

**ÇEŞİTLİ ORTAMLARDAN İZOLE EDİLMİŞ OLAN  
SİYANOBAKTERİLERİN FİKOSİYANİN ÜRETİM YETENEKLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Sona HAJIYEVA**

**Yüksek Lisans Tezi**

**İleri Teknolojiler Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Bilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ**

**Eskişehir**

**Eskişehir Teknik Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Ağustos 2022**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sona HAJIYEVA'nın ÇEŞİTLİ ORTAMLARDAN İZOLE EDİLMİŞ OLAN SİYANOBAKTERİLERİN FİKOSİYANİN ÜRETİM YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI başlıklı çalışması 05/08/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknolojiler Anabilim dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### Unvan Adı Soyadı

### İmza

Üye

: Prof. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ

Üye

: Prof. Dr. Nalan YILMAZ SARIOZLÜ

Üye

: Doç. Dr. Hülya KARACA

Prof. Dr. Murat TANIŞLI  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

## **DANIşMAN ONAYI**

Danişmanlığını yürüttüğüm Yüksek Lisans ğrencisi Sona HAJIYEVA, EşİTLİ ORTAMLARDAN İZOLE EDİLMİş OLAN SİYANOBAKTERİLERİN FİKOSİYANİN ÜRETİM YETENEKLERİNİN ARAşTIRILMASI başlıklı tez çalışmasını tamamlamıştır. Hazırlamış olduğu tez tarafımca incelenmiş ve öğrencinin tez savunma sınavına alınması bilimsel ve etik açıdan uygun görülmüştür.

Tez Danişmanı

Prof. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ

## ÖZET

### ÇEŞİTLİ ORTAMLARDAN İZOLE EDİLMİŞ OLAN SİYANOBAKTERİLERİN FİKOSİYANİN ÜRETİM YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sona HAJIYEVA

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ağustos 2022

Danışman: Prof. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ

Bu tez çalışmasında, daha önce çeşitli ekolojik ortamlardan izole edilerek identifiye edilmiş yedi siyanobakteri izolatından en yüksek C-fikosiyanın verimi sağlayan izolat belirlenmiştir. C-fikosiyanın üretimine yönelik optimizasyon çalışmaları yapılmış ve elde edilen C-fikosiyanın saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Biyolojik aktivitesini belirlemek amacıyla ekstraktın *in vitro* olarak antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser etkileri araştırılmıştır. Ekstraksiyon yöntemine yönelik optimizasyon çalışmaları ile en iyi verim termofilik *Geitlerinema* sp. izolatı ile elde edilmiştir. Elde edilen C-fikosiyanın pigmenti bakteri ve mayalar üzerinde standart antibiyotiklere göre daha düşük inhibisyon zonu ile antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Antioksidan aktivite DPPH• radikalini süpürme yöntemi kullanılarak  $IC_{50}$   $0,57 \pm 0,01$  mg/mL değeri ile standart olarak kullanılan askorbik aside kıyasla düşük bir değerle sonuçlanmıştır. Antikanser aktivite ise akciğer hücre hatları (A549, CCD-19Lu) ve pankreas hücre hatları (Panc-1, hTERT-HPNE) üzerinde MTT testi kullanılarak belirlenmiştir. CCD-19Lu normal akciğer hücre hattı için hesaplanan  $IC_{50}$  değerlerinin A549 akciğer kanser hücre hattına göre daha düşük bulunduğu gözlenmiştir. C-fikosiyanın pankreas kanser hücreleri üzerinde 72 saatte düşük konsantrasyonlarda daha etkili ve kayda değer antikanser aktiviteye sahip olduğu ve hücre canlılık sonuçları göz önüne alındığında, seçilen bileşiklerin uygun bir güvenlik profili gösterdiği bulunmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** Siyanobakteriler, C-fikosiyanın, Saflaştırma, Karakterizasyon, Biyolojik aktivite.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE PHYCOCYANIN PRODUCTION POTENTIAL OF DIFFERENT STRAINS OF CYANOBACTERIA ISOLATED FROM VARIOUS ENVIRONMENTS

Sona HAJIYEVA

Department of Advanced Technologies

Programme in Biotechnology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, August 2022

Supervisor: Prof. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ

The master thesis investigates the isolate with the highest C-phycoerythrin yield was determined from seven cyanobacteria isolates that were previously isolated and identified from various ecological environments. The studies of optimization for C-phycoerythrin production were carried out and the obtained phycoerythrin was purified and characterized. To determine its biological activity, the antimicrobial, antioxidant, and anticancer effects of the extract were investigated in vitro. With the optimization studies for the extraction method, the best yield was obtained with the thermophilic *Geitlerinema* sp. isolate. The obtained C-phycoerythrin pigment showed antimicrobial activity on bacteria and yeasts with a lower inhibition zone compared to standard antibiotics. Its antioxidant activity by performing the DPPH• test resulted in an IC<sub>50</sub> of 0.57±0.01 mg/mL, which is relatively low compared to ascorbic acid (0.24±0.08 mg/mL). The anticancer activity was determined using the MTT assay on lung cell lines (A549, CCD-19Lu) and pancreatic cell lines (Panc-1, hTERT-HPNE). It was observed that the calculated IC<sub>50</sub> values of the compound for the CCD-19Lu normal cell line were lower than the A549 lung cancer cell line. C-phycoerythrin was found to have more potent and significant anticancer activity for pancreatic cells at low concentrations within 72 hours and the selected compounds showed a favorable safety profile considering the cell viability results.

**Keywords:** Cyanobacteria, C-Phycoerythrin, Purification, Characterization, Biological Activity.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecinde zorlandığım ve endişe ettiğim kısımlarda kendi akademik bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, her daim desteğini esirgemeyen, çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ'a,

Çalışmamın saflaştırma ve karakterizasyon aşamasında bana çok büyük yardımı dokunan, bu konuda elinden geldiğince bana yardım eden, pozitif enerjisi ile her zaman motive eden değerli hocam Doç. Dr. Volkan KILIÇ'a,

Kısa süre içinde tezimin birçok kısmında bana kendi akademik bilgilerini sunarak destek olduğu için Prof. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ'ye,

Kimya alanında çok fazla akademik bilgisi olan ve beni eğiten ayrıca bu tez çalışmasında beni başaracağıma inandırıp bu konuda her daim yardımcı olan değerli Prof. Dr. İlhami ÇELİK'e,

Kimya laboratuvarında çalışmam için bana izin verip bu konuda her zaman destek olan değerli hocam Doç. Dr. İlker AVAN'a,

Laboratuvarda çalıştığım süreçte gerek cihazlar gerekse kimyasal maddeler konusunda zorlandığım kısımlarda desteklerini esirgemeyen ve yabancı olduğumu hissettirmeyen Öğr. Gör. Erdoğan ÇAKIR'a, Mustafa KARAKAŞ'a,

Zor zamanlarımda her daim yanımda olan ve beni destekleyen laboratuvar partnerim ve arkadaşım olan Aytan MAMMADOVA'ya,

Bana çok sevecen davranıp çalışmamda bana yardımcı olan değerli ve yetenekli arkadaşım Yeliz DÜNDAR'a,

Kazandığım tüm mesleki bilgiler, aynı zamanda laboratuvar ve cihaz olanaklarından faydalandığım için Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na ve lisansüstü eğitim enstitüsünün tüm saygıdeğer üyelerine,

Bana eğitimimim boyunca her daim maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen uzakta olmalarına rağmen yalnız hissettirmeyen, benim başaracağıma benden daha fazla inanan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi iletiyorum.

Sona HAJIYEVA

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Sona HAJIYEVA

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                                      |      |
|----------------------------------------------------------------------|------|
| BAŞLIK SAYFASI .....                                                 | i    |
| JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....                                           | ii   |
| DANIŞMAN ONAYI .....                                                 | iii  |
| ÖZET .....                                                           | iv   |
| ABSTRACT.....                                                        | v    |
| TEŞEKKÜR .....                                                       | vi   |
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....                     | vii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                    | viii |
| TABLolar DİZİNİ .....                                                | xii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                | xiii |
| GÖRSELLER DİZİNİ .....                                               | xv   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                 | xvi  |
| 1. GİRİŞ .....                                                       | 1    |
| 1.1. Siyanobakteriler .....                                          | 2    |
| 1.2. Siyanobakteriyel Pigmentler .....                               | 4    |
| 1.3. Fikobiliproteinler .....                                        | 6    |
| 1.4. C-fikosiyanin.....                                              | 9    |
| 1.4.1. C-fikosiyaninin yapısal özellikleri.....                      | 9    |
| 1.4.2. C-fikosiyaninin fiziksel özellikleri.....                     | 12   |
| 1.4.3. C-fikosiyaninin üretim stratejileri ve yöntemleri.....        | 13   |
| 1.4.4. Siyanobakterilerden C-fikosiyanin eldesi .....                | 15   |
| 1.4.4.1. C-fikosiyaninin ekstraksiyonu ve kullanılan yöntemler ..... | 15   |
| 1.4.4.2. C-fikosiyaninin saflaştırılması .....                       | 18   |
| 1.4.4.3. C-fikosiyaninin tanımlanması.....                           | 21   |
| 1.4.5. C-fikosiyaninin biyolojik aktivitesi .....                    | 22   |
| 1.4.5.1. C-fikosiyaninin antioksidan aktivitesi .....                | 23   |
| 1.4.5.2. C-fikosiyaninin antimikrobiyal aktivitesi.....              | 24   |

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 1.4.5.3. C-fikosiyaninin antikanser aktivitesi .....                  | 25 |
| 1.4.6. C-fikosiyaninin kullanım alanları.....                         | 26 |
| 1.4.6.1. Gıda ve kozmetikte renklendirici olarak kullanımı .....      | 26 |
| 1.4.6.2. Farmasötik ve floresan prob olarak kullanımı.....            | 28 |
| 1.4.7. C-fikosiyaninin ekonomik değeri ve gelecek perspektifleri..... | 30 |
| 1.5. Hipotez ve Amaç.....                                             | 31 |
| 2. MATERYAL VE METOT.....                                             | 34 |
| 2.1. Materyal.....                                                    | 34 |
| 2.1.1. Siyanobakteri izolatları.....                                  | 34 |
| 2.1.2. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar .....                           | 34 |
| 2.1.3. Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları.....              | 35 |
| 2.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerleri .....                         | 35 |
| 2.1.4.1. BG-11 besiyeri.....                                          | 35 |
| 2.1.4.2. Mikroelement A .....                                         | 36 |
| 2.1.4.3. Mueller Hinton agar (MHA) (Biomark Laboratories).....        | 36 |
| 2.1.4.4. Mueller Hinton broth (MHB) (Biomark Laboratories) .....      | 37 |
| 2.1.4.5. Sabouraud Dextrose agar (SDA) (Sigma-Aldrich) .....          | 37 |
| 2.1.4.6. Sabouraud Dextrose broth (SDB) (Sigma-Aldrich) .....         | 37 |
| 2.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler ve hazırlanışı .....              | 37 |
| 2.1.5.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve markaları .....              | 37 |
| 2.1.5.2. SDS-PAGE’de kullanılan kimyasalların hazırlanması .....      | 38 |
| 2.2. Metot.....                                                       | 41 |
| 2.2.1. İzolatların üretim koşulları .....                             | 41 |
| 2.2.2. Siyanobakterilerin kuru ağırlık tayini .....                   | 42 |
| 2.2.3. Optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi .....             | 42 |
| 2.2.4. C-fikosiyanin miktarının belirlenmesi.....                     | 43 |
| 2.2.5. C-fikosiyanin üretimiyle ilgili yapılan çalışmalar .....       | 44 |
| 2.2.5.1. Farklı ışık sürelerinin C-fikosiyanin üretimine etkisi.....  | 44 |
| 2.2.5.2. Yaş ve kuru biyokülden C-fikosiyanin verimine etkisi .....   | 44 |
| 2.2.5.3. En uygun tampon çözeltinin belirlenmesi .....                | 45 |
| 2.2.5.4. En uygun sonikasyon parametrelerin belirlenmesi.....         | 45 |
| 2.2.5.5. Büyük ölçekli C-fikosiyanin üretimi.....                     | 45 |

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.6. C-fikosiyaninin kısmi saflaştırılması .....                        | 46        |
| 2.2.6.1. Amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz.....                        | 46        |
| 2.2.7. C-fikosiyaninin saflaştırılması.....                               | 47        |
| 2.2.7.1. İyon değişim kolon kromatografisi .....                          | 47        |
| 2.2.8. C-Fikosiyaninin tanımlanması .....                                 | 48        |
| 2.2.8.1. Spektrofotometrik karakterizasyon .....                          | 48        |
| 2.2.8.2. SDS-PAGE yöntemiyle saflık ve moleküler ağırlık tayini.....      | 48        |
| 2.2.9. Farklı sıcaklıkların C-fikosiyanin stabilitesine etkisi.....       | 50        |
| 2.2.10. C-fikosiyaninin biyolojik aktivite tayinleri .....                | 50        |
| 2.2.10.1. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi .....                      | 50        |
| 2.2.10.2. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.....                    | 51        |
| 2.2.10.3. Antikanser aktivitenin belirlenmesi .....                       | 52        |
| 2.2.11. İstatistiksel analiz .....                                        | 54        |
| <b>3. BULGULAR.....</b>                                                   | <b>55</b> |
| 3.1. Optimum Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi.....                    | 55        |
| 3.2. C-fikosiyaninin Verimini Etkileyen Parametrelerin Belirlenmesi ..... | 58        |
| 3.2.1. Farklı ışık sürelerinin C-fikosiyanin üretimine etkisi.....        | 58        |
| 3.2.2. Yaş ve kuru biyokülden C-fikosiyanin verimine etkisi .....         | 58        |
| 3.2.3. Tampon çözeltilerin C-fikosiyanin verimine etkisi .....            | 59        |
| 3.2.4. Sonikasyonun C-fikosiyanin verimine etkisi.....                    | 60        |
| 3.3. Siyanobakteri İzolatlarından C-fikosiyaninin Saflaştırılması .....   | 61        |
| 3.3.1. Amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz.....                          | 61        |
| 3.3.2. İyon değişim kolon kromatografisi (İDK).....                       | 62        |
| 3.4. C-fikosiyaninin Tanımlanması.....                                    | 64        |
| 3.4.1. C-fikosiyaninin spektrofotometrik tanımlanması .....               | 64        |
| 3.4.2. C-fikosiyaninin saflık ve moleküler ağırlık tayini.....            | 64        |
| 3.5. Farklı Sıcaklıkların C-fikosiyanin Stabilitesine Etkisi .....        | 66        |
| 3.6. C-fikosiyaninin Biyolojik Aktivite Tayinleri .....                   | 68        |
| 3.6.1. Antikoksidan aktivite tayini .....                                 | 68        |
| 3.6.2. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi .....                      | 69        |
| 3.6.3. Antikanser aktivitenin belirlenmesi.....                           | 71        |
| <b>4. TARTIŞMA.....</b>                                                   | <b>76</b> |

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| <b>KAYNAKÇA.....</b>  | <b>87</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b> | <b>1</b>  |



## TABLÖLER DİZİNİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.1.</b> Fikobiliproteinlerin renk ve absorpsiyon özellikleri (Kannaujiya vd., 2017). .....                                                                                  | 7  |
| <b>Tablo 1.2.</b> Çeşitli siyanobakterilerden ekstrakte edilen C- fikosiyanın saflaştırılması için kullanılan yöntemler .....                                                         | 20 |
| <b>Tablo 1.3.</b> Fikobiliprotein bazlı biyoteknolojik ürünleri üreten şirketler.....                                                                                                 | 31 |
| <b>Tablo 2.1.</b> Kullanılan cihaz, ekipmanlar ve markaları .....                                                                                                                     | 34 |
| <b>Tablo 2.2.</b> Çalışmada kullanılan test mikroorganizma kültürleri.....                                                                                                            | 35 |
| <b>Tablo 2.3.</b> Kullanılan kimyasal maddeler ve markalar .....                                                                                                                      | 37 |
| <b>Tablo 3.1.</b> Siyanobakteri izolatlarından farklı yöntemler kullanılarak elde edilen C-fikosiyanın verimleri (mg/g) ve saflık oranları (A620/A280) .....                          | 56 |
| <b>Tablo 3.2.</b> Yaş ve kuru olarak siyanobakteriyel biyokülden C-fikosiyanın verimine etkisi.....                                                                                   | 59 |
| <b>Tablo 3.3.</b> C-fikosiyanın saflaştırılmasında kullanılan reçineler, verim, geri kazanım ve saflık faktörü .....                                                                  | 63 |
| <b>Tablo 3.4.</b> C-fikosiyanın saflaştırılması için yapılan tüm işlemlerin saflık ve verim değerleri .....                                                                           | 63 |
| <b>Tablo 3.5.</b> Kısmi saflaştırılmış C-fikosiyanın ekstraktı ve pozitif kontrol olarak kullanılan standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon çapları..... | 70 |
| <b>Tablo 3.6.</b> Saf C-fikosiyanın 4 farklı hücre hattına 24-48-72 saatlik uygulama sonrası hücre çoğalmasının inhibisyonu ve $\pm$ standart sapmaları .....                         | 72 |
| <b>Tablo 3.7.</b> Farklı hücre grupları 3 günlük MTT analiz sonucundaki IC <sub>50</sub> değerleri .....                                                                              | 73 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.1.</b> Tilakoid membran üzerinde fikobilizomun şematik diyagramı<br>(Ledermann vd., 2017).....                                                                                                                                                                                                         | 8  |
| <b>Şekil 1.2.</b> C-fikosiyaninin kimyasal yapısı (Mandal vd.,2020) .....                                                                                                                                                                                                                                         | 9  |
| <b>Şekil 1.3.</b> C-fikosiyaninin $\alpha$ ve $\beta$ alt birimlerinin amino asit dizilerine bağlanma<br>konumları (Mandal vd., 2020) .....                                                                                                                                                                       | 10 |
| <b>Şekil 1.4.</b> C-fikosiyanin monomer yapısı, $\alpha$ sarı ve $\beta$ mavi alt birimleri (Adir vd.,<br>2001). .....                                                                                                                                                                                            | 10 |
| <b>Şekil 1.5.</b> C-fikosiyaninin trimer ve hegzamer yapıları $\alpha$ ve $\beta$ alt birimleri sırasıyla<br>camgöbeği ve yeşil renklerde, fikosiyanobilin kromoforları<br>kahverengi renktedir, $\beta$ alt biriminin ikame edilmiş kalıntıları ise<br>kırmızı ile temsil edilmektedir (Sonani vd., 2019). ..... | 11 |
| <b>Şekil 1.6.</b> Pelargonium luridum izolatından elde edilmiş olan C-fikosiyanin<br>özütünün absorpsiyon spektrumları, hegzamer ve trimer (Berns ve<br>MacColl, 1989). .....                                                                                                                                     | 13 |
| <b>Şekil 3.1.</b> Farklı ekstraksiyon yöntemleri ve izolatların C-fikosiyanin verimine<br>göre karşılaştırılması .....                                                                                                                                                                                            | 55 |
| <b>Şekil 3.2.</b> Karanlık/aydınlık inkübasyon sürelerinin C-fikosiyanin verimine etkisi<br>(24 saat aydınlık kontrol olarak kullanılmıştır) .....                                                                                                                                                                | 58 |
| <b>Şekil 3.3.</b> Tampon çözeltilerin C-fikosiyanin verimi ve saflığına etkisi * $p<0,05$<br>fark var, ** $p<0,01$ , *** $p<0,001$ önemli fark var .....                                                                                                                                                          | 59 |
| <b>Şekil 3.4.</b> a. Farklı amplitüd oranlarının C-fikosiyanine etkisi; b. Farklı<br>sonikasyon sürelerinin C-fikosiyanine etkisi ve istatistiksel olarak<br>değerlendirilmesi (Anlamlı farklılık var: * $p<0,05$ *** $p<0,001$ ,<br>**** $p<0,0001$ ). .....                                                     | 61 |
| <b>Şekil 3.5.</b> C-fikosiyaninin saflaştırılması sırasında elde edilen ekstraktların<br>absorpsiyon spektrumları .....                                                                                                                                                                                           | 64 |
| <b>Şekil 3.6.</b> C-fikosiyaninin SDS-PAGE profili. (M) Protein markır, (A) Ham<br>ekstrakt, (B) amonyum sülfat çöktürme/diyaliz, (C, D) iyon değişim<br>kromatografisi .....                                                                                                                                     | 65 |
| <b>Şekil 3.7.</b> Saflaştırılmış C-fikosiyanin ( $A_{620}/A_{280}<4,0$ ). (M) Protein markır, Q-<br>sefaroze (A, B, C), DEAE- selüloz (D, E, F).....                                                                                                                                                              | 65 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.8.</b> Sıcaklık artışının C-fikosiyanin üzerinde etkisinin nispi konsantrasyon (CR) değeri.....                                                                                                                                                                                                                                | 66 |
| <b>Şekil 3.9.</b> Sıcaklık artışının C-fikosiyanin üzerinde etkisinin absorpsiyon spektrumları .....                                                                                                                                                                                                                                      | 67 |
| <b>Şekil 3.10.</b> Kısmi saflıkta olan C-fikosiyaninin radikal süpürücü aktivite tayini (kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır) .....                                                                                                                                                                                               | 68 |
| <b>Şekil 3.11.</b> Kısmi saflıkta olan C-fikosiyaninin (solda) ve askorbik asit kontrolünün (sağda) IC <sub>50</sub> grafiği .....                                                                                                                                                                                                        | 69 |
| <b>Şekil 3.12.</b> Farklı hücre grupları için oluşturulmuş 24-48-72 saatlik hücre % canlılık değerleri. (Anlamlılık aksi belirtilmedikçe **p<0,01 dışındaki tüm sütunlar *p<0,01 dışındaki tüm sütunlar *p<0,05).....                                                                                                                     | 71 |
| <b>Şekil 3.13.</b> CCD-19Lu hücrelerinin morfolojik değerlendirmesi. Soldan sağa 24, 48 ve 72 saatlik analiz sonuçları verilmiştir. Üst grup madde uygulanmamış hücre kontrol gruplarını, alt grup ise IC <sub>50</sub> uygulanmış hücre grupları temsil etmektedir (Olympus CKX41-SC30, Japonya mikroskop altında görüntüsü 10x) .....   | 73 |
| <b>Şekil 3.14.</b> A549 hücrelerinin morfolojik değerlendirmesi. Soldan sağa 24, 48 ve 72 saatlik analiz sonuçları verilmiştir. Üst grup madde uygulanmamış hücre kontrol gruplarını, alt grup ise IC <sub>50</sub> uygulanmış hücre grupları temsil etmektedir (Olympus CKX41-SC30, Japonya mikroskop altında görüntüsü 10x) .....       | 74 |
| <b>Şekil 3.15.</b> hTERT-HPNE hücrelerinin morfolojik değerlendirmesi. Soldan sağa 24, 48 ve 72 saatlik analiz sonuçları verilmiştir. Üst grup madde uygulanmamış hücre kontrol gruplarını, alt grup ise IC <sub>50</sub> uygulanmış hücre grupları temsil etmektedir (Olympus CKX41-SC30, Japonya mikroskop altında görüntüsü 10x) ..... | 74 |
| <b>Şekil 3.16.</b> Panc-1 hücrelerinin morfolojik değerlendirmesi. Soldan sağa 24, 48 ve 72 saatlik analiz sonuçları verilmiştir. Üst grup madde uygulanmamış hücre kontrol gruplarını, alt grup ise IC <sub>50</sub> uygulanmış hücre grupları temsil etmektedir (Olympus CKX41-SC30, Japonya mikroskop altında görüntüsü 10x) .....     | 75 |

## GÖRSELLER DİZİNİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Görsel 1.1.</b> C-Fikosiyaninin gıdalarda renklendirici olarak kullanımı (http-1) .....                                                       | 28 |
| <b>Görsel 1.2.</b> Sulu çözelti içinde floresans hale gelmiş C-fikosiyanin ekstraktı.....                                                        | 29 |
| <b>Görsel 2.1.</b> Çeşitli bölgelerden izole edilmiş siyanobakteri izolatları .....                                                              | 42 |
| <b>Görsel 2.2.</b> Termofil siyanobakterilerin hava kompresörüyle steril hava verilerek<br>2 L'lik erlenlerde üretim .....                       | 45 |
| <b>Görsel 2.3.</b> A. DEAE – selüloz dolgu maddeli iyon değişim kromatografisi, B. Q<br>– sefaroz dolgu maddeli iyon değişim kromatografisi..... | 47 |
| <b>Görsel 2.4.</b> SDS-PAGE cihazına yüklenmiş C-fikosiyanin numuneleri.....                                                                     | 49 |
| <b>Görsel 3.1.</b> Kullanılan çözeltilerin ham ekstraktlar üzerinde oluşturduğu renk<br>değişimi. ....                                           | 60 |
| <b>Görsel 3.2.</b> Siyanobakteri izolatlarından elde edilen C-fikosiyaninin amonyum<br>sülfatla çöktürme adımları ve diyaliz yöntemi.....        | 62 |
| <b>Görsel 3.3.</b> Farklı sıcaklıklar altında C-fikosiyaninin örneklerinin oluşturduğu<br>renk değişimi.....                                     | 67 |
| <b>Görsel 3.4.</b> Kısmi saflaştırılmış C-fikosiyanin ekstraktının test<br>mikroorganizmaları üzerinde gösterdiği antimikrobiyal etkileri .....  | 70 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                  |                                                           |
|------------------|-----------------------------------------------------------|
| ANOVA            | : Varyans Analizi                                         |
| C-PC             | : Siyanobakteriden elde edilen fikosiyanin                |
| DEAE             | : Dietilaminoetil                                         |
| Dk               | : Dakika                                                  |
| DMEM             | : Dulbecco's Modified Eagle's Medium                      |
| DMSO             | : Dimetilsülfoksit                                        |
| DNA              | : Deoksiribo Nükleik Asit                                 |
| DPPH•            | : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil                            |
| EDTA             | : Etilendiamin tetraasetik asit                           |
| FBS              | : Fetal Sığır Serum                                       |
| FDA              | : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi                           |
| IC <sub>50</sub> | : %50 İnhibitör Konsantrasyon                             |
| kDa              | : Kilodalton                                              |
| mA               | : Miliamper                                               |
| mg               | : Miligram                                                |
| mM               | : Milimolar                                               |
| MTT              | : 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür   |
| Nm               | : Nanometre                                               |
| ort±             | : Ortalama                                                |
| PBP              | : Fikobiliprotein                                         |
| PBS              | : Phosphate buffered saline (Fosfat ile tamponlanmış tuz) |
| Rpm              | : Dakikadaki dönüş sayısı                                 |
| SDS-PAGE         | : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi   |
| UV-Vis           | : Ultraviyole ve görünür ışık                             |
| $\alpha$         | : Alfa                                                    |
| $\beta$          | : Beta                                                    |
| mL               | : Mililitre                                               |
| $\mu$ L          | : Mikrolitre                                              |

## 1. GİRİŞ

Bilindiği gibi pigmentlerin temel maddeleri doğal kaynaklardan köken alır. Doğada gerek kimyasal gerek fiziksel etkiye ihtiyaç duymadan kendiliğinden gelişebilme özelliğine sahip siyanobakteriler çevreye atık olarak salınmak yerine doğal mavi renk özelliğine sahip C-fikosiyenin (C-PC) üreticisi olarak mükemmel bir biyoteknolojik doğal kaynak olabilir.

Doğal ortamlarda yetişen çoğu mavi yeşil siyanobakterilerin genelinde yaygın olarak bulunan ve kromofor olarak sadece fikosiyanobilinden oluşan tip, C-fikosiyanindir (Tandeau de Marsac, 2003).

Siyanobakteriler bir C-fikosiyenin pigment kaynağı olup kuru ağırlığın %8-13'ü oranında C-fikosiyenin içermektedirler. C-fikosiyenin, toksik olmayan, benzersiz yapısal ve işlevsel özellikleriyle biyoteknoloji, biyotıp, farmasötikler, renklendiriciler, floresan ajanlar ve gıda ürünleri, çeşitli ticari uygulamalar için endüstriyel alanlarda önemi olan bir proteindir. Bununla birlikte, bu pigmentin geniş ölçekte uygulanması ve kaliteli ürünlerin geliştirilebilmesi prosesi saflık endeksine bağlıdır. C-fikosiyenin ekstraksiyonu ve saflaştırılması işlemi son derece karmaşık olmakla beraber belirli siyanobakteri cinslerinde bulunan C-fikosiyenin veriminden dolayı sınırlı olmaktadır (Kannaujiya vd., 2017).

Son birkaç yıldır, siyanobakterilerden C-fikosiyenin elde edilmesine yönelik hücre ekstraksiyonu için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır (Juin vd., 2015). Siyanobakterilerden fikosiyeninlerin saflaştırılması için birkaç teknik benimsenmiş ancak, temel teknikler laboratuvar ölçeğiyle sınırlı kalmıştır. Son zamanlarda, fikobiliprotein üretimi için büyük ölçekli saflaştırma teknolojileri kullanılmaktadır (Chen ve Xiong, 2022; Guan, 2016).

C-fikosiyenin sentetik renklendirici olarak kullanımının yanında sağlık amaçlı olarak da geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. Son yılların en ilgi çekici araştırma konusu olan bu pigmentin üretimiyle ilgili birçok araştırma bulunmaktadır (Galetović vd., 2020; Martelli vd., 2014; Kaur vd., 2019; Saini vd., 2018).

Biyoaktif bileşikler olarak bilinen fikobiliproteinler ile ilgili çalışmalara ilgi artarak devam etmektedir (Pagels vd., 2019). Katma değeri yüksek doğal ürün olarak bilinen C-fikosiyenin antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikanser etkilere sahiptir (Liu vd., 2022; Pourhajibagher vd., 2019; Romay vd., 2003). Ayrıca çeşitli

klirik uygulamalarda bir ilaç olarak da güçlü bir potansiyele sahip olabilir (Demay vd., 2019). Bu nedenle biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan maddenin yüksek oranda bir saflığa sahip olması gerekir. Burada saflık faktörü C-fikosiyanın kullanım alanlarını belirlemektedir. Örneğin C-fikosiyanın 0,7 oranındaki saflığı gıda sektörü için uygulanabilir bir değerdir (Kferbck vd., 2020).

Çok az sayıda siyanobakteri türünün, yüksek miktarda C-fikosiyanın üretme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle daha verimli suşların eldesi önemlidir. Bu çalışmada daha önce farklı ekolojik ortamlardan izole edilerek identifiye edilmiş ve Eskişehir Teknik niversitesi'nin mikrobiyoloji laboratuvarında muhafaza edilen 7 adet siyanobakteri izolatu kullanılmıştır. Bu izolatlar Kütahya'daki Simav Eynal termal kaplıcasından izole edilen 3 adet Geitlerinema sp. izolatu, Eskişehir Porsuk ayı'ndan izole edilen Nodosilinea sp, Phormidium lumbricale ve Leptolyngbya norvegica izolatları, Kırka Bor Madeni atık havuzundan izole edilen Leptolyngbya sp. izolatlarıdır. Çalışmada bu izolatlardan farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak C-fikosiyanın eldesi, elde edilen C-fikosiyanın saflaştırılarak karakterizasyonu ve biyolojik aktivitesinin ortaya konması amaçlanmıştır.

C-fikosiyanın veriminin arttırılmasına yönelik en uygun yöntem ve izolatu seçiminin ardından belirlenen izolatu gelişim sürecinde aydınlık ve karanlık inkübasyon koşulu, ekstraksiyon yönteminde tampon, süre ve g gibi parametrelerde değişiklikler yapılarak en uygun koşullar belirlenmiştir. Ekstraksiyonun ardından C-fikosiyanın örneğini saflaştırmak amaçıyla literatürde en çok tercih edilen yöntem olan amonyum sülfatla çöktürme ve iyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. Daha sonra kısmi ve yüksek saflıktaki C-fikosiyanın örnekleri liyofilize edilerek, karakterizasyon, moleküler ağırlık, yüksek sıcaklıklara dayanıklılık, antimikrobiyal, antioksidan aktivite, ve antikanser çalışmaları yapılmıştır.

### **1.1. Siyanobakteriler**

Mavi yeşil siyanobakteriler evrimde çok eskiye dayanan, morfolojik yönden farklı, ekolojik olarak oldukça önemli, gram-negatif prokaryotik mikroorganizmalardır (Soule ve Garcia-Pichel, 2019). Bunların çoğu aerobik fototroflar olup, yaşam süreçleri için sadece su, karbondioksit, inorganik maddeler ve ışığa ihtiyaç duymaktadırlar. Fotosentez, enerji metabolizmasının temel unsurudur. Doğal

ortamlarda ise bazı türlerin tamamen karanlıkta uzun süre hayatta kalabildikleri bilinmektedir. Bununla birlikte bazı siyanobakteriler fotosenteze gerek kalmaksızın heterotrofik beslenme yeteneğine sahiptir (Fay, 1965; Singh vd., 2021).

Siyanobakteriler, deniz ve karasal ortamlar başta olmak üzere tatlı sular, kaya ve topraklarda kozmopolit bir dağılıma sahip olup, serbest olarak yaşamlarını sürdürebilirler. Bunun yanı sıra tuzlu, acı veya tatlı suda, soğuk ve termal kaplıçalarda ve başka mikro alglerin bulunmadığı ekstrem ortamlarda gelişebilirler (Mur vd., 1999). Çeşitli çevresel stres koşulları altında, büyüme ve gelişme bakımından bir savunma mekanizması oluşturup mevcut kaynaklardan yararlanmak için morfolojilerini değiştirebilirler (Young, 2007). Siyanobakteriyel morfolojiyi etkileyebilen şartlar arasında besin sınırlamaları, ışık kalitesi rengi, sıcaklık, ozmotik şok, oksidatif ve asidik stres gibi abiyotik faktörler bulunmaktadır (Singh vd., 2010). Bu fotosentetik bakterilerin hücresel yapıları kalın olup, musilaj kılıfla kaplanmış peptidoglikan içerir ve bu özelliği ile bakterilerle yakın ilişkilidir. Farklı hücre morfolojilerine sahip mavi yeşil siyanobakteriler genel olarak üç temel morfolojik formla tanımlanmaktadır. Bunlar tek hücreli, heterosist içermeyen filamentöz formlar ve heterosist içeren filamentli formlardır (Singh ve Montgomery, 2011; Whitton, 2012).

Siyanobakterilerin hücre büyüklüğü 0,5-100  $\mu\text{m}$  arasında değişiklik göstermektedir. Azot fikse etmeyen tek hücreli türlerde ise 1-3  $\mu\text{m}$  arasında değişirken, *Crocospaera* hücreleri biraz daha büyük olma eğilimindedir (çapı 7  $\mu\text{m}$ 'ye kadar). Daha küçük (<3  $\mu\text{m}$ ) siyanobakteriyel grup aynı zamanda "pikoplankton" olarak bilinen, birincil türlerin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (Whitton, 2012).

Siyanobakterilerin, temel olarak ticari kullanımı insan tüketimi için toplu bir biyokütle üretimi olup, uzun geçmişi olan teknolojik uygulamalara dayanmaktadır. "Yüksek değerli ürünler" olarak kabul edilen birçok siyanobakteriyel metabolit vardır. Beta-karoten, astaksantin gibi karotenoidlerin yanı sıra fikobilin, C-fikosiyanin pigmenti, gıda boyası olarak endüstriyel açıdan önemlidir (Soule ve Garcia-Pichel, 2019). Ayrıca, siyanobakterilerde en çok bulunan klorofil a pigmenti radyoaktif etiketli nükleotidler, amino asitler ve siyanobakteriyel kaynaklı bazı restriksiyon enzimlerinin araştırılması amacıyla satılmaktadır. Buna ek olarak, siyanobakteriler tarafından polihidroksialkanoatlar (PHAs) gibi biyopolimerlerin üretimi, özellikle biyomedikal endüstrisinde, petrol bazlı plastiklere biyolojik olarak parçalanabilir bir

alternatif olarak kullanılmaktadır (Abed vd., 2009; Kumar vd., 2019; Yadav vd., 2022).

## 1.2. Siyanobakteriyel Pigmentler

Pigmentler, görünür spektrumun farklı bir aralığında ışığı emen bileşiklerdir. Bu pigmentler, elektronları değişik enerji seviyelerinde absorbe etme ve uyarma özelliğini sağlayan karmaşık ve konjugatif bir yapıya sahiptir (Vinha vd., 2018). Günümüzde pigmentler doğal ve sentetik olarak üretilmektedir. Sentetik pigmentler, endüstriyel üretimleri genellikle modern teknolojiye ve kimyasallara dayanmaktadır. Doğal pigmentler ise, böcekler, bitkiler, algler ve daha birçok canlı türünden elde edilebilmektedir (Joshi vd., 2003). Mavi-yeşil siyanobakteriler de bu gruba dahil olup değişik renklerde doğal pigmentler sentezleme konusunda büyük bir yeteneğe sahiptir. Doğada siyanobakteriler, klorofiller (Chls), karotenoidler, fikobiliproteinler ve scytonemin gibi biyolojik pigmentlerin birincil kaynaklarından biri olarak kabul edilir (Mourelle vd., 2017). Bu pigmentler, biyolojik olarak parçalanabilen insan sağlığı ve çevre için faydalı olabilecek çeşitli renklerin doğal bir kaynağıdır (Rastogi vd., 2010).

Pigmentler yapısal olarak izopren ve tetrapirel halkalarından oluşur. Klorofil ve fikobiliproteinler tetrapirel halka yapısına sahipken karotenoidler izopren birimlerinden oluşmaktadır (Chakdar ve Pabbi, 2017; Morocho-Jácome vd., 2020).

Fikobiliproteinler ve karotenoidler, görünür spektrumun büyük kısmında ışığı absorbe eden ışık toplama sistemlerinde bulunur. Bu pigmentler fikobilizomların ana membranı içerisinde klorofil-karotenoid-protein kompleksleri ve karotenoprotein kompleksleri halinde düzenlenir (Bauer, 1966; Thornber, 1986).

Doğada en çok bol bulunan karotenoidler, çoğunlukla klorofiller ile ilişkili olan temel ışık toplama molekülleridir. Genel olarak karotenoidler, görünür spektrum bölgesindeki klorofil moleküllerinin absorpsiyon spektrumu dışındaki ışığı emer. Ayrıca klorofil molekülleri tarafından emilen enerjinin fazlasını dağıtarak aşırı yüksek ışık yoğunluğunun zararlı etkisine karşı koruma sağlar (Nisar vd., 2015).

Klorofiller, yeşil renkli benzersiz pigmentler olup çeşitli bitki, alg ve siyanobakterilerde bulunur (İnanç, 2011). Siyanobakterilerde doğal olarak altı farklı klorofil türü (klorofil a, b, d, f) olmasına rağmen, klorofil a, çoğu siyanobakteri türü arasında en bol bulunan pigmenttir (Gan ve Bryant, 2015). Klorofil a pigmenti,

yapılarında elektronun delokalizasyonuna izin veren birbirine bağlı tek, çift bağların varlığından dolayı mükemmel bir fotoreseptördür. Bu tür delokalize polienler, spektrumun görünür bölgelerinde çok güçlü absorpsiyon bantlarına sahiptir ve bu da güneş ışığından enerji absorpsiyonuna izin verir (Duan vd., 2007). Klorofil-a ve fikobiliprotein konsantrasyonları kültürün bulunduğu ortamın koşullarına bağlıdır. Yüksek ışık yoğunluğunda yetişen kültürlerin hücre sayısı daha az, gelişim hızı normale göre 10 kat daha yavaştır ve bu hücreler normalin 1/3'ü kadar pigment içerirler (Huang vd., 2016).

Klorofil b türünün pigmentine sahip olan siyanobakteri grubu fikobilizomlardan yoksun olması spesifik bir özelliktir (van der Staay vd., 1998; Velichko vd., 2013).

Klorofil d ilk olarak *A. marina* MBIC 110017 izolatın, Batı Pasifik Ascidian *L. patella* ile simbiyotik bir ilişkisinden izole edilmiş olarak bulunmuştur (Miyashita vd., 1997; Li vd., 2013).

Klorofil f yapısal olarak klorofil a'dan molekül olarak sadece C<sub>2</sub> pozisyonunda (metil grubu yerine formil grubu) farklılık göstererek dalga boyunda kırmızı bölgeye doğru 40 nm kaymaya neden olmaktadır (665 → 698 nm, %100 asetonda) (Li vd., 2013). Bu nedenle klorofil f, bugüne kadar bilinen en kırmızıya kaymış klorofildir (Chen vd., 2010). Toplu bir klorofil f sentezi genellikle kırmızı ışıkla uyarılmaktadır (Ho vd., 2016).

Diğer pigment türü olan scytonemin, yağda çözünen, oldukça kararlı, sarı-kahverengi renkli sekonder metabolittir. Siyanobakterilerin tümü olmasa da birkaç üyesinin hücre dışı polisakkarit kılıfında birikir. Scytonemin, bir karbon-karbon (C-C) bağıyla simetrik olarak bağlanan iki heterosiklik birimden oluşan bir indol alkaloididir (Venckus vd., 2018). Bu nedenle, özel yapısı, hücre içindeki konumu ve mor-mavi bölgeye ek olarak UV-Vis'deki güçlü absorpsiyon maksimumları nedeniyle doğal ürünler arasında benzersizdir (Fleming ve Castenholz, 2007; Pathak vd., 2020). Geleneksel olarak scytonemin, hücre dışı bir kılıf pigmentidir ve foto-koruyucu yapısı, siyanobakterilerin sert, kayalık ve yüksek radyasyonlu alanlarda büyümesine izin verir (Pathak vd., 2017). Scytonemin NpR1271 ile NpR1274 olarak tanımlanan dört gen kümesi, aromatik amino asit biyosentezinde yer alan enzimler için gen setleri içerir ve tirozin ve triptofanın biyosentezinin önemli öncüler olduğu gösterilmiştir (Soule vd., 2007).

Siyanobakteriyel pigmentler ve fizyokimyasal özellikleri hakkında detaylı bilgilerin elde edilmesiyle birlikte birçok gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde kullanım alanları genişlemeye başlamıştır. Ayrıca, pigmentlerin, özellikle fikobiliproteinlerin floresan özellikleri, floresan etiketleme ajanları olarak araştırma ve geliştirme alanında kullanım için büyük ölçüde dikkat çekmeye devam etmektedir. Siyanobakterilerde pigment üretiminde biyosentetik yolların incelenmesi, ürünlerin gelişiminde genetik mühendisliği ve sistem biyolojisi yaklaşımlarının kullanılması, gelecekte büyük ölçekli siyanobakteriyel pigment üretimini gerçeğe dönüştürebilir (Mandal vd., 2020).

### **1.3. Fikobiliproteinler**

Siyanobakterilerde, fotosentetik zar olarak bilinen tilakoid membranının dış yüzeyi, birbirine yakın aralıklı, sıralı granüler yapılarla kaplanmaktadır. Tilakoid membranlara gömülü olan bu yapılar, fotosentetik reaksiyon merkezlerine ışık enerjisini birleştiren ve toplayan fikobiliproteinlerle çevrilidir (Grossman vd., 1993; Glazer, 1985). Siyanobakteriler, klorofil a ve fikobiliproteinleri, pigment-protein komplekslerinde bulunan başlıca ışık toplayıcı pigmentler olarak kullanırlar. Fakat siyanobakteriler, yeşil alglerde ve bitkilerde bulunan klorofiller gibi dış ışık toplama özelliğine sahip değildirler. Bu nedenle PSII ve PSI'e emilen enerjiyi aktarmak için dış ışık toplama kompleksleri olarak fikobiliproteinleri kullanırlar (Nelson ve Yocum, 2006; Liu vd., 2004).

Fikobiliproteinler fotosentetik aparatın II sistem üzerine bağlı, süper molekül-kompleksler halinde, parlak renkli, suda çözünür ve otofloresans yardımcı ışık toplama makromolekülleridir (Kannaujiya vd., 2017). Fikobiliproteinler siyanobakteriler, kırmızı algler, nadir glokofitler ve kriptomonadlarda bulunmaktadır. Bunlar iki tür proteinden oluşur: ilk olarak ışık enerjisini absorbe eden ve fotosentetik reaksiyon merkezlerine ileten (%85) renkli fikobiliproteinler, ikincil olarak ışık absorpsiyon özelliklerini modüle eden (%15) pigmentsiz bağlayıcı proteinlerdir (Glazer, 1989). Buradaki renksiz bağlayıcı proteinlerin molekül ağırlıkları 8 ila 120 kDa arasında değişiklik göstermekle birlikte, moleküller arası etkileşim yoluyla fikobiliprotein kompleksinin biyosentezinde ve stabilizasyonunda rol oynayan elemanlar olarak görev yaparlar (Bryant vd., 1991; Arteni vd., 2009).

Dalga boyları 480 ila 660 nm arasında değişen renkli fikobiliproteinler, farklı kromoforlara veya absorpsiyon spektrumlarına bağlı olarak üç ana grupta sınıflandırılmaktadır. Bunlar C-fikosiyanin (C-PC mavi), C-fikoeritrin (C-PE kırmızı), ve C-allofikosiyanin (C-APC mavimsi yeşil) olup, Tablo 1.1’de belirli dalga boylarına sahip, spektroskopik özellikleri sunulmuştur (Bermejo vd., 2003; Sun vd., 2003).

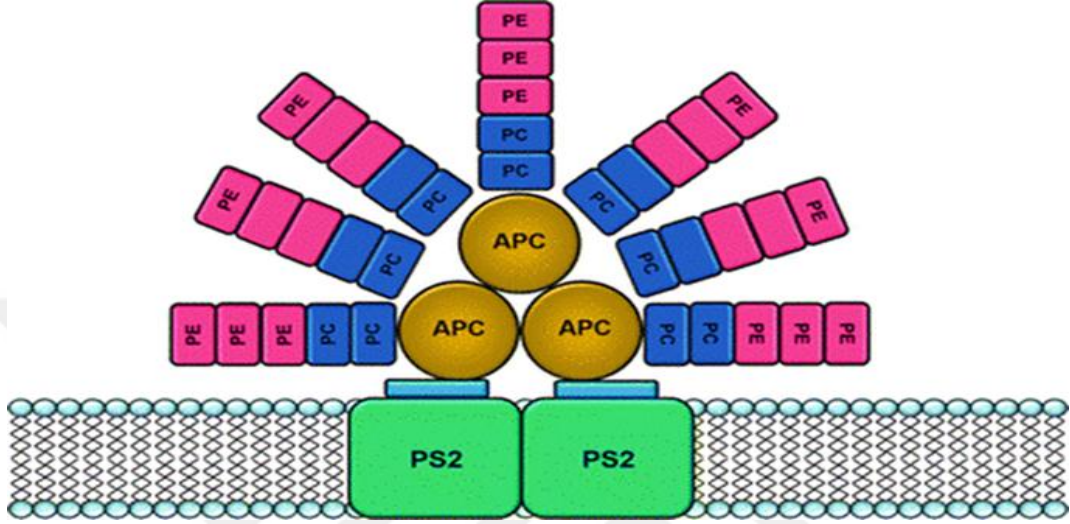
**Tablo 1.1.** Fikobiliproteinlerin renk ve absorpsiyon özellikleri (Kannaujiya vd., 2017).

| Fikobiliproteinler               | Absorpsiyon max (nm) | Emisyon rengi (görünür bölge) | Floresans emisyonu max (nm) | Emisyon rengi (ultraviyole ışınları) | Yayılım                       |
|----------------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| <b>C-fikoeritrin (C-PE)</b>      | 540-565              | Pembe, kırmızı                | 568-575                     | Sarı turuncu                         | Siyanobakteri                 |
| <b>C-fikosiyanin (C-PC)</b>      | 610-625              | Mor, menekşe                  | 630-650                     | Koyu kırmızı                         | Siyanobakteri                 |
| <b>C-allofikosiyanin (C-APC)</b> | 650-655              | Menekşe, gri                  | 660-665                     | Açık kırmızı                         | Kırmızı alg/<br>Siyanobakteri |

Fikobiliproteinlerin ultra yapısı elektron mikrograflarında (1) hemidiskoid, (2) hemi-elipsoid, (3) demet ve (4) blok şeklinde tanımlanmıştır (Bryant vd., 1979). Siyanobakterilerden elde edilen fikobiliproteinlerin çoğu, hemidiskoid morfolojide bulunmaktadır. Hemidiskoid fikobiliproteinler, iki ayrı alt yapısal alan gösterir: periferik çubuklar ve bir çekirdek (Sun vd., 2009). Tipik hemidiskoid fikobiliproteinler çubuk alanı, çekirdek alanından dışarıya doğru yayılan altı veya sekiz silindirik çubuk tarafından oluşmaktadır. Çubuklar, disk şeklindeki fikobiliproteinler, fikoeritrin (C-PE), ve C-fikosiyanine (C-PC) karşılık gelen çubuk bağlayıcı polipeptitlerden ibarettir (Sidler, 1994).

Bununla birlikte bu yapıda gerçekleşmekte olan yüksek verimli enerji transferi, düşük bir enerji düzeyine doğru Şekil 1.1’de sunulan biçimde, C-fikoeritrinden orta enerjili C-fikosiyanine ve nihayetinde düşük enerjili C-allofikosiyanine ulaşarak karbon depolamak için fotosisteme (PSII) aktarılmaktadır (Yamanaka vd., 1978).

Fikobiliproteinlerin çekirdek birimleri  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirlerinden oluşarak hekamerik  $(\alpha\beta)_6$  ve trimerik  $(\alpha\beta)_3$  yapılarda bulunmakla beraber moleküler kütle, amino asit dizisi ve kromofor içeriği bakımından farklılık gösterir. Genel olarak  $\alpha$  zincirinin moleküler ağırlıkları,  $\beta$  alt birimlerinden nispeten daha düşük olmaktadır (Stadnichuk vd., 2015).



Şekil 1.1. Tilakoid membran üzerinde fikobilizomun şematik diyagramı (Ledermann vd., 2017).

Fikobiliproteinler siyanobakterilerde suda çözünür proteinlerin %60'nı, kuru ağırlığın ise %20'sini oluşturur. Rengi temelde A, B, C ve D pirol halkası taşıyan açık zincirli bir dört tetrapirel kromoforu içeren kovalent bağlı prostetik gruplarından kaynaklanmaktadır (Grossman vd., 1993; Padyana vd., 2001; Stadnichuk ve Tropin, 2017). Bunlar mavi renkli fikosiyanobilin ( $PCB-C_{33}H_{38}N_4O_6$ ), mor renkli fikobiliviolin ( $PVB-C_{33}H_{42}N_4O_6S$ ), kırmızı renkli fikoeritrobin ( $PEB-C_{33}H_{38}N_4O_6$ ) ve sarı renkli fikourobilin ( $PUB-C_{33}H_{42}N_4O_6$ ). Bu fikobilinlerin spektroskopik özellikleri, değişen sayıda konjuge çift bağları veya konjuge  $\pi$  elektronların yer değiştirme dereceleri ile belirlenir. Bir ile üç fikobilin, tek bir  $\alpha$  veya  $\beta$  zincir polipeptidine bağlanabilir. Sonuç olarak bir trimerik fikobiliprotein  $(\alpha\beta)_3$ , en az altı fikobilin içerebilmektedir (Maccoll, 1998).

Fikobiliproteinlerin umut verici potansiyel uygulamaları nedeniyle gelecekte artan sayıda çalışmalara sebep olacaktır (Stadnichuk ve Tropin, 2017). Özellikle gıda endüstrisi ve diğer alanlarda, gıda takviyesi ve doğal renklendirici olarak kullanıma uygun olduklarına dair bilgiler, birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir. Örneğin kırmızı renge sahip fikoeritrin, gıda endüstrisinden ziyade biyomedikal çalışmalarda

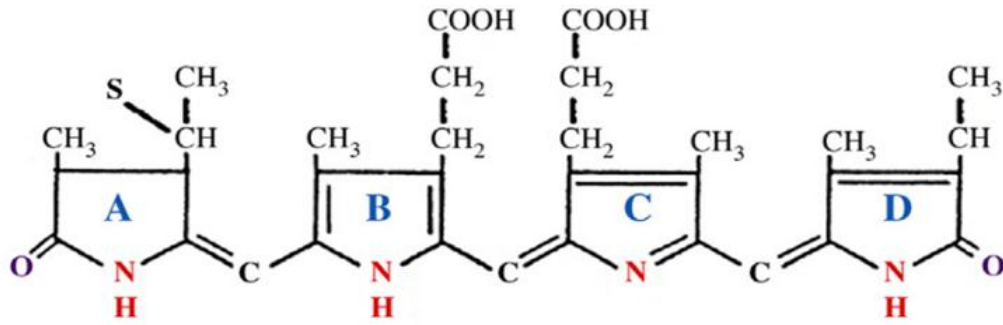
çoğunlukla floresan prob olarak kullanılmıştır (Galetović vd., 2020). Bu doğal pigmentin en yüksek üretim oranı siyanobakterilerde *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*'ten elde edilen C-fikosiyanin ve *Porphyridium cruentum* kırmızı alglerinden elde edilen fikoeritrindir. Bununla birlikte *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. *Phormidium valerianum*, *Spirulina fusiformis* ve kırmızı mikroalg *Rhodospirillum rubrum* türlerinden de elde edilebilmektedir (Sekar ve Chandramohan, 2008).

## 1.4. C-fikosiyanin

### 1.4.1. C-fikosiyaninin yapısal özellikleri

C-fikosiyanin renkli fikobiliprotein ailesinin %75'ini kapsamaktadır. Derin ve yoğun mavi renk özellikli “lina mavisi” olarak bilinen bu protein pigmentin toksik etkisi yoktur ve ışığa hassastır. C-Fikosiyanin genel olarak üç türe ayrılır: Yalnızca siyanobakterilerde bulunan C-fikosiyanin (C-PC), bazı siyanobakterilerde bulunan fikoeritrosiyanin (PEC), ve çok nadir olsa da kırmızı alglerde bulunmakta olan R-fikosiyanin (R- PC) (Zilinskas ve Greenwald, 1986).

C-fikosiyaninin her bir polipeptit zinciri, apoprotein ve açık zincirli dört pirol halkasının oluşturduğu tetrapirel yapıya sahiptir (Şekil 1.2).

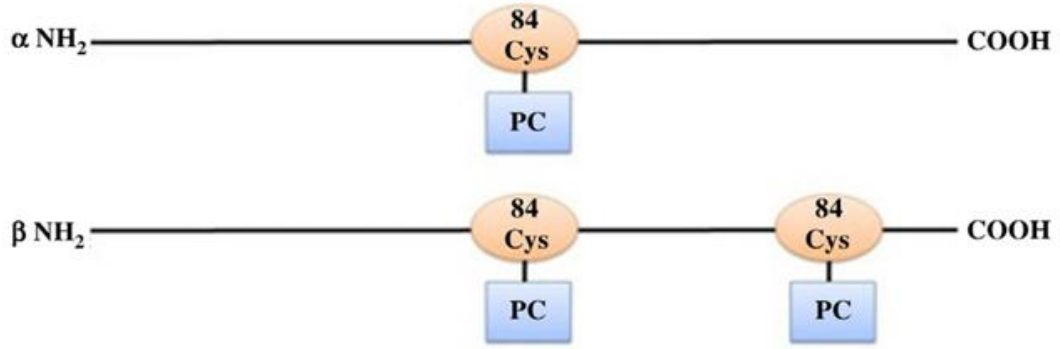


Şekil 1.2. C-fikosiyaninin kimyasal yapısı (Mandal vd.,2020)

Kromoforlar genellikle polipeptit zincirine tetrapirelün A, hem de D pirol halkalarındaki vinil ikame ediciler yoluyla iki sistein aminositine bağlanarak C-fikosiyanin yapısını oluşturmaktadır (Glazer, 1985).

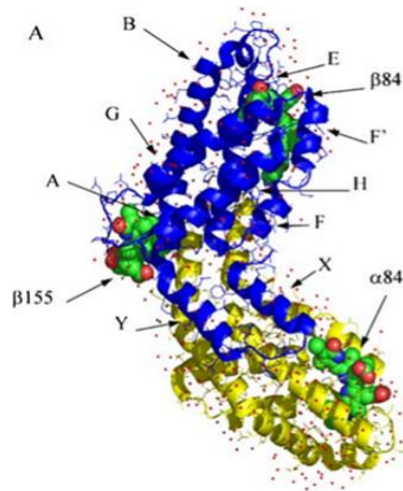
C-fikosiyanin monomeri,  $\alpha$  zincirinde 84,  $\beta$  zincirinde ise 84 ve 155 pozisyonlarında belirli konservatif sistein kalıntılarına kovalent olarak bağlı bir veya

iki fikosiyanobilin içeren farklı polipeptit alt birimlerinden oluşmaktadır (Şekil 1.3). Moleküler ağırlığı 10-19 kDa ve 14 -21 kDa arasında değişmekte olan  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirleri yaklaşık 160 ila 180 amino asit kalıntısı içermektedir (Adir vd., 2001; Maccoll, 1998; Sidler, 1994).



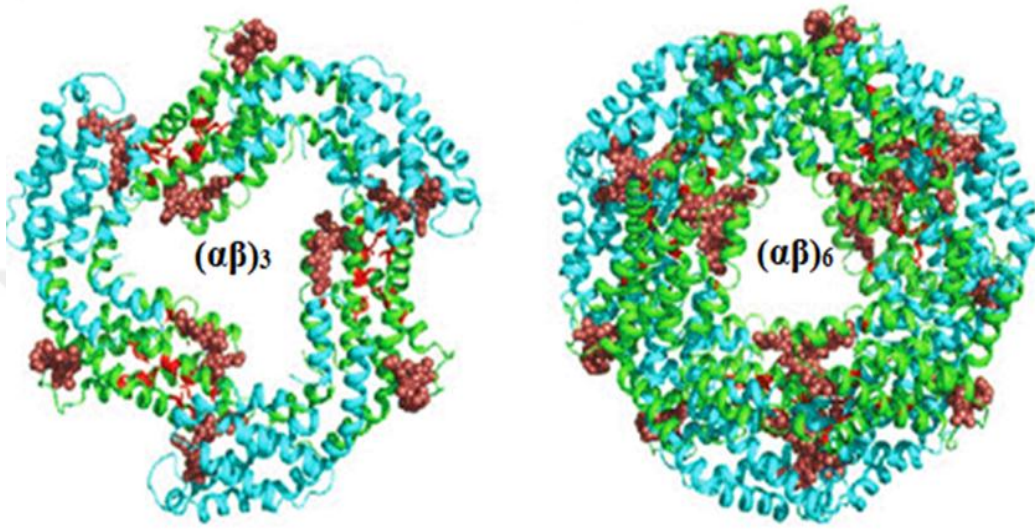
**Şekil 1.3.** C-fikosiyaninin  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinin amino asit dizilerine bağlanma konumları (Mandal vd., 2020)

C-fikosiyanin, 44 ila 260 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip monomerler, trimerler, hegzamerler ve diğer oligomerlerin karmaşık bir çözeltisi olarak bulunabilmektedir (Şekil 1.3). C-fikosiyanin monomer yapısı ve Şekil 1.4'te sunulan üç fikosiyanobilin kromoforu her biri  $\alpha$  ve  $\beta$  monomerleri tarafından taşınarak trimer yapısını oluşturmaktadır.



**Şekil 1.4.** C-fikosiyanin monomer yapısı,  $\alpha$  sarı ve  $\beta$  mavi alt birimleri (Adir vd., 2001).

Bu trimer yapılar kendi içlerinde agregatlar yaparak iki trimerik diskin yüz yüze toplanmasıyla hegzamerik yapıya dönüşebilmektedir. Çoğu C-fikosiyaninin, temel konfügrasyonu trimer yapıda ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> karşımıza çıkabilmektedir (Contreras-Martel vd., 2007; Nield vd., 2003; Padyana vd., 2001).



**Şekil 1.5.** C-fikosiyaninin trimer ve hegzamer yapıları  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimleri sırasıyla camgöbeği ve yeşil renklere, fikosiyanobilin kromoforları kahverengi renktedir,  $\beta$  alt biriminin ikame edilmiş kalıntıları ise kırmızı ile temsil edilmektedir (Sonani vd., 2019).

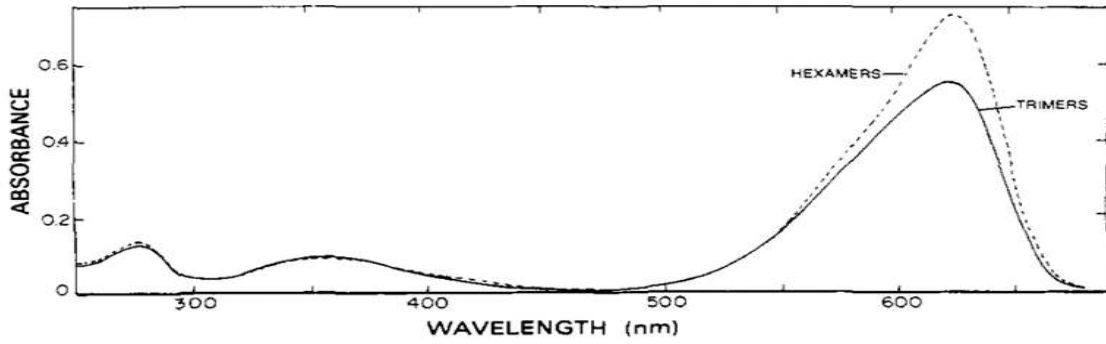
C-fikosiyanin yapısında iki hassaslaştırıcı kromofor olarak işlev gören  $\alpha$ -84 ve  $\beta$ -84 trimer yapıları merkez boşluğunda yer alırken,  $\beta$ -155 transfer enerji donörleri olarak trimerik disk yapısının uç kısmında yer almaktadır (Adir, 2006; Debreczeny vd., 1995; Stec vd., 1999).

Bugüne kadar, C-fikosiyaninin kristal yapıları hem siyanobakteriler hem de kırmızı algler dahil olmak üzere dokuz farklı türde yüksek çözünürlüklü yapılar olarak belirlenmiştir (Adir vd., 2002; Adir vd., 2005; Nield vd., 2003). Bunlar *Anabaena variabilis* (Fisher, 1980), *Termophilic cyanobacterium*, *Mastigocladus laminosus* (Schirmer vd., 1985), *Fremyella diplosiphon* (Duerring vd., 1991), *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Pizarro ve Sauer, 2001), *Synechococcus vulcanus* (Adir vd., 2001) ve *Cyanobacterium Cyanidium* (Stec vd., 1999) gibi farklı türlerde bulunan C-fikosiyaninin kristal yapıları belirlenmiştir.

#### 1.4.2. C-fikosiyaninin fiziksel özellikleri

Siyanobakteriyel hücrelerin bozulması sonucu, fikobiliproteinler tilakoidlerin dış yüzeylerinden yüksek molekül ağırlıklı kümeler halinde serbest bir şekilde salınırlar. Bunların kesin boyutu incelenen organizmaya, pH, iyonik güç, sıcaklık, protein konsantrasyonu dahil olmak üzere izolasyon koşullarına bağlıdır (MacColl vd., 1971). Yapılan birçok araştırmaya göre farklı pH aralığına sahip çözeltiler içinde C-fikosiyaninin hegzamer ve trimer yapıları ortaya çıkmaktadır. Neufeld ve Riggs (1969), Hattori vd., (1965) göre, C-fikosiyaninde, düşük pH-5-6 aralığında 0,01'in üzerindeki iyonik kuvvetler ve 1 mg/mL'den yüksek protein konsantrasyonlarında hegzamerik yapı daha baskın bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Seyreltme hegzameri tamamen düşük pH'da monomer, yüksek pH'da ise dimer haline dönüşür. Nötral bir pH ortamında (pH-7) çoğu C-fikosiyanin proteini çözelti içinde stabil olmayarak trimerik formunda bulunmaktadır (Hattori vd., 1965).

İzolasyon koşullarına (pH, iyonik güç vb.) bağlı olarak C-fikosiyaninin spektroskopik özellikleri de değişmektedir. Bu da esasen içerdiği fikobilin türü ve taşınan fikobilinlerin alt birimlerde ( $\alpha$  ve  $\beta$ ) trimer veya hegzamer yapılarının konumlandırıldığı mikro ortama bağlı olarak değişebilir (Sun vd., 2003). C-fikosiyaninin yapısında bulunan kromoforun proteinle etkileşimi, spektrumun hem görünür bölgesinin konumu hem de absorpsiyon bantlarının göreceli kuvvetinde büyük değişiklikler meydana getirir. C-fikosiyaninin floresans polarizasyon spektrumları, 600 ile 625 nm dalga boyunda maksimum bir absorbanla "s" tipli bir kromofora sahipken 630-635 nm'de ışığı absorbe edenleri hassaslaştıran ve floresans olarak enerjiyi yayan "f" tipli iki kromofor sınıfı vardır (Şekil 1.6). Teale ve Dale (1970)'e göre, C-fikosiyaninin "f" tipi kromoforlardan iki kat fazla "s" tipi içerdiği tespit edilmiştir. Alfa ve beta alt birimlerinin kromofor içeriğinden ve bunların spektroskopik özelliklerinden,  $\beta$  alt biriminin iki "s" tipi kromofor ve  $\alpha$  alt birimin bir "f" tipi kromoforu taşıdığı görülmüştür.



Şekil 1.6. *Pelargonium luridum* izolatından elde edilmiş olan C-fikosiyanin özütünün absorpsiyon spektrumları, hegzamer ve trimer (Berns ve MacColl, 1989).

Şekil 1.6’da sunulan spektroskopik sonuçlara göre, C-fikosiyanin trimerlerinin maksimum absorpsiyonu yaklaşık 620 nm’dir. Daha yüksek tepe noktası absorbe eden form ise hegzamerlerdir.

#### 1.4.3. C-fikosiyaninin üretim stratejileri ve yöntemleri

İnsan sağlığı için üretilen bazı özel ürünlerde mikroalg türleri vardır. *Spirulina* sp., *Nostoc* sp. gibi siyanobakteriler, sağlıklı gıdalardaki potansiyel uygulamaları nedeniyle birçok ülkede ticari üretimde kullanılmaktadır (Dillon vd., 1995; Skjanes vd., 2013). Siyanobakterilerin biyokütle üretimi, kullanılan kültür ortamına ve dış çevre koşullarına göre büyük ölçüde değişim sağlar (Kuddus vd., 2015). Organik substratlar olmadan yetiştirilmeleri, diğer mikroorganizmalara göre ekonomik bir avantaj olan siyanobakterilerden C-fikosiyanin üretimi, Eriksen (2008) tarafından rapor edilmiştir. Bu rapora göre, C-fikosiyanin üretimi dört farklı seçeneği içerir. Bunlar fotoototrofik, heterotrofik, miksotrofik ve rekombinant üretimdir.

Fotoototrofik yöntem ağırlıklı olarak tropikal ve subtropikal bölgelerde kullanılmakta olup mikroalglerin açık güneş ışığında üretimine dayanan bir dış mekân yöntemidir (Jiménez vd., 2003; Pulz, 2001). C-fikosiyanin kaynağı olarak *S. platensis*, 1980’den beri artan şekilde dünya çapında yıllık 3000 ton üzeri kuru ağırlık ve katma değerli ürünlerle birlikte biyokütle üretiminde önemli rol oynamaktadır (Pulz ve Gross, 2004; Spolaore vd., 2006). *Arthospira plantensis*, fotootrofik olarak gelişebilme özelliğine sahip mikroorganizmalardan biridir. Dış mekân kültüründe bol bulunan bu türler açık hava kültüründe herhangi bir kontaminasyon içermeyen alkali koşulları tolere ederek pH>10,5 değerlerinde gelişebilmektedir (Eriksen, 2008).

*A. platensis*'den C-fikosiyanin üretimi için fotobiyoreaktör tipleri ve kültür koşullarıyla ilgili farklı literatürler kaynakları bulunmaktadır (Zeng vd., 2012). Bazı kapalı biyoreaktör türleri, eczane ve kozmetik ürünler de dahil olmak üzere yüksek değerli gıda ürünlerinin üretimi için tasarlanmış ve elde edilen hacimsel verimin açık havada yapılan üretimden yirmi kat fazla olduğu belirlenmiştir (Xie vd., 2015). Fakat yine de yapılan denemelere rağmen kapalı biyoreaktör üretimlerinde geniş ölçekte *A. platensis* üretmek ve dolayısıyla da ölçek büyütmek mümkün olmamıştır (Eriksen, 2008).

Mikroorganizmaların gelişimi için organik bileşiklerin kullanılması heterotrofik olarak tanımlanmaktadır. Mikroalglerin heterotrofik büyümesi kısmen ışık kaynaklarına bağlıdır ve bu duruma göre daha yüksek büyüme oranı gösterir (Kuddus vd., 2013). Mikroalglerin heterotrofik kültürlerinde daha iyi üretkenlik elde etmek için reaktör boyutu, karıştırma, gaz transferi ve üretkenlik açısından ölçeklendirilmesi daha kolaydır. Günümüzde, tüm ölçeklerde büyük ilgi kazanmakta olan heterotrofik kültürler, çok çeşitli mikrobiyal türler tarafından oluşturulur. Örneğin tek hücreli rodofit *Galdieria sulphuraria*, heterotrofik koşullarda C-fikosiyaninin araştırılması ve optimum üretkenliği için potansiyel bir organizmadır (Schmidt vd., 2005). Heterotrofik gelişebilme özellikli diğer bir tür olan *A. platensis* karanlıkta glikoz ve fruktoz ortamında heterotrofik olarak büyütülmektedir. Fakat C-fikosiyanin üretimi açısından, fotootrofik koşullarla karşılaştırıldığında bu oran oldukça düşüktür (Mühling vd., 2005). *G. sulphuraria*'nın heterotrofik büyümesi, *A. platensis* ile karşılaştırıldığında ise önemli ölçüde düşük olup, C-fikosiyanin üretimi ( $0,86 \text{ g L}^{-1} \text{ gün}^{-1}$ ) oldukça yüksek olmaktadır (Graverholt ve Eriksen, 2007).

Fotootrofik kültürlerle kıyasla daha hızlı büyüme ve maksimum biyokütle konsantrasyonları ile sonuçlanan bir başka geliştirme türü de mikсотrofik üretimdir. Bu yöntemde, *S. platensis* dahil mavi-yeşil alglerin gelişimleri kapalı bir reaktörde gerçekleştirilebilmektedir (Vonshak vd., 2000).

Marquez vd., (1993) glikoz ortamında büyütülen mikсотrofik kültürlerin büyüme oranının fotootrofik ve heterotrofik kültürlerin toplamına kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Eriksen (2008) çalışmasında *S. platensis*'in kapalı alanda mikсотrofik olarak gelişen C-fikosiyanin miktarının fotootrofik dış mekân kültürlerinden daha yüksek olduğunu bulmuştur.

Son yıllarda daha çok tercih edilen yöntem ise rekombinant protein üretimidir. Bu üretim, heterotrofik C-fikosiyanin sentezi için alternatif bir yöntem olmakla beraber uygulanabilir olduğu için bazı alanlarda gereksinim duyulabilmektedir. Ancak C- fikosiyanin gibi fikobiliprotein üretimi, diğer rekombinant proteinlerin üretiminden daha zordur (Kuddus vd., 2015; Tooley vd., 2001).

C-fikosiyanin verimini etkileyen sıcaklık, ışık yoğunluğu, pH, besiyeri, havalandırma vb. gibi birçok önemli faktör vardır. Bununla birlikte, yüksek ışık yoğunlukları mavi yeşil alglerin büyümesini teşvik etse de C-fikosiyanin üretimi için aynı etkiyi sağlayamamaktadır (Demirel vd., 2015). Karanlık-aydınlık periyodunun süresine bağlı olarak düşük ışık yoğunluğunda büyüdüklerinde siyanobakterilerdeki C-fikosiyanin içeriği artmaktadır (Juneja vd., 2013). Bu nedenle, daha yüksek bir siyanobakteri biyokütlesinde C-fikosiyanin verimini artırmak için koşulların ve ortamdaki bileşimlerin optimizasyonunun dikkate alınması gerekmektedir (Mandalam ve Palsson, 1998).

#### **1.4.4. Siyanobakterilerden C-fikosiyanin eldesi**

##### ***1.4.4.1. C-fikosiyaninin ekstraksiyonu ve kullanılan yöntemler***

Siyanobakteriyel hücrelerden C-fikosiyaninin ekstraksiyon süreci, hücre duvarının parçalanması, suda çözünür renklendirici proteinlerin çıkarılması, ardından konsantrasyon ve gerektiği halde saflaştırma aşamasını içermektedir (Buchweitz, 2016). C-fikosiyanin ekstraksiyonu için standart bir teknik mevcut olmamakla birlikte, hücrelerin küçük boyutu ve çok katmanlı yapıya sahip aşırı kalın hücre duvarı nedeniyle oldukça zordur (Stewart ve Farmer, 1984). Ayrıca ekstraksiyon stratejisi bir siyanobakteriden diğerine değişkendir, yani bir organizmada iyi çalışan yöntem, başka bir organizma için uygun olmayabilir (Ranjitha ve Kaushik, 2005). Bu da her mikroorganizmada, hücre içi olarak üretilen proteinlerin yerleşim konumuna göre belirli özelliklere sahip olması ve ilgilenilen molekülün sitoplazmada, periplazmada yer alabileceği hatta, mitokondri gibi farklı hücresel organellerde depolanabileceği anlamına gelmektedir (Moraes vd., 2011). Sonuç olarak ekstraksiyon protokolü istenen proteine göre değişebilir. Bunun için de daha önce yapılmış çalışmalar, ön işlem, çözücü seçimi, ekstraksiyon teknikleri ve bunların işleme parametreleri gibi faktörler dikkatlice düşünülmelidir (Pan-utai ve Iamtham, 2019).

Bazı çalışmalar C-fikosiyanini elde etmek için ekstraksiyon yöntemlerini siyanobakterilerin kuru ve ıslak biyokütlesinden elde ederek kullanmaktadır. Ekstraksiyon öncesi siyanobakteriyel biyokütlenin kurutulması ve ıslak biyokütlenin bakteriyel bozulması pigment üretimini etkileyen önemli bir adımdır. Genel olarak, püskürtme, fırın ve güneşte kurutma gibi bilinen ön işlemler uygulansa da C-fikosiyaninin miktarını ve saflığını azaltabilir. C-fikosiyanin molekülü 45° C'nin üzerinde ısıya duyarlı olduğundan bu tür kurutma işlemleri C-fikosiyanin verimini, önemli ölçüde etkiler ve raf ömrünü uzatır (Doke, 2005; Oliveira vd., 2010; Sarada, vd., 1999). Bu nedenle, C-fikosiyanin ekstraksiyonu için hammadde olarak kullanılan biyokütlenin çoğu kuru formdadır (Tavanandi vd., 2018).

Güneşte kurutma işleminin siyanobakteriyel biyokütleye uygulanması, belki de en ucuz kurutma yöntemidir (Prakash vd., 1997). Fakat bu teknik uzun bir süreç olup, geniş bir kurutma alanı gerektirmektedir.

Sarada vd., (1999) sprey veya konvektif kurutucular ile yaptıkları çalışmada *S. plantis* siyanobakterisini kuruttuklarında %50 C-fikosiyanin kaybı olduğunu bildirmişlerdir. Tamburlu kurutma (Prakash vd., 1997), püskürtmeyle kurutma (Desmorieux ve Decaen, 2005), akışkan yatakta kurutma (Leach vd., 1998), dondurarak kurutma (Millamena vd., 1990) teknolojileri genellikle verimli ancak maliyetli olan kurutma yöntemleri olarak bilinmektedir. Bu yüzden seçilecek yöntemin orijinal malzemeyi koruyabilen, duyasal, fizikokimyasal ve besinsel özelliklerinde en düşük kaybı sağlayacak bir yöntem olması gerekmektedir. Ayrıca dondurarak kurutma gibi termal zararları da en aza indiren bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir (Oliveira vd., 2008).

İlter vd., (2018) yaptıkları çalışmada optimum C-fikosiyanin geri kazanımı için, taze ıslak biyokütle tercih ederek, farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanmışlar, aynı zamanda seçilen biyokütle türüne ve tampon seçimine göre hücre ekstraksiyonu amacıyla fiziksel, kimyasal ve mekanik yöntemler geliştirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada C-fikosiyanin ekstraksiyonu için tercih edilen çözücü maksimum C-fikosiyanin verimi bakımından sodyum fosfat tamponu olmuş, ancak saf su, amonyum klorür, CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ve iyonik sıvılar da başarıyla kullanılmış, yüksek saflıklarda sonuçlar elde edilmiştir (Khazi vd., 2018).

Islak biyokütleden yapılan literatürdeki bazı ekstraksiyon çalışmaları; dondurma çözündürme (Horvath vd., 2013; Soni vd., 2006) sonikasyon (Sivasankari ve Ravindran,

2014), homojenizasyon (Abalde vd., 1998; Boussiba ve Richmond, 1979; Moraes vd., 2011; Sivasankari ve Ravindran, 2014), enzimatik parçalama (Boussiba ve Richmond, 1979; Zhu vd., 2007), fransız hücre presi (Bryant vd., 1976), darbeleri elektrik alanı (He vd., 2016) yöntemleridir. Bu yöntemlere ek olarak son yıllarda organik ve inorganik asit uygulaması ve süper kritik karbondioksit gibi kimyasal veya kimyasal-fiziksel ekstraksiyon yöntemleri de araştırılmaktadır (Deniz vd., 2016; Marzorati vd., 2020).

Moraes vd., (2011) *S. platensis* 'in ıslak biyokütlesinden C-fikosiyanini ekstrakte etmek için basit ve etkili bir yöntem bildirilmişlerdir. Çalışmalarında ekstraksiyonları kimyasal (organik ve inorganik asit uygulaması), fiziksel (dondurma ve çözündürme, sonikasyon, homojenizasyon) ve enzimatik (lizozim uygulama) olmak üzere altı farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda ultrasonik banyo kullanılmış ve 0,21 mg/mL'lik konsantrasyona sahip 43,75 mg/g ekstraksiyon verimiyle en uygun yöntem olduğunu yayınlamışlardır (Horvath vd., 2013; Tan vd., 2020).

Sivasankari ve Ravindran (2014) ise, yaptıkları çalışmada 1 g ıslak *Spirulina* biyokütlesine çok çeşitli ekstraksiyon yöntemleri uygulamış, en yüksek verimi (yaklaşık 0,38 mg/g) örneği kurutup havanda dövdüklerinde elde etmişlerdir. Araştırmacılar organik ve inorganik asit işlemi yaptıklarında 0,06 mg/g, homojenizasyon ile 0,06 mg/g ve 0,28 mg/g'ye kadar sonuç elde etmişlerdir.

Diğer araştırmacılar tarafından yapılan C-fikosiyanin eldesi için bir başka ekstraksiyon yönteminde EDTA ve lizozim kombinasyonu kullanılmıştır (Bermejo vd., 2014; Stewart ve Farmer, 1984). Bir başka çalışmada ise karotenoidlerin ve klorofillerin biyokütle ile israf edilmemesine yönelik olarak bütünleşmiş bir pigment ekstraksiyon zinciri içeren farklı bir yaklaşım önerilmiştir (Marzorati vd., 2020). Bu çalışmanın stratejisi, C-fikosiyanin ekstraksiyonundan önce karotenoidlerin ve klorofillerin iki ardışık adımını içeren süper kritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonuna dayanmaktadır. Ekstraktlardaki toplam karotenoid, klorofil a ve klorofil b içerikleri kuru *Spirulina* ağırlığına göre, sırasıyla  $3,5 \pm 0,2$  mg/g,  $5,7 \pm 0,2$  mg/g ve  $3,4 \pm 0,3$  mg/g olmuştur. Daha sonra C-fikosiyanin üretmek üzere su içinde ekstrakte edilerek yaklaşık 250 mg/g C-fikosiyanin pigmenti elde etmişlerdir.

Literatür taramalarının geneline bakıldığında yapılan tüm ekstraksiyon yöntemleri *S. plantesis* üzerinde yoğunlaşmış diğer suşlarla yapılan çalışmaların daha az sayıda olduğu görülmüştür (Sekar ve Chandramohan, 2008). Endüstriyel açıdan

gıda sektörüne alternatif bir doğal pigment olan C-fikosiyaninin endüstriyel üretimi daha kısıtlı olmakla birlikte genellikle laboratuvar ölçeğinde uygulanmaktadır (Eriksen, 2008).

#### ***1.4.4.2. C-fikosiyaninin saflaştırılması***

Biyolojik makromolekül olan proteinlerin ayırma ve saflaştırma teknolojisi biyoteknoloji, ilaç ve kozmetik endüstrilerinin önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Protein saflaştırması hücre ve doku gibi kompleks bir karışımdan bir veya birkaç proteini izole etmeyi amaçlayan farklı işlemleri içermektedir. Bu aşamada proteinin yapısı, işlevselliği ve karakterizasyonu önem arz etmektedir. Herhangi bir proteinin ham özütten ayrılması oldukça emek gerektiren ayırma adımlarını içerir ve bunlar genellikle proteinin yapısal büyüklüğü, fizikokimyasal özellikleri, bağlanma (ligand) afinitesi ve biyolojik aktivitesindeki farklılıklardan yararlanılarak uygulanır (Mishra vd., 2017).

İlgili proteinin saflaştırılma aşamasında dikkate alınması gereken hususlar saflık, verim ve maliyettir. Günümüzde protein saflaştırmasına yönelik kabul edilebilir yöntemler geliştirilmiştir. Bunun yanı sıra bazı durumlarda protein üretiminde harcanan maliyet, elde edilen verimden daha yüksek olabilmektedir. Bu da ilgili proteinin üretiminde kısıtlamalara yol açmakla birlikte imalat endüstrisi için kritik bir durum haline gelmektedir. Bu nedenle üretim maliyetlerini en aza indirmek için deney koşullarının kullanılan alana uygun olarak optimizasyonu gerekebilmektedir (Malik vd., 2020).

C-fikosiyanin yüksek suda çözünürlüğe sahip olması, bu moleküllerin diğer pigmentlerden ayrıştırılarak saflaştırma prosedürünü kolaylaştırmaktadır. C-fikosiyanin pigmentinin biyoteknolojik olarak saflaştırma protokolleri, sayı olarak artmakla birlikte, performans açısından da geliştirilmektedir. Tablo 1.2’de yöntemler özetlenerek sunulmuştur. Pigmentin saflaştırılmasında genellikle farklı miktarlarda amonyum sülfat ile çökeltme, santrifüjleme, ultrafiltrasyon gibi çeşitli yöntemler uygulanabilmektedir (Chaiklahan vd., 2012). Bu yöntemlerle, çeşitli fikobiliprotein türlerini ve ayrıca diğer bazı pigmentleri ayırmak mümkün olabilmektedir (Anteck a vd., 2022). Daha sonra, spesifik bir şekilde, ekstraksiyon, pigmentlerin renkleri, polaritesi ve boyutlarındaki farklılıklar nedeniyle çeşitli kromatografik (iyon değişimi,

afinite veya absorpsiyon kromatografisi) veya yeni iki fazlı sulu ekstraksiyon yöntemlerine dayanan veya bu adımların kombinasyonları ile saflaştırma gerçekleştirilmektedir (Jesus vd., 2016).

Floresan etiketler gibi önemli ticari uygulamalarda, pigmentlerin saflığı önemli bir rol oynar. C-fikosiyanin pigmentinin saflık dereceleri aşağıdaki şekilde yorumlanır (Rito-Palomares vd., 2001).

- Saflık > 0,7 gıda endüstrisine uygun
- Saflık = 1,5 kozmetik alanında uygun
- Saflık = 2,5 preparatif olarak ilaç takviyesine uygun
- Saflık = 3,9 reaktif sınıf olarak uygun
- Saflık > 4,0 analitik derecede saflığa uygun

Düşük saflıkta C-fikosiyanin, gıda ve kozmetik endüstrilerinde biyorenkendirici olarak kullanılabilen olup, gram başına yaklaşık 0,35 ABD doları maliyetle sonuçlanırken, daha yüksek saflıkta bu değer 4,500,00 ABD dolarına kadar yükselebilmektedir (Abalde vd., 1998). Bu fiyatlardaki büyük farklılıklar C-fikosiyaninin saflaştırma sürecinde uygulanan farklı teknik kombinasyonlarından dolayı kaynaklanmaktadır (Bermejo vd., 1997; Román vd., 2002). Kirleticilerin uzaklaştırılması, mevcut üretim maliyetlerinde bir artışa yol açarken, aynı zamanda birden fazla adımda oluşabilecek zaman alıcı ve karmaşık bir deneysel prosedüre dönüşebilmektedir.

Analitik dereceli bir C-fikosiyanin üretimi için genellikle kromatografik adımlar tercih edilmektedir. Bununla birlikte farklı reçineli kromatografi kolonları, protein transferinin yavaş ilerleme hızlarına sahip olması ile sınırlı olmaktadır. Bu da yeterli üretkenlik elde etmek için daha yüksek bir akış hızı gerektirir. Bu işlem, tesis ve ekipmanla ilgili masrafların yanı sıra ilgili donanım, destek sistemlerine olan ihtiyacı ortaya çıkarır (Figueira vd., 2018).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, belirlenen kullanım amacına göre en uygun ve düşük bütçeli yöntem koşulları denenerek alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda gıda, reaktif ve analitik dereceli C-fikosiyanin saflaştırmak için tek adımlı ve çeşitli kromatografik yöntemlerle kombine edilmiş amonyum sülfat çöktürme tekniği kullanılmıştır (Minkova vd., 2003; Soni vd., 2006).

**Tablo 1.2.** Çeşitli siyanobakterilerden ekstrakte edilen C- fikosiyaninin saflaştırılması için kullanılan yöntemler

| Türler                                       | C-fikosiyaninin saflaştırma adımları                                            | Saflık | Verim (%) | Referanslar                       |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------|-----------------------------------|
| <i>Spirulina maxima</i>                      | ATPS ve ultrafiltrasyon                                                         | 3,8    | 29        | Rito-Palomares vd., (2001)        |
| <i>Spirulina fusiformis</i>                  | Rivanol; ASÇ, JFK Sephadex G-25                                                 | 4,3    | 45        | Minkova vd., (2003)               |
| <i>Oscillatoria quadripunctulata</i>         | ASÇ; JFK Sephadex G-150; Bio-Sil SEC; İDK, DEAE-selüloz                         | 3,3    | 44        | Soni vd., (2006)                  |
| <i>Spirulina platensis</i>                   | ATPS; DEAE-sephadex A-100                                                       | 5,1    | 66        | Patil vd., (2006)                 |
| <i>Spirulina platensis</i>                   | İDK; Q-sepharose                                                                | 3,6    | 8         | Niu vd., (2006)                   |
| <i>Spirulina platensis</i>                   | ASÇ, İDK; DEAE-sepharose- hızlı akış                                            | 5,5    | 67        | Yan vd., (2011)                   |
| <i>Lyngbya sp. A09DM</i>                     | Triton X-10; ASP, Sephadex G- 150; DEAE-selüloz                                 | 5,5    | 62        | Sonani vd., (2015)                |
| <i>Spirulina. platensis</i><br><b>LEB-52</b> | Diyafiltrasyon/Ultrafiltrasyon; ASÇ, geniş yataklı İDK; Q-Sepharose- hızlı akış | 4,10   | 42        | Figueira vd., (2018)              |
| <i>Thermosynechococcus elongatus</i>         | Lizozim; yüksek basınç, homojenizasyon; sonikasyon ASÇ, HPLC, İDK               | 6,6    | -         | El-Mohsnawy ve Abu-Khudir, (2020) |

ATPS-girdap akışkanlı-sulu iki fazlı sistem; ASÇ- amonyum sülfat çöktürme; JFK-jel filtrasyon kromatografisi; İDK-iyon değiştirme kromatografisi; HPLC-yüksek performanslı sıvı kromatografisi.

Kromatografik saflaştırma tekniklerinden olan hidrofobik ve iyon değişim kromatografisiyle *Synechococcus* sp.'den saflık oranı 4,85 olan bir C-fikosiyanin elde edilmiştir (Abalde vd., 1998). Gupta ve Sainis (2010) kömür-kitosan kromatografisi ile *Anacystis nidulans*'dan C-fikosiyaninin büyük ölçekli üretimi için tek adımlı bir prosedür rapor ederek yüksek geri kazanım ile 4,72 saflık oranı elde etmişlerdir. Bazı çalışmalarda iki fazlı sulu ekstraksiyon yönteminin, yüksek oranda saf C-fikosiyanin verimi ile sonuçlanabilen etkili bir yöntem olarak tercih edildiği görülmektedir (Patil vd., 2006; Patil ve Raghavarao, 2007). Bu yöntemin ardından uygulanan iyon değişim kromatografisinin son derece saf C-fikosiyanin ile sonuçlandığı ve saflık oranının 6,69

olduğu bildirilmiştir (Soni vd., 2008). Luo vd., (2016) çalışmalarında *Spirulina maxima*'dan yüksek bir C-fikosiyanın geri kazanım verimiyle (%78-93) ticari saflaştırma için ATPS-VFD (girdap akışkanlı-sulu iki fazlı sistem cihazı) kromatografisi geliştirmişlerdir.

#### **1.4.4.3. C-fikosiyanın tanımlanması**

İleri düzeyde saflaştırılmış her bir proteinin karakterizasyon aşaması, biyolojik ürünlerin keşfi, güvenliği ve etkinliğini belirlemede kritik bir rol oynar. Bu süreçte saflaştırma tekniğine bağlı olarak proteinlerin boyutu, yükü ve suda çözünürlüğü gibi farklı sonuçlara göre uygun bir yöntem belirlenebilmektedir. Bunun için protein, büyük konsantrasyonlarda ve yapısal ve fonksiyonel element olarak mevcut olmalıdır (Jakubowski vd., 2022; Pederson, 1997).

C-fikosiyanın pigmentinin karakterizasyonu değişken fiziksel özellikler, saflık endeksi ve molekül ağırlıklarının belirlenmesine bağlı çeşitli yöntemlerin uygulanmasına dayanmaktadır. Bu pigmentin karakterizasyonu için genel olarak kullanılan analitik yöntemler, UV-Vis spektrofotometre (emilim spektrumları için), floresans spektroskopisi (floresans emisyon spektrumları için) ve denatüre proteinin moleküler ağırlığı hakkında yaklaşık bir fikir vermekte olan sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemleridir (Bermejo vd., 1997; Benedetti vd., 2006; Julianti vd., 2019). Bunun yanı sıra, araştırmacılar tanımlama amacıyla NMR spektroskopisi, IR spektroskopisi Patel vd., (2005) veya MALDI TOF (Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanı kütle) analizi gibi yöntemler kullanmışlardır (Chen vd., 2006). Fakat bu tekniklerle daha net sonuçlar elde etmek için C-fikosiyanın pigmentinin çeşitli ön koşullar olarak bilinen saflaştırma teknikleriyle modifikasyonları sağlanarak alt birimlerden ayrılması gerekmektedir. Analitik prosedürlerin geliştirilmesi açısından HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi), bu pigment moleküllerinin ayrılması için birçok araştırmacı tarafından ilgi çeken bir araç olarak ortaya çıkmaktadır (Chakdar vd., 2014).

Eski çalışmalar gözden geçirildiğinde Demidov ve Mimuro (1995), *Mastigocladus laminosus*'dan elde edilen C-fikosiyanın absorpsiyon spekturumundan çıkan dalga boyunun, Debreczeny vd., (1993) çalıştığı *Synechococcus* sp. PCC 7002 izolatın dalga boyundan 4-6 nm farklı olduğunu öne

sürmüştür. Bir başka çalışmada belirli bir termofilik siyanobakteriden izole edilen C-fikosiyaninin diğer örneklerle kıyasla maviye kayan absorpsiyon spektrumu gözlemlenmiştir (Edwards vd., 1996). C-fikosiyaninin genel dalga boyu aralığı olarak tespit edilen 620 nm'den farklı olarak 608 nm'de maksimum absorpsiyona sahip olduğu belirlenmiştir. Bu da protein üzerindeki fikosiyanobilinlerin, apoproteinlerinden farklı bir şekilde etkilenmesiyle ilgilidir. Bununla birlikte monomer yapılarda gözlemlenen spektroskopik farklılıklar trimer yapılar arasında da gözlemlenmiştir (Schneider vd., 1987). Bu durum sadece UV-Vis spektrofotometrisinde değil, aynı zamanda molekül ağırlık ve izoelektrik noktaların tanımlanmasında da değişiklik gösterebilmektedir. Buna örnek olarak *Anabaena variabilis* izolatu ile yapılan çalışmada, SDS-PAGE sonuçlarına göre C-fikosiyanin  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerine karşılık gelen 17 kDa ve 18 kDa olmak üzere iki bant oluşturduğu MALDI-TOF tekniğiyle doğrulanmıştır. Buna yakın değerler diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmalarla da tutarlılık göstermiştir (Chakdar vd., 2014).

Glazer vd., (1971) çalışmalarında *Synechococcus* sp.'nin  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinin moleküler ağırlıkları 15,9 ve 19,1 kDa olarak bulunmuşken, Santiago-Santos, (2004) *Calothrix* sp.'den izole edimiş C-fikosiyaninin 17 ve 21 kDa olarak bulunmuştur. C-fikosiyaninin ana kaynağı olarak bilinen *S. platensis*'den saflaştırılmış C-fikosiyaninin moleküler ağırlıkları ise 20,5 ve 23,5 kDa olan  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Boussiba ve Richmond, 1979).

#### **1.4.5. C-fikosiyaninin biyolojik aktivitesi**

İnsan sağlığına önemli yönde etki eden doğal kaynakların biyoaktif bileşiklerine olan ilgi son yıllarda artmıştır. Beslenme, insan ve hayvan sağlığı, atık suların arıtılması, üretim gibi farklı alanlarda ticari uygulama imkânı nedeniyle siyanobakteriler gibi mikroorganizmaların araştırılmasına dair artan bir ilgi vardır (Pandey vd., 2013).

Mavi yeşil siyanobakteriler; biyolojik renklendiriciler, antioksidanlar, antimikrobiyal maddeler ve hastalıklara karşı güçlü farmakolojik ilaç olarak çeşitli roller oynayabilen pigmentler gibi çok yönlü ikincil metabolitler üretme kapasitesine sahiptirler. Bunlardan biri de siyanobakterilerde bulunmakta olan renkli fikobiliproteinlerdir (Sonani vd., 2017).

Biyoaktif bileşikler olarak bilinen fikobiliproteinlerin incelenmesi, geçtiğimiz yıllardan bugüne kadar giderek artmaktadır. Son yıllarda bu ilgi daha çok C-fikosiyanin üzerine odaklanmaktadır (Pagels vd., 2019). Yüksek değerli doğal ürünler olarak bilinen C-fikosiyanin antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal aktivite, antikanser etkilere sahip olmakla birlikte çeşitli klinik uygulamalarda bir ilaç olarak güçlü bir potansiyele sahip olabilir (del Rio-Chanona vd., 2016; Patel vd., 2018). Son yıllardaki çalışmalara bakıldığında bu konuyla ilgili deneysel araştırmalar daha fazla artmakta olup aşağıdaki bölümlerde anlatılmıştır.

#### ***1.4.5.1. C-fikosiyaninin antioksidan aktivitesi***

Biyoaktif bileşiklerin en çok çalışılan özelliği antioksidan aktivitedir. Antioksidanlar, hücreleri serbest radikaller olarak bilinen kararsız moleküllerin neden olduğu zararlardan koruyan maddelerdir (Safari vd., 2020; Fratelli vd., 2021).

Antioksidan aktivite yöntemlerinin çoğu sulu tampon, hidrofilik prob ve hidrofilik radikal oluşturmaya dayanmaktadır. Bunlar arasında 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) radikal süpürme kapasitesi tayini, 2,2-azinobis (3-etil-benzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) tayini, Toplam Radikal Yakalayıcı Antioksidan Parametresi (TRAP), Ferrik Azaltıcı Antioksidan Gücü (FRAP), Bakırlı Azaltıcı Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC), Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi (TEAC), ve hidrojen peroksit radikal süpürme aktivitesi tayini gibi yöntemler sayılabilir (Capanoglu vd., 2018; Kamiloglu vd., 2015).

Antioksidan bileşikler, organizmalar tarafından kendi koruma sistemlerine yanıt olarak oksidatif etkilere karşı hareket etmek için üretilir. Oksidatif stresin ana nedeni reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesidir. C-fikosiyanin gibi moleküller, genellikle ROS'un serbest radikallerini temizleyerek, reaktif molekülleri nötralize etmekte olup, oksidasyon seviyesini azaltarak enzimatik olmayan antioksidan mekanizması ile hareket edebilirler. Daha spesifik olarak, oksidatif stres DNA'ya zarar verebilir ve apoptoza veya mutajenezeye neden olabilmektedir (Bhat ve Madyastha, 2001; Izadi ve Fazilati, 2018).

C-fikosiyaninin kimyasal yapısında uzun bir konjuge çift bağ oluşturması iyi bir elektron değiştirici olmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, C-fikosiyanine bağlı kromoforlar, antioksidan aktivite özellikleri sergileyebilirler. C-fikosiyaninin sahip

olduğu fikosiyanobilin grubu aynı zamanda insan safra pigmentleri olan biliverdin ve bilirubine yapısal olarak benzerdir (McCarty, 2007). Bunlar eskiye dayanan en güçlü endojen antioksidan substratlardır. Bununla birlikte, bilirubin, doğal kaynaklarındaki eksik ve sentezlemedeki zorluğunun yanı sıra suda çözünmezliği nedeniyle oral uygulama için uygun değildir. Bu nedenle fikosiyanobilin, potansiyel inhibitör etkisi gibi özelliklere sahip olan biliverdininin yerine geçerek taklit molekülü olarak görev yapabilir (Strasky vd., 2013).

Benedetti vd., (2010) çalışmasında bazı biyolojik örnekler için pozitif bir antioksidan profili gösteren Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) yönteminde C-fikosiyanin, büyük bir antioksidan etki göstermiştir. Ayrıca, yapılan çalışmaların birçoğunda fikobiliproteinlerin serbest radikalleri temizleme potensiyeline dair olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Patel vd., 2018). Bir diğer literatürde Cherdkiatikul ve Suwanwong (2014) fikosiyaninin iki bileşeninin (fikosiyanopeptid ve fikosiyanobilin) güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Genel olarak bakıldığında C-fikosiyaninin güçlü bir antioksidan olduğuna dair araştırmalar mevcuttur. Siyanobakteri türü olan *Spirulina*'daki başlıca suda çözünür antioksidan bileşen olan C-fikosiyaninin aktivitesinin C vitamininden yaklaşık 20 kat daha etkili olduğu varsayılmaktadır (Sonani vd., 2015). Bununla birlikte C-fikosiyanin, doğal antioksidan olarak alzheimer, parkinson ve huntington hastalıkları gibi bazı nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde bağışıklık uyarıcısı ve bir anti-inflamatuar ajan olarak bildirilmiştir (Romay vd., 2003; Xalxo vd., 2013).

#### **1.4.5.2. C-fikosiyaninin antimikrobiyal aktivitesi**

Antibiyotik içerikli ilaçlara karşı bakterilerin direnç göstermesi, bu ilaçların gösterdiği etkiyi azaltmakla birlikte yaygın enfeksiyonlara yol açmaktadır. Patojenik mikroorganizmaların büyümesini engellemek için antimikrobiyal ajanlar olarak çeşitli farklı kimyasal ve sentetik bileşikler kullanılır, ancak bu ilaçların yüksek dozajlarda kullanımı hem bakteri hem de canlı organizma için çeşitli olumsuz yan etkilere de neden olabilir (Abdel-Shafi vd., 2019). Bu nedenle çevresel tehlikelerden arındırılmış doğal antimikrobiyal bileşiklere olan talep büyük ölçüde artmıştır. Deniz yosunları gibi doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler, güvenli antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılabilirler (Dashtiannasab vd., 2012; Demirel vd., 2009).

Siyanobakteriler eşsiz özellikli mikroorganizmalardır ve bu doğal ajanlar için birincil sırada yer alırlar. Çevre dostu olarak bilinen bu mikroorganizmaların bazı bilindik türleri hem gıda takviyesi olarak hem de fotosentetik doğal pigmentler üretebilmektedir. Bunun yanı sıra son yapılan araştırmalara göre doğal renklendiricilerin umut verici aktif biyolojik ajanlar olabileceğine dair olumlu sonuçlar ortaya çıkmıştır (Osman vd., 2019; Salama vd., 2015).

C-fikosiyanin, esas olarak nispeten düşük konsantrasyonda biyolojik savunma aktivitesini teşvik ederek birçok bakteriyel ve viral enfeksiyona karşı etkilidir. Literatürde çeşitli siyanobakteri türlerinin ekstraktlarından izole edilmiş C-fikosiyaninin farklı yöntemler ile antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Bu teknikler agar kuyu difüzyon (Bauer vd., 1966; Salama vd., 2015), disk difüzyon yöntemi (Clarke, 2004; Osman vd., 2019), mikrodilüsyon minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC)'dur (Bhuvaneswari vd., 2013; Eloff, 1998). Kullanılmakta olan C-fikosiyanin ekstraktlarının saflık faktörüne bağlı olarak gram negatif ve pozitif türler üzerinde etkilerine bakılmıştır.

*Spirulina*'dan elde edilen C-fikosiyaninin antimikrobiyal etkileri üzerine az sayıda çalışma yapılmıştır. *Spirulina*'nın düşük C-fikosiyanin konsantrasyonlarının incelenen bakteriler üzerinde önemli bir etkisi olmadığı görülmekteyken, ticari antibiyotiklerin antibakteriyel etkileri C-fikosiyaninkinden daha fazla etki göstermektedir. Sitohy vd., (2015) *Anabaena* sp'den C-fikosiyaninin agar kuyu diffuziyon yöntemiyle antimikrobiyal etkisini *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *S. aureus* ve *Bacillus cereus* türleri üzerinde incelenmiş ve sonuç olarak, C-fikosiyaninin *Staphylococcus aureus* üzerindeki gösterdiği etkinin diğer izolatlardan daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Mohite vd., (2015) *Anabaena*'dan elde edilen C-fikosiyaninin antibakteriyel potansiyeli *Spirulina*'dan elde edilen C-fikosiyaninden daha fazla olmuştur.

#### **1.4.5.3. C-fikosiyaninin antikanser aktivitesi**

Kanser, dünya çapında en sorunlu hastalıklardan biri olup aynı zamanda başlıca hücre apoptozuna yol açan nedenlerinden biridir. Bu sebepten kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellemek için sitostatik ilaçların veya doğal maddelerin uygulanması, kanser araştırmalarının önemli ve gelişmekte olan bir konusudur (Jimeno vd., 2004). Birçok sentetik antikanser ilacının toksik yan etkilerine göre,

sentetik olmayan doğal kökenli ürünler daha çok tercih edilmeye başlamıştır (Adnan vd., 2020; Cragg vd., 2009).

Son zamanlarda, farmakolojik aktiviteye sahip doğal deniz ürünlerinin güçlü antikanser aktiviteye sahip olduğu ve toksik yan etkilerinin çok az veya hiç olmadığı bulunmuştur. Doğal deniz ürünlerinin özütü olan C-fikosiyanin, son yıllarda hastalık tedavisinde kimyasal önleme ve kemoterapötik uygulamalarda giderek daha önemli hale gelmiştir (Bechelli vd., 2011; Jiang vd., 2017).

Günümüzde C-fikosiyaninin çeşitli tümör hücreleri ve sağlıklı dokulardan alınan hücreler üzerindeki etkilerine ilişkin *in vitro* ve *in vivo* veriler bulunmaktadır. Bu çalışmalar C-fikosiyaninin çeşitli kanser türleri, meme kanseri (Li vd., 2010), karaciğer kanseri (Jiang vd., 2017), akciğer kanseri (Bingula vd., 2016; Li vd., 2015), kolon kanseri (Watson vd., 2016), lösemi (Subhashini vd., 2004) ve kemik iliği kanseri (Gardeva vd., 2014) üzerinde güçlü bir tümör önleyici etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Braune vd., 2021).

C-fikosiyaninin tümör hücre dokuları üzerindeki etkileri şu anda çok sayıda *in vitro* çalışmalarda kapsamlı bir şekilde analiz edilmesine karşın, *in vivo* çalışmalar çok azdır. *In vivo* deneyler genelde veri seti, oral ve lokal tedavilerde tekli ve kombinasyon yaklaşımları (ilaçlar ve teknikler) içermektedir. Fakat şu anda monoterapinin etkileri yeterince etkili olmadığı için C-fikosiyanin sağlık alanında bir antikanser ilacı olarak kullanılmamaktadır (Bingula vd., 2016). Ek olarak, C-fikosiyaninin *in vivo* yarı ömrünün kısa olması tıptaki uygulamalarında bazı sınırlamalar getirmektedir (Yang vd., 2017).

Bu çalışmaların kapsamında C-fikosiyanin kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde zamana ve doza bağlı olarak önemli bir engelleyici etki ortaya çıkarmaktadır. Apoptoz indüksiyonu, hücre döngüsü durması, DNA replikasyonu inhibisyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi de dahil olmak üzere birçok mekanizma bulunmaktadır (Hao vd., 2018).

#### **1.4.6. C-fikosiyaninin kullanım alanları**

##### ***1.4.6.1. Gıda ve kozmetikte renklendirici olarak kullanımı***

Bilindiği üzere renklendirme, ürünü çekici kılan önemli unsurlardan birisidir. Bu nedenle tekstil, gıda ve kozmetik endüstrilerinde çeşitli renklendirici ürünler, yaygın

olarak kullanılmaktadır. Gıda ve tekstil endüstrilerinde kullanılan renklendirici bileşiğe boyalar, kozmetik, mürekkep ve ilaçlarda kullanılan renklendiricilere ise pigment adı verilmektedir (Dikshit ve Tallapragada, 2018). Renklendiricilerin çoğu, farklı endüstrilerdeki yüksek talep nedeniyle genellikle kimyasal olarak üretilmektedir. Bunların çoğu doğada biyolojik olarak parçalanamamakta ve insan sağlığı için tehdit oluşturabilmektedir (Rastogi vd., 2010).

Günümüzde insanlar kimyasal olarak elde edilen renklerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkilerinin farkındadır. Modern gıda endüstrisi, insan vücuduna herhangi bir zarar vermeden ucuz, sağlıklı ve daha uygun gıda ürünlerinin üretimini artırmaktadır (Kannaujiya vd., 2017).

1982'de piyasaya sürülmesinden bu yana, fikobiliproteinlerin ve özel olarak da C-fikosiyaninlerinin renklendirici olarak uygulanması halen genişlemeye devam etmektedir. Uzun süredir devam eden popülerlik, bu proteinlerin bir takım benzersiz özelliklere sahip olmasına dayanmaktadır (Dasgupta, 2015). Bunlardan bir tanesi, toksik ve kanserojen olabilen sentetik gıda renklendiricilerine kıyasla herhangi bir yan etkiye sahip olmayan eşsiz bir pigment olmasıdır (Prasanna vd., 2007).

Fikobiliproteinler, katkı maddesi olarak insanlar tarafından verimli bir şekilde kullanılan ve gıda olarak pazarlanan en umut verici ürünlerden biridir. Avrupa'da, C-fikosiyaninin boya olarak kullanımı, doğal, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen özelliklerinden dolayı dikkat çekmiştir (de Morais vd., 2018; Venil, 2013). C-fikosiyaninin renk koruyucu özelliğiyle ilgili, çeşitli ürünler üzerinde birkaç stabilite çalışmaları yapılmıştır (Jespersen vd., 2005). *S. platensis*'ten üretilen fikosiyanin sakız, süt ürünleri ve jöleler gibi gıdalarda doğal bir pigment olarak kullanılmaktadır (Santiago-Santos vd., 2004). Daha önce de belirtildiği üzere fikosiyanin ışığa, sıcaklığa ve ortamın pH'ına çok duyarlıdır ve kolayca bozulabilmektedir. Ancak jöle sakızı, kaplanmış yumuşak şekerlemelerde parlak bir mavi renk görüntüsüyle, gardenya ve indigo gibi renklendiricilere alternatif olarak daha yönlü kabul edilebilmektedir. Bununla birlikte fermente süt ürünleri, dondurmalar, meşrubatlar, tatlı ve pasta süslemeleri ve birçok gıda ürününün renklendirilmesinde de kullanılırlar (Görsel 1.1) (Mishra vd., 2010).



**Görsel 1.1.** *C-Fikosiyaninin gıdalarda renklendirici olarak kullanımı (http-1)*

Herhangi bir doğal renklendiricinin gıdada uygun şekilde uygulanması için renklendiricinin stabilitesi çok önemlidir. Örneğin C-fikosiyaninin oda sıcaklığında ısı uygulanmadığı takdirde en az 1 ay rengini kaybetmeden alkolsüz içeceklerde (Pepsi® ve Bacardi Brezzer®) stabilitesini koruduğu tespit edilmiştir. Pasta dekorasyonlarında süs gibi bir yıl boyunca rengini kolayca koruyarak önemli ölçüde devamlılık gösterdiği kanıtlanmıştır (Dufossé vd., 2005).

C-fikosiyanin kozmetik ürünlerinin sürdürülebilir gelişiminde de kapsamlı roller oynamıştır. C-fikosiyaninin ve C-fikoeritrin, kozmetikler için renklendirici maddeler olarak Japonya'da pazarlanmaktadır (Prasanna vd., 2007). Japonya'da gıda mevzuatı, sentetik koruyucu eklenmeden gıda boyalarının uygulanmasını zorunlu kılar. Günümüzde C-fikosiyanin halen, Lina-Blue, DIC Corporation tarafından yapılan doğal kozmetik ve gıda ürünleri için etkin bir şekilde kullanılan renkli bir ticari boyadır. Birçok şirket, banyo pudrası, vücut losyonu, beyazlatıcı krem, sabun, göz kalemi, ruj vb. dahil olmak üzere yeni ve çevre dostu olabilecek C-fikosiyanin tabanlı ürünler tasarlamıştır (Braune vd., 2021; Galetović vd., 2020; Mishra vd., 2008; Morocho-Jácome vd., 2020).

#### **1.4.6.2. Farmasötik ve floresan prob olarak kullanımı**

Fikobiliproteinler, doğal renklendirici özelliklerinin yanı sıra, farmasötik, biyomedikal, moleküler biyoloji ve terapötik uygulamalar için son derece yararlı olan benzersiz floresan özelliklere sahiptirler (Eriksen, 2008). Bu fotosentetik pigmentler,

sulu çözeltilerle ekstraksiyon edildiğinde ve saflaştırıldığında, proteinler yüksek oranda floresan hale gelir (Görsel 1.2). Fikobiliproteinler spektroskopik ve yapısal özellikler olarak, görünür ışık spektrumunda geniş absorpsiyon, muazzam sönme katsayısı, enerji transferi ve yüksek floresan kuantum gibi benzersiz nitel ve nicel özellikler sergilerler (Glazer ve Stryer, 1984; Glazer, 1994; Sun vd., 2003). Fikobiliproteinlerde hegzamer yapıyı oluşturan ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> birimleri yüksek molar katsayısı ve kuantum verimine sahiptir. Bu yapılarda oluşan herhangi bir denatürasyon işleminde, trimerden monomere ayrışması durumunda, molar kat sayısı ve kuantum azalmaktadır (Fukui vd., 2004; Kupka ve Scheer, 2008). Bu özellikler, fikobiliproteinleri çeşitli görüntüleme teknikleriyle kullanımı için ideal floresans adayı yapmaktadır.



**Görsel 1.2.** Sulu çözelti içinde floresans hale gelmiş C-fikosiyanin ekstraktı

Hücre biyolojisinde kullanılan akış sitoflorimetrisi, floresan mikroskobu, tek hücreli analiz, floresanla etkinleştirilmiş hücre sınıflandırması (FACS) gibi bazı önemli yöntemlerde başlıca floresan ajanlar olarak fikobiliproteinler geniş ilgi görmektedir (Sonani vd., 2016). Buna ek olarak antikorlar, reseptörler ve diğer biyolojik moleküller için etiket görevi görebildikleri için immünoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmünoglobulinlere, protein A'ya ve avidine konjuge edilmiş fikobiliproteinler, bir floresanla aktive edilen hücre sıralayıcı (FACS) kullanılarak tek hücreli iki renkli floresan analizi için mükemmel reaktifler haline getirilebilir (Oi vd., 1982).

Son araştırmalar C-fikosiyaninin sağlık açısından umut verici olduğunu ve geniş bir potansiyel farmasötik uygulama yelpazesine sahip olduğunu göstermiştir

(Bermejo, 2014). Farmasötik bir ajan olarak kullanım potansiyeli, yukarıda bahsedilmekte olan biyolojik aktivite bölümünde daha detaylı anlatılmaktadır.

Son zamanlarda C-fikosiyaninin floresan özelliklerinden yararlanılmakta olup, çeşitli teknik yöntemlerle birlikte daha etkili yöntemler geliştirilmeye devam edilmektedir. Siyanobakteri kültürlerinde büyümenin çevrimiçi izlenmesi (Bastien vd., 2011; Sode vd., 1991), içme suyundaki toksik siyanobakterilerin tespiti (Izydorczyk vd., 2005) ve doğal sularda siyanobakterilerin uzaktan algılanması ve gelişim takibi için kullanılabilirler (Sode vd., 1991; Simis, vd., 2005).

#### 1.4.7. C-fikosiyaninin ekonomik değeri ve gelecek perspektifleri

Amerika Birleşik Devletleri'nde Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış tek doğal mavi pigment olan C-fikosiyanin, ekonomik pazarın ana hedeflerinden biridir (Venil vd., 2013). Birçok üretici, pazarı daha yüksek seviyelere taşıyabilecek C-fikosiyaninden yapılmış doğal ve yenilikçi renkleri piyasaya sürmüştür. Ticari olarak gıda katkı maddelerinin ve boyaların hazırlanması için C-fikosiyanin *Spirulina* sp., *Porphyridium* sp. ve *Rhodella* sp'den üretilmektedir (Singh ve Datta, 2005; Spolaore vd., 2006). 2016 yılında *Spirulina*'dan elde edilen C-fikosiyanin, dünya çapında en çarpıcı renk haline gelerek, dokusu ve özellikleri nedeniyle kozmetik ve kişisel bakım endüstrilerinde kullanım onayı almıştır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), gıda güvenliği için AB devletlerinde tüketilen gıda ürünlerinde yapay renklerin kullanımını yasaklamasıyla birlikte birçok üretici firma, dünya pazarında ekonomik açıdan daha yüksek seviyelere ulaştırmıştır (Insights, 2019).

Insights, (2019) raporunda C-fikosiyanin için toplam pazarın 112,3 milyon dolar (USD) olduğunu ve bu sayının 2028'e kadar iki katına çıkacağını tahmin etmektedir. Raporda ayrıca Batı Avrupa'nın bu ürünün en büyük tüketicisi olduğu (yaklaşık %33) ve üretilen fikosiyaninin %80'nin gıda endüstrisinde kullanıldığı belirtilmektedir.

Fikobiliproteinlerin protein yapısı sayesinde, değerli ürünlerle kullanılarak Japonya, Çin, Hindistan, diğer Avrupa ve Asya ülkelerinde gıda ve kozmetik renklendirici olarak pazarlanan en umut verici gıda ürünlerinden biri olmuştur.

Sanayi sektöründe birçok şirket *Spirulina* sp'den gıda takviyeleri ve tıbbi ilaçlar üretmektedir (Holdt ve Kraan, 2011). Şu anda, pigment pazarında birkaç şirket

kurulmuş ve fikobiliproteinler de dahil olmak üzere yeni biyolojik ürünlerle ticari mallardan yararlanmaktadır. Bu şirketlerden birkaç tanesi, ülke ve ürettikleri protein bazlı doğal pigmentler Tablo 1.3'te detaylı bir şekilde sunulmuştur.

**Tablo 1.3.** *Fikobiliprotein bazlı biyoteknolojik ürünleri üreten şirketler*

| Şirketler                   | Ülke/Şehir                  | Ürünler                                                | Web siteleri                                                                            |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Phycobiotech</b>         | Fransa/Montpellier          | Fikosiyenin, fikoeritrin, allofikosiyenin              | <a href="https://www.phycobiotech.com/">https://www.phycobiotech.com/</a>               |
| <b>Binmei biotechnology</b> | Çin/Linhai                  | Organik Spirulina özü, tozu, fikosiyenin               | <a href="http://tr.binmeibio-es.com/">http://tr.binmeibio-es.com/</a>                   |
| <b>Anaspec</b>              | Amerika Birleşik Devletleri | Fikosiyenin, fikoeritrin, allofikosiyenin              | <a href="https://www.anaspec.com/en/">https://www.anaspec.com/en/</a>                   |
| <b>Parry nutraceuticals</b> | Hindistan/Tamil Nadu        | Organik Spirulina (gıda takviyesi olarak), fikosiyenin | <a href="https://www.parrynutraceuticals.com/">https://www.parrynutraceuticals.com/</a> |
| <b>Eurogentec</b>           | Belçika/Seraing             | Fikosiyenin, fikoeritrin, allofikosiyenin              | <a href="https://www.eurogentec.com/en/">https://www.eurogentec.com/en/</a>             |
| <b>Anaspec</b>              | Amerika Birleşik Devletleri | Fikosiyenin, fikoeritrin, allofikosiyenin              | <a href="https://www.anaspec.com/en/">https://www.anaspec.com/en/</a>                   |

### 1.5. Hipotez ve Amaç

Literatür verilerine bakıldığında genellikle *S. plantesis* siyanobakterisi ile yapılmış ekstraksiyon, saflaştırma ve karakterizasyon yöntemleriyle birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar ülke genelinden başlayarak Türkiye'de dahil olmak üzere C-fikosiyenin üreticisi olarak sadece *S. plantesis* kabul edilmiş durumdadır. Hatta, ticari bir marka olarak isimlendirilerek dünya pazarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Sekar ve Chandramohan, 2008).

Siyanobakterilerin yaklaşık 150 cins ve 2000 türü tanımlanmış olmasına rağmen C-fikosiyenin kaynağı olarak en çok kullanılan *S. plantesis* türünün ismi geçmektedir. Bu durumda diğer siyanobakteri türlerinin C-fikosiyenin bakımından verimleri nedir? sorusu ortaya çıkmaktadır. Bu tez çalışmasının ilk amacı da bu sorunun temeline dayanmakta olup C-fikosiyenin verimi sağlayan yeni alternatif Türkiye izolatlarının belirlenmesine yöneliktir. Ayrıca C-fikosiyenin eldesi için

kullanılan yöntemleri optimize etmek, C-fikosiyaniyi saflaştırmak, karakterize etmek ve biyolojik aktivitesinin belirlenmesi de hedeflenmiştir.

Her şeyin zamanla tükendiği bu süreçte C-fikosiyaniyi içeriği bakımından yeni eşsiz özelliklere sahip Türkiye için özel siyanobakterilerin keşfedilmesi bu tezi diğer araştırmalardan özgün kılmaktadır. Aynı zamanda çalışılan yöntemlerin bazılarında modifikasyonlar yapılarak C-fikosiyaniyi üretimine katkı sağlayacak bir kılavuz olarak görülebilir.

C-fikosiyaniyi literatür değerlendirmesi bakımından zengin gözüktüğü de üretimine dair şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bilindik siyanobakteri türleri ile benzer yöntemler kullanılmıştır. Yapılan çalışmalara bakıldığında farklı ortamlardan identifiye edilmiş siyanobakteriler ile C-fikosiyaniyi üretimine yönelik her herhangi kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu anlamda literatürde detaylı şekilde verilen bilgilerden ve eksikliklerden yola çıkarak çalışmamızın hipotezi “farklı çevresel faktörlere uyum sağlamış ve identifiye edilmiş yedi siyanobakteri izolatının C-fikosiyaniyi üretim yeteneklerinin de farklı olacaktır”.

Çalışmamızın amacı farklı ortamlara uyum sağlamış olan siyanobakteri izolatlarının farklı ekstraksiyon yöntemleriyle C-fikosiyaniyi üretim yeteneklerinin ve mevcut verimin artırılmasına yönelik optimum parametrelerin belirlenmesidir. Bu şekilde seçilen izolatların hangi yöntemlerle daha iyi C-fikosiyaniyi verimi sağladığı belirlenebilecek ve Türkiye’ye özgü izolatların C-fikosiyaniyi üretme yetenekleri literatüre kazandırılacaktır.

C-fikosiyaniyi eldesinde diğer basamak olarak saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri uygulanmaktadır. Siyanobakterilerden elde edilecek olan mavi fikosiyaniyi ekstresi bir protein pigmentidir ve deneysel aşamada oluşan mevcut kirleticilerden saflaştırılması gerekmektedir. Literatürde belirtilen yöntemler incelendiğinde bu yöntemlerin temel sınırlayıcı unsurları; saflaştırma işleminin uzun vakit alması, pahalı olması, yüksek hacimlerde çalışılamaması ve saflık oranının düşük olmasıdır.

C-fikosiyaniyi karakterizasyon özelliğini belirlemek için ilgili proteinin yüksek bir saflıkla olması gerekmektedir. Saflaştırma adımı her bir proteinin en kritik noktası olup özenle tasarlanmalıdır. Çünkü her saflaştırma adımı ürün kaybı ve safsızlıklara neden olabilir. Bu durumda saflaştırma basamağı C-fikosiyaniyi bir sonraki kullanım amacına göre önemli bir adımdır. Çalışmamızın alt hipotezi “farklı

yöntemler C- fikosiyaninin endüstriyel veya ve diğer kullanım amacına göre saflık oranlarını değiştirecektir”.

C-fikosiyanin daha basit ve hızlı tekniklerle analitik C-fikosiyaninin saflığının elde edilerek karakterize edilmesi çalışmamızın diğer amacıdır. Uygulanacak saflaştırma adımı yeni ve ucuz yöntemler üzerinde yoğunlaşarak C-fikosiyanini kısa sürede elde etmek ve en az ürün kaybını sağlayacak yöntemin belirlenmesi beklenmektedir. Ardından molekül ağırlığı ve karakterizasyonu gerçekleştirilecektir.

Mavi yeşil siyanobakterilerin biyoaktif bileşikleri birçok kişi tarafından araştırılsa da halen bilinmeyen tarafları vardır. Bu biyoaktif bileşikler ikincil metabolit ürünlerinden biri olan C-fikosiyanin pigmentidir. Birçok literatür araştırmasında *S.plantesis*'in *in vitro* ve *in vivo* olarak tasarlanmış çeşitli biyolojik aktivite testleri yapılmıştır. Ancak bilinmesi gereken bir husus var ki, seçilen türün aktivite değerleri bir diğer farklı türün biyolojik etkisiyle eşdeğer olmayabilir. Dolayısıyla, C-fikosiyanin biyolojik aktiviteleri halen geniş kapsamda araştırılmadığı göz önünde bulundurulabilir.

Siyanobakterilerin ikinci metabolit ürünlerinden biri olan “C-fikosiyanin pigmentinin biyolojik aktivite özelliklerine sahip olduğu” tez çalışmamızın sonuncu hipotezidir. Çalışmamızın son adımı olarak belirlediğimiz biyolojik aktivite çalışmasında saflaştırarak *in vitro* olarak tasarladığımız C-fikosiyaninin antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal özelliklerinin araştırılmasıdır. Bu sayede çalışmamızın ilerleyen basamaklarında bu mavi pigmentin endüstriyel alanlarda doğal bir renklendirici boya maddesi, hatta tıbbi ve farmakolojik uygulamalarda potansiyel ilaç etkisi olarak tanıtmak ve literatüre sunmak amaçlanmaktadır

## 2. MATERİYAL VE METOT

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Siyanobakteri izolatları

Çalışmada daha önce çeşitli ekolojik ortamlardan izole edilerek identifiye edilmiş ve Eskişehir Teknik Üniversitesi mikrobiyoloji laboratuvarında muhafaza edilen 7 adet siyanobakteri izolatı kullanılmıştır. Bu izolatlar Kütahya'daki Simav Eynal termal kaplıcasından izole edilen 3 adet *Geitlerinema* sp. Eskişehir Porsuk Çayı'ndan izole edilen *Nodosilinea* sp., -123, *Phormidium lumbricale*-253 ve *Leptolyngbya norvegica*-141 izolatları, Kırka Bor Madeni atık havuzundan izole edilen *Leptolyngbya* sp.-2, izolatlarıdır. Bu izolatlar sıvı azot içerisinde uzun süreli olarak muhafaza edilmektedir.

#### 2.1.2. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Çalışmada kullanılan cihaz, ekipman ve markaları Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan cihaz, ekipmanlar ve markaları

| Cihazlar                      | Markalar                                                |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Spektrofotometre              | Shimadzu UV-3150 PC, Epoch2 microplate reader, ABD      |
| Steril güvenlik kabini        | Airstream® Class I Biological Safety Cabinet (E-series) |
| Vorteks                       | Heidolph Reaxtop vortex, Almanya                        |
| Manyetik karıştırıcı          | Velp Sciefica™                                          |
| Çalkalamalı inkübatör         | Eppendorf, İnova 44, Kanada                             |
| İnkübatör                     | Nüve N120                                               |
| Sterilizatör                  | Thermo Scientific Heraeus Instruments T20               |
| Masaüstü soğutmalı santrifüj  | Hettich UNIVERSAL 320, Almanya                          |
| Mini santrifüj                | Eppendorf Centrifuge 5415 R                             |
| Buzdolabı (Bosch, Almanya)    | Bosch, Almanya                                          |
| pH metre                      | Mettler Toledo S220, ABD                                |
| Sonikasyon                    | Sonics and Materials, Vibracell, ABD                    |
| Homojenizatör                 | İKA Ultra-Turrax T-25, Almanya                          |
| Terazi                        | Ohaus, Avustralya                                       |
| Hassas terazi                 | Shimadzu AEG-220, Japonya                               |
| Otoklav                       | Eastern Medical, Vertical Autoclave                     |
| PCR cihazı                    | Veriti™ 96-Well Thermal Cycler                          |
| UV Jel Görüntüleme Cihazı     | Uvitec M02 4611                                         |
| Dondurarak Kurutucu           | Martin Christ ALPHA-1-4 LDC-1M Vacuum pump, İngiltere   |
| Işık mikroskobu               | Olympus mikroskobu BX51                                 |
| Çok fonksiyonlu plaka okuyucu | BioTek Synergy HTX, ABD                                 |
| Hücre sayım cihazı            | LUNA II, Logos Biosystems, Güney Kore                   |
| Laminar akış kabini           | Mars Scanlaf, Labogene ApS, Danimarka                   |
| Orbital çalkalayıcı           | Heidolph Unimax 1010, Almanya                           |

### 2.1.3. Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları

Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları (Tablo 2.1) Eskişehir Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarındaki stok kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

**Tablo 2.2.** Çalışmada kullanılan test mikroorganizma kültürleri

| Bakteriler                                | Küfler                                  |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111  | <i>Alternaria brassicicola</i>          |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876         | <i>Aspergillus flavus</i>               |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> NRRL B-3567 | <i>Aspergillus fumigatus</i>            |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538    | <i>Aspergillus niger</i>                |
| <i>Micrococcus luteus</i> NRRL B-4375     | <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 465 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028  | <i>Fusarium moniliforme</i> NRRL 2374   |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603   | <i>Penicillium chrysogenum</i>          |
| <i>Bacillus subtilis</i>                  | <i>Penicillium notatum</i>              |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922        | <i>Sclerotinia citrinum</i>             |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299   |                                         |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> Y53        |                                         |
| Mayalar                                   |                                         |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 90028        |                                         |
| <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019    |                                         |
| <i>Candida krusei</i>                     |                                         |
| <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030        |                                         |

### 2.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerleri

#### 2.1.4.1. BG-11 besiyeri

| Bileşen                | Miktar  |
|------------------------|---------|
| $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ | 0,04 g  |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   | 0,075 g |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$   | 0,036 g |
| Sitrik asit            | 0,006 g |
| Ferrik sitrat          | 0,006 g |

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| EDTA                            | 0,001 g |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 0,02 g  |
| NaNO <sub>3</sub>               | 1,5 g   |
| NaHCO <sub>3</sub>              | 0,15 g  |
| Mikroelement A                  | 1 mL    |
| Agar (g)                        | 15 g    |

Yukarıda verilen bileşenler tartılmış ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Abelson ve Simon 1988). Borlu ortamdan izole edilen suşlar için aynı besiyeri litreye 6 g borik asit ilave edilmiş ve pH-10'a ayarlanarak (1 M NaOH ile) hazırlanmıştır.

#### **2.1.4.2. Mikroelement A**

| <b>Bileşen</b>                                       | <b>Miktar</b> |
|------------------------------------------------------|---------------|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 2,86 g        |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                 | 1,81 g        |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 0,222 g       |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O  | 0,390 g       |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                 | 0,079 g       |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | 0,049 g       |

Yukarıda verilen bileşenler tartılmış ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak, BG-11 besiyerine belirtilen miktarda eklenmiştir (Abelson ve Simon 1988).

#### **2.1.4.3. Mueller Hinton agar (MHA) (Biomark Laboratories)**

Hazır ticari besiyeri 38,0 g tartılmış ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak çözdürülmüş, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### 2.1.4.4. Mueller Hinton broth (MHB) (Biomark Laboratories)

Hazır ticari besiyeri 21,0 g tartılmış ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak çözündürülmüş, 121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### 2.1.4.5. Sabouraud Dextrose agar (SDA) (Sigma-Aldrich)

Hazır ticari besiyeri 65,0 g tartılmış ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak çözündürülmüş, 121°C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### 2.1.4.6. Sabouraud Dextrose broth (SDB) (Sigma-Aldrich)

Hazır ticari besiyeri 30,0 g tartılmış ve hacim 1000 mL'ye distile su ile tamamlanarak çözündürülmüş, 121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

### 2.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler ve hazırlanışı

#### 2.1.5.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve markaları

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve markaları Tablo 2.2'de verilmiştir.

**Tablo 2.3.** Kullanılan kimyasal maddeler ve markalar

| Maddeler                         | Markalar  | Maddeler                                | Markalar             |
|----------------------------------|-----------|-----------------------------------------|----------------------|
| Amonyum asetat                   | Sigma     | Fosfat tamponu (PBS)                    | Invitrogen™          |
| Amonyum sülfat                   | Sigma     | Coomassie Brilliant Mavisi G 250        | Bio-Rad              |
| Bromphenol Blue                  | Sigma     | Fötal Dana Serum                        | Capricorn Scientific |
| CaCl <sub>2</sub>                | Sigma     | β-Merkaptoetanol                        | AppliChem            |
| DEAE- selüloz                    | Sigma     | Trypsin/EDTA                            | Biochrom AG          |
| DPPH•                            | Sigma     | Etanol                                  | Merck                |
| EDTA                             | Bio-Rad   | Akrilamid %30                           | Bio-Rad              |
| Gliserol                         | Sigma     | MTT                                     | Alfa Aesar           |
| Glisin                           | Merck     | Metanol                                 | Merck                |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | Lab Alley | Tripan Mavisi Solüsyonu                 | Biological Industrie |
| HCl                              | Merck     | Lizozim                                 | Sigma                |
| HPLC saf su                      | Sigma     | Aseton                                  | Merck                |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Merck     | Protein markır                          | Cell Signaling       |
| NaCl                             | Sigma     | TEMED                                   | Bio-Rad              |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Merck     | %30 Akrilmaid                           | Bio-Rad              |
| NaOH                             | Sigma     | Dimetil sülfoksit                       | AppliChem            |
| Q sepharose fast flow            | Cytiva    | Tris -HCl                               | Sigma                |
| SDS %10                          | Sigma     | Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | Sigma                |

#### 2.1.5.2. SDS-PAGE’de kullanılan kimyasalların hazırlanması

- **Ayırma (Resolving gel) Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8), 150 mL**

| Bileşen           | Miktar  |
|-------------------|---------|
| Tris              | 27,23 g |
| dH <sub>2</sub> O | 80 mL   |

pH-8,8’e ayarlanmış ve son hacim 150 mL’ye tamamlanmıştır (Grabski ve Novagen, 2001).

- **Yürütme (Stacking gel) Tamponu (0,5 M Tris HCl, pH: 6,8), 100 mL**

| Bileşen           | Miktar |
|-------------------|--------|
| Tris              | 6 g    |
| dH <sub>2</sub> O | 60 mL  |

pH-6,8’e ayarlanmış ve son hacim 100 mL’ye tamamlanmıştır (Grabski ve Novagen, 2001).

- **% 10 SDS, 100 mL**

| Bileşen           | Miktar |
|-------------------|--------|
| SDS               | 10 g   |
| dH <sub>2</sub> O | 100 mL |

Solüsyonu hazırlamak için 10 g sodyum dodesil sülfat (SDS) tartılmış ve hacmi 100 ml’ye tamamlanmıştır. Solüsyon oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Sambrook vd., 1989).

- **% 10 APS, 100 µL**

| Bileşen           | Miktar |
|-------------------|--------|
| APS               | 0.01 g |
| dH <sub>2</sub> O | 100 µL |

0,01 g APS darası alınmış eppendorf tüp içinde hassas terazide tartılarak üzerine 0,1 mL (100 µL) dH<sub>2</sub>O ilave edilmiş ve vorteks ile çözülmüştür. APS jel hazırlamadan

hemen öncesinde hazırlanmalıdır. Daha sonraki gün kullanılacaksa +4 °C’de saklanmalıdır (Manns, 2011).

- **Ayırma jelinde kullanılan çözeltiler**

| <b>Bileşen</b>                                                                    | <b>%12 ayırma jeli, 10 mL</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| %30 acrylamide, bisacrylamide                                                     | 4 mL                          |
| Tampon                                                                            | 2,5 mL (ayırma jeli tamponu)  |
| %10 SDS                                                                           | 0,1 mL                        |
| dH <sub>2</sub> O                                                                 | 3,4 mL                        |
| %10 APS                                                                           | 50 µL                         |
| TEMED (N, N, N <sup>c</sup> , N <sup>c</sup> -<br>tetramethylene-ethylenediamine) | 5 µL                          |

- **Yükleme jelinde kullanılan çözeltiler**

| <b>Bileşen</b>                                                                    | <b>%5 yükleme jeli, 5 mL</b>   |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| %30 acrylamide, bisacrylamide                                                     | 0,85 mL                        |
| Tampon                                                                            | 1,25 mL (Yürütme jeli tamponu) |
| %10 SDS                                                                           | 0,05 mL                        |
| dH <sub>2</sub> O                                                                 | 2,9 mL                         |
| %10 APS                                                                           | 25 µL                          |
| TEMED (N, N, N <sup>c</sup> , N <sup>c</sup> -<br>tetramethylene-ethylenediamine) | 5 µL                           |

Bu bileşenler eklendikten sonra solüsyon filtreden geçirilerek sonrasında polimerizasyon başlatıcı olan APS ve TEMED ilave edilmiştir (Manns, 2011).

- **4x SDS PAGE Örnek Yükleme Tamponu (Laemmli buffer), 10 mL**

| <b>Bileşen</b>    | <b>Miktar</b>                  |
|-------------------|--------------------------------|
| Tris – HCl        | 2 mL                           |
| %0,8 SDS          | 0,8 g                          |
| Gliserol          | 3 mL                           |
| Bromphenol blue   | 0,004 g                        |
| dH <sub>2</sub> O | son hacim 10 mL'ye tamamlanır. |

SDS zor çözündüğü için 3,75 mL tris konduktan sonra SDS ilave edilip 40 °C'de sıcak su banyosunda çözünmesi beklenir. Çözündükten sonra üzerine gliserol ilave edilerek, 15-20 dakika daha 40 °C'de bekletilir. Çözünmeyen SDS kalıntıları varsa iyice çözünmesi sağlanır ve son hacim 10 mL'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanır. Son hacim 10 mL tamamlandıktan sonra bromfenol mavisi ilave edilir. Elde edilen pH istenilen değerde ise boya eklenince mavi, farklı ise yeşil bir renk alır ve bu durumda baştan hazırlanması gerekir (Manns, 2011).

- **Stok 10x SDS PAGE Running (Koşturma) Tamponu, 1 L**

| <b>Bileşen</b>    | <b>Miktar</b>                |
|-------------------|------------------------------|
| Tris              | 30,3 g                       |
| Glisin            | 144 g                        |
| SDS               | 10 g                         |
| dH <sub>2</sub> O | son hacim 1 L'ye tamamlanır. |

Öncelikle 10 g SDS tartılıp son hacim 1 litreye tamamlanır. Tamponun pH'ı 8,3 olmalıdır ancak kaliteli glisin kullanılmışsa pH-8,3 olmaktadır. Bu nedenle pH ayarlaması gerekli olmamaktadır. SDS-PAGE yaparken tanka 10x stok koşturma tamponundan 1x konsantrasyona seyreltilmiş tampon ilave edilmiştir (100 mL 10x koşturma tamponu, 900 mL dH<sub>2</sub>O) (Manns, 2011).

**Boyama çözeltisi, 100 mL**

| Bileşen               | Miktar |
|-----------------------|--------|
| Coomassie Mavi Boyası | 0,25 g |
| Metanol               | 45 mL  |
| Asetik asit           | 10 mL  |
| dH <sub>2</sub> O     | 45 mL  |

Yukarıda belirtilen bileşenler jelin boyanması için hazırlanmıştır. Kullanım öncesine kadar + 4 °C’de buzdolabında saklanmıştır (Kurien ve Scofield, 2012).

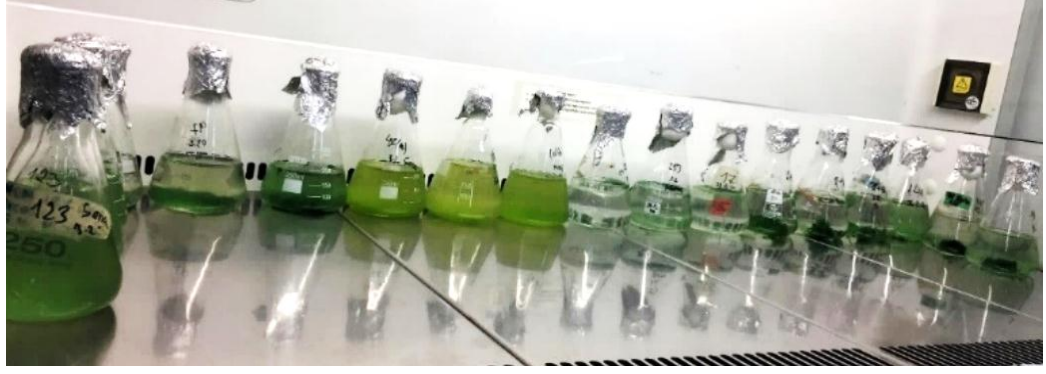
**• Destaining solüsyonu (Boya uzaklaştırıcı), 1 L**

| Birleşen          | Miktar |
|-------------------|--------|
| Metanol           | 300 mL |
| Asetik asit       | 100 ml |
| dH <sub>2</sub> O | 600 mL |

Yukarıda belirtilen bileşenler boyanın uzaklaştırılması için hazırlanmış ve kullanım öncesine kadar + 4 °C’de buzdolabında saklanmıştır (Kurien ve Scofield, 2012).

**2.2. Metot****2.2.1. İzolatların üretim koşulları**

Çalışmada kullanılan siyanobakteri izolatları 250 mL erlenmeyer şişeleri içerisinde 200 mL besiyeri olacak şekilde iki farklı BG-11 (pH-7 ve pH-10) besiyeri içerisinde 28 günlük süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur (Görsel 2.1). Porsuk Çayı ve yüksek bor içeren bölgeden izole edilen izolatlar, sürekli ışık altında oda sıcaklığında (25 °C), termofil izolatların ise iklim kontrol cihazında sıcaklık 45 °C, ışık şiddeti ise 150 µmol foton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, ye ayarlanarak gelişimleri sağlanmıştır.



**Görsel 2.1.** Çeşitli bölgelerden izole edilmiş siyanobakteri izolatları

### 2.2.2. Siyanobakterilerin kuru ağırlık tayini

Üç haftalık gelişim süreçlerini tamamlamış olan izolatlar elektronik terazide (Shimadzu Libror AEG-220) darası önceden alınmış 50 mL'lik falkon tüplerine aktarılmış, ardından 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, pelet iki kez distile su ile yıkanmıştır. Elde edilen pelet fırında kurutma tekniği ile sterilizatörde (Thermo Scientific Heraeus Instruments T20) bir gece düşük sıcaklıkta bekletilmiştir. Sıcaklık, C-fikosiyenin ısıya duyarlı olduğunu varsayarak 40 °C ve altına ayarlanmıştır. Biyokütleye uygulanan ön işlemten sonra darası alınmış ve kuru ağırlık bu şekilde belirlenmiştir (Doke, 2005; Oliveira vd., 2010; Sarada vd., 1999;).

### 2.2.3. Optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi

C-fikosiyenin eldesinde dört geleneksel ekstraksiyon yöntemi; dondurma çözündürme, sonikasyon, homojenizasyon, lizozim ile uygulama yöntemleri kullanılmış ve en iyi C-fikosiyenin verimi sağlayan yöntemin optimizasyonu çalışılmıştır. Bu amaçla, önceden kurutulan siyanobakteri kültürleri kuru ağırlık başına 100 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH-7) içerisinde çözündürülerek 30 dakika 150 rpm'de çalkalamalı koşullarda süspanse edilmiştir. Burada ekstraksiyon işleminin tamamı, alüminyum folyoya sarılı bir şekilde karanlıkta gerçekleştirilmiştir. İzolatların tümüne uygulanan bu prosedürün ardından siyanobakteriyel hücre duvarının parçalanmasına yönelik aşağıdaki ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır.

**Dondurma/çözdürme:** Süspanse edilmiş örneklerin her biri, karanlık koşullar altında derin dondurucuda -20 °C'de dondurma ve bir saat +4 °C'de erime sıcaklığına tabi tutularak, ard arda üç kez tekrarlanmıştır (Chittapun vd., 2020).

**Sonikasyon:** Süspanse edilmiş örneklerin her biri, sabit frekansta (20 kHz-50 kHz) %15-%20 amplitüd oranında 2 dakika boyunca sonikasyon (Sonics and Materials, Vibracell) yöntemine tabi tutularak hücrelerin parçalanması gözlemlenmiştir. Bu süreçte cihazın oluşturabileceği yüksek ısıya karşı tüm deneyler buz içerisinde gerçekleştirilmiştir (Akoğlu, 2012).

**Homojenizasyon:** Süspanse edilmiş örneklerin her biri homojenizatör (IKA Ultra-Turrax T-25, Almanya) cihazında 11.000 devir/dakika hızıyla yaklaşık 10 dakika boyunca homojen hale getirilmiştir. Uzun süreden dolayı cihazda oluşabilecek ısıya yönelik tüm deneyler aynı şekilde buz içerisinde gerçekleştirilmiştir (Moraes vd., 2011).

**Lizozim:** Kuru biyokütle 0,1 M 200 mL fosfat tamponu içerisinde (pH-7) 100 mg lizozim ve 10 mM EDTA içeren tamponla süspanse edilmiş ve ardından 30 °C'de 24 saat boyunca 150 rpm'de çalkalamalı koşullarda inkübasyonu sağlamıştır (Boussiba ve Richmond, 1979; Devi vd., 2020).

Yapılan tüm işlemlerin ardından ekstraksiyonlar 10.000 g'de ve 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra mavi süpernatantlar toplanmış, ardından 4 °C'de gece boyunca bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrik (Shimadzu UV-3150 PC) ölçümleri yapılarak C-fikosiyanin miktarları belirlenmiştir (Akoğlu, 2012).

#### 2.2.4. C-fikosiyanin miktarının belirlenmesi

Gece boyu bekletilen mavi özütlerin spektrofotometrik absorbans ölçümleri 280, 620 ve 660 nm dalga boylarında alındıktan sonra toplanan veriler, C-fikosiyanin miktar tayininde çok yaygın olarak kullanılan denklemin yerine konmuştur. Bennett ve Bogorad (1973) tarafından verilen formül bütün algler için geçerli olup aşağıdaki gibidir:

$$C - PC(mg/mL) = \frac{A_{max} - (0,474 \times A_{652})}{5,34} \quad (2.1)$$

$A_{max}$ - C-fikosiyanin pigmentinin maksimum pik gösterdiği absorbans noktası. Max absorbans göstercileri genel olarak  $A_{610-625}$  dalga boylarında rastlanmaktadır.

$A_{652}$  - C-Allofikosiyanin pigmentinin maksimum pik gösterdiği absorbands noktası.

Formülden elde edilen C-fikosiyenin mg/mL değeri, daha önceden belirlenmiş olan kuru biyokütle miktar tayini ve kullanılan tampon çözelti hacmi de hesaba katılarak gram başına düşen mg C-fikosiyenin değeri Silveira vd., (2008) tarafından sunulan formülle hesaplanmıştır:

$$C - PC(mg/mL) = \frac{C-PC(mg/ml) \times \text{Solvent hacmi}(mL)}{\text{Kuru biyokütle}(g)} \quad (2.2)$$

Ekstraksiyon ve sonraki tüm aşamalarda kullanılan bir başka denklemde C-fikosiyenin saflık tayini olup  $A_{620}/A_{280}$  oranıyla hesaplanmıştır (Abalde vd., 1998).

## **2.2.5. C-fikosiyenin üretimiyle ilgili yapılan çalışmalar**

### **2.2.5.1. Farklı ışık sürelerinin C-fikosiyenin üretimine etkisi**

Bu çalışmada termofil siyanobakterinin karanlık-aydınlık (k/a) periyodunun süresine bağlı olarak C-fikosiyenin üretimine olan etkisi araştırılmıştır. Seçilen isolatlar üç grup şeklinde belirlenmiştir; 24 saat sürekli ışık, 16s:8s ve 12s:12s (k/a) süreleridir. Çalışma sürecinde ışık şiddeti  $150 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sıcaklığı ise  $40^\circ\text{C}$  ayarlanmış koşullar altında farklı sürelerde yer değiştirme yöntemiyle karanlık-aydınlık (k/a) periyodlarına tabi tutularak bir ay sürecinde inkübasyonu sağlanmıştır. Deneyler iki tekrarlı yapılarak termofilik isolatların C-fikosiyenin üretme potansiyelleri karşılaştırılmıştır.

### **2.2.5.2. Yaş ve kuru biyokülden C-fikosiyenin verimine etkisi**

En iyi ekstraksiyon yöntemi ve C-fikosiyenin aktivitesi gösteren izolat belirlendikten sonra, inkübasyonu sağlanarak kuru ve yaş biyokütleyle aynı şekilde ekstraksiyon işlemi uygulanmış, yaş ve kuru biyokütlenin C-fikosiyenin verimine olan etkisinin karşılaştırılması yapılmıştır. İlk olarak 250 mL erlenmeyer şişesinde gelişmiş biyokütlelerin santrifüjünden sonra tartımı yapılmıştır. Yaş biyokütle miktarı toplam 1 g, kuru biyokütlenin miktarı ise 0,04 g olarak belirlenmiştir. Kullanılan solvent hacmi kuru ağırlığa göre hesaplanarak her numuneye 4 mL çözücü ilave edilmiştir.

#### 2.2.5.3. En uygun tampon çözeltinin belirlenmesi

En uygun tampon çözeltiyi belirlemek amacıyla deneyler üç tekrarlı yapılarak aşağıdaki belirtilen sulu tamponlarla ekstraksiyon işlemi yapılmış ve C-fikosiyanin miktarı belirlenmiştir.

- %1,5  $\text{CaCl}_2$
- Sodyum fosfat tamponu
- Distile su

#### 2.2.5.4. En uygun sonikasyon parametrelerin belirlenmesi

En iyi C-fikosiyanin verimi elde etmek amacıyla çeşitli sonikasyon parametreleri denenmiştir. Sonikasyon yoğunluğu sabit sürede, farklı oranlarda amplitüd (%5, %10, %15, %20, %25) ve bunun aksi olan, sabit amplitüd farklı sürelerin denemeleri (2, 4, 6, 8, 10 dakika) yapılarak C-fikosiyanin verimindeki değişiklikler gözden geçirilmiştir.

#### 2.2.5.5. Büyük ölçekli C-fikosiyanin üretimi

Bu çalışmada en iyi C-fikosiyanin verimi sağlayan izolatın büyük hacimli erlenlerde (2 litre) üretimi Eskişehir Teknik Üniversitesi, Gıda ve Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (Görsel 2.2).



**Görsel 2.2.** Termofil siyanobakterilerin hava kompresörüyle steril hava verilerek 2 L'lik erlenlerde üretim

Bunun için ilk önce birkaç günlük inkübasyonda bekletilmiş taze siyanobakteri kültürleri inokulum olarak kullanılmıştır. Sekiz adet 2 L'lik erlenmeyer içerisinde toplam hacmi 8 L olan biyokütlenin, sürekli ışık altında, 45 °C'de, 28 günlük hava

kompresörleriyle steril hava verilerek hızlı ve verimli bir şekilde üretimi sağlanmıştır. Daha sonra optimize edilmiş ekstraksiyon koşulları altında spektrofotometrik veri değerleri hesaplanmış ve bir sonraki saflaştırma ve karakterizasyon aşamasına geçilmiştir.

## **2.2.6. C-fikosiyaninin kısmi saflaştırılması**

### **2.2.6.1. Amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz**

Ekstraksiyon sonrası C-fikosiyaninin kısmi saflaştırılması amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından tuzluluğun giderilmesi amacıyla da diyaliz yöntemi uygulanmıştır. Tüm prosedür 4 °C'de soğuk odada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, katı amonyum sülfat %25'lik doygunluğa eşdeğer bir konsantrasyon elde edilene kadar, 75 mL (w/v) ham ekstrakt içine kademeli olarak ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcıda sürekli karıştırılarak 4 °C'de 4 saat beklemeye bırakılmıştır. Elde edilen homojenatlar 8.000 g'de 4 °C'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. İlk aşamada toplanan çökelti (esas olarak bazik proteinler) atılarak ve bakır mavisi renkli süpernatantlar geri kazanılarak bir başka falkona aktarılmıştır. İkinci aşamada, önceki doygunluğa benzer şekilde süpernatant, %75 doygunluğa ulaşana kadar katı amonyum sülfat ilave edilmiş ve gece boyunca 4 °C'de sürekli karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti, 15 dakika 8.000 g'de santrifüjlenmiş süpernatant atılarak çöken proteinler toplanmış ve pH'ı 7 olan 10 mM sodyum fosfat tamponu içinde çözündürülerek diyaliz membranlarına aktarılmıştır (Sigma-D9277). Diyalizden önce membranlar kesilmiş ve 3-4 saat akan musluk suyu altında bırakılmış daha sonra membranların içeriğinde bulunan gliserolu uzaklaştırmak amacıyla %0,2 (v/v) sülfürik asit ile asitleştirilmiş ve asiti uzaklaştırmak için sıcak distile su ile yıkanmış ve kullanım öncesine kadar %20'lik etanol içerisinde bekletilmiştir. C-fikosiyanin numuneleri iki gün boyunca 10 mM sodyum fosfat tamponu içerisinde 4 °C'de sürekli karıştırılmış ve bu süreçte kullanılan tampon iki kez değiştirilmiştir. Diyaliz sonrası kısmi saflaştırılmış C-fikosiyanin numuneleri spektrofotometrik ölçümleri yapılarak saflık faktörü tayin edilmiştir (Patel vd., 2005; Soni vd., 2006). Burada kullanılan doygunluk seviyelerine ulaşmak için gerekli olan amonyum sülfat miktarı internet EnCor Biotechnology Inc adresindeki programı kullanılarak belirlenmiştir ([http-2](http://2)).

### 2.2.7. C-fikosiyaninin saflaştırılması

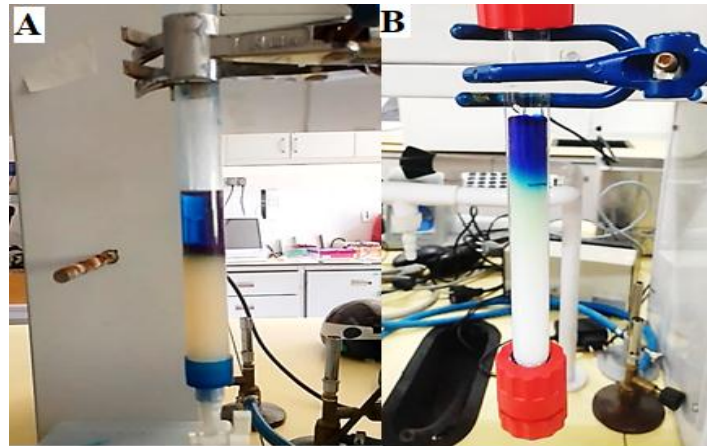
C-fikosiyaninin analitik düzeyde bir saflığa ulaşması için belli bir kısmi saflığa ulaşması gerekmektedir. Bu da amonyum sülfat çöktürme yöntemi veya literatür özetinde belirtilen diğer yöntemlerin kombinasyonlarıyla yapılmıştır. Bu çalışmada kısmi saflaştırma olarak amonyum sülfat ve ardından diyaliz yöntemi uygulandıktan sonra saflık belirlenmiştir. Spektrofometrik tarama, saflaştırma aşamasının en önemli kısmı olup her aşamada ölçüm yapılmıştır. Bu adımda aynı zamanda, saflık faktörü ve verim açısından saflaştırma öncesi ve sonrası yapılan işlemlerde toplam hacim ve C-fikosiyanin miktarları belirlenip, aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (de Amarante vd., 2020).

$$\text{Geri kazanım (\%)} = \frac{C-PC \text{ (mg/mL)} \times V_{SS} \text{ (mg/mL)}}{C-PC \text{ (mg/mL)} \times V_{ON} \text{ (mg/mL)}} \times 100\% \quad (2.3)$$

$V_{SS}$  – saflaştırma sonrası,  $V_{ON}$  – saflaştırma sonrası

#### 2.2.7.1. İyon değişim kolon kromatografisi

Diyaliz sonrası elde edilen kısmi saf örnekler analitik derecede bir saflığa ulaşmak için iyon değişim kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ayrıca bu kromatografide kullanılan biri zayıf anyonik DEAE- selüloz (Sigma aldrich, D6418 Almanya), diğeri kuvvetli olan Q- Sefaroz (Q-sepharose<sup>TM</sup> Cytiva, ABD) iki anyonik reçinenin geri kazanım (%), verim ve saflık açısından nicel ve nitel olarak karşılaştırılmaları yapılmıştır (Görsel 2.3).



**Görsel 2.3.** A. DEAE – selüloz dolgu maddeli iyon değişim kromatografisi, B. Q – sefaroze dolgu maddeli iyon değişim kromatografisi

Dolgu maddeleri, ürünlerin protokollerine uygun bir şekilde hazırlanıp, pH'ları ayarlanarak, (pH-7) iç çapı 1,5 cm, yüksekliği 30 cm olan kolona, yatak hacmi yaklaşık 5 mL olacak şekilde yüklenmiştir. İlk olarak sütun 25 mM sodyum fosfat tamponuyla (pH-7) dengelenmiştir. Bu sırada lineer akış hızı 30 mm saat<sup>-1</sup>, yani, dakikada 1 mL olacak şekilde peristalik pompa ile ayarlanmıştır.

Daha sonra C-fikosiyanin örneği dolgu maddesinin yüzeyini bozmayacak şekilde hafifçe eklenmiştir. Burada 5 kolon hacmi kadar elüsyon tamponu (25 mM sodyum fosfat tamponu, pH-7) ve bağlama tamponu olan (0-0,5 M) NaCl çözeltisini doğrusal gradyan ile yürütülmüştür. C-fikosiyanin açısından zengin bakır mavisi renkli fraksiyonlar dak/mL<sup>-1</sup>'ye ayarlanmış 2 mL'lik cam tüplere toplanmıştır. Son olarak da konsantrasyon ve saflık analizi için tüm fraksiyonların taranması 250-700 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu belirlenmiş ve  $A_{620}/A_{280}$  denklemiyle hesaplanmıştır (Khazi vd., 2018).

## **2.2.8. C-Fikosiyaninin tanımlanması**

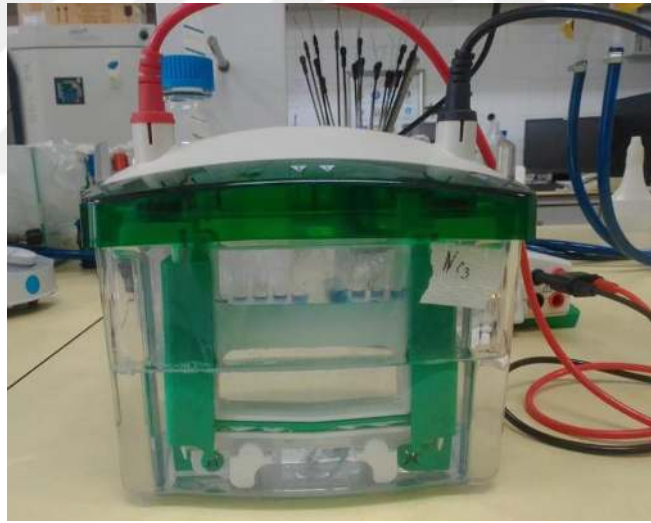
### **2.2.8.1. Spektrofotometrik karakterizasyon**

Bu çalışmada spektrofotometrik ölçüm C-fikosiyaninin karakterizasyon aşamasının büyük bir kısmında yer almıştır. İlk başta ekstraksiyon olmak üzere diğer saflaştırma tekniklerinin her basamağında kullanılan çözeltiler kör değer olarak seçilmiştir. Ham ve saflaştırılmış numuneler tarama hızı 1 nm, dalga boyu 250-700 nm aralığında olan UV-Vis absorpsiyon spektrumu ile incelenmiştir. Bununla birlikte bu yöntemde saflık hassasiyeti açısından 280 nm dalga boylarında daha net sonuçlar elde etmek amacıyla ışık yolu 10 mm olan bir kuvars küvet kullanılmıştır (Patel vd., 2005).

### **2.2.8.2. SDS-PAGE yöntemiyle saflık ve moleküler ağırlık tayini**

C-fikosiyaninin spektrofotometrik ölçümlerinden sonra, alt birimlerinin saflık kontrolleri ve moleküler ağırlığının tahmini amacıyla SDS-PAGE elektroforezi yapılmıştır. Bunun için ilk olarak MiniProtean II (Bio-Rad) cihazı kullanım için steril koşullara tabi tutulmuştur. Jellerin hazırlanacağı cam plakalar, taraklar, bağlayıcı klipsler ve tutucu hazırlanarak distile sudan geçirilmiştir. Cam plakalar kullanılmadan önce %70'lik etanol çözeltisiyle yıkanmıştır. Ardından protein boyutuna göre ayarlanmış %12'lik ayırma jeli (resolving gel) ilave edilerek yüzeyinde kabarcık

oluşturmayacak şekilde distile su eklenmiş ve polimerize olana kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu aşamada oluşan faz farkı gözlemlendikten sonra üstte kalan su dökülmüş kalan sıvılar kurutma kâğıdıyla geri çekilmiştir. Yukarıda kalan kısma ise %4'lük yükleme jeli (stacking gel) hazırlanmış ve üzerine tarak yerleştirilmiş, aynı şekilde oda sıcaklığında polimerizasyon işlemine tabii tutulmuştur. Bir sonraki aşamada, SDS-PAGE tankına 1x koşturma tamponu ilave edilmiş elektrotların bağlı olduğu tutucu ile jeller tanka konulmuştur. Tarak dikkatli bir şekilde çıkartılmış ve oluşan kuyular pipetlenerek dikkatlice yıkanmıştır. Toplam hacim 20  $\mu$ L olacak şekilde, 15  $\mu$ L C-fikosiyanin numunesi ve 5  $\mu$ L 4x konsantrasyona sahip ( $\beta$ -merkaptoetanol içeren) örnek yükleme tamponu (Laemmli buffer) ile karıştırılmış ve 10 dakika kaynatılarak, tüm hacim kuyulara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. Örnekler ayırma jeline gelene kadar 60 V'da (15-20 mA) sonrasında 90-100 V'da (35-50 mA)'de yaklaşık 2 saat yürütülmüştür (Görsel 2.4).



**Görsel 2.4.** SDS-PAGE cihazına yüklenmiş C-fikosiyanin numuneleri

Elektroforez işlemi bittikten sonra, 10 dk distile su ile çalkalamalı tablada yıkanmış sonrasında distile su dökülerek, Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck, Darmstadt, Almanya) solüsyonu ilave edilmiştir. 1-2 saat boyama yapıldıktan sonra boya dökülerek uzaklaştırılmıştır. Jeller distile su veya yıkama (bağlanmamış boyayı uzaklaştırma “destaining”) solüsyonu ile yıkanmıştır. Protein bantlarının daha net görünmesi için 1 gece bekletilmiş ve görüntüleme cihazında (Gel Doc™ EZ imager) jel fotoğrafları alınmıştır. Seçilen protein standardına (Prestained Protein markır,

Broad Range 11-190 kDa) göre bantlar tayin edilmiş ve C-fikosiyanin örneğinin moleküler büyüklükleri belirlenmiştir.

### **2.2.9. Farklı sıcaklıkların C-fikosiyanin stabilitesine etkisi**

Herhangi doğal veya sentetik bir pigment kimyasal yapıları ve fiziksel özelliklerine göre farklı stabilite özellikleri sergiler. Bu özelliklerden biri de ürünün termal sıcaklığa olan dayanıklılığıdır. Bu tez çalışması kapsamında kısmi saflaştırılmış C-fikosiyaninin termal stabilitesi belirlenmiştir. Bu amaçla numuneler 1 mg/mL konsantrasyonlarda 1,5 mL'lik ependorflara aktararak su banyosunda (Julabo TW20) farklı sıcaklıklarda (25 °C, 50 °C, 60 °C ve 80 °C) 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 250-700 nm aralığında C-fikosiyaninin spektrum verilerine bakılmıştır. Bu çalışma birbirinden bağımsız şekilde üç tekrarlı yapılarak standart sapmaları belirlenmiştir. C-fikosiyaninin mg/mL konsantrasyonları belirlendikten sonra başlangıç konsantrasyonuna göre kalan C-fikosiyanin nispi konsantrasyonu  $C_R$ , (%), aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Chaiklahan vd., 2012).

$$C_R = \frac{C}{C_0} \times 100\% \quad (2.4)$$

$C_R$ - C-fikosiyaninin nispi konsantrasyon değeri,  $C$ - son konsantrasyon,  $C_0$ - başlangıç konsantrasyon

### **2.2.10. C-fikosiyaninin biyolojik aktivite tayinleri**

#### **2.2.10.1. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi**

C-fikosiyaninin antioksidan aktivitesi literatürde en çok tercih edilen DPPH• (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) radikali sönmüleme testine dayalı olarak belirlenmiştir (Contreras-Guzmán ve Strong 1982; Wu vd., 2016). İlk olarak, C-fikosiyanin ekstraktının başlangıç miktarı 1 mg/mL olacak şekilde 5 farklı konsantrasyonda seri dilüsyon yapılmıştır. 1 mL sulu C-fikosiyanin çözeltisi üzerine 3 mL 0,06 mM'lik metanolik DPPH• ilave edilerek steril tüpde karıştırılmıştır. Daha sonrasında oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika beklemeye bırakılmıştır. Ortaya çıkan solüsyonun absorbansı, 520 nm'de UV-Vis spektrofotometresinde (Epoch2 microplate reader, ABD) ölçülmüş ve pozitif kontrol olarak aynı konsantrasyonlarda (1 mg/mL) askorbik asit (C vitamini) ile %50 inhibisyon değer ortalamaları ( $IC_{50}$ ) karşılaştırılmıştır

(Brand-Williams vd., 1995). Antioksidan aktivite aşağıdaki formül kullanılarak inhibisyon yüzdesine göre belirlenmiştir.

$$\%inhibisyon = \frac{Kontrol\ absorbansı - Numunenin\ absorbansı}{Kontrol\ absorbansı} \times 100\% \quad (2.5)$$

Kontrol absorbansı, reaksiyonun 520 nm'deki absorbansı DPPH+metanol, numunenin absorbansı, DPPH+ C-fikosiyenin, kör olarak metanol ve su kullanılmıştır.

#### **2.2.10.2. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi**

Termofilik siyanobakteriden elde edilen C-fikosiyenin antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Clarke, 2004; Rao vd., 2011). Deneyde test mikroorganizması olarak kullanılan mikroorganizmalar Tablo 2.5'te verilmiştir. Bakterilerin taze kültürlerinden Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerine, mayalar için Sabouraud Dextrose Broth (SDB) besiyerine ekim yapılarak 24 saat 37 °C'ye ayarlanmış etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürler 0,5 McFarland ( $1 \times 10^8$  kob mL<sup>-1</sup>) standardına göre ayarlanmış ve steril bir eküvyon yardımıyla Mueller Hinton Agar içeren petri yüzeyine inoküle edilmiştir. Liyofilize edilmiş kuru C-fikosiyenin örnekleri için çözücü olarak %100'lük saf aseton seçilmiştir. Asetonda çözdürülmüş C-fikosiyenin çözeltisi, toplam hacmi 1 mg/mL 'ye tamamlanarak seri dilüsyonları (1000 µg/mL, 500 µg/mL ve 250 µg/mL) hazırlanmıştır. Her bir dilüsyona 20 steril kâğıt disk eklenmiş (6 mm çap) ve aseton tamamen uçurulmuştur. C-fikosiyenin içeren kâğıt diskler daha sonra test mikroorganizmaları ile inoküle edilmiş petri yüzeylerine dikkatlice yerleştirilmiştir. Sadece aseton içeren ve asetonu uzaklaştırılmış olan boş diskler de çözücünün uçup uçmadığının kontrolü olarak deneyde kullanılmıştır. Aynı işlemler mayalar için Sabouraud Dextrose Agar besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Petriler 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir.

Küf kültürleri SDA besiyerine ekilerek 28 °C'de 5-7 gün süreyle inkübasyona bırakılmış, inkübasyon süresi sonunda %0,1'lik Tween 80 solüsyonu kullanılarak spor solüsyonları hazırlanmıştır. Thoma lamı ile spor sayımları yapılarak spor konsantrasyonları 10<sup>6</sup> CFU/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Spor solüsyonlarından SDA içeren petri yüzeylerine 100 µL yayılarak ekim yapılmış ve sonrasında yukarıda

anlatıldığı şekilde hazırlanmış C-fikosiyanin içeren kâğıt diskler yerleştirilmiş ve petriler 28 °C'de 5-7 gün süreyle inkübe edilmiştir

Tüm mikroorganizmalar için inkübasyondan sonra, inhibisyon zonları şeffaf bir cetvel kullanılarak milimetre (mm) cinsi olarak ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak aseton, sodyum fosfat tamponu, pozitif kontrol olarak bakteriler için kloramfenikol, küf ve mayalar için ketokonazol kullanılmıştır. Tüm testler steril koşullar altında iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

### **2.2.10.3. Antikanser aktivitenin belirlenmesi**

Bu çalışmada Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinde (AÜBİBAM) -196 °C'lik sıvı azot stoklarında önceden mevcut bulunan hücreler, standart hücre kültürü teknikleri kullanılarak ( $37 \pm 1$  °C %5 CO<sub>2</sub> içeren, yaklaşık %95 göreceli nem ortamında), uygun besiyeri içerisinde (%90 Besiyeri + %10 Serum + %1 Antibiyotik), önce hızlıca üreyebilmeleri için inkübatörde 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda (BINDER CB 150 E3, Almanya) kültüre edilmiştir.

Hücreler inverted tip ışık mikroskobu (Olympus CKX41-SC30, Japonya) altında kontrol edilerek yeterli miktarda pasajlanıp 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda analize hazır hale (9. pasajdaki CCD-19Lu, 7.pasajdaki A549, 12.pasajdaki hTERT-HPNE ve 18.pasajdaki Panc-1) getirilmiştir. Flask yüzeyindeki yapışkan (adhere) hücreler 2 kez fosfat tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra 1X Trypsin/EDTA solüsyonu ile kaldırılmış, besiyeri ile nötrallenip falkon tüplerine aktarıldıktan sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir (Hettich Lab Teknoloji, Almanya). Sonrasında süpernatant atılarak üzerine 1 mL besiyeri ilave edilerek sayıma hazır, süspanse hale getirilmiştir. Hazırlanan süspanse hücre solüsyonunun 10 µL'si tripan mavisıyla 1:1 oranında 10 saniye boyandıktan sonra sayımı otomatik hücre sayım cihazında (LUNA II, Logos Biosystems, Güney Kore) yapılmıştır. Her bir plaka için kuyucuk başına 10<sup>4</sup> hücre/200 µL besiyeri olacak şekilde hücreler besiyeri ile süspanse edilerek (1 kuyu hücresiz besiyeri= kör olmak suretiyle) plakaya ekilmiştir. Analizler için en fazla 250 µL sıvı hacmi içerebilen tabanı düz, 96 kuyulu, steril, tek kullanımlık, kapaklı plakalar kullanılmıştır (Deniz vd., 2016).

**MTT ile hücre canlılığının ölçülmesi:** Canlı ve apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla MTT solüsyonunda bulunan tetrazolium halkası hücrelerdeki dehidrojenaz enzimlerince reaksiyona girip parçalanarak formazan

kristallerinin oluşmasına neden olur. Reaksiyon sonucu oluşan rengin yoğunluğu mitokondriyal aktiviteyle doğrudan ilişkilidir. Ölü hücreler formazan kristali oluşturamamakta, yalnızca canlı hücrelerce aktivite gerçekleştirildiğinde formazan kristalleri oluşmaktadır. Özetle MTT boyasının sarı rengi canlılık aktivitesinden sonra çözücü ilavesiyle mora dönüşmekte ve mikropilaka okuyucuda bu renk değişimi okunarak optik yoğunluk verisi elde edilmektedir.

**Yöntemin uygulanışı:** Hücreler, açıklamalar kısmındaki gibi plakaya ekildikten sonra 24 saat inkübasyona bırakılmış ve plaka tabanına hücrelerin yapışması beklenmiştir. 24 saatin sonunda, hücrelere hazırlanan farklı konsantrasyonlarda, PBS ile çözündürülmüş C-fikosiyanin numunesi ilave edilmiştir. 24-48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinden sonra her bir kuyuya ışıktan korunarak 20 µL stok MTT çözeltisinden (5 mg/mL PBS içinde çözülüp filtrelenen MTT solüsyonu) ilave edilmiş ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücrelerin besiyerleri tamamen çekilerek 100 µL saf DMSO ilave edilmiş, plaka 15 dk karanlıkta çalkalandıktan (orbital çalkalayıcı, Heidolph Unimax 1010, Almanya) ve formazan kristallerinin çözünmesi sağlandıktan sonra çok fonksiyonlu plaka okuyucuda (BioTek Synergy HTX, ABD) 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Cihazdan elde edilen optik yoğunluk değerlerine göre hesaplanıp düzenlenen veriler tablo ve grafiklerle sunulmuştur.

**Numune ve çalışma konsantrasyonlarının hazırlanışı:** Numunenin gereken miktarı hassas terazide tartılarak (Mettler Toledo, ABD) besiyeri içinde homojen olarak çözülmüştür. Çözöldükten sonra taze besiyeri ile konsantrasyonlar hazırlanmadan önce 20 dk. direk (90° açı ile) UV ışığına maruz bırakılmış, numunede bozunuma gözlenmemiş, ardından besiyeri ile karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler üzerindeki etkisinin (canlılık/inhibisyon) değerlendirilebilmesi için 7 farklı konsantrasyon uygulaması yapılmıştır.

- Her dört hücre tipine de konsantrasyonlar max 200 µg/mL (tüm konsantrasyonlar büyükten küçüğe doğru sırasıyla: 200/100/50/25/12,5/6,25/3,125 µg/mL) olacak şekilde 1:1 seyreltilerek (n=7 konsantrasyon) uygulanmıştır.

- Bunun için farklı seyreltmeler, hücre tipine uygun besiyeri ile plakada son konsantrasyonda (1:1 seyreltildiği düşünölerek hesaplanmıştır) taşınacak şekilde hazırlanmıştır. Tüm konsantrasyonlar en yüksek konsantrasyon üzerinden seyreltmelerle elde edilmiş ve sonrasında plakaya uygulanmıştır.

- Plaka tabanına yapışan hücreler üzerinden 200 µL'lik besiyerinin yarısı (100 µL) çekilmiş ve çekilen miktarda (100 µL) test numunesinin farklı konsantrasyonlarını içeren taze besiyeri ilave edilmiştir (plakadaki son konsantrasyonun 1:1 seyreceği göz önüne alınarak hesaplamalar 2 kat olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır).

- n=5 tekrarlı veriler hesaplanarak analiz değerlendirmesi gerçekleştirilmiş, numune analize kadar uygun koşullarda (+4 °C buzdolabında, karanlıkta) muhafaza edilmiş ve işlem süresince ışıktan korunarak çalışılmıştır.

Hücrelere aşağıdaki şekilde kontrol grupları uygulanmıştır:

**Besiyeri kontrol:** %90 besiyeri +%10 serum + %1 antibiyotik + hücre

**Kör:** Hüresiz %90 besiyeri +%10 serum + %1 antibiyotik

**Renkli numune kontrol:** %90 besiyeri +%10 serum + %1 antibiyotik + hücre + MTT hariç okuma

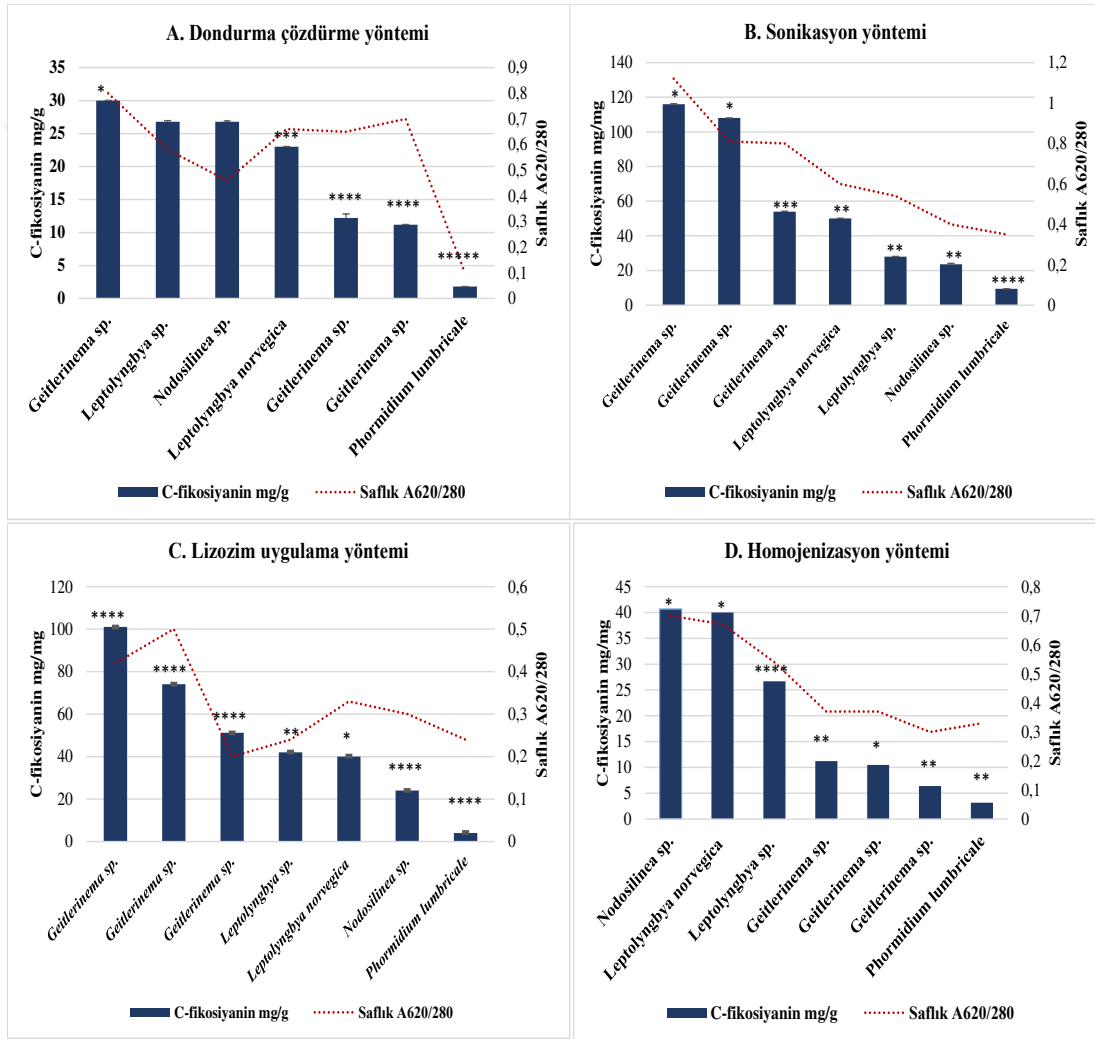
#### 2.2.11. İstatistiksel analiz

Tüm tez çalışması boyunca sonuçlar ort±standart sapma olarak hesaplanmıştır. Deneyler 3 tekrar olarak yapılmıştır. Antikanser çalışmasında %hücre canlılık değerleri kontrol grubuna göre Microsoft Office Excel programında hesaplanmıştır. İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin çizilmesi için Microsoft Office Excel programında çizilmiştir (Kamiloglu vd., 2020). Elde edilen verilerde üç veya daha fazla bağımsız ortalama arasındaki farkın anlamlılık değerini belirlemek için tek yönlü ANOVA, gruplar arasında farklılıklar değerlerini ise post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir (Ross, 2017). Anlamlılık değerleri;  $p > 0.05$  fark yok, \* $p < 0.05$  fark var, \*\* $p < 0.01$  anlamlı fark var, \*\*\* $p < 0.001$  önemli fark var ve \*\*\*\* $p < 0.0001$  çok önemli fark var olarak değerlendirilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Optimum Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi

Bu çalışmada 7 siyanobakteri izolatından hücre duvarının parçalanması ve suda çözünür C-fikosiyaninin açığa çıkartılmasını amaçlayan dört farklı ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen C-fikosiyaninin mg/g değerleri ve saflık oranları hesaplanmıştır. Deneyler üç tekrarlı şekilde yapılmış ve sonuçlar tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak gruplar arasında farklılıklar analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.1’de sunulmuştur.



**Şekil 3.1.** Farklı ekstraksiyon yöntemleri ve izolatların C-fikosiyanin verimine göre karşılaştırılması (A: Dondurma-çözme yöntemi; B: Sonikasyon; C: Lizozim uygulaması; D: Homojenizasyon). Standart sapmalar grafikte hata çubukları ile gösterilmiştir  $n = 3$  tekrar için varyasyon katsayılarıdır. En yüksek C-fikosiyanin verimine göre belirtilen yıldızlar, sonuçların istatistiksel olarak farklı olup olmadığı anlamına gelir ve şekilde yorumlanır  $p > 0,05$  fark yok,  $*p < 0,05$  fark var,  $**p < 0,01$  anlamlı fark var,  $***p < 0,001$  önemli fark var ve  $****p < 0,0001$  çok önemli fark var olarak değerlendirilmiştir. (tukey post hoc testi)

**Tablo 3.1.1.** Siyanobakteri izolatlarından farklı yöntemler kullanılarak elde edilen C-flkosiyanin verimleri (mg/g) ve saflık oranları (A620/A280)

| İzolatlar                         | Dondurma-Çözdürme |           | Sonikasyon |           | Homojenizasyon |           | Lizozim  |           |
|-----------------------------------|-------------------|-----------|------------|-----------|----------------|-----------|----------|-----------|
|                                   | Verim             | Saflık    | Verim      | Saflık    | Verim          | Saflık    | Verim    | Saflık    |
| <i>Geitlerinema</i> sp. 17        | 12±0,01           | 0,65±0,13 | 116±0,18   | 1,12±0,39 | 10,5±0,03      | 0,37±0,01 | 51,2±4,4 | 0,2±0,1   |
| <i>Geitlerinema</i> sp. G6        | 11,2±0,03         | 0,7±0,14  | 108±0,01   | 0,81±0,02 | 6,4±0,02       | 0,3±0,04  | 101±0,04 | 0,4±0,4   |
| <i>Geitlerinema</i> sp. 47        | 30±0,14           | 0,8±0,43  | 54±0,2     | 0,8±0,07  | 26,7±0,15      | 1±0,03    | 74±0,09  | 0,5±0,2   |
| <i>Nodosilinea</i> sp. 123        | 26,8±0,6          | 0,46±0,3  | 23,6±0,16  | 0,4±0,05  | 40,7±0,7       | 0,33±0,14 | 24±0,02  | 0,3±0,2   |
| <i>Phormidium lumbricale</i> 253  | 1,7±0,0,04        | 0,1±0,15  | 9,4±0,03   | 0,35±0,04 | 3,15±0,9       | 0,16±0,06 | 4±0,24   | 0,2±0,5   |
| <i>Leptolyngbya norvegica</i> 141 | 23±0,16           | 0,66±0,52 | 50±0,23    | 0,60±0,05 | 40±0,15        | 0,67±0,04 | 40±0,19  | 0,3±0,1   |
| <i>Leptolyngbya</i> sp. 2         | 26,8±0,2          | 0,58±0,19 | 28±0,11    | 0,54±0,27 | 28±0,1         | 0,5±0,14  | 42±0,19  | 0,24±0,17 |

Şekil 3.1’de sunulan grafiklere bakıldığında izolatlara uygulanan tüm yöntemlerin C-fikosiyanin veriminin (mg/g) ve saflığın giderek azaldığı biçimde düzenlenmiştir. Bu grafikte belirtilen C-fikosiyanin verimi ve saflık sonuçları Tablo 3.1’de detaylı bir şekilde özetlenmiştir.

Çalışmada elde edilen C-fikosiyanin konsantrasyonları, çeşitli ekstraksiyon yöntemlerinin yanı sıra, izolatlar arasında da büyük ölçüde farklılık göstermiştir. Şekilden de anlaşıldığı gibi dondurma-çözdürme yöntemi (Yöntem A) ile elde edilen verim tüm izolatlarda en düşük değerler ( $1,7\pm0,04$ - $30\pm0,14$  mg/g) ile sonuçlanmıştır.

Sonikasyon yöntemi (Yöntem B) maksimum C-fikosiyanin verimi ve saflık oranı ile diğer yöntemlere göre daha uygun bir yöntem olarak belirlenmiştir. Bu yöntemde aynı zamanda en fazla C-fikosiyanin içeren izolat  $116\pm4,4$  mg/g verimle *Geitlerinema* sp.-17 termofil siyanobakteri izolatı olarak belirlenmiştir. Homojenizasyon yönteminde ise en fazla C-fikosisyanin verimi  $40,63\pm0,7$  mg/g ile *Nodosilinea* sp. 123 numaralı izolatı ile elde edilmiştir. Sonikasyon yönteminden sonra en iyi C-fikosiyanin verimi sağlayan lizozim uygulama yöntemi olmasına rağmen en düşük saflıklar bu yöntemde bulunmuştur. Kullanılan 4 ekstraksiyon yöntemi ile en az C-fikosiyanin verimi elde edilen izolat *Phormidium lumbricale* 253 olmuştur. Sonuç olarak, tüm ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen verilere göre C-fikosiyanin verimi açısından izolatların sıralaması *Geitlerinema* sp. 17 > *Leptolyngbya norvegica* 141 > *Leptolyngbya* sp 2. > *Nodosilinea* sp. 123 > *Phormidium lumbricale* 253 şeklinde olmuştur. Yapılan istatistiksel çalışmalara göre siyanobakteri izolatları arasındaki istatistiksel değerler \*\*\*\* $p<0,0001$  bulunarak çok anlamlı farklılık değerleri ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada genel olarak sonuçlara bakıldığında C-fikosiyanin miktarı ve saflık açısından en verimli izolat *Geitlerinema* sp. ( $116\pm0,18$  mg/g,  $A_{620/280}=1,12$ ) ve en iyi ekstraksiyon yöntemi ise sonikasyon yöntemi olarak belirlenmiştir.

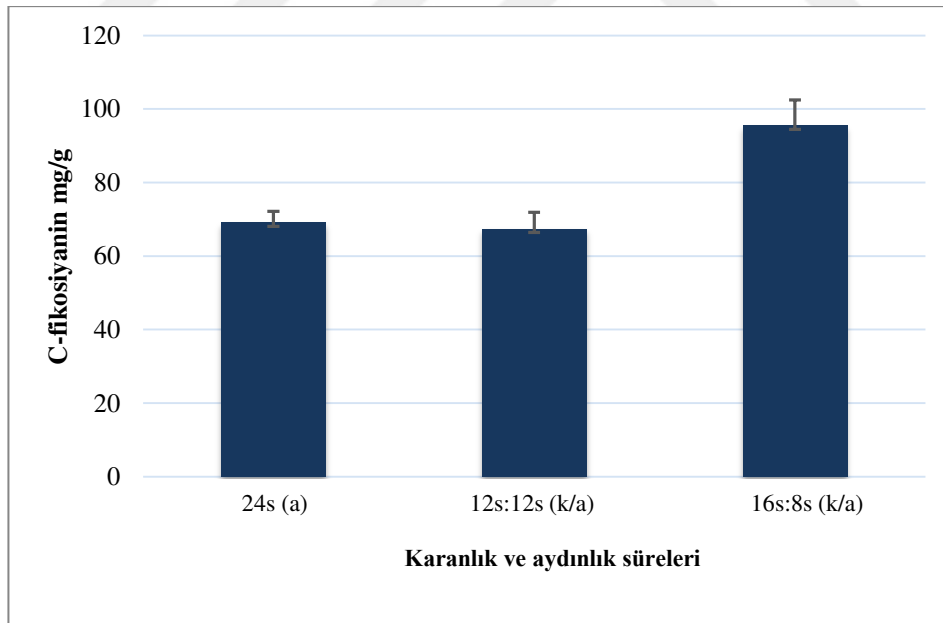
En iyi C-fikosiyanin verimi olan sonikasyon yöntemi, ekstraksiyon süresinin kısılması ve daha etkili hücre parçalanması, verim saflık oranının yüksek olması gibi faktörler, sonikasyon yöntemini diğer yöntemlere göre daha cazip kılmıştır. Bu çalışmada sonikasyon yöntemi optimum ekstraksiyon yöntemi olarak belirlenmiştir.

### 3.2. C-fikosiyaninin Verimini Etkileyen Parametrelerin Belirlenmesi

#### 3.2.1. Farklı ışık sürelerinin C-fikosiyanin üretimine etkisi

Tüm mavi yeşil siyanobakterilerin gelişiminde ışık şiddeti ve yoğunluğu çok önemli bir rol oynamaktadır. Fakat ışık şiddeti, C-fikosiyanin içeriğinin azalmasıyla ters orantılı olabilmektedir. Çalışmamızda ışık periyodunun C-fikosiyanin verimine etkisini incelemek amacıyla karanlık/aydınlık periyodu değiştirilerek siyanobakteri izolatları inkübe edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre 16:8 karanlık/aydınlık döngüsü en yüksek C-fikosiyanin verimi ( $95,5 \pm 6,93$  mg/g) ile sonuçlanmıştır. Bu sonuç, uygulanan diğer iki inkübasyon döngüsü olan 12 saat karanlık: 12 saat aydınlık ve 24 saat aydınlık süreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark ortaya çıkarmıştır (\* $p < 0,05$  gruplar arasında fark var).

Bu iki inkübasyon döngüsünden elde edilen sonuçlara bakıldığında C-fikosiyanin verimi stabil kalmış ve aralarında önemli bir fark bulunmamıştır (gruplar arasında istatistiksel olarak  $p > 0,05$  fark yok) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Karanlık/aydınlık inkübasyon sürelerinin C-fikosiyanin verimine etkisi (24 saat aydınlık kontrol olarak kullanılmıştır)

#### 3.2.2. Yaş ve kuru biyokülden C-fikosiyanin verimine etkisi

Çalışmamızda *Geitlerinema* sp. izolatından elde edilen C-fikosiyanin veriminde oluşan farklılıkları belirlemek amacıyla, seçilen izolatın yaş ve kuru biyokütlesinin C-

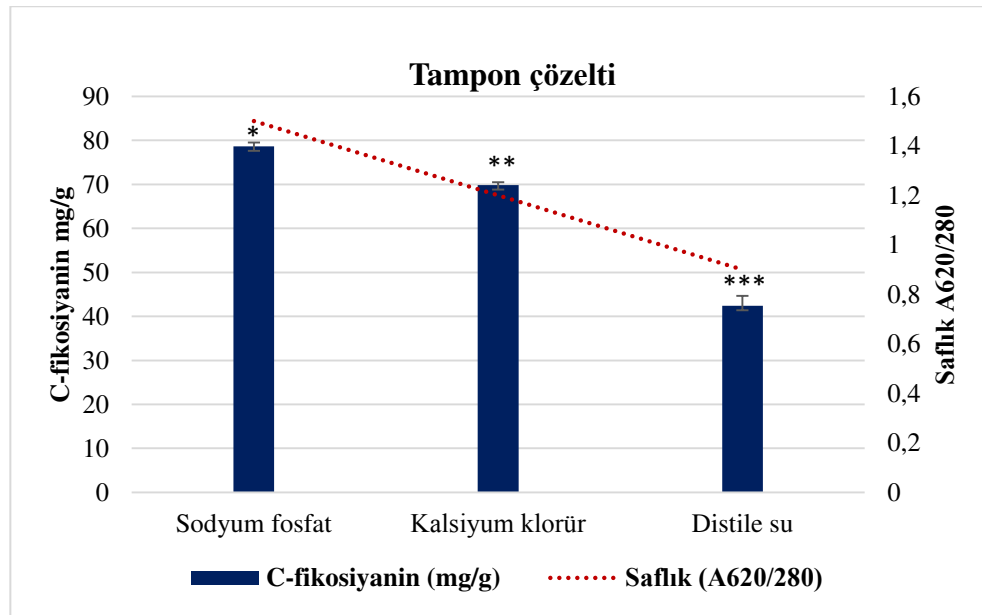
fikosiyanin verimine olan etkisi incelenmiştir. Burada yaş ve kuru biyokütlenin sodyum-fosfat tamponu ile ekstraksiyonu yapılmış ve yaş ve kuru biyokütleden verim ve saflık olarak belirgin bir fark elde edilmemiştir (Tablo 3.2).

**Tablo 3.2.** Yaş ve kuru olarak siyanobakteriyel biyokültenin C-fikosiyanin verimine etkisi

| Biyokütle | C-fikosiyanin verim (mg/g) | C-fikosiyanin Saflık $A_{620}/A_{280}$ |
|-----------|----------------------------|----------------------------------------|
| Kuru      | $95,2 \pm 0,17$            | $0,9 \pm 0,08$                         |
| Yaş       | $96,8 \pm 0,25$            | $1,23 \pm 0,21$                        |

### 3.2.3. Tampon çözeltilerin C-fikosiyanin verimine etkisi

Bu çalışmada, belirlediğimiz en verimli siyanobakteri izolatu olan *Geitlerinema* sp.'den elde edilen C-fikosiyanin verimine tampon çözeltilerin etkisini incelemek amacıyla sodyum fosfat, kalsiyum klorür ve distile su olmak üzere 3 farklı çözücü ile çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre verim karşılaştırması yapılmıştır (Şekil 3.3).

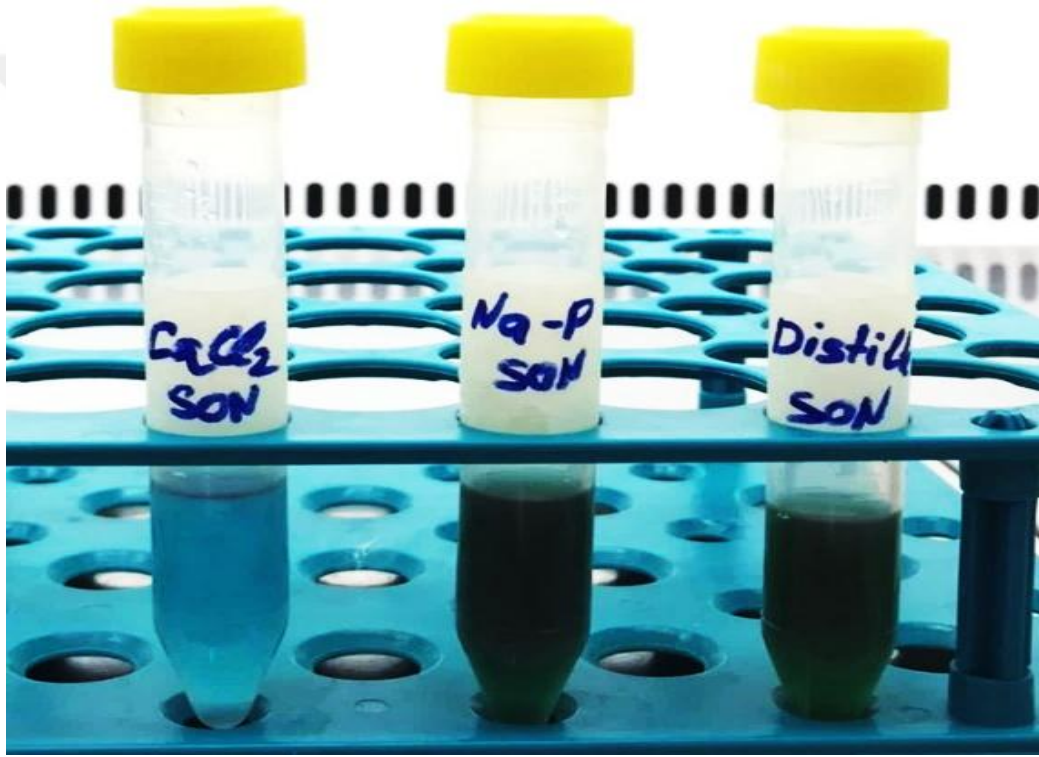


**Şekil 3.3.** Tampon çözeltilerin C-fikosiyanin verimi ve saflığına etkisi \* $p < 0,05$  fark var, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  önemli fark var

Sodyum fosfat, kalsiyum klorür ve distile su ile elde edilen C-fikosiyaninin saflığına bakıldığında ise kalsiyum klorürün en saf, sodyum fosfat tamponun ise en az saflıkta C-fikosiyanin eldesini sağladığı bulunmuştur.

En yüksek saflık kalsiyum klorür ( $A_{620}/A_{280} = 1,5$ ), en yüksek C-fikosiyanin içeriği sodyum-fosfat tamponu ile elde edilmiş ( $79,2 \pm 0,88$  mg/g), distile su ise diğer tamponlara göre daha düşük bir verimle sonuçlanmıştır.

Ayrıca Görsel 3.1’de de görüldüğü gibi C-fikosiyaninin ekstraksiyonu sonrası çözeltilerin farklı renkler oluşturduğu da gözlenmiştir.



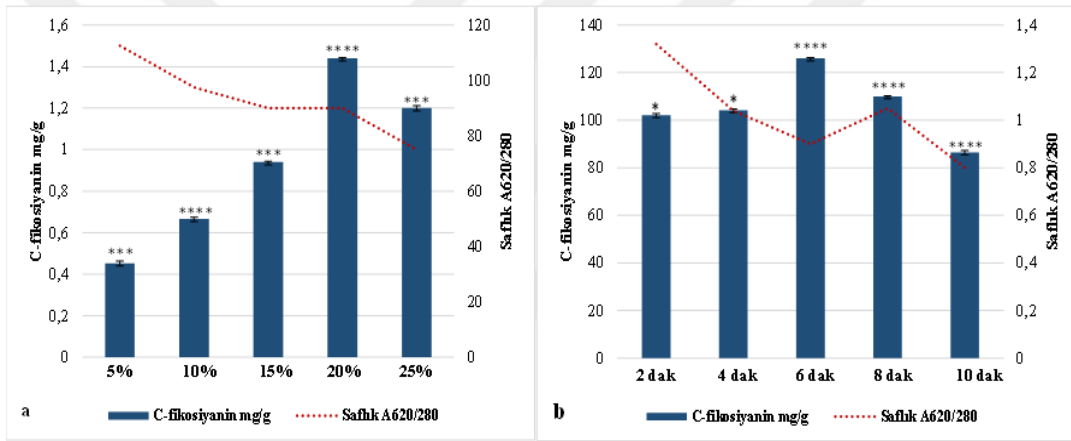
**Görsel 3.1.** Kullanılan çözeltilerin ham ekstraktlar üzerinde oluşturduğu renk değişimi.  
*CaCl<sub>2</sub>- mavi, sodyum fosfat tamponu- koyu yeşil, distile su – yeşil.*

#### 3.2.4. Sonikasyonun C-fikosiyanin verimine etkisi

Çalışmamızda C-fikosiyanin verimine etki eden faktörlerden biri olarak sonikasyon parametreleri incelenmiştir. Bu amaçla ilk olarak, sonikasyon cihazında amplitüd (dalga genliği) oranları belirlenerek 2 dakika sabit süre ile %5’ten %25 oranına kadar titreşim frekans dalgaları uygulanmıştır. Amplitüd gruplarına göre yüksek C-fikosiyanin üretiminin %15 ve üstündeki sonikasyon güçlerinde sağlandığı ve elde edilen değerlerin istatistik açıdan birbirinden farklı oluşu belirlenmiştir.

(\* $p<0,05$  fark var, \*\*\* $p<0,001$  önemli fark var ve \*\*\*\* $p<0,0001$  çok önemli fark var). Saflık oranı açısından bakıldığında %20 ve üzerinde uygulanan frekans dalgalarında saflığın giderek azaldığı görülmüştür (Şekil 3.4-a). Harcanan enerji miktarı da dikkate alındığında optimum amplitüd oranı %20 olarak C-fikosiyanin verimi  $108 \pm 0,2$  mg/g olarak, saflık oranı ise 1,2 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.4-a).

Bir diğer yapılan farklı süre çalışmasında ise saflık oranı süre arttıkça düşmektedir (2 dk, 4 dk, 6 dk, 8 dk, 10 dk). 2 dakika ve üstünde uygulanan sonikasyon sürelerinde elde edilen C-fikosiyanin miktarlarının istatistik açıdan birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir (\* $p<0,05$  fark var, \*\*\* $p<0,001$  önemli fark var ve \*\*\*\* $p<0,0001$ ). Saflık oranı ise süre arttıkça düşmektedir (Şekil 3.4-b).



**Şekil 3.4.** a. Farklı amplitüd oranlarının C-fikosiyanine etkisi; b. Farklı sonikasyon sürelerinin C-fikosiyanine etkisi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Anlamlı farklılık var: \* $p<0,05$  \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ ).

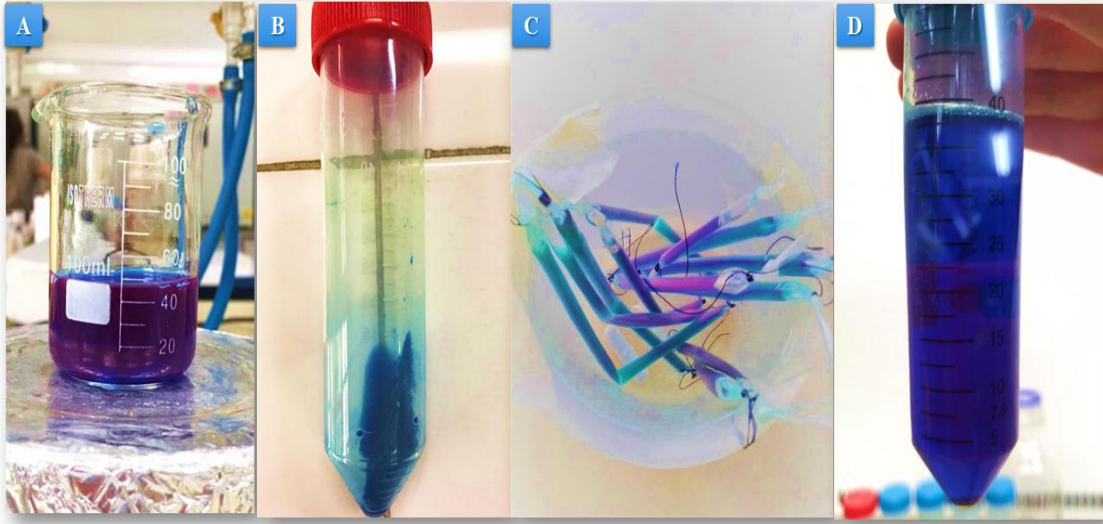
Bu nedenle yüksek miktarda C-fikosiyanin elde edilebilecek en düşük süre olan 4 dakika en uygun değer olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak yapılan çalışmalar göre %20 amplitüd oranında 4 dakika süre ile uygulanan sonikasyon koşullarının maksimum C-fikosiyanin üretimi ve saflığı açısından yeterli olduğu tespit edilmiştir.

### 3.3. Siyanobakteri İzolatlarından C-fikosiyaninin Saflaştırılması

#### 3.3.1. Amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz

Siyanobakteri izolatlarından elde edilen C-fikosiyaninin istenmeyen proteinlerden arındırılarak saflığını sağlamak amacıyla iki aşamalı amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulanmıştır. İlk olarak %25'lik  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  konsantrasyonda

amonyum sülfat tuzu eklenerek oluşan karışımın santrifüj sonrası yeşilimsi görünümde kirlilik olan protein çöktürmelerini içeren pelet oluşmuştur; ikinci aşamada elde edilen süpernatant kısmına daha yüksek konsantrasyonda, %75'lik amonyum sülfat tuzu eklenmiş ve santrifüj sonrasında mavimsi çökelti içeren pelet elde edilmiştir. Renksiz protein çöktürmeleri içeren süpernatant kısmı atılmıştır. Bu da C-fikosiyaninin %25 ve %75 amonyum sülfat doygunluğu arasında çöktüğünü göstermiştir. Bu aşamalar Görsel 3.2'de gösterilmiştir. İki adımlı uygulanan amonyum tuzu sonrası yapılan iki günlük diyaliz işleminin ardından C-fikosiyanin verimi %60,19, saflığı ise 2,79 olarak belirlenmiştir.



**Görsel 3.2.** Siyanobakteri izolatlarından elde edilen C-fikosiyaninin amonyum sülfatla çöktürme adımları ve diyaliz yöntemi  
A, ham ekstrakt; B, %75'lik amonyum sülfat çöktürme sonrası oluşan mavi C-fikosiyanin peleti; C, diyaliz mebrana aktarılmış C-fikosiyanin; D, kısmi saf C-fikosiyanin

### 3.3.2. İyon değişim kolon kromatografisi (İDK)

Diyaliz ile elde edilen kısmi saflıktaki C-fikosiyaninin saflaştırma basamağının son adımına geçmeden önce, 2 litrelik erlenler kullanılarak geliştirilmiş olan siyanobakteri kültürleri santrifüjlenmiştir. Elde edilen yaş pelet %1,5  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi kullanılarak sonikasyon yöntemiyle ekstrakte edilmiştir. Prosedür sonucu ilk C-fikosiyanin verimi absorbans değerlerine göre hesaplanmış ve kuru ağırlık başına mg/g olarak ifade edilmiştir. Buna göre elde edilen verim 103,2 mg/g, saflığı ise 1,84 olarak belirlenmiştir. Daha sonra amonyum sülfat çöktürme yöntemi 3.1'de belirtildiği şekilde yapılarak elde edilen C-fikosiyanin peleti diyaliz edilmiş,  $A_{620}/A_{280}$  değerine göre saflığı hesaplanmıştır. Elde edilen C-fikosiyanin geri kazanımı %60 oranı ile

62,11 mg/g, saflığı ise 2,79 olmuştur. Burada artan saflık faktörü, verimin azalmasıyla sonuçlanmıştır. Daha yüksek oranda bir saflığa ulaşmak için çalışmamızda son adım olarak iyon değişim kromatografisi tercih edilmiştir. Burada kolon dolgu maddesi olarak kullanılan güçlü ve zayıf anyonik reçine karşılaştırmalı olarak saflık faktörü, C-fikosiyenin verimi, ve geri dönüşüm oranı şeklinde Tablo 3.3’de sunulmuştur.

**Tablo 3.3.** C-fikosiyenin saflaştırılmasında kullanılan reçineler, verim, geri kazanım ve saflık faktörü

| Kullanılan Reçineler | C-fikosiyenin verimi mg/g | Geri kazanım (%) | Saflık $A_{620}/A_{280}$ |
|----------------------|---------------------------|------------------|--------------------------|
| DEAE- selüloz        | 22,23                     | 38,8             | 4,0                      |
| Q – Sefaroz          | 28,02                     | 48,9             | 4,12                     |

Tablo 3.3’deki değerler incelendiğinde en iyi C-fikosiyenin verimi (28,02 mg/g), geri kazanım (%48,9) ve saflık (4,12) açısından güçlü anyonik reçine olan Q – sefaroze ile elde edilmiştir. Genel olarak bakıldığında C-fikosiyenin saflaştırılması esnasındaki tüm basamakların saflık ve verim değerleri Tablo 3.4’de özetlenmiştir.

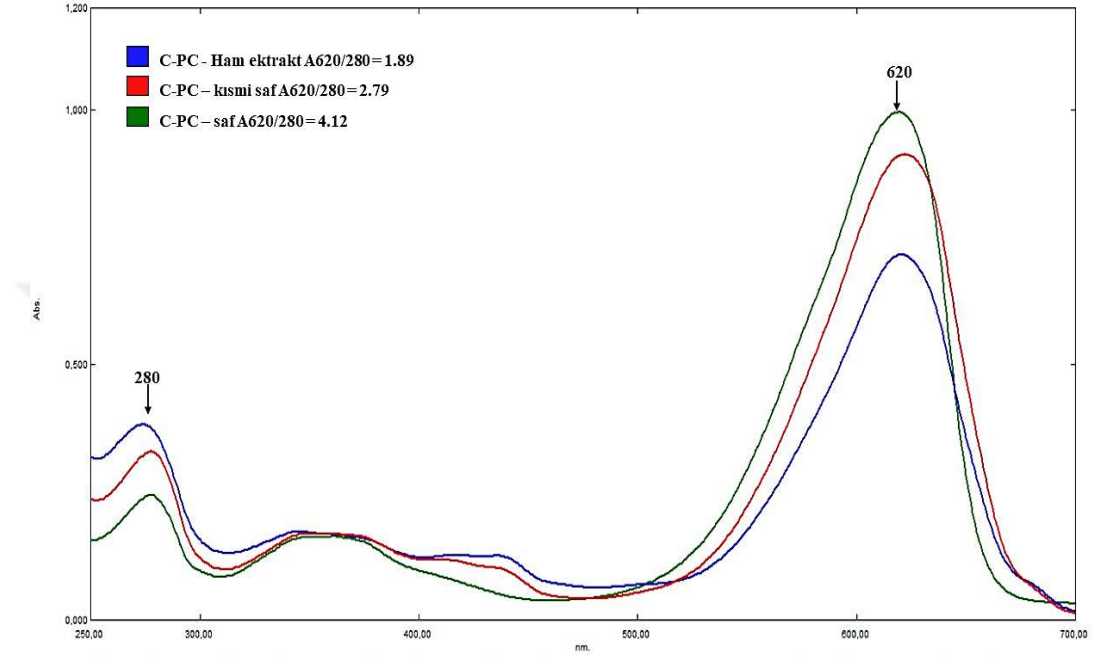
**Tablo 3.4.** C-fikosiyenin saflaştırılması için yapılan tüm işlemlerin saflık ve verim değerleri

| Yöntem                                        | C-fikosiyenin verim mg/g | Geri kazanım (%) | Saflık $A_{620}/A_{280}$ |
|-----------------------------------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| Ekstraksiyon                                  | 103,2                    | 100              | 1,84                     |
| Amonyum sülfat çöktürme/diyaliz               | 62,11                    | 60,19            | 2,79                     |
| İyon – değişim kromatografisi (DEAE –selüloz) | 22,23                    | 38,8             | 4,0                      |
| İyon – değişim kromatografisi (Q – sefaroze)  | 28,02                    | 48,9             | 4,12                     |

### 3.4. C-fikosiyaninin Tanımlanması

#### 3.4.1. C-fikosiyaninin spektrofotometrik tanımlanması

C-fikosiyaninin ekstraksiyon, kısmi saflaştırma ve saflaştırma aşamalarının her adımında elde edilen spektrum taraması Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



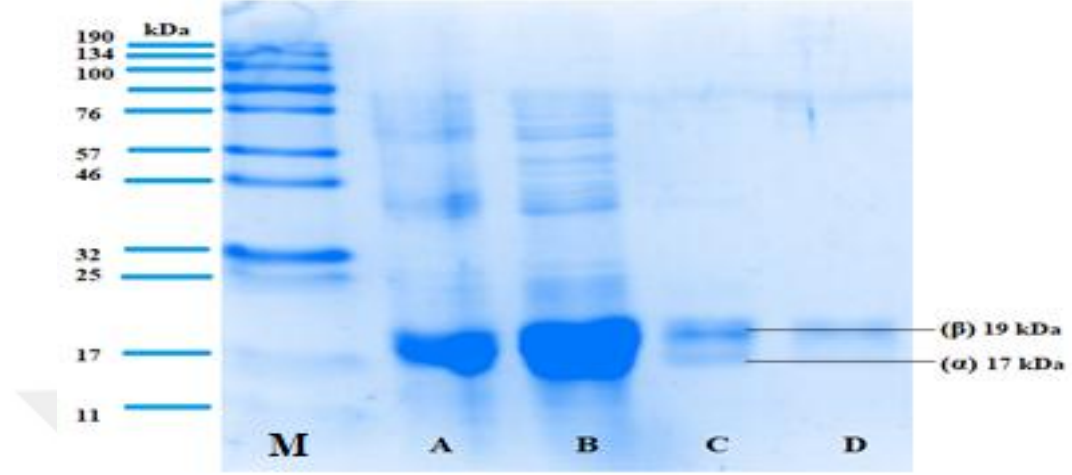
Şekil 3.5. C-fikosiyaninin saflaştırılması sırasında elde edilen ekstraktların absorpsiyon spektrumları  
--- Ham ekstrakt ( $A_{620}/A_{280} = 1,89$ ), --- kısmi saf ( $A_{620}/A_{280} = 2,79$ ), --- saf ( $A_{620}/A_{280} = 4,12$ )

Şekil 3.5'te görüldüğü üzere iki önemli tepe noktası olan  $A_{620}$  ve  $A_{280}$  dalga boylarında piklerin artma ve azalma oranları ortaya çıkmıştır. Buradaki  $A_{280}$ 'deki, toplam proteinlerin absorbansıdır ve her saflaştırma adımında bu oranın azalmasıyla saf C-fikosiyanin elde edildiği belirgin bir şekilde görülmektedir. Absorpsiyon spektrumu her adımda maksimum C-fikosiyanin (620 nm'de zirve) içerdiğini göstermiştir.

#### 3.4.2. C-fikosiyaninin saflık ve moleküler ağırlık tayini

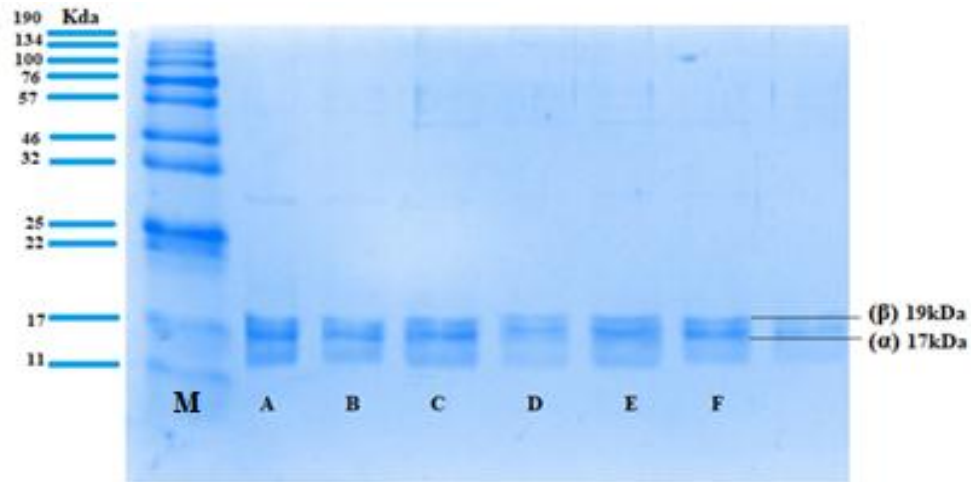
Çalışmamızda elde edilen C-fikosiyanin protein pigmentinin varlığı ve moleküler ağırlığıyla ilgili bulgular elde etmek amacıyla SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. C-fikosiyaninin saflığını belirlemek için ham ekstrakt, kısmi saf ve saf olarak belirtilen sıralamayla jele yüklenmiş ve sonuçlar Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre C-fikosiyaninin  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimleri, yaklaşık 17 kDa ve 19 kDa olarak gözlemlenmiştir.



**Şekil 3.6.** C-fikosiyaninin SDS-PAGE profili. (M) Protein markır, (A) Ham ekstrakt, (B) amonyum sülfat çöktürme/diyaliz, (C, D) iyon değişim kromatografisi

Şekil 3.6’da A ve B kuyucuğuna ait olan yoğun bantlar C-fikosiyanin içeriğinde diğer proteinlerin varlığını göstermektedir. C ve D kuyucuğuna ait olan bantlarda ise diğer protein kirlilikleri kaybolmuş ve iki alt birimin daha net görülmektedir. Ayrıca elde edilen saf C-fikosiyanin özütlerinin jelle yüklenmesinin ardından, jel üzerinde görüntülenen saf ve homojen bantlar Şekil 3.7’de belirtilen bantlarla aynı sonuçlanmış ve deney ikinci kez doğrulanmıştır. C-fikosiyaninin bir monomerinin molekül ağırlığı 36 kDa (17+19) olarak tespit edilmiştir.

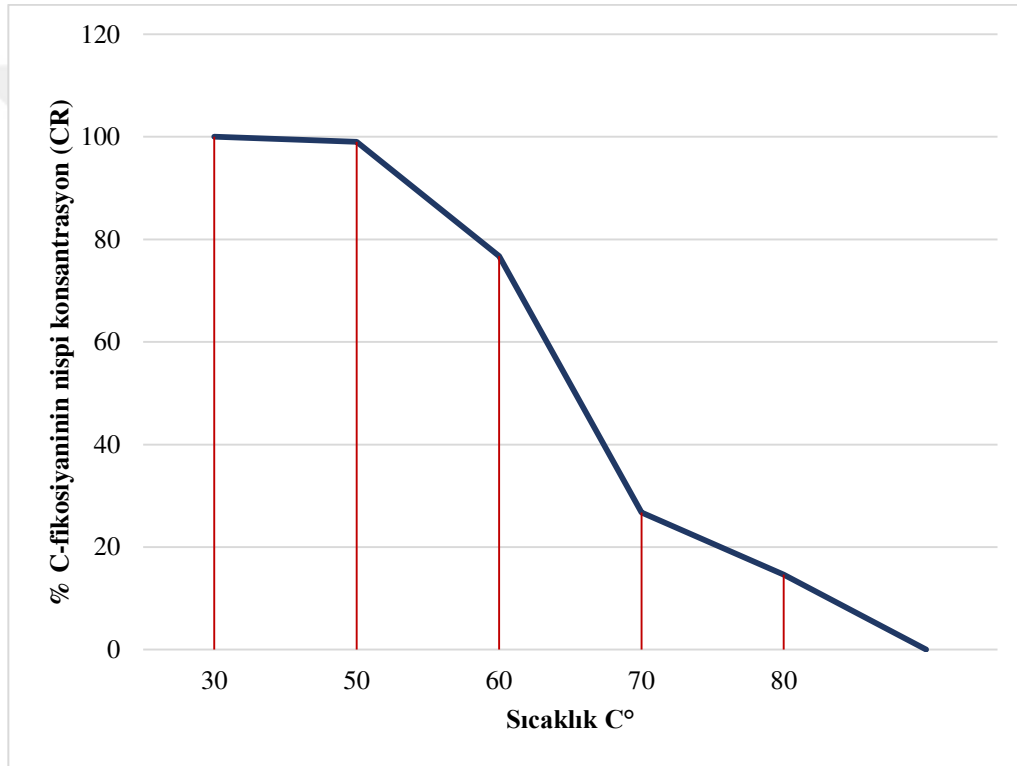


**Şekil 3.7.** Saflaştırılmış C-fikosiyanin ( $A_{620}/A_{280} < 4,0$ ). (M) Protein markır, Q-sefaroze (A, B, C), DEAE-selüloz (D, E, F)

### 3.5. Farklı Sıcaklıkların C-fikosiyanin Stabilitesine Etkisi

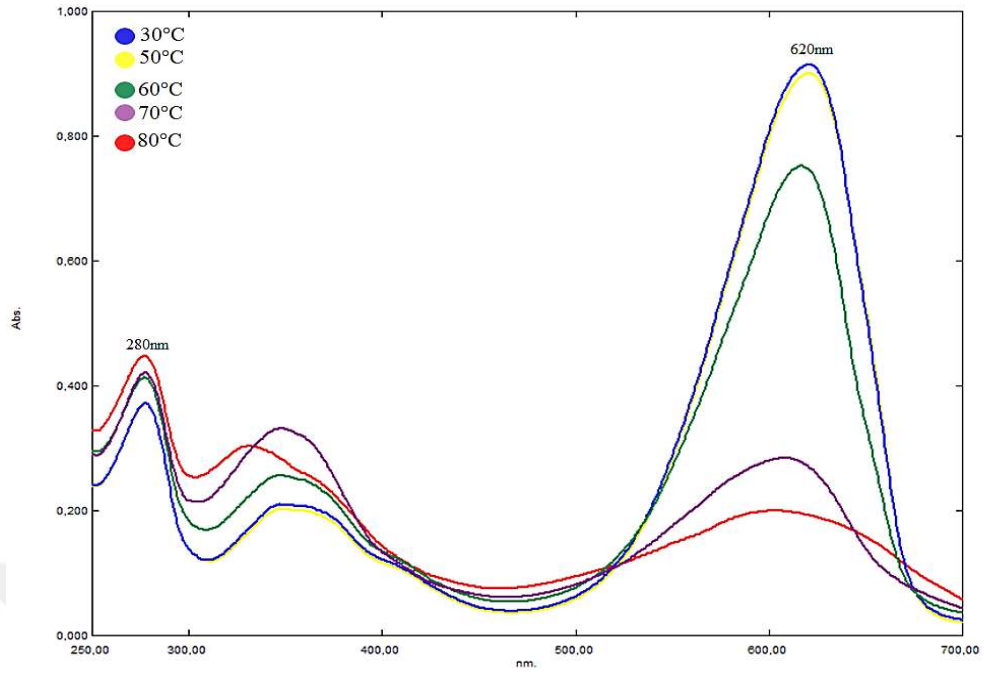
C-fikosiyaninin sıcaklık stabilitesi belirlemek için farklı sıcaklıklarla denemeler yapılmıştır. Burada sıcaklığa maruz kalmış C-fikosiyanin çözeltilerinin nispi konsantrasyonunu ( $C_R$ ) belirlemek için işlem sonrası elde edilen C-fikosiyanin konsantrasyonların absorbands ölçümlerinin önceden belirlenen konsantrasyonuna oranı ile belirlenmiştir.

C-fikosiyanin çözeltilerinin nispi konsantrasyonları sıcaklık artışının etkisiyle ( $C_R$ ) sırasıyla %100, %99,0, %76,71'den %26,71 ve %14,66'ya azalan oranlarda düşmüştür (Şekil 3.8).



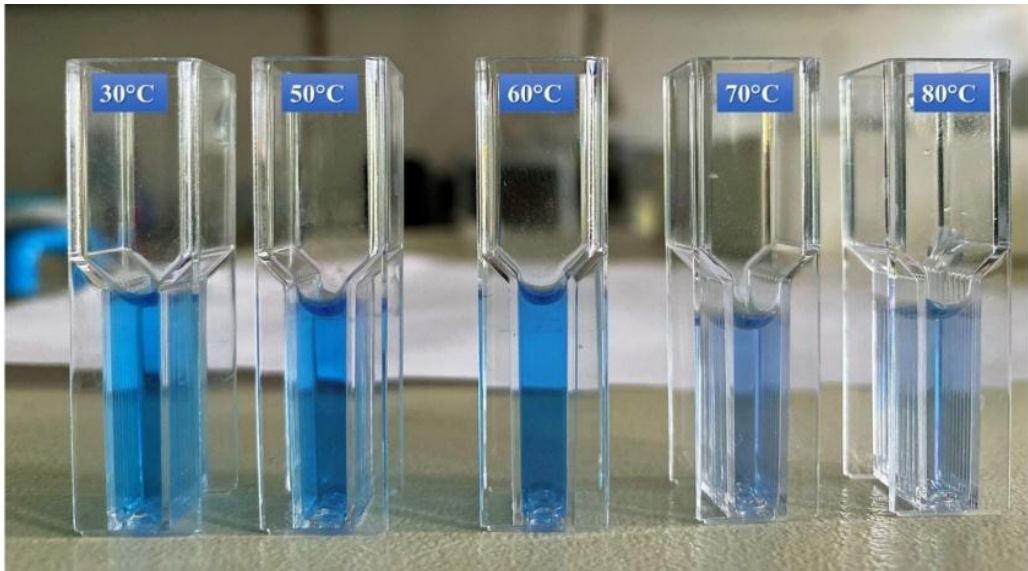
Şekil 3.8. Sıcaklık artışının C-fikosiyanin üzerinde etkisinin nispi konsantrasyon ( $C_R$ ) değeri

Sonuçlara bakıldığı zaman C-fikosiyaninin mg/mL değerleri 30-50 °C'deki sıcaklık geçişlerinde direnç göstererek, nispi konsantrasyon ( $C_R$ ) değerlerinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Fakat 60 °C'den başlayarak C-fikosiyaninin nispi konsantrasyon ( $C_R$ ) değerleri sıcaklığa bağlı bir şekilde azalmıştır. Bu sonuçlar spektrum özelliklerinde de aynı şekilde yansımıştır (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9.** Sıcaklık artışının *C-fikosiyanin* üzerinde etkisinin absorpsiyon spektrumları

Burada farklı renklerle belirtilmiş olan  $A_{620}$  nm spektrumundaki varyasyonlar, *C-fikosiyanin*in protein yapısında oluşan değişiklikleri göstermiştir. Ayrıca yüksek sıcaklık nedeniyle oluşan protein denatürasyonu *C-fikosiyanin*in renk oluşumu üzerinde de önemli bir etkiye sahip olmuştur (Görsel 3.3).



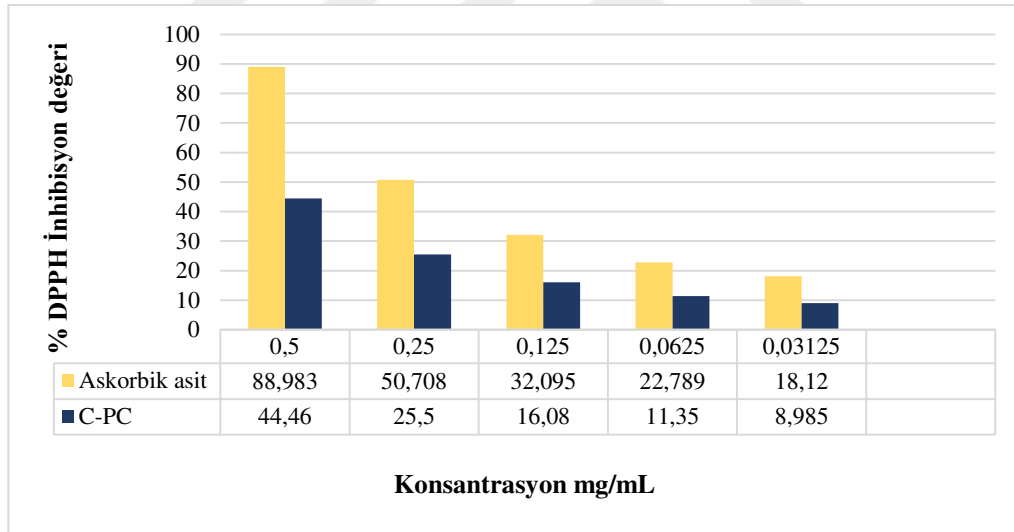
**Görsel 3.3.** Farklı sıcaklıklar altında *C-fikosiyanin*in örneklerinin oluşturduğu renk değişimi

Görsel 3.3’de görüldüğü üzere 30, 50 ve 60 °C de mavi renk belirgin şekilde kendi kararlılığını korumuş, ancak 70 ve 80 °C’deki sıcaklıklarda protein yapısında oluşan denatürasyon durumuna bağlı olarak renk bozulması gözlemlenmiştir.

### 3.6. C-fikosiyaninin Biyolojik Aktivite Tayinleri

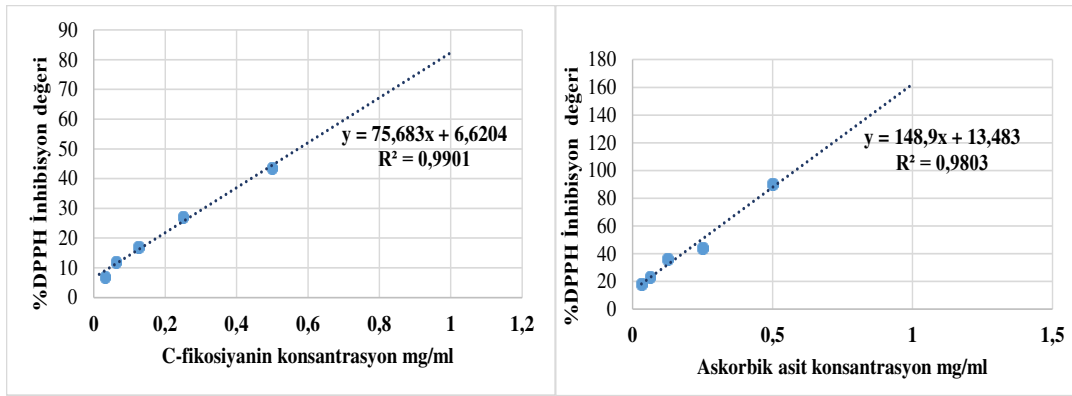
#### 3.6.1. Antikoksidan aktivite tayini

Amonyum sülfat ile kısmi düzeyde saflaştırılmış C-fikosiyanin numunelerinin antioksidan aktivitesi DPPH• (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) serbest radikali üzerindeki inhibisyon (%) değerlerine göre radikal süpürme etkisi belirlenmiş ve ardından pozitif standart olarak askorbik asite kıyasla IC<sub>50</sub> değerleri karşılaştırılmıştır (Şekil 3.10). Burada deney aşamasında DPPH•, mevcut C-fikosiyanin analitleri ile reaksiyona girdiğinde sarı veya sarımsı-kahverengiye dönüşen bir reaksiyon gerçekleşmiştir. Farklı konsantrasyonlarda dilüe edilen C-fikosiyanin ekstrelerinin ortamdaki DPPH• serbest radikallerini inhibe eden miktarı yüzde olarak Şekil 3.11’de verilmiştir.



Şekil 3.10. Kısmi saflıkta olan C-fikosiyaninin radikal süpürücü aktivite tayini (kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır)

Burada yüzde (%) inhibisyon değeri ne kadar yüksekse antioksidan etki de o kadar güçlü kabul edilmektedir. Buna dayalı olarak Şekil 3.10’a göre 0,5 mg/mL konsantrasyonda C-fikosiyanin ekstresinin DPPH• maksimum sönmüleme aktivitesi % 44,46±0,74 olarak bulunmuştur. DPPH• radikal süpürücü etkisinin bir diğer göstergesi de IC<sub>50</sub> değerleridir.



Şekil 3.11. Kısımlı saflıkta olan C-fikosiyenin (solda) ve askorbik asit kontrolünün (sağda) IC<sub>50</sub> grafiği

Bu değer belirli bir DPPH• derişiminde mevcut DPPH•'ın yarısının süpürülmesi için gerekli olan antioksidan miktarı olarak tanımlanmaktadır. Şekil 3.11'de oluşturulan grafikte ise, C-fikosiyenin ve askorbik asit için IC<sub>50</sub> değerleri elde edilmiştir. Buna göre eğri denkleminde y=50 konarak sırasıyla hesaplanmış ve C-fikosiyenin için 0,57±0,01 mg/mL, askorbik asit için ise 0,24±0,08 mg/mL olarak bulunmuştur.

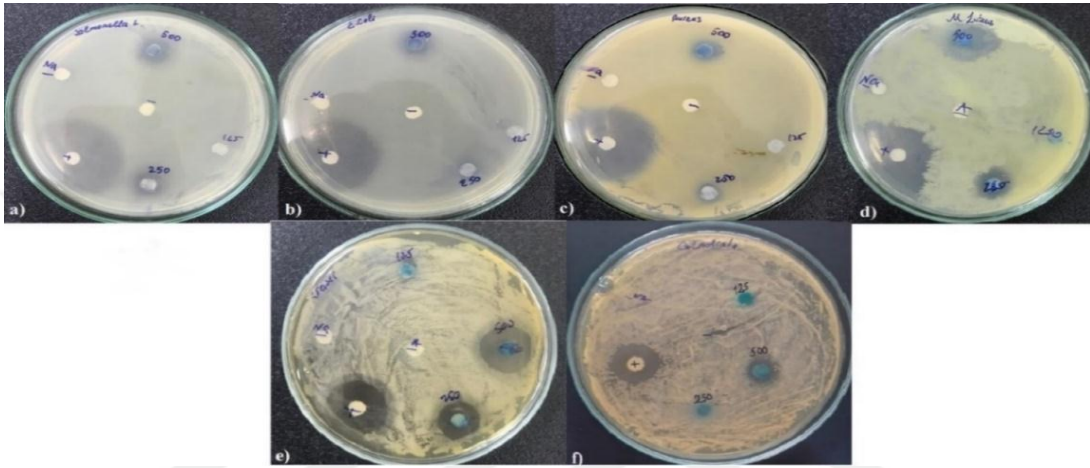
### 3.6.2. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Bu çalışmada saflık oranı  $A_{620}/A_{280} < 2,7$  olan C-fikosiyenin örneğinin Tablo 2.1'de yer alan 15 patojen test mikroorganizmasına karşı antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Burada kullanılan C-fikosiyenin numunesi 50 µg, 25 µg ve 12,5 µg lık konsantrasyonlar her bir diskin emdiği miktar olarak hesaplanmıştır. Yani 50 µg-12,5 µg aralığındaki C-fikosiyenin miktarının etkisi bu çalışmada test edilmiştir. Toplam altı mikroorganizma türüne karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Gram pozitif bakterilerden, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, gram negatif bakterilerden *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve mayalardan ise *Candida krusei* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030'ya karşı antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir (Görsel 3.4).

Küflere karşı antimikrobiyal etkisine bakıldığında ise herhangi bir inhibisyon zonu elde edilmemiştir. Pozitif kontrol olarak bakteriler için kloramfenikol, maya ve küfler için ise ketokonazol standart antibiyotikleri, negatif kontrol olarak ise aseton ve sodyum fosfat kullanılmıştır (Görsel 3.4). Bununla birlikte C-fikosiyenin

ekstraktlarının test mikroorganizmalarına karşı göstermiş olduğu inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüş ve Tabloda 3.5’te gösterilmiştir.

Negatif kontrol olarak kullanılan aseton ve sodyum fosfat çözeltisinde beklendiği şekilde antimikrobiyal aktivite görülmemiştir (Görsel 3.4). Genel olarak C-fikosiyenin pigmenti minimum 25 µg konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite sergileme potansiyeli göstermiştir.



**Görsel 3.4.** Kısmi saflaştırılmış C-fikosiyenin ekstraktının test mikroorganizmaları üzerinde gösterdiği antimikrobiyal etkileri  
a) *Salmonella typhimurium*, b) *Escherichia coli*, c) *Staphylococcus aureus* d) *Micrococcus luteus*, e) *Candida krusei*, f) *Candida glabrata*.

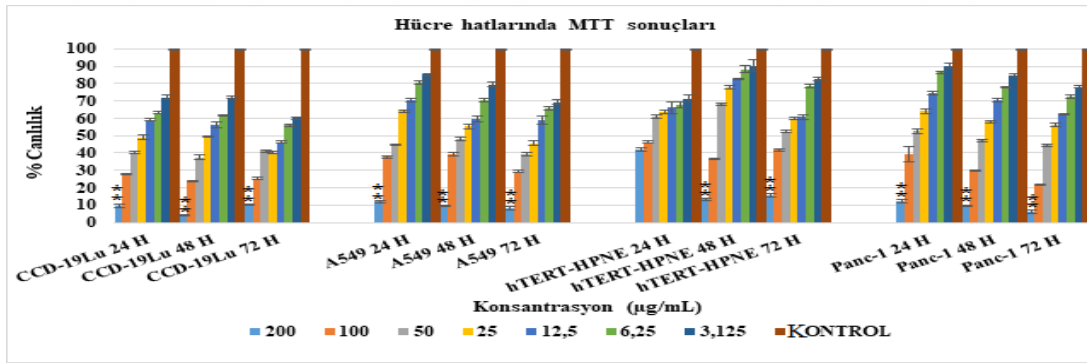
**Tablo 3.5.** Kısmi saflaştırılmış C-fikosiyenin ekstraktı ve pozitif kontrol olarak kullanılan standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon çapları

| Test mikroorganizmaları                  | İnhibisyon zon çapları (mm)              |         |         |    | Kloramfenikol | Ketokonazol |
|------------------------------------------|------------------------------------------|---------|---------|----|---------------|-------------|
|                                          | C-fikosiyenin konsantrasyonları<br>50 µg | 25 µg   | 12,5 µg |    |               |             |
| <i>Micrococcus luteus</i><br>NRRL B-4375 | 15±0,71                                  | 10±1,41 | -       | 32 | -             | -           |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538    | 11±0,0                                   | 9±3,18  | -       | 35 | -             | -           |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922       | 9±2,12                                   | -       | -       | 30 | -             | -           |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 | 12±0,35                                  | 9±1,06  | -       | 32 | -             | -           |
| <i>Candida krusei</i> ATCC 90028         | 18±3,54                                  | 14±4,95 | -       | -  | -             | 20          |
| <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030       | 12±0,35                                  | -       | -       | -  | -             | 19          |

(-): antimikrobiyal etki yok

### 3.6.3. Antikanser aktivitenin belirlenmesi

C-fikosiyaninin kullanılan hücre çoğalmasında üzerindeki etkisi ve yarı maksimum inhibitör konsantrasyonlarını ( $IC_{50}$ ) hesaplamak için MTT yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle hücreler otomatik hücre sayım cihazı (LUNA II, Logos Biosystems, Güney Kore) kullanılarak sayılmıştır. Daha sonra, 96 kuyulu mikrotitrasyon petrilere kuyu başına  $1 \times 10^4$  yoğunluğunda olacak şekilde ekilerek yapışmaları beklenmiş ve C-fikosiyanin konsantrasyonlarına (200/100/50/25/12,5/6,25/3,125  $\mu\text{g/mL}$ ) tabi tutulmuştur. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyondan sonra, 5 mg/mL 'lik stok MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide % 98, Alfa Aesar, Almanya (298-93-1) solüsyonu her bir kuyuya ilave edilmiştir. Hücreler  $37^\circ\text{C}$ 'de 3 saat daha inkübe edilmiş ve sonrasında besiyeri çekilerek formazan kristallerinin çözünmesi için kuyu başına 100  $\mu\text{L}$  DMSO ilave edilmiştir. Absorbans değerleri, çok fonksiyonlu plaka okuyucu (BioTek, HTX Synergy, ABD) kullanılarak 540 nm'de ölçülmüştür. Hücre canlılık oranları, kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilerek hesaplanmış (Şekil 3.11, Tablo 3.6) ve analiz sonucuna göre  $IC_{50}$  konsantrasyonları bulunmuştur (Tablo 3.6).



**Şekil 3.12.** Farklı hücre grupları için oluşturulmuş 24-48-72 saatlik hücre % canlılık değerleri. (Anlamlılık aksi belirtilmedikçe \*\* $p < 0,01$  dışındaki tüm sütunlar \* $p < 0,01$  dışındaki tüm sütunlar \* $p < 0,05$ )

Şekil 3.12'de tüm hücreler için hücre canlılık grafiği  $\pm$  standart hata değerleri ile gösterilmiştir. 3 günlük analiz sonuçlarından elde edilen  $IC_{50}$  değerleri Tablo 3.6'da sunulmuştur. Bu veriler ışığındaki analiz sonuçlarına göre normal hücreler için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri kanser hücrelerine göre daha yüksek bulunmuş ve bu sebeple bileşiğin antikanser aktivite gösterebileceği düşünülmüştür. Ancak akciğer gözlenmiştir.

**Tablo 3.6. Saf C-flikosiyinin 4 farklı hücre hattına 24-48-72 saatlik uygulama sonrası hücre çoğalmasının inhibisyonu ve  $\pm$  standart sapmaları**

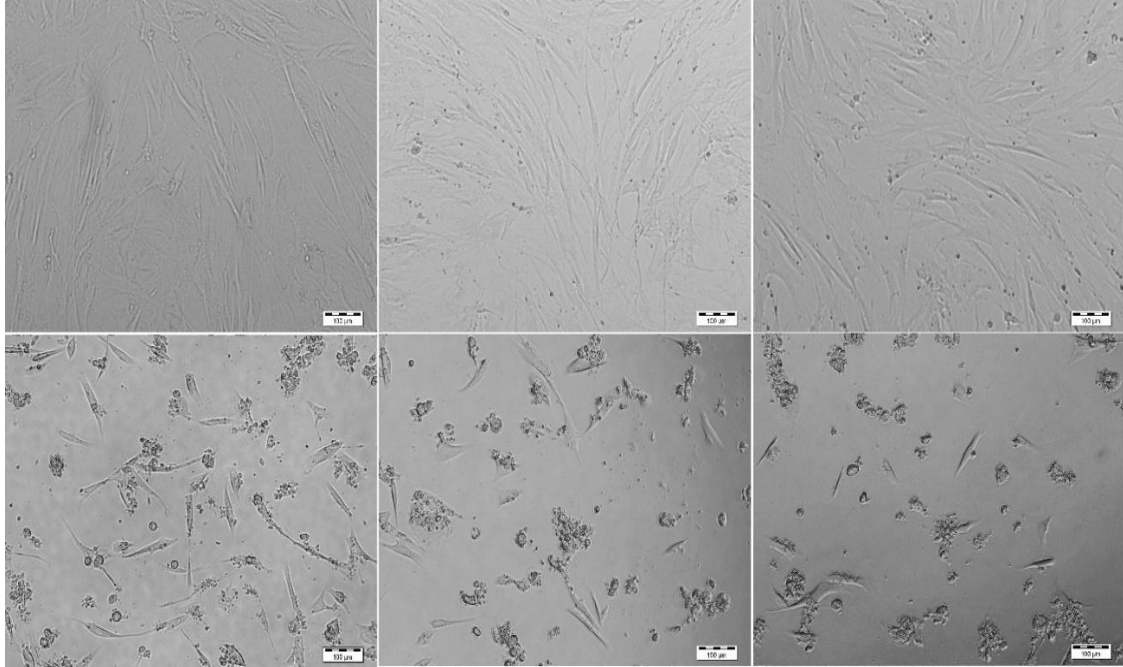
| Dört farklı hücre grubunun % canlılık değerler |          |        |        |        |        |        |            |        |        |        |        |        |
|------------------------------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                                                | CCD-19Lu |        |        | A549   |        |        | hTERT-HPNE |        |        | Panc-1 |        |        |
|                                                | 24 S     | 48 S   | 72 S   | 24 S   | 48 S   | 72 S   | 24 S       | 48 S   | 72 S   | 24 S   | 48 S   | 72 S   |
| 200                                            | 9,66     | 4,51   | 10,16  | 11,88  | 9,31   | 8,16   | 41,99      | 13,30  | 15,43  | 12,17  | 9,62   | 6,25   |
| 100                                            | 27,76    | 23,69  | 25,21  | 37,84  | 39,10  | 29,41  | 46,30      | 36,82  | 41,70  | 39,13  | 30,19  | 21,65  |
| 50                                             | 40,22    | 37,60  | 41,07  | 44,59  | 48,08  | 39,21  | 61,24      | 68,18  | 52,30  | 52,66  | 47,26  | 44,40  |
| 25                                             | 49,05    | 49,65  | 40,13  | 64,03  | 55,37  | 45,72  | 63,93      | 78,13  | 59,74  | 64,05  | 57,94  | 56,43  |
| 12,5                                           | 59,14    | 56,23  | 46,39  | 70,28  | 59,57  | 58,87  | 66,07      | 82,43  | 60,80  | 74,56  | 70,55  | 62,30  |
| 6,25                                           | 63,23    | 61,48  | 56,15  | 80,58  | 70,42  | 65,72  | 67,78      | 88,37  | 78,72  | 86,58  | 77,88  | 72,48  |
| 3,125                                          | 71,96    | 72,08  | 59,98  | 85,21  | 79,38  | 69,33  | 71,26      | 90,25  | 82,49  | 90,42  | 84,93  | 78,07  |
| BESİYER KONTROL                                | 100,0    | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0      | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  |
| $\pm$ Standard sapma                           |          |        |        |        |        |        |            |        |        |        |        |        |
|                                                | 24 S     | 48 S   | 72 S   | 24 S   | 48 S   | 72 S   | 24 S       | 48 S   | 72 S   | 24 S   | 48 S   | 72 S   |
| 200                                            | 0,96     | 0,160  | 0,173  | 0,612  | 0,4649 | 1,039  | 0,7851     | 0,4314 | 0,9735 | 0,7975 | 0,4186 | 0,9557 |
| 100                                            | 0,632    | 0,3955 | 0,601  | 0,560  | 1,0986 | 0,537  | 0,8016,    | 0,4281 | 0,7677 | 4,5548 | 0,1843 | 0,6034 |
| 50                                             | 0,809    | 1,427  | 0,932  | 0,511  | 0,7460 | 1,0302 | 0,962      | 0,7843 | 0,7888 | 1,2208 | 0,8201 | 0,6994 |
| 25                                             | 1,809    | 0,3704 | 0,664  | 0,865  | 1,169  | 1,334  | 0,975      | 1,0762 | 0,6884 | 1,1448 | 0,3665 | 1,0581 |
| 12,5                                           | 0,833    | 1,775  | 0,533  | 1,092  | 1,560  | 2,4329 | 3,424      | 0,4272 | 1,2443 | 1,0060 | 0,8823 | 0,4725 |
| 6,25                                           | 0,7918   | 0,3704 | 0,6874 | 1,087  | 0,7982 | 1,191  | 1,4226     | 1,7864 | 0,9730 | 0,5811 | 0,3394 | 0,7221 |
| 3,125                                          | 1,22     | 0,511  | 0,569  | 0,7683 | 1,412  | 1,308  | 2,101      | 3,4571 | 0,9805 | 1,1347 | 0,5963 | 0,5398 |
| BESİYER KONTROL                                | 0,07     | 0,01   | 0,058  | 0,036  | 0,0367 | 0,1006 | 0,064      | 0,2165 | 0,0081 | 0,0146 | 0,0218 | 0,0244 |

**Tablo 3.7.** Farklı hücre grupları 3 günlük MTT analiz sonucundaki IC<sub>50</sub> değerleri

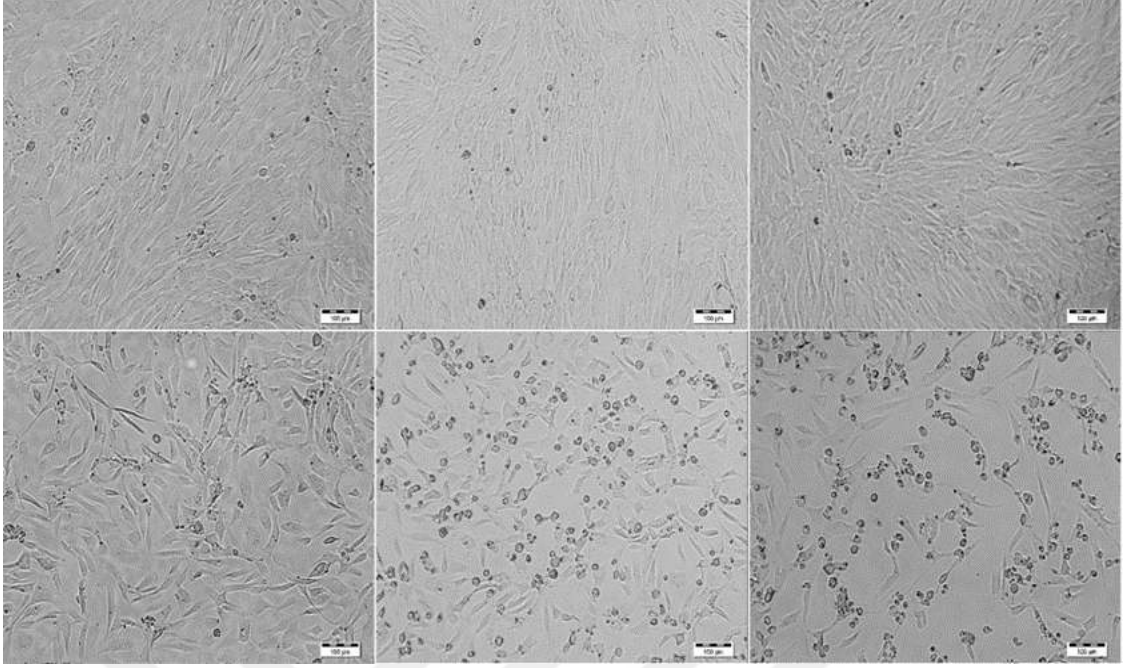
| İnkübasyon<br>süresi (saat) | IC <sub>50</sub> değerleri (µg/mL) |         |            |         |
|-----------------------------|------------------------------------|---------|------------|---------|
|                             | CCD-19Lu                           | A549    | hTERT-HPNE | Panc-1  |
| 24                          | 42,3432                            | 74,9364 | 122,7591   | 83,4521 |
| 48                          | 36,1614                            | 61,9082 | 94,9641    | 67,9866 |
| 72                          | 12,6788                            | 40,0787 | 76,1911    | 53,2751 |

Bulunan IC<sub>50</sub> değerleri incelendiğinde, bileşiğin akciğer hücreleri üzerindeki toplam etkinliğinin pankreas hücreleri üzerindeki etkinliğinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Farklı hücre hatlarının canlılık sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında, bileşiğin akciğer kanseri üzerindeki etkinliğinin pankreas kanseri üzerindeki etkinliğinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

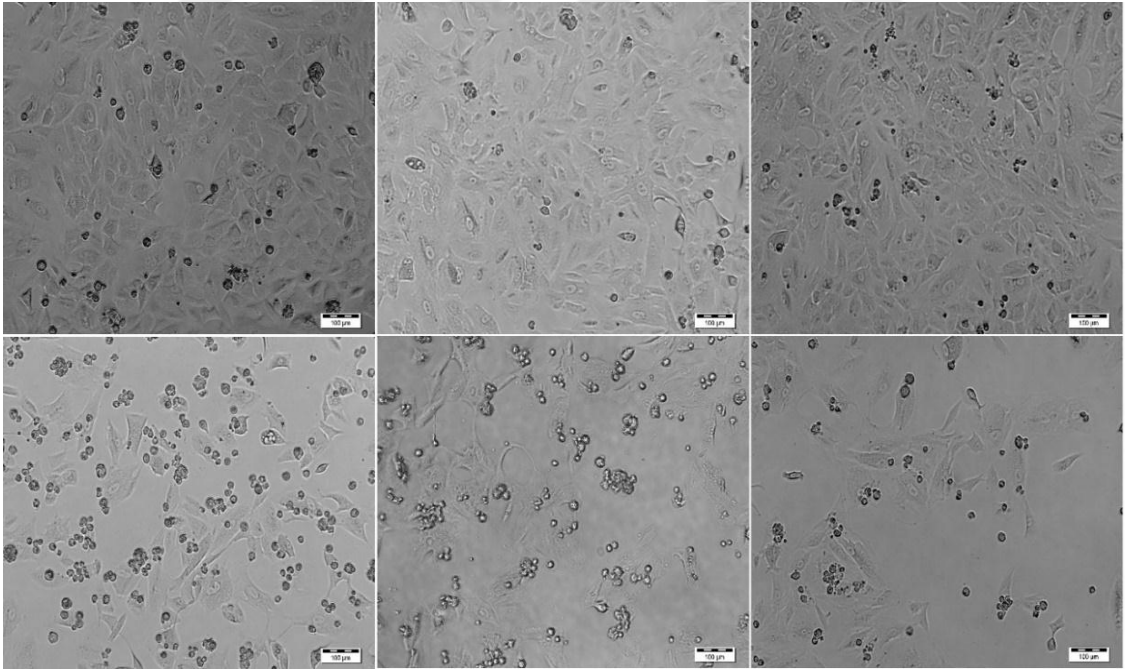
Daha sonra 100 x objektif (Olympus CKX41-SC30, Japonya) ışık mikroskobu ile 3 farklı zaman periyodunda (24-48-72 saat) deney sonrası hücrelerin (IC<sub>50</sub> değerleri) morfolojik değerlendirmesini göstermek için mikroskop görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.13-3.16).



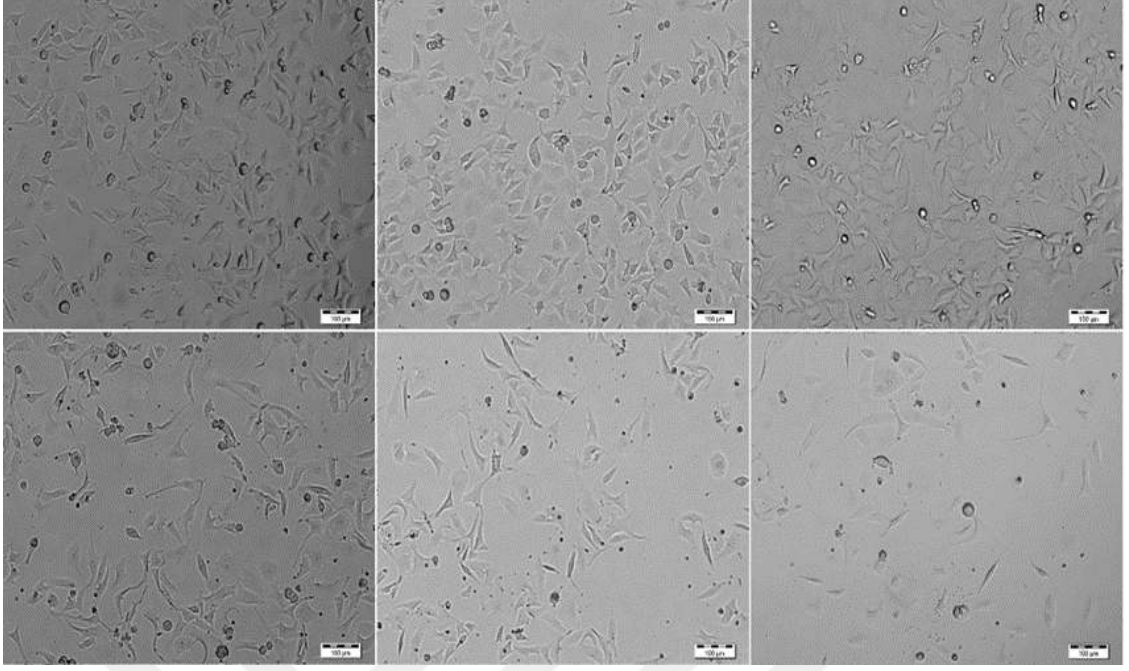
**Şekil 3.13.** CCD-19Lu hücrelerinin morfolojik değerlendirmesi. Soldan sağa 24, 48 ve 72 saatlik analiz sonuçları verilmiştir. Üst grup madde uygulanmamış hücre kontrol gruplarını, alt grup ise IC<sub>50</sub> uygulanmış hücre grupları temsil etmektedir (Olympus CKX41-SC30, Japonya mikroskop altında görüntüsü 10x)



**Şekil 3.14.** A549 hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi. Soldan sağa 24, 48 ve 72 saatlik analiz sonuçları verilmiştir. Üst grup madde uygulanmamış hücre kontrol gruplarını, alt grup ise  $IC_{50}$  uygulanmış hücre grupları temsil etmektedir (Olympus CKX41-SC30, Japonya mikroskop altında görüntüsü 10x)



**Şekil 3.15.** hTERT-HPNE hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi. Soldan sağa 24, 48 ve 72 saatlik analiz sonuçları verilmiştir. Üst grup madde uygulanmamış hücre kontrol gruplarını, alt grup ise  $IC_{50}$  uygulanmış hücre grupları temsil etmektedir (Olympus CKX41-SC30, Japonya mikroskop altında görüntüsü 10x)



**Şekil 3.16.** *Panc-1* hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi. Soldan sağa 24, 48 ve 72 saatlik analiz sonuçları verilmiştir. Üst grup madde uygulanmamış hücre kontrol gruplarını, alt grup ise  $IC_{50}$  uygulanmış hücre grupları temsil etmektedir (Olympus CKX41-SC30, Japonya mikroskop altında görüntüsü 10x)

Şekil 3.13-3.16'deki mikroskop görüntüleri değerlendirilecek olursa mikroskop altında incelenen hücrelerin kontrol gruplarının homojen bir hücre yapısı dağılımı sergilediği,  $IC_{50}$  konsantrasyonu uygulanan hücrelerin ise, vakuolizasyon, apoptotik cisimcikler, hücre büzüşmeleri vakuolizasyon ve sferoidal yapılar gibi farklı anormal morfolojik özellikler sergilediği görülmüştür.

#### 4. TARTIŞMA

Siyanobakterilere özgü C-fikosiyanin pigmenti sağlık alanında önemli bir potansiyele sahip olmakla birlikte aynı zamanda gıda sektöründe de genellikle renklendirici olarak kullanılan fonksiyonel bir doğal üründür. C-fikosiyanin antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antikanser aktivite, bağışıklık geliştirme fonksiyonu, karaciğer ve böbrek koruma gibi çeşitli klinik uygulamalarda ilaç olarak güçlü bir potansiyele sahip olduğu yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır (Manirafasha vd., 2017; Patel vd., 2018).

Siyanobakteriler C-fikosiyanin içermesine rağmen, ticari biyokütle kalitesine ve kültür koşullarına bağlı olarak üretkenlikleri sınırlıdır. Bu nedenle, C-fikosiyaninin optimum verimi ve ticarileştirilmesi için ekstraksiyon yöntemi anahtar faktördür.

Günümüzde *Arthospira plantesis* siyanobakterisi, birçok endüstriyel uygulamaya sahip önemli bir siyanobakteriyel pigment olan C-fikosiyanin için yüksek kaliteli bir protein olarak kullanılmaktadır (Eriksen, 2008). Buna yönelik son zamanlarda birçok çalışmada C-fikosiyanin *Spirulina fusiformis* (Minkova vd., 2003), *Calothrix* sp. (Santiago-Santos vd., 2004), *Anabaena marina* (Ramos vd., 2010), *S. maxima* (Rito-Palomares vd., 2001), *Nostoc muscorum* (Biswas vd., 2010), *Synechococcus* sp. (Abalde vd., 1998), *Oscillatoria quadripunctulata* (Soni vd., 2006), *Thermosynechococcus elongatus* (El-Mohsnawy ve Abu-Khudir, 2020), *Leptolyngba* sp. (Schipper vd., 2020), gibi siyanobakterilerden başarıyla ekstrakte edilmiş ve saflaştırılmıştır.

Bu çalışmada farklı ortamlardan izole edilmiş olan siyanobakteri izolatlarının C-fikosiyanin pigmenti eldesi açısından karşılaştırması yapılmıştır. Öncelikli olarak en verimli ekstraksiyon yöntemi belirlenmiş ve bu amaçla C-fikosiyanin ekstraksiyonu için en çok tercih edilen dört geleneksel yöntem olan; dondurma çözündürme, sonikasyon, lizozim ile enzimatik uygulama ve homojenizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Literatüre göre siyanobakteriyel hücre duvarını parçalamanın en yaygın yolu, biyokütleyi birden çok dondurma-çözündürme döngüsüne tabi tutmaktır (Tan vd., 2020). Fakat bu çalışmada üç kez ard arda yapılan dondurma çözündürme döngüsü diğer ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla yetersiz bulunmuştur. Bu yöntemle elde edilen en yüksek C-fikosiyanin verimi *Leptolyngbya* sp 2. ( $26,8 \pm 1,05$  mg/g) ve *Nodosilinea* sp.123 ( $26,8 \pm 0,85$  mg/g) numaralı izolatları ile olmuştur (Şekil 3.1). Bu yöntem ekonomik açıdan avantajlı olarak gözüксе de uzun bir işlemdir ve iş yükü de oldukça

fazladır. Ayrıca pigmentin raf ömrünün kısa olması ile ilgili sınırlamalarla birlikte bakteriyel kontaminasyon ve kötü kokulu bileşikler oluşturan bozulmanın başlaması gibi ek sorunlara neden olabilmektedir (Buchweitz, 2016).

Ekstraksiyon amacıyla tercih edilen enzimatik uygulama yöntemi pek çok araştırmacı tarafından denenmiştir (Boussiba ve Richmond, 1979; Devi vd., 2020; Stewart ve Farmer, 1984; Tavanandi ve Raghavarao, 2020). Elde edilen sonuçlarda izolatların pigment konsantrasyonu iyi bir verimle ( $51,6 \pm 4,4$  mg/g) sonuçlansa da bu yöntem izolatlardan fikosiyanin eldesinde saflığın azalmasına neden olmuştur. Yani dalga boyu değerlerinden hesaplanan saflık faktörü, gıda sınıfı olarak belirlenen değerden ( $<0,7$ ) daha az bulunmuştur. Bu nedenle C-fikosiyanin eldesinde bu yöntemi uygularken enzimlerin ortamdan uzaklaştırılması için başka bir ekstraksiyon basamağı daha yapılması gerekmektedir (Bermejo vd., 2014). Bir diğer yöntem olan homojenizasyon yöntemi ile yapılan ekstraksiyonda verim ve saflığın düşük kaldığı görülmüştür.

Fiziksel tekniğe dayalı son ekstraksiyon çalışmamız sonikasyon yöntemi olmuştur. Bu yöntem daha önceleri Vernet vd., 1990 ve Román vd., 2002 tarafından *Porphyridium cruentum* ve *Synechococcus* sp. izolatları üzerinde yaygın olarak kullanılmış ve mevcut C-fikosiyanin eldesi için avantajlı bir yöntem olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada ise verim, saflık ve yöntem bakımından elde ettiğimiz en iyi sonuç *Geitlerinema* sp 17 numaralı. izolat ile tespit edilmiş ve en iyi C-fikosiyanin verimi  $116 \pm 0,18$  mg/g değerinde elde edilerek optimum ekstraksiyon yöntemi olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada en iyi C-fikosiyanin verimi sağlayan sonikasyon yöntemi, ekstraksiyon süresinin kısaltması, daha etkili hücre parçalanması, verim saflık oranının yüksek olması gibi avantajları nedeniyle diğer yöntemlere göre daha cazip bir yöntem olmuştur.

Literatür çalışmaları incelendiğinde sınırlı sayıda belirlenmiş siyanobakteri izolatının yüksek miktarda C-fikosiyanin üretim yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu durumda yüksek verimli izolatların araştırılması ve tespit edilen verimli izolatların üretim koşullarında değişiklikler yapılarak C- fikosiyanin veriminin artırılmasının önemli olduğu bilinmektedir (Singh vd., 2009). Buna yönelik olarak çalışmamızın bir sonraki adımında seçilen ekstraksiyon yönteminin ardından, belirlenen izolat üzerinde ekstraksiyonu etkileyebilecek önemli parametrelerden biri olan karanlık ve aydınlık

stres koşulları, tampon çözelti, kuru ve yaş biyokütle ve sonikasyon parametrelerinde yapılan değişiklikler gibi çeşitli değişken faktörler incelenmiştir.

Fikobiliproteinlerin foton yakalamadaki baskın rolü nedeniyle, ortamdaki ışık kalitesi ve miktarındaki değişikliklere uyum sağlamak için gelişim sürecinin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu koşullar altında, özellikle fotosistem II'nin (PSII) reaksiyon merkezlerinde aşırı uyarılmış klorofil moleküllerinin birikmesi, reaktif oksijen türlerinin oluşmasına yol açabilir. Bunlar da fotosentetik aparata ve hücresel ortama ciddi şekilde zarar verebilir. Farklı çevresel koşullar, fikobilizomların ve fikobiliproteinlerin bileşimini veya üretim miktarını değiştirir. Genellikle düşük ışık yoğunlukları siyanobakterilerin fotosentez sistemini tetikler ve daha fazla pigment üretimine yol açar (Grossman vd., 1993; Juneja vd., 2013). Bununla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde *Arthronema africanum* biyokütlesindeki C-fikosiyenin içeriği, ışık-sıcaklık koşullarına bağlı olarak en düşük verim 50 ve 100  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Daha sonra yoğun büyüme için 150 ve 300  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık yoğunluklarını karşılaştırarak, 150  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'de fikobiliproteinlerin maksimum üretimi gözlemlenmiştir (Chaneva vd., 2007; Tamary vd., 2012). Çalışmamızda çeşitli karanlık aydınlık periyotlarının C-fikosiyenin verimine etkisi araştırılmıştır. Burada 150  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışıkla sabit olarak ayarlanmış, 16 saat karanlık ve 8 saat aydınlık koşulları altında *Geitlerinema* sp 17 numaralı. izolatımızdan toplam  $95,5 \pm 6,93$  mg/g C-fikosiyenin elde edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak C-fikosiyenin üretimi için 150  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en uygun koşul olarak belirlenmiş ve 16 saat karanlık periyoduyla yapılan kombinasyonun C-fikosiyenin veriminde önemli yönde etki edeceği düşünülmüştür.

Yapılan optimizasyon çalışmalarının bir diğeri ise biyokütlenin kuru ve yaş olarak ekstraksiyonudur. Deneysel çalışmalarda pigment konsantrasyonuna olan etkisi tartışılarak her iki yönteminde seçilecek olan ekstraksiyon yöntemine göre uygun olabileceği sonucuna varılmıştır (Begum vd., 2020; İlter vd., 2018). Yapılan çalışmamızda ise her iki yöntem C-fikosiyenin eldesi için uygun görülmüştür. Fakat kurutma yöntemi uzun süre gerektiren bir işlem olduğu için yaş biyokütle yöntemi tercih edilmiştir.

Ekstraksiyon adımından sonra C-fikosiyenin verimine etki eden bir diğer faktör çözücü seçimidir. Bu çalışma sürecinde seçilen tampon çözelti (0,1 M Sodyum fosfat pH-7) dışında iki farklı çözücünün etkileri araştırılmıştır. İlter vd., (2018)

çalışmalarında farklı ön işlemlere (kuru, dondurulmuş ve ıslak) ve çözücülerle (distile su, Na-Fosfat pH 7,4 süspansiyon ve %1,5 CaCl<sub>2</sub>) ekstrakte edilen *S. platensis* biyokütlesini karşılaştırırken, en yüksek toplam C-fikosiyanin içeriği (55,33 mg/g), %1,5 CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ile elde edilmiştir. Khazi'ye (2018) göre, ham ekstraktların rengi C-fikosiyanin saflığına, esas olarak da tampon ve kullanılan hücre parçalama yöntemine bağlıdır. Yaptığı çalışmada kullanılan su ve fosfat tamponu koyu yeşil ekstrakt üretirken, CaCl<sub>2</sub> de parlak mavi renkli ham ekstrakt oluşmuştur. Bu tez çalışmasında ise seçmiş olduğumuz çözücüler arasında CaCl<sub>2</sub>'nin bu yöntem için daha uygun olduğu belirlenmiştir. Bunun ana sebebi CaCl<sub>2</sub> çözeltisiyle ekstrakte edilen ham madde renginin diğer çözeltilere göre parlak mavi renge ve yüksek saflığa sahip olmasıdır. Bundan başka Demirel ve Sukatar (2019) CaCl<sub>2</sub> çözeltisinin hücre zarının kalsiyum iyonlarını kolayca emerek gözeneklerle etkileşime geçmesinden dolayı bu çözeltiyi önermiştir. Bununla birlikte Mishra vd., (2008) CaCl<sub>2</sub>'nin 4 °C'de C-fikosiyanin stabilitesine koruyucu olarak etkili olduğunu belirtmiştir. Sonuç olarak belirlediğimiz çözücü seçimi literatürde belirtilen sonuçlarla karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Sonikasyon yoğunluğu ve süresi, siyanobakterilerde hücre duvarının parçalanmasında en önemli faktördür (Benedetti vd., 2004). Burada uygulanan sonikasyon gücü ve süresi, sonikasyon yönteminin verimini etkiler. Higham vd., (2016) yaptıkları çalışmada *Spirulina platensis* süspansiyonlarından en yüksek C-fikosiyanin verimini, toplam 400 saniyelik sonikasyon sürelerinden elde etmiştir. Bununla birlikte 400 saniyeden (yaklaşık 6 dakika 40 saniye) sonra yapılan işlemlerde daha fazla pigment salınımının gerçekleşemeyeceğini ve ayrıca sonikasyonun uzun süre kullanılması durumunda elde edilen C-fikosiyanine kirlilik oluşturarak zarar verme olasılığını belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada sonikasyon güç yoğunluğunun 20-50 kHz aralığında sabitleyerek uygun bir C-fikosiyanin verimi elde edilebileceğini, ancak sonikasyon sürelerinin seçilen siyanobakteri izolatının hücre duvarının karmaşık yapısına göre uygun bir yöntem belirlemek açısından zor olduğunu belirtmiştir (Wiltshire vd., 2000). Yapmış olduğumuz son optimasyon çalışmamızda C-fikosiyanin eldesine güç ve sürenin etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Hem saflık hem de verim açısından optimal sürenin 2-6 dakika ve güç olarak da %20 amplitüd değerinin sonikasyon yöntemi için uygun olduğu görülmüştür. Bu yöntem C-fikosiyanin için kısa sürede minimum kayıp ve yüksek verim eldesi amacıyla daha avantajlıdır. Elde

edilen sonuçlara göre güç ve sürenin arttırılmasının çözücünün C-fikosiyaninle birlikte diğer kirleticilerle de etkileşime girerek C-fikosiyaninin saflık ve veriminde bir düşüşe neden olabileceği düşünülmüştür. Bu durum da yapmış olduğumuz çalışma diğer çalışmalarla benzerlik göstererek çıkan sonuçların doğruluğunu desteklemektedir.

C-fikosiyanin eldesinde ekstraksiyon adımından sonra en önemli prosedürlerden bir diğeri de saflaştırılma basamağıdır. Burada seçmiş olduğumuz optimizasyon çalışmalarından elde ettiğimiz C-fikosiyanin iki adımda saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat çöktürme (%50 ve %75 doygunlukta) ve diyalizin ardından %60,19 oranında geri kazanımla 2,79 saflık elde edilmiştir. Bu sonuç endüstriyel olarak kozmetik ürünlerde renklendirici olarak kullanım için kabul edilebilir bir saflık düzeyidir. Amonyum sülfat çöktürme işlemi istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılmasında ve aynı zamanda C-fikosiyaninin konsantrasyonunda yararlı olmuştur. Ancak bu yöntemin dezavantajı uzun bir işlem gerektirdiği için daha alternatif saflaştırma tekniklerinin tasarlanması gerektiği düşünülmüştür.

Bir sonraki adımda saf bir C-fikosiyanin protein pigmenti elde etmek için iyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. Burada kullanılan reçinelerde süre ve verim açısından önemli farklılık oluşmuştur. Zayıf anyonik reçine olan DEAE-selülozla yapılan işlemde ortalama bir buçuk saat sürede %38 geri dönüşümle 22,23 mg/g saf C-fikosiyanin elde edilmişken, Q- sefaroz ile daha uzun sürede (ortalama 3-4 saat) %48,9 geri dönüşüm ile 28,02 mg/g elde edilmiştir. Bu durumun proteinde bulunan iyonik yüklerin kolondaki reçineye çok güçlü bir şekilde adsorbe edilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Chakdar vd., (2014) yaptıkları çalışmada *Anabaena variabilis* CCC421 izolatından elde edilen C-fikosiyanini amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile kombine ederek saflığını 2,75 olarak tespit etmişler, ancak bu yöntem reaktif veya analitik dereceli saflık standartlarını karşılamamıştır.

Son saflaştırma aşamasında elde ettiğimiz saflık oranı (Tablo 3.3) literatürdeki benzer çalışmalar ile paralellik göstermiştir (Abalde vd., 1998; Patil vd., 2006; Seo vd., 2013). C-fikosiyaninin konsantrasyonu ve saflığında çok önemli olan UV-vis görünür spektrumunda her saflaştırma adımında elüe edilen bütün tüplerin analizi yapılmış ve 620 nm'de belirgin bir tepe noktası elde edilmiştir (Şekil 3.5). Ardından yüksek saflıkla sonuçlanan örneklerin SDS-PAGE yöntemiyle karakterizasyonu yapılmıştır. C-fikosiyanin  $\alpha$ -alt birimi (17 kDa) ve  $\beta$ -alt birimlerinde (19 kDa)

gözlemlenen tekli bantlarının mevcudiyeti saf C-fikosiyanin elde edildiğini doğrulanmıştır (Şekil 3.7). Çalışmamızda *Geitlerinema* sp. 17 numaralı izolatından elde edilen SDS-PAGE jelindeki C-fikosiyanin bantlarının doğruluğu Hazra ve Kesh (2017) ve Minkova vd., (2003) çalışmaları ile desteklenmiştir. Bir başka çalışmada *Geitlerinema* sp. H8DM izolatından elde edilen C-fikosiyanin  $\alpha$  biriminin yaklaşık olarak 17,5 kDa ve  $\beta$  alt biriminin 18,1 kDa sahip olduğunu bildirilmiş, bu da elde edilen sonuçların doğruluğunu desteklemektedir (Patel vd., 2018).

Her siyanobakteri türü farklı karakteristik özellikler ve yetenekler sergiler bu da onların içeriğindeki ikinci metabolit ürünlerine doğrudan etki eder. Çalışmada seçmiş olduğumuz *Geitlerinema* sp. izolatı termal kaplıcalarda geliştiği için yüksek sıcaklarda dayanıklılık özellikleri sergiler. dolayısıyla, bu izolattan elde ettiğimiz C-fikosiyanininde aynı koşullarda uyum sağlayabileceği düşünülmüştür. Samsonoff ve MacColl, (2001) Termofilik siyanobakterilerin C-fikosiyaninlerinin, mezofilik organizmalara göre yüksek ısılarda termal denatürasyona karşı direnç göstermesi açısından avantajlı olduğunu belirtmişler. Hattori vd., 1965 ve Berns, 1963 yapmış oldukları çalışmalarda *S. lividus* termal kaynaklı C-fikosiyaninin 66 °C'de denatüre olduğunu, mezofilik C-fikosiyaninin ise 49-51 °C'de denatüre olduğu bildirilmiştir (Hattori vd., 1965; Berns, 1963). Mevcut çalışmamızda termofilik *Geitlerinema* sp.'den elde edilmiş kısmi saf C-fikosiyaninin termal stabilitesi araştırılmış ve 60 °C ye kadar olan ısı işlemlerde stabil kalabildiği gözlenmiştir. 70 °C-80 °C arasındaki sıcaklık aralığında spekturum yoğunluğunda oluşan denatürasyon durumu çok net gözlemlenmiştir (Şekil 3.9). Stabilitate üzerine yapılan çalışmada elde edilen bulgular Chaiklahan vd., (2012), Munawaroh vd., (2018), Sukhinov vd., (2021) bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

İnsan sağlığı ve çevre ile ilgili artan farkındalık doğal bileşikleri oldukça popüler bir konu haline getirmiştir. Bu sebeple daha düşük çevresel etkilere sahip alternatif kaynakların biyolojik aktiviteleri araştırılmaya başlanmıştır. Denizsel ortamların en önemli kaynağı olan siyanobakterilerden izole edilen C-fikosiyanin, yüksek verimlilik ve düşük toksisite özelliklerinden dolayı çoğu araştırmacıların ilgi odağı olmayı başarmıştır. Bu doğal mavi pigmentin sadece renkli olmasıyla değil içeriğindeki hidroksil altgruplarının varlığı ve serbest radikalleri temizlemelerini sağlayan aromatik yapıları nedeniyle antioksidanlar olarak önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. Herhangi bir proteinin antioksidan aktivitesi, onu oluşturan amino asit kalıntılarının

antioksidan aktivitesinin toplamıdır (Sonani vd., 2017). Negatif yüklü amino asitlerin (yani Glutamin ve Asparagin) antioksidan yapıya sahip olduğu bilinmektedir (Elias vd., 2008). Araştırmalara göre termofil izolatdan elde edilen C-fikosiyaninin birleşik glutamik asit ve glutamin içeriğinin çoğu mezofilik türden farklı olduğu bilinmektedir (Kao vd., 1976). Bu bakımdan çalışmamızda kullanılan termofilik *Geitlerinema* sp. izotundan elde edilen C-fikosiyaninin antioksidan özelliği olabileceği düşünülerek DPPH• (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) serbest radikali üzerindeki inhibisyon (%) değeri, standart askorbik asitle karşılaştırılmış ve elde edilen değerler IC<sub>50</sub> olarak kıyaslanmıştır. Elde edilen bulgulara hesaplanan % inhibisyon ve IC<sub>50</sub> değerleri göz önüne alındığında askorbik asitin C-fikosiyanin özütünden daha kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. C-fikosiyaninin IC<sub>50</sub> değeri 0,57±0,01 mg/mL olarak bulunmuştur. Bu değer askorbik asite göre daha az olsa da (0,245±0,08 mg/mL), doğal kaynaklı mavi pigmentin spesifik bir antioksidan kaynağı olabileceği de anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda C-fikosiyanin eldesi ve saflaştırma, optimizasyon ve karakterizasyon basamaklarından sonra biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla elde ettiğimiz C-fikosiyaninin antioksidan, antibakteriyel ve bazı kanser hücreleri üzerindeki aktivitesi incelenmiştir.

Elde edilen C-fikosiyanin özütünün en yüksek antioksidan aktivitesi *Geitlerinema* sp. 17 numaralı izolat ile 500 µg/mL konsantrasyonda yaklaşık %43,55'lik DPPH• süpürme aktivitesi olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında elde edilen aktivitenin daha az olduğu anlaşılmaktadır. Örneğin *Geitlerinema* sp. TRV57 izolatından elde edilen C-fikosiyanin, 200 µg/mL konsantrasyonda, % 78,75 temizleme aktivitesine (DPPH• testi) veya %95,27'ye kadar hidrojen peroksit radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Renugadevi vd., 2018).

Bir başka çalışmada, *Geitlerinema* sp. H8DM izolatından elde edilen C-fikosiyanin yüksek saflıkta 200 µg/mL 'lik konsantrasyonda DPPH• süpürücü aktivite oranı %72,85±2,1'lik aktivite gösterirken, askorbik asitin ise 200 µg/mL 'de %99,82±1,9 olarak bulunmuştur (Patel vd., 2018).

Sonuç olarak her biri farklı mekanizmalar ve farklı bulgulara sahip, redoks potansiyelleri, pH değerleri, saflık oranları ve solvent bağımlılıklarını temsil eden farklı protokoller uygulanabileceğinden, antioksidan aktivite ile ilgili sonuçların

karşılaştırmasının zor olduğunu belirtmekte yarar vardır. Ayrıca, aynı yöntemler içinde, sonuçların ifade edilmesi için kullanılan birimlerde (örneğin, süpürme aktivitesinin %'si, IC<sub>50</sub> değeri veya Trolox eşdeğeri birimler) bir tutarsızlık vardır ve bu, çalışmalar arasında uygun bir şekilde karşılaştırmaların yapılmasında büyük ölçüde engel oluşturmaktadır.

Günümüzde yeni antibiyotiklerin keşfi şu anda önemli bir araştırma alanıdır ve doğal ürünler, yeni ilaç moleküllerinin tercih edilen kaynakları olmuştur. Mikroorganizmalar ve bitkiler bu anlamda ilgi odağı olmuştur. Siyanobakterilerinde C-fikosiyanin gibi antimikrobiyal bileşikler üretmesi buna örnek verilebilir. *Anabaena* sp.'den elde edilen C-fikosiyaninin agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle *Klebsiella* sp., *E. coli*, *S. aureus* ve *B. cereus* türleri üzerine antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. *S. aureus* üzerine gösterilen etkinin diğer izolatlardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Salama vd., 2015). *Oscillatoria* sp.'den elde edilen kısmi saf C-fikosiyanin *Pseudomonas* sp., *S. aureus* ve *Klebsiella* sp. karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Shanmugam vd., 2017). Murugan, (2012) *Westiellopsis* sp. siyanobakteri izolatından elde edilen C-fikosiyaninin, disk difüzyon yöntemi kullanılarak *B. subtilis*, *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* türleri için antibakteriyel aktiviteleri açısından test edilmiştir. Çalışma sonucunda dört bakteri izolatından *P. aeruginosa*, bu çalışmada kullanılan C-fikosiyanin konsantrasyonlarında hiçbir inhibisyon belirtisi saptanmamıştır. Ancak 50 µg/disk konsantrasyonda *S. aureus* ile elde edilen maksimum inhibisyon bölgesi 14 mm, *Klebsiella pneumoniae* ise 13 mm olarak belirlenmiştir. Safari vd., (2020) çalışmasında C-fikosiyaninin üç gram pozitif bakteri olan *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *S. iniae* ve ayrıca gram negatif olarak *Y. ruckeri* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivitesini incelenmiştir. Kullanılan bakteri suşları farklı sonuçlar göstermiş ve C-fikosiyaninin konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibisyon zonunun çapı artmıştır. Çalışma özetinde 25 µg/mL konsantrasyonlarda kullanılan bütün bakterilerde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Çalışmamızda ise C-fikosiyanin özütü 50–12,5 µg konsantrasyon aralığında *M. luteus* NRRL B-4375'e karşı sırasıyla 15 ve 10 mm'lik inhibisyon zonu göstermiştir (Tablo 3.5). Mayalardan *C. krusei* ATCC 90028'ye karşı en yüksek antimikrobiyal aktivite sergileyerek 50–12,5 µg'lık konsantrasyonlar için sırasıyla 18 ve 14 mm'lik inhibisyonlar elde edilmiştir. Bu mikroorganizmalara kıyasla daha düşük antimikrobiyal aktivite gözlenen izolatlar *E. coli* ATCC 25922 (50 µg için 9 mm) ve *C. glabrata* ATCC

90030 (50 µg için 12 mm) olmuştur. Elde edilen C-fikosiyaninin 12,5 µg konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir. Genel olarak C-fikosiyanin pigmenti minimum 25 µg konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite sergileme potansiyeli göstermiştir. Bu durumda kullanılan C-fikosiyaninin konsantrasyon artışına bağlı olarak daha yüksek miktarlarda diğer patojen bakteri türlerine de antimikrobiyal etki gösterebileceğine dair varsayımda bulunabilir.

Bu bulgular eşliğinde preparatif bir saflık düzeyinde ( $A_{620}/A_{280} < 2,7$ ) olan C-fikosiyanin ekstraktları 25 µg konsantrasyonda diğer çalışmaların sonuçlarına göre iyi aktivite göstermiş olsa da standart antibiyotiklere göre aktivite daha az olmuştur.

C-fikosiyaninin diğer eşsiz özelliklerinden biri de tümör hücrelerinde hücre canlılığını inhibe ederek, normal hücre hattı üzerinde çok az toksik etkiye sahip olmasıdır (Jiang vd., 2017). C-fikosiyanin *in vivo* çalışmalarda yüksek konsantrasyonlarda bile normal dokudan kaynaklanan hücreler üzerinde neredeyse hiç proliferatif etki göstermemekle birlikte, toksik etkileri tespit edilmemiştir (Remirez vd., 2002; Liu vd., 2016). Kısaca özetlemek gerekirse, bu pigmentin kanser hücreleri için toksik olup, normal hücreler için toksik olmaması durumu antikanser ajan olarak büyük bir avantaj sağlamaktadır (Jiang vd., 2017; Ravi vd., 2015).

Czerwonka vd., (2018) çalışmasında A549 hücreleri üzerinde 24 saatte test edilen fikosiyanin ekstraktının  $IC_{50}$  değerini 99,2 µg/mL olarak bulmuştur. Çalışmamızda ise A549 hücre hattında 24 saat muamele sonucu 74,9 µg/mL, 72 saatte ise 40 µg/mL konsantrasyonda sitotoksik etki belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan bir diğer çalışmada 72 saat 10 µM varlığında, PANC-1 hücre morfolojilerinde tümörjenik potansiyele engel olduğu tespit edilmiştir (Liao vd., 2016).

Abu Zaid vd., (2015) *Spirulina* sp.'nin sulu C-fikosiyanin ekstraktından, HCT116 kolon karsinomu ve HEPG2 hepatoselüler karsinoma üzerine yaptıkları çalışmada sırasıyla  $IC_{50}$  değerini 18,8 µg/mL ve 22,3 µg/mL olarak bulmuşlardır. Bir başka çalışmada, Kasumi-1 insan akut lösemi ve K-562 kronik miyeloid lösemiye karşı sitotoksik aktivite sergileyerek  $IC_{50}$  değeri sırasıyla 2,13 mg/mL ve 12,68 mg/mL olmuştur (Hernandez vd., 2017).

Çalışmamızda hücreler 3 günlük inkübasyon periyodunda farklı konsantrasyonlarla muamele edildiğinde ortaya çıkan sonuçlardan test numunesinin konsantrasyon artışı ve inkübasyon süresine bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Test numunesi antikanser etkinlik açısından

değerlendirildiğinde, akciğer kanser hücrelerine etkisinin pankreas kanser hücrelerine etkisine kıyasla daha fazla olduğu, ancak normal akciğer hücreleri üzerinde de proliferasyonu azaltıcı etkinlik gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu sebeple güvenlik profili için uygun olmadığı düşünülmüştür (Tablo 3.7). Yani saf C-fikosiyanin 40 µg/mL konsantrasyonda A549 akciğer kanseri hücresinde anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkiler gösterirken bu değerler CCD19Lu sağlıklı hücrelerde 12,7 µg/mL bulunarak daha fazla hücre apoptozuna sebep olmuştur. Pankreas kanser hücrelerinde (Panc-1) ise bu durumun aksi olduğu için antikanser aktivite gösterebileceği düşünülmüştür. Ayrıca C-fikosiyaninin Panc-1 hücreleri üzerindeki büyüme önleyici etkisi zamana bağlı olarak değişmiş ve zaman geçtikçe daha güçlü hale gelmiştir. Çalışmamızda 24 saatte 83,5 µg/mL, 48 saatte 67,9 µg/mL ve 72 saatte 53 µg/mL C-fikosiyanin varlığında, Panc-1 hücreleri antikanser aktivitesi sergilemiştir (Tablo 3.7).

Sonuç olarak pankreatik hücrelerde test numunesi aynı konsantrasyonlarda verildiğinde normal hücrelerde hasarı daha az olacağından güvenli profil oluşturarak antikanser etkinlik gösterebileceği düşünülmüştür. Akut yaralanmalarda akciğer ve pankreas hücreleri düşünüldüğünde her iki hücrenin harabiyetinde pankreas hücrelerinin kendini tek başına daha kolay onarabildiği ancak alveolar mekanizmaların daha kompleks bir sistemle çalıştığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen antikanser aktivite sonuçları son zamanlarda yayınlanan çalışmalarla karşılaştırıldığında umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Konsantrasyon, maruz kalma süresi ve C-fikosiyaninin saflığı antikanser aktivite çalışmalarında önemli hususlardır. Bu detaylar, yapılan deneysel çalışmalar arasında büyük farklılıklar gösterse de sonuç olarak tümör hücre döngüsünü bloke edip, tümör hücresi apoptozunu/nekrozunu ve otofajiyi indükleyerek çok düşük miktarlarda (µg/mL) antikanser aktivitesi göstermektedir (Liao vd., 2016). Bir diğer hipoteze göre C-fikosiyaninin biyolojik aktivitesinin türe özgüllüğü söz konusudur. Ekstraktın kaynağı (yani türler), C-fikosiyaninin biyolojik aktiviteleri için dikkate değer bir kısıtlamadır. Böyle bir durumda, C-fikosiyanin üretiminde türlerin seçimi son derece önemlidir, çünkü bu doğrudan mevcut çalışılmakta olan herhangi bir biyolojik aktivite testinin kalitesini ve başarısını belirleyen en önemli faktördür.

Bu çalışmada C-fikosiyanin üretebilme potansiyeli araştırılan siyanobakteriler Türkiye'ye özgü olması açısından yenidir. Bu nedenle, çalışma sırasında üretilen veriler, biyoteknoloji ve diğer ilgili endüstriler için bir kaynak olarak siyanobakteriler

hakkındaki bilgilerimizi zenginleştirmeye katkıda bulunabilir. Bu çalışmada en yüksek pigment üreten başta termal kaplıcadan izole edilmiş *Geitlerinema* sp. 17 numaralı izolat olmakla, diğer izolatlarda (*Leptolyngbya norvegica* 141, *Nodosilinea* sp., 123, *Phormidium lumbricale* 253, *Leptolyngbya* sp. 2) azalan miktarlarda C-fikosiyanin pigmenti bulunmuştur. Burada gözlemlenen sonuç, değişik C-fikosiyanin konsantrasyonları her izolat için belirlenen farklı tampon veya yöntem kombinasyonlarının eksikliğinden kaynaklanabileceğidir. *Geitlerinema* sp. 17 numaralı izolatından elde edilen C-fikosiyaninin ekstraksiyon, saflaştırma, karakterizasyon adımlarında basit ve kayda değer olumlu sonuçlar elde edilerek C-fikosiyanin araştırmaları üzerine etkili olabilecek öneriler sunulmuştur. Ayrıca, C-fikosiyanin 60 °C ye kadar yapı konformasyonunu koruyabildiğini kanıtlanmıştır.

Çalışmanın devamında C-fikosiyanin eldesinde önemli bir alternatif kaynak olan *Geitlerinema* sp. 17 numaralı izolatında kapsamlı biyolojik aktivite çalışmaları yapılarak olumlu sonuçlar elde edilmiştir. C-fikosiyanin “kaynak antioksidan” olarak nitelendirilebilir. Bu izolatla daha önce yapılmış antioksidan aktivite çalışmaları varsa da antimikrobiyal ve antikanser aktivite çalışmaları bulunmamaktadır. Böyle bir çalışmanın yapılması C-fikosiyanin üretimiyle ilgili literatüre katkı sağlayacaktır. Fakat yine de C-fikosiyanin içeriğindeki kimyasal bileşimler ve onların oluşturduğu sinerjik etkileşimler hala gizemini korumaktadır. Bu nedenle C-fikosiyanin pigmentinin sadece mavi bir özüt olmadığı, yapılan biyolojik aktive sonuçlarının bu hipotezi doğruladığı görülmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda *Geitlerinema* sp. 17 numaralı izolatından elde edilen termostabil C-fikosiyanin pigmentinin kapsamlı araştırmalar sonucu, her saflık faktörüne göre gıda takviyesi, reaktif analizler, farmasötik, çeşitli endüstriyel ve sağlık alanlarında kullanılabilecek önemli alternatif doğal bir kaynak olduğu ortaya konmuştur.

## KAYNAKÇA

- 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*, 136(1), 109-120.
- Abdel-Shafi, S., Al-Mohammadi, A. R., Sitohy, M., Mosa, B., Ismaiel, A., Enan, G. and Osman, A. (2019). Antimicrobial activity and chemical constitution of the crude, phenolic-rich extracts of *Hibiscus sabdariffa*, *Brassica oleracea* and *Beta vulgaris*. *Molecules*, 24(23), 4280.
- Abed, R. M., Dobretsov, S. and Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1-12.
- Abelson, J.N. and Simon, M.I. (1988). *Methods Enzymol.*, Academic Press, San Diego, California.
- Abu Zaid, A. A., Hammad, D. M. and Sharaf, E. M. (2015). Antioxidant and anticancer activity of *Spirulina platensis* water extracts. *International Journal of Pharmacology*, 11(7), 846-851.
- Adir, N. (2005). Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynthesis Research*, 85(1), 15-32.
- Adir, N., Dines, M., Klartag, M., McGregor, A. and Melamed-Frank, M. (2006). Assembly and disassembly of phycobilisomes. *Complex Intracellular Structures in Prokaryotes*, 47-77.
- Adir, N., Dobrovetsky, Y. and Lerner, N. (2001). Structure of C-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 Å: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly. *Journal of Molecular Biology*, 313(1), 71-81.
- Adir, N., Vainer, R. and Lerner, N. (2002). Refined structure of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 1.6 Å: insights into the role of solvent molecules in thermal stability and co-factor structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1556(2-3), 168-174.
- Adnan, M., Oh, K. K., Azad, M. O. K., Shin, M. H., Wang, M. H. and Cho, D. H. (2020). Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and seed as a potential source of the bioactive compounds: effects of various extraction solvents on biological properties. *Life*, 10(10), 223.

- Akoğlu, A. (2012). *Siyanobakteriden Elde Edilen Fikosiyaninin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- Antecka, A., Klepacz-Smółka, A., Szeląg, R., Pietrzyk, D. and Ledakowicz, S. (2022). Comparison of three methods for thermostable C-phyocyanin separation and purification. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 171, 108563.
- Arteni, A. A., Ajlani, G. and Boekema, E. J. (2009). Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(4), 272-279.
- Bastien, C., Cardin, R., Veilleux, É., Deblois, C., Warren, A. and Laurion, I. (2011). Performance evaluation of phycocyanin probes for the monitoring of cyanobacteria. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(1), 110-118.
- Bauer, A. W. M. M., Kirby, W. M. M. and Sherris, J. C. T. (1966). turck, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493.
- Bechelli, J., Coppage, M., Rosell, K. and Liesveld, J. (2011). Cytotoxicity of algae extracts on normal and malignant cells. *Leukemia Research and Treatment*, 2011.
- Begum, H., Khatoon, H., Yusoff, F. M. and Shariff, M. (2020). Production and purity of phycobiliproteins from selected marine and freshwater cyanobacteria subjected to different drying methods. *Asian Fish. Science*, 33, 258-265.
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Scoglio, S. and Canestrari, F. (2010). Oxygen radical absorbance capacity of phycocyanin and phycocyanobilin from the food supplement *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Medicinal Food*, 13(1), 223-227.
- Benedetti, S., Rinalducci, S., Benvenuti, F., Francogli, S., Pagliarani, S., Giorgi, L., ... and Canestrari, F. (2006). Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Chromatography B*, 833(1), 12-18.
- Bennett, A., and Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology*, 58(2), 419-435.

- Bermejo, R. (2014). Phycocyanins. *Cyanobacteria: An Economic Perspective*, 209-225.
- Bermejo, R., Acien, 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 Chromatography B*, 790(1-2), 317-325.
- Bermejo, R., Talavera, E. M. and Orte, J. C. (1997). Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina platensis* high-performance liquid chromatographic separation of their  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. *Journal of Chromatography A*, 778(1-2), 441-450.
- Berns, D. S. and MacColl, R. (1989). Phycocyanin in physical chemical studies. *Chemical Reviews*, 89(4), 807-825.
- Bhat, V. B. and Madyastha, K. M. (2001). Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2), 262-266.
- Bhuvaneswari, G. R., Shukla, S. P., Makesh, M., Thirumalaiselvan, S., Sudhagar, S. A., Kothari, D. C. and Singh, A. (2013). Antibacterial Activity of *Spirulina* (*Arthospira platensis* Geitler) against Bacterial Pathogens in Aquaculture. *Israeli J. of Aquaculture-Bamidgeh*, 65, 1-8.
- Bingula, R., Dupuis, C., Pichon, C., Berthon, J. Y., Filaire, M., Pigeon, L. and Filaire, E. (2016). Study of the effects of betaine and/or C-phycoerythrin on the growth of lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. *Journal of Oncology*, 2016.
- Biswas, S., Pankaj, P. P., Seth, R. K. and Mallick, N. (2010). Isolation and purification of C-Phycocyanin from *Nostoc Muscorum* (Cyanophyceae and cyanobacteria) exhibits antimalarial activity in vitro. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 1(2), 86-91.
- Boussiba, S. and Richmond, A. E. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 120(2), 155-159.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

- Braune, S., Krüger-Genge, A., Kammerer, S., Jung, F. and Küpper, J. H. (2021). Phycocyanin from *Arthrospira platensis* as potential anti-cancer drug: Review of in vitro and in vivo studies. *Life*, 11(2), 91.
- Bryant, D. A., Glazer, A. N. and Eiserling, F. A. (1976). Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. *Archives of Microbiology*, 110(1), 61-75.
- Bryant, D. A., Guglielmi, G., de Marsac, N. T., Castets, A. M. and Cohen-Bazire, G. (1979). The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology*, 123(2), 113-127.
- Bryant, D. A., Stirewalt, V. L., Glauser, M., Frank, G., Sidler, W. and Zuber, H. (1991). A small multigene family encodes the rod-core linker polypeptides of *Anabaena* sp. PCC7120 phycobilisomes. *Gene*, 107(1), 91-99.
- Buchweitz, M. (2016). Natural solutions for blue colors in food. In *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverage* (pp. 355-384). Woodhead Publishing.
- Capanoglu, E., Kamiloglu, S., Ozkan, G. and Apak, R. (2018). Evaluation of antioxidant activity/capacity measurement methods for food products. *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*, 273-286.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N. and Bunnag, B. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp. Influence of temperature, pH, and preservatives. *Process Biochemistry*, 47(4), 659-664.
- Chakdar, H., and Pabbi, S. (2017). Algal pigments for human health and cosmeceuticals. In *Algal green chemistry* (pp. 171-188). Elsevier.
- Chakdar, H., Saha, S. and Pabbi, S. (2014). Chromatographic and spectroscopic characterization of phycocyanin and its subunits purified from *Anabaena variabilis* CCC421. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50(1), 62-68.
- Chaneva, G., Furnadzhieva, S., Minkova, K. and Lukavsky, J. (2007). Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthrospira africanum*-a prospective phycobiliprotein-producing strain. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 537-544.
- Chen, H., Qi, H. and Xiong, P. (2022). Phycobiliproteins—A Family of Algae-Derived Biliproteins: Productions, Characterization and Pharmaceutical Potentials. *Marine Drugs*, 20(7), 450.

- Chen, M., Schliep, M., Willows, R. D., Cai, Z. L., Neilan, B. A. and Scheer, H. (2010). A red-shifted chlorophyll. *Science*, 329(5997), 1318-1319.
- Chen, T., Wong, Y. S. and Zheng, W. (2006). Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. *Phytochemistry*, 67(22), 2424-2430.
- Cherdkiatikul, T. and Suwanwong, Y. (2014). Production of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of *Spirulina* allophycocyanin and C-phycocyanin in *Escherichia coli*: A comparative study of their antioxidant activities. *Journal of Biomolecular Screening*, 19(6), 959-965.
- Chittapun, S., Jonjaroen, V., Khumrangsee, K. and Charoenrat, T. (2020). C-phycocyanin extraction from two freshwater cyanobacteria by freeze thaw and pulsed electric field techniques to improve extraction efficiency and purity. *Algal Research*, 46, 101789.
- Clarke, S. C. (2004). Collins and Lyne's Microbiological Methods. *British Journal of Biomedical Science*, 61(2), 113.
- Contreras-Guzmán, E. S. and Strong III, F. C. (1982). Determination of tocopherols (vitamin E) by reduction of cupric ion. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 65(5), 1215-1221.
- Contreras-Martel, C., Matamala, A., Bruna, C., Poo-Caamaño, G., Almonacid, D., Figueroa, M. 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*, 125(2-3), 388-396.
- Cragg, G. M., Grothaus, P. G. and Newman, D. J. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews*, 109(7), 3012-3043.
- Czerwonka, A., Kaławaj, K., Sławińska-Brych, A., Lemieszek, M. K., Bartnik, M., Wojtanowski, K. K., ... and Rzeski, W. (2018). Anticancer effect of the water extract of a commercial *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) product on the human lung cancer A549 cell line. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106, 292-302.
- Dasgupta, C. N. (2015). Algae as a source of phycocyanin and other industrially important pigments. In *Algal Biorefinery: an Integrated Approach* (pp. 253-276). Springer, Cham.

- Dashtiannasab, A., Kakoolaki, S., Sharif Rohani, M. and Yeganeh, V. (2012). In vitro effects of *Sargassum latifolium* (Agardeh, 1948) against selected bacterial pathogens of shrimp.
- de Amarante, M. C. A., Braga, A. R. C., Sala, L., and Kalil, S. J. (2020). Colour stability and antioxidant activity of C-phyococyanin-added ice creams after in vitro digestion. *Food Research International*, 137, 109602.
- de Moraes, M. G., da Fontoura Prates, D., Moreira, J. B., Duarte, J. H. and Costa, J. A. V. (2018). Phycocyanin from microalgae: properties, extraction, and purification, with some recent applications. *Industrial Biotechnology*, 14(1), 30-37.
- Debreczeny, M. P., Sauer, K., Zhou, J. and Bryant, D. A. (1993). Monomeric C-phyococyanin at room temperature and 77 K: resolution of the absorption and fluorescence spectra of the individual chromophores and the energy-transfer rate constants. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(38), 9852-9862.
- Debreczeny, M. P., Sauer, K., Zhou, J. and Bryant, D. A. (1995). Comparison of calculated and experimentally resolved rate constants for excitation energy transfer in C-phyococyanin. 2. Trimers. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(20), 8420-8431.
- del Rio-Chanona, E. A., Zhang, D. and Vassiliadis, V. S. (2016). Model-based real-time optimisation of a fed-batch cyanobacterial hydrogen production process using economic model predictive control strategy. *Chemical Engineering Science*, 142, 289-298.
- Demay, J., Bernard, C., Reinhardt, A. and Marie, B. (2019). Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. *Marine Drugs*, 17(6), 320.
- Demidov, A. A. and Mimuro, M. (1995). Deconvolution of C-phyococyanin beta-84 and beta-155 chromophore absorption and fluorescence spectra of cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Biophysical Journal*, 68(4), 1500-1506.
- Demirel, Z., and Sukatar, A. (2019). Purification of phycocyanin from isolated and identified hot spring cyanobacteria.
- Demirel, Z., Imamoglu, E., and Conk Dalay, M. (2015). Fatty acid profile and lipid content of *Cylindrotheca closterium* cultivated in air- lift photobioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(12), 2290-2296.

- Demirel, Z., Yilmaz-Koz, F. F., Karabay-Yavasoglu, U. N., Ozdemir, G. and Sukatar, A. (2009). Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(6), 619-628.
- Deniz, I., Ozen, M. O. and Yesil-Celiktas, O. (2016). Supercritical fluid extraction of phycocyanin and investigation of cytotoxicity on human lung cancer cells. *The Journal of Supercritical Fluids*, 108, 13-18.
- Desmorieux, H. and Decaen, N. (2005). Convective drying of spirulina in thin layer. *Journal of Food Engineering*, 66(4), 497-503.
- Devi, A. C., Tavanandi, H. A., Govindaraju, K. and Raghavarao, K. S. M. S. (2020). An effective method for extraction of high purity phycocyanins (C-PC and A-PC) from dry biomass of *Arthrospira maxima* *Journal of Applied Phycology*, 32(2), 1141-1151.
- Dikshit, R. and Tallapragada, P. (2018). Comparative study of natural and artificial flavoring agents and dyes. In *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes* (pp. 83-111). Academic Press.
- Dillon, J. C., Phuc, A. P. and Dubacq, J. P. (1995). Nutritional value of the alga *Spirulina*. *Plants in Human Nutrition*, 77, 32-46.
- Doke, J. M. (2005). An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from *Spirulina* sp. *International Journal of Food Engineering*, 1(5).
- Duan, H., Zhang, Y., Zhang, B., Song, K. and Wang, Z. (2007). Assessment of chlorophyll-a concentration and trophic state for Lake Chagan using Landsat TM and field spectral data. *Environmental Monitoring and Assessment*, 129(1), 295-308.
- Duerring, M., Schmidt, G. B. and Huber, R. (1991). Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycocyanin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 217(3), 577-592.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C. 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 and Technology*, 16(9), 389-406.

- Edwards, M. R., MacColl, R. and Eisele, L. E. (1996). Some physical properties of an unusual C-phyocyanin isolated from a photosynthetic thermophile. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1276(1), 64-70.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S. and Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430-441.
- El-Mohsnawy, E. and Abu-Khudir, R. (2020). A highly purified C-phyocyanin from thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* and its cytotoxic activity assessment using an in vitro cell-based approach. *Journal of Taibah University for Science*, 14(1), 1218-1225.
- Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64(08), 711-713.
- Eriksen, N. T. (2008). Production of phyocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods, and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), 1-14.
- Fay, P. (1965). Heterotrophy and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii*. *Microbiology*, 39(1), 11-20.
- Figueira, F. D. S., Moraes, C. C. and Kalil, S. J. (2018). C-phyocyanin purification: Multiple processes for different applications. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 35, 1117-1128.
- Fisher, R. G., Woods, N. E., Fuchs, H. E. and Sweet, R. M. (1980). Three-dimensional structures of C-phyocyanin and B-phycoerythrin at 5-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 255(11), 5082-5089.
- Fleming, E. D. and Castenholz, R. W. (2007). Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV- screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 9(6), 1448-1455.
- Fratelli, C., Burck, M., Amarante, M. C. A. and Braga, A. R. C. (2021). Antioxidant potential of nature's “something blue”: Something new in the marriage of biological activity and extraction methods applied to C-phyocyanin. *Trends in Food Science and Technology*, 107, 309-323.
- 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 phyocyanin molecule. *Dyes and Pigments*, 63(1), 89-94.

- Galetović, A., Seura, F., Gallardo, V., Graves, R., Cortés, J., Valdivia, C., ... and Gómez-Silva, B. (2020). Use of phycobiliproteins from atacama cyanobacteria as food colorants in a dairy beverage prototype. *Foods*, 9(2), 244.
- Gan, F., and Bryant, D. A. (2015). Adaptive and acclimative responses of cyanobacteria to far- red light. *Environmental microbiology*, 17(10), 3450-3465.
- Gardeva, E., Toshkova, R., Yossifova, L., Minkova, K., Ivanova, N. and Gigova, L. (2014). Antitumor activity of C-phycocyanin from *Arthonema africanum* (Cyanophyceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 675-684.
- Glazer, A. N. (1985). Light harvesting by phycobilisomes. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 14, 47-77.
- Glazer, A. N. (1989). Light guides: directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *Journal of Biological Chemistry*, 264(1), 1-4.
- Glazer, A. N. (1994). Phycobiliproteins—a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*, 6(2), 105-112.
- Glazer, A. N. and Stryer, L. (1984). Phycofluor probes. *Trends in biochemical sciences*, 9(10), 423-427.
- Glazer, A. N., Cohen-Bazire, G. and Stanier, R. Y. (1971). Characterization of phycoerythrin from a *Cryptomonas* sp. *Archiv für Mikrobiologie*, 80(1), 1-18.
- Grabski, A. C. and Novagen, R. R. B. (2001). Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips.
- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G. and Collier, J. (1993). The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiological Reviews*, 57(3), 725-749.
- Guan, S. (2016). Extracting phycocyanin from spirulina and hydrothermal liquefaction of its residues to produce bio-crude oil.
- Gupta, A. and Sainis, J. K. (2010). Isolation of C-phycocyanin from *Synechococcus* sp., (*Anacystis nidulans* BD1). *Journal of Applied Phycology*, 22(3), 231-233.
- Graverholt, O. S., and Eriksen, N. T. (2007). Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(1), 69-75.

- Hao, S., Yan, Y., Li, S., Zhao, L., Zhang, C., Liu, L. and Wang, C. (2018). The in vitro anti-tumor activity of phycocyanin against non-small cell lung cancer cells. *Marine Drugs*, 16(6), 178.
- Hattori, A., Crespi, H. L. and Katz, J. J. (1965). Association and dissociation of phycocyanin and the effects of deuterium substitution on the processes. *Biochemistry*, 4(7), 1225-1238.
- Hazra, P., and Saha Kesh, G. (2017). Isolation and purification of phycocyanin from cyanobacteria of a mangrove forest. *Applied Biological Chemistry*, 60(6), 631-636.
- He, X., Mao, L., Gao, Y. and Yuan, F. (2016). Effects of high-pressure processing on the structural and functional properties of bovine lactoferrin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, 221-230.
- Hernandez, F. Y. F., Khandual, S. and López, I. G. R. (2017). Cytotoxic effect of *Spirulina platensis* extracts on human acute leukemia Kasumi-1 and chronic myelogenous leukemia K-562 cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(1), 14-19.
- Higham, W., Agiro, M., and Takemoto, J. Y. (2016). Alternate Method of Phycocyanin Extraction.
- Holdt, S. L. and Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543-597.
- Horvath, H., Kovács, A. W., Riddick, C. and Présing, M. (2013). Extraction methods for phycocyanin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and their application in a shallow lake. *European Journal of Phycology*, 48(3), 278-286.
- Huang, C. H., Shen, C. R., Li, H., Sung, L. Y., Wu, M. Y. and Hu, Y. C. (2016). CRISPR interference (CRISPRi) for gene regulation and succinate production in cyanobacterium *S. elongatus* PCC 7942. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1-11.
- İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M. and Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 78-88.
- İnanç, A. L. (2011). Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*.

- Insights, F. M. (2019). Phycocyanin Market: Food and Beverage Application to Hold Close to 85% Value Share Throughout the Forecast Period: *Global Industry Analysis (2013–2017) and Opportunity Assessment (2018–2028)*. Retrieved May 02, 2019.
- Izadi, M. and Fazilati, M. (2018). Extraction and purification of phycocyanin from spirulina platensis and evaluating its antioxidant and anti-inflammatory activity. *Asian Journal of Green Chemistry*, 2(4), 364-379.
- Izydorczyk, K., Tarczynska, M., Jurczak, T., Mrowczynski, J. and Zalewski, M. (2005). Measurement of phycocyanin fluorescence as an online early warning system for cyanobacteria in reservoir intake water. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 20(4), 425-430.
- Jakubowski, H., Flatt, P., Agnew, H. and Larsen, D. (2022). Fundamentals of Biochemistry, a free and new LibreText book for Undergraduate Courses. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36.
- Jespersen, L., Strømdahl, L. D., Olsen, K. and Skibsted, L. H. (2005). Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 220(3), 261-266.
- Jiang, L., Wang, Y., Yin, Q., Liu, G., Liu, H., Huang, Y. and Li, B. (2017). Phycocyanin: a potential drug for cancer treatment. *Journal of Cancer*, 8(17), 3416.
- Jiménez, C., Cossío, B. R., Labella, D. and Niell, F. X. (2003). The feasibility of industrial production of Spirulina (Arthrospira) in Southern Spain. *Aquaculture*, 217(1-4), 179-190.
- Jimeno, J., Faircloth, G., Sousa-Faro, J. F., Scheuer, P. and Rinehart, K. (2004). New marine derived anticancer therapeutics— a journey from the sea to clinical trials. *Marine Drugs*, 2(1), 14-29.
- Joshi, V. K., Attri, D., Bala, A. and Bhushan, S. (2003). Microbial pigments.
- Juin, C., Chérouvrier, J. R., Thiéry, V., Gagez, A. L., Bérard, J. B., Joguet, N., ... and Picot, L. (2015). Microwave-assisted extraction of phycobiliproteins from Porphyridium purpureum. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 1-15.

- Julianti, E., Singgih, M. and Mulyani, L. N. (2019). Optimization of extraction method and characterization of phycocyanin pigment from *Spirulina platensis*. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*, 51, 168-176.
- Juneja, A., Ceballos, R. M. and Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, 6(9), 4607-4638.
- Käferböck, A., Smetana, S., de Vos, R., Schwarz, C., Toepfl, S. and Parniakov, O. (2020). Sustainable extraction of valuable components from *Spirulina* assisted by pulsed electric fields technology. *Algal Research*, 48, 101914.
- Kamiloglu, S., Pasli, A. A., Ozcelik, B., Van Camp, J. and Capanoglu, E. (2015). Colour retention, anthocyanin stability and antioxidant capacity in black carrot (*Daucus carota*) jams and marmalades: Effect of processing, storage conditions and in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of functional foods*, 13, 1-10.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., and Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.
- Kannaujiya, V. K., Sundaram, S. and Sinha, R. P. (2017). *Phycobiliproteins: Recent Developments and Future Applications*. Springer Singapore.
- Kao, O. H., Edwards, M. R., Coll, R. M. and Berns, D. S. (1976). Thermophilic phycocyanin. In *Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms Structure and Function* (pp. 291-305). Birkhäuser, Basel.
- Kaur, S., Khattar, J. I. S., Singh, Y., Singh, D. P. and Ahluwalia, A. S. (2019). Extraction, purification and characterisation of phycocyanin from *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5: as a natural and food grade stable pigment. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1685-1696.
- Khazi, M. I. (2018). *Mikroalg ve siyanobakterilerden bazı kimyasal bileşiklerinin üretimi ekstraksiyonu saflaştırılması ve aktivite tayini*. Doktora tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- Khazi, M. I., Demirel, Z., Liaqat, F. and Dalay, M. C. (2018). Analytical grade purification of phycocyanin from cyanobacteria. In *Biofuels from Algae* (pp. 173-179). Humana, New York, NY.
- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G. and Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. *BioMed Research International*, 2013.

- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., and Ali, A. (2015). Production of cphycocyanin and its potential applications. *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*, 283-299.
- Kumar, J., Singh, D., Tyagi, M. B. and Kumar, A. (2019). Cyanobacteria: Applications in biotechnology. In *Cyanobacteria* (pp. 327-346). Academic Press.
- Kupka, M. and Scheer, H. (2008). Unfolding of C-Phycocyanin followed by loss of non-covalent chromophore–protein interactions: 1. Equilibrium experiments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1777(1), 94-103.
- Kurien, B. T. and Scofield, R. H. (2012). Accelerated coomassie blue staining and destaining of SDS-PAGE gels with application of heat. In *Protein Electrophoresis* (pp. 471-479). Humana Press, Totowa, NJ.
- Leach, G., Oliveira, G. and Morais, R. (1998). Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a  $\beta$ -carotene rich powder. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(2), 82-85.
- Ledermann, B., Aras, M. and Frankenberg-Dinkel, N. (2017). Biosynthesis of cyanobacterial light-harvesting pigments and their assembly into phycobiliproteins. In *Modern Topics in The Phototrophic Prokaryotes* (pp. 305-340). Springer, Cham.
- Li, B., Chu, X., Gao, M. and Li, W. (2010). Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. *Acta Biochim Biophys Sin*, 42(1), 80-89.
- Li, B., Gao, M. H., Chu, X. M., Teng, L., Lv, C. Y., Yang, P. and Yin, Q. F. (2015). The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycocyanin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 749, 107-114.
- Li, Y., Larkum, A., Schliep, M., Köhl, M., Neilan, B. and Chen, M. (2013). Newly isolated Chl d-containing cyanobacteria. In *Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future* (pp. 686-690). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Liao, G., Gao, B., Gao, Y., Yang, X., Cheng, X., and Ou, Y. (2016). Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: role of apoptosis and autophagy. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.

- Liu, Q., Huang, Y., Zhang, R., Cai, T. and Cai, Y. (2016). Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycoerythrin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Liu, R., Qin, S. and Li, W. (2022). Phycocyanin: Anti-inflammatory effect and mechanism. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 153, 113362.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., ... and Chang, W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 428(6980), 287-292.
- Luo, X., Smith, P., Raston, C. L. and Zhang, W. (2016). Vortex fluidic device-intensified aqueous two phase extraction of C-phycoerythrin from *Spirulina maxima*. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(7), 3905-3911.
- MacColl, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, 124(2-3), 311-334.
- MacColl, R., Lee, J. J. and Berns, D. S. (1971). Protein aggregation in C-phycoerythrin. Studies at very low concentrations with the photoelectric scanner of the ultracentrifuge. *Biochemical Journal* 122(4), 421-426.
- Malik, J. K., Bharti, V. K., Rahal, A., Kumar, D. and Gupta, R. C. (2020). Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* (pp. 467-478). Academic Press.
- Mandal, M. K., Chanu, N. K. and Chaurasia, N. (2020). Cyanobacterial pigments and their fluorescence characteristics: applications in research and industry. In *Advances in Cyanobacterial Biology* (pp. 55-72). Academic Press.
- Mandalam, R. K. and Palsson, B. (1998). Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high- density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 59(5), 605-611.
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Yue, Q., Zeng, X., Lu, Y., and Jing, K. (2017). Ammonium chloride: a novel effective and inexpensive salt solution for phycocyanin extraction from *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1261-1270.
- Manns, J. M. (2011). SDS- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS- PAGE) of proteins. *Current protocols in microbiology*, 22(1), A-3M.

- Marquez, F. J., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N. and Nagai, S. (1993). Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(5), 408-410.
- Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M. and Ferrari, D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*, 49(1), 154-159.
- Marzorati, S., Schievano, A., Idà, A. and Verotta, L. (2020). Carotenoids, chlorophylls and phycocyanin from *Spirulina*: supercritical CO<sub>2</sub> and water extraction methods for added value products cascade. *Green Chemistry*, 22(1), 187-196.
- McCarty, M. F. (2007). Clinical potential of *Spirulina* as a source of phycocyanobilin. *Journal of Medicinal Food*, 10(4), 566-570.
- Millamena, O. M., Aujero, E. J. and Borlcmgan, I. G. (1990). Techniques on algae harvesting and preservation for use in culture and as larval food. *Aquacultural Engineering*, 9(5), 295-304.
- Minkova, K. M., Tchernov, A. A., Tchorbadjieva, M. I., Fournadjieva, S. T., Antova, R. E. and Busheva, M. C. (2003). Purification of C-phycocyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, 102(1), 55-59.
- Mishra, M., Tiwari, S. and Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Review of Proteomics*, 14(11), 1037-1053.
- Mishra, S. K., Shrivastav, A., and Mishra, S. (2008). Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, 43(4), 339-345.
- Mishra, S. K., Shrivastav, A., Pancha, I., Jain, D. and Mishra, S. (2010). Effect of preservatives for food grade C-Phycoerythrin, isolated from marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(5), 597-602.
- Miyashita, H., Adachi, K., Kurano, N., Ikemot, H., Chihara, M. and Miyach, S. (1997). Pigment composition of a novel oxygenic photosynthetic prokaryote containing chlorophyll d as the major chlorophyll. *Plant and Cell Physiology*, 38(3), 274-281.
- Mohite, Y. S., Shrivastava, N. D. and Sahu, D. G. (2015). Antimicrobial activity of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis* isolated from extreme haloalkaline

- environment of Lonar Lake. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 1(4), 40-45.
- Moraes, C. C., Sala, L., Cerveira, G. P. and Kalil, S. J. (2011). C-phyococyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28, 45
- Morocho-Jácome, A. L., Ruscinc, N., Martinez, R. M., de Carvalho, J. C. M., Santos de Almeida, T., Rosado, C., and Baby, A. R. (2020). (Bio) Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(22), 9513-9522.
- Mourelle, M. L., Gómez, C. P. and Legido, J. L. (2017). The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. *Cosmetics*, 4(4), 46.
- Munawaroh, H. S. H., Darajatun, K., Gumilar, G. G., Aisyah, S. and Wulandari, A. P. (2018, May). Characterization of phyococyanin from *Spirulina fusiformis* and its thermal stability. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1013, No. 1, p. 012205). IOP Publishing.
- Mur, R., Skulberg, O. M. and Utkilen, H. (1999). Cyanobacteria In The Environment.
- Murugan, T. (2012). Antibacterial activity of C-phyococyanin against clinical isolates by disc diffusion method. *J. Pharm. Res*, 5(6), 3020-3021.
- Mühling, M., Belay, A. and Whitton, B. A. (2005). Screening *Arthrospira* (*Spirulina*) strains for heterotrophy. *Journal of Applied Phycology*, 17(2), 129-135.
- Nelson, N. and Yocum, C. F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 521-565.
- Neufeld, G. J. and Riggs, A. F. (1969). Aggregation properties of C-phyococyanin from *Anacystis nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 181(1), 234-243.
- Nield, J., Rizkallah, P. J., Barber, J. and Chayen, N. E. (2003). The 1.45 Å three-dimensional structure of C-phyococyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Journal of Structural Biology*, 141(2), 149-155.
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C. and Pogson, B. J. (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(1), 68-82.

- Niu, J. F., Wang, G. C. and Tseng, C. K. (2006). Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev. *Protein Expression and Purification*, 49(1), 23-31.
- Oi, V. T., Glazer, A. N. and Stryer, L. (1982). Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *The Journal of Cell Biology*, 93(3), 981-986.
- Oliveira, E. G. D., Rosa, G. S. D., Moraes, M. A. D. and Pinto, L. A. D. A. (2008). Phycocyanin content of *Spirulina platensis* dried in spouted bed and thin layer. *Journal of Food Process Engineering*, 31(1), 34-50.
- Oliveira, E. G., Duarte, J. H., Moraes, K., Crexi, V. T. and Pinto, L. A. (2010). Optimisation of *Spirulina platensis* convective drying: evaluation of phycocyanin loss and lipid oxidation. *International Journal of Food science and Technology*, 45(8), 1572-1578.
- Osman, A., Abd-Elaziz, S., Salama, A., Eita, A. A. and Sitohy, M. (2019). Health protective actions of phycocyanin obtained from an Egyptian isolate of *Spirulina platensis* on albino rats. *EurAsian Journal of BioSciences*, 13(1), 105-112.
- Padyana, A. K., Bhat, V. B., Madyastha, K. M., Rajashankar, K. R. and Ramakumar, S. (2001). Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(4), 893-898.
- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoa, A. and Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 37(3), 422-443.
- Pandey, V. D., Pandey, A. and Sharma, V. (2013). Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2(9), 89-97.
- Pan-utai, W. and Iamtham, S. (2019). Physical extraction and extrusion entrapment of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis*. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 1535-1542.
- 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*, 40(2), 248-255.

- Patel, H. M., Rastogi, R. P., Trivedi, U. and Madamwar, D. (2018). Structural characterization and antioxidant potential of phycocyanin from the cyanobacterium *Geitlerinema* sp. H8DM. *Algal research*, 32, 372-383.
- Pathak, J., Pandey, A., Maurya, P. K., Rajneesh, R., Sinha, R. P. and Singh, S. P. (2020). Cyanobacterial secondary metabolite scytonemin: a potential photoprotective and pharmaceutical compound. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90(3), 467-481.
- Pathak, J., Sonker, A. S., Rajneesh, R., Kannaujiya, V. K., Singh, V., Ahmed, H. and Sinha, R. P. (2017). Screening and partial purification of photoprotective pigment scytonemin from cyanobacterial crusts dwelling on the historical monuments in and around Varanasi, India. *Microbiology Research*, 8(1), 6559.
- Patil, G. and Raghavarao, K. S. M. S. (2007). Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochemical Engineering Journal*, 34(2), 156-164.
- Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A. S. and Raghavarao, K. S. M. S. (2006). Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, 1127(1-2), 76-81.
- Pederson, P. (1997). Protein Methods, 2nd edit., by Daniel M. Bollag, Michael D. Rozycki, and Stuart J. Edelstein. New York: Wiley- Liss, Inc.
- Pizarro, S. A. and Sauer, K. (2001). Spectroscopic Study of the Light- harvesting Protein C- Phycocyanin Associated with Colorless Linker Peptides†¶. *Photochemistry and Photobiology*, 73(5), 556-563.
- Pourhajibagher, M., Chiniforush, N. and Bahador, A. (2019). Antimicrobial action of photoactivated C-Phycocyanin against *Enterococcus faecalis* biofilms: Attenuation of quorum-sensing system. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 28, 286-291.
- Prakash, J., Pushparaj, B., Carlozzi, P., Torzillo, G., Montaini, E. and Materassi, R. (1997). Microalgal Biomass Drying By a Simple Solar Device. *International Journal of Solar Energy*, 18(4), 303-311.
- Prasanna, R., Sood, A., Suresh, A., Nayak, S. and Kaushik, B. (2007). Potentials and applications of algal pigments in biology and industry. *Acta Botanica Hungarica*, 49(1-2), 131-156.

- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3), 287-293.
- Pulz, O. and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648.
- Ramos, A., Acién, F. G., Fernández- Sevilla, J. M., Gonzalez, 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*, 85(6), 783-792.
- Ranjitha, K. and Kaushik, B. D. (2005). Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*.
- Rao, B. D., Shamitha, G., Renuka, G. and Babu, M. R. (2011). Action of C- Phycocyanin Pigment and Cell Extracts of *Tolypothrix* sps. On the Biochemical Activity of Eri Silkworm and Their Antifungal Activity. *Nature, Environment and Pollution Technology*, 10(3), 351-356.
- Rastogi, R. P., Singh, S. P., Häder, D. P. and Sinha, R. P. (2010). Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(3), 603-607.
- Ravi, M., Tentu, S., Baskar, G., Rohan Prasad, S., Raghavan, S., Jayaprakash, P., ... and Venkatraman, G. (2015). Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. *BMC cancer*, 15(1), 1-13.
- Remirez, D., Ledon, N. and González, R. (2002). Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response. *Mediators of Inflammation*, 11(2), 81-85.
- Renugadevi, K., Nachiyar, C. V., Sowmiya, P., and Sunkar, S. (2018). Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp TRV57. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 237-242.
- Rito- Palomares, M., Nunez, 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*, 76(12), 1273-1280.
- Román, R. B., Alvarez-Pez, J. M., Fernández, F. A. and Grima, E. M. (2002). Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, 93(1), 73-85.
- Romay, C. H., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D. and Rimbau, V. (2003). C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*, 4(3), 207-216.
- Ross, A., and Willson, V. L. (2017). One-way anova. In *Basic and advanced statistical tests* (pp. 21-24). SensePublishers, Rotterdam.
- Safari, R., Raftani Amiri, Z. and Esmaeilzadeh Kenari, R. (2020). Antioxidant and antibacterial activities of C-phycocyanin from common name *Spirulina platensis*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(4), 1911-1927.
- Saini, D. K., Pabbi, S. and Shukla, P. (2018). Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 616-624.
- Salama, A., Abdel Ghany, A., Osman, A. and Sitohy, M. (2015). Maximising phycocyanin extraction from a newly identified Egyptian cyanobacteria strain: *Anabaena oryzae* SOS13. *International Food Research Journal*, 22(2).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. (Cold Spring Harbor Press: New York).
- Samsonoff, W. A. and MacColl, R. (2001). Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat. *Archives of Microbiology*, 176(6), 400-405.
- Santiago-Santos, M. C., Ponce-Noyola, T., Olvera-Ramírez, R., Ortega-López, J. and Cañizares-Villanueva, R. O. (2004). Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. *Process Biochemistry*, 39(12), 2047-2052.
- Sarada, R. M. G. P., Pillai, M. G. and Ravishankar, G. A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, 34(8), 795-801.
- Scheer, H. (2003). The pigments. In *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis* (pp. 29-81). Springer, Dordrecht.

- Schipper, K., Fortunati, F., Oostlander, P. C., Al Muraikhi, M., Al Jabri, H. M. S., Wijffels, R. H. and Barbosa, M. J. (2020). Production of phycocyanin by *Leptolyngbya* sp. in desert environments. *Algal Research*, 47, 101875.
- Schirmer, T., Bode, W., Huber, R., Sidler, W. and Zuber, H. (1985). X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its resemblance to globin structures. *Journal of Molecular Biology*, 184(2), 257-277.
- Schmidt, R. A., Wiebe, M. G. and Eriksen, N. T. (2005). Heterotrophic high cell-density fed- batch cultures of the phycocyanin- producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1), 77-84.
- Schneider, S., Baumann, F. and Klüter, U. (1987). CARS Investigation of Changes in Chromophore Geometry of C-Phycocyanin from *Mastigocladus laminosus* Induced by Titration with p-Chloromercuribenzenesulfonate. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 42(11-12), 1269-1274.
- Sekar, S. and Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20(2), 113-136.
- Seo, Y. C., Choi, W. S., Park, J. H., Park, J. O., Jung, K. H., and Lee, H. Y. (2013). Stable isolation of phycocyanin from *Spirulina platensis* associated with high-pressure extraction process. *International journal of molecular sciences*, 14(1), 1778-1787.
- Shanmugam, A., Sigamani, S., Venkatachalam, H., Jayaraman, J. D., and Ramamurthy, D. (2017). Antibacterial activity of extracted phycocyanin from *Oscillatoria* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(3), 62-67.
- Sidler, W. A. (1994). Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In *The molecular biology of cyanobacteria* (pp. 139-216). Springer, Dordrecht.
- Silveira, S. T., de Menezes Quines, L. K., Burkert, C. A. V. and Kalil, S. J. (2008). Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(5), 477-482.
- Simis, S. G., Peters, S. W. and Gons, H. J. (2005). Remote sensing of the cyanobacterial pigment phycocyanin in turbid inland water. *Limnology and Oceanography*, 50(1), 237-245.

- Singh, D. V., Upadhyay, A. K., Singh, R., and Singh, D. P. (2021). Health benefits of bioactive compounds from microalgae. In *Phytomedicine* (pp. 291-319). Academic Press.
- Singh, N. K., Parmar, A., and Madamwar, D. (2009). Optimization of medium components for increased production of C-phyococyanin from *Phormidium ceylanicum* and its purification by single step process. *Bioresource Technology*, 100(4), 1663-1669.
- Singh, S. and Datta, P. (2005). Growth and survival potentials of immobilized diazotrophic cyanobacterial isolates exposed to common ricefield herbicides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(4), 441-446.
- Singh, S. P., and Montgomery, B. L. (2011). Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends in microbiology*, 19(6), 278-285.
- Singh, S. P., Häder, D. P. and Sinha, R. P. (2010). Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing Research Reviews*, 9(2), 79-90.
- Singh, S., Kate, B. N. and Banerjee, U. C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 73-95.
- Sitohy, M., Osman, A., Ghany, A. G. A., and Salama, A. (2015). Antibacterial phyococyanin from *Anabaena oryzae* SOS13. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod*, 8(4), 27-36.
- Sivasankari, S. and Ravindran, D. (2014). Comparison of different extraction methods for phyococyanin extraction and yield from *Spirulina platensis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(8), 904-909.
- Skjanes, K., Rebours, C. and Lindblad, P. (2013). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals, and other high value products in a combined process. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(2), 172-215.
- Sode, K., Horikoshi, K., Takeyama, H., Nakamura, N. and Matsunaga, T. (1991). On-line monitoring of marine cyanobacterial cultivation based on phyococyanin fluorescence. *Journal of Biotechnology*, 21(3), 209-217.
- Sonani, R. R., Patel, S., Bhastana, B., Jakharia, K., Chaubey, M. G., Singh, N. K. and Madamwar, D. (2017). Purification and antioxidant activity of phyococyanin

- from *Synechococcus* sp. R42DM isolated from industrially polluted site. *Bioresource Technology*, 245, 325-331.
- Sonani, R. R., Rastogi, R. P. and Madamwar, D. (2015). Antioxidant potential of phycobiliproteins: role in anti-aging research. *Biochem Anal Biochem*, 4(172), 2161-1009.
- Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Patel, R. and Madamwar, D. (2016). Recent advances in production, purification, and applications of phycobiliproteins. *World Journal of Biological Chemistry*, 7(1), 100.
- Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Patel, S. N., Chaubey, M. G., Singh, N. K., Gupta, G. D., ... and Madamwar, D. (2019). Phylogenetic and crystallographic analysis of Nostoc phycocyanin having blue-shifted spectral properties. *Scientific Reports*, 9(1), 1-10.
- Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Singh, N. K., Thadani, J., Patel, P. J., Kumar, J., ... and Madamwar, D. (2017). Phycoerythrin averts intracellular ROS generation and physiological functional decline in eukaryotes under oxidative stress. *Protoplasma*, 254(2), 849-862.
- Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U. and Madamwar, D. (2006). Extraction, purification, and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*—Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry*, 41(9), 2017-2023.
- Soni, B., Trivedi, U. and Madamwar, D. (2008). A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. *Bioresource Technology*, 99(1), 188-194.
- Soule, T. and Garcia-Pichel, F. (2019). Cyanobacteria. In *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 799-817). Elsevier.
- Soule, T., Stout, V., Swingley, W. D., Meeks, J. C. and Garcia-Pichel, F. (2007). Molecular genetics and genomic analysis of scytonemin biosynthesis in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *Journal of Bacteriology*, 189(12), 4465-4472.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.

- Stadnichuk, I. N. and Tropin, I. V. (2017). Phycobiliproteins: Structure, functions and biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(1), 1-10.
- Stadnichuk, I. N., Krasilnikov, P. M. and Zlenko, D. V. (2015). Cyanobacterial phycobilisomes and phycobiliproteins. *Microbiology*, 84(2), 101-111.
- Stec, B., Troxler, R. F. and Teeter, M. M. (1999). Crystal structure of C-phycocyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycobilisome assembly. *Biophysical Journal*, 76(6), 2912-2921.
- Stewart, D. E. and Farmer, F. H. (1984). Extraction, identification, and quantitation of phycobiliprotein pigments from phototrophic plankton. *Limnology and Oceanography*, 29(2), 392-397.
- Strasky, Z., Zemankova, L., Nemeckova, I., Rathouska, J., Wong, R. J., Muchova, L., ... and Nachtigal, P. (2013). *Spirulina platensis* and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase 1: a possible implication for atherogenesis. *Food and Function*, 4(11), 1586-1594.
- Subhashini, J., Mahipal, S. V., Reddy, M. C., Reddy, M. M., Rachamallu, A. and Reddanna, P. (2004). Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochemical Pharmacology*, 68(3), 453-462.
- Sukhinov, D. V., Gorin, K. V., Romanov, A. O., Gotovtsev, P. M., and Sergeeva, Y. E. (2021). Increased C-phycocyanin extract purity by flocculation of *Arthrospira platensis* with chitosan. *Algal Research*, 58, 102393.
- Sun, L., Wang, S., Chen, L. and Gong, X. (2003). Promising fluorescent probes from phycobiliproteins. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 9(2), 177-188.
- Sun, L., Wang, S., Zhao, M., Fu, X., Gong, X., Chen, M. and Wang, L. (2009). Phycobilisomes from cyanobacteria. *Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Application*. New York: Nova Science Publishers, 105-160.
- Tamary, E., Kiss, V., Nevo, R., Adam, Z., Bernát, G., Rexroth, S., ... and Reich, Z. (2012). Structural and functional alterations of cyanobacterial phycobilisomes induced by high-light stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(2), 319-327.

- Tan, H. T., Khong, N. M., Khaw, Y. S., Ahmad, S. A. and Yusoff, F. M. (2020). Optimization of the freezing-thawing method for extracting phycobiliproteins from *Arthrospira* sp. *Molecules*, 25(17), 3894.
- Tandeau de Marsac, N. (2003). Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. *Photosynthesis Research*, 76(1), 193-205.
- Tavanandi, H. A., Mittal, R., Chandrasekhar, J. and Raghavarao, K. S. M. S. (2018). Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, 31, 239-251.
- Teale, F. W. J. and Dale, R. E. (1970). Isolation and spectral characterization of phycobiliproteins. *Biochemical Journal*, 116(2), 161.
- Thornber, J. P. (1986). Biochemical characterization and structure of pigment-proteins of photosynthetic organism. In *Photosynthesis III* (pp. 98-142). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Tooley, A. J., Cai, Y. A. and Glazer, A. N. (2001). Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycocyanin holo- $\alpha$  subunit in a heterologous host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), 10560-10565.
- van der Staay, G. W., Yurkova, N. and Green, B. R. (1998). The 38 kDa chlorophyll a/b protein of the prokaryote *Prochlorothrix hollandica* is encoded by a divergent pcb gene. *Plant Molecular Biology*, 36(5), 709-716.
- Velichko, N., Averina, S., Gavrilova, O., Pinevich, A. and Ivanikova, N. (2013). Polyphasic emended description of the filamentous prochlorophyte *Prochlorothrix scandica* Skulberg 2008. *Algal Stud*, 141, 11-27.
- Venckus, P., Paliulis, S., Kostkevičiene, J. and Dementjev, A. (2018). CARS microscopy of scytonemin in cyanobacteria *Nostoc commune*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 49(8), 1333-1338.
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A. and Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.
- Vernet, M., Mitchell, B. G., and Holm-Hansen, O. (1990). Adaptation of *Synechococcus* in situ determined by variability in intracellular phycoerythrin-543 at a coastal station off the Southern California coast, USA. *Marine Ecology Progress Series*, 9-16.

- Vinha, A. F., Rodrigues, F., Nunes, M. A. and Oliveira, M. B. P. (2018). Natural pigments and colorants in foods and beverages. In *Polyphenols: Properties, recovery, and applications* (pp. 363-391). Woodhead Publishing.
- Vonshak, A., Cheung, S. M. and Chen, F. (2000). Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light. *Journal of Phycology*, 36(4), 675-679.
- Wang, L., Qu, Y., Fu, X., Zhao, M., Wang, S. and Sun, L. (2014). Isolation, purification and properties of an R-phycocyanin from the phycobilisomes of a marine red macroalga *Polysiphonia urceolata*. *PloS one*, 9(2), e87833.
- Watson, N. F., Durrant, L. G., Madjd, Z., Ellis, I. O., Scholefield, J. H. and Spendlove, I. (2006). Expression of the membrane complement regulatory protein CD59 (protectin) is associated with reduced survival in colorectal cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55(8), 973-980.
- Whitton, B. A. (Ed.). (2012). *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Springer Science and Business Media.
- Wiltshire, K. H., Boersma, M., Möller, A., and Buhtz, H. (2000). Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquatic Ecology*, 34(2), 119-126.
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D. and Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Archives of Toxicology*, 90(8), 1817-1840.
- Xalxo, R. K., Sao, S. and Sahu, P. K. (2013). Effect of antibacterial properties of cyanobacterial *Spirulina platensis*. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, 4(9).
- Xie, Y., Jin, Y., Zeng, X., Chen, J., Lu, Y. and Jing, K. (2015). Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under phototrophic cultivation. *Bioresource Technology*, 180, 281-287.
- Yadav, P., Singh, R. P., Patel, A. K., Pandey, K. D. and Gupta, R. K. (2022). Cyanobacteria as a Biocontrol Agent. In *Microbial Biocontrol: Food Security and Post Harvest Management* (pp. 167-185). Springer, Cham.

- Yamanaka, G., Glazer, A. N. and Williams, R. C. (1978). Cyanobacterial phycobilisomes. Characterization of the phycobilisomes of *Synechococcus* sp. 6301. *Journal of Biological Chemistry*, 253(22), 8303-8310.
- Yan, S. G., Zhu, L. P., Su, H. N., Zhang, X. Y., Chen, X. L., Zhou, B. C. and Zhang, Y. Z. (2011). Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycocyanin and allophycocyanin with high purity and recovery from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 23(1), 1-6.
- Yang, P., Li, B., Yin, Q. F. and Wang, Y. J. (2017). Carboxymethyl chitosan nanoparticles coupled with CD59-specific ligand peptide for targeted delivery of C-phycocyanin to HeLa cells. *Tumor Biology*, 39(3), 1010428317692267.
- Young, K. D. (2007). Bacterial morphology: why have different shapes? *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 596-600.
- Zhou, Z. P., Liu, L. N., Chen, X. L., Wang, J. X., Chen, M. I. N., Zhang, Y. Z. and Zhou, B. C. (2005). Factors that effect antioxidant activity of C- phycocyanins from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 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 pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 244-248.
- Zilinskas, B. A. and Greenwald, L. S. (1986). Phycobilisome structure and function. *Photosynthesis Research*, 10(1), 7-35.
- http-1:** <https://www.dlt-spl.co.jp/en/product/linablue/> (Erişim tarihi 02.08.2022)
- http-2:** <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm> (Erişim tarihi 03.08.2022)

## ÖZGEÇMİŞ

ORCID NO: 0000000277873892

Adı Soyadı : SONA HAJIYEVA

Yabancı Dil : İngilizce, Rusça, Fransızca.

Eğitim Geçmişi:

- 2003-2014, Gence Şehri 46 Numaralı Orta Öğretim Okulu
- 2014-2018, Gence Devlet Üniversitesi, Biyoloji Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Mesleki Geçmişi:

- 2022, Azerbaycan Devlet İktisat Üniversitesi, Nobel ödüllü “Aziz Sancar”ın adına Gıda Güvenliği ve Mikrobiyoloji Laboratuvarında, laboratuvar asistanı ve araştırma görevlisi.