

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**SİYANOBAKTERİDEN ELDE EDİLEN FİKOSİYANİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Aylin AKOĞLU

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2012

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

SİYANOBAKTERİDEN ELDE EDİLEN FİKOSİYANİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Aylin AKOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI

Bu çalışmada yüksek fikosiyanın verimine sahip siyanobakteri suşunun seçimi, suşun fikosiyanın veriminin artırılması, ekstrakte edilen fikosiyanın stabilitesinin belirlenmesi, saflaştırılması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında çeşitli siyanobakteri suşları fikosiyanın verimleri açısından karşılaştırılmış ve *Anabaena affinis* suşu 110 mg/g fikosiyanın miktarı ile en verimli suş olarak belirlenmiştir. Bu suşun üretim ve ekstraksiyon koşullarında optimizasyon yapılarak fikosiyanın verimi % 10.9'dan, % 14.1'e yükseltilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında kısmi olarak saflaştırılan fikosiyanın gıdalarda kullanım potansiyelini belirlemek amacıyla sıcaklık, pH, ışık gibi faktörlerin fikosiyanın stabilitesi üzerine etkileri araştırılmış ve doğal koruyucular (sakkaroz, sitrik asit, NaCl, CaCl₂) ilave edilerek fikosiyanın stabilitesi artırılmaya çalışılmıştır. Aynı amaçla fikosiyanın *Daphnia magna* organizması üzerinde toksik etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Buna göre gıdaya uygun saflıkta elde edilen fikosiyanın 4°C'de ve pH 6'da stabilitesini 1 ay boyunca koruyabildiği, daha yüksek sıcaklıklarda ve asidik pH'larda stabilitesini kaybettiği ayrıca 1 mg/mL düzeyinde fikosiyanın *Daphnia magna* organizmasına karşı toksik bir etki göstermediği belirlenmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında çeşitli saflaştırma teknikleri kullanılarak farklı verimlerde ve saflıklarda fikosiyanın elde edilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi basamaklarından oluşan üç aşamalı saflaştırma yönteminin fikosiyanın saflığını 6.93 kat artırdığı ve 4.02 saflık oranı ile analitik saflıkta ürün elde edilebildiği belirlenmiştir.

Çalışmanın son aşamasında saf fikosiyanın; SDS-PAGE ve HPLC jel filtrasyon yöntemleriyle molekül ağırlığı ve yapısı belirlenmiş, MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile elde edilen protein bantlarının fikosiyanine ait olduğu doğrulanmış, UV-VIS ve floresan spektrofotometrisi ile en yüksek absorban ve floresan yayını, sırasıyla 620 ve 646 nm'de verdiği tespit edilmiştir. *Anabaena affinis* suşundan elde edilen saf fikosiyanın, sırasıyla 17.1 ve 18.6 kDa'luk α ve β alt ünitelerinden oluşan 35.7 kDa büyüklüğünde monomerlerden oluştuğu ve % 21'lik kısmının 198.0 kDa (hegzamer yapı), % 79'lük kısmının ise 156.2 kDa (tetramer veya 2 adet bağlayıcı polipeptid zinciri içeren trimer yapı) moleküler ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca fikosiyanın antimikrobiyel ve antioksidan aktivite açısından incelenmiş, antimikrobiyel etkisinin olmadığı ancak "480 μ M troloks/mg" düzeyinde oldukça yüksek bir antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Şubat 2012, 109 sayfa

Anahtar Kelimeler: Siyanobakteriler, fikosiyanın, stabilite, saflaştırma, karakterizasyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PHYCOCYANIN OBTAINED FROM CYANOBACTERIA

Aylin AKOĞLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI

This study aimed to selection cyanobacteria strain with high phycocyanin yield, enhancing phycocyanin yield of this strain, determination of the stability, purification and characterization of phycocyanin extracted.

The first stage of the study, various cyanobacteria strains were compared in terms of phycocyanin yield and *Anabaena affinis* strain was determined as the most productive strain with amount of 110 mg/g phycocyanin. Production and extraction conditions of this strain were optimized and phycocyanin yield increased from 10.9 % to 14.1 %.

In the second stage of the study to determine the potential use of partially purified phycocyanin in food, effects of factors such as temperature, pH, light on stability phycocyanin were investigated and natural preservatives (sucrose, citric acid, NaCl, CaCl₂) were added to increase the stability. For the same purpose, effect of phycocyanin on organism *Daphnia magna* was investigated to find out whether it has toxic effect on this organism or not. Accordingly food grade phycocyanin protecting the stability at 4°C and pH 6 for 1 month loses stability at higher temperatures and acidic pH. Addition of 1 mg/mL phycocyanin was determined that non-toxic effect to organism *Daphnia magna*.

The third stage of the study by using various purification techniques, pure phycocyanin was obtained at different yield and purity. In the line with the findings, three purification including ammonium sulfate precipitation/dialysis, ultrafiltration and ion exchange chromatography resulted in 6.93-fold increase in phycocyanin purity and purity ratio of 4.02 indicates that analytical grade product can be obtained.

The final stage of the study, molecular weight and structure of pure phycocyanin were determined by using SDS-PAGE and HPLC gel filtration methods, MALDI-TOF mass spectrometry was used to confirm which protein bands belong to phycocyanin. By using UV-VIS and fluorescence spectrophotometry, the highest absorbance and fluorescence were determined as 620 and 646 nm, respectively. Pure phycocyanin obtained from *Anabaena affinis* formed 35.7 kDa monomer consisting α (17.1 kDa) and β (18.6 kDa) sub-units, 21% of the protein is hexamer having 198.0 kDa, 79% is tetramer or trimer structure containing two binding polypeptide chain having 156.2 kDa molecular weight. Phycocyanin was also examined in terms of antimicrobial and antioxidant activity and no antimicrobial activity was detected. But quite high antioxidant activity was determined at 480 μ M trolox / mg phycocyanin.

February 2012, 109 pages

Key words: Cyanobacteria, phycocyanin, stability, purification, characterization

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince beni yönlendiren, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği A.B.D.), tez çalışmam sırasındaki öneri ve katkılarından dolayı tez izleme komitesi üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN (Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği A.B.D.) ve Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK'e, (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği A.B.D.), doktora başlammama vesile olan ve her konuda fikir alışverişinde bulunabildiğim sevgili hocam Doç. Dr. İbrahim ÇAKIR'a (Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği A.B.D.), bana olan güvenini her fırsatta dile getiren ve bana her konuda yol gösteren sevgili hocam Prof. Dr. Kamuran AYHAN'a (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği A.B.D.), çalışmamın saflaştırma ve karakterizasyon aşamasındaki yardımlarından, bilimsel desteğinden ve içtenliğinden dolayı değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü), Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji laboratuvarında çalışmama imkan sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü) ve yine çalışmam sırasında laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Ertan ANLI'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği A.B.D.), toksisite analizleri sırasındaki yardımlarından dolayı Arş. Grv. Şeyda FİKİRDEŞİCİ'ye, (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü) çalışmam sırasında kullandığım suşları temin ettiğim Yrd. Doç Dr. Fatma GÜRBÜZ'e (Aksaray Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu) ve Yrd. Doç Dr. Tülay BAYKAL'a (Ahi Evran Üniversitesi, Biyoloji Bölümü),

İhtiyaç duyduğum her konuda yardıma koşan sevgili arkadaşım Dr. Fadime KIRAN'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü) ve çalışmama gösterdiği ilgi ve destek için sevgili meslektaşım Şebnem KURHAN'a,

Sağladığı yurtiçi doktora bursu ile tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Beni her konuda destekleyen ve cesaretlendiren sevgili anne ve babama, çalışmalarım sırasında gösterdikleri fedakarlık için eşimin anne ve babasına, her zaman yanımda olduğunu bildiğim sevgili eşim İlker AKOĞLU'na ve varlığıyla bana güç veren biricik kızım ADA'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aylin AKOĞLU
Ankara, Şubat 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Siyanobakteriler	3
2.2 Fikobiliproteinler	4
2.3 Fikosiyanin	6
2.3.1 Fikosiyaninin yapısı	6
2.3.2 Fikosiyanin üretimi	9
2.3.3 Fikosiyanin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu	11
2.3.3.1 Fikosiyanin ekstraksiyonu	11
2.3.3.2 Fikosiyanin saflaştırılması	14
2.3.3.3 Fikosiyaninin karakterizasyonu	18
2.3.4 Fikosiyaninin kullanım alanları	20
2.3.4.1 Renklendirici olarak kullanımı	20
2.3.4.2 Floresan prob olarak kullanımı	21
2.3.4.3 Gıda katkısı ve fonksiyonel gıda olarak kullanımı	22
2.3.4.4 Nutrasötikler ve farmasötikler	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24
3.1 Materyal	24
3.2 Yöntem	24
3.2.1 Şuşların üretimi	24
3.2.2 Fikosiyanin miktarının belirlenmesi	24
3.2.3 Fikosiyanin miktarının günlere göre değişiminin belirlenmesi	26
3.2.4 Optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi	26
3.2.5 Optimum tampon çözeltinin belirlenmesi	27
3.2.6 Optimum tampon miktarının belirlenmesi	27
3.2.7 Optimum sonikasyon parametrelerinin belirlenmesi	28
3.2.8 C-PC üretim koşullarının optimizasyonu çalışmaları	28
3.2.8.1 Fikosiyanin üretimi üzerine besiyeri bileşenlerinin etkisi	28
3.2.8.2 Fikosiyanin üretimi üzerine pH'nın etkisi	28
3.2.8.3 Fikosiyanin üretimi üzerine farklı inokülasyon oranlarının etkisi	29
3.2.8.4 Fikosiyanin üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi	29
3.2.8.5 Fikosiyanin üretimi üzerine farklı ışık kaynaklarının etkisi	29
3.2.9 Fikosiyaninin kısmi saflaştırılması	29
3.2.9.1 Amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz	29
3.2.9.2 Kısmi saflaştırılan fikosiyaninin toksisitesinin belirlenmesi	30
3.2.9.3 Kısmi saflaştırılmış örneğin pH, sıcaklık ve ışık stabilitesinin belirlenmesi	31
3.2.9.4 Fikosiyaninin stabilitesine koruyucuların etkisi	31

3.2.9.5 Fikosiyaninin stabilitesine farklı konsantrasyonlardaki sakkarozun etkisi	32
3.2.10 Fikosiyanin saflaştırılması	32
3.2.10.1 Amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz	33
3.2.10.2 Ultrafiltrasyon	33
3.2.10.3 Jel filtrasyon kromatografisi	33
3.2.10.4 İyon değişim kromatografisi	34
3.2.11 Fikosiyaninin karakterizasyonu	34
3.2.11.1 HPLC- Jel filtrasyon kolon ile moleküler ağırlığın belirlenmesi	34
3.2.11.2 SDS-PAGE ile fikosiyanin alt ünitelerinin molekül ağırlıklarının belirlenmesi	35
3.2.11.3 Fikosiyaninin floresan spektrasının belirlenmesi	36
3.2.11.4 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi	36
3.2.11.5 Antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesi	37
3.2.12 MALDI-TOF kütle spektrometresi ile fikosiyaninin tanımlanması	39
3.2.12.1 Protein kümelerinin kesimi ve jel içinde tripsin sindirimi (tripsinizasyon)	39
3.2.12.2 MALDI-TOF kütle spektrometresi için örnek hazırlama ve ölçüm ...	39
3.2.12.3 Peptit kütle verilerinin biyoinformatik analizi ve protein tanımlama .	40
3.2.12 İstatistik analiz	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	42
4.1 Siyanobakteri Suşlarının Fikosiyanin Miktarlarının Karşılaştırılması	42
4.2 Fikosiyanin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu	44
4.2.1 Optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi	45
4.2.2 Optimum sonikasyon parametrelerinin belirlenmesi	47
4.2.3 Optimum ekstraksiyon tamponunun belirlenmesi	48
4.2.4 Optimum ekstraksiyon tamponu miktarının belirlenmesi	49
4.3 Fikosiyanin Üretim Koşullarının Optimizasyonu	50
4.3.1 Besiyeri bileşenlerinin optimizasyonu	50
4.3.2 Fikosiyanin miktarına pH'nın etkisi	53
4.3.3 Fikosiyanin miktarına inokülasyon oranının etkisi	53
4.3.4 Fikosiyanin miktarına sıcaklığın etkisi	54
4.3.5 Fikosiyanin miktarına ışık kaynağının etkisi	55
4.4 Kısmi Olarak Saflaştırılan Fikosiyanin Toksisitesinin ve Stabilitesinin Belirlenmesi	56
4.4.1 Fikosiyaninin toksisitesinin belirlenmesi	57
4.4.2 Fikosiyanin stabilitesinin belirlenmesi	58
4.4.3 Koruyucuların fikosiyanin stabilitesine etkisi	64
4.5 Fikosiyaninin Saflaştırılması	67
4.5.1 Amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz (ASÇD)	68
4.5.2 Ultrafiltrasyon (UF)	69
4.5.3 Jel filtrasyon kromatografisi (JFK)	71
4.5.4 İyon değişim kromatografisi (İDK)	72
4.6 Fikosiyaninin Karakterizasyonu	76
4.6.1 Fikosiyaninin moleküler ağırlığı ve yapısının belirlenmesi	76
4.6.2 Peptit kütle parmak izi (PMF) yöntemi ile fikosiyaninin tanımlanması ...	78
4.6.3 Fikosiyaninin floresan spektrasının belirlenmesi	81
4.6.4 Fikosiyaninin antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesi	82

4.6.5 Fikosiyaninin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi	82
5. SONUÇ	84
KAYNAKLAR	87
EKLER	96
EK 1 <i>Anabaena affinis</i> suşunun optik mikroskop ve floresan mikroskop görüntüleri	97
EK 2 Siyanobakterilerin geliştirilmesi için kullanılan besiyerleri	98
EK 3 SDS PAGE'de kullanılan tamponlar ve çözeltiler	100
EK 4 Saflaştırmada kullanılan kromatografi sistemi	102
EK 5 TSK kolona yüklenen moleküler ağırlık standardının kromatogramından elde edilen grafik.....	103
EK 6 HPLC Jel filtrasyon kolondan elde edilen kromatogram	104
EK 7 SwissProt/UniprotKB veri tabanından elde edilen <i>Anabaena affinis</i> NIES-40 suşuna ait fikosiyanin α ve β alt ünitelerinin peptit dizileri	105
EK 8 Antioksidan aktivite tayini için kullanılan eğriler	106
ÖZGEÇMİŞ	107

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit
APS	Amonyum persülfat
C-PC	Siyanobakteriden elde edilen fikosiyanın
ddH ₂ O	Çift distile su
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Dithiyothreitol
ESI-MS/MS	Elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometrisi
FSB	Fikosiyanobilin
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
kDa	Kilodalton
m/z	Kütle/yük oranı
mA	Miliamper
MALDI-TOF	Matriks ile desteklenmiş lazer desorbsiyon-iyonizasyon uçuş zamanı
mg	Miligram
mM	Milimolar
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
ng	Nanogram
PBS	Fosfat tamponlu tuz
PMF	Peptit kütle parmak izi
RT-HPLC	Ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SPSS	Sosyal bilimler için istatistik paketi
TEAC	Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TEMED	Tetrametilen-diamin
UV-Vis	Mor ötesi-görünür bölge
W	Watt
α	Alfa
β	Beta
μm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Fikobilizomlar içinde fikobiliproteinlerin yerleşimi	5
Şekil 2.2 Fikosiyanobilin yapısı	7
Şekil 2.3 Fikosiyaninin α ve β zincirlerinin yapısı	7
Şekil 2.4 Fikosiyanin monomerinin üç boyutlu yapısı ve şematik şerit gösterimi	8
Şekil 2.5 Fikosiyaninin trimer ve hegzamer yapılarının görünümü	9
Şekil 2.6 Fikosiyanobilin, bilirubin ve fikosiyanorubin yapıları	23
Şekil 4.1 Siyanobakteri suşlarının fikosiyanin miktarlarının günlere göre değişimi..	42
Şekil 4.2 <i>Anabaena affinis</i> suşunun fikosiyanin ve kuru madde miktarı açısından gelişim kurvesi	44
Şekil 4.3 Farklı sonikasyon güçlerinin fikosiyanin miktarı üzerine etkisi	47
Şekil 4.4 Farklı sonikasyon sürelerinin fikosiyanin miktarı üzerine etkisi	48
Şekil 4.5 Biyokütle:tampon oranının fikosiyanin miktarı ve saflığı üzerine etkisi ...	49
Şekil 4.6 NaNO_3 miktarının fikosiyanin üretimi üzerine etkisi	51
Şekil 4.7 İz element karışımı miktarının fikosiyanin üretimi üzerine etkisi	52
Şekil 4.8 CaCl_2 miktarının fikosiyanin üretimi üzerine etkisi	52
Şekil 4.9 Na_2CO_3 miktarının fikosiyanin üretimi üzerine etkisi	52
Şekil 4.10 Besiyerinin farklı pH değerlerinin fikosiyanin miktarı üzerine etkisi	53
Şekil 4.11 Farklı inokülasyon oranlarının fikosiyanin miktarı üzerine etkisi	54
Şekil 4.12 Farklı inokülasyon oranlarının fikosiyanin miktarı üzerine etkisi	54
Şekil 4.13 Farklı ışık kaynaklarının fikosiyanin miktarı üzerine etkisi	55
Şekil 4.14 24 saatlik deney sonrası canlı <i>Daphnia magna</i> organizmasının ve iç organlarının görüntüsü	58
Şekil 4.15 24 saat sonunda farklı pH'larda fikosiyanin stabilitesindeki değişim	58
Şekil 4.16 4°C'de farklı pH'larda 4 aylık depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim	59
Şekil 4.17 25°C'de farklı pH'larda 4 aylık depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim	59
Şekil 4.18 35°C'de farklı pH'larda 1 aylık depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim	60
Şekil 4.19 45°C'de farklı pH'larda 1 aylık depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim	60
Şekil 4.20 4°C'de farklı pH'larda 30 günlük depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim	62
Şekil 4.21 25°C'de farklı pH'larda 30 günlük depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim	62
Şekil 4.22 4°C'de farklı pH'larda ve sürekli ışık altında 30 günlük depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim	63
Şekil 4.23 Fikosiyaninin 260-800 nm aralığındaki spektrumu	63
Şekil 4.24 Farklı koruyucuların 4°C'de 30 günlük depolama sonrası C-PC stabilitesine etkisi	65
Şekil 4.25 Farklı koruyucuların 25°C'de 30 günlük depolama sonrası C-PC stabilitesine etkisi	65
Şekil 4.26 Sakkarozun 4°C'de 45 günlük depolama sonunda fikosiyanin stabilitesine etkisi	66

Şekil 4.27 Sakkarozun 25°C’de 45 günlük depolama sonunda C-PC stabilitesine etkisi	67
Şekil 4.28 Saflaştırma işlemlerinin akış şeması	68
Şekil 4.29 C-PC’nin amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz yöntemi aşamaları	69
Şekil 4.30 Ultrafiltrasyon yöntemi	71
Şekil 4.31 Jel filtrasyon kromatografisi sonrası elde edilen kromatogram	72
Şekil 4.32 İyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen kromatogram	73
Şekil 4.33 Saflaştırma işlemi sırasında elde edilen fraksiyonların spektrumları	74
Şekil 4.34 Saflaştırma sonrası fikosiyaninin SDS-PAGE görüntüsü	77
Şekil 4.35 MALDI-TOF kütle spektrometresinin beş peptit karışımı ile kalibrasyonundan sonra elde edilen beş peptit m/z değerleri	79
Şekil 4.36 α ünitesinden elde edilen peptitlerin 800-3000 m/z değerleri arasındaki MALDI-TOF spektrumu	79
Şekil 4.37 β ünitesinden elde edilen peptitlerin 800-3000 m/z değerleri arasındaki MALDI-TOF spektrumu	79
Şekil 4.38 Fikosiyaninin absorban ve floresan spektrumu	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, gelişme ortamları ve uygun gelişim sıcaklıkları	38
Çizelge 3.2 MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonunda kullanılan peptitlerin kütleleri	40
Çizelge 4.1 Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen fikosiyanın miktarı ve saflığı	46
Çizelge 4.2 Farklı tamponlar ile elde edilen fikosiyanın miktarı ve saflığı	49
Çizelge 4.3 Optimizasyon sonrası fikosiyanın veriminin karşılaştırılması	57
Çizelge 4.4 Ultrafiltrasyon yönteminde farklı santrifüj sürelerin fikosiyanın verimine ve saflığına etkisi	70
Çizelge 4.5 Fikosiyanın saflaştırılmasında her bir saflaştırma basamağı ve işleminden elde edilen saflık oranı, verim ve saflık faktörü değerleri	74
Çizelge 4.6 MALDI-TOF kütle spektrometresinden elde edilen α ve β üniteleri ait peptit kütle değerlerinin SwissProt/UniprotKB veri tabanı ile karşılaştırılması	81

1. GİRİŞ

Siyanobakterilerden elde edilen fikosiyanın mavi renkli, kokusuz, toksik olmayan, suda çözünebilen, güçlü floresan özelliğe sahip doğal bir renk maddesidir. Gıda boyası olarak şeker, süt ürünleri, jöle, meyveli içecek vb. üretiminde renklendirici olarak kullanılmaktadır. Günümüzde gıda sanayisinde özellikle içecek ve şekerleme sektöründe yapay mavi renkli boyaların kullanımı kısıtlanmakta ve doğal mavi renkli boyaların kullanımına olan ilgi giderek artmaktadır. Fikosiyanın, gıda sanayisi dışında, ilaç ve kozmetik sanayilerinde de renklendirici olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Bu bağlamda siyanobakteriden elde edilen ve doğal mavi renkli bir pigment olan fikosiyanın üretimi dikkat çekmektedir. Doğal renk maddesi özelliğinin dışında sahip olduğu floresan özellikten dolayı mikroskopi, sitometri, bağışıklık, doku kimyası çalışmalarında floresan prob olarak kullanılmakta, ayrıca antioksidan ve radikal uzaklaştırıcı etkisinden dolayı nutrasötik¹ ve farmasötik olarak kullanılma potansiyeli de bulunmaktadır. Tüm bu üstün özelliklerinden dolayı fikosiyanın geniş bir kullanım alanı bulmakta ve son 10-15 yıldır fikosiyanın kullanımına ve üretimine olan ilgi giderek artmaktadır.

Günümüzde fikosiyanın ekstraksiyonunda ve saflaştırılmasında temel sorun, verimin ve saflığın düşük olması olarak görülmektedir. Ayrıca çok az siyanobakteri suşu yüksek verimde fikosiyanın üretebildiği için, fikosiyanın üretiminde temel mikroorganizma olan ve bir siyanobakteri türü olan *Spirulina*'ya alternatif mikroorganizma tespiti, araştırmacıları yeni ve verimli suş elde etmeye yöneltmektedir. Yapılan çalışmalarda fikosiyanın saflaştırılması için çeşitli yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen saflaştırma işlemin uzun vakit alması, pahalı olması, yüksek hacimlerde çalışılmaması ve saflık oranının düşük kalması nedenleriyle araştırmalar fikosiyanın eldesi ve saflaştırılması için yeni yöntemler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bugün gıdaya uygun saflıkta olan fikosiyanın mg fiyatı 0.13 dolar iken analitik saflıktaki fikosiyanın mg fiyatı 15 dolar olarak bilinmektedir. Bu durum araştırmacıları daha az maliyette, daha kısa

¹ Nutrasötik, hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde sağlığa yararları bilimsel olarak ispatlanmış, toksik olmayan, herhangi bir gıda ekstresi desteğini ifade eder (Başer 2002).

sürede, daha yüksek verimde ve saflıkta fikosiyenin elde etmeye teşvik etmektedir.

Bu noktadan hareketle fikosiyenin siyanobakterilerden etkili ve verimli bir şekilde elde edilmesi bilimsel ve ticari açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle uygun suş seçimi, seçimi yapılan suşun gelişim koşullarında yapılacak optimizasyon çalışması ile fikosiyenin veriminin artırılması, uygun ekstraksiyon yöntemi ve koşullarının belirlenmesi, ekstrakte edilen örneğin uygun koşullarda saflaştırılması ve saflaştırılan örneğin karakterize edilmesi bu çalışmanın amaçları arasında yer almaktadır.

Çalışmada, *Anabaena affinis*, *Spirulina maxima*, *Synechococcus* sp., *Phormidium* sp. ve *Oscillatoria* sp. suşları fikosiyenin verimleri açısından karşılaştırılmış ve en yüksek fikosiyenin veriminin elde edildiği suşun gelişim koşullarında optimizasyon yaparak fikosiyenin verimi artırılmıştır. Yine en yüksek fikosiyenin verimi ve saflığını elde edebilmek için sonikasyon, dondurma-çözme, lizozim uygulaması, homojenizasyon gibi çeşitli ekstraksiyon yöntemleri denenmiş ve en yüksek verim ve saflığın elde edildiği ekstraksiyon yönteminde, ekstraksiyon tamponu, süresi ve miktarı gibi parametrelerde değişiklikler yapılarak optimum ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. Gıdaya uygun saflıkta elde edilen fikosiyenin gıdalarda kullanım potansiyelini belirlemek amacıyla sıcaklık, pH, ışık gibi faktörlerin fikosiyenin stabilitesi üzerine etkisi araştırılmış ve doğal koruyucular (sakkaroz, sitrik asit, NaCl, CaCl₂) ilave edilerek fikosiyenin stabilitesi artırılmaya çalışılmıştır. Aynı amaçla fikosiyenin *Daphnia magna* organizması (su piresi) üzerinde toksik etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Ekstrakte edilen fikosiyenin örneğini saflaştırmak amacıyla amonyum sülfatla çöktürme, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri birbiri ile kombine edilerek 4 farklı saflaştırma işlemi oluşturulmuş, en uygun verim ve saflığın elde edildiği saflaştırma işlemi belirlenmiştir. Son olarak saf fikosiyenin moleküler ağırlığı, yapısı, antioksidan aktivitesi ve antimikrobiyel aktivitesi gibi bir takım özellikleri belirlenmiş ve MALDI-TOF kütle spektrometresi yöntemi ile de elde edilen fikosiyenin tanımlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Siyanobakteriler

Siyanobakteriler, anaerobik metabolizmaya sahip, fototrof mikroorganizmalardır. Yaşayabilmeleri için su, CO₂, inorganik bileşikler ve ışığa ihtiyaç duyarlar. Enerji mekanizmalarının temelini fotosentez oluşturmaktadır. Ancak bazı türleri hiç fotosentez yapmaksızın kemoheterotrof olarak karanlıkta uzun süre yaşayabilmektedir (Mur 1999).

Siyanobakteriler, genellikle serbest olarak hem tatlı sularda hem de deniz sularında yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Bunun yanı sıra toprakta ve karasal ortamlarda da yaygın olarak bulunmaktadır. Düşük ve yüksek sıcaklıkları tolere edebildiklerinden sıcak ve soğuk su kaynaklarında da yaşayabilmektedirler. Ultraviyole ışığı absorbe eden kılıf pigmentlerinin varlığı sayesinde uygun olmayan ortam koşullarına uyum göstermektedirler (Mur 1999). Siyanobakteriler N₂ fikse etme yetenekleri sayesinde besince fakir ortamlarda bile gelişebilmekte ve böylece toprağın verimliliğini artırabilmektedirler (Tunail 2009).

Siyanobakteriler 0.5-100 µm genişliğinde Gram negatif mikroorganizmalardır. Gerçek bir prokaryotik hücreye sahip olmakla birlikte ökaryotlara benzer şekilde fotosentez yapma yeteneğine sahiptirler. Fotosentez sistemi fotosistem I ve fotosistem II olmak üzere iki fotoreaksiyon merkezinden oluşmakta ve bu sistemin tüm elemanları tilakoid membranda yer almaktadır. Tilakoid membranda iki grup anten pigmentleri vardır. Klorofil a ve karotenoidler birinci grubu oluştururken, fikobilizomlar içinde yer alan fikobiliproteinler ikinci grupta yer almaktadır. Siyanobakteri hücreleri pilluslara sahiptir ve birçok siyanobakteri türü ile filamentli siyanobakterilerin bir bölümü kayarak hareket eder. Flagellaları bulunmayan grupta tek hücreli olup gaz vakuelleri içerenler yüzerek hareket ederler (Tunail 2009).

Siyanobakteriler fikobiliproteinler, karotenoidler, yağ asitleri gibi ticari açıdan önemli birçok ürünün kaynağını oluşturmakta ve bu konu ile ilgili biyoteknolojik çalışmalar

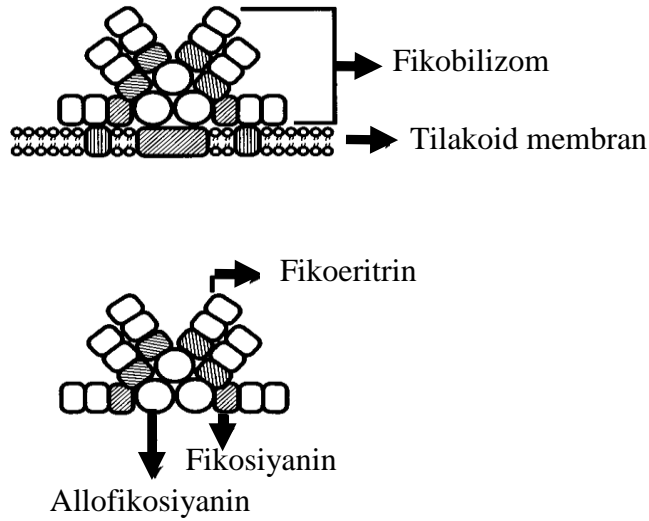
giderek artmaktadır. Siyanobakteriler gıda, yem, ilaç, gübre, yakıt, pigment ve su ürünleri sanayisindeki potansiyel kullanımı ve vitamin, toksin, enzim gibi ikincil metabolit üretimi ile son zamanlarda dünya çapında ilgi çekmektedir. Şili, Peru, Meksika ve Filipinler’de *Nostoc* ve *Anabaena*’nın bazı suşları insan gıdası olarak tüketilmektedir. *Spirulina* ise yüksek besin içeriği nedeniyle gıda katkısı (takviyesi) olarak kullanılmaktadır. Ancak çok az siyanobakteri suşu karakterize edilmiştir veya ticari olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle yüksek değerli ürünler elde edebilmek ve bu ürünlerin sentezini artırabilmek için yeni siyanobakteri suşlarının tanımlanması ve özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir (Moreno vd. 1998, Thajuddin ve Subramanian 2005).

2.2 Fikobiliproteinler

Fikobiliproteinler, siyanobakterilerde, kırmızı alglerde, biflegellat (iki kamçılı, cryptomonads) ve siyanellerde (endosimbiyotik plastid) bulunan ışığın absorblanmasında görevli anten pigmentleridir (Glazer 1994). Birinci grup anten pigmentleri (klorofil *a*, karotenoid) absorbe edilen ışık enerjisini fotosistem I’e gönderirken, ikinci grup anten pigmentleri olan fikobiliproteinler de aynı şekilde absorbe ettikleri ışık enerjisini fotosistem II’ye transfer eder. Pigment proteinler genellikle 550-650 nm dalga uzunluğundaki ışığı tutar (Tunail 2009). Absorbsiyon özelliklerine göre; fikoeritrinler (C-PE, λ_{mak} . 540–570 nm), fikosiyanınlar (C-PC, λ_{mak} . 615-640 nm) ve allofikosiyanınlar (C-APC λ_{mak} . 650-655 nm) olmak üzere 3 ana sınıfa ayrılmışlardır (Beramojo vd. 2006). Fikobiliproteinlerin % 75’ini fikosiyanınlar, % 12’sini allofikosiyanınlar, % 12’sini de fikoeritrinler ve pigmentsiz polipeptitler oluşturur (Tunail 2009).

Fikobiliproteinler siyanobakterilerde ve kırmızı alglerde tilakoid membranının stoplazmaya dönük kısmında yerleşik özel tilakoid yapılar olan ve çok fazla sayıda bulunan fikobilizomlar içinde çok moleküllü kompleksler şeklinde yer alırlar. Fikobiliproteinlerde ışık enerjisi, yüksek enerji düzeyinden düşük enerji düzeyine aktarılmakta ve buna bağlı olarak fikobiliproteinler enerji düzeylerine göre

fikobilizomlar üzerinde sıralanmaktadır (Şekil 2.1). Buna göre ışık enerjisi, yüksek enerjili fikoeritrobilinden, önce fikosiyanine ardından en düşük enerji seviyesindeki allofikosiyanine aktarılmaktadır. Allofikosiyaninden sonra enerji ya fotosistem II'ye ya da nadiren fotosistem I'e aktarılmaktadır (Maccoll 1998).



Şekil 2.1 Fikobilizomlar içinde fikobiliproteinlerin yerleşimi (MacColl 1998)

Fikobiliproteinler, fikosiyanabilin, fikoeritrobilin gibi protein olmayan bileşiklerin (veya kromofor yapıların) polipeptit zincirine bağlanması sonucu meydana gelen oligomerik proteinlerdir. Sahip oldukları fikobilin grubuna göre isimlendirilmektedirler. Buna göre fikoeritrobilin kromoforu içeren fikoeritrobilin, fikosiyanobilin kromoforu içerenler de fikosiyanin ve allofikosiyanin olarak adlandırılmışlardır. Fikobiliproteinlerin en yüksek absorpsiyon dereceleri kromofordaki konjuge çift bağların çeşitliliğine bağlıdır. Örneğin 8 konjuge çift bağ içeren fikosiyanobilin (610-620 nm), 6 konjuge çift bağ içeren fikoeritrobiline (545-565 nm) göre daha düşük enerji seviyelerinde ışığı absorblar. Fikobiliproteinler metal iyonları içermemekte ancak metal iyonları ile kompleks oluşturabilmektedir (Maccoll 1998). Fikobilizomlarda fikobiliproteinlere ilave olarak bilin prostetik grubu içermeyen polipeptitler de yer alır. “Bağlayıcı” olarak adlandırılan bu polipeptit zinciri fikobiliproteinlerin disk yapısının oluşmasından sorumludur (Yu ve Glazer 1982).

Fikobiliprotein üretiminden sorumlu temel mikroorganizmalar bir siyanobakteri türü olan *Spirulina (Arthrospira)* ve kırmızı bir alg türü olan *Porphyridium*'dur (Román vd. 2002). Azot ve karbon kaynağı başta olmak üzere uygulanan gelişme koşullarının özellikleri fikobiliprotein içeriğini belirlemektedir (Sekar ve Chandramohan 2008).

Siyanobakterilerden elde edilen fikobiliproteinler ticari açıdan büyük öneme sahiptir ve çok çeşitli kullanım alanları vardır. Başlıca kullanım alanları doğal renklendiriciler olmakla birlikte çeşitli araştırmalar nutrasötik ve farmasötik uygulamalarda kullanım potansiyelleri olduğunu göstermektedir. Renklendirici olarak kullanımlarının dışında floresan özelliklerinden dolayı klinik ve immünoassay araştırma laboratuvarlarında da geniş bir kullanım potansiyeline sahiptirler. Fikobiliproteinlerin mg fiyatı 3-25 dolar arasında değişmekte; antikor, reseptör veya başka biyolojik moleküllerle bağ yapmış şekilde işaretleyici olarak kullanılması halinde mg fiyatı 1500 dolara kadar çıkmaktadır (Spolaore vd. 2006). Bugüne kadar fikobiliproteinlerin üretimiyle ilgili 55 adet patent, ilaç, gıda ve diğer alanlardaki uygulamaları ile ilgili 30 adet patent ve floresan özellikleri kullanılarak yapılan uygulamalar ile ilgili 236 adet patent olduğu tespit edilmiştir. En az 11 şirket fikobiliproteinleri, fikobiliprotein türevlerini ve uygulamalarını üretmekte ve satmaktadır (Sekar ve Chandramohan 2008).

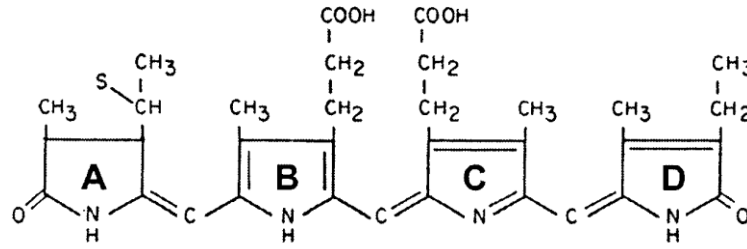
2.3 Fikosiyanin

2.3.1 Fikosiyaninin yapısı

Siyanobakterilerde yüksek miktarda bulunan ve ekonomik anlamda en önemli fikobiliprotein çeşidi mavi renkli fikosiyanindir. Fikosiyanin protoplazma içinde hücre kuru ağırlığının yaklaşık % 20'sine varabilen oranlarda bulunabilir. Hücre içerisinde yeşil renkli klorofil *a* ile mavi renkli fikosiyanin pigmentinin baskınlığı nedeni ile hücreler karakteristik mavi-yeşil renkte görülmektedir.

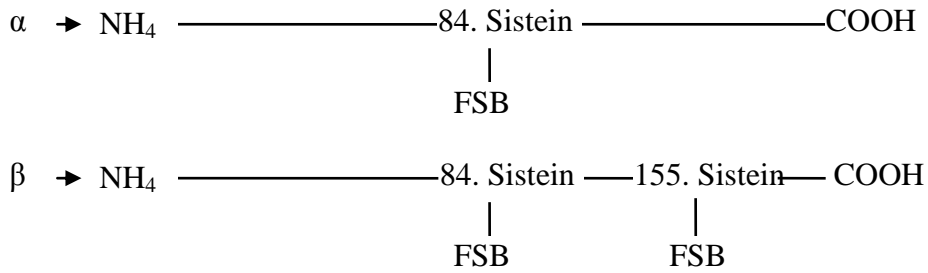
Fikosiyanin sahip olduğu fikosiyanobilin (FSB) kromoforundan dolayı bu ismi almıştır. Proteinin prostetik grubu olarak kabul edilen fikosiyanobilin dört pirol halkasının

oluşturduğu doğrusal tetrapireol yapısı sergilemektedir (Şekil 2.2). Bu yapı farklı bölgelerden sistein aminoasitine bağlanma yaparak fikosiyanın yapısını oluşturmaktadır. Fikosiyanobilinin kimyasal yapısı bir safra pigmenti olan ve hücre içinde güçlü radikal uzaklaştırıcı etkiye sahip olan bilirubin ile benzerlik göstermektedir ve bu bulgu fikosiyanobilinlerin de bilirubin gibi radikal uzaklaştırıcı etkileri olduğunu desteklemektedir (Benedetti vd. 2006).



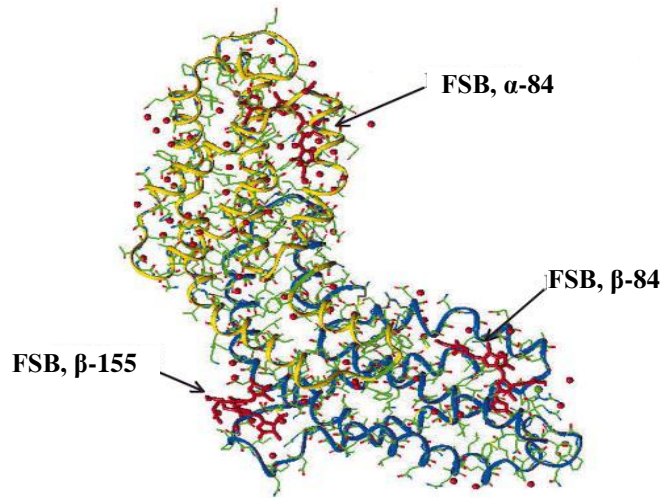
Şekil 2.2 Fikosiyanobilin yapısı (Maccoll 1998)

Fikosiyanın α ve β olmak üzere birbirleriyle nispeten homolog iki alt birimden oluşmaktadır. α zincirinde, fikosiyanobilin 84. sistein aminoasitine; β zincirinde ise iki adet fikosiyanobilin 84. ve 155. sistein aminoasitlerine bağlanmıştır (Şekil 2.3) (MacColl 1998, Stec vd. 1999, Adir vd. 2001).



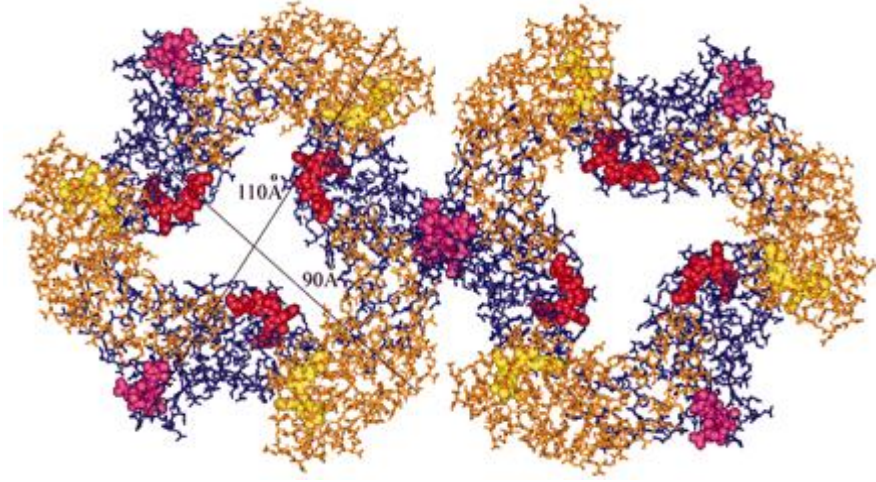
Şekil 2.3 Fikosiyanın α ve β zincirlerinin yapısı (Maccoll 1998)

Fikosiyanin monomer yapısında olabildiği gibi, kendi içinde agregatlar yaparak trimer yapısında da olabilmekte hatta disk şeklini alan hegzamer yapısında da bulunabilmektedir (Stec vd. 1999, Contreras-Martel vd. 2007). Şekil 2.4'te fikosiyanin monomerinin üç boyutlu yapısı, Şekil 2.5'te fikosiyaninin trimer ve hegzamer yapısı görülmektedir. Fikosiyaninlerde α -84 ve β -84 kromoforları trimerik disk yapısının merkezinde yer alırken, β -155 kromoforu trimerik disk yapısının uç kısmında yer almaktadır (Stec vd. 1999). Fikosiyaninin α ve β zincirleri benzer tersiyer yapıya sahiptirler ve oluşturdukları bu yapı ile globin protein yapısına benzerlik göstermektedirler (Schirmer vd. 1985). Tüm siyanobakterilerden ve kırmızı alglerden elde edilen fikosiyanin yapısındaki aminoasit dizilimi büyük benzerlikler göstermektedir (Stec vd. 1999, Adir vd. 2001, Contreras-Martel vd. 2007).



Şekil 2.4 Fikosiyanin monomerinin üç boyutlu yapısı ve şematik şerit gösterimi (Adir vd. 2001)

Sarı şerit, α alt ünitesini; mavi şerit β alt ünitesini, kırmızı çubuklar, fikosiyanobilin kofaktörünü; kırmızı küreler su molekülünü simgelemektedir.



Şekil 2.5 Fikosiyaninin trimer ve hegzamer yapılarının görünümü (Adir ve Lerner 2003).

Turuncu ve mavi renkler sırasıyla α ve β alt ünitelerini; sarı, kırmızı ve mor renkler sırasıyla $\alpha 84$, $\beta 84$, ve $\beta 155$ fikosiyanolin kofaktörleri göstermektedir.

2.3.2 Fikosiyanin üretimi

C-PC ticari olarak fototrofik bir siyanobakteri türü olan *Arthrospira platensis* (syn. *Spirulina platensis*)’ten açık hava koşullarında üretilmektedir. *S. platensis*, Pasifik Okyanusu’nun etrafındaki tropikal ve subtropikal bölgelerdeki su kanallarında ve açık havuzlarda baskın olarak gelişebilen bir türdür. *S. platensis* alkali koşulları tolere edebilir ve pH 10.5’in üstündeki değerlerde gelişebilir. *S. platensis* ortamda diğer kontaminant mikroorganizmalar olmasına rağmen açık havada gelişebilen birkaç fototrofik mikroorganizma türünden biridir. Tüm bu özelliklerinin yanı sıra kolay elde edilebilirliği de göz önüne alındığında C-PC üretimi için başlıca siyanobakteri türü olarak kabul edilmiştir. *S. platensis*’in dünyadaki üretimi 1980 yılından beri artmaktadır. Dünyada kuru ağırlık olarak yıllık 3000 tonun üzerinde üretilen *S. platensis*, sağlıklı gıda üretiminde ve hayvan yemi katkısı olarak kullanılmaktadır (Eriksen 2008).

Biyokütle verimliliği ışık varlığına ve kullanılan ışık enerjisinin etkisine göre belirlenir. Açık üretimlerde sıvı derinliği 10-30 cm’den az değildir ve bu nedenle sıvı faz çarklar vasıtasıyla karıştırılır ve sirkülasyon sağlanır. Aksi takdirde ışık penetrasyonu sadece

yüzeyde olacağından dipte kalan hücreler gelişim sürelerinin çoğunu karanlıkta geçirecek ve verim sıfıra düşecektir. Diğer taraftan yüzeyde kalan hücreler aşırı ışığa maruz kalacaklarından ışık inhibisyonu ve fotodegradasyonu gerçekleştirebilmektedir. Fototrofik üretimlerde, kültür derinliğinin azaltıldığı, hücre yoğunluğunun artırıldığı kapalı fotobiyoreaktörlerde yapılan üretim ile *S. platensis* verimi artırılabilir. Kapalı biyoreaktörlerde yapılan üretimden elde edilen hacimsel verimin açık havada yapılan üretimden elde edilen verime göre 20 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Bu artış kapalı biyoreaktörlerde sıcaklığın kontrollü şekilde sağlanması ve üretimi yapılan kültürün saflığının korunması ile açıklanmaktadır. Diğer taraftan şimdiye kadar yapılan kapalı biyoreaktör üretimlerinde geniş ölçekte *S. platensis* üretmek ve dolayısıyla ölçek büyütmek mümkün olmamıştır (Eriksen 2008).

Mikroalg ve siyanobakteri kültürlerindeki fikosiyanın verimliliği ise biyokütle verimliliği ve biyokütledeki C-PC içeriği ile belirlenmektedir. Açık havada gerçekleştirilen bazı çalışmalarda *Spirulina platensis* ve *Anabaena* sp.'nin kuru biyokütle verimi ve C-PC miktarı sırasıyla 14.0–23.5 ve 0.85–1.32 g/m² gün olarak bulunmuştur (Jiménez vd. 2003, Moreno vd. 2003). Son zamanlarda yapılan çalışmalar fikosiyanın üretimi açısından birçok siyanobakteri türünün (*Spirulina maxima*, *Spirulina fusiformis*, *Anabaena* sp., *Synechococcus* sp., *Aphanothece halophytica*, *Nostoc* sp., *Oscillatoria quadripunctulata*, *Phormidium ceylanicum*) *S. platensis*'e alternatif olabileceğini göstermiştir.

S. platensis fototrofik gelişiminin yanı sıra miksotrofik olarak da gelişebilmektedir. Fototrofik üretim ile karşılaştırıldığında miksotrofik üretimde daha hızlı bir gelişim ve daha fazla miktarda biyokütle konsantrasyonu sağlanmaktadır. Geri beslemeli üretimde glikoz beslemesinin son biyokütle konsantrasyonunu 10 g/L'nin üzerine çıkardığı bildirilmiştir (Chen ve Zhang 1997). Miksotrofik üretimin; yüksek biyokütle verimi, yüksek hücre konsantrasyonları ile çalışılabilmesi, optimum üretim koşullarının kolaylıkla sağlanabilmesi gibi avantajlarının yanında, daha hızlı gelişim gösterebilen mikroorganizmalarla kontaminasyon gibi bir dezavantajı da bulunmaktadır. *S. platensis* organik karbon kaynağı için ortamda daha hızlı gelişim gösterebilen diğer mikroorganizmalarla mücadelede edemeyeceği ve nispeten yavaş bir gelişim

göstereceği için mikсотrofik üretimin kapalı alanlarda (reaktör) ve steril koşullarda gerçekleşmesi ile bu sorunun önüne geçilebilmektedir (Chojnacka ve Zielińska 2011). Kapalı alanlarda mikсотrofik olarak üretilen C-PC miktarını açık alanda fototrofik olarak üretilen C-PC miktarından daha yüksektir. Bunun nedeni ortama ilave edilen glikoz etkisinden ziyade açık alanda gerçekleşen fototrofik üretimlerdeki ışık yoğunluğunun yetersizliğidir (Eriksen 2008).

Çoğu *Spirulina* türü karanlıkta heterotrofik olarak da gelişebilmektedir. Ancak gelişme oranı ve pigment içeriği çok düşük olduğundan *S. platensis*'ten heterotrofik olarak fikosiyanın eldesi uygulanabilir değildir. Heterotrofik C-PC üretiminde *Spirulina*'ya alternatif olarak kırmızı alg türü olan *Galdieria sulphuraria* kullanılmaktadır (Sloth vd. 2006, Eriksen 2008).

Siyanobakterilerin gelişimini etkileyen başlıca faktörler; ışık, sıcaklık, besiyeri, havalandırma, pH, CO₂ gereksinimi ve karanlık-aydınlık periyodunun süresidir (Parmar vd. 2011). Bunların arasında ışık ve sıcaklık fototrofik üretimlerde biyokütle verimini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Işığın hem parlaklığı hem de spektral dağılımı kısa süreli, günlük ya da mevsimsel olarak değişebilmektedir ve bu nedenle ışık, verimi etkileyen en önemli faktör haline gelmektedir (Madhayastha ve Vatsala 2007). Yüksek miktarda fikosiyanın üretebilen siyanobakteri sayısı az olduğundan mevcut suşların gelişim koşullarında bir takım değişiklikler yaparak fikosiyanın verimini artırma yoluna gidilmektedir (Singh vd. 2009).

2.3.3 Fikosiyanın ekstraksiyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu

2.3.3.1 Fikosiyanın ekstraksiyonu

Ticari açıdan son derece önemli olduğu bilinen fikosiyaninden faydalanabilmek için bu maddeyi fikobilizomlardan uygun şekilde ekstrakte etmek ve saflaştırmak gerekmektedir (Sekar ve Chandramohan 2008). Siyanobakterilerden fikobiliproteinlerin ekstraksiyonu hücre duvarının aşırı dayanıklı olması nedeniyle oldukça zordur (Stewart

ve Farmer 1984). Fikobiliproteinlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için çok çeşitli teknikler denenmiş olsa da henüz standart bir teknik belirlenmemiştir. Bir organizma grubu için iyi sonuç veren bir yöntem başka bir organizma için uygun bir yöntem olmayabilir (Ranjitha ve Kaushik 2005). Kapsamlı bir ekstraksiyon için, hızlı ve etkili bir ayırım sağlanmalı ve açığa çıkan pigmentler ortamdan kolayca ayrılabilmelidir (Stewart ve Farmer 1984). Fikobiliproteinlerin ekstraksiyon ve saflaştırmadaki zorlukları nedeniyle pigmentler oldukça pahalıdır ve bu nedenle bu pigmentleri saf olarak elde etmek ilgi çeken bir çalışma alanıdır (Reis vd. 1998).

Fikosiyenin hem kuru hem de ıslak biyokütleden ekstrakte edilebilmektedir. Kuru biyokütleden ekstraksiyon yönteminde hücre kültürü farklı sıcaklıklarda ve farklı kurutma yöntemleri ile kurutulmakta ve çeşitli tamponlarla çözündürülerek C-PC açığa çıkartılmaktadır (Doke 2005, Oliveira vd. 2008). Kuru biyokütleden fikosiyenin ekstraksiyonunda yüksek sıcaklık uygulaması fikosiyenin kaybına neden olmakta, bu nedenle kurutma işlemi düşük sıcaklıklarda yapılmaktadır (Eriksen 2008). Ancak, genel anlamda, kuru biyokütleden yapılan ekstraksiyon verim ve saflığının düşük olması nedeniyle tercih edilmemektedir. Sarada vd. (1999) yapmış oldukları fikosiyenin ekstraksiyon çalışmalarında, kurutulmuş *Spirulina* sp.'nin yaklaşık % 50 oranında fikosiyenin kaybına uğradığını, bu yüzden fikosiyenin ekstraksiyonunda taze biyokütle kullanımının daha uygun olduğunu bildirmişlerdir. Kurutma genelde biyokütlenin uzun süre depolanabilmesi için tercih edilen bir yöntemdir. En çok kullanılan kurutma yöntemleri püskürterek kurutma, dondurarak kurutma ve güneşte kurutmadır. Bu yöntemler arasında dondurarak kurutma ürünün duyuşal, fizikokimyasal ve besinsel özelliklerinde en düşük kayba neden olduğundan en çok tercih edilen kurutma yöntemidir (Oliviera vd. 2008).

Islak biyokütleden C-PC ekstraksiyonu için fiziksel ve kimyasal birçok yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerden bazıları; dondurma-çözme (-25°C , -18°C veya sıvı azotta dondurma, 4°C veya 30°C 'de çözme) (Abalde vd. 1998, Zhang ve Chen 1999, Minkova vd. 2003, Doke 2005, Soni vd. 2006), homojenizasyon (Boussiba ve Richmond 1979, Abalde vd. 1998, Doke 2005, Schmidt vd. 2005), yüksek basınç uygulaması (Patil vd. 2006, Patil ve Raghavarao 2007), sonikasyon (Abalde vd. 1998),

asit uygulaması (Sarada vd. 1999), lizozim uygulaması (Boussiba ve Richmond 1979) ve *Klebsiella pneumonia* ile ekstraksiyon (Zhu vd. 2007) yöntemleridir. Tüm bu yöntemlerin dışında süper kritik karbondioksit tekniği üzerinde yapılan çalışmalarla siyanobakterilerden renk maddelerinin ekstraksiyonunda gelişmeler sağlandığı ifade edilmiştir (Valderrama vd. 2003, Herrero vd. 2006, Macías-Sánchez vd. 2007). Viskari ve Colyer (2003), ise azot kavitasyon yöntemi ile etkili bir şekilde fikobiliprotein ekstraksiyonu yapılabileceğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar en fazla fikosiyanın verimini elde edebilmek için çeşitli yöntemleri karşılaştırarak, çalıştıkları suşa en uygun ekstraksiyon yöntemini belirlemeye çalışmışlardır. Bunun için Abalde vd. (1998), sonikasyon, sıvı azotta dondurma/4°C'de çözme ve -21°C'de dondurma/4°C'de çözme yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında *Synechococcus* sp.'den fikosiyanın ekstraksiyonunda -21°C'de dondurma/4°C'de çözme yönteminin 13.42 µg/mL fikosiyanın miktarı ile en etkili yöntem olduğunu tespit etmiştir. Soni vd. (2006), *Oscillatoria quadripunctulata* suşundan fikosiyanın ekstraksiyonunda sonikasyon, lizozim, sakkaroz ile ozmoz ve dondurma/çözme yöntemlerini karşılaştırmış, ozmoz ve dondurma/çözme yöntemlerinin benzer sonuçlar gösterdiğini ancak ozmoz yöntemi ile ortama kontaminant proteinlerin karışma riskinin fazla olduğunu, sonikasyon yönteminde ise proteinde renk kaybı gözlemlendiğini ve tüm bu nedenlerden dolayı optimum ekstraksiyon yönteminin dondurma/çözme olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada en etkili dondurma/çözme sıcaklığını -25°C/4°C olarak belirlemişlerdir. Zhu vd. (2007), *Spirulina platensis*'ten fikosiyanın ekstraksiyonu için *Klebsiella pneumoniae* suşunu kullanmış ve bu yöntemin % 91 ekstraksiyon verimi ile lizozim, dondurma/çözme, sonikasyon ve cam boncukla öğütme yöntemlerine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

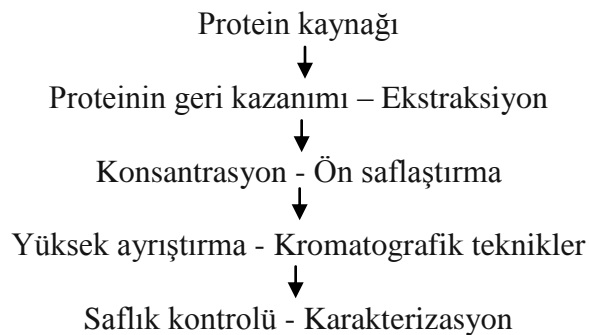
Genel olarak her yöntemin kendine göre avantaj ve dezantajları vardır ve bu nedenle ekstraksiyon sırasında harcanan süre, maliyet, elde edilen verim ve saflık gibi faktörler de dikkate alınarak çalışılan suşa ait en uygun ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi gerekmektedir. Endüstriyel açıdan düşünüldüğünde seçilen ekstraksiyon yönteminin ölçek büyütme uygun ve ekonomik olması gerekmektedir. Ancak fikosiyanın ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu fikosiyanınin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve

karakterizasyonu üzerine yoğunlaşmaktadır. Moraes vd. (2010), faktöriyel dizayn yöntemi ile ölçek büyütmeye olanak sağlayacak ekstraksiyon yöntemi çalışması yapmışlardır. Bunun dışında literatürde ölçek büyütme ve ekonomik kullanım ile ilgili pek az çalışmaya rastlanmaktadır.

2.3.3.2 Fikosiyanin saflaştırılması

Bir proteinin saflaştırma stratejisinde bir seri ayırma metodu ve adımı yer alır. Her bir protein için saflaştırma işlemi, ilgili proteine özgüdür. Protein saflaştırılmasında göz önünde bulundurulması gereken ana kıstaslar; saflık, verim ve maliyettir. Saflık, işleme başlamadan önce proteinin kullanılacağı yere göre hesaplanır; verim, geri kazanılan toplam protein miktarı ile ölçülür; maliyet ise, kullanılan yöntem ve materyallerin maliyeti ve işlemler sırasında harcanan zamanla ilişkilidir. Gerekli protein miktarı ve saflık düzeyi proteinin kullanım amacına bağlıdır. Yapı, kompozisyon veya aminoasit dizisi analiz edilecekse mümkün mertebe saf ve homojen örneğe; endüstriyel kullanım amacıyla protein hazırlanacaksa yüksek miktarda, kararlı, düşük maliyetli, saflık oranı yüksek olmayan örneğe ihtiyaç vardır. Proteinlerin saflaştırılmasında bugün kullanılan yöntemler oldukça gelişmiştir. Saflaştırmada kullanılan yöntemlerden bir veya birkaçı arka arkaya kullanılarak protein saf halde veya safa yakın bir şekilde elde edilmektedir. Elde edilecek saf protein miktarı saflaştırma adımlarının toplam verimine bağlıdır. Adım sayısı verim ile ters, saflık derecesi ile doğru orantılıdır. En az saflaştırma adımı ile amaca uygun saflıkta protein preparatı hazırlamak çok önemlidir (Zihnioğlu 2007).

Protein saflaştırılmasında genel yaklaşım şu şekildedir (Zihnioğlu 2007),



Siyanobakterilerden C-PC saflaştırılması için amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz, ultrafiltrasyon, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, hidroksiapatit kromatografisi, genişletilmiş yataklı adsorbsiyon kromatografisi (EBAC) gibi birçok kromatografik teknik ve bu tekniklerin birbiri ile kombinasyonları denenmiştir (Reis vd. 1998, Bermejo vd. 2003, Minkova vd. 2003, Santiago-Santos vd. 2004, Soni vd. 2006, Chen vd. 2006). Bu yöntemlerin temel sınırlayıcı unsurları; saflaştırma işleminin uzun vakit alması, pahalı olması, yüksek hacimlerde çalışılmaması ve saflık oranının düşük olmasıdır (Niu vd. 2007). İşte tüm bu nedenlerden dolayı araştırmacılar fikosiyanın eldesi ve saflaştırılması için yeni ve ucuz yöntemler üzerinde yoğunlaşmışlardır (Patel vd. 2005, Singh vd. 2009). Saflaştırma işlemi sırasında fikosiyanın saflığı 620 nm'deki absorbans değerinin 280 nm'deki absorbans değerine oranı (A_{620}/A_{280}) ile tespit edilmektedir. Elde edilen bu saflık oranına göre fikosiyanın kullanım alanı belirlenmektedir. Fikosiyanın, saflık oranı 0.7 ve üstünde ise gıdaya uygun saflıkta, 3.9 ise reaktif saflıkta, 4 ve üzerinde ise analitik saflıkta olarak kabul edilmektedir (Rito-Palomares vd. 2001).

Saflaştırma ile ilgili olarak bugüne kadar yapılmış bazı çalışmalara aşağıda yer verilmiştir.

Boussiba ve Richmond (1979), *Spirulina platensis*'ten fikosiyanın ve allofikosiyanın izole ve karakterize etmişlerdir. Zarouk besiyerinde, geri beslemeli kültürde, 35°C'de, beyaz ışık altında ve ortama % 1.5 oranında CO₂ vererek hücrelerin 1.3-1.6 mg/mL düzeyinde gelişimini sağlamış ve elde edilen pelleti -18°C'de depolamışlardır. Araştırmacılar lizozim enzimi ile yaptıkları enzimatik ekstraksiyonun ardından amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz, hidroksiapatit kolon ve iyon değişim kromatografisi tekniklerini kullanarak fikosiyanini saflaştırmışlar ve saflaştırma işlemi sonunda fikosiyanın saflık oranını 4.15, saflık faktörünü de 4.6 olarak belirlemişlerdir. Zhang ve Chen (1999), *Spirulina platensis*'ten fikosiyanın ve allofikosiyanın izole ettikleri bir çalışmada amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz, jel filtrasyon, iyon değiştirici kromatografisi olmak üzere 3 basamakla bir saflaştırma yöntemi kullanmışlar ve fikosiyanın/allofikosiyanın saflığını sırasıyla, 5.06/5.34 olarak tespit etmişlerdir. Fikosiyanın saflık faktörünü ise 4.4 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar kullandıkları

bu yöntemi *Spirulina platensis*'ten fikosiyanin eldesinde kullanılabilecek basit ve etkili bir yöntem olarak önermişlerdir.

Minkova vd. (2003), *Spirulina fusiformis*'ten fikosiyanin saflaştırılması için yeni bir yöntem geliştirdikleri çalışmada saflaştırma işleminin son aşamasında fikosiyanin verimini % 45.7 saflığını ise 4.3 (saflık faktörü 4.5) olarak belirlemişlerdir.

Ranjitha ve Kaushik (2005), *Nostoc muscorum* suşundan amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz, iyon değişim kromatografisi ve hidroksiapatit kolon kromatografisi tekniklerini kullanarak % 39 verimde ve 3.89 saflık oranında fikosiyanin elde etmişlerdir.

Patel vd. (2005), Hindistan'ın kıyı kesimlerindeki kayalık yüzeylerden siyanobakteri cinsleri olan *Phormidium* ve *Lyngbya* spp. suşlarını izole etmişlerdir. Elde edilen suşlar ASN besiyerinde, pH 7.5'te, $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de floresan ışık altında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta kalacak şekilde geliştirilmiştir. Tatlı su kaynaklarından elde edilen *Spirulina* sp. suşu ise aynı koşullar altında ancak Zarouk besiyerinde pH 10'da geliştirilmiştir. Araştırmacılar saflaştırma yöntemi olarak amonyum sülfatla çöktürme ardından iyon değiştirici kolon kromatografisi yöntemlerini kullanmışlar ve saflaştırma sonundaki saflık oranlarını, sırasıyla 4.42, 4.43 ve 4.59; verimi ise % 45.6, % 35.2 ve % 36.8 olarak belirlemişlerdir. Saflık faktörlerini ise, sırasıyla 5.5, 6.3 ve 6.9 olarak tespit edilmiştir. Saflık oranları bugüne kadar yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında ortalama 4.4 ile diğer çalışmaların üstünde bulunmuştur.

Bhaskar vd. (2005), fikosiyaninin gıda ve eczacılık alanında birçok uygulamada kullanıldığını ve bu uygulamalarda fikosiyanin saflığının büyük rol oynadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında sıvı azotta maserasyon işleminden sonra Na-fosfat tamponu ile fikosiyanini ekstrakte etmişler, ardından elde ettikleri ham ekstraktı % 50 amonyum sülfatta çöktürme/diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi kullanarak saflaştırmışlar ve 4.98 saflıkta fikosiyanin elde etmişlerdir.

Benedetti vd. (2006), hidroksiapatit kolon kromatografisi kullanarak tek aşamalı olarak *Aphanizomenon flos-aquae*'dan fikosiyanini saflaştırmış ve saflık oranını 4.78 olarak tespit etmişlerdir.

Soni vd. (2006), Hindistan'da kayalık bir bölgeden izole ettikleri ve siyanobakteri türü olan *Oscillatoria quadripunctulata* olarak tanımladıkları yerel suşu kullanarak, fikosiyanın ekstraksiyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine bir araştırma yapmışlardır. Saflaştırma için 3 aşamalı bir yöntem olan amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-150 jel filtrasyon kromatografisi ve son olarak DEAE selüloz iyon değiştirici kolon kromatografisi tekniğini kullanmışlardır. Saflaştırmanın ilk aşamasında saflık oranını 1.2 son aşamasında ise 3.31 olarak tespit etmişlerdir. Yaptıkları bu çalışma sonucunda araştırmacılar fikosiyanın saflaştırılması için kullandıkları yöntemi etkili bir yöntem olarak, elde ettikleri yerel suşu da iyi bir fikosiyanın üreticisi olarak önermişlerdir.

Soni vd. (2008), *Phormidium fragile* suşundan amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz ve hidrofobik interaksiyon kromatografisi kullanarak fikosiyanın saflığını 0.42'den 4.52'ye yükseltmişlerdir. Bu yöntemin hızlı ve kolay olması nedeni ile *P. fragile*'den fikosiyanın saflaştırılması için önermişlerdir.

Singh vd. (2009), bir siyanobakteri türü olan *Phormidium ceylanicum* suşundan fikosiyanın ekstrakte etmişler ve elde ettikleri ham ekstraktı 50 kDa'luk membran filtre ve ardından iyon değiştirici kolon kromatografisi ile saflaştırılmışlardır. Saflaştırma sonunda fikosiyanın verimini % 63.5, saflık oranını ise 4.15 (saflık faktörü 3.95) olarak tespit etmişlerdir. Elde ettikleri veriler sonucunda bu yöntemi *Phormidium ceylanicum*'dan fikosiyanın saflaştırılması için uygun, basit ve ucuz bir yöntem olarak önermişlerdir.

Tüm bu yöntemlerin yanı sıra son zamanlarda iki fazlı sıvı ekstraksiyonu (aqueous two phase extraction-ATPE) ve geniş yataklı adsorbsiyon kromatografisi (bed adsorption chromatography-EBAC) gibi alternatif yöntemler de denenmiş ve çok iyi sonuçlar

alınmıştır. Bermojo vd. (2003) *Porphyridium cruentum* suşundan EBAC yöntemi ile fikoeritrin saflaştırmışlar ve verimin % 32'den % 66'ya yükseldiğini, saflaştırma işlemi süresinin ise 8 saatten 40 dakikaya kadar düştüğünü ifade etmişlerdir. Ramos vd. (2010), *Anabaena marina* suşundan EBAC yöntemi ile fikosiyanın saflaştırmışlar, % 62 verimle ve analitik saflıkta ürün elde etmişlerdir. Bu yöntem ile daha yüksek verimde ve daha kısa sürede ürün elde edilebileceğini önermişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bu yöntemin ölçek büyütme için uygun olabileceğini ve yüksek miktarda ve düşük maliyette ürün elde edilebileceğini ifade etmişlerdir. Patil vd. (2006) ATPE yöntemi ile *S. platensis*'ten % 66 verim ve analitik saflıkta fikosiyanın saflaştırmışlardır. Araştırmacılar iki fazlı sıvı ekstraksiyon yöntemini takiben, iyon değişim kromatografisi yöntemi uygulamış ve 6.69 gibi çok yüksek saflıkta fikosiyanın elde etmeyi başarmışlardır.

2.3.3.3 Fikosiyanın karakterizasyonu

Saflaştırılan proteinin iyi karakterize edilmesi ve yapısının belirlenmesi gerekmektedir. Karakterizasyon amacı ile kullanılan izoelektrik nokta tayini, alt birimlerin belirlenmesi, saflık kontrolleri, moleküler kütle tayini, primer yapı analizi, sekonder/tersiyer ve kuarter yapı analizi, translasyon sonrası modifikasyonlar gibi birçok alternatif yöntem vardır (Zihnioğlu 2007). Fikosiyanın karakterizasyonunda ise genelde, UV-VIS spektrofotometre (saflık oranı), floresan spektrofotometre ve SDS-PAGE yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler kullanılarak çeşitli araştırmacılar tarafından saflaştırılan fikosiyanın izoelektrik noktası, molekül ağırlığı, alt birimleri ve yapısı belirlenerek karakterizasyonu yapılmıştır (Boussiba ve Richmond 1979, Zhang ve Chen 1999, Minkova vd. 2003, Patel vd. 2005, Benedetti vd. 2006, Ramos vd. 2010). Bu yöntemlerden spektroskopik yöntemler, fikosiyanın saflığı ve doğası hakkında bilgi verirken, SDS-PAGE moleküler ağırlığı hakkında yaklaşık bir değer elde edilmesini sağlar.

Fikosiyanın molekül ağırlığı, yapısı, alt birimlerinin büyüklüğü ve izoelektrik noktaları elde edildiği suşa göre farklılık göstermektedir. Santiago-Santos vd. (2004),

Chen vd. (2006), Soni vd. (2008) yaptıkları karakterizasyon çalışması sonrasında sırasıyla *S. platensis*, *Calothrix* sp. ve *Phormidium fragile*'den elde ettikleri fikosiyanınin trimer yapısında olduğunu, Soni vd. (2006), *Oscillatoria quadripunctulata*'den elde ettikleri fikosiyanınin hegzamer yapısında olduğunu bildirmişlerdir. Patel vd. (2005), *Spirulina* sp. ve *Phormidium* sp.'den elde ettikleri trimer yapısındaki fikosiyanınin α alt ünitelerinin büyüklüklerinin aynı olduğunu, β alt ünitelerinin ise sırasıyla 17 kDa ve 19.1 kDa olarak farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

SDS-PAGE tekniği tek başına fikosiyanın yapısının tam olarak tanımlanmasında yeterli bir yöntem değildir. Daha kapsamlı sonuçlar elde etmek ve proteini tam olarak tanımlayabilmek için günümüzde kütle spektrometrisi (MS) yöntemleri kullanılmaktadır. Proteinlerin ve peptitlerin kütle spektrometrilerinde genelde peptit dizi analizleri, protein tanımlanması ve haritalama, moleküler kütle ve özellikle post-translasyonel modifikasyonların belirlenmesi esastır. Bu amaçla en yaygın kullanılan sistemlerden bazıları MALDI-TOF (Matriks destekli lazer desorbsiyon iyonizasyonu-Uçuş süresi), ESI MS/MS (elektrosprey deiyonizasyonu), ESI-TOF olarak sıralanabilir. Kütle spektrometrik teknikler iyi geliştirilmiş ve duyarlı olmalarına rağmen, MS/MS spektrumlarından kısmi dizilerin belirlenmesi sınırlıdır. Bu durumda peptit karışımlarının HPLC gibi ilave tekniklerle ayrılması ve saflaştırılmış peptitlerin N-terminal Edman dizi analizleri, hala sıklıkla kullanılan yardımcı ve güvenilir alternatif metotlardır (Zihnioğlu 2007). Karakterizasyonu yapılan saf fikosiyanıni tanımlamak için ise çeşitli araştırmacılar tarafından MALDI-TOF-MS yöntemi kullanılmıştır (Benedetti vd. 2006, Chen vd. 2006). Ayrıca CE-MS (kapiler elektroforez-MS) ve HPLC-MS gibi daha etkili yöntemlerin de kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Chen vd. 2006).

2.3.4 Fikosiyaninin kullanım alanları

2.3.4.1 Renklendirici olarak kullanımı

Gıda boyaları, ürünlerin renk kalitesini artırmak amacıyla kullanılan en önemli gıda katkı maddeleri arasında yer almaktadır. Gıdalarda çeşitli işlemler ve depolama sırasında kaybolan doğal rengi vermek, zayıf olan doğal rengi kuvvetlendirmek, gerçekte renksiz olan gıdalara renk vermek ve böylece cazip ve kabul edilebilir ürünler elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Yapay renk maddelerinin, keşfedilmesi ve üretimine başlanmasıyla beraber doğal renk maddelerinin yerini almıştır. Yapay renk maddeleri daha stabil olmaları, kuvvetli renk vermeleri gibi birçok avantaja sahip olmalarına karşın toksik ve alerjik etkilerinin olması ve kullanımında yasal sınırlamalar getirilmesi tüketicilerin sentetik renklendiricilerin güvenliği ile ilgili endişeler duymasına ve yapay renk maddelerine olan ilginin giderek azalmasına yol açmıştır. Tüm bu nedenler, üreticileri tekrar doğal renk maddelerini kullanmaya yöneltmiştir. (Karaali ve Özçelik 1993, Yentür vd. 1998).

Günümüzde gıda sanayisinde, özellikle içecek ve şekerleme sanayisinde, yapay mavi renkli boyaların kullanımı kısıtlanmakta ve doğal mavi renkli boyaların kullanımına olan ilgi giderek artmaktadır (Jespersen vd. 2005). Fikosiyaninin, gıda, ilaç ve kozmetik sanayilerinde, karsinojen olduğundan şüphe edilen sentetik pigmentlerin yerini alabileceği bildirilmiştir (Sarada vd. 1999). Bu bağlamda siyanobakteriden elde edilen, doğal ve mavi renkli bir pigment olan fikosiyanin üretimi dikkat çekmektedir.

Fikosiyanin dünyada çeşitli firmalar tarafından ticari olarak üretilmektedir. Japonya'da "Dainippon Ink. & Chemicals Inc." şirketi "lina mavisi" adıyla ticari olarak fikosiyanin üretimi yapmakta ve kg fiyatını 130 dolardan satmaktadır (Herrera vd. 1989, Henrikson 2011, <http://www.algaeindustrymagazine.com>). *S. platensis*'den elde edilen C-PC, Japonya'da gıda ve kozmetik alanında renklendirici olarak kullanılmasına rağmen Avrupa yasal kısıtlamalar nedeni ile bu tip kullanımı henüz onaylanmamıştır. C-PC, fermente süt ürünleri, dondurma, alkolsüz içkiler, tatlılar, sakızlar, buzlu şekerler,

dekorasyon ürünleri gibi birçok gıda ürünüde renklendirici olarak kullanılmaktadır. Ancak mavi renkli gıdaların sınırlı tüketimi bu maddenin gıdalarda renklendirici olarak kullanımına olan ilgiyi azaltmaktadır. Sıcaklığa ve ışığa karşı stabilitesinin zayıf olmasına rağmen indigo ve gardenya mavisinden çok daha elverişli olduğu kabul edilmiştir. Kırmızı mikroalg türü olan *Phorphyridium aerugineum*'dan elde edilen fikosiyaninin renginin ışığa ve pH değişimlerine karşı stabil kaldığı ancak sıcaklığa karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir. Fikosiyaninin farklı koşullardaki stabilitesinin belirlenmesi gıda proseslerindeki kullanım olanaklarının tespiti açısından oldukça önemlidir. Isı uygulanmaksızın içeceklere (Pepsi® ve Bacardi Brezzer®) ilave edilmesi halinde oda sıcaklığında 1 ay boyunca renk kaybı olmadığı tespit edilmiştir. Kuru gıdalarda kullanılması durumunda renk stabilitesi çok yüksektir. Kek dekorasyonunda kullanılan şekerli çiçeklerin renklerinin bir yıl boyunca stabil kaldığı belirlenmiştir (Eriksen 2008, Sekar ve Chandramohan 2008).

2.3.4.2 Floresan prob olarak kullanımı

Fikobilizomlar sulu çözeltilerden ekstrakte edildiklerinde fikobiliproteinler uyarılma enerjilerinin doğal alıcılarını kaybederler ve böylece yüksek floresan özelliğe sahip olurlar. Diğer floresan maddelerle karşılaştırıldıklarında fikobiliproteinler yüksek molar ekstinksiyon (sönüm) katsayısına, yüksek oligomer stabilitesine, yüksek floresan kuantum verimine ve geniş stok kaymasına sahiptir ve bu özellikleri onların güçlü ve yüksek duyarlılıkta floresan etken olarak kullanımlarını sağlamaktadır (Glazer 1994, Spolaore vd. 2006).

Fikobiliproteinler immunoglobulin, protein A, biotin ve avidin gibi biyolojik özgünlüğe sahip moleküllerle birleştirilmesi sonucu floresan prob olarak kullanıldığı ve histokimya, floresan mikroskopi, akış sitometrisi, bağışıklık testleri gibi birçok alanda kullanım potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Oi vd. 1982, Glazer 1994, Sekar ve Chandramohan 2008). Fikobiliproteinlerin hegzamer yapısı trimer ve monomerlerine ayrıştığı zaman uyarım (eksitasyon) katsayısı ve floresan kuantum verimi azalmakta,

denatürasyonu sonucunda ise floresan özelliği tamamen kaybolmaktadır (Fukui vd. 2004, Kupka ve Scheer 2008).

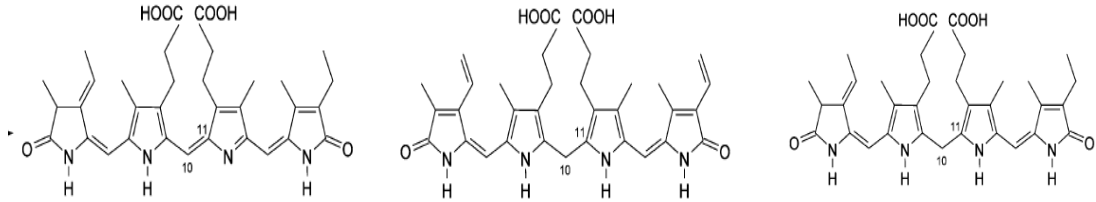
Floresan özelliği etkileyen en önemli değişkenlerden biri kuantum verimidir. Kuantum verimi, lüminesans yapan moleküllerin sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranı olarak ifade edilir ve floresan özellik arttıkça bu oran bire yaklaşır. Floresan prob olarak en yaygın kullanılan fikobiliprotein, % 82-98 floresan kuantum verimi ile fikoeritrindir (Oi vd. 1982, Glazer 1994). Fikosiyaninin ve allofikosiyaninin kuantum verimlerinin düşük olduğu (sırasıyla % 68 ve % 50) belirlenmiştir (Oi vd. 1982). Stabilize edici bazı etkenlerin polipeptit zincirine bağlanması sonucu kimyasal stabilizasyon sağlanmış, fikosiyaninin ve allofikosiyaninin floresan prob olarak kullanımı olanaklı hale getirilmiştir (Fukui vd. 2004, Sun vd. 2006). Fikosiyaninin floresan özelliğinden faydalanarak, siyanobakterilerin gelişimi eş zamanlı olarak takip edilebilmekte, içme sularındaki toksik siyanobakteriler tespit edilebilmekte ve doğal su kaynaklarında siyanobakteri varlığı uzaktan belirlenebilmektedir (Eriksen 2008).

2.3.4.3 Gıda katkısı ve fonksiyonel gıda olarak kullanımı

Siyanobakterilerin fonksiyonel gıda olarak tüketimi fikosiyaninin kullanım alanlarından bir diğerini oluşturmaktadır. Kurutulmuş *S. platensis*'in fonksiyonel gıda olarak tüketiminde fikosiyaninin fonksiyonunu gösteren bir dizi çalışma bulunmaktadır. Son zamanlarda ilgi fikosiyaninin fonksiyonel bileşenler içeren kurutulmuş *S. platensis* ile alınmasına doğru kaymaktadır. Besinsel değerlerinin ötesinde tüm siyanobakterilerin fikosiyanin içerikleri nedeniyle, bağışıklık sistemini uyardığı, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antikanser ve kolesterol düşürücü etkiler gösterdiği öne sürülmüştür. Siyanobakteriler biyolojik olarak birçok aktif bileşik içerdiğinden, siyanobakterinin tüketilmesi ile oluşan bu sağlık etkilerinin yalnızca fikosiyanin içeriği ile ilişkilendirilmesi tam olarak mümkün değildir (Eriksen 2008).

2.3.4.4 Nutrasötik ve farmasötik olarak kullanımı

Farklı siyanobakterilerden elde edilen saf fikosiyanın antioksidan ve radikal uzaklaştırıcı aktivitesi olduğu ve bu bağlamda saflaştırılmış C-PC'nin nutrasötik ve farmasötik olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Benedetti vd. 2006, Bermejo vd. 2008, Soni vd. 2008). Hidroksil radikallerinin yok olmasında fikosiyanın büyük bir kısmını oluşturan fikosiyanobilinlerin sorumlu olduğu belirlenmiştir (Zhou vd. 2005). Fikosiyanobilinlerin kimyasal yapısı güçlü bir antioksidan olduğu bilinen bilirubin kimyasal yapısı ile benzerlik göstermektedir (Romay vd. 2003). Bilurubin, plazmada biliverdin redüktaz enzimi tarafından biliverdinden sentezlenen ve lipitleri oksidasyondan koruyan bir maddedir. Diğer yandan antioksidan aktivitenin asıl sorumlusunun fikosiyanobilinin indirgenmiş formu olan fikosiyanorubin olabileceği de ifade edilmiştir. C-PC'nin denatürasyonu veya tripsin ile parçalanması sonucunda antioksidan aktivitesi artmakta ve peroksit radikallerinin parçalanması sırasında rengini kaybetmektedir (Zhou vd. 2005). Şekil 2.6'da fikosiyanobilin, bilirubin ve fikosiyanorubin yapıları gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Fikosiyanobilin, bilirubin ve fikosiyanorubin yapıları (soldan sağa) (Eriksen 2008)

Bir dizi bozulmuş fizyolojik durumun C-PC uygulaması ile düzeltilebildiği ve birçok vakadaki sağlık üzerine olan bu olumlu etkinin, C-PC'nin antioksidan ve radikal parçalayıcı etkisi aracılığıyla olduğu ifade edilmiştir. C-PC'nin NADH oksidaz gibi diğer bazı enzimleri de inhibe ederek, memeli hücrelerinde ve deney farelerinde gen düzenlenmesini etkilediği, hücre çoğalmasını önlediği ve kanserojenik hücrelerde apoptozisi (programlı hücre ölümü) uyardığı gözlenmiştir. Bu gözlemler nutrasötik veya farmasötik olarak C-PC kullanımına olan ilginin giderek artmasına neden olmuştur (Eriksen 2008).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada fikosiyanın verimlerini karşılaştırmak ve en yüksek fikosiyanın veriminin elde edildiği suşu belirlemek amacıyla 5 farklı cinse ait siyanobakteri suşu kullanılmıştır. Bu suşlardan *Spirulina maxima*, *Anabaena affinis* ve *Synechococcus* sp. Yrd. Doç. Dr. Fatma Gürbüz'den (Aksaray Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO), *Phormidium* sp. ve *Oscillatoria* sp. ise Yrd. Doç. Dr. Tülay Baykal'dan (Ahi Evran Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Suşların üretimi

Anabaena affinis, *Synechococcus* sp., *Phormidium* sp. ve *Oscillatoria* sp. suşları BG11 besiyerinde, *Spirulina maxima* suşu ise Zarouk besiyerinde 28°C'de 12 saat karanlık/12 saat aydınlık (36 W beyaz floresan ışık) ortamda, çalkalamalı koşullarda (120 devir/dakika) 28 gün boyunca inkübe edilmiştir. BG11 ve Zarouk besiyerlerinin bileşenleri EK 2'de gösterilmiştir.

3.2.2 Fikosiyanın miktarının belirlenmesi

Suşlardan elde edilen fikosiyanın miktarını belirlemek amacıyla inkübasyonun 0., 7., 14., 21. ve 28. günlerinde kültürlerden 7 mL örnek alınmış, 20.000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş (Sigma 3k30, Almanya), elde edilen pellet 7 mL 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.8, % 0.02 Na-azit) ile sulandırılmıştır. Hücre süspansiyonunun ekstraksiyonu için dondurma/çözme yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla hücre süspansiyonuna -21°C'de dondurma ve ardından 30°C'de çözme işlemi 3 kez ardı ardına uygulanarak hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır. Ekstrakt 20.000 g'de 20

dakika santrifüj edilmiş, elde edilen mavi renkli süpernatantın spektrofotometrik ölçümleri yapılmış ve değerler formülde yerine konularak fikosiyanın miktarı belirlenmiştir (Bennett ve Bogorad 1973).

$$\text{C-PC miktarı (mg/mL)} = \frac{A_{620} - (0.534 \times A_{652})}{5.34}$$

Kuru ağırlık üzerinden elde edilen fikosiyanın miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Silveria vd. 2007). Formülden elde edilen sonuç, gram kuru ağırlık başına düşen mg fikosiyanın miktarını göstermektedir.

$$\text{C-PC miktarı (mg/g)} = \frac{\text{C-PC (mg/mL)} \times \text{Solvent hacmi (mL)}}{\text{Kuru biyokütle ağırlığı (g)}}$$

Örneklerin kuru biyokütle ağırlıkları belirlemek amacıyla, 50 mL örnek önceden kurutulup darası alınan filtre kağıdından (Whatmann GF/C, 42.5 mm, İngiltere) süzölmüş ve 80°C'de 24 saat kurutulduktan sonra tartılarak kuru madde miktarı belirlenmiştir (Madhyastha ve Vatsala 2007).

C-PC'nin saflığı ise A_{620}/A_{280} oranı ile tespit edilmiştir (Abalde vd. 1998). 620 nm'deki absorbans fikosiyanın maksimum absorbans değerini gösterirken, 280 nm'deki absorbans ortamdaki diğer proteinlerin varlığını göstermektedir (Liu vd. 2005).

Siyanobakteriden elde edilen fikosiyanın verimini belirlemek için ise aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{C-PC (mg/mL)} \times \text{Solvent hacmi (mL)}}{\text{Kuru biyokütle ağırlığı (mg)}} \times 100$$

3.2.3 Fikosiyanin miktarının günlere göre değişiminin belirlenmesi

Çalışmada en yüksek fikosiyanin miktarının elde edildiği suş belirlendikten sonra bu suşun fikosiyanin üretimini günlere göre değişimi tespit edilerek en yüksek fikosiyanin miktarının elde edildiği gün belirlenmiştir. Bu amaçla inkübasyonun 0., 5., 10., 15., 20., 25., 30. ve 35. günlerinde örnekler alınmış ve fikosiyanin verimi bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

3.2.4 Optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi

En yüksek fikosiyanin miktarının elde edildiği ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi amacıyla sonikasyon, homojenizasyon, dondurma/çözme ve lizozim uygulaması yöntemleri kullanılmıştır. Gelişmiş kültürden 5 mL örnek alınarak 20.000 g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet 5 mL 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.8, % 0.02 Na-azit) ile sulandırılmış ve ardından hücre duvarının parçalanması amacıyla bahsedilen yöntemler şu şekillerde uygulanmıştır;

Sonikasyon: Santrifüj sonrası elde edilen süspansiyon 20 kHz sabit frekansta 3 W çıkış hızı ile 2 dakika boyunca sonikasyona (Sonics Vibracell VC130, ABD) tabi tutulmuştur. Isınmayı önlemek amacıyla sonikasyon işlemi buz içerisinde gerçeleştirilmiştir.

Homojenizasyon: Santrifüj sonrası elde edilen süspansiyon 11.000 devir/dakika hızla 5 dakika boyunca homojenize (Ultra Turraks IKA T25, Almanya) edilmiştir. Isınmayı önlemek amacıyla homojenizasyon işlemi buz içerisinde gerçeleştirilmiştir (Boussiba ve Richmand 1979).

Dondurma/çözme: Santrifüj sonrası elde edilen süspansiyona, -21°C’de dondurma/4°C çözme, -21°C’de dondurma/30°C çözme, -65°C’de dondurma/4°C çözme ve -65°C’de dondurma/30°C çözme gibi farklı dondurma ve çözme sıcaklıkları uygulanmıştır.

Ekstraksiyon etkinliğini artırmak amacı ile aynı örneğe peşpeşe 3 kere dondurma/çözme işlemi uygulanmıştır.

Lizozim uygulaması : Santrifüj sonrası elde edilen pellet 600 mg/mL lizozim ve 10 mM EDTA içeren 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.8) ile sulandırılmış ve elde edilen süspansiyon 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Boussiba ve Richmand 1979, Santiago-Santos vd. 2004).

Hücre duvarının parçalanması amacıyla gerçekleştirilen tüm yöntemlerin ardından ekstraktlar 20.000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen mavi renkli süpernatantın spektrofotometrik ölçümleri yapılarak fikosiyanın miktarları belirlenmiştir. Fikosiyanın miktarını artırmak amacı ile elde edilen ekstraktlar 4°C'de 1 gece bekletilmiş ve spektrofotometrik ölçümleri yapılarak fikosiyanın miktarları belirlenmiştir. Aynı amaçla bazı yöntemler birbiri ile kombine edilerek de kullanılmıştır.

3.2.5 Optimum tampon çözeltinin belirlenmesi

En yüksek fikosiyanın miktarının elde edildiği tampon çözeltiyi belirlemek amacıyla 100 mM sodyum asetat tamponu (pH 5.0), 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.0 ve pH 7.0), 100 mM Tris-Cl tamponu (pH 8.0), 100 mM CaCl₂, 100 mM NaCl ve saf su kullanılarak ekstraksiyon yapılmıştır.

3.2.6 Optimum tampon miktarının belirlenmesi

Ekstraksiyon aşamasında santrifüj sonrası elde edilen pellet farklı oranlarda (1:0.5, 1:1, 1:2) tampon ile sulandırılmış ve aynı ekstraksiyon işlemine tabi tutularak fikosiyanın miktarı belirlenmiştir.

3.2.7 Optimum sonikasyon parametrelerinin belirlenmesi

Sonikasyon işleminde kullanılan temel parametreler; kullanılan güç (P, Watt), sonikasyon süresi (t, saniye), örneğin hacmi (V, L) ve örneğin konsantrasyonudur (Foladori vd. 2007). Bu çalışmada farklı sonikasyon güçleri (0-10 W) ve farklı sonikasyon süreleri (1, 2, 3, 4 ve 5 dakika) uygulanarak, bu parametrelerin C-PC miktarı üzerine etkisi belirlenmiştir. Sonikasyon işlemi 20 kHz sabit frekansta ve ısınmayı önlemek amacıyla örnek kabı buz içerisine yerleştirilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.8 C-PC üretim koşullarının optimizasyonu çalışmaları

3.2.8.1 Fikosiyanin üretimi üzerine besiyeri bileşenlerinin etkisi

Çalışmada BG11 besiyerinin temel bileşenleri olan NaNO_3 , CaCl_2 , Na_2CO_3 ve iz element miktarlarında değişiklikler yapılarak C-PC üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. NaNO_3 , 0.5-2.5 g/L; CaCl_2 , 0.05-0.3 g/L; Na_2CO_3 , 0.01-0.05 g/L; iz element karışımı, 0.5-1.5 mL/L miktarlarında kullanılmıştır. Etkisi tespit edilecek olan bileşen değişik miktarlarda besiyerine katılmış, diğer bileşenler sabit tutulmuştur. Hazırlanan besiyerine *Anabaena affinis* suşundan % 10 oranında aşılama yapılarak 30°C'de 25 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda fikosiyanin miktarı belirlenmiştir.

3.2.8.2 Fikosiyanin üretimi üzerine pH'nın etkisi

Farklı pH değerlerine (6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 ve 10.0) ayarlanmış BG11 besiyerine *Anabaena affinis* suşundan % 10 oranında aşılama yapılarak 30°C'de 25 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda fikosiyanin miktarı belirlenmiştir.

3.2.8.3 Fikosiyanin üretimi üzerine farklı inokülasyon oranlarının etkisi

BG11 besiyerine *Anabaena affinis* suşundan % 5, % 10, % 15 ve % 20 oranlarında aşılama yapılmış ve 30°C'de 25 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda fikosiyanin miktarı belirlenmiştir.

3.2.8.4 Fikosiyanin üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi

BG11 besiyerine *Anabaena affinis* suşundan % 10 oranında aşılama yapılarak farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C, 35°C, 40°C) 25 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda fikosiyanin miktarı belirlenmiştir.

3.2.8.5 Fikosiyanin üretimi üzerine farklı ışık kaynaklarının etkisi

BG11 besiyerine *Anabaena affinis* suşundan % 10 oranında aşılama yapılarak mavi, kırmızı ve beyaz ışık altında 30°C'de 25 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda fikosiyanin miktarı belirlenmiştir.

3.2.9 Fikosiyaninin kısmi saflaştırılması

3.2.9.1 Amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz

Ekstraksiyon sonrası elde edilen ham ekstraktı kısmi olarak saflaştırmak için amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz yöntemi denenmiştir. Yöntemin işlem basamakları şu şekildedir;

- 25 günlük inkübasyonun ardından, ekstraksiyon yapılmış ve süpernatant (ham ekstrakt) elde edilmiştir.

- +4°C’de sürekli karıştırılan süpernatanta, % 25 doygunluğa gelene kadar amonyum sülfat eklenmiş ardından + 4°C’de 4 saat bekletilmiştir.
- Bekletilen örnek 20.000 g’de 20 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan pellet atılarak üstte kalan mavi renkli süpernatant ile çöktürme işlemine devam edilmiştir.
- +4°C’de sürekli karıştırılan süpernatanta, % 75 doygunluğa gelene kadar amonyum sülfat eklenmiş ardından + 4°C’de 1 gece bekletilmiştir.
- Bekletilen örnek 20.000 g’de 20 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan pellet pH’sı 6.8 olan 10 mM Na-fosfat tamponunda çözündürülüp, yine 10 mM Na-fosfat tamponuna karşı +4°C’de 48 saat diyaliz (Serva Spectra/pore 1000 MWCO, ABD) edilmiştir. Diyaliz sırasında sürekli karıştırma yapılmış ve tampon 12 saatte bir yenilenmiştir (Patel vd. 2005, Soni vd. 2006). Doygunluk seviyelerine ulaşmak için gerekli olan amonyum sülfat miktarı “<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>” internet adresindeki program kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.9.2 Kısmi saflaştırılan fikosiyanın toksisitesinin belirlenmesi

Kısmi olarak saflaştırılan fikosiyanın toksin testi için *Daphnia magna* organizması kullanılmıştır. Biyodeneğe başlamadan önce, belirli üretim koşullarında partenogenez ile elde edilmiş *Daphnia magna* organizmalarının en az üçüncü nesil ve yaşının 24 saatten küçük olmasına dikkat edilmiştir. Yumurtlamaya hazır bireyler, taze seyreltme suyu ile kaplara aktarılmış ve 24 saat içerisinde yeni çıkmış bireyler toplanmıştır. Biyodenede farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.05, 0.1, 1.0 mg/mL) fikosiyanın içeren deney düzenekleri hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için her bir kaptaki 10 adet *Daphnia magna* kullanılmıştır. Aynı zamanda deneyin yapıldığı şekil ve şartlarla birlikte yürütülen kontrol grubu kullanılmıştır ve her kontrole, deney ortamıyla aynı sayıda *Daphnia magna* koyulmuştur. Deney süresince hayvanlar kesinlikle beslenmemiştir. 24 saatlik deney periyodu sonunda, her bir kaptaki hareketli *Daphnia magna* organizmaları sayılmıştır (Anonim 1999). Bu çalışma Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Algoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.3 Kısmi saflaştırılmış örneğin pH, sıcaklık ve ışık stabilitesinin belirlenmesi

Kısmi olarak saflaştırılan fikosiyanınin farklı pH'larda ne kadar süre stabil kalabildiğini tespit edebilmek için pH 3.0-11.0 aralığında tampon çözeltiler hazırlanmıştır. pH 3.0-6.5 aralığında sodyum sitrat tamponu, pH 7.0-8.0 aralığında sodyum fosfat tamponu, pH 8.5-11.0 aralığında bikarbonat tamponu kullanılmıştır. Ön deneme sonrası pH 5.0-7.0 aralığında ve farklı sıcaklıklarda stabilite denemesi kurulmuştur. C-PC konsantrasyonu yaklaşık 0.20 mg/mL olacak şekilde, farklı pH'larda (5.0, 5.5, 6.0, 6.5 ve 7.0) hazırlanan tampon çözeltilere kısmi saflaştırılmış C-PC örneğinden ilave edilmiş ve hazırlanan çözeltiler 4°C, 25°C, 35°C, 45°C ve 55°C'de dört ay boyunca depolanmıştır. İlk 1 hafta her gün, sonrasında haftada bir olmak üzere örnek alınmış ve spektrofotometrik ölçümler yapılarak fikosiyanın miktarındaki değişim tespit edilmiştir. Aynı çalışma Na-azit içermeyen tampon ile yapılan ekstraksiyondan elde edilen fikosiyanınin stabilitesini belirlemek amacı ile de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kısmi saflaştırılmış C-PC örneği, son konsantrasyonu yaklaşık 0.3 mg/mL olacak şekilde farklı pH'larda (4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) hazırlanan tampon çözeltilere ilave edilmiş, hazırlanan çözeltiler 4°C ve 25°C'de ve aynı zamanda 4°C'de ışık altında (1000 lüks) 30 gün süreyle depolanmış ve spektrofotometrik ölçümleri yapılarak fikosiyanın miktarındaki değişim tespit edilmiştir.

3.2.9.4 Fikosiyanınin stabilitesine koruyucuların etkisi

Kısmi saflaştırılmış C-PC örneği, son konsantrasyonu yaklaşık 0.3 mg/mL olacak şekilde farklı pH'larda (4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0) hazırlanan tampon çözeltilere ilave edilmiş, ardından % 0.4 oranında NaCl, CaCl₂, sitrik asit, sakkaroz ve % 0.02 oranında Na-azit ilave edilerek bir ay süreyle depolanmış ve spektrofotometrik ölçümleri yapılarak koruyucuların fikosiyanınin stabilitesine etkisi belirlenmiştir (Mishra vd. 2008).

3.2.9.5 Fikosiyaninin stabilitesine farklı konsantrasyonlardaki sakkarozun etkisi

Kısmi saflaştırılmış C-PC örneği, son konsantrasyonu yaklaşık 0.3 mg/mL olacak şekilde farklı pH'larda (5.0, 6.0 ve 7.0) hazırlanan tampon çözeltilere ilave edilmiştir. Ardından % 10, % 20, % 30 oranlarında sakkaroz ilave edilerek, 4°C ve 25°C'de bir ay süreyle depolanmış ve en etkili sakkaroz konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.10 Fikosiyanin saflaştırılması

Fikosiyanin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürme/diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerin birbiri ile kombinasyonları denenerek en yüksek verim ve saflığın elde edildiği yöntem belirlenmiştir.

Saflaştırmanın her aşamasında, saflık oranı (A_{620}/A_{280}) hesaplanarak, spektrum taraması ve SDS-PAGE analizleri yapılarak elde edilen fraksiyonların saflıkları kontrol edilmiştir. Fikosiyaninin geri dönüşüm oranı (verim) ve saflaştırma faktörü aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır (Moraes ve Kalil 2009, Antelo vd. 2010).

$$\text{Geri dönüşüm (\%)} = \frac{\text{C-PC}_{SS} \text{ miktarı (mg/mL)} \times \text{Hacim}_{SS} \text{ (mL)}}{\text{C-PC}_{SÖ} \text{ miktarı (mg/mL)} \times \text{Hacim}_{SÖ} \text{ (mL)}}$$

$$\text{Saflaştırma faktörü} = \frac{\text{Saflık oranı}_{SS}}{\text{Saflık oranı}_{SÖ}}$$

SS: Saflaştırma sonrası; SÖ: Saflaştırma öncesi

Çalışmanın bu aşaması Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Proteom Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.10.1 Amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz

Bölüm 3.2.9.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.2.10.2 Ultrafiltrasyon

Amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz yöntemine alternatif olarak “ultrafiltrasyon yöntemi” denenmiştir. Bu yöntemde ham ekstrakt Vivaspin 6 ultrafiltrasyon tüpü (100 kDa, Sartorius, Almanya) ile 4000 g’de farklı süreler kullanılarak santrifüj edilmiş ve en yüksek saflıkta ve verimde fikosiyanin elde edilen optimum değer belirlenmiştir.

3.2.10.3 Jel Filtrasyon Kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak Sephadex G-100 (Sigma Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Sephadex G-100 kolon dolgu materyalinden 2 g tartılarak 25 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) ile hidrate edilmiş ve hidrasyonun tamamlanmasının ardından dolgu materyali 16 mm çaplı cam kolona yaklaşık 200 mm yükseklikte paketlenmiştir. Böylece, 40 mL yatak hacimli jel filtrasyon kolonu hazırlanmıştır. Kromatografi cihazına (BioLogic DuoFlow 10, ABD) yerleştirilen kolon 0.3 mL/dak hızda akıtılan 25 mM konsantrasyonda sodyum fosfat tamponu ile 5 kolon hacmi olacak şekilde şartlandırılmıştır. Spektrometrik ve iletkenlik kayıtlarının stabilize olmasının ardından fikosiyaninin jel filtrasyon ile saflaştırılması deneylerine geçilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi için akım hızı yaklaşık 90 mm/saat lineer akım hızı oluşturacak şekilde 0.3 mL/dak akış hızına ayarlanmış pompa ile gerçekleştirilmiştir. Kolona her seferde 2 mL ham örnek enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun ardından kolondan protein çıkışı spektrofotometrik olarak 280 nm dalga boyundaki absorbansın ölçümü ile, tampon değişimi ise iletkenlik sensöründen gelen sinyaller ile izlenmiştir. Absorbans değerlerinin 0.005 AU (Arbitrary unit) üzerine çıkması ile birer mililitrelik fraksiyonlar toplanmış, her bir fraksiyonda kaç kat saflaşma elde edildiği spektrometrik olarak 620 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbansların oranı hesaplanarak

bulunmuştur. Fraksiyon toplama işlemi iletkenliğin değişimi ile sonlandırılmıştır. Kolon % 100 elüsyon tamponu ile rejenere edilerek tekrar kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.10.4 İyon değişim kromatografisi

Saflaştırmanın ilk basamağından elde edilen ve saflık oranı 2 ve üzeri olan fraksiyonlar, iyon değişim kromatografisi ile ileri saflaştırmaya alınmıştır. İyon değiştirici reçine olarak kuvvetli bir anyonik değiştirici olan CaptoQ (General Electric Healthcare, ABD) kolon dolgu maddesi kullanılmıştır. Dolgu maddesi, 16 mm çapındaki cam kolona 20 mm yükseklikte paketlenmiş ve yaklaşık 4 mL yatak hacimli iyon değişim kolonu hazırlanmıştır. Kromatografi cihazına (BioLogic DuoFlow 10, ABD) yerleştirilen kolon 25 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) ve 150 mm/saat lineer akım hızı ile 10 kolon hacmi olacak şekilde şartlandırılmıştır. Kolonun stabilize olmasının ardından enjeksiyon peristaltik pompa ile gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, 5 kolon hacmi kadar elüsyon tamponu (25 mM sodyum fosfat tamponu-pH 7.0) ve ardından 5 kolon hacmi kadar bağlanma tamponu (25 mM sodyum fosfat tamponu-pH 7.0 ve 1 M NaCl) kolona verilmiş ve bağlanma tamponunun lineer gradiyenti oluşturularak saflaştırma işlemi tamamlanmıştır. Kolon çıkışındaki spektrofotometrik ölçüm değeri 0.005 AU'nun üzerine çıkması ile birer mililitrelik fraksiyonlar toplanmış, her bir fraksiyonda kaç kat saflaşma elde edildiği spektrofotometrik olarak 620 nm ve 280 nm dalgaboylarındaki absorpsiyon oranı hesaplanarak bulunmuştur. Kolon % 100 elüsyon tamponu ile rejenere edilerek tekrar kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.11 Fikosiyaninin karakterizasyonu

3.2.11.1 HPLC-Jel filtrasyon kolon ile moleküler ağırlığın belirlenmesi

Fikosiyaninin molekül ağırlığı HPLC-jel filtrasyon kromatografisi (Hp Agilent 1200 HPLC, ABD) ile belirlenmiştir. Bu amaçla 7.8 mm iç çapa ve 300 mm uzunluğa sahip TSK jel filtrasyon kolonu (TSKGel G2000SWXL, TOSOH Corporation, Japonya)

kullanılmıştır. Kromatografi deneyleri, 25 mM sodyum fosfat (pH 7.0) tamponu ile 0.6 mL/dak akış hızında gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işleminden elde edilen örnekler ve protein standardı (Pierce 26nnn, ABD) kolona 50 µL hacimde enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun ardından 27 dakika boyunca 230 ve 620 nm dalga boylarında spektrofotometrik kayıt alınarak kromatogramlar elde edilmiştir. Moleküler ağırlık standardı kromatogramından elde edilen piklerin alıkonma (retansiyon) zamanları ile ayrılan her bir proteinin moleküler ağırlıklarından eğri uydurma metodu ile regresyon denklemi bulunmuştur. Fikosiyanin alıkonma zamanı, kromatogramın 620 ve 280 nm dalga boylarında aynı anda pik verdiği zaman noktası olarak belirlenmiştir. Bu zaman noktası moleküler ağırlık standardından elde edilen regresyon denkleminde yerine konularak fikosiyaninin moleküler ağırlığı hesaplanmıştır. Çalışmanın bu aşaması Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Proteom Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.11.2 SDS-PAGE ile fikosiyanin alt ünitelerinin molekül ağırlıklarının belirlenmesi

Saflaştırılan fikosiyaninin alt ünitelerinin molekül ağırlıklarının belirlenmesi ve saflaştırma işleminden elde edilen ürünlerin saflık kontrollerinin yapılması için SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan çözeltilerin içerikleri EK 3'te belirtilmiştir. Proteinlerin poliakrilamid jelde yürütülmesi Mini Protean (Bio-Rad, ABD) dikey elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektroforez plakaları % 70'lik etanol çözeltisiyle temizlendikten sonra sistem düzenlenmiştir. Jel tarağının 1 cm altına gelecek şekilde % 15'lik yürütme jeli (resolving gel) dökülmüş ve üzerine 1 mL bütanol ilave edilmiştir. Jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklenmiş ve bütanol kurutma kâğıdıyla geri çekilmiştir. Plakanın geri kalan kısmı % 4'lük yükleme jeli (stacking gel) ile tamamlanmış ve tarak ucunda hava kabarcıkları oluşmamasına dikkat edilerek yerleştirilmiş, polimerizasyon için 30 dakika beklenmiştir. Daha sonra plakalar elektroforez tankına konulmuş tank içine elektrot tamponu boşaltılmış ve taraklar çıkarılmıştır. Saflaştırılan fikosiyanin molekülü örnek tamponu içerisinde çözülmüş (1:2 oranında), 10 dakika kaynatılmış ve 25 µL olarak jele yüklenmiştir. Elektroforez işlemi; 25 mA'da yaklaşık 1 saatte, 35 mA'da da yaklaşık 2 saatte gerçekleştirilmiştir.

(EV231 Consort, Belçika). Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue (Merck, Darmstadt, Almanya) boya çözeltisinde 1 gece bekletilmiştir. Daha sonra boya geri alma çözeltisine alınan jel, protein bantları netlik kazanana kadar bu solüsyonda bekletilmiş ve ardından jel Kodak Jel Görüntüleme (Gel Logic 200 Imaging System) cihazında fotoğraflanmıştır. KODAK jel görüntüleme cihazından alınan jel fotoğraflarında proteinlerin moleküler büyüklükleri 10-200 kDa aralığında 14 protein içeren protein standardı (SM0661, Fermentas, İngiltere) kullanılarak hesaplanmıştır (Laemmli 1970).

3.2.11.3 Fikosiyaninin floresan spektrumunun belirlenmesi

Saflaştırılmış fikosiyanin örneklerinin floresan spektrumu Plak okuyucu spektrometri (SpectraMax M4 Multi-Mode Microplate Reader, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Uyarım (eksitasyon) spektrumunu saptamak için 720 nm dalga boyunda uyarılan fikosiyanin örneğinden yayılan ışın 500 ile 680 nm arasındaki dalga boylarında 2 nm'lik adımlar ile taranarak okunmuştur. Yayılım (emisyon) spektrumunu saptamak için ise, 560 nm dalga boyunda uyarılan fikosiyanin örneğinden yayılan ışın 590 ile 760 nm arasındaki dalga boylarında 2 nm'lik adımlar ile taranarak okunmuştur.

3.2.11.4 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Antioksidan aktivite tayini Re vd. (1999) tarafından önerilen yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, ABTS⁺ (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) radikal katyonu tarafından tutulan antioksidatif maddelerin miktarının, sentetik bir antioksidan olan Trolox'un (suda çözünen E vitamini analogu) standart miktarlarıyla kıyaslanarak bağıl ölçümünü sağlamaktadır. Ölçümler, mavi/yeşil renkli stabil bir bileşik olan ABTS radikalinin kayboluşunun spektrofotometrik olarak belirlenmesiyle yapılmaktadır. Mavi/yeşil ABTS⁺ kromoforu oluşturmak için ABTS ve potasyum persülfat arasında gerçekleşen reaksiyondan yararlanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda 2.45 mM potasyum persulfat içeren 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti karanlıkta oda sıcaklığında 12-16 saat bekletilerek stok ABTS⁺ radikal çözeltisinin

oluşması sağlanmıştır. Analize başlamadan önce ABTS⁺ çalışma çözeltisi elde etmek amacıyla stok radikal çözeltisinden 1 mL alınarak, 734 nm'de absorbans değeri 0.700±0.02 olacak şekilde yaklaşık 90-100 mL PBS (tuzlu fosfat tamponu) ile seyreltilmiştir. Daha sonra 10 µL ekstrakt 990 µL ABTS⁺ çalışma çözeltisi ile reaksiyona sokulmuş ve 6 dakika sonunda 734 nm de absorbansları belirlenmiştir. 6. dakika sonunda saptanmış olan absorbans değeri esas alınarak, başlangıç değerine göre yüzde azalma oranı (inhibisyon oranı) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon oranı (\%)} = \frac{\text{Başlangıç absorbans değeri} - \text{Son absorbans değeri}}{\text{Başlangıç absorbans değeri}}$$

10 µL örnek alınarak yapılan bu işlemler en az 3 kez tekrarlanmış ve inhibisyon oranları hesaplanarak bunların ortalaması alınmıştır. Daha sonra, yine küvet içeriği 1 mL olacak şekilde 20 ve 30 µL örnek hacimlerine karşı, sırasıyla 980 ve 970 µL radikal çözeltisi eklenerek aynı işlemler tekrarlanmıştır. Elde edilen ortalama yüzde inhibisyon değerleri örnek hacimlerine (10, 20 ve 30 µL) karşı bir grafiğe aktarılmış ve bu verilere doğrusal regresyon analizi uygulanarak örneğe ilişkin eğriye ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır. Analize başlamadan önce örneklerle uygulanan spektrofotometrik uygulamalar farklı konsantrasyonlarda hazırlanan troloks standartlarına da uygulanmış, ortalama inhibisyon değerleri hesaplanarak troloks konsantrasyonuna karşı grafiğe işlenmiştir. Elde edilen verilere doğrusal regresyon analizi uygulanmak suretiyle, troloks standart eğrisine ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır. Örneğe ait yüzde inhibisyon eğrisinin eğiminin, troloks standart eğrisinin eğimine oranlanmasıyla örneğin antioksidan aktivitesi belirlenmiş ve TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity–troloks eşdeğer antioksidan aktivite) olarak ifade edilmiştir (Kırca ve Özkan 2007). Denemede kullanılan fikosiyaninin saflık oranı 3.5-4.0 olarak belirlenmiş ve 10.000 Da'luk ultrafiltrasyon tüpü (Sartorius, Almanya) ile yoğunlaştırılarak konsantrasyonu 1 mg/mL düzeyine çıkartılmıştır.

3.2.11.5 Antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesi

18 saat sıvı besiyerinde geliştirilmiş indikatör mikroorganizmalar % 1 oranında 5 mL yarı-katı (sıvı + % 0.75 agar) besiyerine inoküle edilmiştir. Petrilerdeki katı agarın (sıvı + % 1.5 agar) yüzeyine indikatörün bulunduğu yarı-katı besiyeri yayılmıştır. Katılaştıran yarı-katı besiyeri yüzeyine saflaştırılmış fikosiyanın örneğinden 10 µL olacak şekilde yüzeye nokta ekim yöntemiyle (spot on lawn) direkt olarak pipetlenmiş ve Petriler uygun sıcaklıkta 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Petrilerde inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiştir (Bhunja vd. 1991). Denemede kullanılan fikosiyanın saflık oranı 3.5-4.0 olarak belirlenmiş ve 10.000 Da'luk ultrafiltrasyon tüpü ile yoğunlaştırılarak konsantrasyonu 1 mg/mL düzeyine çıkartılmıştır. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, gelişme ortamları ve uygun gelişim sıcaklıkları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, gelişme ortamları ve uygun gelişim sıcaklıkları

Bakteri adı	Gelişme ortamı	Gelişme sıcaklığı	Kaynak
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	LB (Sigma)	37°C	A.Ü.F.F.* Mikrobiyoloji laboratuvarı
<i>Candida albicans</i> ATCC 26555	TSB (Merck)	30°C	A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez laboratuvarı
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25295	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği laboratuvarı
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği laboratuvarı
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	TGE (Difco)	30°C	A.Ü.F.F. Mikrobiyal Genetik laboratuvarı
<i>Leu. mes. subsp. dextranicum</i> NRLL 3469	TGE	30°C	A.Ü.F.F. Mikrobiyal Genetik laboratuvarı
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	TSB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği laboratuvarı
<i>Salmonella enterica</i> serotype Typhimurium SL 1344	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği laboratuvarı
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği laboratuvarı

*A.Ü.F.F: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi

3.2.12 MALDI-TOF kütle spektrometresi ile fikosiyaninin (α ve β ünitelerinin) tanımlanması

3.2.12.1 Protein kümelerinin kesimi ve jel içinde tripsin sindirimi (tripsinizasyon)

Tripsin sindirimi işlemi, Shevchenko vd. (1998) önerdikleri yöntemde bazı modifikasyonlar yaparak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla SDS-PAGE’de görüntülenen α ve β üniteleri robotik bir sistem olan spot kesim cihazında (SporCutter, ABD) 1 mm çaplı daire parçaları şeklinde kesilmiştir. Kesimi yapılan parçalar, her bir kuyucuğuna daha önce 200’er mL ddH₂O koyulan V tabanlı plaka kuyucuklarına robotik kol tarafından aktarılmıştır. Kesim işleminin ardından jel içinde sindirim işlemi (tripsinizasyon) gerçekleştirilmiştir. Öncelikle amonyum bikarbonat ve asetonitril ile jel parçalarının boyası uzaklaştırılmıştır. Daha sonra DTT ile redükleme, iyodoasetamid ile alkilleme yapılmıştır. Bu işlemlerin ardından her bir kuyucuğa 30 mL 50 mM amonyum bikarbonat içinde 150 ng tripsin enzimi koyularak enzimin kendi kendini sindirmeden jele geçmesi için 30 dakika oda ısısında bekletilmiş ve enzimin sindirim işlemini gerçekleştirebilmesi için de gece boyu 37°C’de inkübe edilmiştir. Daha sonra ekstraksiyon tamponu (% 1 formik asit, % 2 asetonitril) ile jel içinde sindirilmiş olan peptitler elde edilip temiz bir polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) plakasına alınarak kurumaya bırakılmıştır. Tüm bu işlemler kontaminasyonu engellemek amacıyla laminar akışlı kabinde yapılmıştır.

3.2.12.2 MALDI-TOF kütle spektrometresi için örnek hazırlama ve ölçüm

Uygun bir şekilde yıkanmış olan temiz MALDI-TOF örnek yükleme plakasının kuyucukları önce saf su, daha sonra asetonitril ile temizlenmiş ve kuruması beklenmiştir. İyonlaşmayı sağlayacak matriks olarak kullanılmak üzere α -siyano-4-hidroksikinamik asit (CHCA), mg başına 50 μ L olacak şekilde matriks çözücü tamponunda (% 75 asetonitril, % 0.1 trifloro asetik asit) çözülmüştür. PZR plakasında kuru bir şekilde bulunan yüklenecek peptit örneklerinin üzerine eşit hacimlerde önce örnek çözücü tamponu (% 50 asetonitril, % 0.1 trifloro asetik asit) eklenerek pipetleme

ile peptitler tampona geçirilmiş, sonra da matriks tamponu eklenerek MALDI-TOF örnek yükleme plakasının kuyucuklarına 1.5 µL yükleme yapılmıştır.

MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonu örnek plakasında bulunan “Lock Mass” kalibrasyon kuyucuklarına yüklenen ve moleküler ağırlıkları bilinen beş peptit karışımı ile yapılmıştır (dış kalibrasyon). Bu amaçla, adrenokortikotropik hormon (ACTH) 18-19, (Glu1)-fibrinopeptit B (Glu-Fib), substance P, renin-14 ve anjiyotensin 1 peptitleri son konsantrasyonları 10-40 pmol olacak şekilde stok çözeltilerden örnek çözücü tamponuyla seyreltilmiştir. Kalibrasyonda kullanılan peptitlerin moleküler ağırlıkları Çizelge 3.2’de verilmiştir. Yapılan canlı kalibrasyon sonrası peptit karışımı tekrar okunarak ölçümün doğruluğu test edilmiştir. Kalibrasyon işleminin ardından yapılan tüm ölçümler MALDI-TOF kütle spektrometresinde (Waters, İngiltere) 800-3000 m/z arasında ve refletron pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2 MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonunda kullanılan peptitlerin kütleleri

Peptitin adı	Kütlesi (Da)
ACTH 18-19	2465.1989
Renin-14	1758.9326
Glu-Fib	1570.6774
Substance P	1347.7360
Anjiyotensin 1	1296.6853

3.2.12.3 Peptit kütle verilerinin biyoinformatik analizi ve protein tanımlama

Her bir kuyucuk için elde edilen çekimlerin MassLynx 4.0 programında ortalaması alınmış ve yine aynı programda arka plan çıkarımı işlemine tabi tutulmuştur. Yukarıda belirtilen ön işlemlere tabi tutulan spektrumlarda kirlilikten ve matriksten gelen piklerin de bulunması sebebiyle belirli yoğunluğun üstünde olan peptit m/z değerlerinin monoizotopik değerleri elle yazılmıştır. Peptit kütle değerlerinin analizinde Mascot (<http://www.matrixscience.com>) arama motoru kullanılmıştır. Mascot veri analizlerinde, peptit örneklerine iyodoasetamit ile alkilleme yapıldığı için sistemin

karbamidometillenmesi sabit modifikasyon olarak işaretlenmiş, değişken modifikasyonu seçilmemiş, peptit toleransı 1.2 Da olarak seçilmiş, bir kaçırılan kesime izin verilmiş, taksonomi olarak “Bacteria” işaretlenmiş ve SwissProt veri tabanı kullanılmıştır. Ayrıca SwissProt/UniprotKB (<http://www.uniprot.org/>) veritabanında mevcut olan farklı organizmalara ait fikosiyanın proteinleri sanal triptik kesime uğratılmış (sistein karbamidometillenmesi işaretlenmiştir) ve elde edilen bulgular deneysel *m/z* değerleri ile karşılaştırılmıştır. MALDI-TOF kütle spektrometresi çalışmaları Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Proteom Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu aşaması Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Proteom Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

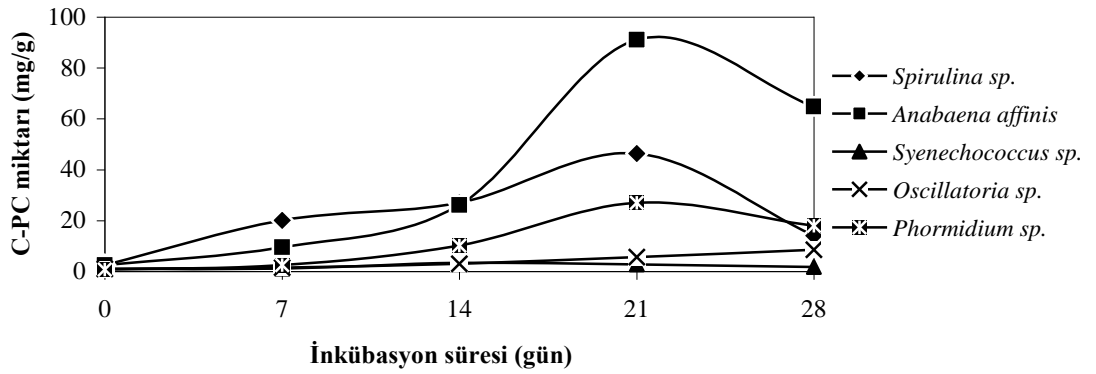
3.2.12 İstatistik analiz

Çalışma boyunca elde edilen deneme sonuçları SPSS (versiyon 11.0, ABD) paket programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Siyanobakteri Suşlarının Fikosiyanin Miktarlarının Karşılaştırılması

Fikosiyanin, *Spirulina platensis*, *Spirulina fusiformis*, *Spirulina maxima*, *Synechococcus* sp., *Oscillatoria quadripunctulata*, *Aphanizomenon flos-aquae* ve *Phormidium fragile* gibi birçok siyanobakteri türünden ekstrakte edilmiş ve saflaştırılmıştır (Eriksen 2008). Ancak siyanobakterilerden çok azı yüksek miktarda fikosiyanin üretme yeteneğine sahip olduklarından ve elde edilen fikosiyaninin saflaştırma aşamasında yaklaşık % 70'lik bir kaybı söz konusu olduğundan verimli bir üretim için yüksek verimli suşlara ihtiyaç duyulmaktadır (Patil vd. 2006, Singh vd. 2009). Çalışmada kullanılan 5 adet siyanobakteri suşundan elde edilen fikosiyanin miktarlarının günlere göre değişimi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. *Oscillatoria* sp. hariç tüm suşlar 21. günde en yüksek fikosiyanin miktarına ulaşmış ve *Anabaena affinis* suşu 91.14 mg/g (verim % 9.1) fikosiyanin miktarı ile en verimli suş olarak belirlenmiştir.



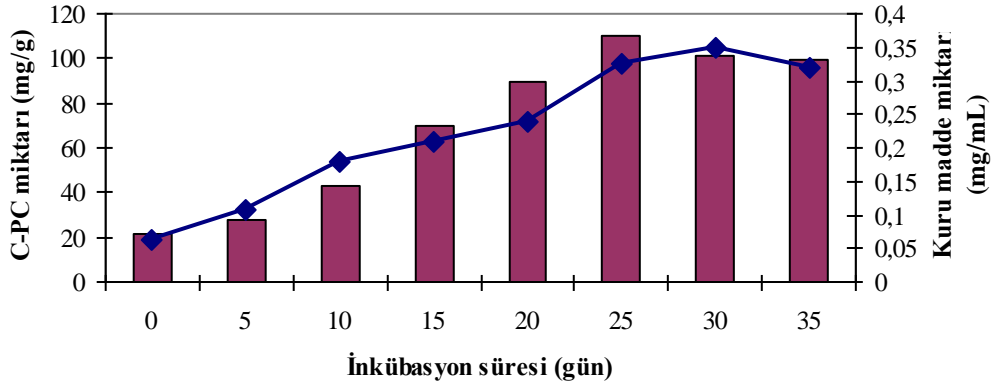
Şekil 4.1 Siyanobakteri suşlarının fikosiyanin miktarlarının günlere göre değişimi

Çeşitli araştırmacılar tarafından biyokütle ve biyokütlerdeki C-PC miktarı belirlenerek C-PC verimi ortaya konulmuştur. Rodriguez vd. (1989), *Anabaena* sp. ile yaptıkları çalışmada C-PC verimini % 8.3 (kuru ağırlık); Moreno vd. (1995), bazı *Anabaena* ve *Nostoc* türlerinin C-PC verimini % 10-17 arasında belirlemişlerdir. Takano vd. (1995) Japonya'nın kıyı kesimlerinden 150 adet siyanobakter suşu izole ettikleri ve

fikosiyanin verimi açısından karşılaştırdıkları çalışmada *Synechococcus* sp. NKBG042902 kodlu suşun 102 mg/g kuru hücre fikosiyanin üretimi ile *Spirulina platensis*'ten (90 mg/g kuru hücre) daha verimli olduğunu belirlemişler ve fikosiyanin üretimi açısından *S. platensis*'e alternatif bir suş olabileceğini önermişlerdir. Moraes vd. (2010) *S. platensis* ile yaptıkları çalışmada fikosiyanin miktarını 82.48 mg/g, Silveira vd. (2007) ise 46.8 mg/g olarak tespit etmişlerdir. Herrera vd. (1989), *S. maxima* suşundan % 7.7 verimle C-PC elde etmişlerdir.

Çalışma boyunca kullanılacak olan inkübasyon süresini tespit edebilmek için *Anabaena affinis* suşunun fikosiyanin üretiminin günlere göre değişimi belirlenmiş ve en yüksek fikosiyanin veriminin elde edildiği inkübasyon süresi tespit edilmiştir. Şekil 4.2 incelendiğinde *Anabaena affinis* suşunun 110.52 mg/g fikosiyanin miktarı ile en yüksek verimi 25. günde gösterdiği, kuru madde miktarının ise 0.35 mg/mL ile 30. günde en yüksek değere ulaştığı ve sonrasında düşüşe geçtiği tespit edilmiştir. Bu durumda en yüksek fikosiyanin verimine ulaşıldığı 25. gün en uygun inkübasyon süresi olarak belirlenmiş ve bundan sonraki deneylerde 25. günde inkübasyona son verilerek analizler yapılmıştır.

Anabaena sp. ile yapılan bazı çalışmalarla karşılaştırıldığında *Anabaena affinis* suşunun fikosiyanin veriminin oldukça yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Prasanna vd. (2006) 30 adet *Anabaena* sp. suşu ile yaptıkları çalışmada en düşük 0.3 µg/mL, en yüksek 26.80 µg/mL fikosiyanin miktarı tespit etmişlerdir. *Anabaena affinis* suşunun 110.52 mg/g (36.03 µg/mL) fikosiyanin miktarı ile bu çalışmada kullanılan *Anabaena* sp. suşlarına kıyasla oldukça yüksek fikosiyanin içerdiği görülmüştür. Moreno vd. (2003) *Anabaena* sp. ATCC 33047 suşu ile yaptıkları çalışmada kuru biyokütledeki fikosiyanin verimini % 7.25 olarak belirlerken, *Anabaena affinis* ile yapılan bu çalışmada fikosiyanin verimi % 11.05 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2 *Anabaena affinis* suşunun fikosiyanin ve kuru madde miktarı açısından gelişim kurvesi (Bar, C-PC miktarı; Çizgi, kuru madde miktarı)

Bir siyanobakteri türü olan *Spirulina* ve bir kırmızı alg türü olan *Porphyridium*, fikosiyanin üretimi açısından asıl organizmalar olarak kabul edilse de (Román vd. 2002) yapılan çalışmalar *Anabaena*'nın ve diğer bazı siyanobakteri türlerinin de alternatif fikosiyanin üreticileri olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda *Anabaena affinis* suşunun fikosiyanin üretimi açısından uygun ve *Spirulina*'ya alternatif bir suş olabileceği önerilmiştir. *Anabaena affinis* suşunun mikroskopik görüntüsü EK 1'de gösterilmiştir.

4.2 Fikosiyanin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

C-PC ekstraksiyonu için çok çeşitli yöntemler denenmiş olmasına rağmen, maksimum C-PC üretimi için standart bir yöntem henüz belirlenmemiştir. Kullanılan yöntemlerde verim ve saflığın oldukça düşük kaldığı bildirilmiştir (Soni vd. 2006). Ekstraksiyon aşamasında, ekstraksiyon yöntemi, ekstraksiyon tamponunun çeşidi, biyokütle-tampon oranı ve ekstraksiyon süresi gibi çok çeşitli faktörler fikosiyanin miktarını etkilemektedir (Abalde vd. 1998, Reis vd. 1998). Bu nedenle minimum maliyette ve maksimum verimde fikosiyanin elde etmek için optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi gerekmektedir (Moraes vd. 2010). Bu amaçla çalışmada optimum fikosiyanin ekstraksiyonun sağlandığı parametreler belirlenmiştir.

4.2.1 Optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi

Uygun ekstraksiyon yönteminin seçimi maksimum C-PC verimi elde edilebilmesi açısından oldukça önemlidir (Soni vd. 2006). Hücre duvarının parçalanması ve suda çözünür fikobiliproteinlerin açığa çıkartılmasını amaçlayan çeşitli yöntemler kullanılarak hem ıslak hem de kuru biyokütleden C-PC ekstraksiyonu çalışmaları yapılmıştır (Eriksen 2008). Birçok araştırmacı tarafından ıslak biyokütleden C-PC ekstraksiyonunda dondurma-çözme yönteminin etkili olduğu bildirilmiştir (Abalde vd. 1998, Doke 2005, Soni vd. 2006).

Çizelge 4.1 incelendiğinde, en yüksek C-PC miktarının 3, 12, 13 ve 14. yöntemler ile elde edildiği ve aralarındaki farkın önemsiz olduğu ($p>0.05$); saflık açısından değerlendirildiğinde ise 2, 12 ve 14. yöntemler ile yüksek saflıkta ürün elde edildiği ve aralarındaki farkın önemsiz olduğu ($p>0.05$) belirlenmiştir. Homojenizasyon ve lizozim yöntemi ile yapılan ekstraksiyonda verim ve saflığın düşük kaldığı görülmüştür. Uygulanan ekstraksiyon yöntemlerine ilave olarak yapılan “4°C’de 1 gece bekletme” uygulamasının C-PC miktarını hemen hemen 2 kat artırdığı da elde edilen bulgular arasındadır ve bu bulgunun ekstraksiyon verimi açısından oldukça önemli olduğu görülmüştür. Sonikasyon yöntemi, ekstraksiyon süresinin kısılması, solvent tüketiminin azalması ve daha etkili hücre parçalanması sağlanması nedenleriyle avantajlı; yüksek güç tüketimi ve ölçek büyütme elverişli olmaması nedenleriyle de dezavantajlıdır. Tüm yöntemlerin kendi içinde avantaj ve dezavantajları değerlendirildiğinde, daha kısa sürede gerçekleşmesi, verim saflık oranının yüksek olması gibi faktörler, sonikasyonu diğer yöntemlere göre daha cazip kılmıştır ve bu durumda “**sonikasyon + 4°C’de 1 gece bekletme**” yöntemi optimum ekstraksiyon yöntemi olarak belirlenmiştir. Niu vd. (2007), bu sonuca benzer olarak sonikasyonun, dondurma-çözme ve ozmoza göre daha etkili olduğunu bildirmiştir. Abalde vd. (1998) ise *Synechococcus* sp. 109201 ile yaptıkları çalışmada en etkili yöntemin dondurma-çözme olduğunu göstermiştir. Soni vd. (2006), fikosiyanın ekstraksiyonu için tekrarlanan dondurma çözündürme yöntemini kullanmışlar ve bu yöntemde kullanılan sıcaklıkların standardize edilmesi halinde çok iyi sonuçlar alınabileceğini bildirmişlerdir. Doke (2005), yüksek saflıkta ve miktarda fikosiyanın ekstraksiyonu için en etkili ekstraksiyon yönteminin 86.6 mg/g miktar ve

1.34 saflık oranı ile -21°C’de dondurma, 4°C’de çözme yöntemi olduğunu bunun yanı sıra sıvı azotta dondurma ve ultrasonikasyon yöntemlerinin zayıf geri dönüşüm ve düşük saflık göstermesi nedeniyle etkisiz olduğunu bildirmiştir. Doke (2005) ayrıca fikosiyanın ekstraksiyonunun hücrenin parçalanma yöntemi, çözgenin çeşidi ve ekstraksiyon süresi gibi çeşitli faktörlerden etkilendiğini belirtmiştir.

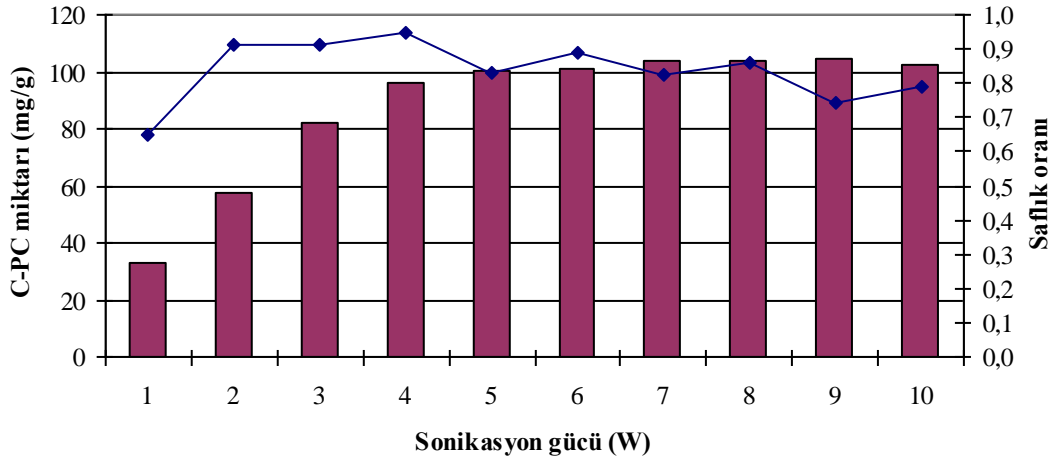
Çizelge 4.1 Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen fikosiyanın miktarı ve saflığı

Yöntem No.	Ekstraksiyon Yöntemleri	Fikosiyanın Miktarı (mg/g)	Saflık (A ₆₂₀ /A ₂₈₀)
1	-65°C’de dondurma/30°C’de çözme	72.19 ± 1.3 ^{bcd}	0.53 ± 0.06 ^{ab}
2	-65°C’de dondurma/4°C’de çözme + 4°C’de 1 gece bekletme	111.91 ± 2.3 ^g	0.88 ± 0.07 ^d
3	-65°C’de dondurma/30°C’de çözme + 4°C’de 1 gece bekletme	123.80 ± 3.6 ^h	0.83 ± 0.09 ^{cd}
4	-65°C’de dondurma/30°C’de çözme + Sonikasyon	98.17 ± 4.3 ^f	0.82 ± 0.04 ^{cd}
5	-21°C’de dondurma/30°C’de çözme	66.86 ± 3.8 ^{cde}	0.50 ± 0.02 ^{ab}
6	-21°C’de dondurma/30°C’de çözme + 4°C’de 1 gece bekletme	76.90 ± 5.1 ^b	0.50 ± 0.11 ^{ab}
7	-21°C’de dondurma/4°C’de çözme	94.21 ± 1.5 ^f	0.80 ± 0.02 ^{cd}
8	-21°C’de dondurma/30°C’de çözme + Sonikasyon	80.18 ± 1.1 ^{de}	0.64 ± 0.06 ^{bc}
9	Sonikasyon	70.00 ± 8.3 ^{bc}	0.58 ± 0.14 ^{ab}
10	Homojenizasyon	35.55 ± 0.3 ^a	0.37 ± 0.11 ^a
11	Lizozim + EDTA (30°C’de 24 saat)	82.28 ± 4.3 ^e	0.43 ± 0.05 ^{ab}
12	Sonikasyon + 4°C’de 1 gece bekletme	122.23 ± 1.2 ^h	0.89 ± 0.19 ^d
13	-65°C’de dondurma/30°C’de çözme + Sonikasyon + 4°C’de 1 gece bekletme	126.62 ± 1.9 ^h	0.84 ± 0.04 ^{cd}
14	-21°C’de dondurma/30°C’de çözme + Sonikasyon + 4°C’de 1 gece bekletme	123.97 ± 4.8 ^h	0.86 ± 0.08 ^d

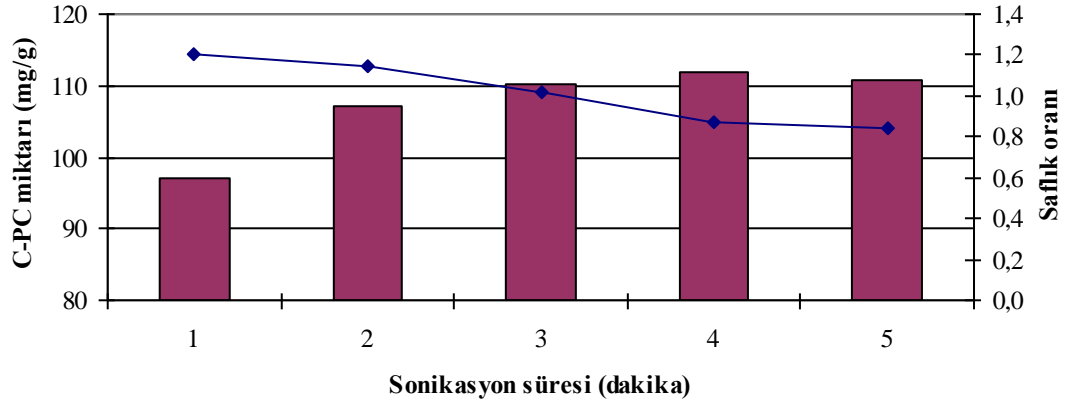
Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.05)

4.2.2 Optimum sonikasyon parametrelerinin belirlenmesi

Uygulanan sonikasyon gücü ve süresi, sonikasyon yönteminin verimini etkiler. Denemede optimum sonikasyon gücünü belirlemek için 1 dakika süre ile 1-10 W aralığında farklı sonikasyon güçleri uygulanmıştır. Sonikasyon süresi ve örnek hacmi de dikkate alınarak spesifik enerji belirlenmiştir. En yüksek fikosiyanın üretiminin 4 Watt ve üstündeki sonikasyon güçlerinde sağlandığı ve elde edilen değerlerin istatistik açıdan birbirinden farklı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Saflık oranı açısından bakıldığında 4 Watt ve üzerinde uygulanan sonikasyon güçlerinde saflığın giderek azaldığı görülmüştür (Şekil 4.3). Harcanan enerji miktarı da dikkate alındığında optimum sonikasyon gücü 4 W olarak tespit edilmiştir. Sonikasyon gücü sabit tutularak 1-5 dakika aralığında farklı sonikasyon süreleri de denenmiştir. 2 dakika ve üstünde uygulanan sonikasyon sürelerinde elde edilen fikosiyanın miktarlarının istatistik açıdan birbirinden farklı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Saflık oranı ise süre arttıkça düşmektedir. Bu nedenle yüksek miktarda fikosiyanın elde edilebilecek en düşük süre olan 2 dakika en uygun değer olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak 4 W'da 2 dakika süre ile uygulanan sonikasyon koşullarının maksimum fikosiyanın üretimi ve saflığı açısından yeterli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3 Farklı sonikasyon güçlerinin fikosiyanın miktarı üzerine etkisi (Bar, C-PC miktarı; Çizgi, Saflık oranı)



Şekil 4.4 Farklı sonikasyon sürelerinin fikosiyenin miktarı üzerine etkisi (Bar, C-PC miktarı; Çizgi, saflık oranı)

4.2.3 Optimum ekstraksiyon tamponunun belirlenmesi

Denemeye alınan tampon çözeltilerden 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.0- pH 7.0) ve 100 mM CaCl_2 çözeltisi en yüksek fikosiyenin miktarı ve saflığı ile en etkili ekstraksiyon çözeltileri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Bu sonuçlara benzer olarak, Ramos vd. (2010), *Anabaena marina* suşu ile yaptıkları çalışmalarında fikosiyenin fosfat, asetat ve su ile ekstraksiyonunu karşılaştırmış ve fosfat tamponunun diğerlerine göre daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Silveria vd. (2007), fosfat tamponunun (pH 7.0) çalışmasında kullandığı diğer tamponlara göre daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir.

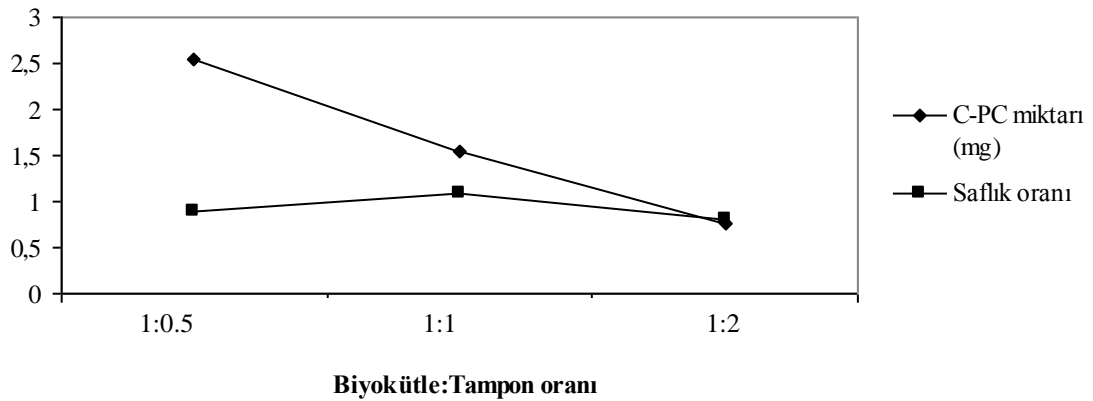
Çizelge 4.2 Farklı tamponlar ile elde edilen fikosiyanın miktarı ve saflığı

Ekstraksiyon Tamponları	Fikosiyanın miktarı (mg/g)	Saflık değeri (A_{620}/A_{280})
100 mM sodyum asetat tamponu (pH 5.0)	69.09 ± 0.4 ^a	0.99 ± 0 ^b
100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.0)	133.14 ± 12.5 ^d	1.04 ± 0.1 ^b
100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0)	130.44 ± 5.1 ^d	0.90 ± 0.1 ^b
100 mM Tris-Cl tamponu (pH 8.0)	47.95 ± 4.3 ^a	0.35 ± 0 ^a
100 mM CaCl ₂	125.68 ± 12.9 ^d	1.01 ± 0 ^b
100 mM NaCl	111.17 ± 8.8 ^{cd}	1.05 ± 0.1 ^b
Saf su	104.23 ± 3.4 ^c	1.00 ± 0.1 ^b

Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$)

4.2.4 Optimum ekstraksiyon tamponu miktarının belirlenmesi

Silveria vd. (2007), biyokütle-tampon oranının fikosiyanın konsantrasyonu üzerinde etkili olduğunu ve biyokütle-tampon oranı arttıkça fikosiyanın konsantrasyonunun da arttığını bildirmiştir. Bu bulguya paralel olarak çalışmada en yüksek fikosiyanın üretiminin 2.54 ± 0.24 mg ile en yüksek biyokütle-tampon oranından (1:0.5) elde edildiği ve istatistik olarak diğerlerinden farklı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Bunun yanında farklı biyokütle-tampon oranlarından elde edilen saflık oranlarının birbirinden farklı olmadığı ($p > 0.05$) yani biyokütle-tampon oranının fikosiyanın saflığına etki etmediği belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Biyokütle-tampon oranının fikosiyanın miktarı ve saflığı üzerine etkisi

4.3 Fikosiyanin Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Sınırlı sayıdaki siyanobakteri suşu yüksek miktarda fikosiyanin üretim yeteneğine sahip olduğundan yüksek verimli suşların araştırılması ve tespit edilen suşun kültürel koşullarında değişiklikler yaparak suşun fikosiyanin üretiminin artırılması gerekmektedir (Singh vd. 2009). Siyanobakterilerin üretiminde azot kaynağı, karbon kaynağı, pH, sıcaklık, ışık gibi etkenler büyük önem taşır (Conk Dalay vd. 2008). Bu nedenle çalışmada *Anabaena affinis* suşundan yüksek miktarda fikosiyanin elde edebilmek için; besiyerinin optimum bileşen miktarları, optimum besiyeri pH'sı, optimum gelişme sıcaklığı, optimum inokülasyon oranı ve optimum ışık kaynağı belirlenmiştir.

4.3.1 Besiyeri bileşenlerinin optimizasyonu

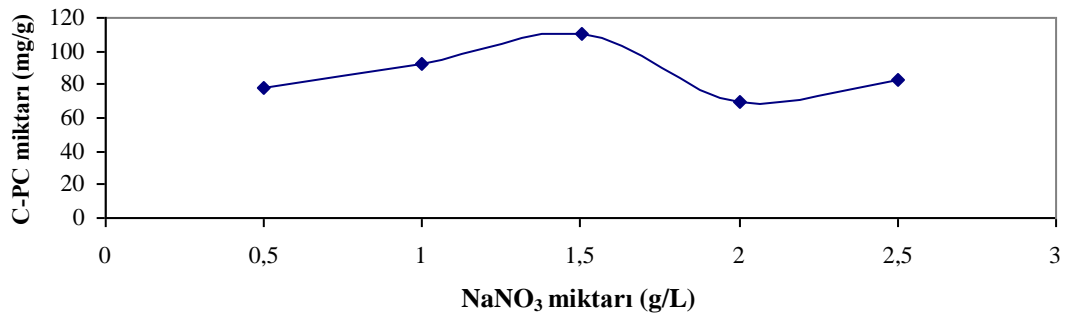
Yapılan çalışmalar kültür ortamının (besiyeri) bileşenleri ve kültür ortamının şartlarının optimize edilmesi sonucunda biyokütle ve fikosiyanin miktarında artış sağlanabileceğini göstermiştir. Sekar ve Chandramohan (2008), *Phormidium tenue* BDU 46241 suşu ile yapılan optimizasyon çalışmasında biyokütle ve fikobillerin miktarının, *Phormidium valderianum* BDU 30501 suşu ile yapılan çalışmada ise biyokütle ve fikosiyanin miktarının arttığını ifade etmişlerdir. Kathiresan vd. (2006) *Porphyridium* spp. ile yaptıkları çalışmada besiyerinin ana bileşenleri olan NaCl, MgSO₄, NaNO₃ ve K₂HPO₄ miktarlarını optimize etmişler ve elde ettikleri optimum koşullarda fikobiliprotein miktarının % 4.8 oranında arttığını göstermişlerdir. Singh vd. (2009), besiyeri bileşenlerinin optimizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada *Phormidium ceylanicum* suşu ve BG11 besiyeri kullanmışlar ve optimum NaNO₃ miktarını 4.0-4.5 g/L, optimum iz element karışımı miktarını 0.9-1.0 mL/L ve optimum CaCl₂ miktarını 0.2-0.25 olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada *Phormidium ceylanicum*'un optimum ortam koşulları altında 32 günde BG11 ortamı kullanılarak kültüre alındığında, fikosiyanin üretiminin 2.3 kat arttığını gözlemlemişlerdir.

Siyanobakterilerin gelişiminde en çok kullanılan azot kaynakları nitrat, amonyak ve üredir. Bunların seçimi türe ve optimum pH'ya bağlıdır. Azot kaynağındaki değişim organizmanın metabolik yolları üzerinde etki göstererek organizmanın kompozisyonunun değişmesine neden olur (Conk Dalay vd. 2008). Çalışmada besiyerine 1.5 g/L NaNO₃ katılması halinde 110.44 ± 0.3 mg/g ile en yüksek fikosiyanın üretiminin sağlandığı ve istatistik olarak bu değer diğerlerinden farklı olduğu (p<0.05) tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

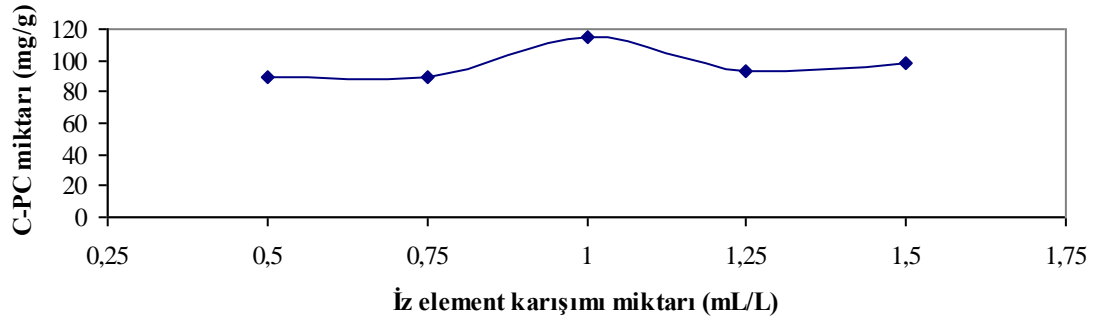
Besiyerine 1 mL/L düzeyinde iz element karışımı katılması durumunda 115.31 ± 3.3 mg/g ile en yüksek fikosiyanın üretiminin sağlandığı ve istatistik olarak bu değer diğerlerinden farklı olduğu (p<0.05) tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

105.69 ± 9.2 mg/g fikosiyanın miktarı ile en yüksek fikosiyanın üretimi 0.05 g/L düzeyinde CaCl₂ kullanılması durumunda elde edilmiş ve bu değer diğerlerinden farklı olduğu (p<0.05) belirlenmiştir (Şekil 4.8).

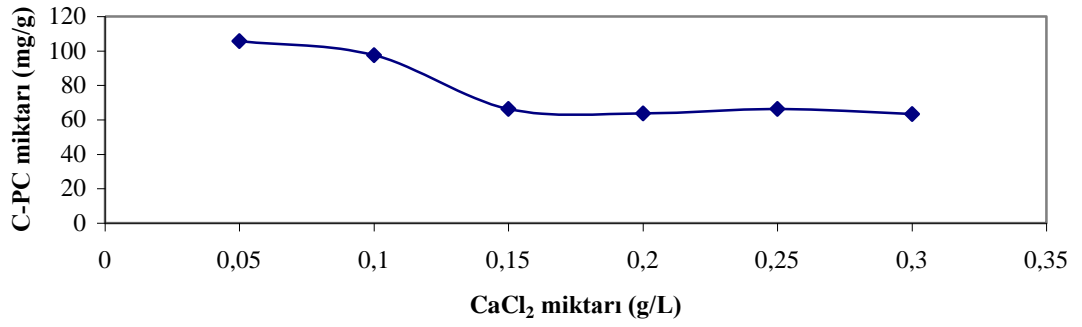
Biyokütle üretiminde yeterli miktarda karbon sağlanması hayati önem taşımaktadır. Karbon kaynağı olarak olarak, CO₂ veya karbonatlı bileşikler kullanılır. Çalışmada karbon kaynağı olarak farklı oranlarda Na₂CO₃ kullanılmış ve 0.05 g/L düzeyinde Na₂CO₃ kullanılması durumunda 105.03 ± 3.4 mg/g ile en yüksek fikosiyanın üretiminin gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu değer istatistik olarak 0.02, 0.03, 0.04 g/L oranlarında kullanılan Na₂CO₃ ile benzerlik göstermektedir (p>0.05) (Şekil 4.9).



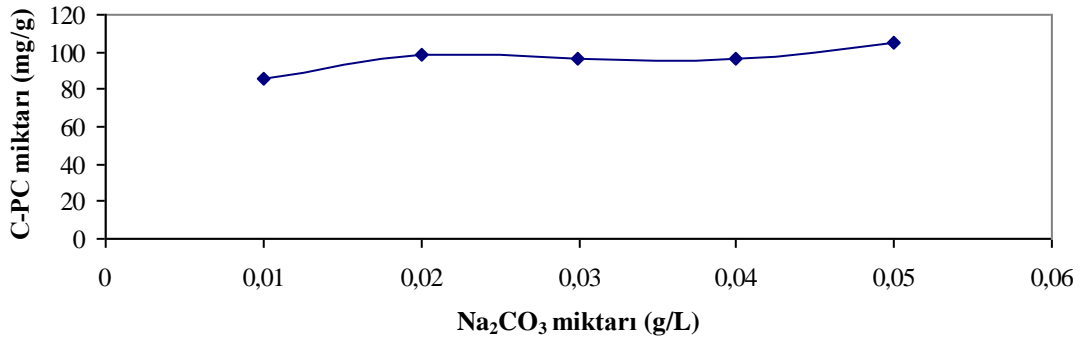
Şekil 4.6 NaNO₃ miktarının fikosiyanın üretimi üzerine etkisi



Şekil 4.7 İz element karışımı miktarının fikosiyanın üretimi üzerine etkisi



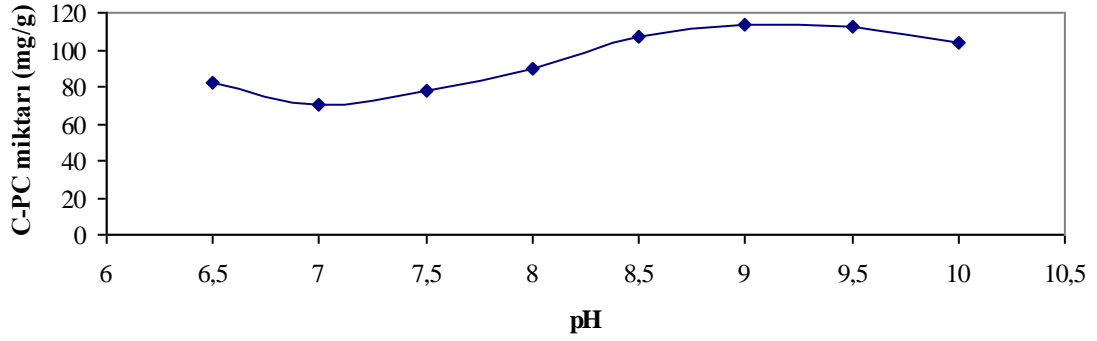
Şekil 4.8 CaCl₂ miktarının fikosiyanın üretimi üzerine etkisi



Şekil 4.9 Na₂CO₃ miktarının fikosiyanın üretimi üzerine etkisi

4.3.2 Fikosiyanin miktarına pH'nın etkisi

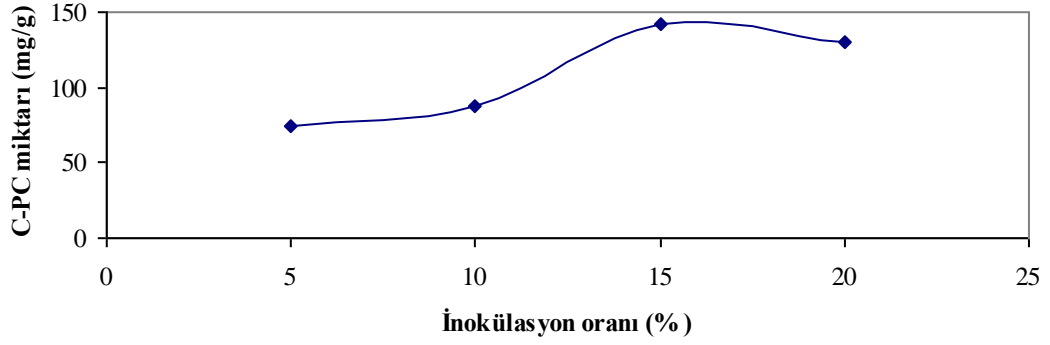
Siyanobakterilerin üretimine etki eden diğer bir parametre ise pH'dır. Her tür, özgün olarak belirli bir pH aralığında üreyebilir ve genel olarak bu aralık 7-9 arasındadır. Kültür için uygun pH'nın sağlanamaması, hücrelerin parçalanarak içeriğinin ortama geçmesine ve kültürün ölümüne yol açar (Conk Dalay vd. 2008). Bu nedenle çalışmada *Anabaena affinis* suşunun maksimum fikosiyanin üretiminin sağlandığı pH değeri belirlenmiştir. Çalışmada en yüksek fikosiyanin üretiminin 113.26 ± 1.6 mg/g ve 112.62 ± 3.2 mg/g ile sırasıyla pH 9.0 ve pH 9.5'te gerçekleştiği ve aradaki farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Besiyerinin farklı pH değerlerinin fikosiyanin miktarı üzerine etkisi

4.3.3 Fikosiyanin miktarına inokülasyon oranının etkisi

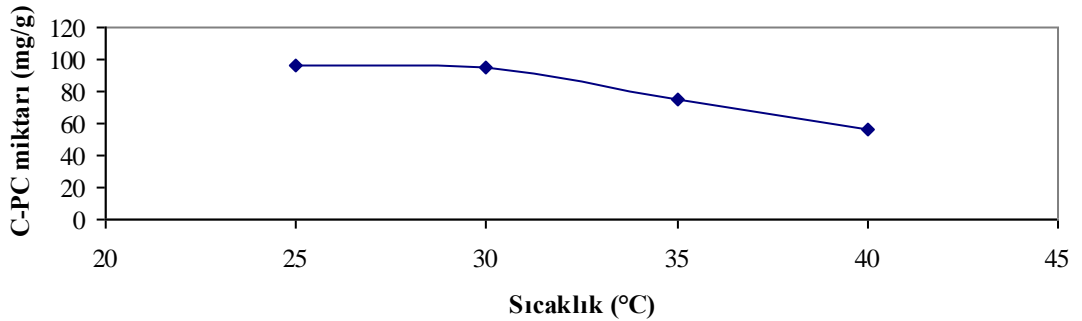
Anabaena affinis suşunun farklı inokülasyon oranlarında ürettiği fikosiyanin miktarları Şekil 4.11'de verilmiştir. Buna göre en yüksek fikosiyanin üretimi 142.06 ± 7.7 mg/g ile % 15 inokülasyon oranında sağlanmıştır ve bu değer istatiki açıdan diğerlerinden farklı bulunmuştur ($p<0.05$). İnokülasyon oranı % 20'ye çıktığında ise fikosiyanin üretimi düşmüştür. Bunun nedenleri olarak, hücre kültürünün artmasına bağlı olarak ortamdaki CO₂ miktarının azalması veya besine olan talep sonucu oluşan rekabetin gelişimi engellemesi gibi nedenler olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.11 Farklı inokülasyon oranlarının fikosiyanın miktarı üzerine etkisi

4.3.4 Fikosiyanın miktarına sıcaklığın etkisi

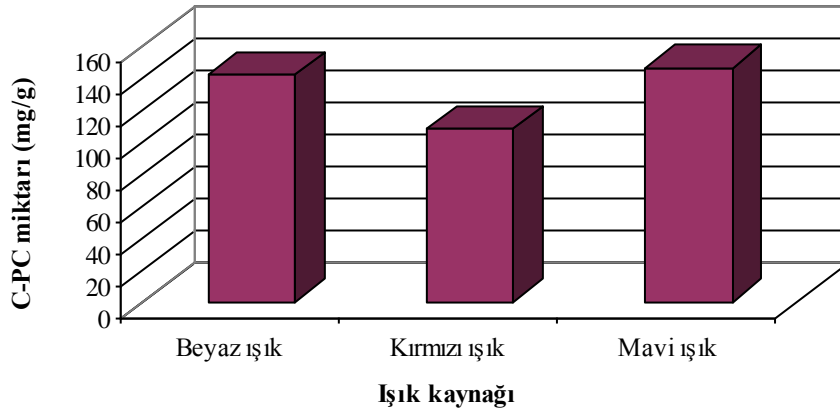
Sıcaklık siyanobakterilerin biyokütle üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Madhyastha ve Vatsala 2007) Siyanobakteriler çok geniş sıcaklık aralıklarında yaşamlarını sürdürebilmektedir. Ancak metabolizmalarına ve fizyolojik aktivitelerine doğrudan etki eden sıcaklık değişimlerine karşı hemen tepki gösterirler. Artan sıcaklıkla birlikte solunum hızı da artmakta ve bu da biyokütle kayıplarına yol açmaktadır. En fazla biyokütle ve fikosiyanın miktarını tespit edebilmek için türe özgü optimum sıcaklığın belirlenmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalar sıcaklığın verimlilik kadar kimyasal yapı üzerinde de etkili olduğunu göstermiştir (Conk Dalay vd. 2008). Bu çalışmada 25°C ve 30°C’de yapılan üretimlerde fikosiyanın miktarının yüksek olduğu ve sıcaklık arttıkça fikosiyanın miktarının azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Farklı inokülasyon oranlarının fikosiyanın miktarı üzerine etkisi

4.3.5 Fikosiyanin miktarına ışık kaynağının etkisi

Siyanobakterilerin gelişiminde ve pigment üretiminde hayati öneme sahip olan bir diğer faktör ise ışıktır (Mishra vd. 2012). Işık kaynağı doğal ya da yapay olabilmekte ve yapay aydınlatma için genellikle floresan lambalar kullanılmaktadır. Mavi ya da kırmızı ışık spektrumu yayan floresanlar, fotosentez için kullanılan en aktif ışık spektrum aralığına sahip olduklarından tercih edilmektedir (Conk Dalay vd. 2008). Bu amaçla çalışmada mavi, kırmızı ve beyaz ışık kaynakları kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Beyaz ve mavi ışık kullanılması durumunda en yüksek fikosiyanin miktarının elde edildiği ve aralarındaki farkın önemsiz olduğu görülmüştür ($p>0.05$). Kırmızı ışığın ise *Anabaena affinis* suşundan fikosiyanin üretimi için uygun bir ışık kaynağı olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.13 Farklı ışık kaynaklarının fikosiyanin miktarı üzerine etkisi

Çeşitli araştırmacılar tarafından bazı önemli pigmentler üzerine ışık kaynağının etkisi araştırılmıştır. Madhyastha ve Vatsala (2007), çalışmalarında farklı fotofiziksel koşullarda *Spirulina fusciformis*'in içerdiği pigmentler üzerine ışık kaynağının etkilerini araştırmışlardır. Günlük elde ettikleri en yüksek biyokütle üretimi beyaz ışık, mavi ışık ve yeşil ışıktaki sırasıyla 0.8 g/L, 0.75 g/L ve 0.69 g/L olarak belirlemişlerdir. Fikosiyanin içeriğinin mavi ışık yoğunluğunda 2 mg/mL'ye yükseldiğini, kırmızı ışık yoğunluğunda (yüksek dalga boyu) ise en yüksek fikosiyanin miktarına ulaşıldığını tespit etmişlerdir. Yüksek ışık yoğunluğunun *Spirulina*'dan fikosiyanin ve fikoeritrin üretiminde daha

uygun olduğunu belirtmişlerdir. Benzer olarak Babu vd. (1991) kırmızı ışıktaki fikosiyanın içeriğinin yeşil ve beyaz ışığa göre daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Takano vd. (1995) *Synechococcus* sp. NKBG042902 suşu ile yaptıkları çalışmada, 63 mg/g fikosiyanın içeriği ile en yüksek üretimin kırmızı ışık ile sağlandığını; yeşil ve mavi ışıkta fikosiyanın miktarının düşük olduğunu (sırasıyla 29 mg/g, 39 mg/g) belirlemişler ve *Synechococcus* sp. NKBG042902 suşundan fikosiyanın üretiminde kırmızı ışık kaynağının alternatif bir ışık kaynağı olabileceğini önermişlerdir. Mishra vd. (2012), *Pseudanabaena* sp. suşu ile yaptıkları çalışmada en yüksek fikosiyanın miktarının kırmızı ışık ile sağlandığını bildirmişlerdir. Çalışmadan elde edilen bulgular literatür ile benzerlik göstermemektedir. Bu farklılığın suş seçiminden ileri gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Ancak ışığın etkilerini tam olarak anlayabilmek için fotokimyasal reaksiyonları moleküler seviyede incelemek gerekmektedir.

Tüm optimizasyon çalışması sonucu elde edilen değerler ile optimizasyon öncesi kullanılan değerler karşılaştırılmış ve fikosiyanın miktarının 106.5 mg/g'dan 143.5 mg/g'a, fikosiyanın veriminin % 10.9'dan % 14.1'e, saflık oranının ise 0.69'dan 0.92'ye yükseldiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Bu sonuçlar hem kültür üretimi sırasında hem de ekstraksiyon aşamasında yapılan optimizasyon çalışmasının fikosiyanın verimini ve saflığını artırdığını göstermiştir.

4.4 Kısmi Olarak Saflaştırılan Fikosiyanın Toksik Özelliğinin ve Stabilitesinin Belirlenmesi

Fikosiyanın toksik özelliğini ve stabilitesini belirlemek amacıyla amonyum sülfatla çöktürme yöntemi ile fikosiyanın kısmi olarak saflaştırılmıştır. Bu sayede hem fikosiyanın konsantrasyonu artırılmış hem de saflık oranı yükseltilmiştir. Kısmi saflaştırma sonrası C-PC konsantrasyonu 1.48 mg/mL, saflığı ise 2.18 olarak belirlenmiştir.

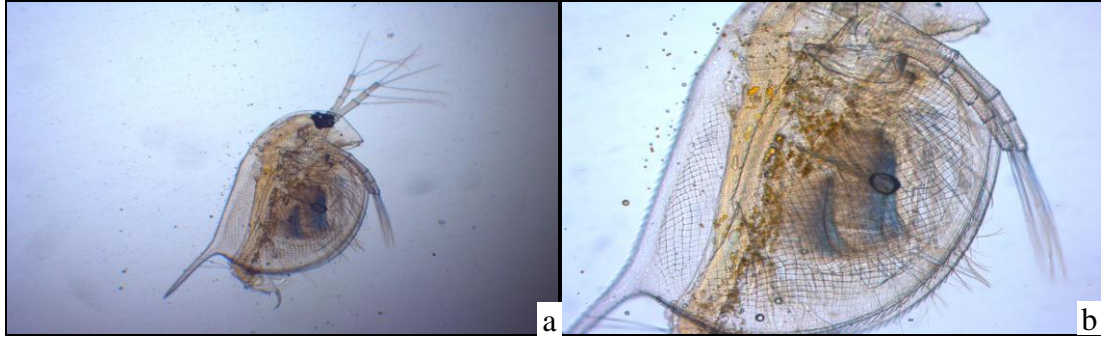
Çizelge 4.3 Optimizasyon sonrası fikosiyanın veriminin karşılaştırılması

	Optimizasyon öncesi	Optimizasyon sonrası
Besiyeri bileşenleri		
NaNO ₃ (g/L)	1.5	1.5
CaCl ₂ (g/L)	0.036	0.050
İz element karışımı (mL/L)	1	1
Na ₂ CO ₃ (g/L)	0.02	0.02
pH	7.5	9.0
İnokülasyon oranı (%)	10	15
Sıcaklık	30°C	30°C
Işık kaynağı	Beyaz	Beyaz
Ekstraksiyon yöntemi	Dondurma-çözme	Sonikasyon +4°C'de 1 gece bekletme
Ekstraksiyon tamponu	Na-fosfat tamponu	Na-fosfat tamponu
Biyokütle -Tampon oranı	1:1	1:0.5
Fikosiyanın miktarı (mg/g)	106.5 ± 3.44	143.5 ± 3.88
Saflık oranı	0.69 ± 0.12	0.92 ± 0.14
Verim	% 10.9	% 14.1

4.4.1 Fikosiyanın toksisitesinin belirlenmesi

Çeşitli siyanobakteri türleri toksin üretme yeteneğine sahip olduğu için siyanobakterilerden elde edilen ürünlere yapılan toksin deneyi önem taşımaktadır (Sabarinathan ve Ganesan, 2008). Bu amaçla çalışmada fikosiyanın *Daphnia magna* (su piresi) organizmasına karşı toksik olup olmadığı belirlenmiştir. Yapılan toksin deneyinde çeşitli konsantrasyonlarda fikosiyanın içeren deney çözeltileri hazırlanmış ve 24 saatlik deney süresi sonunda en yüksek konsantrasyon olan 1 mg/mL'de fikosiyanın *Daphnia magna* organizmasına karşı öldürücü etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Analiz sonrası mikroskopta yapılan incelemede canlıların hareket yeteneklerini kaybetmedikleri ve organlarında hiçbir değişim olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.14). Sabarinathan ve Ganesan (2008) *Westiellopsis* sp.'nin 5 farklı türünden elde ettikleri fikosiyanın toksin deneylerini yapmışlar ve ipek böceğine karşı toksik etki göstermediğini ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir. Naidu vd. (1996), *Spirulina*

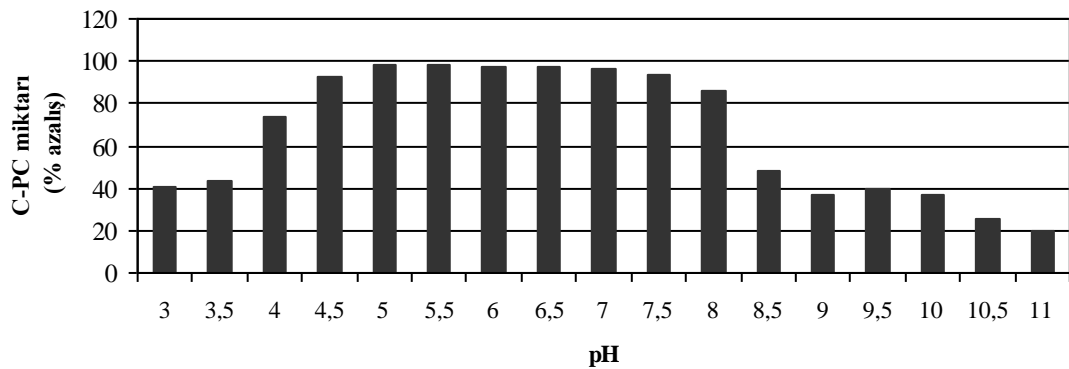
platensis'ten elde ettikleri fikosiyanın fareler üzerindeki toksikolojik etkilerini araştırmışlar ve deney hayvanları tarafından tüketiminin hayvanlarda toksik etki yaratmadığını belirlemişlerdir.



şekil 4.14 24 saatlik deney sonrası canlı *Daphnia magna* organizmasının (a) ve i organlarının görüntüsü (b)

4.4.2 Fikosiyanın stabilitesinin belirlenmesi

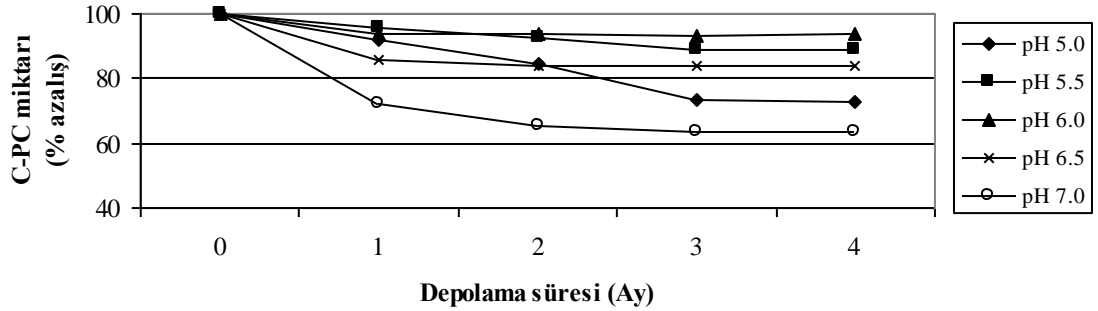
Yapılan n deneme sonrasında fikosiyanınin pH 5-7 aralığında en yüksek stabiliteyi gösterdiği belirlenmiş ve bu nedenle tüm stabilite çalışması pH 5-7 aralığında gerçekleştirilmiştir (şekil 4.15).



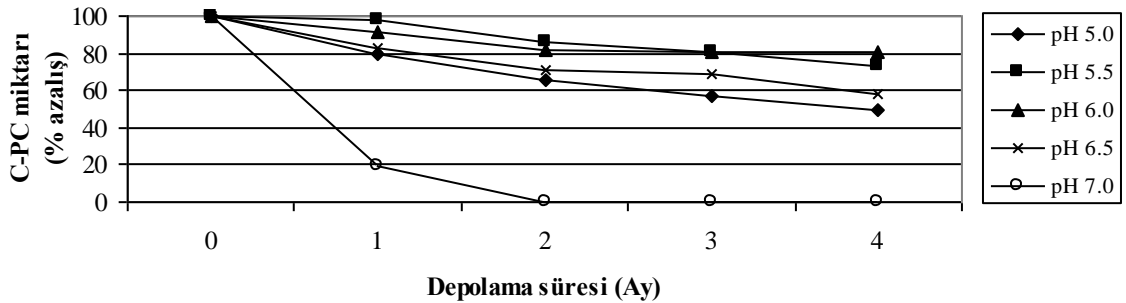
şekil 4.15 24 saat sonunda farklı pH'larda fikosiyanın stabilitesindeki değişim

Fikosiyanın, 4°C'de ve tüm pH derecelerinde dört aylık depolama sonunda stabilitesini yüksek oranda korumuştur. En yüksek stabiliteyi pH 6'da (% 6 azalış) göstermiştir

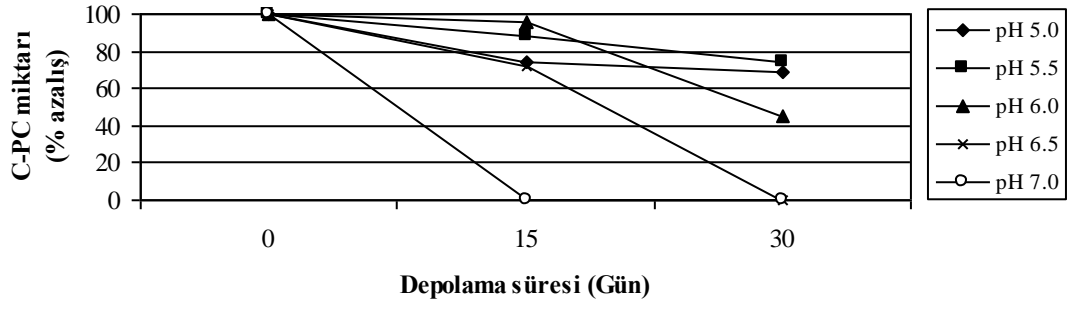
(Şekil 4.16). 25°C’de ise pH 5.5, pH 6 ve pH 6.5’da ortalama % 80 oranında stabil kaldığı pH 7’de ise iki aylık depolama sonunda stabilitesini tamamen kaybettiği görülmüştür (Şekil 4.17). 35°C’de 1 aylık depolama sonunda pH 6.5 ve 7’de rengin tamamen kaybolduğu pH 5 ve pH 5.5’te ise yaklaşık % 70 civarında stabilitesini koruduğu görülmüştür (Şekil 4.18) 45°C’de ise 1 aylık depolama sonunda tüm pH’larda rengin tamamen kaybolduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19). 55°C’de 4. günün sonunda tüm pH’larda renk kaybı gözlenmiştir. Bu sonuçlar fikosiyaninin 25°C ve üstü sıcaklıklarda stabilitesini uzun süre koruyamadığını, 4°C’de ise özellikle pH 5.5 ve pH 6’da stabilitesini hemen hemen hiç kaybetmediğini göstermektedir. Sarada vd. (1999) *Spirulina*’dan elde ettikleri fikosiyaninin 4°C ve 10°C’de uzun süre stabil kaldığını 45 °C ve üstü sıcaklıklarda stabilitesini kaybettiğini belirtmişlerdir. Patel vd. (2004) fikosiyaninin farklı pH’larda 45°C ve üzeri sıcaklıklarda hızlı bir şekilde denatüre olduğunu ifade etmişlerdir.



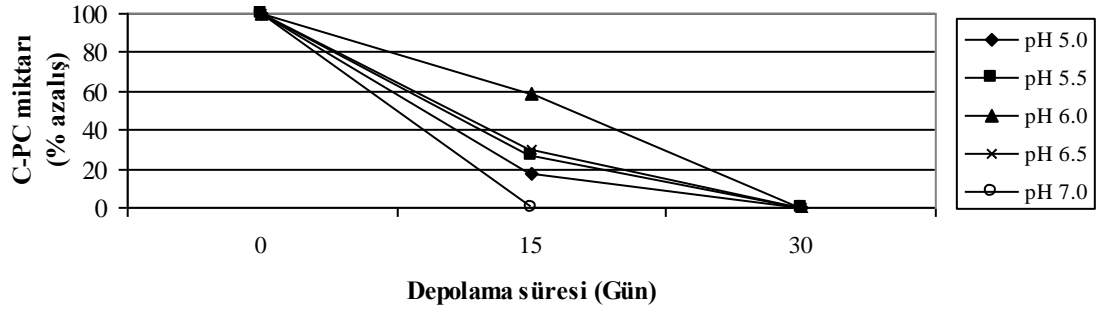
Şekil 4.16 4°C’de farklı pH’larda 4 aylık depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim



Şekil 4.17 25°C’de farklı pH’larda 4 aylık depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim



Şekil 4.18 35°C'de farklı pH'larda 1 aylık depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim

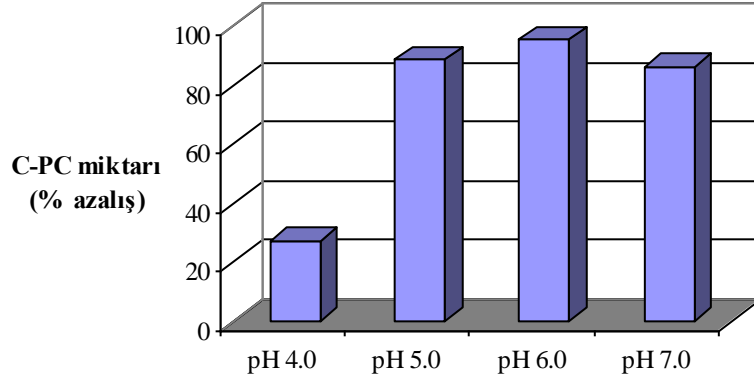


Şekil 4.19 45°C'de farklı pH'larda 1 aylık depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim

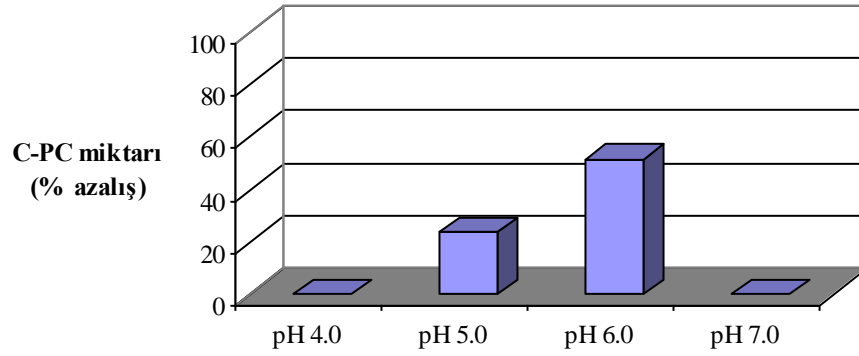
Renk maddesi içeren ürünlerin üretim, paketlenme ve depolama koşullarını uygun şekilde belirleyebilmek için kullanılan renklendiricinin stabilitesi ve olası parçalanma prosesi hakkında ayrıntılı bilgi sahibi olunması gerekmektedir. Fikosiyanin ışık ve yüksek sıcaklığa karşı düşük stabilite göstermesine rağmen, diğer mavi renkli boya maddelerine göre daha parlak bir renge sahip olması onu daha cazip kılmaktadır. İndigo mavisi birçok ülkede yasal sınırlamalar nedeni ile gıda boyası olarak kabul edilmemekte ve pratik uygulamalarda düşük stabilite göstermektedir. Gardenya mavisi ise oldukça yüksek stabilite göstermekte ve sıvı ürünlerde renklendirici olarak kullanılmakta ancak katı ürünlerde renk kaybı olmakta ve yeşil-mavi bir renge dönüşmektedir. Bu gibi olumsuzluklar göz önüne alındığında fikosiyaninin mavi renkli diğer renklendiricilere göre daha kullanışlı olduğu ve bir takım ambalaj materyalleri ile stabilite sorununun önüne geçilebileceği düşünülmektedir (Jespersen vd. 2005).

Çalışmada fikosiyaninin gıdalarda kullanım olanaklarını belirlemek amacıyla, Na-azit içermeyen tampon ile ekstraksiyon ve saflaştırma yapılarak fikosiyaninin farklı sıcaklık, pH ve ışık altındaki stabilitesi de belirlenmiştir.

Yapılan denemelerde 30 günlük depolamanın sonunda fikosiyaninin 4°C'deki stabilitesinin 25°C'deki stabilitesine oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 4°C'de pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0'de, sırasıyla % 27.2, % 88.8, % 95.6, % 86.3 düzeyinde stabilitesini korurken, 25°C'de sadece pH 5.0 ve pH 6.0'da, sırasıyla, % 23.6 ve % 51.7 düzeyinde stabilitesini koruyabilmiştir. Fikosiyanin % 95.6 ile pH 6.0'da diğer pH'lara göre en yüksek stabiliteyi göstermiştir (Şekil 4.20 ve 4.21). Jespersen vd. (2005) sıcaklığın etkisiyle meydana gelen denatürasyonun pH 7'de pH 5'e göre daha yüksek olduğunu göstermiş ve bunun nedeninin proteinin yapısındaki agregasyonların farklılığından kaynaklandığını, düşük agregasyonlarda sıcaklığa karşı daha az stabil kaldığını belirtmiştir. pH 5'te hegzamer yapısının baskın olduğunu ve bu yapının fikosiyanine dayanıklılık kazandırdığını ifade etmiştir. Bir kırmızı alg türü olan *Porphyridium aerugineum*'dan elde edilen fikosiyaninin pH'daki değişimlerden etkilenmediği, ışık altında stabilitesini koruduğu, ancak sıcaklığa karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir. pH 4-5 aralığında 60°C'de 40 dakika boyunca stabil kaldığı elde edilen bulgular arasındadır ve siyanobakterilerden elde edilen fikosiyaninlerde böyle güçlü bir stabiliteye rastlanmamıştır. *Porphyridium aerugineum*'dan elde edilen fikosiyaninin bu özelliği sayesinde gıdalarda kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Elde edilen mavi renk ısı uygulanmaksızın Pepsi ve Bacardi Breezer ürünlerine ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 ay boyunca depolanmış ve depolama sonrasında renk kaybının oluşmadığı bildirilmiştir (Dufosse vd. 2005).

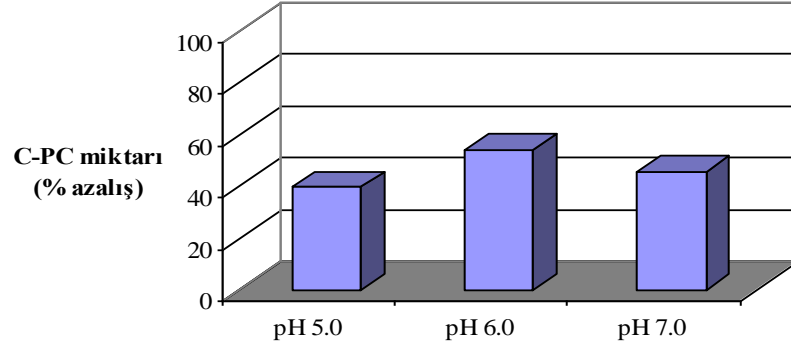


Şekil 4.20 4°C’de farklı pH’larda 30 günlük depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim



Şekil 4.21 25°C’de farklı pH’larda 30 günlük depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim

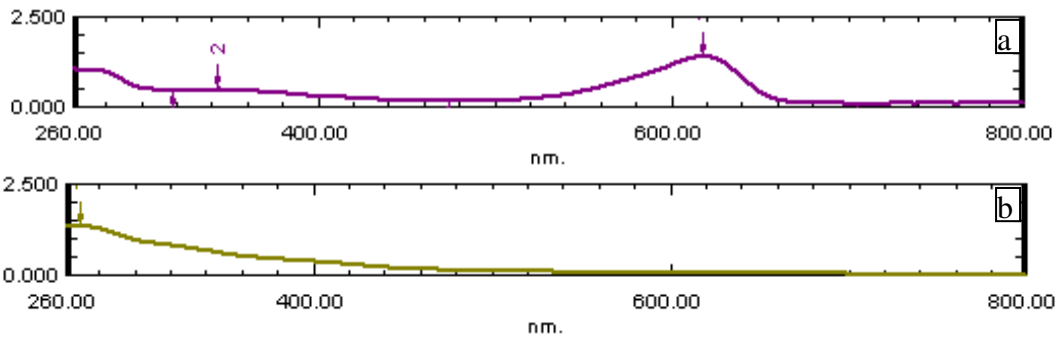
Sürekli ışık altında (yaklaşık 1000 lüks) bir aylık depolama sonunda fikosiyanın stabilitesinde yaklaşık % 60 civarında düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.22). Karanlıkta yapılan depolamada fikosiyanın stabilitesini hemen hemen korurken, ışık altındaki bu düşüş, ışığın stabilite üzerindeki olumsuz etkisini göstermektedir. Jespersen vd. (2005), gardenya mavisinin ışığa karşı dirençli olduğunu ancak fikosiyanın belirgin şekilde denatüre olduğunu ifade etmiştir. Organizma içerisindeki fikosiyanın gelen ışığı fotosisteme aktararak kendini sürekli yenilemektedir, ancak saf fikosiyanda bu durum söz konusu olmadığından yenilenme mümkün olmamakta ve denatürasyon gerçekleşmektedir (Jespersen 2005).



Şekil 4.22 4°C’de farklı pH’larda ve sürekli ışık altında 30 günlük depolama sonrası C-PC miktarındaki değişim

Bu sonuçlar fikosiyaninin asidik gıdalarda, yüksek sıcaklıklarda ve ışık altında kullanımının uygun olmadığını, pH 6.0 civarında, 4°C’de ve karanlıkta depolanan gıdalar için uygun bir renk maddesi olabileceğini göstermiştir. Ancak Jespersen vd. (2005) fikosiyaninin enkapsülasyon teknikleri ile kaplanması sonucu asidik gıdalarda da kullanımının mümkün olabileceğini ifade etmişlerdir.

Fikosiyaninde meydana gelen denatürasyon spektrum taraması ile de açık bir şekilde takip edilebilmektedir. Depolama öncesi 620 nm’de mevcut olan fikosiyanine ait pikin, denatürasyon sonrası tamamen kaybolduğu Şekil 4.23’de açık bir şekilde görülmektedir.

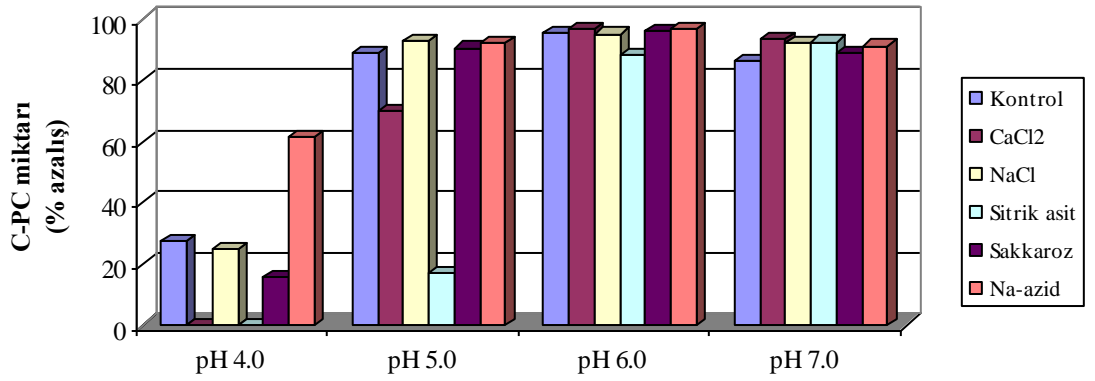


Şekil 4.23 Fikosiyaninin 260-800 nm aralığındaki spektrumu (a, başlangıç; b, denatürasyon sonrası)

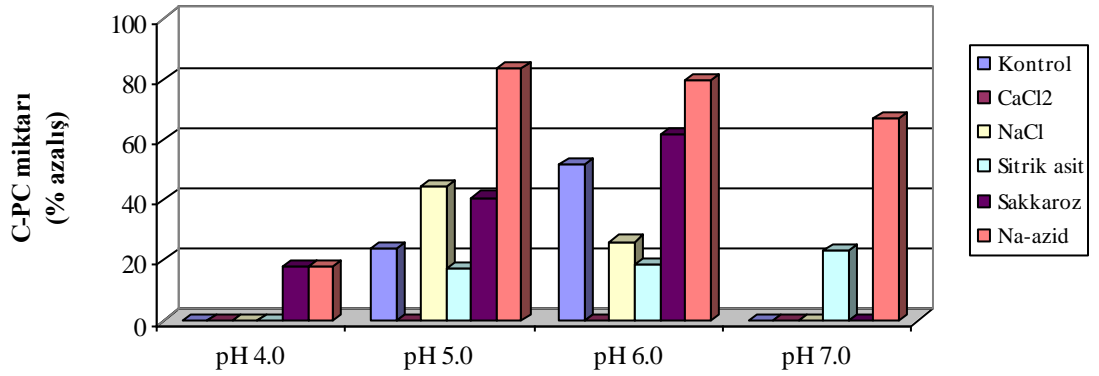
4.4.3 Koruyucuların fikosiyanın stabilitesine etkisi

Fikosiyanın ekstraksiyonu ve saflaştırılması için çok çeşitli yöntemler geliştirilse de fikosiyanın ışığa, sıcaklığa, oksijene, neme olan hassasiyeti nedeni ile saflık ve geri dönüşümü nispeten düşük kalmaktadır. Bu nedenle etkili koruyucular ile fikosiyanın stabilitesinin artırılması gerekmektedir. Sodyum azit (NaN_3) ve dithiothreitol (DTT) analitik çalışmalarda en yaygın kullanılan koruyuculardır, ancak toksik etkileri nedeni ile gıdalarda kullanımı sözkonusu değildir. Gıdalarda kullanımına izin verilen fikosiyanın üretimi ve raf ömrünün artırılması için toksik olmayan, uzun süre stabilitesini koruyabilen ve yine gıdalarda kullanımına izin verilen doğal koruyucuların kullanılması gerekmektedir (Mishra vd. 2008, Mishra vd. 2010). Bazı gıda katkıları karsinogenik veya toksik özellik göstermekte birlikte alerji, astım, migren gibi etkilere de neden olmaktadır. Bu nedenle uygun gıda koruyucusu belirlemek oldukça önemlidir. Tuz, şeker, sirke yüzyıllardır gıdaların korunması amacı ile kullanılan başlıca gıda katkılarıdır (Mishra vd. 2010). Bu nedenle çalışmada doğal gıda koruyucusu olarak NaCl , CaCl_2 , sitrik asit ve sakkaroz seçilmiş ve farklı pH ve depolama sıcaklıklarında fikosiyanın stabilitesine etkisi araştırılmıştır. Aynı çalışmada elde edilen sonuçlar, yapay ve toksik bir koruyucu olan Na-azit ile karşılaştırılmıştır.

Yapılan denemelerde 4°C 'de fikosiyanın stabilitesinde önemli bir düşüş olmadığı için koruyucuların etkisi tam olarak anlaşılammıştır (Şekil 4.24). Ancak 25°C 'de pH 5.0'te ve pH 6.0'da sakkarozun koruyucu bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Doğal koruyucuların hiç biri Na-azit kadar kuvvetli bir etki gösterememiştir. 25°C 'de pH 7.0'de ise sitrik asitin koruyucu bir etkisi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Sürekli ışık altında yapılan denemede ise Na-azit dahil hiçbir koruyucu maddenin stabilite üzerine olumlu etkisi olmadığı belirlenmiştir. Mishra vd. (2008) 35°C 'de 45 günlük depolama sonunda sitrik asitin (4 mg/mL) koruyucu etkisinin sakkaroz ve CaCl_2 'ye göre daha yüksek olduğunu bildirmişler, 4°C 'deki depolamada ise kontrol grubu da stabil kaldığından koruyucuların etkisini gözlemleyememişlerdir.



Şekil 4.24 Farklı koruyucuların 4°C’de 30 günlük depolama sonrası C-PC stabilitesine etkisi



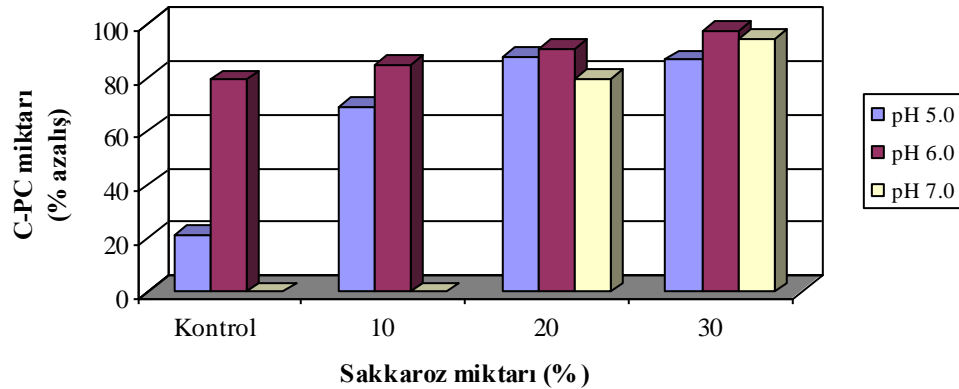
Şekil 4.25 Farklı koruyucuların 25°C’de 30 günlük depolama sonrası C-PC stabilitesine etkisi

Yapılan bu çalışma sonrasında sakkarozun fikosiyenin stabilitesine olumlu bir etki gösterdiği belirlendiğinden ve fikosiyenin gıdalarda kullanım alanına bakıldığında daha çok meyveli içecekler, şekerlemeler, dondurma gibi şekerli ürünlerde kullanımı söz konusu olduğundan sakkarozun değişik konsantrasyonlarda kullanımının fikosiyenin stabilitesine etkisi araştırılmıştır.

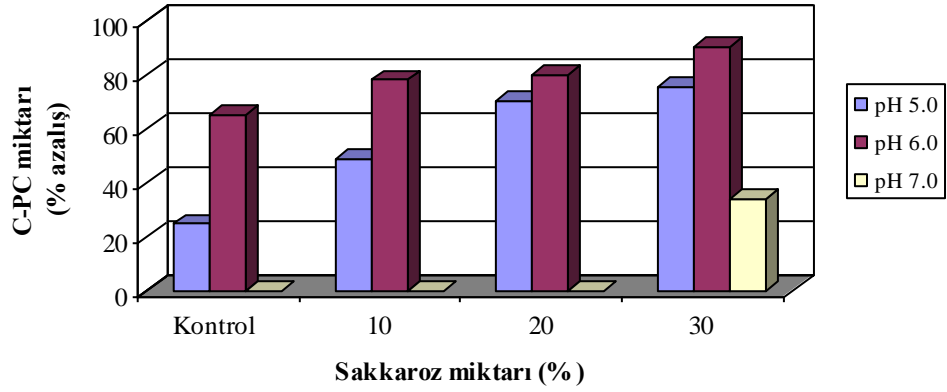
4°C’de 45 günlük depolama sonunda pH 5.0’te kontrol grubunda yaklaşık % 80’lik bir azalış varken, % 30 sakkaroz kullanımında sadece % 15’lik bir azalış görülmektedir; pH 6.0’da kontrol grubunda yaklaşık % 20’lik bir azalış varken, % 30 sakkaroz

kullanımında sadece % 2'lik bir azalış görülmektedir; pH 7.0'de kontrol grubunda yaklaşık % 48'lik bir azalış varken, % 30 sakkaroz kullanımında % 5'lik bir azalış görülmektedir (Şekil 4.26). Genel olarak % 30 düzeyinde kullanılan sakkaroz ile stabilitenin 45 gün boyunca korunabildiği belirlenmiştir.

25°C'de 45 günlük depolama sonunda ise pH 5.0'te kontrol grubunda yaklaşık % 75'lik bir azalış varken, % 30 sakkaroz kullanımında % 25'lik bir azalış görülmektedir; pH 6.0'da kontrol grubunda yaklaşık % 60'lık bir azalış varken, % 30 sakkaroz kullanımında % 10'luk bir azalış görülmektedir; pH 7.0'de kontrol grubunda yaklaşık % 100'lük bir azalış varken, % 30 sakkaroz kullanımında % 65'lik bir azalış görülmektedir (Şekil 4.27). Genel olarak artan sakkaroz miktarına bağlı olarak her iki depolama sıcaklığında ve her üç pH derecesinde fikosiyenin stabilitesinin arttığı görülmektedir. Antelo vd. (2008) fikosiyenin çözeltisine % 10-50 oranında sorbitol ilavesi yaparak stabilite üzerine etkisini araştırmışlar ve artan sorbitol konsantrasyonunun stabilite üzerinde olumlu etkisi olduğunu göstermişlerdir. Koruyucuların yanı sıra fikosiyenin stabilitesini artırmak amacıyla kimyasal stabilizasyon yoluna da gidilmiştir. Sun vd. (2006), formaldehit ile fikosiyenin arasında kovalent çapraz bağlar oluşturarak kimyasal yolla stabilizasyon sağlamışlardır. Elde edilen fikosiyane, SDS-PAGE analizinde 60°C'de 3 saat ve 100°C'de 10 dakika inkübasyon uygulanmış ancak denatürasyon gözlenmemiştir ve ayrıca doğal fikosiyenin ile aynı spektrum özellikleri gösterdiği de ifade edilmiştir.



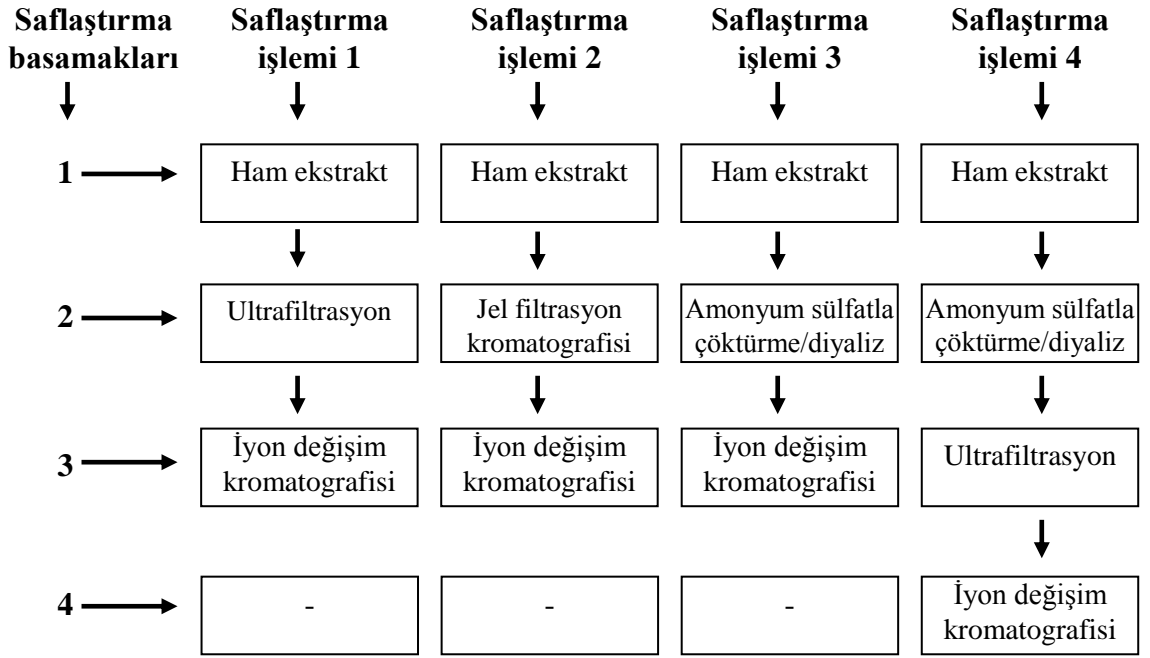
Şekil 4.26 Sakkarozun 4°C'de 45 günlük depolama sonunda fikosiyenin stabilitesine etkisi



Şekil 4.27 Sakkarozun 25°C’de 45 günlük depolama sonunda fikosiyanın stabilitesine etkisi

4.5 Fikosiyanın Saflaştırılması

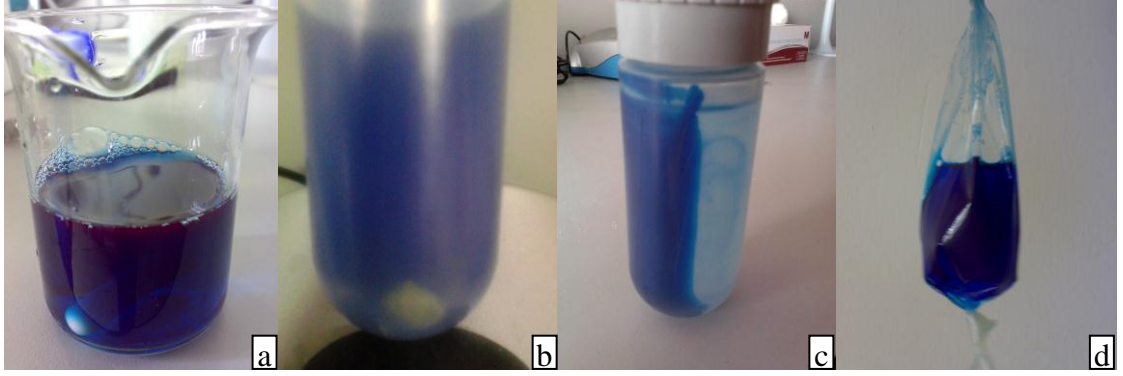
Fikosiyanın saflaştırılması için çok çeşitli metotlar geliştirilmiş olmasına rağmen saflık ve geri dönüşüm düşük kalmaktadır. Bu nedenle siyanobakterilerden yüksek saflıkta fikosiyanın elde edebilmek için daha basit ve etkili yöntemlerin geliştirilmesi çalışmaları sürmektedir (Patel vd. 2005). Saflaştırma işlemi sırasında elde edilen saflık “ A_{620}/A_{280} ” oranı ile takip edilmekte ve bu saflık oranına göre elde edilen fikosiyanın kullanım alanı belirlenmektedir. Fikosiyaninler daha önce de bahsedildiği gibi geniş kullanım alanına sahiptirler ve bu nedenle de ekonomik değerleri yüksektir. Saflaştırma işlemi zor ve zaman alıcı olduğundan ürün maliyetleri de artmakta ve ürünün kullanımı kısıtlanmaktadır. Bugün saflığı 0.7 olan fikosiyanınin mg fiyatı yaklaşık 0.13 dolar iken saflığı 4 ve üzerinde olan analitik kullanıma uygun fikosiyanınin mg fiyatı 15 dolar’ın üstündedir (Rito-Palamares vd. 2001, Niu vd. 2007). Bu durum araştırmacıları daha az maliyette, daha kısa sürede, daha yüksek verimde ve saflıkta fikosiyanın elde etmeye teşvik etmektedir. Bu amaçla çalışmada çeşitli saflaştırma tekniklerinin birbiri ile kombinasyonları denenerek en uygun saflaştırma yöntemi belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan saflaştırma işlemlerinin akım şeması Şekil 4.28’de gösterilmiştir.



Şekil 4.28 Safılaştırma işlemlerinin akış şeması

4.5.1 Amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz (ASÇD)

Amonyum sülfat ile çöktürme yöntemi proteinlerin ayrılmasında ve safılaştırılmasında kullanılan en eski yöntemlerden biridir. ASÇD, yüksek hacimlerde çalışılabilmesi ve ekonomik olması nedeni ile avantajlı, ancak çok zaman alması nedeni ile de dezavantajlı bir yöntemdir. Çalışmada en yüksek verim ve saflıkta fikosiyanini elde edebilmek için amonyum sülfatın farklı doygunluk seviyeleri denenmiştir. Farklı miktarlarda (% 30 + % 50, % 25 + % 75, % 70 ve % 80) amonyum sülfat ilavesi yapılarak çöktürme işlemi gerçekleştirilmiş ve 3.38 saflık faktörü ve % 79.93 geridönüşüm oranı ile en iyi sonucun % 25 + % 75 amonyum sülfat ilavesi ile gerçekleştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4). % 25'lik amonyum sülfat çöktürmesi ile ortamdaki diğer proteinler uzaklaştırılmış, % 75'lik amonyum sülfat çöktürmesi ile de fikosiyanin proteini çöktürülerek ortamdaki ayrılmıştır. ASÇD işleminin aşamaları Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



Şekil 4.29 C-PC'nin amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz yöntemi aşamaları

a, Ham ekstrakt; b, % 25'lik çöktürme sonrası ayrılan kısım; c, % 75'lik çöktürme sonrası oluşan protein peleti; d, diyaliz sonrası elde edilen ürün

Çalışmadan elde edilen bulgular birçok araştırmaya kıyasla daha iyi saflıkta ve verimde fikosiyanın elde edildiğini göstermektedir (Boussiba ve Richmond 1979, Zhang ve Chen 1999, Ranjitha ve Kaushik 2005, Soni vd. 2006, Soni vd. 2008). Patel vd. (2005) çalışma sonuçlarına benzer olarak, ASÇD yöntemi ile *Spirulina* sp. suşundan 3.33 saflık faktörü ve % 81 verimle fikosiyanın saflaştırmışlardır. Chen vd. (2006) ise bu çalışma sonuçlarının aksine 4.41 gibi yüksek bir saflık oranı ile *Spirulina platensis* suşundan ASÇD yöntemi ile fikosiyanın saflaştırmayı başarmışlardır.

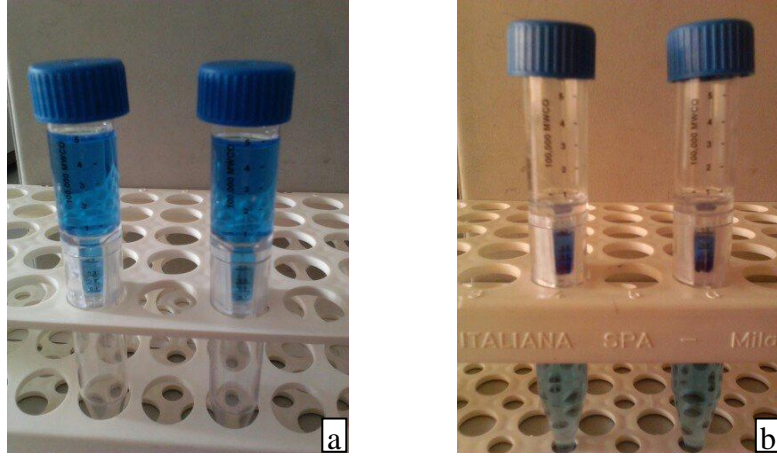
4.5.2 Ultrafiltrasyon (UF)

Ultrafiltrasyon yöntemi diyaliz tekniğine göre çalışan ancak uygulanan basınç veya santrifüj gibi transmembran kuvvetlerinin etkisiyle proteinlerin daha hızlı ve daha yüksek verimlilikte ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir. Uygulanan kuvvet sayesinde küçük moleküllerle birlikte bir miktar sıvı da kaybedildiği için protein daha konsantre bir şekilde elde edilir. Çalışmada ultrafiltrasyon aşamasında öncelikli olarak en yüksek verim ve saflığın elde edildiği santrifüj süresi belirlenmiştir. Bu amaçla ekstraksiyon sonrası elde edilen ham ekstrakt, 100 kDa'luk ultrasantrifüj tüpleri ile 4000 g'de ve 4°C'de farklı sürelerde santrifüj edilmiştir. En yüksek verim ve saflığın elde edildiği 60. dakika optimum santrifüj süresi olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Ultrafiltrasyon yönteminde farklı santrifüj sürelerin C-PC'nin verimine ve saflığına etkisi

	A _{620/280}	C-PC (mg/ml)	Toplam C-PC (mg)	Verim	Saflık faktörü
Ham ekstrakt	0,66	0,24	1,21	100,00	1
10. dakika	0,81	0,33	0,90	74,39	1,23
20.dakika	1,14	0,49	0,94	77,75	1,73
30. dakika	2,32	5,78	0,96	79,34	3,52
60. dakika	2,63	16,15	0,98	81,41	3,99
90. dakika	2,50	9,83	0,88	73,06	3,79

Bu yöntemle fikosiyenin konsantrasyonunun yaklaşık 67 kat, saflığının ise yaklaşık 4 kat arttığı tespit edilmiştir. Chaiklahan vd. (2011), farklı por çaplarına sahip ultrafiltrasyon membranlar ile fikosiyaniyi saflaştırmışlar ve 100 kDa membran filtre ile saflığı yaklaşık 2 kat, konsantrasyonu da yaklaşık 6 kat, 50 kDa'luk ultrafiltrasyon membran ile ise saflığı yaklaşık 2 kat, konsantrasyonu da yaklaşık 11 kat artırabilmişlerdir. Singh vd. (2009), 50 kDa'luk ultrafiltrasyon membran kullanarak fikosiyenin saflığını 1.05'ten 2.89'a yükseltmişler (yaklaşık 3 kat) ve fikosiyenin verimini % 84.58 olarak tespit etmişlerdir. Dolayısıyla çalışmada elde edilen konsantrasyon ve saflık değerleri diğer araştırmacılar tarafından elde edilen değerlerinin oldukça üstünde bulunmuştur. Bu farklılık kullanılan ultrafiltrasyon tüpünün çapı, santrifüj hızı ve süresi ile ilgili olabileceği gibi kullanılan suş farklılığından da kaynaklanabilmektedir. Çalışmada kullanılan ultrafiltrasyon tüpleri ve aşamaları Şekil 3.30'da gösterilmiştir.

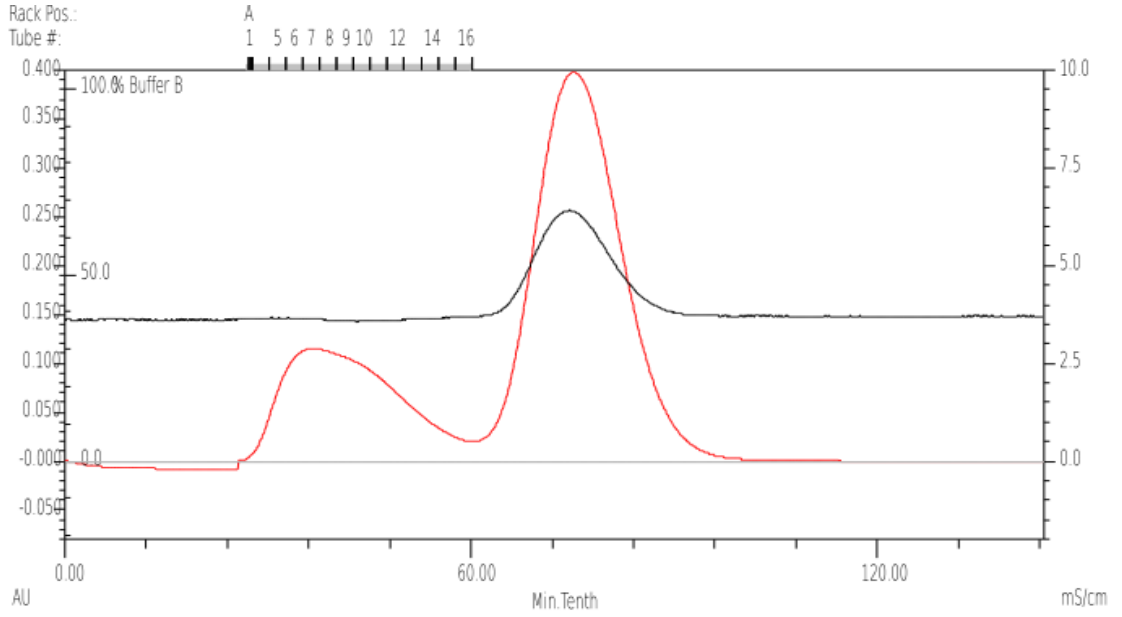


Şekil 4.30 Ultrafiltrasyon yöntemi

a, ham ekstrakt; b, santrifüj sonrası saflaştırılan ve yoğunlaştırılan fikosiyanın

4.5.3 Jel filtrasyon kromatografisi (JFK)

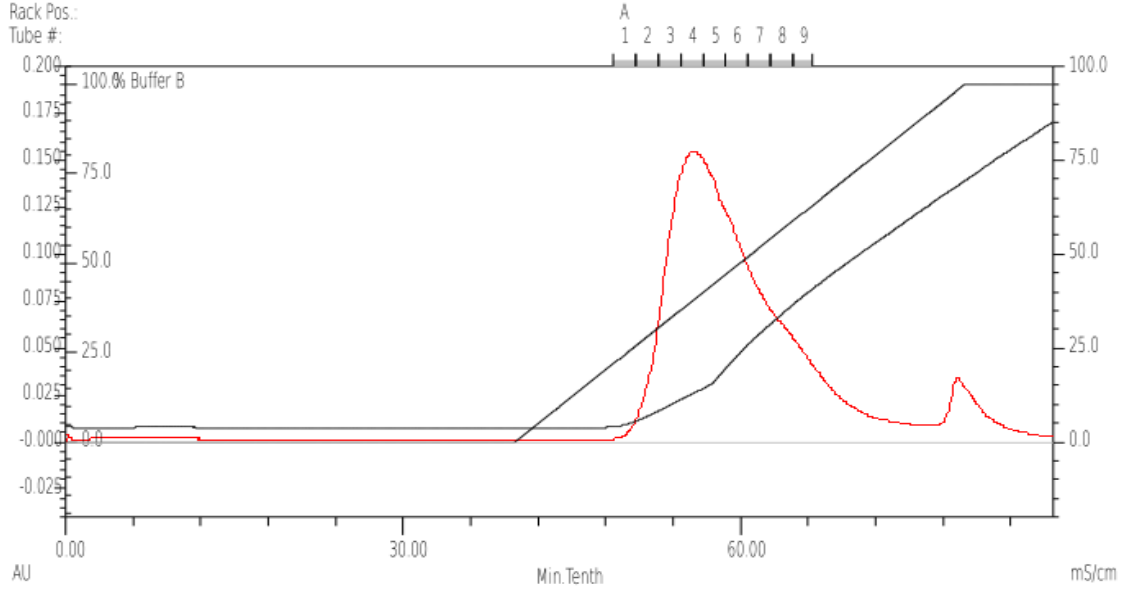
Jel filtrasyon kromatografisi için değişik pH'larda tampon çözeltiler (pH 6.0, 6.5, 7.0 Na-fosfat tamponu ve pH 8.0 Tris-Cl tamponu) denenmiş ve en iyi sonucun 25 mM pH 7.0 Na-fosfat tamponu ile elde edildiği belirlenmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi sonrası elde edilen kromatogram Şekil 4.31'da gösterilmiştir. Kromatogramın 1. pik alanında yani 20. ve 60. dakikalar arasında gelen tüm mavi renkli fraksiyonlar toplanmış ve saflık oranları spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. Şekildeki ikinci pik alanı ise ortamdaki diğer proteinlerin kolondan çıkışını göstermektedir. Saflık oranı 2 ve üzerinde olan tüm fraksiyonlar toplanmış ve bir sonraki saflaştırma basamağına geçilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi için kullanılan cihaz ve kolon EK 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.31 Jel filtrasyon kromatografisi sonrası elde edilen kromatogram

4.5.4 İyon değişim kromatografisi (İDK)

Amonyum sülfatla çöktürme, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi sonrası elde edilen ürünler bir diğer saflaştırma basamağı olan iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Elde edilen veriler saflık ve verim açısından değerlendirilerek, uygun yöntem belirlenmiştir. İyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen kromatogram Şekil 4.32’de gösterilmiştir. Kromatogramın 1. pik alanında yani 50. ve 70. dakikalar arasında gelen tüm mavi renkli fraksiyonlar toplanmış ve saflık oranları spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. Şekildeki ikinci pik alanı ise ortamdaki diğer proteinlerin kolondan çıkışını göstermektedir. İDK için kullanılan cihaz ve kolon EK 4’te gösterilmiştir.



Şekil 4.32 İyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen kromatogram

Tüm saflaştırma işlemlerinden elde edilen saflık ve verim değerleri Çizelge 4.5'te gösterilmiştir. Çizelge 4.5 incelendiğinde en yüksek verimin % 41.40 ile işlem 2'den, en yüksek saflığın ise 6.93 saflık faktörü ile işlem 4'ten elde edildiği görülmektedir. İşlem 1, 2, 3 ve 4'te İDK ile saflaştırma faktörünün sırasıyla 1.64, 1.37, 1.54 ve 1.65 kat arttığı görülmüştür ve bu sonuç daha önce yapılan birçok çalışma ile benzerlik göstermektedir (Reis vd. 1998, Boussiba ve Richmond 1979, Abalde vd. 1998, Zhang ve Chen 1999). Diğer taraftan işlem 3'te ASÇD sonrası uygulanan İDK'nin yüksek miktarda fikosiyanın kaybına neden olduğu da dikkat çekmektedir. Saflaştırma basamakları kendi içlerinde karşılaştırıldığında, JFK yöntemi % 92.57'lik verim ve 3.64'lük saflık faktörü ile UF ve ASÇD yöntemlerine göre daha avantajlı görülmektedir. Ancak harcanan zaman açısından değerlendirildiğinde, 10 mL'lik ham ekstraktın saflaştırılması için JFK ile yaklaşık 9 saat, ASÇD ile yaklaşık 48 saat harcanırken, ultrafiltrasyonda yalnızca bir saatte aynı işlem gerçekleştirilebilmektedir. İşlem 3'ün hem verim hem de saflık açısından değerlendirildiğinde, diğer işlemlerden oldukça düşük olduğu da dikkat çekmektedir. İşlem 4 ile analitik kullanıma uygun ($A_{620}/A_{280} > 4$) ürün elde edilebildiği ancak ürün kaybının oldukça yüksek olduğu (% 18.56) elde edilen bulgular arasındadır. Soni vd. (2006) *Oscillatoria quadripunctulata* suşundan elde ettikleri fikosiyanın saflığını ASÇD ve ardından JFK uygulayarak 0.85'ten

2.36'ya (2.78 kat) yükseltmişlerdir. Bu çalışmada ise sadece tek bir aşamada saflık oranı yaklaşık 3.5 kat artırılmıştır. Moraes ve Kalil (2009) 3 aşamalı uyguladığı saflaştırma işleminde (AMÇD, İDK, JFK) 5.20 saflık faktörü ve % 31.9'luk verim elde etmişken, bu çalışmada sadece 2 basamaklı saflaştırma işlemi ile 5.52 saflık faktörü ve % 33.75'lik verim elde edilmiştir.

Çizelge 4.5 Fikosiyanin saflaştırılmasında herbir saflaştırma basamağı ve işleminden elde edilen saflık oranı, verim ve saflık faktörü değerleri

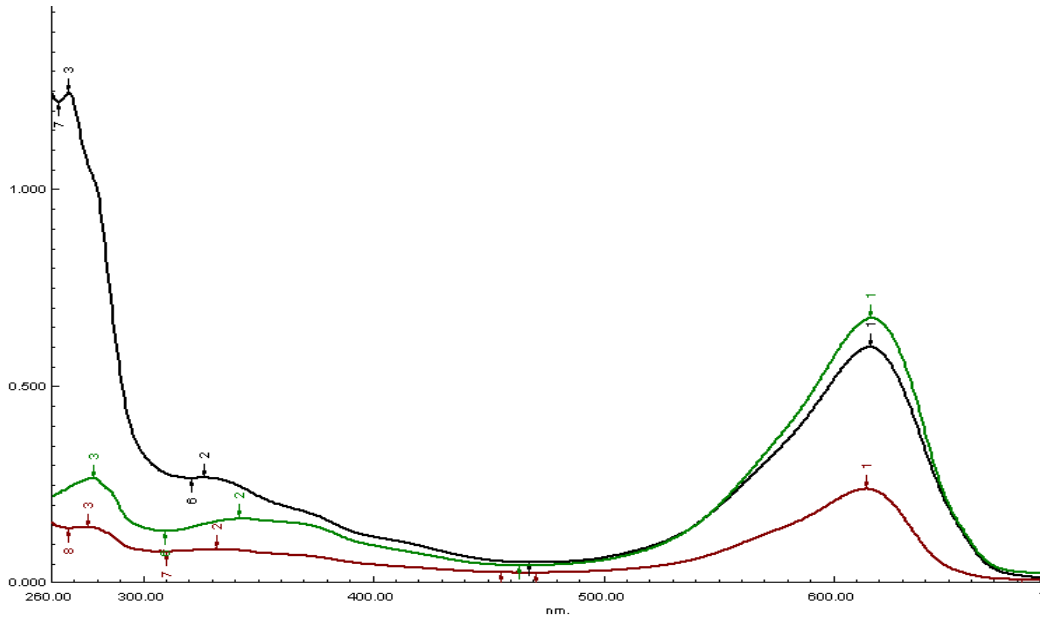
Saflaştırma işlemleri	Saflaştırma basamağı	Saflık oranı	Verim (%)	Saflık Faktörü
İşlem 1	1-Ham ekstrakt	0.66	100	1
	2-UF	2.22	75.54	3.36
	3-İDK	3.64	33.75	5.52
İşlem 2	1-Ham ekstrakt	0.69	100	1
	2-JFK	2.51	92.57	3.64
	3-İDK	3.43	41.40	4.97
İşlem 3	1-Ham ekstrakt	0.58	100	1
	2-ASÇD	1.96	79.93	3.38
	3-İDK	3.02	15.75	5.21
İşlem 4	1-Ham ekstrakt	0.58	100	1
	2-ASÇD	1.96	79.93	3.38
	3-UF	2.43	62.18	4.19
	4-İDK	4.02	18.56	6.93

Saflaştırmanın amacına göre uygulanacak saflaştırma işlemi değişiklik göstermektedir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, eğer amaç, analitik saflıkta ürün elde etmek ise işlem 4'ün, yüksek verimde ürün elde etmek ise işlem 2'nin, daha kısa sürede ve maliyette ürün elde etmek için ise işlem 1'in uygulanması gerekmektedir.

Ekstraksiyonun başlangıcından saflaştırmanın sonuna kadar geçen süredeki tüm veriler değerlendirildiğinde, 40 mL örnekten (0.68 mg/mL kuru ağırlık) 0.66 mg saf fikosiyanin elde edildiği diğer bir ifade ile 1 g kuru hücreden 24.44 mg saf fikosiyanin elde edildiği belirlenmiştir. Soni vd. (2006) yaptıkları saflaştırma çalışmasında 1 g kuru hücreden 2 mg saf fikosiyanin elde edebilmişlerdir. Bu sonuçlar gerek suş seçimi, gerek

ekstraksiyon yöntemi ve şartlarında yapılan değişiklikler, gerek kültürün gelişme koşullarında yapılan değişiklikler ve gerekse saflaştırma işleminde yapılan optimizasyon çalışmasının fikosiyanın verimini artırmada başarıyla sonuçlandığını göstermektedir. Elde edilen bulgular, bugüne kadar yapılan saflaştırma çalışmalarından elde edilen bulguların birçoğu ile benzerlik göstermektedir.

Saflaştırma işleminin sonunda elde edilen örneklerin saflık kontrolleri spektrum taraması ile yapılmıştır ve örnek teşkil etmesi açısından işlem 2'ye ait spektrum taraması Şekil 4.33'te gösterilmiştir. Şekilde 280 nm'deki absorbans değerinin saflaştırma aşamaları arttıkça azaldığı, buna bağlı olarak A_{620}/A_{280} oranının giderek arttığı belirgin bir şekilde görülmektedir. 280 nm'deki azalış ortamdaki diğer proteinlerin uzaklaştırıldığını, 620 nm'deki tek pik ise C-PC'nin maksimum absorbans noktasını göstermektedir.



Şekil 4.33 Saflaştırma işlemi sırasında elde edilen fraksiyonların spektrumları

— : Ham ekstrakt; — : Jel filtrasyon kromatografisi; — : İyon değişim kromatografisi

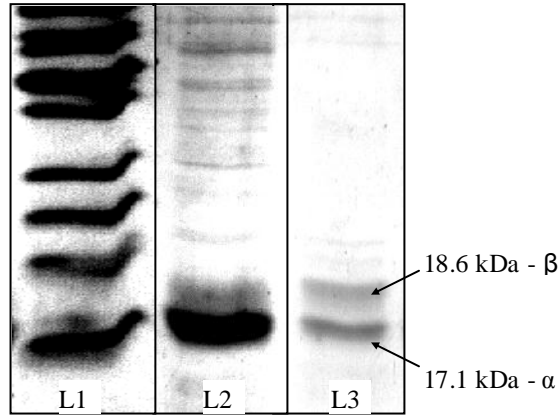
4.6 Fikosiyaninin Karakterizasyonu

4.6.1 Fikosiyaninin moleküler ağırlığı ve yapısının belirlenmesi

Saflık oranı 3.5-4.0 olan fikosiyanin örneğinin molekül ağırlığı HPLC-Jel filtrasyon kolonu ile tespit edilmiştir. Öncelikle moleküler ağırlık standardı kromatogramından elde edilen piklerin alıkonma zamanları ile ayrılan her bir proteinin moleküler ağırlıkları grafiğe taşınmış ve eğri uydurma metodu ile regresyon denklemi bulunmuştur (EK 5). Fikosiyanin alıkonma zamanı ise kromatogramın 620 ve 280 nm dalga boylarında aynı anda pik verdiği zaman noktası olarak belirlenmiştir (EK 6). Fikosiyaninden elde edilen kromatogram incelendiğinde 2 farklı alıkonma zamanında pik geldiği görülmektedir. Bu sonuç bize farklı moleküler ağırlığına sahip 2 çeşit fikosiyanin varlığını göstermektedir. Bu zaman noktaları moleküler ağırlık standardından elde edilen regresyon denkleminde yerine konulduğunda ve kromatogramdaki pik alanları dikkate alındığında, ortamdaki fikosiyaninin % 21'inin 198.0 kDa, % 79'unun ise 156.2 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir.

SDS-PAGE analizi ile saflaştırılan fikosiyanin alt ünitelerinin moleküler ağırlıkları belirlenmiş ve saflık kontrolü yapılmıştır. SDS-PAGE'de görülen 17.1 kDa'luk bant fikosiyaninin α alt ünitesini, 18.6 kDa'luk bant ise β alt ünitesini göstermektedir (Şekil 4.34). İyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen ürünün jele yüklenmesi sonucu elde edilen bu iki bant aynı zamanda yapılan saflaştırma işleminin doğruluğunu da göstermektedir. Fikosiyanin molekülü elde edildiği bakteri çeşidine göre monomer, dimer, trimer ve hegzamer gibi değişik formlarda bulunabilmektedir (MacColl 1998). Proteinin agregasyon seviyesi ortamın pH'sına, iyonik gücüne ve protein konsantrasyonuna karşı çok duyarlıdır. Nötral pH'da, optimum iyonik güçte ve protein konsantrasyonunda en çok karşılaşılan agregasyon formu trimer yapıdır (Bermejo vd. 2006). α ve β alt ünitelerin toplam moleküler ağırlığı bir monomerin moleküler ağırlığını vermektedir. Bu çalışmada fikosiyanin molekülünün bir monomerinin moleküler ağırlığı 35.7 kDa (17.1+18.6) olarak belirlenmiştir. Bu sonuç doğrultusunda, *Anabaena affinis* suşu 2 farklı yapıda fikosiyanin içermektedir. 198.0 kDa moleküler ağırlığına sahip % 21'lik kısmın hegzamer- ($\alpha\beta$)₆ yapısında olduğu; 156.2 kDa moleküler ağırlığına sahip %

79'luk kısmın ise ya tetramer-($\alpha\beta$)₄ yapısında ya da 2 adet 27.0 kDa'lık bağlayıcı eklenmiş trimer-($\alpha\beta$)₃ yapısında olduğu sanılmaktadır. Bu konu ile ilgili daha net sonuçlara ulaşabilmek için yeni tekniklerle daha kapsamlı bir çalışma yapılması gerekmektedir. Bu yapıların ortaya konmasıyla ürünün fonksiyonel özellikleri hakkında da daha net bulgular elde edilebileceği düşünülmektedir. Son zamanlarda kapiler CE-MS veya HPLC-MS gibi teknikler ile fikosiyanınin detaylı yapısı belirlenmektedir. Chen vd. (2006), fikosiyanınin karakterizasyonunda RP-HPLC ters faz yöntemi ile Zobax C₈ kolonu kullanarak α ve β alt ünitelerine ait ayrı ayrı spektrum elde etmiş ve elde ettiği spektrumdaki bant yoğunluklarına göre 1:2 oranında α : β alt ünitelerini içerdiğini belirleyerek yapısı ile ilgili daha detaylı bilgiye ulaşabilmişlerdir.



Şekil 4.34 Saflaştırma sonrası fikosiyanınin SDS-PAGE görüntüsü

L1: Moleküler standart, L2: Ham ekstrakt, L3: İyon değişim kromatografisi sonrası C-PC

Çalışmadan elde edilen monomer büyüklüğü diğer çalışmalara kıyasla daha düşük bulunmuştur. Boussiba ve Richmond (1979), *Spirulina platensis*'ten elde ettikleri saf fikosiyanınin SDS-PAGE analizi sonucunda 20.5 ve 23.5 kDa'luk α ve β alt ünitelerini belirlemişler ve toplam monomer ağırlığını 44 kDa olarak tespit etmişlerdir. Bu sonucun monomer ağırlıkları, sırasıyla 36 ve 28 kDa olan *Anabaena* sp. ve *Mastigocladus laminosus* gibi diğer siyanobakteri suşlarından daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

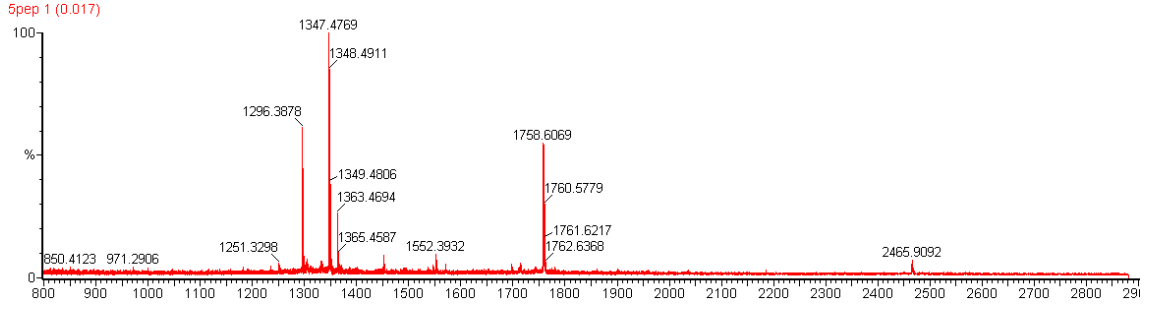
Patel vd. (2005) *Spirulina*, *Phormidium* sp. ve *Lyngbya* sp. suşları ile yaptıkları çalışmada, her üç suşa ait fikosiyanın molekül ağırlıklarını sırasıyla 112 kDa, 131 kDa, 81 kDa olarak tespit etmişlerdir. SDS-PAGE analizi sonucu β alt ünitelerinin moleküler ağırlıklarını her üç suş için aynı iken (24.5 kDa), α üniteleri sırasıyla 17, 19.1 ve 15.2 kDa olarak belirlemişlerdir. Buna göre *Spirulina* ve *Phormidium* sp. suşlarından elde edilen fikosiyanın trimer, *Lyngbya* sp suşundan elde edilen fikosiyanın ise dimer yapısında olduğunu ifade etmişlerdir.

Soni vd. (2006) bir siyanobakteri türü olan *Oscillatoria quadripunctulata*'dan elde edilen fikosiyanın saflığını jel elektroforez ve UV-Vis spektrofotometre ile kontrol etmişler, 19 ve 20 kDa büyüklüğünde 2 bant tespit etmişler ve toplam monomer ağırlığını 39 kDa olarak belirlemişlerdir.

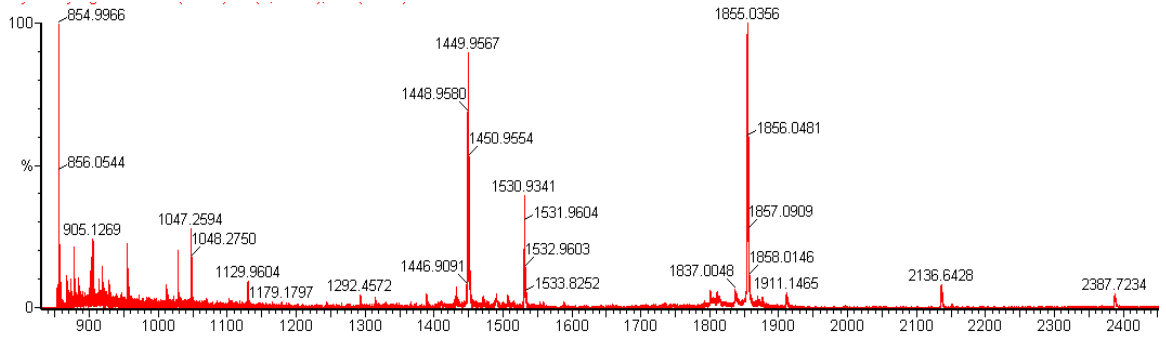
Ramos vd. (2010) *Anabaena marina* suşundan saflaştırdıkları fikosiyanın 17.6 ve 20.5 kDa büyüklüğünde iki alt ünitesinin olduğunu tespit etmişlerdir.

4.6.2 Peptit kütle parmak izi (PMF) yöntemi ile fikosiyanın tanımlanması

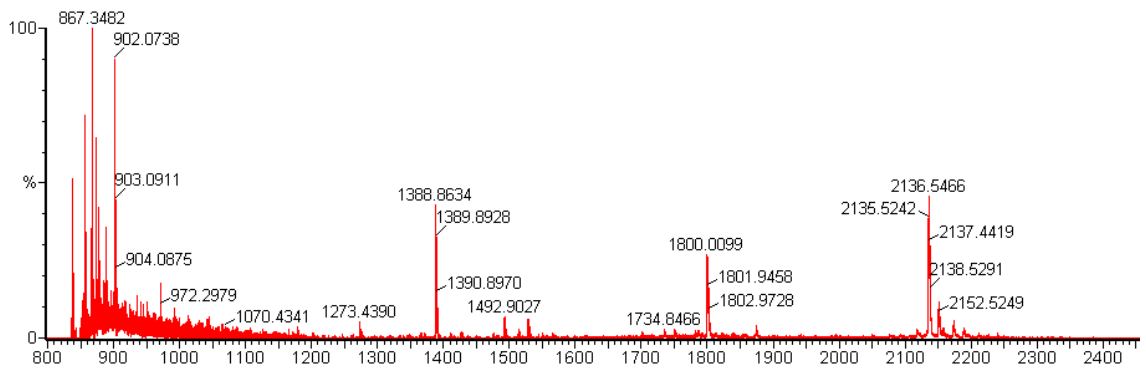
SDS-PAGE analizi sonrası elde edilen protein bantları MALDI-TOF kütle spektrometresi kullanılarak peptit kütle parmak izi yöntemi ile tanımlanmıştır. MALDI-TOF kütle spektrometresinde beş peptit karışımı ile dış kalibrasyon sağlanmış, daha sonra tekrar beş peptit okutularak ölçümün doğruluğu görülmüş (Şekil 4.35) ve ardından örnek kuyucuklarından peptit m/z değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.36 ve 4.37).



Şekil 4.35 MALDI-TOF kütle spektrometresinin beş peptit karışımı ile kalibrasyonundan sonra elde edilen beş peptit m/z değerleri



Şekil 4.36 α ünitesinden elde edilen peptitlerin 800-3000 m/z değerleri arasındaki MALDI-TOF spektrumu



Şekil 4.37 β ünitesinden elde edilen peptitlerin 800-3000 m/z değerleri arasındaki MALDI-TOF spektrumu

Proteinlerin tanımlanması için Mascot arama motoru kullanılmış ancak verimli bir tanımlama yapılamamıştır. Bunun nedeni olarak, α ve β ünitelerinin tripsinle kesildiğinde oluşan triptik peptit sayısının az olması ve veri tabanında yer alan taksonomide çalışılan organizmaya ait özgül bir tanımlama yapılamamış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ancak SwissProt/UniprotKB veri tabanından anahtar kelime olarak “*Anabaena* sp. ve fikosiyanın” şeklinde yapılan özelleştirme sonucunda veri tabanında bulunan proteinler listelenmiştir. Buna göre MALDI-TOF kütle spektrometresinden elde edilen α ve β ünitelerine ait peptit kütle değerleri, SwissProt/UniprotKB veri tabanı kullanılarak elde edilen ve *Anabaena affinis* NIES-40 suşunun α ve β ünitelerinin fragmentlerine ait peptit kütle değerleri ile karşılaştırılmış ve her iki üniteye ait 3 adet ortak peptit olduğu belirlenmiştir (EK 7). Çalışmada doğrulamayı kuvvetlendirmek adına veri tabanında bulunan diğer bazı *Anabaena* sp. suşları ile de karşılaştırma yapılmıştır. Çizelge 4.6’da SwissProt/UniprotKB veritabanı sonuçlarına göre tanımlanan proteinlerin adları, ait olduğu organizma, toplam peptit sayıları, eşleşen peptit sayıları, teorik molekül ağırlıkları ve dizi kapsama yüzdeleri gösterilmiştir. Sonuçta çalışmada kullanılan *Anabaena affinis* suşundan elde edilen fikosiyanın alt ünitelerinin veri tabanındaki *Anabaena affinis* NIES-40 suşu ve diğer *Anabaena* sp. suşları ile büyük oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak tam bir doğrulama yapabilmek için ESI-MS/MS yöntemi kullanılması gerekmektedir. Benedetti vd. (2006) *Aphanizomenon flos-aquae* suşundan elde ettikleri fikosiyanın tanımlanması için MALDI-TOF ve ESI-MS/MS yöntemlerini kullanmışlardır. Peptit kütle parmak izi yöntemi ile kendi organizmalarından elde ettikleri α ve β ünitelerine ait peptitleri veri tabanındaki organizma ile karşılaştırmış ve 4 adet peptit benzerliği tespit etmişlerdir. Aynı yöntemle Chen vd. (2006) *Spirulina platensis*’ten elde ettikleri fikosiyanın α ve β ünitelerini tanımlamışlardır.

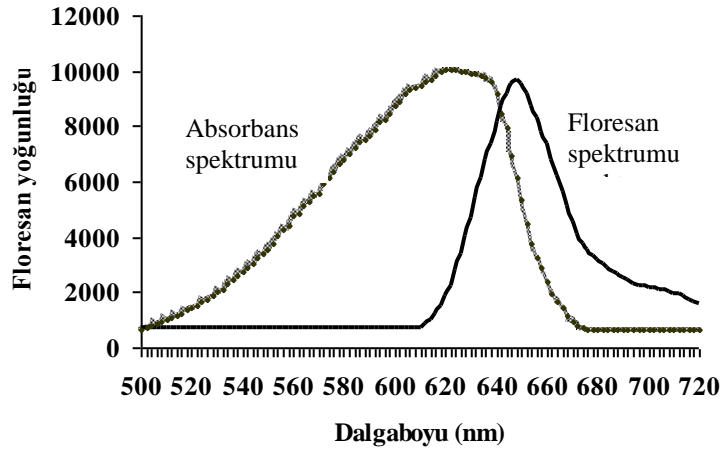
Çizelge 4.6 MALDI-TOF kütle spektrometresinden elde edilen α ve β üniteleri ait peptit kütle değerlerinin SwissProt/UniprotKB veri tabanı ile karşılaştırılması

Organizma adı/ NCBI numarası	Proteinin adı	Erişim no.	Toplam peptit sayısı*	Eşleşen peptit sayısı	Teorik Mw(Da)- fragment	Dizi kapsama yüzdesi
<i>Anabaena affinis</i> NIES-40/549787	Fikosiyanin α alt ünitesi	Q68GR8	6	3	8.986	46.25
<i>Anabaena affinis</i> NIES-40/549787	Fikosiyanin β alt ünitesi	Q68GR9	5	3	8.255	53.09
<i>Anabaena</i> sp. KAC16/113109	Fikosiyanin α alt ünitesi	Q939H7	5	3	6.947	56.07
<i>Anabaena</i> sp. KAC16/113109	Fikosiyanin β alt ünitesi	Q939H6	5	1	7.303	22.22
<i>Anabaena</i> sp. AnaKu3 /748218	Fikosiyanin α alt ünitesi	Q68GL6	7	3	9.671	40.22
<i>Anabaena</i> sp. AnaKu3/748218	Fikosiyanin β alt ünitesi	Q68GL5	5	3	8.211	53.09

*700 m/z değeri üstündeki peptitler değerlendirmeye alınmıştır.

4.6.3 Fikosiyaninin floresan spektrumunun belirlenmesi

Monomer ve trimer yapıdaki fikosiyaninin absorpsiyon spektrumu az da olsa agregasyondaki değişikliklerden etkilenmektedir. (Bermejo vd. 2006). Saflık oranı 3.5-4.0 olan fikosiyanin örneğinin floresan spektrumu incelendiğinde, maksimum 620 nm'de uyarıldığı, maksimum floresan yayını ise 646 nm'de verdiği görülmektedir (Şekil 4.38). Bu sonuç yapılan birçok çalışma ile uyum göstermektedir (Minkova vd. 2003, Benedetti vd. 2006, Chen vd. 2006). Ancak elde edilen bu absorpsiyon ve floresan spektrumundan fikosiyaninin yapısı ile ilgili kesin bir bilgiye ulaşmak mümkün değildir.



Şekil 4.38 Fikosiyaninin absorbans ve floresan spektrumu

4.6.4 Fikosiyaninin antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan fikosiyanin 10.000 Da'luk filtrasyon tüpü ile konsantre edilerek antimikrobiyel aktivite denemesinde kullanılmıştır. Saflık oranı 3.5-4.0, konsantrasyonu 1 mg/mL olan örneğin Çizelge 3.1'de yer alan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivitesine bakılmıştır. Sabarinathan ve Ganesan (2008) bir siyanobakteri olan *Westiellopsis* sp.'den elde ettikleri C-PC'nin *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp. ve *Xanthomonas* sp.'ye karşı antimikrobiyel aktivitesinin olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada 2.2-13.1 aralığında zon çapı belirlemiş ve en az antimikrobiyel etkinin *Pseudomonas* sp.'ye karşı olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgunun aksine bu çalışmada *Anabaena affinis* suşundan elde edilen fikosiyaninin kullanılan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel ve antifungal aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir.

4.6.5 Antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

Antioksidan aktivite analizi sonucunda örneğe ait yüzde inhibisyon değerleri örnek hacimlerine (10, 20 ve 30 µL) karşı bir grafiğe aktarılmış ve bu verilere doğrusal regresyon analizi uygulanarak örneğe ilişkin eğriye ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe

ulaşmıştır. Örneğe ait eğri ve troloks standart eğrisi EK 8’de gösterilmiştir. Bu eğrilerden faydalanarak fikosiyanın antioksidan aktivitesinin “**480 µM troloks/mg fikosiyanın**” olduğu belirlenmiştir. Leelapornpisid vd. (2010) *S. platensis*’ten elde ettikleri saf fikosiyanın antioksidan aktivitesini 0.2 µM troloks/mg fikosiyanın olarak tespit etmişlerdir. Soni vd. (2008), *Phormidium fragile* suşundan elde ettikleri saf fikosiyanın antioksidan aktivitesini belirledikleri ve askorbik asit, galik asit, ürik asit, α-tokoferol, demir sülfat gibi bazı antioksidanlarla kıyasladıkları çalışmalarında, fikosiyanın antioksidan aktivitesinin diğerleri ile aynı ya da daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında elde edilen değerin çay, zerdaçal ve bazı meyve ve sebzelere oranla oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Mishra vd. 2006). Bu sonuçlar *Anabaena affinis* suşundan elde edilen saf fikosiyanın antioksidan olarak kullanılma potansiyelinin varlığını göstermektedir.

5. SONUÇ

Çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenmiştir:

- Çalışmada kullanılan beş adet siyanobakteri arasından *Anabaena affinis* suşu yüksek fikosiyanın içeriği nedeni ile en verimli suş olarak belirlenmiştir. Bu suşun üretim ve ekstraksiyon koşullarında bir takım değişiklikler yaparak fikosiyanın verimi % 10.9'dan, % 14.1'e yükseltilebilmiştir. Ancak daha yüksek bir verim artışı için genetik çalışmaların da yapılması gerektiği düşünülmektedir. Literatürdeki birçok siyanobakteri suşundan daha yüksek fikosiyanın verimine sahip olması ve mevcut verimin belirtilen koşullarda değişiklikler yapılarak artırılabilmesi nedeni ile *Anabaena affinis* suşu fikosiyanın üretimi için alternatif bir suş olarak önerilmiştir.
- Seçilen ekstraksiyon yönteminin hızlı olması ve yüksek saflıkta ürün elde edilebilmesi nedeniyle "sonikasyon + 4°C'de 1 gece bekletme" fikosiyanın ekstraksiyonunda kullanılabilecek en uygun yöntem olarak önerilmiştir. Sonikasyon, yeni geliştirilmiş bir yöntem olmamakla birlikte, yöntemin hız ve süre gibi parametrelerinde optimizasyona gidilmesi ve buna paralel olarak ekstraksiyon tamponu ve miktarı gibi faktörlerin de optimize edilmesi ile yüksek verimde ve saflıkta ürün elde edilebilmesi mümkün olmuştur. Ayrıca 4°C'de 1 gece bekletme yaparak fikosiyanın miktarını hemen hemen iki katına çıkartılabilmesi ile ekstraksiyonun etkinliği artırılmış ve bu yönüyle literatüre katkı sağlanmıştır.
- Gıdaya uygun saflıkta elde edilen fikosiyanın 4°C'de ve pH 6'da stabilitesini 1 ay boyunca koruyabilmesi, daha yüksek sıcaklıklarda ve asidik pH'larda stabilitesini kaybetmesi, gıda boyası olarak kullanımını sınırlandırmaktadır. Gıda boyası olarak daha geniş bir kullanım alanı yaratabilmek için kimyasal stabilizasyon ya da enkapsülasyon teknikleriyle stabilizasyon yapılması gerektiği düşünülmektedir. Diğer taraftan fikosiyanın ışığa ve sıcaklığa duyarlı olması, ambalaj materyalinde kullanılması durumunda ürünün raf ömrü ve

depolama koşulları hakkında bilgi verebileceğini ve bu nedenle akıllı ambalaj materyali olarak kullanılma potansiyeli olduğunu göstermiştir. Fikosiyaninin bu yönü ile kullanımına rastlanmadığından, bu konudaki çalışmalara ağırlık verilmesi gerektiği düşünülmektedir.

- Çalışmada çeşitli saflaştırma teknikleri ile farklı verimlerde ve saflıklarda fikosiyanin saflaştırılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda *Anabaena affinis* suşundan analitik saflıkta fikosiyanin elde etmek için amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi basamaklarından oluşan üç aşamalı yöntemin kullanılması gerektiği önerilmiştir. Gıdaya uygun saflıkta ürün elde etmek için ise elde edilen yüksek saflık dışında harcanan zaman açısından da avatajlı olması nedeniyle ultrafiltrasyon yönteminin kullanılması gerektiği belirlenmiştir. Literatürde ultrafiltrasyon ile fikosiyanin saflaştırma ile ilgili çok az çalışma yer almaktadır. Çalışmada ultrafiltrasyon ile elde edilen sonuçlar, yöntemin optimize edilmesi nedeni ile mevcut birçok çalışmaya göre üstünlük sağlamıştır.
- Saflaştırma çalışmasının sonunda 1 g kuru hücreden 24.44 mg (% 2.44) saf fikosiyanin elde edildiği belirlenmiştir. Bu yönüyle çalışmadan elde edilen verim oldukça yüksek gözükmektedir. Ancak çalışmanın sanayide kullanılabilir olması için ölçek büyütme ve fizibilite çalışmalarının yapılması gerekmektedir.
- Saflaştırma sonrası elde edilen fikosiyanin; SDS-PAGE, HPLC Jel filtrasyon, MALDI-TOF kütle spektrofotometrisi, UV-VIS ve floresan spektrofotometrisi ile tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Buna göre *Anabaena affinis* suşundan elde edilen fikosiyaninin % 21'lik kısmının 198.0 kDa, % 79'luk kısmının 156.2 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğu, sırasıyla 17.1 ve 18.6 kDa'luk α ve β ünitelerinden oluşan 35.7 kDa büyüklüğünde monomerlerden oluştuğu ve bu sonuca göre de % 21'lik kısmının hegzamer, % 79'luk kısmının ise ya tetramer yapısında olduğu ya da 2 adet bağlayıcı polipeptid zinciri içeren trimer yapısında olduğu düşünülmektedir. Yapılan MALDI-TOF kütle spektrofotometrisi analizi ile elde edilen protein bantlarının fikosiyanine ait α ve

β üniteleri olduğu doğrulanmıştır. Ancak daha iyi bir yapı analizi için daha ileri tekniklerin kullanılması gerekmektedir.

- Çalışmadan elde edilen fikosiyanın protein yapısında olması, stabilitesini 4°C’de uzun süre koruyabilmesi, bazı doğal koruyucular ile stabilitesinin artırılabilmesi ve yüksek antioksidan özelliğine sahip olması nedenleri ile ısı işlem uygulanmayan gıda maddelerinde kullanılarak gıdanın fonksiyonel özelliklerinin artırabileceğini düşünülmektedir. Ülkemizde fikosiyanın üretimi ile ilgili çok az sayıda çalışma olması, yerel bir suştan elde edilen fikosiyanın ve fikosiyanın kullanımını ile elde edilecek yeni ürünlerin önemini artırmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abalde, J., Betancourt, L., Torres, E., Cid, A. and Barwell, C. 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, Vol. 136, pp. 109-120.
- Adir, N., Dobrovetsky, Y. and Lerner, N. 2001. Structure of C-phycocyanin from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 Å: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 313, pp. 71-81.
- Adir, N. and Lerner, N. 2003. The crystal structure of a novel unmethylated form of C-phycocyanin, a possible connector between cores and rods in phycobilisomes. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, pp. 25926-25932.
- Anonim. 1999. Su kalitesi. *Daphnia magna* straus'un (Cladocera, Crustacea) hareketliliğinin engellenmesinin (inhibisyonu) tayini, akut zehirlilik deneyi. TS 6050 EN ISO 6341. Türk Standartları Enstitüsü.
- Antelo, F.S., Costa, J.A.V. and Kalil, S.J. 2008. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 41, pp. 43-47.
- Antelo, F.S., Anschau, A., Costa, J.A.V. and Kalil, S.J. 2010. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 21(5), pp. 921-926.
- Babu, T.S., Kumar, A. and Varma, K. 1991. Effect of light quality on phycobilisome components of the cyanobacterium *Spirulina plantensis*. *Plant Physiology*, Vol. 95, pp. 492-497.
- Başer, K.H.C. 2002. Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, 31-42.
- Benedetti, S., Rinalducci, S., Benvenuti, F., Francogli, S., Pagliarani, S., Giorgi, L., Micheloni, M., D'Amici, G.M., Zolla, L. and Canestrari, F. 2006. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Chromatographic B*, Vol. 833, pp. 12-18.
- Bennett, A. and Bogarad, L. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 58, pp. 419-435.
- Bermejo, R., Acién, F.G., Ibáñez, M.J., Fernández, J.M., Molina, E. and Alvarez-Pez, J.M. 2003. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga

- Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. Journal of Chromatographic B, Vol. 790, pp. 317-325.
- Bermejo, R., Felipe, M.A., Talavera, E.M. and Alvarez-Pez, J.M. 2006. Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. Chromatographia, Vol. 63, pp. 59-66.
- Bermejo, P., Piñero, E. and Villar, Á.M. 2008. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. Food Chemistry, Vol. 110, pp. 436-445.
- Bhaskar, S.U., Gopaldaswamy, G. and Raghu, R. 2005. A simple method for efficient extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* Geitler. Indian Journal of Experimental Biology, Vol. 43, pp. 277.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. and Kalchayanand, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacteria strains. Journal of Applied Bacteriology, Vol. 70, pp. 25-33.
- Boussiba, S. and Richmand, A.E. 1979. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. Archives Microbiology, Vol. 120, pp. 155-159.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S. and Bunnag, B. 2011. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. Bioresource Technology, Vol. 102, pp. 7159-7164.
- Chen, F. and Zhang, Y. 1997. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. Enzyme and Microbiol Technology, Vol. 20, pp. 221-224.
- Chen, T., Wong, Y. and Zheng, W. 2006. Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. Phytochemistry, Vol. 67, pp. 2424-2430.
- Chojnacka, K. and Zielińska, A. 2011. Evaluation of growth yield of *Spirulina* (*Arthrospira*) sp. in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology, DOI 10.1007/s11274-011-0833-0.
- Contreras-Martel, C., Matamala, A., Bruna, C., Poo-Caamaño, G., Almonacid, D., Figueroa, M., Martínez-Oyanedel, J. and Bunster, M. 2007. The structure at 2 Å resolution of phycocyanin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer network in a PC-PC complex. Biophysical Chemistry, Vol. 125, pp. 388-396.
- Conk Dalay, M.C., İmamoğlu, E. and Öncel, S. 2008. Mikroalgal biyokütle üretimi için düşük maliyetli fotobiyoreaktör tasarımı. 104M354 nolu TÜBİTAK projesi raporu, 177 s., İzmir.

- Doke, J.H. 2005. An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from *Spirulina* sp. International Journal of Food Engineering, Vol. 1, pp. 2.
- Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Malis Arad, A., Blanc, P., Chidambara Murthy, N.K. and Ravishankar, G.A. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? Trends in Food Science&Technology, Vol. 16, pp. 389-406.
- Eriksen, N.T. 2008. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 80, pp. 1-14.
- Foladoria, P., Laurab, B., Giannia, A. and Giuliano, Z. 2007. Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry-Fecal indicators, wastewater and activated sludge. Water research, Vol. 41, pp. 235-243.
- Fukui, K., Saito, T., Noguchi, Y., Kodera, Y., Matsushima, A, Nishimura, H. and Inada, Y. 2004. Relationship between color development and protein conformation in the phycocyanin molecule. Dyes and Pigments, Vol. 63, pp. 89-94.
- Glazer, A.N. 1994. Phycobiliproteins-a family of valuable, widely used fluorophores. Journal of Applied Phycology, Vol. 6, pp. 105-112.
- Henrikson, R. 2011. Development of a Spirulina Industry-Marketing. <http://www.algaeindustrymagazine.com/special-report-spirulina-part-6/>, Erişim tarihi: 28.01.2012.
- Herrera, A., Boussiba, S., Napoleone, V. and Hohlberg, A. 1989. Recovery of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. Journal of Applied Phycology, Vol. 1, pp. 325-331.
- Herrero, M., Cifuentes, C. and Ibanez, E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. Food Chemistry, Vol. 98, pp. 136-148.
- Jespersen, L., Strømdahl, L.D., Olsen, K., Skibsted, L.H. 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. Eur. Food Res. Technol., Vol. 220, pp. 261-266.
- Jiménez, C., Cossío, B.R., Labella, D. and Niell, F.X. 2003. The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. Aquaculture, Vol. 217, pp. 179-190.
- Karaali, A. ve Özçelik, B. 1993. Gıda katkısı olarak doğal ve sentetik boyalar. Gıda, Vol. 18 (6), pp. 389-396.

- Kathiresan, S., Sarada, R., Battacharya, S. and Ravishankaret, G.A. 2006. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 96(3), pp. 456-463.
- Kırca, A. ve Özkan, M. 2007. Değişik amaçlı bazı test ve analiz yöntemleri. In: Gıda analizleri. Cemeroglu, B. (ed.), Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 535 s., Ankara.
- Kupka, M. and Scheer, H. 2008. Unfolding of C-phycoyanin followed by loss of non covalent chromophore–protein interactions. 1. Equilibrium experiments. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1777, pp. 94-103.
- Leelapornpisid, P., Khamrat, W. and Santiarworn, D. 2010. Purification and antioxidant activities of phycoyanin from *Spirulina platensis*. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, Vol. 4(7), pp. 12-16.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685.
- Liu, L., Chen, X., Zhang, X., Zhang, X. and Zhou, B. 2005. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *Journal of Biotechnology*, Vol. 116, pp. 91-100.
- Maccoll, R. 1998. Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, Vol. 124, pp. 311-334.
- Macias-Sánchez, M.D, Mantell, C., Rodríguez, M., Ossa, E.M., Lubián, L.M. and Montero, O. 2007. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll *a* from *Synechococcus* sp. *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol. 39(3), pp. 323-329.
- Madhyastha, H.K and Vatsala, T.M. 2007. Pigment production in *Spirulina fusciformis* in different photophysical conditions. *Biomolecular Engineering*, Vol. 24, pp. 301-305.
- Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchorbadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T., Antova, R.E. and Busheva, M. 2003. Purification of C-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusciformis*. *Journal of Biotechnology*, Vol. 102, pp. 55-59.
- Mishra, A., Bapat, M.M, Tilak, J.C. and Devasagayam, T.P.A. 2006. Antioxidant activity of *Garcinia indica* (kokam) and its syrup. *Current Science*, Vol. 91(1), pp. 90-92.
- Mishra, S.K., Shrivastav, A. and Mishra, S. 2008. Effects of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, Vol. 43, pp. 339-345.

- Mishra, S.K., Shrivastav, S., Pancha, I. Jain, G. and Mishra, S. 2010. Effect of preservatives for food grade C-Phycocerythrin, isolated from marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 7(5), pp. 597-602.
- Mishra, S.K, Shrivastav, A., Maurya, R.R., Patidar, S.K., Haldar, S. and Mishra, S. 2012. Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. isolated from Gujarat coast, India. Protein Expression and Purification, Vol. 81(1), pp. 5-10.
- Moraes, C.C. and Kalil, S.J. 2009. Strategy for a protein purification design using C-phycoerythrin extract. Bioresource Technology, Vol. 100, pp. 5312-5317.
- Moraes, C.C., Burkert, J.F.M. and Kalil, S.J. 2010. C-Phycocyanin extraction process for large-scale use. Journal of Food Biochemistry, Vol. 34, pp. 133-148.
- Moreno, J., Rodríguez, M., Vargas, M.A. and Rivas, J. 1995. Nitrogen fixing cyanobacteria as a source of phycobiliproteins pigments-composition and growth performance of ten filamentous heterocystous strains. Journal of Applied Phycology, Vol. 7, pp. 17-23.
- Moreno, J., Vargas, M.A., Olivares, H., Rivas, J. and Guerrero, M.G. 1998. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. Journal of Biotechnology, Vol. 60, pp. 175-182
- Moreno, J., Vargas, M.A., Rodríguez, H., Rivas, J. and Guerrero, M.G. 2003. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047. Biomolecular Engineering, Vol. 20, pp. 191-197.
- Mur, L.C., Skulberg, O.M. and Utkilen, H. 1999. Toxic cyanobacteria in water. 15-34 pp., In: Cyanobacteria in the environment. Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Spon Pres, 417 p., New York.
- Naidu, K.A., Sarada, R., Manoj, G., Khan, M.Y., Swamy, M.M., Viswanatha, S., Murthy, N., Ravishankar, G.A. and Srinivas, L. 1996. Toxicity Assessment of Phycocyanin-A Blue Colorant From Blue Green Alga *Spirulina platensis*. Food Biotechnology, Vol. 13(1), pp. 51-66.
- Niu, J.F., Wang, G.C., Lin, X.Z. and Zhou, B.C. 2007. Large-scale recovery of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. Journal of Chromatographic B, Vol. 850, pp. 267-276.
- Oi, V.T., Glazer, A.N. and Stryer, L. 1982. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. Journal of Cell Biology, Vol. 93, pp. 981-986.

- Oliveira, E.G., Rosa, G.S., Moraes, M.A. and Pinto, L.A.A. 2008. Phycocyanin content of *Spirulina platensis* dried in spouted bed and thin layer. *Journal of Food Process Engineering*, Vol. 31, pp. 34-50.
- Parmar, A., Singh, N.K., Pandey, A., Gnansounou, E. and Madamwar, D. 2011. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, Vol. 102, pp. 10163-10172.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R. and Ghosh, P.K. 2005. Purification and characterization of C-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, Vol. 40, pp. 248-255.
- Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A.S. and Raghavarao, K.S.M.S. 2006. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *Journal of Chromatographic A*, Vol. 1127, pp. 76-81.
- Patil, G. and Raghavarao, K.S.M.S. 2007. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 34, pp. 156-164.
- Prasanna, R., Kumar, R., Sood, A., Prasanna, B.M. and Singh, P.K. 2006. Morphological, physiochemical and molecular characterization of *Anabaena* strains. *Microbiological Research*, Vol. 161, pp. 187-202.
- Ramos, A., Acién, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., González, C.V. and Bermejo, R. 2010. Large-scale isolation and purification of C-phycocyanin from the cyanobacteria *Anabaena marina* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 85, pp. 783-792.
- Ranjitha, K. and Kaushik, B.D. 2005. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*. *J. Sci. Indus. Res.*, Vol. 64, pp. 372-375.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 26, pp. 1231-1237.
- Reis, A., Mendes, A., Lobo-Fernandes, H., Empis, J.A. and Novias, J.M. 1998. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp.. *Bioresource Technology*, Vol. 66, pp. 181-187.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M. and Stanier, R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 111, pp. 1-61.
- Rito-Palomares, M., Nuñez, L. and Amador, D. 2001. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 76, pp. 1273-1280.

- Rodriguez, H., Rivas, J. and Guerrero, M.G. 1989. Nitrogen fixing cyanobacteria with a high phycoerythrin content. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 55, pp. 758-760.
- Román, R.B., Álvarez-Pez, J.M., Fernández, F.G.A. and Grima, E.M. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, Vol. 93, pp. 73-85.
- Romay, C., Armesto, J., Ramirez, D., González, R., Ledon, N. and García, I. 1998. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. *Inflammation Research*, Vol. 47, pp. 36-41.
- Sabarinathan, K.G. and Ganesan, G. 2008. Antibacterial and toxicity evaluation of C-phycoerythrin and cell extract of filamentous freshwater cyanobacterium – *Westiellopsis* sps. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, Vol. 12, pp. 79-82.
- Santiago-Santos, Ma.C., Ponce-Noyola, T., Olvera-Ramírez, R., Ortega-López, J. and Cañizares-Villanueva, R.O. 2004. Extraction and purification of phycoerythrin from *Calothrix* sp.. *Process Biochemistry*, Vol. 39, pp. 2047-2052.
- Sarada, R., Pillai, M.G. and Ravishankar, A. 1999. Phycoerythrin from *Spirulina* sp.: influence of processing of biomass on phycoerythrin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycoerythrin. *Process Biochemistry*, Vol. 24, pp. 795-801.
- Schirmer, T., Bode, W., Huber, R., Sidler, W. and Zuber, H. 1985. X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-phycoerythrin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its resemblance to globin structures. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 184, pp. 257-277.
- Schmidt, R.A., Wiebe, M.G. and Eriksen, N.T. 2005. Heterotrophic high cell density fed-batch cultures of the phycoerythrin producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 90, pp. 77-84.
- Sekar, S. and Chandramohan, M. 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, Vol. 20, pp. 113-136.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. 1998. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, Vol. 68(5), pp. 850-858.
- Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V. and Kalil, S.J. 2007. Optimization of phycoerythrin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, Vol. 98, pp. 1629-1634.

- Singh, N.K., Parmar, A. and Madamwar, D. 2009. Optimization of medium components for increased production of C-phycoyanin from *Phormidium ceylanicum* and its purification by single step process. *Bioresource Technology*, Vol. 100, pp. 1663-1669.
- Sloth, J.K., Wiebe, M.G. and Eriksen, N.T. 2006. Accumulation of phycoyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme Microbiol Technology*, Vol. 38, pp. 168-175.
- Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U. and Madamwar, D. 2006. Extraction, purification and characterization of phycoyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry*, Vol. 41, pp. 2017-2023.
- Soni, B., Trivedi, U. and Madamwar, D. 2008. A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycoyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. *Bioresource Technology*, Vol. 99, pp. 188-194.
- Spolaore, P., Cassan, C.J., Duran, E. and Isanbert, A. 2006. Commercial application of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 101(2) , pp. 87-96.
- Stec, B., Troxler, R.F. and Teeter, M.M. 1999. Crystal structure of C-phycoyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective in phycobilisome assembly. *Biophysical Journal*, Vol. 76, pp. 2912-2921.
- Steward, D.E. and Farmer, F.H. 1984. Extraction, identification and quantitation of phycobiliprotein pigments from phototrophic plankton *Limnology and Oceanography*, Vol. 29(2), pp. 392-397.
- Sun, L., Wang, S. and Qiao, Z. 2006. Chemical stabilization of the phycoyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Biotechnology*, Vol. 121, pp. 563-569.
- Takano, H., Arai, T., Hirano, M. and Matsunaga, T. 1995. Effects of intensity and quality of light on phycoyanin production by a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 042902. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 43, pp. 1014-1018.
- Thajuddin, N. and Subramanian, G. 2005. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, Vol. 89(1), pp. 47-57.
- Tunail, N. 2009. *Mikrobiyoloji. Pelin ofset*, 448 s., Ankara.
- Valderrama, J.O., Perrut, M. and Majewski, W. 2003. Extraction of astaxantine and phycoyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical Engineering*, Vol. 48, pp. 827-830.

- Viskari, P.J.V. and Colyer, C.L. 2003. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical Biochemistry*, Vol. 319(2), pp. 263-271.
- Yentür, G., Yaman, M. and Bayhan, A. 1998. Bazı gıda maddelerine katılan sentetik boyaların miktarlarının araştırılması. *Gıda*, Vol. 23(3), pp. 195-199.
- Yu, M.H. and Glazer, A.N. 1982. Cyanobacterial phycobilisomes role of the linker polypeptides in the assembly of phycocyanin. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 257(7), pp. 3429-3433.
- Zhang, Y. and Chen, F. 1999. A simple method for efficient separation and purification of C-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biotechnology Techniques*, Vol. 13, pp. 601-603.
- Zhou, Z.P., Liu, L.N., Chen, X.L., Wang, J.X., Chen, M., Zhang, Y.Z. and Zhou, B.C. 2005. Factors that effect antioxidant activity of C-phycocyanins from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biochemistry*, Vol. 29, pp. 313-322.
- Zhu, Y., Chen, X.B., Wang, K.B., Li, Y.X., Bai, K.Z., Kuang, T.Y. and Ji, H.B. 2007. A simple method for extracting C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using *Klebsiella pneumonia*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 74, pp. 244-248.
- Zihnioğlu, F. 2007. Biyokimya ve moleküler biyolojide son teknikler. Protein saflaştırması, karakterizasyonu ve proteom analizi. Ed. Telefoncu A, Erbil MK, Zihnioğlu F, Kılınç A. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 467 s.