek bağ sayısını ve buna bağlı olarak da renk yoğunluklarının azalmasına neden olur (Bağdatlıoğlu ve Demirbüker, 1999).

Karotenoidler 2 ana gruba ayrılırlar. Bunlar (Britton,2008):

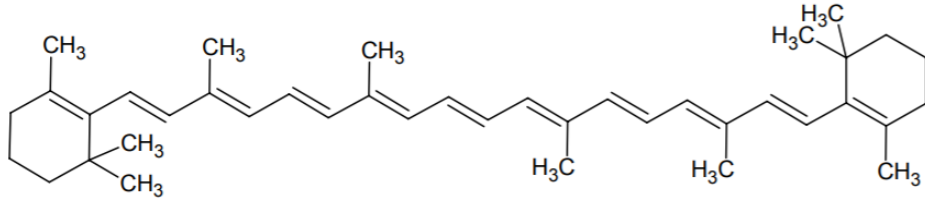
- 1- Karoten, yapısında karbon ve hidrojen atomları bulunduran karotenoidler; likopen, α -karoten β -karoten vb.
- 2- Ksantofiller, yapısında hidroksil, keton, metoksi gibi en az bir oksijen atomu içeren karotenoidler; Lutein, zeaksantin vb.

Karotenoidler güçlü antioksidanlardır. Kahverengi deniz algleri özellikle fukoksantin violaksantin, β karoten bakımından zengindir. Kırmızı alglerdeki karotenoidler β karoten, α karoten ve dihidroksil türevleri: lutein ve zeaksantin'dir. Yeşil alglerde bulunan başlıca karotenoidler ise β karoten, lutein, violaksantin, neoksantindir. (Okuzumi ve diğ. 1993; Yan ve diğ., 1999) Karotenoidlerin yem, gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde çeşitli kullanım alanları vardır.

2.2.4.1. β - karoten

β -karoten doğada en yaygın olarak bulunan ve yağda çözünen pigmenttir. Vucuttaki kan ve dokulardaki en önemli karotenoidlerden biridir. β -karoten yeşil yapraklı sebzelerin yanı sıra turuncu ve sarı meyve ve sebzelerde de bulunur. (Krinsky ve Johnson, 2005). β -karotenin en çok bulunduğu temel besin kaynakları olarak başta havuç olmak üzere maydanoz, mango, patlıcan sayılabilir.

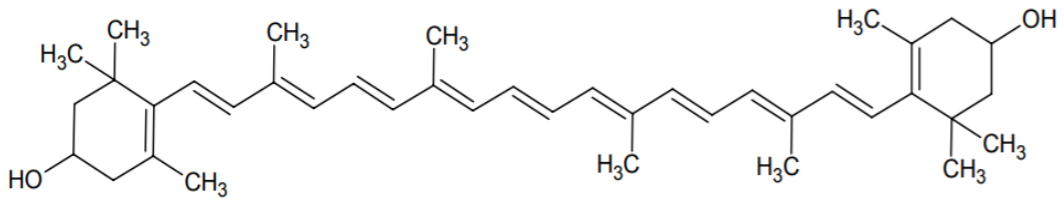
A vitamini olarak metabolize edilebilen 50 karotenoidden biri olan β -karoten en yüksek provitamin A aktivitesine sahiptir. Diğer karotenoidlerden farklı olarak zincir yapısının iki ucunda da β iyonon halkası bulunur (Woutersen ve diğ., 1999).



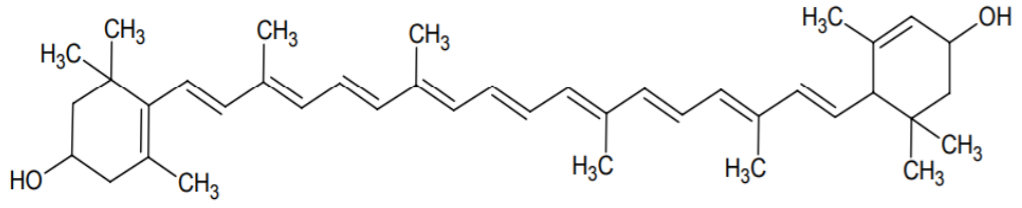
Şekil 2.13: β -karotenin kimyasal yapısı

2.2.3.2. Zeaksantin ve Lutein

Lutein ve zeaksantin retinanın makuler pigmentlerinin iki ana bileşenini oluşturan ksantofillerdir. Makuler pigmentler (sarı pigment) gözü ışık ve retinal zararlara karşı korumaktadır. Bu pigmentler ıspanak, lahana, brokoli gibi koyu yeşil sebzelerde bulunmaktadır (Krinsky ve diğ.,2003). Ayrıca böğürtlen, mandalina ve yumurta sarısında da bulunduğu bilinmektedir. Zeaksantince zengin en önemli besin kaynağı mısırdır. Zeaksantin gıda endstrisinde kuşlar, balıklar için yem katkı maddesi ve renklendirici olarak kullanılır. Zeaksantin ve lutein birbirinin izomeridirler (Hadden ve diğ., 1999).



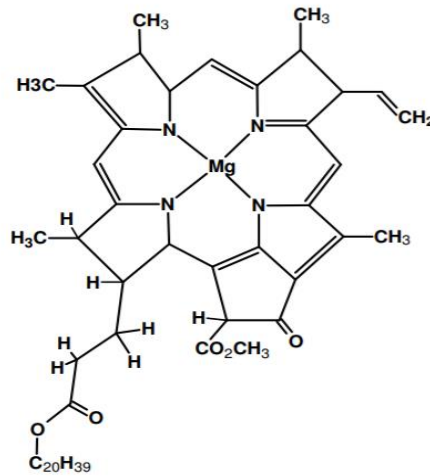
Şekil 2.14: Zeaksantin'nin kimyasal yapısı



Şekil 2.15: Lutein'in kimyasal yapısı

2.2.4. Klorofiller

Klorofiller birçok bitkide ve alglerde bulunan yağda çözünebilen yeşil pigmentlerdir. Klorofil bileşikleri birçok endüstri alanında pigment olarak kullanılmaktadır. Klorofilin bilinen çok fazla türevi olmasına karşın bunlardan en önemli olanları mavi-yeşil renkli klorofil a ve sarı-yeşil renkli klorofil b'dir. Klorofil a bitkilerin fotosentez yapan kısımlarında yer alırlar. Klorofil b de klorofil a ile birlikte bazı yosunlarda bulunurlar. Doğada, bitkilerde klorofil a ve b baskındır, ancak klorofil c, d ve e türevleri kahverengi, kırmızı ve sarı-yeşil algler dahil çeşitli fotosentetik algler ve diatomik türlerde bulunur (Sheer, 1991). Klorofil, porfirin halkası ve fitol grubuyla iki temel kısımdan oluşur. Porfirin halkasının merkezinde Mg atomu bulunur. Klorofil iyi bir antioksidan kaynağıdır ve vücuda zarar veren serbest radikallerin oluşmasını engellerler (İnanç, 2011).



Şekil 2.16: Klorofil a kimyasal yapısı

2.3. DENİZ ALGLERİ

2.3.1. Alglerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Algler basit yapılı ve klorofil içeren organizmalardır. Algler yapısal olarak mikroalg ve makroalg olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Mikro algler mavi-yeşil algler (Cyanophyta) olarak bilinir. Makroalgler ise yeşil algler (Chlorophyceae), kahverengi algler (Phaeophyceae), kırmızı algler (Rhodophyceae), diyatomerler (Chrysophyceae) ve kamçılı algler (Flagellatae) olarak sınıflandırılmaktadır (Gamal, 2010).

Kloroplastları, sitoplazma içerisinde serbest olarak değil, granüler endoplazmik retikulum üzerinde bulunur ve plazmalemma adı verilen bir membran ile çevrilidir. Ayrıca, klorofile ek olarak, bitkilerde bulunmayan başka pigment maddeleri de taşırlar. Çeşitli gruplara özel renkleri de, bu pigment maddeleri verir. Bitkilerdeki gövde elemanlarına benzeyen, ancak damar (vasküler) dokusu taşımayan, özelleşmemiş vücut bölümlerine "tallus" adı verilir. Vakuoller, sitoplazmada bulunan hücre içi özsuyu ile dolu boşluklardır. Vakuollerin sayısı şekli ve hücrede bulunduğu yerler alg gruplarına göre değişiklik göstermektedir (Cirik ve Cirik, 2011).

Alglerin hücre çeperlerinde farklı oranlarda selüloz vardır. Alglerin hücreleri arasındaki dolgu maddesi yeşil alglerde genellikle ksilan ve mannan, kahverengi alglerde aljinik asit, kırmızı alglerde ise agar-agar ve karragenindir. Hücre çeperlerinde bazı mineral maddeler birikebilir. Hücredeki çekirdek sayıları değişkendir. Genellikle tek olduğu halde iki ya da daha çok sayıda da olabilir. Plastidler fotosentez olayında en önemli yapılardır. Kloroplast, kromoplast ve lökoplast olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Klorofilin büyük çoğunluğunu klorofil a ve daha az olarak klorofil b oluşturmaktadır. Kloroplastlarda bulunan diğer renk maddeleri ise karotenoidlerdir (Cirik ve Cirik, 2011; Aktar ve Cebe, 2010).

Deniz alglerinde üreme eşeysiz (sporla) veya eşeyli (gamet meydana getirerek) olur; ilkel gruplarında üreme hücreleri (sporlar, gametler) kamçılıdırlar. Eşeysiz üreme doğrudan doğruya hücrelerinin ikiye bölünmesiyle; eşeyli üreme ise çoğunlukla izogami ile (şekil ve büyüklük olarak aynı olan gametlerle) olur (Tanker ve diğ., 2004).

2.3.1.1 Kahverengi Alglerin (*Phaeophyceae*) Genel Özellikleri

Kahverengi algler, sığ sularda veya kıyı şeridi kayalıklarında yaşar ve dalgaların sürekli çarpmasına dayanmalarını sağlayan çok esnek gövdelere sahiptir (Ghosh ve diğ., 2012). İpliği yapıda basit ve dallanmış olanları yanında, ağaçsı, yapraksı yapıda oldukça büyük talluslara sahip olan türleri de bulunmaktadır. Hücrelerinde ya büyük tek vakuol ya da birkaç küçük vakuol bulunur. Ayağa benzer bir yapı ile bir yere tutunarak yaşarlar. (Çolakoğlu, 1999; Yurdakulol ve diğ., 2004). Kahverengi algler, bazı türleri için uzunluğu 35-45 m'ye kadar olan ve çok değişken olan en büyük yosunlardır. En yaygın cins *Ascophyllum*, *Laminaria*, *Saccharina*, *Macrocystis*, *Nereocystis* ve *Sargassum*'dur (Murty ve Banerjee, 2012). *Phaeophyceae* sınıfının 240 cinsi 1500'den fazla türü bilinmektedir (Çolakoğlu, 1999).

Hücre çeperleri selüloz ve pektinden meydana gelir. Pirenoidler kloroplastların dışındadır. Genellikle kloroplastlar klorofil a, az miktarda klorofil c, β karoten, ksantofillerden diğer renkli maddelerini örten esmer renkli pigment fukoksantin ihtiva ederler. Bu pigmentlerden fukoksantin klorofile baskın geldiği için koyu renklidirler. Besin depo ürünleri nişasta yerine dekstrini andıran bir polisakkarit olan laminarin, mannit alkolü, fukosan ve yağ maddeleridir. Bazı türleri alginat bakımından çok zengindir. Bu yapılarından dolayı tallusları endüstride işlenerek çeşitli sanayi kollarında kullanılabilecek alginat çeşitleri elde edilmektedir (Çolakoğlu, 1999; Yurdakulol ve diğ., 2004).

Eşeyli ve eşeysiz olmak üzere her iki tip üreme de görülür. Eşeysiz üremeleri tek odacıklı sporangiyumlarda oluşan zoosporlarla, eşeyli üreme ise izogami, anizogami ve oogami ile olur. Genellikle bütün esmer su yosunlarında heterofazik döl almaşı vardır (Yurdakulol ve diğ., 2004).

Kahverengi deniz algleri genel olarak biyolojik aktiviteye sahip önemli biyoaktif bileşik kaynakları olarak kabul edilir (Gupta ve Abu-Ghannam, 2011). Bu biyoaktif bileşikler; polisakkaritler (fukoidler, alginatlar ve laminarinler), polifenoller (florotanninler) ve karotenoidler (fukoksantin)'dir. Ek olarak omega 3 (çoklu doymamış yağ asitleri) içerirler (Holdt ve Kraan, 2011). Bu bileşiklerin özellikle antioksidan, prebiyotik, antibakteriyel, antidiyabetik, kanser önleyici ve antikoagülan gibi etkileri nedeniyle deniz alglerine ilgi artmaktadır (O'sullivan ve diğ., 2010).

2.3.1.2. Kırmızı Alglerin (*Rhodophyceae*) genel özellikleri

Rhodophyceae sınıfının yaklaşık 500 cinsi ve 4000 kadar da türü vardır. Bu sınıfın çoğunluğu kırmızı, menekşe rengi, esmer pembe, kırmızı kahve renkte görünürler ve kromotoforları rodoplastlardır (Çolakoğlu, 1999). Kromotoforlarında klorofil-a,c, β -karoten ve çok az miktarda α -karoten bulunur. Ksantofillerden ise lutein, fikobilinlerden de kırmızı renkli fikoeritrin, mavi renkli fikosiyanın bulunur. Tüm türlerde görünen kırmızı renkli fikoeritrin klorofiller ile karotenleri maskeler. Bu sebeple bitkiler çeşitli tonlarda kırmızı görünür. Kırmızı deniz algleri genellikle denizlerde yaşarlar. Phaeophyceae sınıfının üyelerine göre daha derin ve ılık sularda yaygındırlar (Çolakoğlu, 1999; Yurdakulol ve diğ., 2004).

Tallusları ipliksi, silindirik, yapraksı ya da disk şeklinde yassı olup etli yapıdadır. Hücreler tek çekirdeklidir. Tallusu tek hücre dizisinden oluşuyorsa monosifon, paralel hücre sıralarından oluşuyor ise polisifon adını alır. Hücre çeperi iki tabakadan meydana gelir ve iç tabaka selüloz, dış tabaka musilajlaşan pektinden oluşmaktadır. Bazı türlerinde çeperlerinde CaCO_3 birikebilir. Kırmızı alglerin fotosentez ürünü olarak gerçek nişasta görülmez, nişasta ile glikojen arasında bir yapı gösteren ve bir polisakkarit olan floride nişasta meydana gelir. Floride nişastasını iyotla kırmızı renk verir (Çolakoğlu, 1999; Yurdakulol ve diğ., 2004). Eşeyli üreme aplanosporlarla eşeyli üreme ise oogami ile olur. Spor ve gametler kamçısız oluşlarından dolayı aktif hareket edemezler, bu su yosunlarının üremelerinde dikkati çeken en önemli özellikleri olmaktadır (Çolakoğlu, 1999).

Kırmızı alg türlerinden kappaphycus ve betaphycus gıdalarda kullanılan özellikle yoğurt, çikolatalı süt ve pudinglerde yaygın olarak kullanılan bileşen karragenin önemli kaynaklarından. Kırmızı alglerden Gracilaria, Gelidium, Pterocladia başta olmak üzere diğer kırmızı alglerden de elde edilebilen agar-agar pektin yapılı hücre zarlarından çıkarılır. Mikrobiyolojide kültür elde etmek için kullanılan agar-agar aynı zamanda tıp, eczacılık ve endüstride alanlarında da kullanılır (El Gamal, 2009). Diğer kırmızı alglerden olan porphyra cinsi ise Japonya'da nori olarak bilinen besin maddesi olarak kullanılır.

2.3.1.3. Yeşil Alglerin (*Chlorophyceae*) Genel Özellikleri

Yeşil algler hem tatlı sularda hem de denizlerde bulunabilirler. Çok azı denizlerin sığ bölgelerinde yaşadığı halde, çoğu tatlı sularda rutubetli topraklar üzerinde bulunur. Ayrıca yüksek bitkiler üzerinde epifit yaşayanları olduğu gibi mantar ile simbiyoz teşkil ederek likenlerin yapısına girenleri de vardır. Bu alglerin hücre çeperleri selülozduandır. Besin depo ürünleri nişastadır. Tek veya çok hücreli, ipliksi veya çeşitli şekillerde dallanmış yeşil alglerdir. Türlerin bazılarında hücreler bir nükleus, bir kromatofor içerdiği halde; bazıları çok sayıda nükleus ve kromatofor içebilir (Çolakoğlu, 1999; Yurdakulol ve diğ., 2004).

Eşeysiz üreme aplanosporlar ve zoosporlarla, eşeyli üreme izogami, anizogami ve oogami ile olur. Chlorophyceae sınıfının 450'den fazla cinsi 8000 kadar da türü bulunmaktadır. (Çolakoğlu, 1999; Yurdakulol ve diğ., 2004).

2.3.2. Alglerin Kullanım Alanları

Deniz alglerinden gıda, tıp, tarım, kozmetik, eczacılık gibi çeşitli endüstri dallarında faydalanılmaktadır. Nüfusun hızlı bir şekilde artmasından dolayı ortaya çıkabilecek gıda sorunlarının önlenmesi adına yosunlarla ilgili birçok çalışmalar yapılmaktadır (Aktar ve Cebe, 2010). Çin, deniz yosunlarının en büyük üreticisidir ve bunu Japonya ve Kore izlemektedir. Japonya, Kore ve Çin'de deniz algleri çok uzun sürelerden beri gıda olarak kullanılmaktadır. Japonya'da yosun, suşi hazırlanmasında kullanılan kurutulmuş yosun yaprağı olan porphyta türlerinden nori yapmak için kullanılmaktadır. Yunanistan'da eski çağlarda deniz algleri uzun yıllar boyunca hayvan yemi olarak kullanılmıştır (Tiwari ve Troy, 2015).

Hollanda'da süt üretimi ve sütteki A vitamini oranı yosun unu karıştırılmış yemlerle sağlanmış, kuzuların yün ve et miktarı da %20 oranında arttırılmıştır. Bunun nedeni deniz yosunlarının besin değerinin yüksek olmasıdır ayrıca mineral tuzları, oligoelementler ve vitaminler yönünden zengin oldukları da bilinir. (Aktar ve Cebe, 2010; Cirik ve Cirik 2004).

Deniz yosunlarından elde edilen jelatin adı da verilen agar-agar, karragenan, aljinat gibi maddeler jelleştirici, dengeleyici ve koyulaştırıcı maddeler olarak çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılır (El-Din ve El-Ahwany, 2015). Gıda ve farmasötik endüstrisinde hidrokolloidler (agar- agar, stabilizatörler, koyulaştırıcı ve dolgu maddeleri olarak kullanılan alijinatlar), pigmentler, vitaminler, mikro mineraller (selenyum, krom, nikel), prebiyotik maddeler, kompleks karbonhidratlar (alijinatlar, fukoz içeren polimerler, minnitol ve laminarin) ve florotanninler gibi sayısız bileşen kaynaklarıdır (Evans ve Critchley, 2014).

Deniz yosunlarının tıpta ve eczacılıkta ise sayılamayacak kadar kullanım alanı vardır. Algler tıpta antikoagülan olarak kullanılmalarının yanı sıra iyot eksikliğinden kaynaklanan guatr, hipertiroit ve hipokolesterolemi gibi birçok hastalığın tedavisinde, bağışıklık sisteminin dengelenmesinde, kullanılır (El Gamal, 2012). Agar-agar, karragenan ve aljinat'tan dışılıkte ve eczacılıkta yararlanılmaktadır. Örneğin Aljinat ve Agar dış macunlarının hazırlanmasında, dış kalıplarının alınmasında protezlerde dolgu maddesi olarak kullanılır (Cirik ve diğ., 2003).

Toprağı havalandırıcı ve nem tutucu olması, azot yönünden çiftlik gübresi kadar zenginlik göstermesi, ayrıca değişik oranlarda iz elementleri, potasyum, fosforik asidi bünyelerinde bulundurma özellikleri ile deniz yosunları gübre olarak birçok ülkede değerlendirilmektedir (Cirik ve diğ.,2003). Deniz algleri entegre su ürünleri sistemlerinde, suların arıtımında kullanılmaktadır (Troell ve diğ., 2009). Alglerde bulunan fenolik bileşenler antioksidan aktiviteden ve serbest radikal süpürücü etkiden sorumludur. Alg ekstratlarıyla yapılan çalışmalarda bulunan polifenollerin antioksidan etkisi gösterdikleri belirtilmiştir. Son yıllarda algler, deriyi rejenere etme ve zengin mineral içermesi özelliklerinden ötürü güzellik enstitüleri tarafından "thalassoterapi" uygulamaları amacıyla Türkiye'de de oldukça yaygın olarak kullanılmakta, alg içeren kozmetik ürünlerin çeşitliliği artmaktadır (Aktar ve Cebe, 2010).

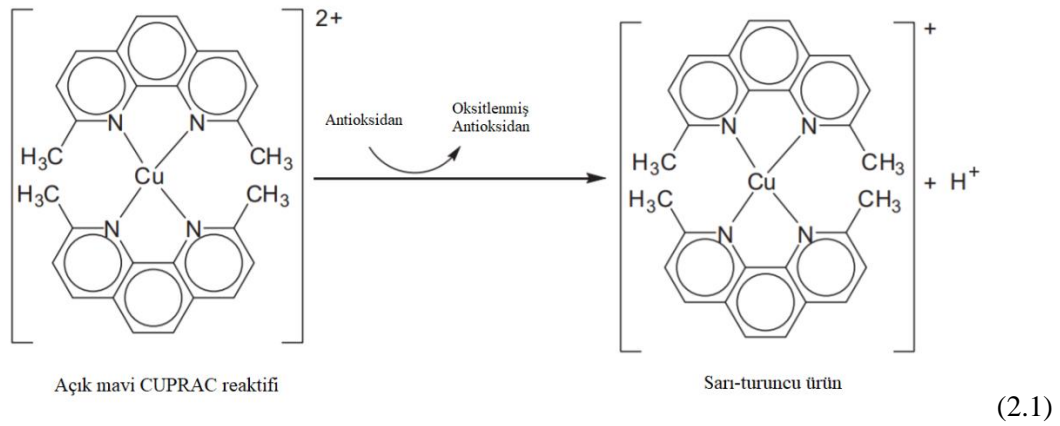
2.4. TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

2.4.1. CUPRAC (Cupric Reducing Antioksidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemi

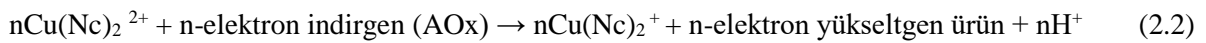
Apak ve ark. tarafından bulunan bu yöntemde 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin-Nc)'in Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)- neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc) bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme özelliğinden faydalanılarak antioksidan kapasitesi belirlenmektedir. Bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatı 450 nm' de maksimum absorpsiyon

vermektedir. Aynı zamanda bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite yöntemi olarak da belirtilmiş ve kısaca CUPRAC metodu olarak adlandırılmıştır (Apak ve diğ., 2004; Özyürek ve diğ., 2011).

CUPRAC yöntemi, flavonoidler, fenolik asitler, hidrokisinasimik asitler, tiyoller, sentetik antioksidanlar ve C ve E vitaminleri [5] için basit ve yaygın olarak uygulanabilir bir antioksidan kapasite belirleme yöntemidir. Hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilir bir yöntemdir (Apak ve diğ., 2013).



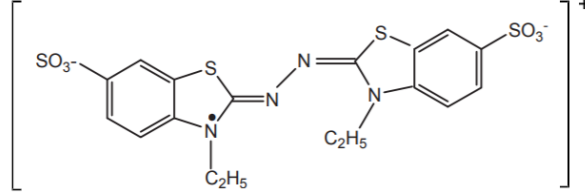
CUPRAC reaksiyonları çoğunlukla 30 dk içerisinde tamamlanır. Geliştirilen CUPRAC yönteminin kromojenik oksitleyici reaktifi, yani Cu(II)-Nc, n-elektron indirgeyici antioksidanlarla (AOx) reaksiyonu:



2.4.2. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS Yöntemi

Miller ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntem, antioksidan varlığında çözeltide ki ABTS radikalinin ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) absorbansında ki azalmanın ölçülmesine dayanmaktadır. ABTS radikal kationu, H_2O_2 ile metilmiyoglobinin tepkimesi sonucu oluşan ferrilmiyoglobin ile 2,2'-

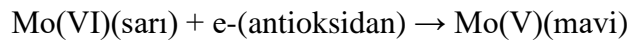
azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) arasında ki etkileşimden meydana gelmektedir. ABTS radikal katyonu 660, 734, 820 nm’lerde maksimum absorpsiyon göstermektedir (Re ve diğ., 1999; Miller ve diğ., 1993).



Şekil 2.17: ABTS^{•+} radikal katyonunun yapısı

4.4.3. Folin-Ciocalteu Yöntemi

Bu yöntem; Singleton ve ark. tarafından antioksidanların toplam fenolik içeriğini ölçmek için geliştirilmiş olup temeli fenolik bileşiklerin folin-ciocalteu reaktifi (FCR) ile bazik ortamda reaksiyon vermesine dayanmaktadır. Folin ciocalteu reaktifi (fosfomolibdik fosfotungstik asit) kullanılan bu yöntem gerçekte örneğin indirgeme kapasitesini tayin etmektedir. Mavi renkli kompleks oluşumu 750 nm’de spektrofotometrik olarak belirlenir.



(2.3)

Fenolik olmayan birçok bileşik tarafından (vitamin C, Cu(I) vb.) indirgenebileceği için fenolik bileşikler için spesifik değildir. Yöntem sonuçları genellikle gallik asit eşdeğeri olarak (mg/L) ifade edilir. Aynı zamanda Folin-Ciocalteu yöntemi lipofilik bileşiklere uygulanamamaktadır (Prior ve diğ.,2005; Huang ve diğ.,2005).

2.5. DENİZ ALGLERİNDE TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ VE FENOLİK BİLEŞİKLERİN BELİRLENMESİ İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

Yumiko ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Japonya'dan elde edilen 27 ayrı deniz yosunu türünde bulunan flavonoid bileşenleri incelenmiştir. Deniz alglerde ki bileşenler rutin, kuarsetin, mirisetin, hesperidin, morin, kuersitrin, luteolin, apigenin, kamferol, kafeik asit, baicalin ve kateşol miktarları hidroliz işleminden sonra HPLC ile analiz edilmiştir. Bütün deniz alglerinde kuarsetin, apigenin, kamferol ve baicalin tespit edilememiştir. Hesperidin tüm kırmızı deniz alglerinde 0,626-119 mg/g kuru ağırlık değerleri arasında belirlenmiştir. Kateşol tüm kırmızı ve yeşil alglerde 1,660-777 mg/g arasında bulunurken yine morin de tüm deniz alg örneklerinde tespit edilmiştir. Kuarsitrin ve mirisetin yalnızca iki alg örneğinde sırasıyla 202-466 ve 270-346 µg/g kuru ağırlık değerleri arasında tespit edilmiştir. Genel olarak kırmızı alglerde, kahverengi ve yeşil alglere göre daha fazla miktarlarda bileşenler bulunmuştur (Yoshie-stark ve diğ., 2003).

Ling ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada, Malezya bölgesinde elde edilen çeşitli ticari yenilebilir deniz alglerinin antioksidan aktiviteleri ve toplam fenolik içerikleri belirlenmiştir. Üç çeşit *Kappaphycus alvarezii* (yenilebilir bir tür kırmızı alg) kullanılmıştır. Tüm alg örnekleri %80 metanol çözücüsüyle ekstrakte edilmiştir. Beyaz deniz yosunu olarak belirtilen tür 49.04 ± 6.05 mg GAE / 100g kuru ağırlık ve 15.54 ± 1.68 mg CE / 100g kuru ağırlık değerleri ile diğer analiz edilen türlere göre en yüksek toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriğine sahip bulunmuştur. Bu çalışmada deniz yosunlarının serbest radikal süpürücü aktivitesi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), ABTS yöntemi ve demir (III) iyonu indirgeyici toplam antioksidan aktivitesi FRAP (Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) yöntemleriyle tayin edilmiştir (Ling ve diğ., 2013).

Farvin ve Jacobsen tarafından yapılan bir başka çalışmada, Danimarka kıyılarından toplanan 16 deniz alg türünün su ve etanol ile ekstraksiyon işlemi sonrasında deniz alglerinin antioksidan aktiviteleri radikal süpürücü (DPPH), indirgeme gücü, demir kelatını oluşturma ve lipozom model sistemi şeklinde dört ayrı deneme ortaya konulmuştur. Etanol'ün polifenolik bileşikler için sudan daha etkili bir çözücü olduğu görülmüştür. *Polysiphonia fukositleri* ve test edilen tüm *Fucus* türlerinin fenolik içerikleri yüksek bulunmuştur. Bu deniz yosunlarının, yiyeceklerin oksidasyona karşı korunması için potansiyel olarak zengin doğal antioksidan kaynakları

olabileceği belirtilmiştir. Antioksidan aktivite gösteren bileşenlerin tayinleri için HPLC analiz yönteminden faydalanılmıştır (Farvin ve Jacobsen, 2013).

Audibert ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, fenolik bileşikler sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve ultrafiltrasyon ile ayrılıp, saflaştırılmıştır. Ascophyllum nodosum kahverengi deniz alginin ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen fenolik bileşenlerinin dağılımları ve radikal süpürücü aktiviteleri Folin–Ciocalteu reaktifi, DPPH ve ABTS yöntemleri ile belirlenmiştir. Analiz yöntemi olarak ters faz HPLC sistemi kullanılmıştır (Audibert ve diğ., 2010).

De Quiros ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada, Galiçya'daki Atlantik kıyı bölgesindeki kırmızı ve kahverengi makroalglerin (*Palmaria* spp., *Porphyra* spp., *Himantalia elongata*, *Laminaria ochroleuca* ve *Undaria pinnatifida*) polifenollerini analiz etmek için ters faz HPLC yöntemi uygulanmıştır. En uygun ekstraksiyon koşullarını belirlemek için farklı çözücü hacmi (10,20 ve 30 ml), farklı sıcaklıklarda (25°C, 40 °C, 70 °C, 80 °C ve 85 °C), farklı sürelerde (10,20,40,50 ve 60 dk), farklı miktarlarda (0,1, 0,2 ve 0,3 g) denemeler yapılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda fenolik bileşiklerin 0,1 g ve 10 ml çözücü ile 70 °C' de 50 dakika da en yüksek ekstraksiyon verimine ulaşılmıştır. Analiz edilen beş alg örneğinin dördünde epigallokateşin bulunmuştur ve konsantrasyonu $252,5 \pm 9,5$ - $760,2 \pm 5,2$ µg/g kuru ağırlık aralığındadır. Epikateşingallat sadece kahverengi alglerde tespit edilmiştir ve kahverengi alg *L.ochroleuca* kateşinlerde en yüksek miktara sahiptir. Kateşin yalnızca *porphyra* spp. de tespit edilmiştir (Rodríguez-Bernaldo de Quirós ve diğ., 2010).

Rajauria yaptığı bu çalışmada, kahverengi yosun *Himantalia elongata* fenolik bileşiklerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için diyot array dedektör ve elektro-sprey kütle spektrometresi yöntemiyle bağlantılı ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) geliştirilmiştir. *H. Elongata* ekstraksiyonu için %60 metanol çözücüsü seçilmiştir ve SPE (katı faz ekstraksiyonu) kartuşu kullanılarak saflaştırılmıştır. Alg örneğinin içerdiği bileşiklerin kantitatif analizi yapılmıştır. Floroglusinol ($394,1 \pm 4,33$ µg/g), gallik asit ($96,3 \pm 3,12$ µg/g), klorojenik asit ($38,8 \pm 1,94$ µg/g), kafeik asit ($44,4 \pm 2,72$ µg/g), ferulik asit ($17,6 \pm 0,85$ µg/g), mirisetin ($8,6 \pm 0,85$ µg/g), kuarsetin ($4,2 \pm 0,15$ µg/g) tespit edilen fenolik bileşiklerdir. Tüm bu fenolik antioksidan bileşiklerin *H. Elongata* ekstresinde bulunması, geliştirilen yöntemin yeterince hassas ve tekrar üretilebilir olduğunu ve deniz alginde ki polifenollerin kantitatif ve kantitatif değerlendirilmesinde kullanılabileceğini göstermiştir (Rajauria, 2018).

Ortiz ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada, yenilebilir yosunlar *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* ve *Macrocystis pyrifera*'nın aminoasit, tokoferol ve karotenoid içerikleri belirlenmiştir. Sonuçlar, üç yosunun yüksek oranda protein, aminoasit, düşük lipid içerdiğini göstermiştir. *C. Fragile* ve *G. Chilensis*'de linolenik, oleik ve linoleik asitler en çok bulunan yağ asitleridir. *C. Fragile* alg örneğinde δ -tokoferol ve α -tokoferol (sırasıyla 677.8 ve 453.5 $\mu\text{g/g}$), *G. Chilensis* ve *M. Pyrifera* da γ -tokotrienol ve α -tokoferol (263.5 ve 1327.7 $\mu\text{g/g}$) en yüksek miktarda belirlenen bileşenlerdir. Üç alg arasında en yüksek lutein değerini *G. Chilensis* (2.0 $\mu\text{g/g}$, kuru ağırlık) vermiştir. Bunlara ek olarak *C. Fragile* ve *G. Chilensis*'in β -karoten içerikleri sırasıyla 197.9 ve 113.7 $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. Bu değerler *M. Pyrifera*'nın β karoten içeriğine göre daha yüksektir (Ortiz ve diğ., 2009).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada, alg örneklerini ve kimyasal maddeleri tartmak için Shimadzu AUX320 analitik terazi, ekstraksiyon işlemleri ve kimyasalların çözünmesine yardımcı olması için Wiseclean ultrasonik banyo, Simpax1 Synergy 185 ultra saf su sistemi, çözücü uzaklaştırmak ve örnekleri derişiklendirmek için Buchi evaporator, Memmert su banyosu, ekstraksiyon işlemleri için Wisd WiseCube inkübatörlü çalkalayıcı, absorbans ölçümleri için Cary 100 Bio UV-vis spektrofotometresi, HPLC sonuçları için zorbox eclipse plus C18 kolon (4.6x250 mm, 5µm), Waters 1525 Binary HPLC pompa, In-Line degazerden, 2998 PDA detektörden oluşan HPLC cihazı kullanılmıştır .

3.2. KİMYASAL MADDELER

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ; Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) (Aldrich), neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Sigma-Aldrich), bakır(II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck), amonyum asetat (Riedel-de Haën), folin reaktifi (Sigma), sodyum karbonat (Sigma-Aldrich), bakır (II) sülfat (Riedel-de Haën), sodyum potasyum tartarat (Sigma-Aldrich), sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich), ABTS (2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]) (Sigma-Aldrich), potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Sigma-Aldrich), metanol (Sigma-Aldrich), asetonitril (Sigma-Aldrich), aseton (Sigma-Aldrich), etanol (Sigma-Aldrich), fukoksantin (Sigma-Aldrich), violaksantin (Sigma-Aldrich), neoksantin (Sigma-Aldrich), astaksantin (Sigma-Aldrich), lutein (extrasynthere), zeaksantin (Sigma-Aldrich), α -karoten (Sigma-Aldrich), β -karoten (Sigma-Aldrich), klorofil a (Sigma-Aldrich), klorofil b (Sigma-Aldrich), floroglisinol (Sigma-Aldrich), gallik asit (Sigma-Aldrich), kateşin (Sigma), epikateşin (Sigma), hesperidin (fluka), morin (Sigma-Aldrich), p-kumarik asit (sigma), kafeik asit (sigma), chromafil PP/GF/PET-45/25 mikro filtre (Macherey-Nagel) 'dır.

3.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Troloks, gallik asit, floroglusinol, kateşin, epikateşin, kafeik asit, p-kumarik asit, rutin standart maddelerin stok çözeltileri metanolde, hesperidin (bazik ortamda çözündüğünden) KOH ve bidistile su karışımında; morin (bazik ortamda çözündüğünden) KOH ve metanol karışımında hazırlandı. Karotenoid ve klorofil standartları aseton ile hazırlandı. Tüm stok çözeltiler analiz süresine kadar -20 °C’de saklanarak kullanıldı.

CUPRAC yönteminde; 1.0×10^{-2} M Cu (II) klorür çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tampon çözeltisi (pH 7.0) ultra saf suda, 7.5×10^{-3} M 2,9-Dimetil-1,10-fenantrolin (neokuproin: Nc) çözeltisi %96’lık etanolde hazırlandı.

Etanollü CUPRAC yönteminde 0.5×10^{-2} M Cu (II) klorür çözeltisi ultra saf suda, 1 M amonyum asetat tampon çözeltisi (pH 7.0) ve 7.5×10^{-3} M 2,9-Dimetil-1,10-fenantrolin (neokuproin: Nc) çözeltisi etanolde hazırlandı.

ABTS yönteminde; ABTS radikal çözeltisi 7 mM ABTS (2,2’-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]) ve 2.45 mM potasyum persülfatın suda çözülmesiyle elde edilen karışımın 12-16 saat süreyle karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmesiyle hazırlandı.

Folin-Ciocalteu yönteminde; Lowry A çözeltisi için 0.1 N NaOH çözeltisi distile suda, %2’lik Na_2CO_3 çözeltisi 0.1 N NaOH çözeltisinde hazırlandı. Lowry B çözeltisi için %1’lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ çözeltisi distile suda, %0,5’lik CuSO_4 çözeltisi %1’lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ çözeltisinde hazırlandı. Lowry C çözeltisi için 50 mL Lowry A çözeltisine 1 mL Lowry B çözeltisi ilave edildi.

3.3. DENİZ ALG ÖRNEKLERİNİN ANALİZE HAZIRLANMASI

3.3.1. Alg Örneklerinin Temin Edilmesi

Kahverengi, kırmızı ve yeşil alg gruplarından çeşitli alg türleri Çanakkale ve Antalya bölgelerinden konusu uzman kişiler tarafından temin edildi. Örnekleme çalışmaları, 0-40 m derinlikler arasında SCUBA ve serbest dalışlar ile su altında dikey ve yatay taramalar şeklinde yapıldı. Örnekleme esnasında makroalglerin sualtı fotoğrafları “Olympus OM-DE-M5” fotoğraf makinesi ile çekildi. Toplanan örneklerin bir kısmı, tayin ve tanımları daha sonra laboratuvarında yapılmak üzere, deniz suyu ile hazırlandı %4-6’lık nötrale formaldehit

çözültisinde kavanozlarda belirlendi. Materyallerin tanımlama çalışmaları Olympus marka SZX16 model stereo zoom ve BX51 model binoküler ışık mikroskopları ile gerçekleştirildi.

Tablo 3.1: Kahverengi, kırmızı ve yeşil alg gruplarından toplanan çeşitli alg türlerinin listesi ve temin edilme koşulları

Algler	Yer	Derinlik	Tarih
KAHVERENGİ ALGLER			
Cladostephus spongiosum f.	Çanakkale	0-1m	19.07.2016
Verticillatum (lightfoot) Prudhomme Van reine 1972			
Colpomenia sinuosa (mertens ex Roth) Derbés&soler in castagne 1851	Çanakkale	0-1m	27.02.2017
KIRMIZI ALGLER			
Jania rubens (linnaeus) J.V.Lamouroux 1816	Antalya	1-2 m	6.09.2016
Hypnea musciformis (wulfen) J.V.Lamouroux 1813	Çanakkale	0-1m	19.07.2016
YEŞİL ALGLER			
Caulerpa racemosa var.cylindracea (Sonder) verlaque, Huisman & Boudouresque 2003	Çanakkale	22 m	25.08.2017
Codium fragile (Suringar) Hariot 1889	Çanakkale	0-1m	25.08.2017

3.3.2. Alg Örneklerinin Kurutulması

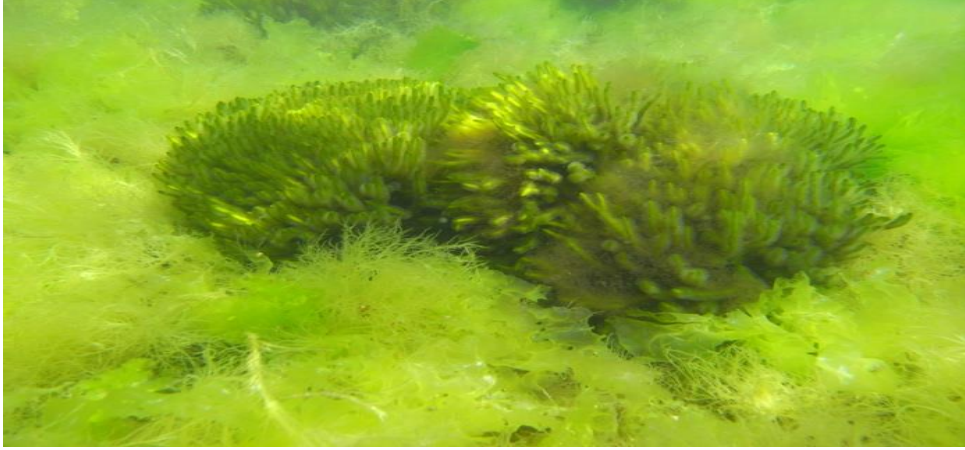
Kurutma işlemi gerçekleştirilene kadar -80 °C soğutma koşullarında muhafaza edilmiş örnekler liyofilizatör kullanılarak kuruldu. Kurutma işlemi her bir örnek için yaklaşık olarak 1-3 gün sürdü.



Şekil 3.1: *Jania Rubens*



Şekil 3.2: *Hypnea Musciformis*



Şekil 3.3: *Codium Fragile*



Şekil 3.4: *Caulerpa Racemosa* var. *Cylindracea*



Şekil 3.5: *Colpomenia Sinuosa*

3.3.3. Alg Örneklerinin Ekstraksiyonu

3.3.3.1. Alglerdeki Karotenoid ve Klorofil Bileşenlerinin Ekstraksiyonu

Karotenoid ve klorofil bileşenlerinin ekstraksiyonu için aseton çözücüsü kullanıldı. Ağzı kapaklı cam erlenlere alınan liyofilize alglerin 1.0 g'ı 10 dk süre ile 10 mL aseton çözücüsü ile oda sıcaklığında ultrasonik banyoda ekstrakte edildi. Üst faz dekante edilerek alındıktan sonra aynı işlem çözücü olarak 10 mL aseton çözücüsü ve daha sonra 5ml daha çözücü katılarak üç aşamada ekstrakte edildi. Ekstraktlar birleştirilerek 25 mL ye tamamlandı ve tüm ekstraktlar önce adi süzgeç kağıdı daha sonra GF/PET mikro filtre kullanılarak süzüldü. Ekstraktlar genel olarak taze kullanıldı, fakat gerektiğinde daha sonra kullanılmak üzere -20 °C de saklandı (Başkan ve diğ., 2013). Ekstrakte edilen örnekler HPLC cihazına verilmeden önce evaporatörde uygun oranda derişiklendirildi.

3.3.3.2. Alglerdeki Polifenolik Bileşenlerin Ekstraksiyonu

Uygun çözücünün belirlenmesi için deniz alg örnekleri %100 metanol, metanol-su (%80 ve 70, v/v), etanol-su (%80, 70 ve 100, v/v) ve %100 aseton kullanılarak ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirildi.

Ağzı kapaklı cam erlenlerde liyofilize edilen ve öğütülen alg örneklerinden 2 g tartıldı ve üzerine 25 mL ekstraksiyon çözücüsü eklendi. İnkübatörlü çalkalayıcıda, oda sıcaklığında, 16 saat boyunca, 100 rpm'de çalkalandı. Elde edilen ekstrakt önce adi süzgeç kağıdı ile sonra mikro filtre ile süzüldü. Son hacim 25 mL'ye tamamlandı ve analiz öncesi -20 °C de saklandı (Harborne,1998; Yıldız ve diğ., 2011). Ekstrakte edilen örnekler HPLC cihazına verilmeden önce evaporatörde uygun oranda derişiklendirildi.

3.3.3.3 Alg Örneklerinin Hidrolizi

15 ml %80 metanollu alg ekstraktı + 0.5 mL metanol + 7 mL su + 2.5 mL HCl içeren karışım 80 °C de 2 saat hidroliz edildi (son derişim 1.2 M HCl ve %50 metanol) (Yıldız ve diğ., 2008). Hidrolizatlar HPLC cihazına verilmeden önce evaporatörde uygun oranda derişiklendirildi.

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. Spektrofotometrik Yöntemler

3.4.1.1. CUPRAC Yöntemi

Normal CUPRAC

Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL 1.0×10^{-2} M Cu(II) çözeltisi, 1 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin (Nc), ve 1 mL amonyum asetat tampon çözeltisi (pH 7.0) ilave edildi. Daha sonra x ml örnek ve (1-x) ml çözücü ilave edilerek son hacmi 4 ml ye tamamlandı. Çözeltiler karıştırıldı ve tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakikada bekletildi. Süre sonunda içerisinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'deki absorbansları ölçüldü.

Etanollü yöntem (CUPRAC_E);

Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 0.5 ml 2.0×10^{-2} M Cu (II) çözeltisi, 0.5 ml destile su, 1 ml $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin (Nc) ve 1ml amonyum asetat tampon çözeltisi (pH 7.0) ilave edildi. Daha sonra x ml alg örneğinden ve (1-x) ml çözücü ilave edilerek son hacmi 4 ml'ye tamamlandı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dk bekletildikten sonra içerisinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'deki absorbansları ölçüldü.

3.4.1.2. ABTS Yöntemi

Bir deney tüpü içerisine (3-x) ml ekstrakt çözücüsünden ve x ml antioksidan standart çözeltisinden veya alg örneğinden ilave edildi. Bu şekilde hazırlanan örnek çözeltileri üzerine ve sadece 3 ml çözücü içeren referans üzerine 1:50 (v/v) oranında seyreltilmiş ABTS•+ radikal çözeltisinden 1'er mL eklendi (Re ve diğ., 1999). Çözeltiler karıştırıldıktan sonra altıncı dakika sonunda etanole karşı 734 nm'deki absorbansları ölçüldü. Radikal çözeltisinin absorbansından örnek içeren çözeltinin absorbansı çıkarılarak ΔA absorbans değerleri hesaplandı. Troloks(TR) standardı ile oluşturulan kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak alg örneklerinin toplam antioksidan kapasiteleri $\mu\text{mol TR/g}$ kuru madde (alg) olarak hesaplandı.

3.4.1.3. Folin Ciocalteu Yöntemi (Toplam Fenolik Madde Tayini)

Bir deney tüpü içerisine sırasıyla x mL örnek çözeltisi, (2-x) ml destile su ve 50 mL Lowry A çözeltisine (0.1 M NaOH içinde %2 Na₂CO₃) 1 mL Lowry B çözeltisi (% 1 NaKC₄H₄O₆ içinde %0,5 CuSO₄) eklenmesiyle oluşan Lowry C çözeltisinden 2.5 mL ilave edildikten 10 dakika sonra folin reaktifi ilave edilip tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Daha sonra örnek içermeyen referansa karşı 750 nm’de absorbanları ölçüldü.

3.4.2. Kromatografik Yöntemler

3.4.2.1. Karotenoid ve Klorofillerin HPLC Analizi ile Belirlenmesi

Alg örneklerinin karotenoid bileşenlerinin belirlenmesinde %100 aseton ekstraktı kullanıldı. Karotenoid ve klorofillerin analizi için iki farklı mobil faz (metanol/asetonitril) (50:50, v/v) % 0.1(v/v) TEA (trietylamin) (A) ve aseton(B) çözücülerinin kullanıldığı gradient elusyon programı uygulandı. Analizler 200-800 nm dalga boyu aralığında PDA (photodiode array) dedektör kullanılarak 20 µL örnek enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. Sabit faz olarak Waters C30 kolon kullanıldı. Kolon sıcaklığı 35 °C ve akış hızı 1.5 mL/dk olarak uygulandı. (Başkan ve diğ., 2013).

Tablo 3.2: Karotenoid bileşenlerin analizi için belirlenen HPLC metodu

Zaman (Dakika)	(%) A	(%) B	Eğim
0	100	0	0
15	100	0	6
25	30	70	4
55	0	100	6

3.4.2.2. Fenolik Bileşenlerin HPLC Analizi ile Belirlenmesi

Belda ve ark.'nın kullanmış olduğu yöntem modifiye edilerek uygulandı. % 0.2 (v/v) H₃PO₄ içeren bidistile su (A) ve metanol (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazın kullanıldığı gradient elüsyon programı uygulandı. Toplam süre 45 dk, akış hızı 1 mL/dk ve dedeksiyon dalga boyu 270 nm.

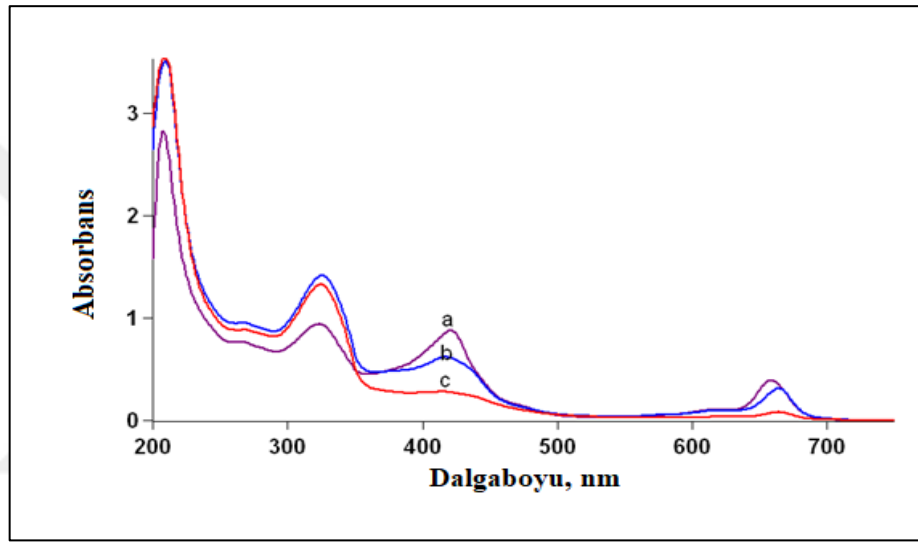
Tablo 3.3: Fenolik bileşenlerin analizi için belirlenen HPLC metodu

Zaman (Dakika)	(%) A	(%) B	Eğim
0	95	5	0
10	80	20	6
15	60	40	4
30	50	50	6
45	95	5	6

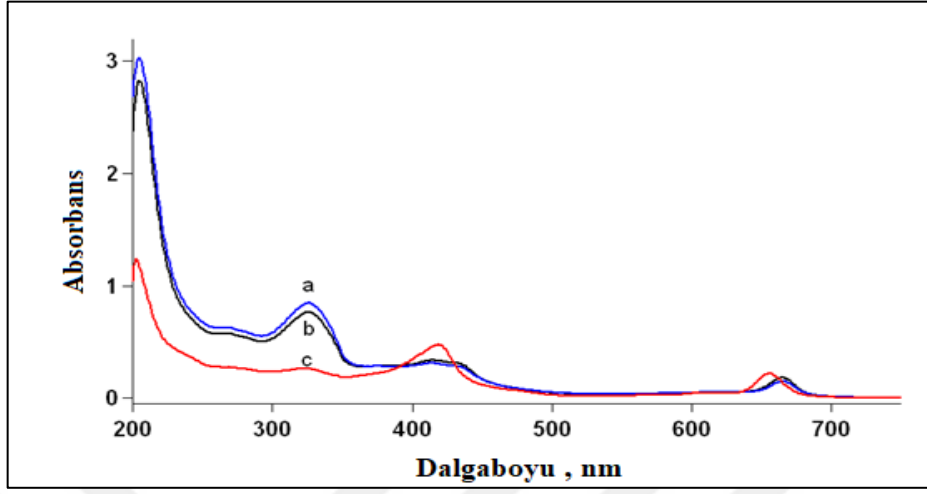
4. BULGULAR

4.1. UYGUN EKSTRAKSİYON ÇÖZÜCÜSÜNÜN SEÇİLMESİ

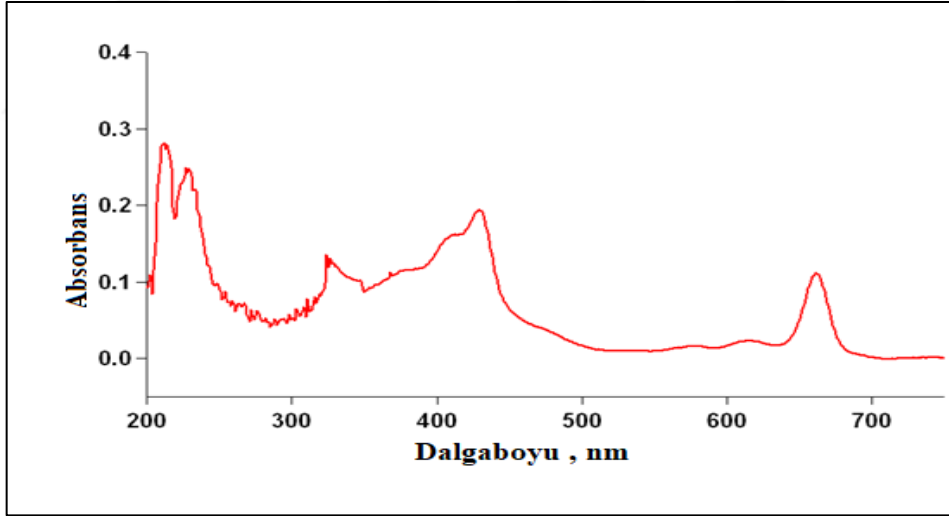
Alg örneğine sırasıyla %70 MeOH-su (v/v), %80 MeOH-su (v/v) ve %100 MeOH ile aynı oranlarda EtOH içeren çözücülerle hazırlanmış ekstraktların UV-görünür bölge spektrumları *Jania rubens* örneği için şekil 4.1 ve 4.2’de ve *C.spongiosum f.v* alg örneği için şekil 4.4 ve 4.5 ‘te görülmektedir.



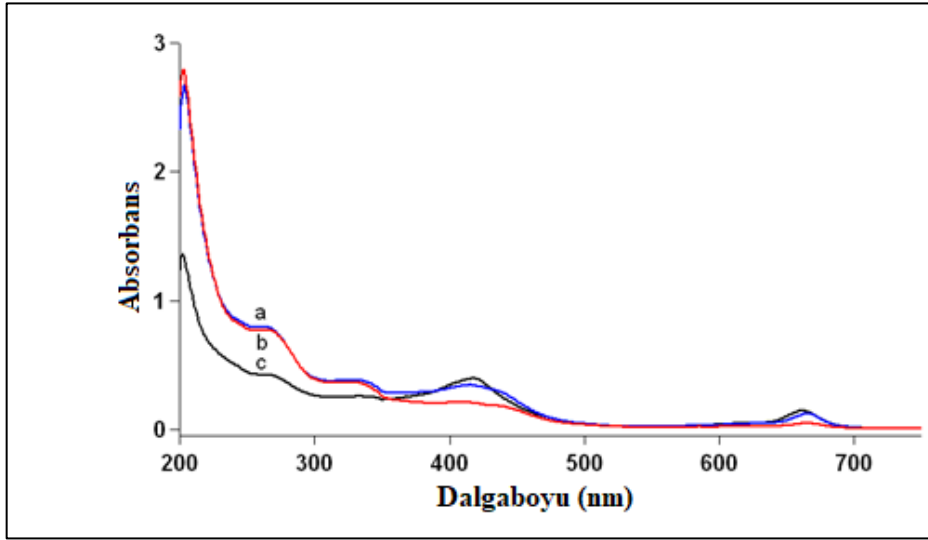
Şekil 4.1: *Jania rubens* alg örneğinin (1:10 seyreltilmiş) farklı oranlarda MeOH-su içeren ekstraktlarının spektrumları (a: %100 MeOH, b: %80 MeOH, c: %70 MeOH).



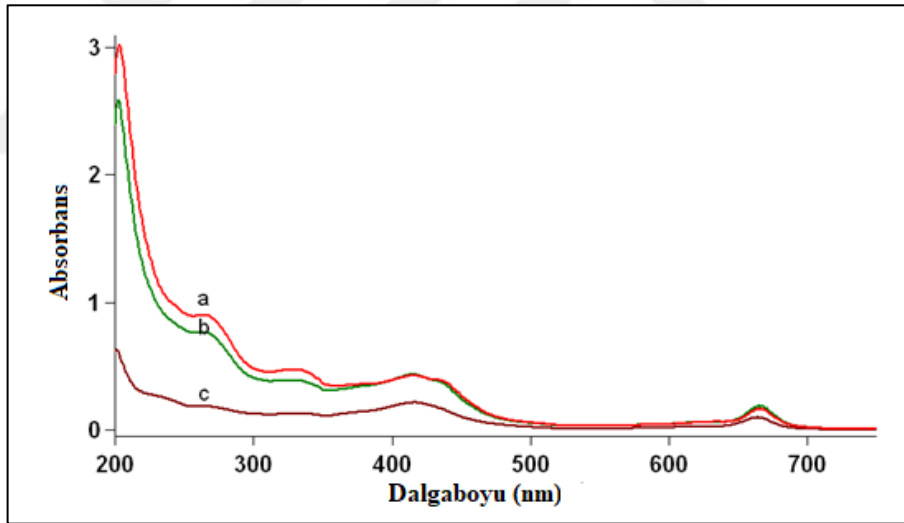
Şekil 4.2 : *Jania Rubens* alg örneğinin (1:10 seyreltilmiş) farklı oranlarda EtOH-su içeren ekstraktlarının spektrumları. (a: %70 EtOH b: %80 EtOH c: %100 EtOH).



Şekil 4.3: *Jania rubens* alg örneğinin aseton ekstraktının spektrumu.



Şekil 4.4: *C.Spongiosum f.v* alg örneğinin (1:10 seyreltilmiş) farklı oranlarda MeOH-su içeren ekstraktlarının spektrumları. (a: %80 MeOH b: %70 MeOH c: %100 MeOH).



Şekil 4.5: *C. Spongiosum f.v* alg örneğinin (1:10 seyreltilmiş) farklı oranlarda EtOH-su ekstraktlarının spektrumları. (a: %70 EtOH b: %80 EtOH c: %100 EtOH).

%80 MeOH ve %80 EtOH arasında büyük bir fark olmamakla birlikte literatürde metanolün koruyucu rolü olduğu ve fenolik bileşiklerin fenoloksidaz gibi enzimlerle yükseltgenmesini engellediği belirtildiğinden dolayı %80 MeOH tercih edildi. Ayrıca metanolün fenolik yapıdaki antioksidanlar için HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile gerçekleştirilen analizleri için koruyucu bir niteliği olduğu bilgisi verilmiştir (Harborne, 1998;

Yıldız ve diğ., 2008). Diğer taraftan algelerde farklı oranlarda bulunduğu bilinen karotenoid, klorofil grubu bileşenlerin (α , β karoten, klorofil a, klorofil b vb.) ekstraksiyonu için aseton tercih edildi (Başkan ve diğ., 2013; Rao ve diğ., 2009).

4.2. CUPRAC YÖNTEMİNİN BAZI ANTIÖKSİDAN STANDARTLARINA UYGULANMASI, TEAC KATSAYILARININ VE B-KAROTEN EŞDEĞERİ ANTIÖKSİDAN KAPASİTE (β -CEAC) KATSAYILARININ BELİRLENMESİ

Fukoksantin, violaksantin, neoksantin, astaksantin, lutein, zeaksantin, α -karoten, β -karoten, klorofil a ve klorofil b standart antioksidanların CUPRAC yöntemine göre kalibrasyon doğruları çizildi. Bu kalibrasyon denklemlerinden elde edilen molar absorplama katsayısı ile troloksun molar absorplama katsayısına bölünmesiyle ($\epsilon_{\text{pigment}}/\epsilon_{\text{TR}}$) elde edilen troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) ve β -karoten'nin molar absorplama katsayısına bölünmesi ile β -Karoten eşdeğeri (β -CEAC_{CUPRAC}) katsayıları hesaplandı. Elde edilen değerler Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1: Karotenoid ve klorofil pigmentlerinin CUPRAC yöntemi ile elde edilen doğru denklemleri ve β -karoten eşdeğeri (β -CEAC_{CUPRAC}), troloks eşdeğeri (TEAC_{CUPRAC}) katsayıları.

Pigment	Doğru denklemi	Korelasyon katsayısı (r)	TEAC _{CUPRAC}	β -CEAC _{CUPRAC}
Fukoksantin	$y = 0,35 \times 10^5 c - 0.030$	0,9986	2,19	0,67
Violaksantin	$y = 0,14 \times 10^5 c + 0.001$	0,9993	0,88	0,27
Neoksantin	$y = 0,25 \times 10^5 c + 0.003$	0,9993	1,56	0,47
Astaksantin	$y = 0,32 \times 10^5 c - 0.050$	0,9970	1,95	0,61
Lutein	$y = 0,75 \times 10^5 c - 0.020$	0,9996	4,58	1,44
Zeaksantin	$y = 0,31 \times 10^5 c - 0.050$	0,9990	1,89	0,59
α -karoten	$y = 0,81 \times 10^5 c - 0.040$	0,9990	4,96	1,55
β -karoten	$y = 0,52 \times 10^5 c - 0.010$	0,9991	3,18	1,00
Klorofil a	$y = 1,20 \times 10^5 c - 0.010$	0,9991	7,34	2,30
Klorofil b	$y = 1,04 \times 10^5 c - 0.010$	0,9980	6,36	2,00

Tablo 4.2’de verilen fenolik antioksidan maddelerin standartları için uygulanan CUPRAC yöntemi sonrasında, absorbans ve derişim arasında çizilen kalibrasyon grafiğinin eğiminden molar absorplama katsayıları ($\epsilon_{\text{fenolik}}$) bulundu. İlgili bileşenlerin $\epsilon_{\text{fenolik}}$ değerleri, troloksun molar absorplama katsayısına (ϵ_{TR}) bölünerek troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) katsayıları hesaplandı.

Tablo 4.2 : Fenolik standartların CUPRAC yöntemi ile elde edilen molar absorplama katsayıları ($\epsilon_{\text{fenolik}}$, $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) ve TEAC katsayısı değerleri.

Antioksidan	Molar Absorplama Katsayısı ($\text{L} / \text{mol.cm}$)	TEAC _{CUPRAC}
Floroglusinol	$3,50 \times 10^4$	2,23
Gallik asit	$4,27 \times 10^4$	2,72
p-Kumarik asit	$8,96 \times 10^3$	0,57
Kafeik asit	$4,92 \times 10^4$	3,14
Kateşin	$5,40 \times 10^4$	3,44
Epikateşin	$4,61 \times 10^4$	2,94
Rutin	$4,28 \times 10^4$	2,73
Hesperidin	$1,62 \times 10^4$	1,03
Morin	$3,20 \times 10^4$	2,04

4.3. ÇALIŞILAN ANTIOKSİDANLARIN HPLC KALİBRASYONLARININ SONUÇLARI

4.3.1. Karotenoid ve Klorofil Standartlarının HPLC ile Kalibrasyon Sonuçları

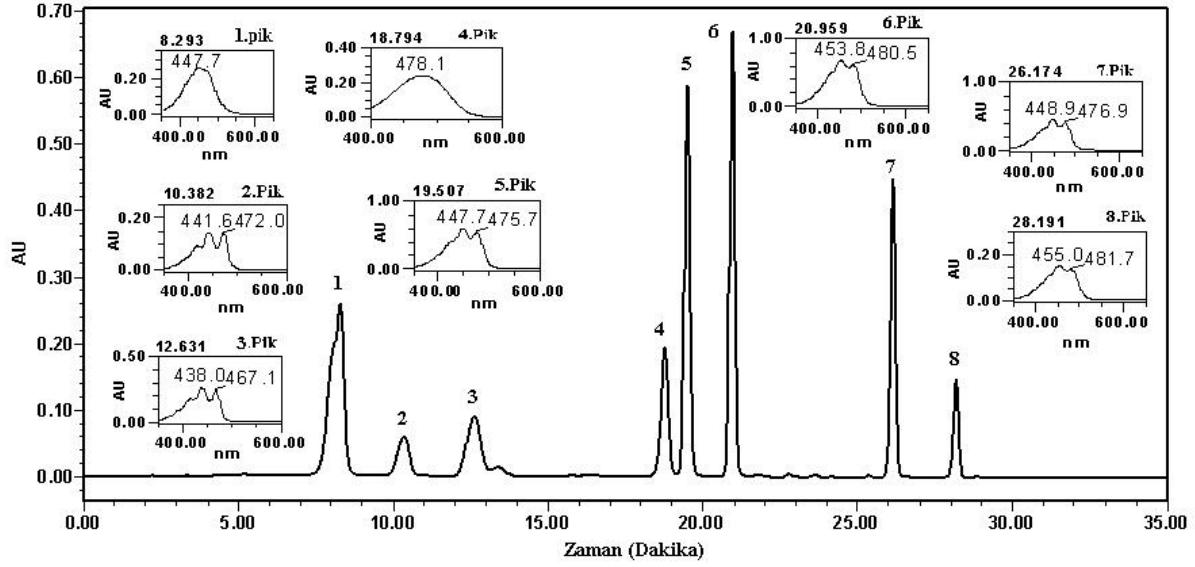
Tablo 4.3’de belirtilen karotenoid ve klorofil standart antioksidanlarının HPLC de belirlenen metotla elde edilen, pik alanları ile derişimleri arasında çizilen doğru denklemleri görülmektedir.

Tablo 4.3’de yer alan y: pik alanı, c: derişim, ve r: korelasyon katsayısını belirtmektedir.

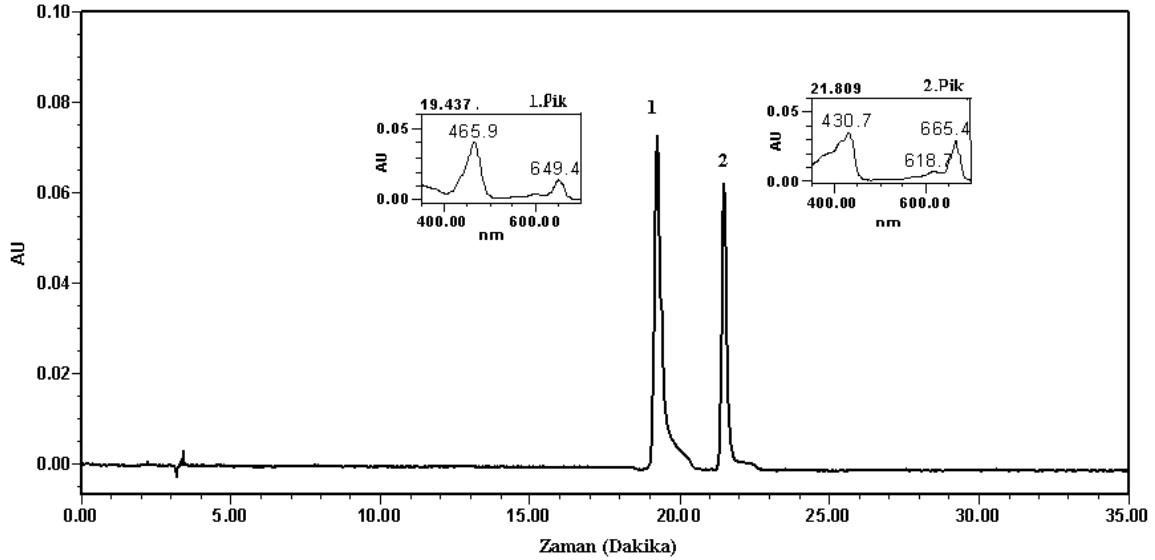
Tablo 4.3: Bazı karotenoid ve klorofil bileşiklerinin HPLC ile elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.

Karotenoid standartlar	Doğru denklemi	Korelasyon katsayısı (r)
Fukoksantin	$y = 1,43 \times 10^{11}c - 9,6 \times 10^4$	0,999
Violaksantin	$y = 5,14 \times 10^{10}c + 9,6 \times 10^4$	0,996
Neoksantin	$y = 1,90 \times 10^{11}c - 5,0 \times 10^4$	0,999
Astaksantin	$y = 1,86 \times 10^{11}c - 6,9 \times 10^4$	0,999
Lutein	$y = 2,08 \times 10^{11}c - 7,9 \times 10^4$	0,999
Zeaksantin	$y = 2,36 \times 10^{11}c - 4,9 \times 10^4$	0,999
α -karoten	$y = 1,67 \times 10^{11}c - 2,8 \times 10^4$	0,999
β -karoten	$y = 4,40 \times 10^9c - 1,3 \times 10^3$	0,999
Klorofil a	$y = 3,20 \times 10^{10}c + 5,7 \times 10^3$	0,999
Klorofil b	$y = 5,10 \times 10^{10}c - 5,7 \times 10^4$	0,998

Karotenoid standart karışımının şekil 4.5’de 450 nm’deki, şekil 4.6’da ise klorofillerin 650 nm deki kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.6: Karotenoid bileşenlerinin 450 nm de elde edilen kromatogramları: (1) Fukoksantin, (2) Violaksantin, (3) Neoksantin, (4) Astaksantin, (5) Lutein, (6) Zeaksantin, (7) α -karoten, (8) β -karoten.



Şekil 4.7: Klorofil bileşenlerinin 650 nm’deki kromatogramları: (1) Klorofil b, (2) Klorofil a standart karışımlarının kromatogramları.

4.3.2. Çalışılan Fenolik Standartlarının HPLC ile Kalibrasyon Sonuçları

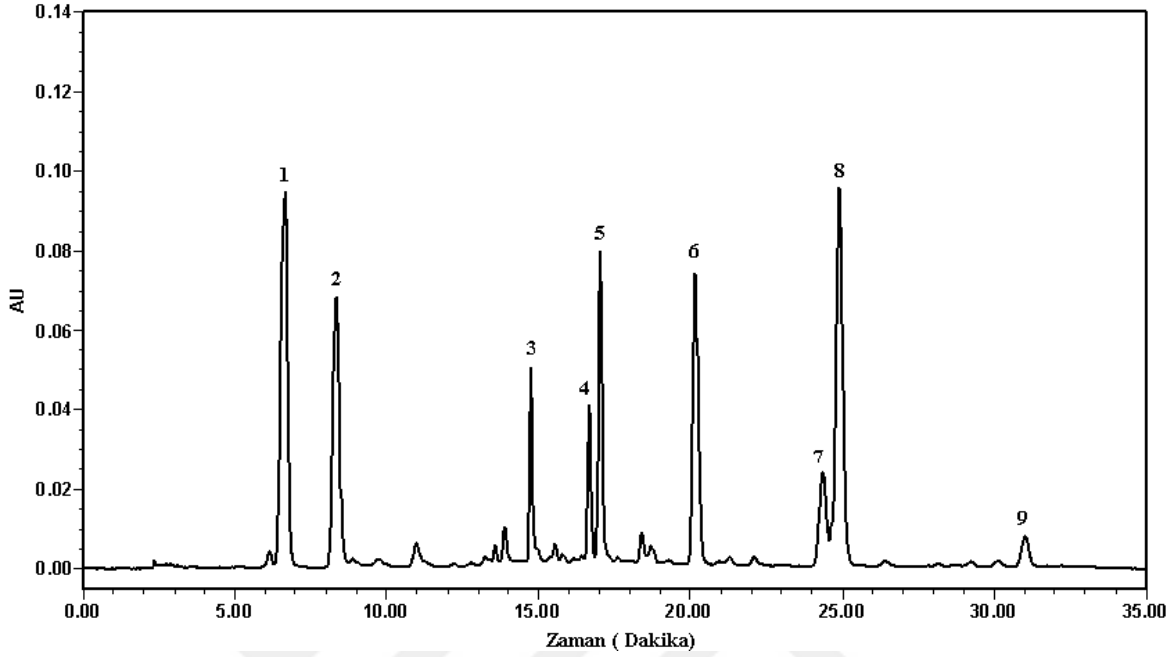
Tablo 4.4’de belirtilen fenolik antioksidan standartlarının HPLC de belirlenen metodla elde edilen, pik alanları ile derişim arasında çizilen doğru denklemleri görölmektedir.

Tablo 4.4’de yer alan y: pik alanı, c: derişim, ve r: korelasyon katsayısını belirtmektedir.

Tablo 4.4: Çeşitli antioksidan standartlarının HPLC ile elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.

ANTIOKSİDAN	Doğru Denklemi	Korelasyon katsayısı (r)
Floroglusinol	$y = 5,33 \times 10^8 c + 9,2 \times 10^3$	0,9998
Gallik asit	$y = 1,27 \times 10^{10} c + 2,7 \times 10^3$	0,9998
Kateşin	$y = 4,06 \times 10^9 c + 2,0 \times 10^3$	0,9998
Epikateşin	$y = 3,89 \times 10^9 c + 1,9 \times 10^3$	0,9998
Kafeik asit	$y = 9,24 \times 10^9 c + 7,9 \times 10^3$	0,9997
p-kumarik asit	$y = 1,26 \times 10^{10} c + 3,2 \times 10^3$	0,9997
Rutin	$y = 1,88 \times 10^{10} c + 3,4 \times 10^3$	0,9998
Hesperidin	$y = 9,56 \times 10^9 c + 4,4 \times 10^3$	0,9999
Morin	$y = 8,06 \times 10^9 c + 6,3 \times 10^3$	0,9996

Şekil 4.7’de fenolik standart karışımının 270 nm ‘deki kromatogramı görülmektedir.



Şekil 4.8: Fenolik bileşenlerinin 270 nm’deki kromatogramları:(1) Floroglusinol, (2) Gallik asit, (3) Kateşin, (4) Epikateşin, (5) Kafeik asit, (6) p-Kumarik asit, (7) Rutin (8) Hesperidin, (9) Morin.

4.4. ALG ÖRNEKLERİNİN SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZ SONUÇLARI

Alg örneklerinin toplam fenolik miktarlarının belirlenmesinde kullanılan Folin-Ciocalteu yöntemi için gallik asit (GA) standardı ile toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan CUPRAC ve ABTS yöntemleri için troloks (TR) standardı ile oluşturulan kalibrasyon doğru denklemleri Tablo 4.5’de gösterilmektedir.

Tablo 4.5: Referans maddeler (GA ve TR) için belirlenmiş doğru denklemleri

Spektrofotometrik yöntem	Standart madde	Doğru denklemi	(r)
CUPRAC	Troloks	$y = 15653c + 0,0011$	0,9995
		$y^* = 16346c - 0,0354$	0,9992
ABTS	Troloks	$y = 30756c - 0,0053$	0,9992
		$y^* = 14726c - 0,0605$	0,9998
FOLIN-CIOCALTEU	Gallik asit	$y = 6108c - 0,0912$	0,9983

*Pigment bileşenlerin analizi için TR standardı aseton çözücüsü kullanılarak oluşturulmuş doğru denklemleri

Tablo 4.5’de verilen doğru denklemlerinden yararlanılarak alglerin %80 MeOH-su (v/v) ekstraktları için elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri $\mu\text{mol TR/g}$ alg (troloks eşdeğeri) ve toplam fenolik madde içerikleri $\mu\text{mol GA/g}$ (gallik asit eşdeğeri) olarak tablo 4.6’da verildi.

Tablo 4.6: Alg örneklerinin %80 MeOH-su ekstraktlarının CUPRAC, ABTS yöntemleri ile belirlenmiş TAK değerleri ($\mu\text{mol TR/g}$) ile Folin yöntemi ile belirlenmiş ($\mu\text{mol GA/g}$) toplam fenolik içerikler.

ALG ÖRNEĞİ	CUPRAC ($\mu\text{mol TR/g}$)	ABTS ($\mu\text{mol TR/g}$)	Folin-Ciocalteu ($\mu\text{mol GA/g}$)
<i>J.rubens</i>	$7,36 \pm 0,02$	$4,42 \pm 0,01$	$16,36 \pm 0,01$
<i>H.Musciformis</i>	$6,72 \pm 0,02$	$4,32 \pm 0,04$	$19,45 \pm 0,01$
<i>C.Fragile</i>	$7,08 \pm 0,04$	$3,77 \pm 0,04$	$16,89 \pm 0,04$
<i>C.racemosa var.Cylindracea</i>	$4,37 \pm 0,01$	$2,02 \pm 0,01$	$12,36 \pm 0,004$
<i>C.Sinuosa</i>	$6,80 \pm 0,03$	$7,90 \pm 0,06$	$14,84 \pm 0,02$
<i>C.Spongiosum f.v</i>	$7,97 \pm 0,02$	$4,87 \pm 0,04$	$18,56 \pm 0,01$

C.Sinuosa ve *C.Fragile* normal CUPRAC yönteminde bulanıklık olduğundan etanollü CUPRAC yöntemi uygulandı. Tablo 4.6 'da verilen sonuçlardan alg ekstraktlarının FC yöntemi ile elde edilen değerleri CUPRAC ve ABTS yöntemleri bulgularına göre genel olarak daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi folin reaktifinin fenolik olmayan pek çok bileşik tarafından indirgenebilmesinden dolayı sadece fenolik bileşiklere karşı belirleyici olmamasıdır. FC metodu gerçekte bir örneğin indirgeme kapasitesini ölçmektedir. Kahverengi alg grubundan *C.spongiosum* ve kırmızı alglerden *J.Rubens* CUPRAC değerleri diğer alg türlerine göre daha yüksek bulunmaktadır. *C.Fragile* türünün toplam fenolik içeriği, Yıldız ve ark. tarafından FC yöntemi ile analizlenmiş ve elde edilen sonuç 0,27 mg GA /g alg olarak verilmiştir. *C.Fragile* aynı yöntemle analizlenen ve tablo 4.6'da aynı birim cinsinden ifade edildiğinde yaklaşık olarak 2,87 mg GA/g alg olarak bulundu. Bu çalışmada bulunan sonuçlar ile diğer araştırmacılar arasında yaklaşık 10 kat fazlalık olduğu görülmektedir. Bu durumun alglerin temin edilme zamanlarının ve coğrafi konumlarının farklı oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Alglerin karotenoid ve klorofil bileşenlerinden ileri gelen spektrofotometrik toplam antioksidan kapasite değerleri troloks eşdeğeri $\mu\text{mol TR/g}$ ve β -karoten eşdeğeri olarak belirlendi.

Tablo 4.7: Alg örneklerinin aseton ekstraktlarının CUPRAC, ABTS yöntemleri ile belirlenen troloks eşdeğeri toplam antioksidan değerleri ($\mu\text{mol TR/g}$) ile β -karoten eşdeğeri olarak belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri

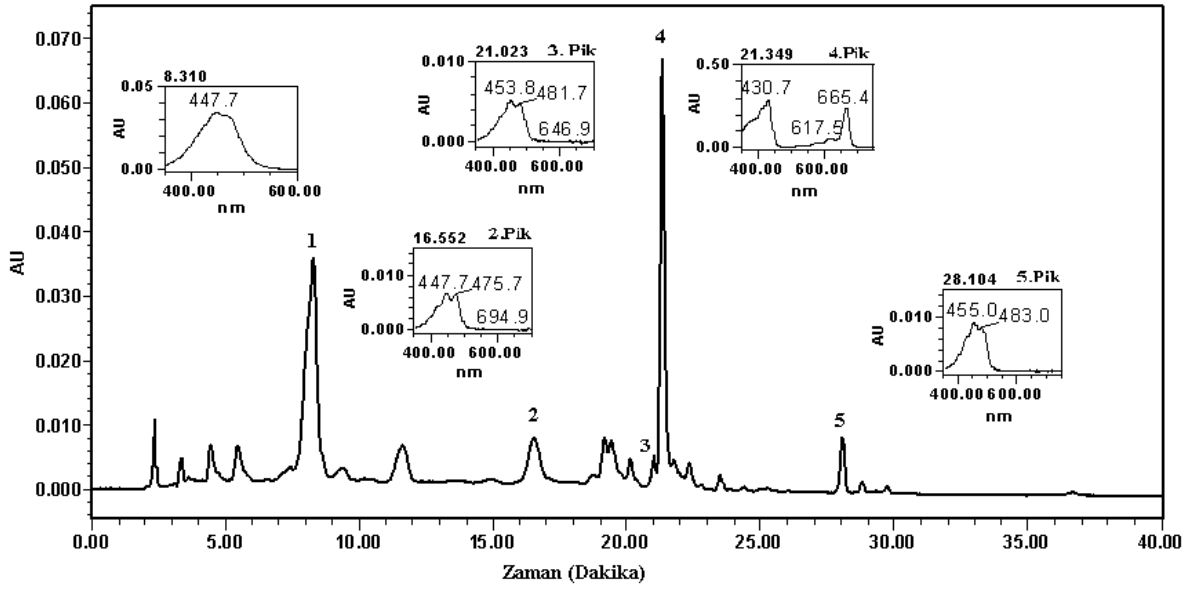
Alg örneği	TAK (TE)		TAK (β -CE)
	CUPRAC	ABTS	CUPRAC
<i>J. Rubens</i>	0,87 \pm 0,01	0,46 \pm 0,01	0.25 \pm 0,009
<i>H. Musciformis</i>	0,72 \pm 0,01	0,60 \pm 0,01	0.2 \pm 0,007
<i>C.Fragile</i>	4,26 \pm 0,04	2,85 \pm 0,01	3.33 \pm 0,020
<i>C.Racemosavar. cylindracea</i>	1,31 \pm 0,02	0,59 \pm 0,01	0.39 \pm 0,007
<i>C.Sinuosa</i>	2,67 \pm 0,01	1,44 \pm 0,01	0.85 \pm 0,010
<i>C.Spongiosum f.v</i>	1,67 \pm 0,01	1,31 \pm 0,01	0.48 \pm 0,009

4.5. ALG ÖRNEKLERİNİN HPLC ANALİZİ VE HPLC-CUPRAC YÖNTEMİ SONUÇLARI

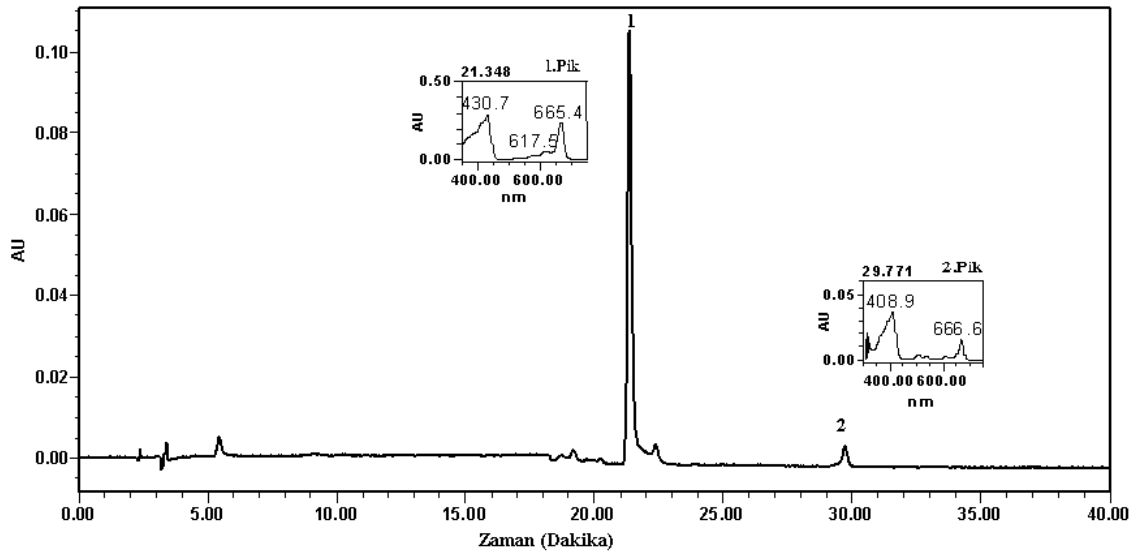
4.5.1. Karotenoid ve Klorofil Bileşiklerinin HPLC Analizi ve HPLC-CUPRAC Sonuçları

HPLC ile miktar tayinleri karotenoid bileşenleri için maksimum absorpsiyon dalga boyu 450 nm'de ve klorofil bileşenleri için 650 nm de yapıldı. Alglerde bulunan feofitin a'nın teşhisi ve analizi literatüre dayalı olarak gerçekleştirildi. Feofitin a deniz alglerinde önemli miktarlarda bulunduğu tespit edilen klorofil a pigmentinin başlıca türevidir (Indrawati ve diğ., 2015). Feofitin a'nın oluşması zamanla ve ısı gibi çevre etkileriyle kısmen artar. Bitkilerin ekstraksiyon işlemi sırasında da önemli oranlarda klorofil a dan, feofitin a maddesine dönüşüm gerçekleşir. Bu dönüşüm porfirin halka yapısı şeklinde olan klorofil a molekülünde bulunan Mg merkez atomunun uzaklaşması ile olur. Bu yüzden genel olarak basitçe Mg merkez atomsuz klorofil olarak tanımlanır (Milenkovic ve diğ., 2012). Feofitin a maddesinin standartı olmadığından teşhisi için asıl ayırt edici özellik olan PDA spektrumlarının literatürlerde verilenlerle örtüşmesi bu bileşenin tayini için yeterli veri oluşturdu (Heriyanto ve diğ., 2017; Wright ve diğ., 1991).

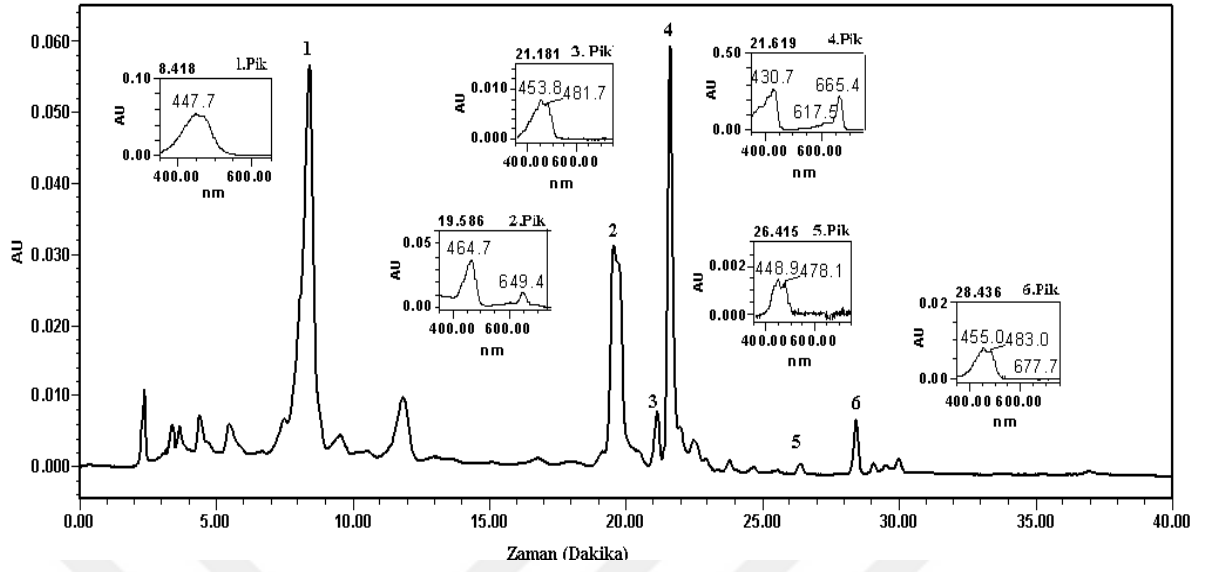
Şekil 4.8- 4.19 arasında kırmızı alglerden *J.Rubens*, *H.Musciformis*, kahverengi alglerden *C.Spongiosum f.v.*, *C.Sinuosa* ve yeşil algler *C.Racemosa*, *C. Fragile* örneklerinin % 100 aseton ile hazırlanmış ekstraktlarının 450 ve 650 nm' deki kromatogramları görülmektedir. *J. Rubens* kırmızı alg örneğinde fukoksantin, lutein, zeksantin, klorofil a, β -karoten, Pheophytin a, *H.Musciformis* kırmızı alg örneğinde fukoksantin, klorofil b, zeksantin, klorofil a, α -karoten, β -karoten tespit edildi. Kahverengi alglerden *C.Spongiosum f.v.* fukoksantin, lutein, klorofil a, β -karoten ,diğer kahverengi alg örneği *C.Sinuosa* ise fukoksantin, zeaksantin, klorofil a, β -karoten, pheophytin a bulundu. Yeşil alglerden *C.Racemosa* da fukoksantin, klorofil b, klorofil a, α -karoten, β -karoten, pheophytin a ve *C. Fragile* da fukoksantin, violaksantin, klorofil a, α -karoten bulundu.



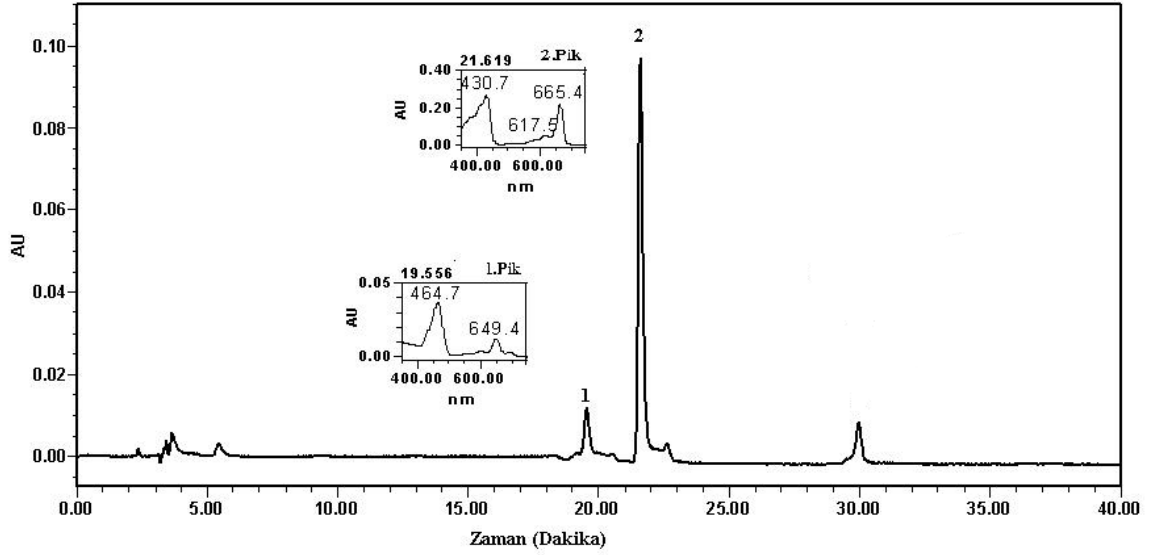
Şekil 4.9: *Jania rubens* alg örneğinin (1:15 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1) Fukoksantin, (2) Lutein, (3) Zeaksantin, (4) Klorofil a, (5) β karoten)



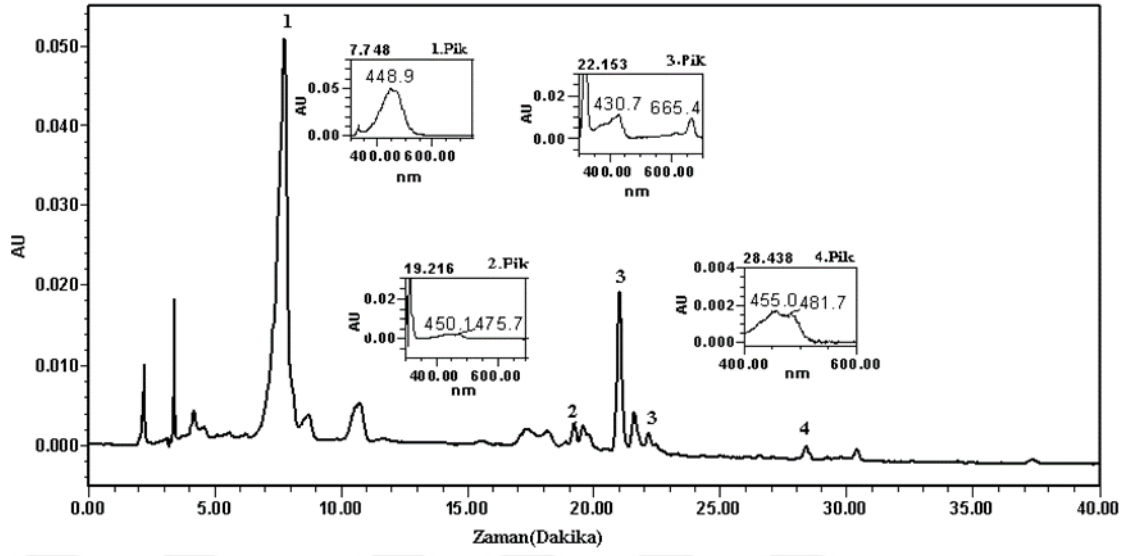
Şekil 4.10: *Jania rubens* alg örneğinin (1:15 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1) Klorofil a, (2) Feofitin a.



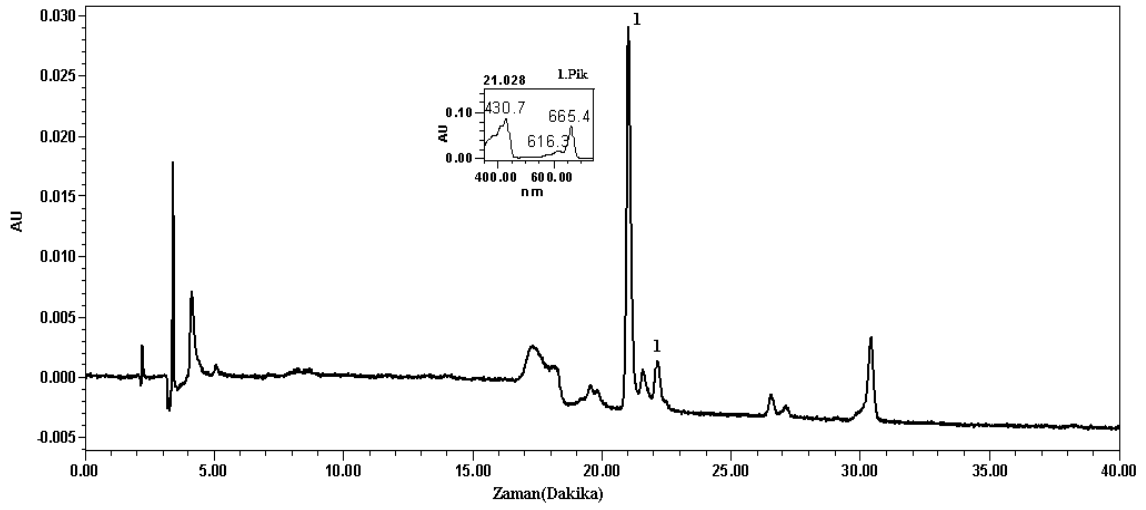
Şekil 4.11: *H. Musciformis* alg örneğinin (1:20 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1) Fukoksantin, (2) Klorofil b, (3) Zeaksantin, (4) Klorofil a, (5) α karoten, (6) β karoten.



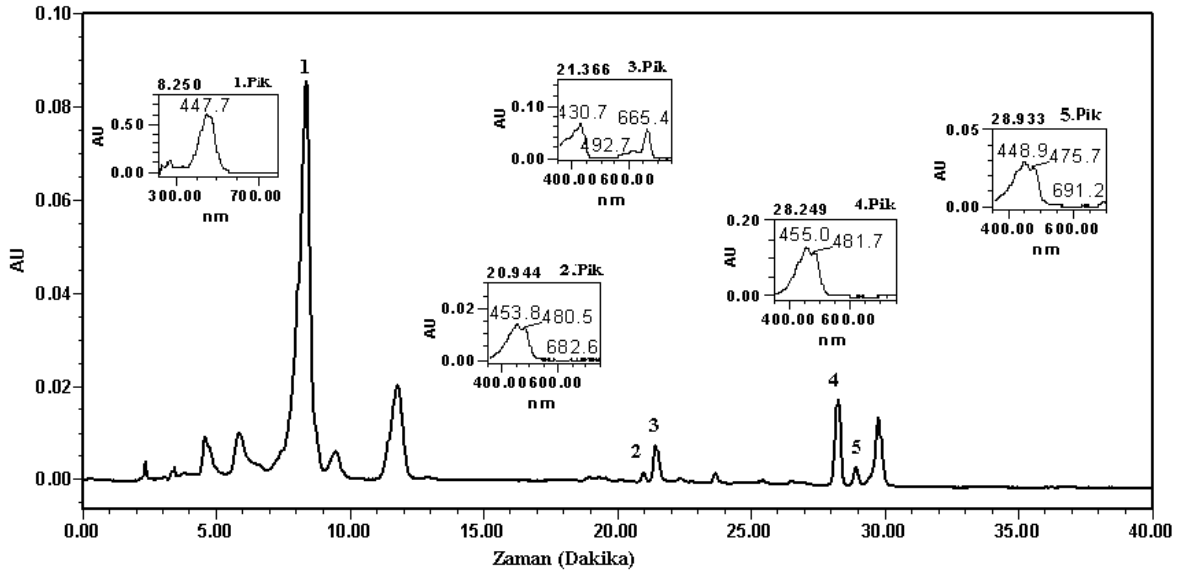
Şekil 4.12: *H. Musciformis* alg örneğinin (1:20 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1) Klorofil b, (2) Klorofil a.



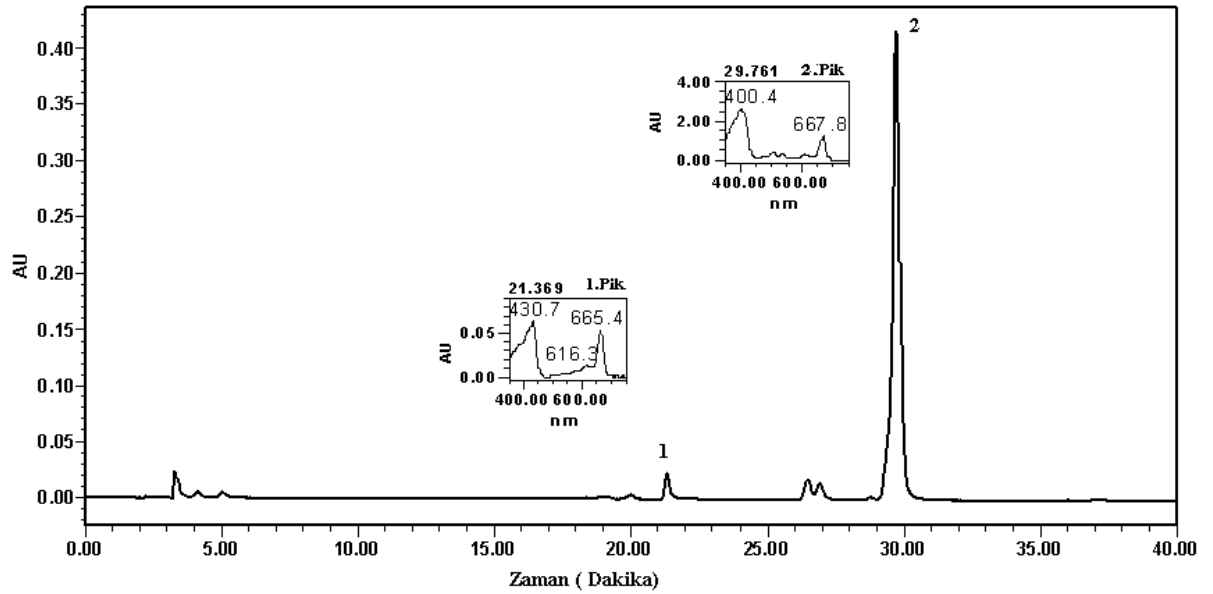
Şekil 4.13: *C.Spongiosum f.v* alg örneğinin (1:10 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1) Fukoksantin, (2) Lutein, (3) Klorofil a, (4) β -Karoten.



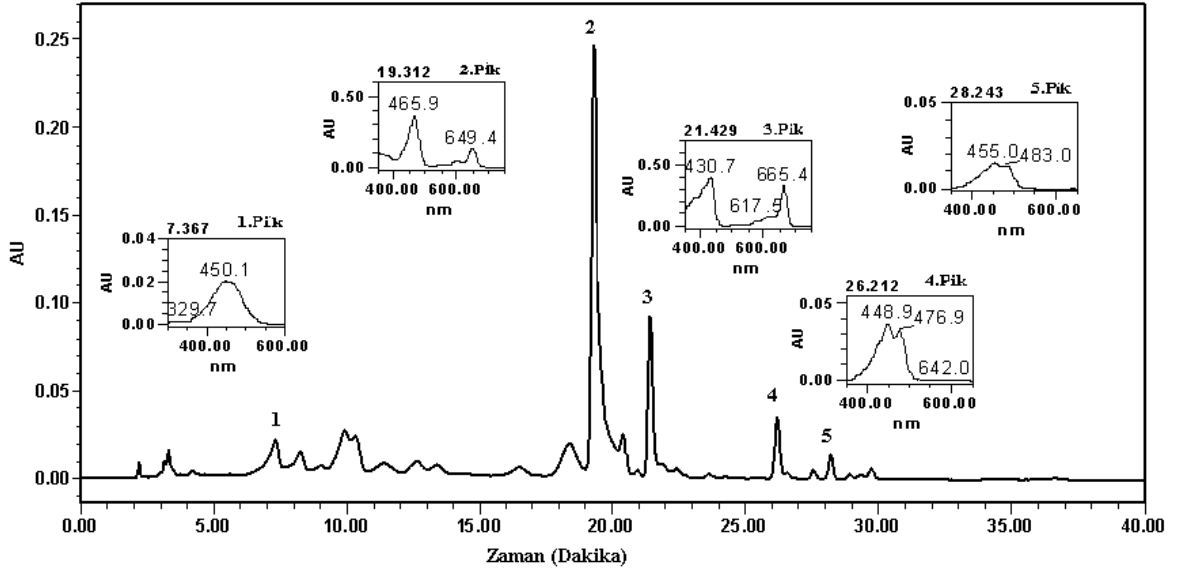
Şekil 4.14: *C.Spongiosum f.v* alg örneğinin (1:10 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1) Klorofil a



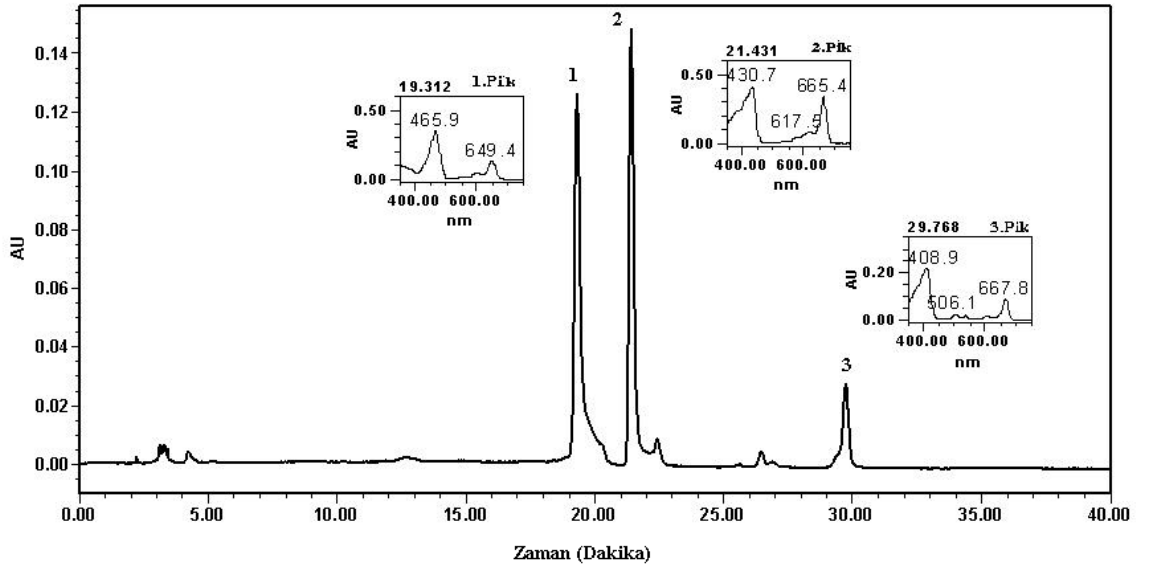
Şekil 4.15: *Colpemenia sinuosa* alg örneğinin (1:5 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1)Fukoksantin, (2) Zeaksantin, (3) Klorofil a, (4) β karoten , (5) α -karoten .



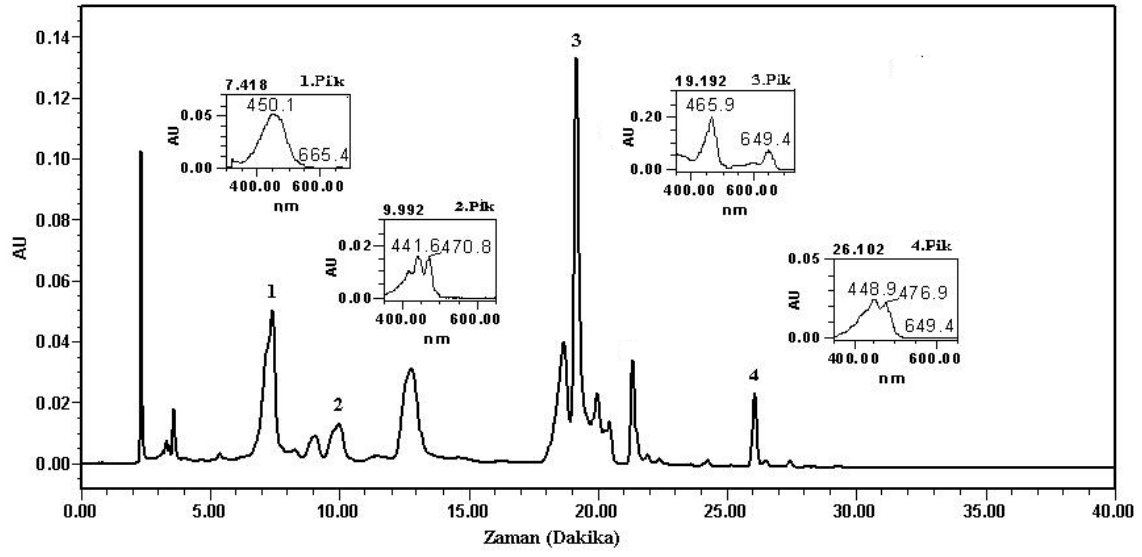
Şekil 4.16: *Colpemenia sinuosa* alg örneğinin (1:5 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1)Klorofil a , (2) Feofitin a



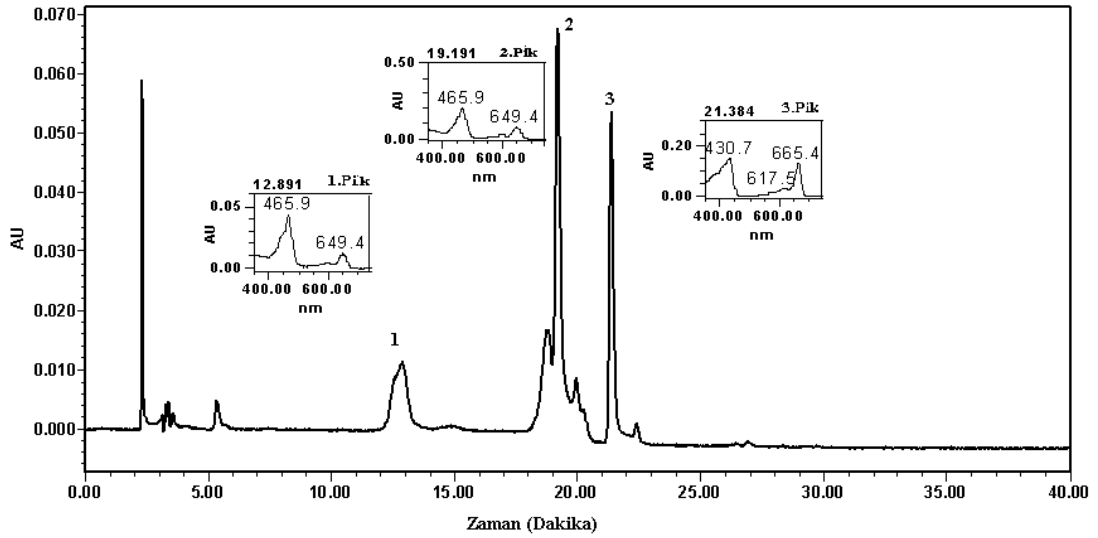
Şekil 4.17: *Caulerpa racemosa* alg örneğinin (1:10 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1)Fukoksantin, (2) Klorofil b, (3) Klorofil a, (4) α karoten, (5) β -karoten.



Şekil 4.18: *Caulerpa racemosa* alg örneğinin (1:10 derişiklendirilen) aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1) Klorofil b, (2) Klorofil a, (3) Feofitin a.



Şekil 4.19: *Codium Fragile* alg örneğinin aseton ekstraktının 450 nm'deki kromatogramı (1) Fukoksantin, (2) violaksantin, (3) Klorofil a (4) α -karoten.



Şekil 4.20: *Codium Fragile* alg örneğinin aseton ekstraktının 650 nm'deki kromatogramı (1,2) Klorofil b, (3) Klorofil a.

HPLC’de pik alanlarıyla madde derişimleri arasında çizilen grafiklerden belirlenen ve tablo 4.3.’te verilen kalibrasyon doğruları yardımıyla, alg örneklerinde bulunan karotenoid ve klorofil bileşenlerinin miktarları ($\mu\text{g-pigment/g alg}$) olarak hesaplandı.

Tablo 4.8: Alg örneklerinde bulunan karotenoid ve klorofil bileşenlerinin HPLC ile belirlenen miktarları ($\mu\text{g/g alg}$).

Alg örneği	Fks	Vks	Lt	Zks	α -kar	β -kar	Klfil a	Klfil b	Ffa
<i>J. Rubens</i>	6,36	-	0,66	0,25	-	-	36,31	1,97	1,73
<i>H.Musciformis</i>	5,01	-	-	0,19	-	-	17,66	1,94	2,38
<i>C. Racemosa</i>	5,78	-	-	-	1,76	34,27	79,59	59,77	22,73
<i>C.Fragile</i>	139,46	32,45	-	-	10,84	-	255,22	381,00	-
<i>C.Sinuosa</i>	183,0	-	-	1,30	0,54	85,36	12,21	-	587,87
<i>C.Spongiosum</i>	12,35	-	0,36	-	-	5,97	14,77	-	4,25

Alglerde bulunan karotenoid ve klorofil pigmentlerinin HPLC ile analizlenen ve Tablo 4.8 ’de verilen $\mu\text{g-pigment/g alg}$ cinsinden miktarları ilgili bileşenin mol tartısına bölünerek $\mu\text{mol-pigment/g alg}$ cinsinden miktarları ile elde edildi. Elde edilen bu değerler toplanarak, spektrofotometrik CUPRAC yöntemi ile elde edilen doğru denklemlerinden troloks eşdeğeri ($\text{TEAC}_{\text{CUPRAC}}$) ve β -karoten eşdeğeri ($\beta\text{-CEAC}_{\text{CUPRAC}}$) katsayıları (Tablo 4.1 ($(\epsilon_{\text{pigment}}/\epsilon_{\text{TR}})$ ve $(\epsilon_{\text{pigment}}/\epsilon_{\beta\text{-karoten}})$) ile çarpıldı ve bulunan değerler toplandı. Böylece alg örneklerindeki bileşenlerin kuramsal olarak gösterdikleri TAK değerleri TR ve β -CE eşdeğeri olarak HPLC ile belirlendi (Tablo 4.9). Bu şekilde, bileşenlerin HPLC ile bulunan ve spektrofotometrik yöntemlerle belirlenen katsayılarından yararlanılarak elde edilen bireysel kapasiteleri toplanarak TAK değerleri hesaplandı.

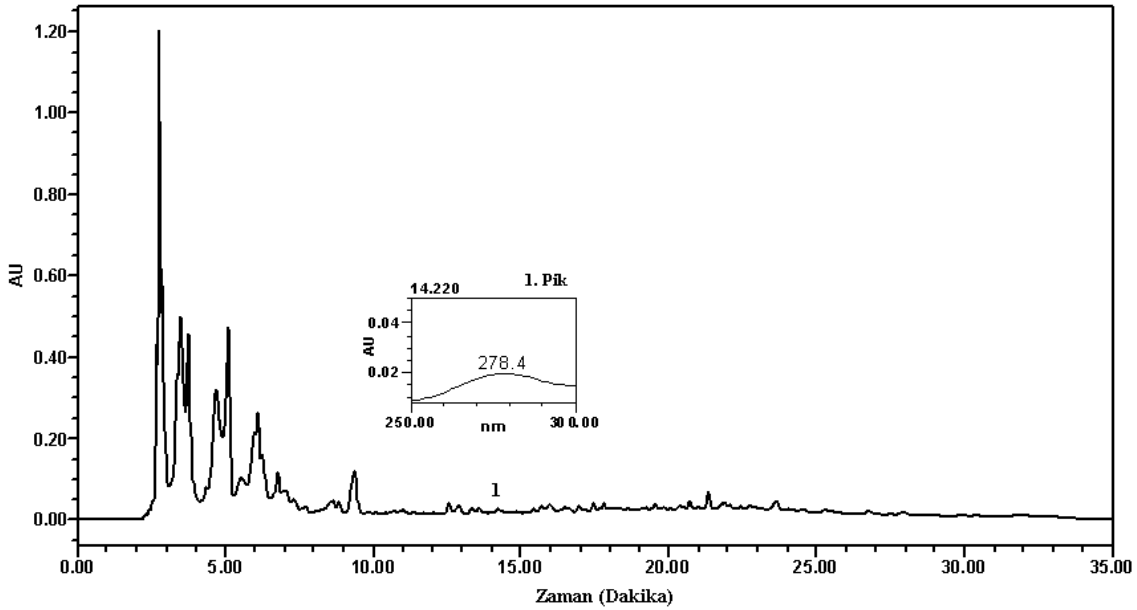
Tablo 4.9: HPLC-CUPRAC yöntemleri ile belirlenmiş teorik TAK değerleri ($\mu\text{mol TE /g alg}$ ve $\mu\text{mol } \beta\text{-CE /g alg}$)

Alg örneği	HPLC-CUPRAC (TE)	HPLC-CUPRAC (β-CE)
<i>J. Rubens</i>	0,36	0,11
<i>H. Musciformis</i>	0,20	0,06
<i>C.Fragile</i>	5,49	1,68
<i>C.Racemosavar. cylindracea</i>	1,53	0,47
<i>C.Sinuosa</i>	1,24	0,38
<i>C.Spongiosum f.v</i>	0,20	0,06

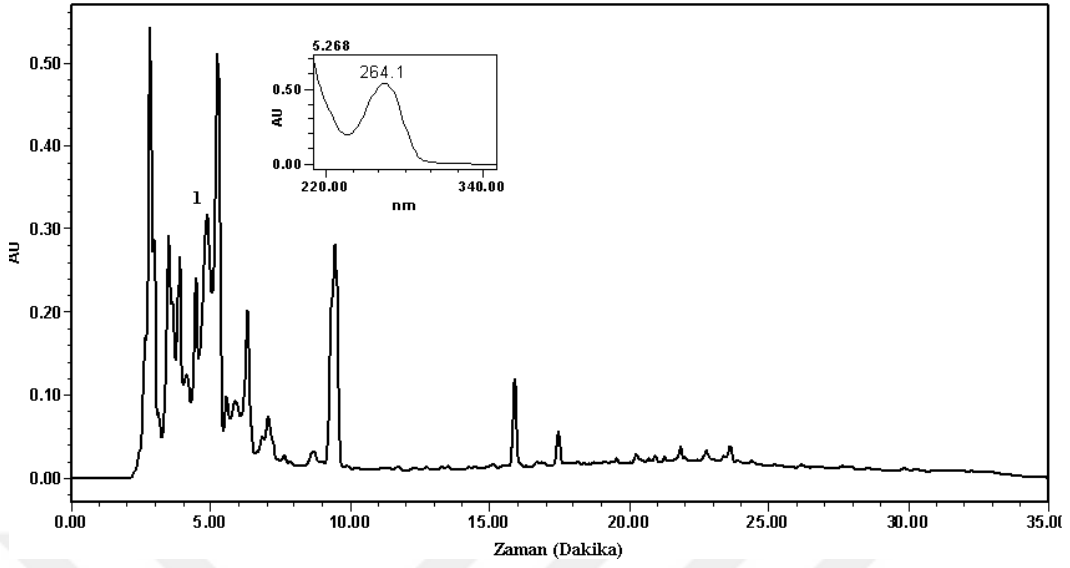
4.5.2. Fenolik Bileşiklerin HPLC Analizi

Kahverengi, kırmızı ve yeşil alg gruplarından bir kısmında tespit edilen fenolik bileşenleri gösteren kromatogramlar (270 nm) verildi. Alg örnekleri kromatogramları metanol ekstraktları ve hidrolizatları olarak iki aşamada değerlendirildi.

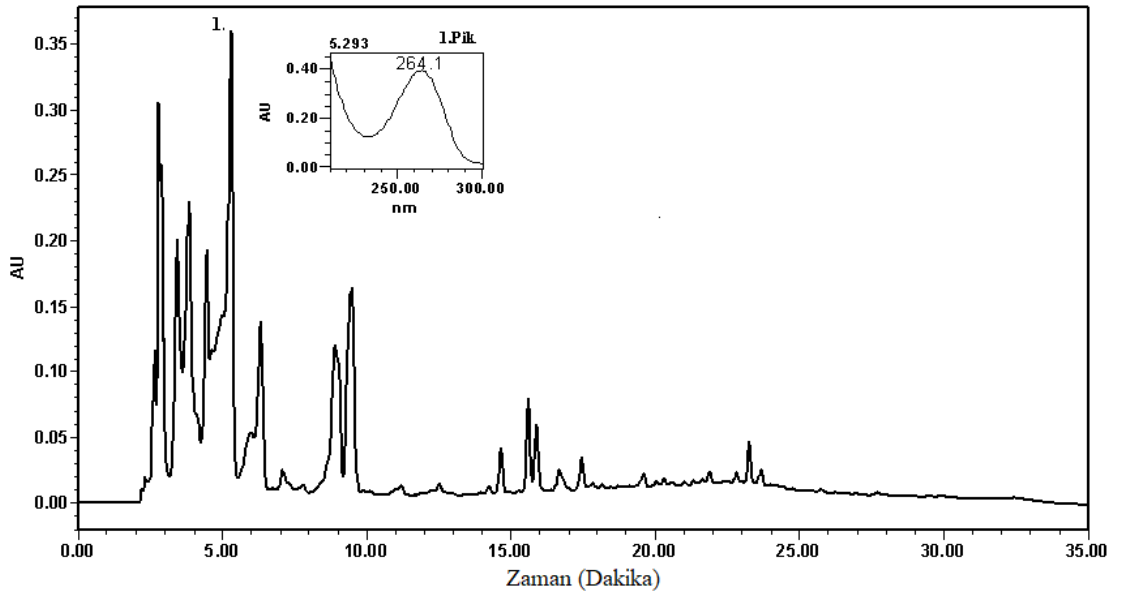
Alglerde yaygın olarak bulunan tannik yapılar çok kompleks yapıda polimerik maddeler olduğundan birçok bileşenin biraraya gelmesinden oluştukları için kromatografik olarak tanımlanmaları çok zordur. Fenolik asit türevlerinden oluşan hidrolize edilebilir tanenler, hidrolizden sonra oluşan fenolik bileşenler olarak alg ekstraktlarında analiz edilebilen bir başka önemli fenolik bileşik sınıfıdır (Oszmianski ve diğ., 2007). Bunlardan bir kısmı elajik, gallik, p- kumarik, kafeik asitlerdir. *H. Musciformis* ve *C. Sinuosa* alglerinde kateşin bileşiği, *C.Spongiosum f.v* ve *C.Racemosa* alglerinde floroglusinol bileşiği tespit edildi. *C. Sinuosa*'nın hidrolizatında kateşin belirlendi.



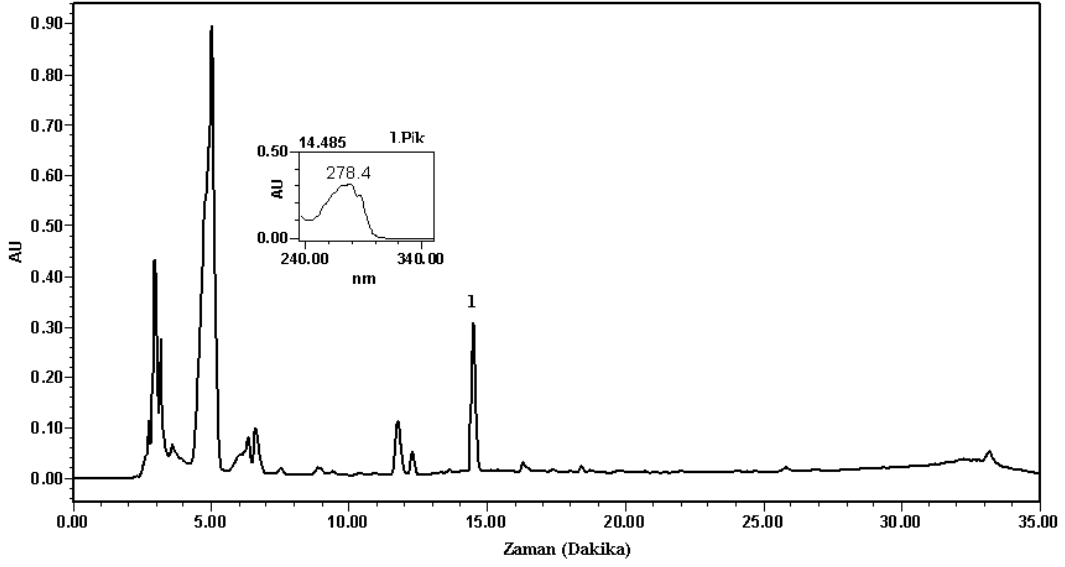
Şekil 4.21: *H. Musciformis* alg örneğinin %80 MeOH ekstraktının 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) Kateşin.



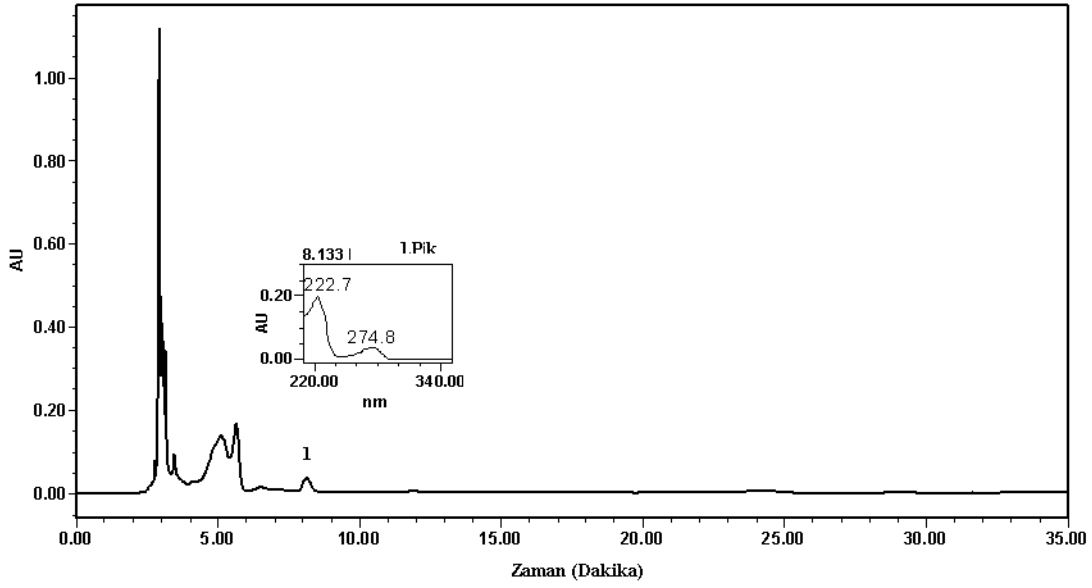
Şekil 4.22: *C.Spongiosum f.v* alg örneğinin % 80 MeOH ekstraktının 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) Floroglusinol.



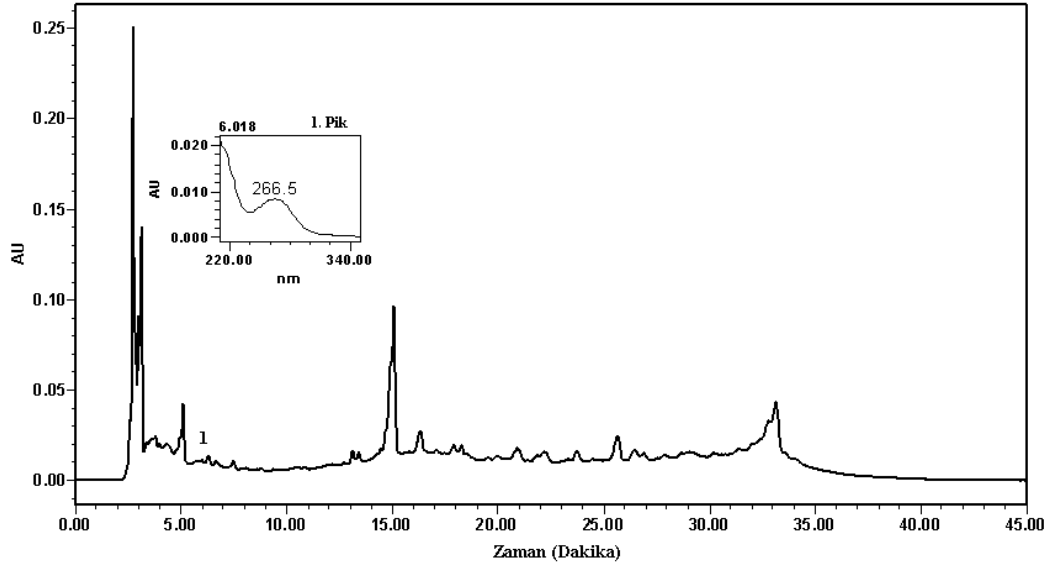
Şekil 4.23: *C.Spongiosum f.v* alg örneğinin % 80 MeOH ekstrakt hidrolizinin 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1)floroglusinol.



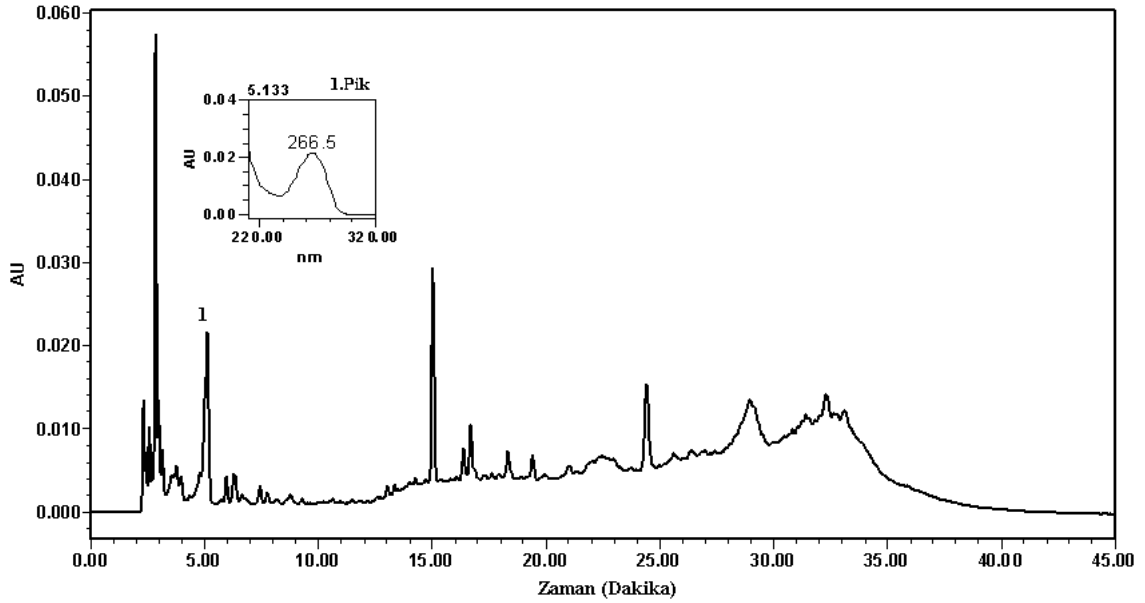
Şekil 4.24: *Colpemenia sinuosa* alg örneğinin % 80 MeOH-su ekstraktının 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) Kateşin.



Şekil 4.25: *Colpemenia sinuosa* alg örneğinin %80 MeOH ekstraktın hidrolizinin 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) Gallik asit.



Şekil 4.26: *Caulerpa racemosa* alg örneğinin %80 MeOH-su ekstraktının 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) floroglusinol.



Şekil 4.27: *Caulerpa racemosa* alg örneğinin %80 MeOH ekstraktın hidrolizinin 270 nm'deki kromatogramı (1:20 derişiklendirilen) (1) Floroglusinol.

HPLC analizler sonucu belirlenen pik alanlarıyla madde derişimleri arasında çizilen kalibrasyon doğruları yardımıyla, alg örneklerinde bulunan fenolik bileşenlerinin miktarları ($\mu\text{mol-fenolik bileşen/g alg}$) hesaplandı. Alglerde bulunan fenolik bileşenlerin HPLC ile belirlenen miktarları CUPRAC yöntemi ile belirlenmiş TEAC katsayıları ($\epsilon_{\text{fenolik}}/\epsilon_{\text{TR}}$) (Tablo. 12) ile çarpıldı. Böylece alg örneklerinde belirlenen bileşenlerin miktarları (troloks eşdeğeri) toplanarak alg örneklerinin kuramsal olarak gösterdikleri TAK değerleri hesaplanmış oldu.

Tablo 4.10: Alg örneklerinde HPLC ile belirlenen fenolik bileşenlerin (hidroliz öncesi ve sonrası) HPLC-CUPRAC yöntemi ile hesaplanmış teorik (bireysel ve toplam) antioksidan kapasite değerleri ($\mu\text{mol TE /g alg}$).

Alg örneği	Metanol ekstraksiyonu				Hidroliz			
	Floroglusinol	Gallik asit	Kateşin	HPLC-TAK(TE)	Floroglusinol	Gallik asit	Kateşin	HPLC-TAK(TE)
<i>H. musciformis</i>	-	-	0,22	0,22	-	-	-	-
<i>C. racemosavar . cylindracea</i>	0,76	-	-	0,76	-	-	-	-
<i>C. sinuosa</i>	-	-	1,73	1,73	-	-	-	-
<i>C. spongiosum f.v</i>	18,18	-	-	18,18	13,44	-	-	13,44

H. Musciformis ve *C. Sinuosa* alg örneklerinde kateşin bileşimi tespit edildi. *C. Racemosa* ve *C. Spongiosum* alglerinde floroglusinol tespit edildi. Alglerde en çok rastlandığı belirtilen morin ve hesperidin bileşenleri tespit edilmedi. Aynı şekilde alglerde bulunduğu belirtilen bir diğer fenolik bileşikler flavanollerdir (kateşin, gallokateşin, epikateşin, epigallokateşin) (Yoshie ve diğ., 2000). Ayrıca fenolik bileşenlerin antioksidan özellik gösteren fenolik polimerlerden (tanen) oluştuğu literatürlerde belirtilmiştir (Audibert ve diğ., 2010; Koivikko ve diğ., 2007)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Algler, içerdikleri fenolik bileşenler, pigmentler, vitaminler (C, B12, folik asit, pantotenik asit, B1, B2, E, K), lipitler, mineraller, proteinler ile oldukça önemli bir yere sahiptir. Algler doğal antioksidan kaynakları olarak bilinmektedir. Ayrıca alglerin sentetik antioksidanlar yerine kullanılabilen doğal antioksidanların önemli bir kaynağı olduğu da belirtilmektedir.

H. Musciformis, *J. Rubens*, *C.Spongiosum*, *C.Sinuosa*, *C.Racemosa* ve *C.Fragile* deniz alglerinin toplam antioksidan kapasitesini belirlemek için CUPRAC ve ABTS yöntemi, toplam fenolik madde miktarı için ise Folin-Ciocalteu yöntemleri uygulandı. Antioksidan bileşenlerinin belirlenmesi ve miktarlandırılması için ise HPLC yöntemi kullanıldı.

Alg örneklerinin karotenod ve klorofil bileşenlerinin ekstraksiyonu için çözücü olarak aseton kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi ultrasonik banyoda gerçekleştirildi. Karotenoid ve klorofil bileşenlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için CUPRAC ve ABTS yöntemleri uygulandı. Her iki yöntem bulgularına göre yüksek toplam antioksidan kapasite değerine ($\mu\text{mol TR/g}$) sahip alglerin *C. Fragile* ve *C. Sinuosa* olarak belirlendi. Bu alglerin CUPRAC yöntemiyle belirlenen TAK değerleri $4,26 \pm 0.04$ ve $2,67 \pm 0.01$, ABTS yöntemi ile belirlenen TAK değerleri ise $1,01 \pm 0,01$ ve $1,08 \pm 0,01$ 'dir. Karotenoid ve klorofil bileşenlerinin belirlenmesi için HPLC yöntemi belirlendi ve alg örneklerine uygulandı. HPLC yöntemiyle genel olarak örneklerde fukoksantin ve klorofil a pigmentleri bulundu. Deniz algleri genel olarak içerdikleri pigmentlere ve bunların miktarlarına bağlı olarak farklı renklerde görünmektedirler. Kromatogramlardan da görüleceği gibi kahverengi alglerde bulunan başlıca bileşenler fukoksantin, klorofil a ve β -karoten'dir. Bu bileşenlerin yanı sıra bazı kahverengi alglerinde lutein ve zeaksantin tespit edildi. *C.Sinuosa* alg ve ekstraktı yaklaşık %21 Fks, % 10 β -Kar, % 1,4 Klfil a ve Zks içermektedir.

Kırmızı alg gruplarında bulunan bileşenler başlıca Klfil a, Fks ve olmakla birlikte miktarlarının, kahverengi algere göre genel olarak çok daha az olduğu belirlendi. *J. rubens* alginin başlıca bileşen miktarları yaklaşık olarak %76,8 Klfil a, % 13,5 Fks, az miktarda %4,2 Klfil b, % 1,4 Lt bulundu. *H. musciformis* alginde bulunan başlıca bileşenler ve miktarları % 18 Fks, %65 Klfil a, %7 Klfil b olarak belirlendi ayrıca her iki algde de az miktarda Zks bulundu.

Alglerde bulunan karotenoid türü bileşenler alg türlerine göre değişebildiği gibi, mevsimsel döngülere, toplandığı bölgeye aynı zamanda algin üreme dönemine yani gelişme evresine büyük ölçüde bağlıdır. Bütün bu etkilere bağlı olarak aynı alg türünün içerdiği bileşenler ve bunların miktarları değişkenlik göstermektedir. Çalışmamızda yer alan yeşil alg grubundan analizlenen türlerin ağırlıklı olarak Klfil a, Klfil b, kısmen Fks bileşenlerinden daha zengin olduğu belirlendi. Özellikle, Klfil b bileşeninin miktarının kahverengi ve kırmızı alglere oranla oldukça fazla olduğu saptandı.

C. fragile alginin yaklaşık %17 fukoksantin, %4 violaksantin, klorofil b ve α -karoten içerdiği tespit edildi. *C. Racemose* alginde fukoksantin, %1,3 α - Kar, %31,2 Klfil a, %46,5 Klfil b bileşenlerinin olduğu belirlendi. İki yeşil alg örneğinde Zks ve Lt bileşenleri bulunmadı. Yeşil alg gruplarında bulunan pigmentlerin profilini literatüre göre değerlendirdiğimizde bu alg grubuna yeşil rengini veren klorofil ve türevlerinin başlıca bileşenler olarak rapor edildiği görülmektedir (Hegazi ve diğ., 1998; Haryatfrehnia ve diğ., 2015).

Alg örneklerinde fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu için uygun çözücüü belirlemek amacıyla %100 MeOH ve EtOH ile %80 (v/v) ve %70 (v/v) sulu çözeltileri uygulandı. Ekstraksiyon işlemi inkübatörlü çalkalayıcıda gerçekleştirildi. Sonuçta metolun fenolik bileşikler için koruyucu etkisi de dikkate alınarak ekstraksiyon verimi için en uygun %80 (v/v) MeOH-su olarak belirlendi.

Fenolik bileşikler için toplam antioksidan kapasite tayini için CUPRAC ve ABTS yöntemleri ve toplam fenolik madde miktarı için ise Folin-Ciocalteu yöntemi uygulandı. En yüksek toplam antioksidan kapasite değerine sahip algler *C.Spongiosum* ve *J.Rubens* olarak belirlendi. Bu alglerin CUPRAC yöntemiyle belirlenen TAK değerler sırasıyla $7,97 \pm 0.02$ ve $7,36 \pm 0.02$ ($\mu\text{mol TR/g}$)'dir. Folin- Ciocalteu yöntemi ile daha yüksek değerler elde edildi. Bunun nedeni, bu yöntemin fenolik olmayan pek çok madde ile indirgenbilmesidir. Alglerde fenolik maddeler dışında indirgen özellikte pek çok madde bulunduğundan bu değerlerin yüksek bulunduğu düşünülmüştür.

Deniz algleri, belirlemiş olduğumuz biyoaktif bileşenlerinin yanı sıra literatürde verilen diğer biyoaktif bileşenleri açısından önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Ayrıca çeşitlilikleri ve bol bulunabilirlikleri, bu kaynak için ekonomik anlamda önemli bir avantaj teşkil etmektedir. Alglerin kültürlerinin yapılarak üretilebilirlikleri dikkate alındığında, biyoaktif bileşenler

açısından zengin ekstraktların hazırlanabileceği ve bu doğal kaynağın daha verimli olarak değerlendirilebileceği ifade edilebilir.



KAYNAKLAR

- Aktar, S., Cebe, G. E., 2010, Algerin Genel Özellikleri, Kullanım Alanları Ve Eczacılıkta Önemi, *Ankara Eczacılık Fakültesi dergisi*, 39(3), 237-264.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M., Güçlü, K., 2013, Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity, *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Audibert, L., Fauchon, M., Blanc, N., Hauchard, D., Ar Gall, E., 2010, Phenolic compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: distribution and radical-scavenging activities, *Phytochemical Analysis*, 21(5), 399-405.
- Bağdatlıoğlu, N., Demirbükler, B., 1999, Gıda İlemede Karotenoidlerde Meydana Gelen Gelişmeler, 9, 48-51.
- Başkan, S.K., Tütem, E., Özer, N., Apak, R., 2013, Spectrophotometric and chromatographic assesment of contributions of carotenoids and chlorophylls to the total antioxidant capacities of plant foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 11371-11381.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneri, P., 2012, Functional properties of carotenoids originating from algae, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1), 5-11.
- Cirik, S., Cirik, Ş., Conk-Dalay, M., 2004, *Su Bitkiler 2 (Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri)*, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Yayınları, İzmir.
- Cirik, Ş., Cirik, S., 2004, *Su bitkileri (Deniz Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi ve Yetiştirme Teknikleri)*, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Çolakoğlu, G., 1999, *Tohumuz Bitkiler Sistematiği*, Marmara Üniversitesi, yayın no 648.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R., 2007, Polyphenols, Dietary Sources and Bioavailability, *Annali- Istituto Superiore di Sanità*, 43(4) 348-361.
- Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., Wang, B.G., 2006, Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95(1), 37-43.
- El Gamal, A. A., 2010, Biological importance of marine algae, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), 1-25.

- Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G., 2002, Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition*, 18(10), 872–879.
- Farvin, K.H.S., Jacobsen, C. 2013, Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast, *Food Chemistry*, 138, 1670-1681.
- Goel, G., Puniya, A.K., Aguilar, Singh, K., 2005, Interaction of gut microflora with tannins in feeds, *Naturwissenschaften*, 92(11), 497–503.
- Gupta, S., Abu-ghannam, N., 2011, Bioactive potential and possible health effects of edible Brown seaweeds, *Trends in Food Science technology*, 22(6),315-326.
- GÜÇLÜ, K., SÖZGEN, K., TÜTEM, E., ÖZYÜREK, M., APAK, R., 2005, Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceutical, *Talanta*, 65 (5), 1226-1232.
- Hadden, W.L., Watkins, R.H., Levy, L.W., Regalado, E., Rivadeneira, D.M., van Breemen, R.B., Schwartz, S.J., 1999, Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4189–4194.
- Harborne, J.B., 1998, *Phytochemical methods; a guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman and Hall, London.
- Haryatfrehnia, R, Dewia, S.C., Meiliandaa, A., Rahmawatia, S., Saria, I.Z.R. 2015, Extraction and analysis of algal pigments from common Gunungkidul seaweeds, *Procedia Chemistry* 14, 373-380.
- Hegazi, M.M., Perez-Ruzafa, A., Almela, L., Candela, M-E, 1998, Separation and identification of chlorophylls and carotenoids from *Caulerpa prolifera*, *Jania rubens* and *Padina pavonica* by reversed phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 829, 153-159.
- Heriyanto, H., Juliadiningtyas, A.D., Shioi, Y., Limantara, L., Brotosudarmo, T.H. P., 2017, Analysis of Pigment Composition of Brown Seaweeds Collected from Panjang Island, Central Java, Indonesia, *Philippine Journal of Science*, 146, 323-330.
- Holdt, S.L., Kraan, S., 2011, Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation, *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543–597.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I., 2011, A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835.
- İnanç, A.L., 2011, Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils, *Academic Food Journal*, 9(2), 26-32.

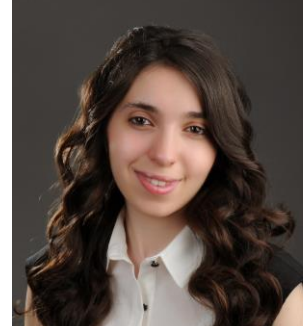
- Kaur, C. and Kapoor, H.C. 2001, Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.
- Koivikko, R., Laponen, J., Pihlaja, K., Jormaleinen, V. 2007, High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus Vesiculosus*, *Phytochemical analysis*, 18(4), 326-332.
- Krinsky, N.I., Johnson, E.J., 2005, Carotenoid actions and their relation to health and disease, *Molecular Aspects of Medicine*, 26 (6), 459-516.
- Krinsky, N.I., Landrum, J.T., Bone, R.A., 2003, Biologic Mechanisms of the Protective Role of Lutein and Zeaxanthin in the Eye, *Annual Review of Nutrition*, 23(1), 171–201.
- Ling, A.L.M., Yasir, S.M., Matanjun, P., Bakar M.F.A., 2013, Antioxidant activity, Total Phenolic and Flavonoid Contents of Selected Commercial Seaweeds of Sabah, Malaysia, *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 3 (3), 234-238.
- Makkar, H. P. S., Tran, G., Heuzé, V., Giger-Reverdin, S., Lessire, M., Lebas, F., Ankers, P., 2016, Seaweeds for livestock diets: A review, *Animal Feed Science and Technology*, 212, 1–17.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jime'nez, L., 2004, Polyphenols: Food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (5), 727-747.
- Milenković, S.M., Zvezdanović, J.B., Anđelković, T.D., Marković, D.Z., 2012, The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-Chromatography, visible and mass spectroscopy, *Advanced Technologies*, 1, 16-24.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science*, 84, 407–412.
- Mohy El-Din, S.M., and El-Ahwany, A.M.D., 2016, Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*Jania rubens*, *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*), *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 471–484.
- Namitha, K.K., and Negi, P.S., 2010, Chemistry and biotechnology of carotenoids, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(8), 728–760.
- O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P.G., Hughes, H., Gardiner, G.E., 2010, Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications, *Marine Drugs*, 8(7), 2038–2064.
- Okuzumi, J., Takahashi, T., Yamane, T., Kitao, Y., Inagake, M., Ohya, K., Nishino, H., Tanaka, Y., 1993, Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mouse duodenal carcinogenesis. *Cancer Letters*, 68, 159-68.
- Ortiz, J., Uquiche, E., Robert, P., Romero, N., Quitral, V., Llantén, C., 2009, Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and

- Macrocystis pyrifera, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(4), 320–327.
- Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-Zarawska, E., Swiader, K. 2007, Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots, *Food Chemistry*, 100, 579-583.
- Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2011, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652-664.
- Prior, R.L., Wu, X., Scaich, K., 2005, Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3110-3113.
- Qi, H., Zhao, T., Zhang, Q., Li, Z., Zhao, Z., Xing, R., 2005, Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 17(6), 527–534.
- Rajauria, G., 2018, Optimization and validation of reverse phase HPLC method for qualitative and quantitative assessment of polyphenols in seaweed, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 230–237.
- Rao, R., Sarada, A.R., Baskaran, V., Ravishankar, G.A., 2009, Identification of carotenoids from green alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC-MS (APCI) and their antioxidant properties, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 1333–1341.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rizvi, S., Raza S.T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., Mahdi, F., 2014, The Role of Vitamin E in Human Health and Some diseases, *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 14 (2), 157-165.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Lage-Yusty, M.A., López-Hernández, J., 2010, Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption, *Food Chemistry*, 121(2), 634–638.
- Santoso, J., Yoshie, Y., Suzuki, T., 2002, The distribution and profile of nutrients and catechins of some Indonesian seaweeds. *Fisheries Science*, 68(2), 1647–1648.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M., 2004, *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Tiwari, B.K., Troy, D.J., 2015, Seaweed sustainability – food and nonfood applications, *Seaweed Sustainability*, 1-6.
- Woutersen, R.A., Wolterbeek, A.P.M., Appel, M.J., Van der berg, H., Goldbohm, R.A., Feron, V.J., 1999, Safety evaluation of synthetic β -carotene, *Critical Reviews in toxicology*, 29(6), 515-542.

- Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjornland T., Repeta D., Welschmeyer N. 1991, Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton, *Marine Ecology Progress Series*, 77, 183-196.
- Yan, X., Chuda, Y., Suzuki, M., Nagata, T., 1999, Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(3), 605-607.
- Yıldız, L., Başkan, S.K., Tütem, E., Apak, R., 2008, Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle, *Talanta*, 77(1), 304-313.
- Yoshie, Y., Wang, W., Petillo, D., Suzuki, T., 2000, Distribution of catechins in Japanese seaweeds, *Fisheries Science*, 66(5), 998–1000.
- Yoshie-Stark, Y., Hsieh Y-P, Suzuki, T., 2003, Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan, *Journal of Tokyo University of Fisheries*, 89, 1-6.
- Yurdakulol, E., Cansaran D., 2004, *Tohumusuz Bitkiler-I Laboratuvar Kılavuzu*, Ankara üniversitesi, Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Özge KARAKAŞ
Doğum Yeri	Küçükçekmece
Doğum Tarihi	27.11.1991
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0537 742 3299
E-Posta Adresi	ozgekarakas91@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik Fakültesi
Bölümü	Kimya
Mezuniyet Yılı	13.06.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Analitik Kimya Programı

Makale ve Bildiriler	