



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ



MİKROALGAL GÜNEŞ KORUYUCU MADDELERİN ÜRETİMİ VE KOZMETİKTE KULLANIM POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Doktora Tezi

Ceren GÜRLEK KLİBER

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

**MİKROALGAL GÜNEŞ KORUYUCU
MADDELERİN ÜRETİMİ VE KOZMETİKTE
KULLANIM POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

Ceren GÜRLEK KLİBER

Danışman(lar) : Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Doktora Programı

İzmir
2024

Ceren GÜRLEK KLİBER tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Mikroalgal Güneş Koruyucu Maddelerin Üretimi ve Kozmetikte Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 09/09/2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Suphi Şurişvan ÖNCEL

Raportör Üye : Prof. Dr. Murat ELİBOL

Üye : Prof. Dr. Zeynep ŞENYİĞİT

Üye : Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ

Üye : Prof. Dr. Sait SARGIN

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “**Mikroalgal Güneş Koruyucu Maddelerin Üretimi ve Kozmetikte Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

09 / 09 / 2024

Ceren GÜRLEK KLİBER

ÖZET**MİKROALGAL GÜNEŞ KORUYUCU MADDELERİN ÜRETİMİ
VE KOZMETİKTE KULLANIM POTANSİYELİNİN
BELİRLENMESİ**

GÜRLEK KLİBER, Ceren

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

Eylül 2024, 146 sayfa

Ozon tabakasının zarar görmesi ve buna bağlı olarak yeryüzüne ulaşan UV radyasyonun artması güneş koruyucularına duyulan ihtiyacı artırmaktadır. Kozmetik ürünlerin ciltte oluşturduğu reaksiyonlar nedeniyle güvenli olmaması tüketicileri ve üreticileri doğal ürün arayışına itmektedir. Bu noktada mikroalgler evrimsel süreçte karşılaştığı zorluklara karşı çeşitli aktivitelere sahip moleküllerin üretimini gerçekleştirdiği için doğal ürün kaynağı olarak önemli bir noktada bulunmaktadır. Bu önemli moleküllerden UV absorplama özelliği olan moleküllerin güneş koruyucularında kullanılarak sentetik kozmetik ürünlere alternatif olabileceği; daha geniş aralıktaki dalga boylarını absorplayarak gelişmiş bir güneş koruma sağlayabildiği gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında, mikroalglerin ürettiği güneş koruyucu maddelerin güneş kremlerine bir alternatif oluşturma potansiyelini incelemek hedeflenmiştir. Üretici türler belirlenerek farklı fotobiyoreaktörler ile dış alan koşullarında üretim gerçekleştirilmiştir. Dış alan üretimlerinde en fazla biyokütle üretiminin ortalama sıcaklıkların mikroalglerin optimum büyüme sıcaklığına yakın olduğu bahar aylarında gerçekleştiği gözlenmiştir. Ayrıca ölçek büyütme çalışmaları yapılarak pilot ölçekteki panel ve tübüler fotobiyoreaktörler ile üretimleri yapılmıştır. 50 L panel fotobiyoreaktörde *Nostoc linckia* sp. CALU-129 türünün ikilenme süresi 4,92 gün olarak belirlenmiştir. Elde edilen kısmi saf ekstratlar kozmetik formülasyon içerisine

eklenerek hücre kültürü denemeleri ve kozmetik stabilite testleri yapılarak ürün potansiyeli incelenmiştir. Hücre kültürü denemelerinde *Nostoc* sp. CALU-997 türünden elde edilen ekstrenin 500 µg/ml konsantrasyonda HaCaT insan immortazile keratinosit hücre hattını UV'den %20 oranında; *N. linckia* CALU-129 türünden elde edilen ekstrenin ise 62,5 µg/ml konsantrasyonda %29 oranında koruduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda üretim maliyetini düşürebilmek adına SLIC (sequence- and ligation-independent cloning) gen aktarım tekniği kullanılarak foto koruma özellikteki mikosporin benzeri amino asitlerden shinorine maddesinin *E. coli* BAP1 bakterisinde başarılı bir şekilde üretimi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Mikroalgler, güneş koruyucu moleküller, mikosporin benzeri amino asitler, heterolog ekspresyon, sitotoksiste, gen manipülasyonu, kozmetik ürünler.

ABSTRACT**PRODUCTION OF MICROALGAL SUNSCREEN MOLECULES
AND DETERMINING THEIR POTENTIAL IN COSMETICS**

GÜRLEK KLİBER, Ceren

PhD Thesis in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Suphi Şurişvan ÖNCEL

September 2024, 146 pages

There is a greater need for sunscreens because of increase in UV radiation reaching the Earth due to depletion of ozone layer. The fact that cosmetic products used today are not safe due to the reaction on skin pushes consumers and manufacturers to search for natural products. Currently, microalgae represent a significant natural product source because over their evolutionary journey, they have faced numerous challenges and have developed a variety of compounds to overcome these obstacles. It has been observed that compounds with UV absorption (photoprotection) properties among these valuable compounds can be used in sunscreens as an alternative to synthetic cosmetic products; and they can even provide more advanced sun protection by absorbing a wider range of wavelengths. This thesis aimed to investigate the potential of sun-protective substances produced by microalgae as an alternative to sunscreens. Producer species were identified, and production was carried out under outdoor conditions with different photobioreactors. It was observed that the highest biomass production in outdoor conditions occurred during the spring months when average temperatures were close to the optimal growth temperature of microalgae. Furthermore, scale-up studies were conducted, and production was performed with pilot-scale panel and tubular photobioreactors. The doubling time of the species *Nostoc linckia* sp. CALU-129 was determined to be 4,92 days in a 50 L panel photobioreactor. The partial pure extracts obtained were added to cosmetic formulations, and product potential was examined through cell culture experiments and cosmetic stability tests. In cell culture experiments, it was determined that the extract obtained from the species *Nostoc* sp. CALU-997 protected the HaCaT human immortalized

keratinocyte cell line from UV radiation by 20% at a concentration of 500 µg/ml, while the extract from the species *N. linckia* CALU-129 provided 29% protection at a concentration of 62,5 µg/ml. At the same time, to reduce production costs, the sequence- and ligation-independent cloning (SLIC) gene transfer technique was used to successfully produce the photoprotective mycosporine-like amino acid shinorine in *E. coli* BAP1 bacteria.

Keywords: Microalgae, sunscreen molecules, mycosporine-like amino acids, heterologous expression, cytotoxicity, gene manipulation, cosmetics.



ÖNSÖZ

Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünde 2013'te başlayan lisans eğitimime 2017'de Lisans Dereceli Doktora programı ile devam ettim. Lisans eğitimim boyunca farklı alanlarda aldığım birçok ders ve staj deneyimlerim sayesinde çalışma alanımı belirleyerek Mikroalgal Proses Laboratuvarında doktora çalışmalarına başlamaya karar verdim.

Tez konumu belirlemeye çalıştığım dönemde hayatımı etkileyen bir soruna doğal bir çözüm bulabilme fikri beni oldukça etkiledi. Hayatım boyunca güneşin zararlı ışınlarıyla farklı farklı güneş kremleriyle baş etmeye çalıştıktan sonra mikroalglerden güneş kremi ham maddesi üretmek benim için oldukça heyecanlı bir tez konusu haline geldi. Tüm evrimsel süreçleri boyunca oldukça zorlu koşullarla karşılaşan mikroalgler bu zorlu koşullara boyun eğmeden ortam koşullarına uyum sağlayabilmek adına çok değerli birçok madde üreterek hayatlarını ve türlerinin devamlılığını sürdürebilmişler ve bu ürettikleri maddeler ile de birçok sektör tarafından popülaritelerinde yükselen bir trende girmişlerdir. Güneşten hem yararlanıp hem de kendilerini koruyabilmek adına çok değerli maddeler üreterek özellikleri bakımından tüm güneş kremlerinden daha güvenli bir alternatif potansiyelindedirler. Çalıştığım tez konusunun ilham kaynağı sorunlara çözüm bulmada doğaya dönmek ve bakmak felsefesidir aslında.

Doktora sürecinde birçok zorlukla karşılaştım. Özellikle pandemi hem çalışmalarımı hem de motivasyonumu olumsuz yönde etkileyen bir süreçti. Tüm bu zorluklara rağmen çalışmalarımı tamamladım ve kazandığım tecrübeler ile ortaya bir tez koyuyorum. Zorluklarla baş etme konusunda ilham kaynağım olan mikroalglerin tüm hayatım boyunca bana yol göstermesi ümidiyle...

İZMİR

09/09/2024

Ceren GÜRLEK KLİBER



İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	5
2.1 Mikroalgler	5
2.2 Mikroalglerin Kullanım Alanları	6
2.2.1 Kozmetikte Mikroalgler	9
2.3 Mikosporin Benzeri Amino Asitler (MAA)	11
2.3.1 Yapısı ve biyosentezi	12
2.3.2 Güneş Kremi Olarak MAA'lar	13
2.4 Mikosporin Benzeri Amino Asitlerin Heterolog Ekspresyonu	15
2.4.1 SLIC (Dizi ve bağlamadan bağımsız klonlama)	16

İÇİNDEKİLER (devam)

2.5. Mikroalglerin Fotobiyoreaktörlerde Üretimi.....	19
2.6. Mikroalglerin Dış Alanda Fotobiyoreaktörlerde Üretimi.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1 Kullanılan Kimyasallar	25
3.2 Kullanılan Cihazlar	26
3.3 Kullanılan Besin Ortamları.....	27
3.4 Siyanobakterilerin Kültüre Alınması.....	29
3.5 Ham Ekstrelerin Elde Edilmesi	35
3.6 Ham Ekstrelerin Ön Tarama Analizleri.....	36
3.6.1 Güneş koruma faktörünün belirlenmesi	36
3.6.2 Radikal süpürme aktivitesinin belirlenmesi	37
3.7 Mikosporin benzeri amino asit biyosentetik gen bölgelerinin belirlenmesi için PCR tabanlı tarama	39
3.8 Güneş Koruyucu Molekül Üretiminin İndüklenmesi	40
3.9 Siyanobakteri Türlerinin Panel Ve Tübüler Fotobiyoreaktörlerde Dış Alan Üretimleri	41
3.10 Siyanobakteri Türlerinin Pilot Ölçekli Panel ve Tübüler Fotobiyoreaktörlerde Üretimleri	44

İÇİNDEKİLER (devam)

3.11 Güneş koruyucu moleküllerin kısmi saflaştırılması.....	47
3.12 HPLC/MS analizi	48
3.13 Güneş Koruyucu Moleküllerin Kozmetik Uygulamalar İçin Test Edilmesi	49
3.13.1 Sitotoksisite analizi.....	49
3.13.2 UV koruma özelliğinin test edilmesi	51
3.13.3 Stabilite testleri	51
3.14 <i>E. coli</i> ’de Heterolog Ekspresyon.....	56
3.14.1 Siyanobakteriden DNA ekstraksiyonu	57
3.14.2 Shinorine gen bölgesinin amplifikasyonu	57
3.14.3. Plazmid Ekstraksiyonu	60
3.14.4 SLIC Metodu	61
3.14.5. Transformasyon	62
3.14.6. Ekspresyon Kültürü	63
4. BULGULAR.....	65
4.1 Siyanobakterilerden Biyokütle Elde Edilmesi Ve Ekstraksiyon Verimi	65
4.2. Ham Ekstrelerin Ön Tarama Analizleri	70

İÇİNDEKİLER (devam)

4.2.1. Güneş koruma faktörü (SPF) sonuçları.....	70
4.2.2. Radikal süpürme aktivitesi sonuçları	75
4.3. MAA Üreten Gen Bölgelerinin Belirlenmesi	78
4.4 Güneş Koruyucu Molekül İçeren Türlerin Belirlenmesi	78
4.5 Güneş koruyucu moleküllerin indüklenmesi.....	80
4.6 Siyanobakteri Türlerinin Panel Ve Tübüler Fotobiyoreaktörlerde Dış Alan Üretimleri	83
4.7 Pilot Ölçek Üretimleri	91
4.8 Güneş Koruyucu Moleküllerin Kısmi Saflaştırılması	95
4.9 Sitotoksosite Sonuçları	96
4.10 UV Koruma Özelliğinin Test Edilmesi	99
4.11 Kozmetik Stabilitate Sonuçları.....	101
4.11.1 Stabilitate Çalışmaları.....	105
4.12 <i>E. Coli</i> 'de Heterolog Ekspresyon	111
5. TARTIŞMA	117
6. ÖNERİLER.....	121
KAYNAKLAR DİZİNİ	123

İÇİNDEKİLER (devam)

TEŞEKKÜR141

ÖZGEÇMİŞ143





ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Siyanobakteriyel MAA sentetik yolu. a) Farklı mikroalglerin MAA sentetik gen kümeleri. Siyah oklar DHQS/EVS (3-dehydroquinate sentaz/ 2-epi-5-epi-valiolone sentaz) beyaz oklar O-MT'yi (O-metiltransferaz), taranmış oklar ATP-grasp ve gri oklar NRPS(Nonribosomal peptid sentaz)/D-Ala-D-Ala ligazı göstermektedir b) MAA biyosentetik yolu (Kageyama and Waditee-Sirisattha, 2018).....	16
Şekil 2.2. Tübüler fotobiyoreaktör	21
Şekil 2.3. Panel fotobiyoreaktör	22
Şekil 3.1. Tüm türler için kullanılan üretim sisteminin diyagramı.....	31
Şekil 3.2. 250 ml erlenmayer flasklarda üretim a) <i>Anabaena</i> sp.; b) <i>A. variabilis</i> ; c) <i>N. sphaerocarpa</i>	32
Şekil 3.3. 250 ml erlenmayer flasklarda üretim a) <i>P. tricornutum</i> ; b) <i>S. nidulans</i> ; c) <i>S. protuberans</i>	32
Şekil 3.4. 250 ml erlenmayer flasklarda üretim a) <i>N. muscorum</i> ; b) <i>S. platensis</i> ; c) <i>N. linckia</i>	33
Şekil 3.5. Türlerin üretim sistemi a) Karşıdan görüntüsü; b) Yandan görüntüsü (2 L Schott şişelerde, havalandırma, hortum ve pompa ile; karıştırma, manyetik karıştırıcı ile gerçekleştirilmiştir).	33
Şekil 3.6. Kabarcık kolon biyoreaktörde <i>S. platensis</i> türünün üretimi.....	34
Şekil 3.7. Üretim sonrası hasat işleminin diyagramı.....	34
Şekil 3.8. Hasat sonrası ekstraksiyon işlemi.	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 3.9. Ekstrelerin SPF değerlerinin hesaplanması yönteminin diyagramı.....	37
Şekil 3.10. DPPH metodunun diyagramı.....	38
Şekil 3.11. Seçilen türlerin Şubat ayı dış alan üretimleri, a) Kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; b) Panel fotobiyoreaktörler.	42
Şekil 3.12 Seçilen türlerin Mart ayı dış alan üretimleri, solda, kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; sağda, panel fotobiyoreaktörler.....	42
Şekil 3.13. Seçilen türlerin Nisan ayı dış alan üretimleri, a) Kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; b) Panel fotobiyoreaktörler.	43
Şekil 3.14. Seçilen türlerin Mayıs ayı dış alan üretimleri, a) Kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; b) Panel fotobiyoreaktörler.	43
Şekil 3.15. Seçilen türlerin Ekim ayı dış alan üretimleri, a) Kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; b) Panel fotobiyoreaktörler.	44
Şekil 3.16. Seçilen türlerin Kasım ayı dış alan üretimleri, a) Kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; b) Panel fotobiyoreaktörler.	44
Şekil 3.17. 1 L panel fotobiyoreaktörlerde a) <i>N. linckia</i> CALU-129; b) <i>Nostoc</i> sp. CALU-997 üretimi.....	45
Şekil 3.18. Toplam hacmi 25 L olan tübüler fotobiyoreaktörlerde <i>Nostoc</i> sp. CALU-997 türünün inkübasyonu, solda; uzaktan, sağda; yakından görüntüsü.....	46
Şekil 3.19. <i>N. linckia</i> CALU-129 türünün 50 L panel fotobiyoreaktörlerdeki üretimi, solda, 3. gün; sağda, 12. gündeki durumu.	46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 3.20. Sıvı-sıvı partiyon. Altta pigmentleri sudan uzaklaştıran kloroform fazı, üstte shinorine içeren su fazı.....	47
Şekil 3.21. L929 fare fibroblast hücre hattının mikroskop görüntüsü.....	50
Şekil 3.22. HaCaT insan immortalize keratinosit hücre hattının mikroskop görüntüsü.	50
Şekil 3.23. Shinorine içeren krem formülasyonunları.....	53
Şekil 3.24. Tek noktalı viskozimetre cihazı.	53
Şekil 3.25. Brookfield DVNext reometresi	54
Şekil 3.26. Formülasyonlarının mekanik özelliklerinin incelenmesi için kullanılan bilgisayar kontrollü penetrometre.....	55
Şekil 3.27. 25°C±2°C’de %60±%5 bağıl nem oranına sahip (yukarıda) ve 40°C±2°C’de %75±%5 bağıl nem oranına sahip (aşağıda) farklı stabilite kabinleri.	56
Şekil 3.28. Heterolog ekspresyon için DNA izolasyonundan başlayarak son ürüne kadar uygulanan metodun şeması.	57
Şekil 4.1. Evaporasyon sonrası %70 metanol ekstraktları a) <i>P. tricornutum</i> ; b) <i>N. muscorum</i> ; c) <i>Anabaena</i> sp.; d) <i>S. protuberans</i> ; e) <i>N. linckia</i> ; f) <i>N. sphaerocarpa</i> ; g) <i>S. nidulans</i> ; h) <i>S. platensis</i> ; i) <i>A. variabilis</i>	68
Şekil 4.2. Evaporasyon sonrası kloroform ekstraktları a) <i>P. tricornutum</i> ; b) <i>N. muscorum</i> ; c) <i>Anabaena</i> sp.; d) <i>S. protuberans</i> ; e) <i>N. linckia</i> ; f) <i>N. sphaerocarpa</i> ; g) <i>S. nidulans</i> ; h) <i>S. platensis</i> ; i) <i>A. variabilis</i>	68

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- Şekil 4.3.** Evaporasyon sonrası kloroform: metanol (1:1) ekstreleri a) *Anabaena* sp.; b) *N. sphaerocarpa*; c) *P. tricornutum*; d) *S. protuberas*; e) *N. linckia*; f) *S. nidulans*; g) *S. platensis*; h) *A. variabilis*.....69
- Şekil 4.4.** Evaporasyon sonrası hekzan ekstreleri a) *Anabaena* sp.; b) *S. platensis*; c) *N. sphaerocarpa*; d) *S. protuberas*; e) *S. nidulans*; f) *P. tricornutum*; g) *N. linckia*; h) *A. variabilis*.....69
- Şekil 4.5.** Algatech kültür koleksiyonundan seçilen siyanobakteri türlerinin ekstraksiyonu sonrası elde edilen ekstrelerin görüntüleri. 1-13 %70 metanol ekstreleri; 13-26 kloroform:metanol ekstreleri; 27-39 kloroform ekstreleri; 39-52 hekzan ekstreleri.70
- Şekil 4.6.** *Nostoc* sp. CALU-997’de bulunan MAA sentezini sağlayan gen bölgeleri.78
- Şekil 4.7.** *Nostoc* sp. Lukesova’9/94 türünün HPLC/MS profili (333 m/z).79
- Şekil 4.8.** *Nostoc* sp. Lukesova’30/93 türünün HPLC/MS profili (333 m/z).79
- Şekil 4.9.** *N. linckia* CALU-129 türünün HPLC/MS profili (333 m/z).79
- Şekil 4.10.** *Nostoc* sp. CALU-997 türünün HPLC/MS profili (333 m/z).79
- Şekil 4.11.** *Calothrix* sp. türünün HPLC/MS profili (333 m/z).80
- Şekil 4.12.** BG11 ve BG11+Deniz tuzu (1%) üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm).80
- Şekil 4.13.** BG11 ve BG11+Deniz tuzu (3%) üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm).81

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.14. BG11 ve BG11-N üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm).....	81
Şekil 4.15. BG11 ve BG11+1 Mm MgSO ₄ üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm).	82
Şekil 4.16. BG11 ve BG11+%1 NaCl üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm)...82	
Şekil 4.17. BG11 ve BG11+%2 NaCl üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm)...83	
Şekil 4.18. BG11 ve BG11+%3 NaCl üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm)...83	
Şekil 4.19. Panel fotobiyoreaktörlerde <i>Nostoc</i> sp. Lukesova'9/94 türünün aylara göre absorbans değişimi.	85
Şekil 4.20. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde <i>Nostoc</i> sp. Lukesova'9/94 türünün aylara göre absorbans değişimi.....	86
Şekil 4.21. Panel fotobiyoreaktörlerde <i>Nostoc</i> sp. Lukesova'30/93 türünün aylara göre absorbans değişimi.	87
Şekil 4.22. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde <i>Nostoc</i> sp. Lukesova'30/93 türünün aylara göre absorbans değişimi.	87
Şekil 4.23. Panel fotobiyoreaktörlerde <i>N. linckia</i> CALU-129 türünün aylara göre absorbans değişimi.....	88
Şekil 4.24. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde <i>N. linckia</i> CALU-129 türünün aylara göre absorbans değişimi.....	88
Şekil 4.25. Panel fotobiyoreaktörlerde <i>Nostoc</i> sp. CALU-997 türünün aylara göre absorbans değişimi.....	89

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.26. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde <i>Nostoc</i> sp. CALU-997 türünün aylara göre absorbands değişimi.	89
Şekil 4.27. Panel fotobiyoreaktörlerde <i>Calothrix</i> sp. türünün aylara göre absorbands değişimi.....	90
Şekil 4.28. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde <i>Calothrix</i> sp. türünün aylara göre absorbands değişimi.....	90
Şekil 4.29. Dış alan üretimlerin HPLC/MS profilleri.....	91
Şekil 4.30. <i>Nostoc</i> sp. CALU-997 türünün 1 L panel fotobiyoreaktör ve 25 L tübüler fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerin absorbands-zaman grafiklerinin karşılaştırması.	92
Şekil 4.31. 1 L panel fotobiyoreaktör ve 25 L tübüler fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerin pH-zaman grafiklerinin karşılaştırması.	93
Şekil 4.32. <i>N. linckia</i> CALU-129 türünün 1 L panel fotobiyoreaktör ve 50 L panel fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerin absorbands-zaman grafiklerinin karşılaştırması.	94
Şekil 4.33. <i>N. linckia</i> CALU-129 türünün 1 L panel fotobiyoreaktör ve 50 L panel fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerin pH-zaman grafiklerinin karşılaştırması.	94
Şekil 4.34. Kısmi saflaştırma sonrası ekstrenin HPLC/MS profili.....	95
Şekil 4.35. Farklı konsantrasyonlardaki shinorine maddesinin L929 hücre hatları üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saatteki etkisi. PK; pozitif kontrol, madde uygulanmamış besin ortamı içerisindeki L929 hücreleri, NK; negatif kontrol, DMSO uygulanmış L929 hücreleri.....	96

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- Şekil 4.36.** *E. coli*'den elde edilen shinorine bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda HaCaT hücre hatları üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saatteki etkisi. PK; pozitif kontrol, madde uygulanmamış besin ortamı içerisindeki HaCaT hücreleri, NK; negatif kontrol, DMSO uygulanmış HaCaT hücreleri.....97
- Şekil 4.37.** *Nostoc sp. CALU-997*'den elde edilen içinde shinorine içeren ekstrenin farklı konsantrasyonlarda HaCaT hücre hatları üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saatteki etkisi. PK; pozitif kontrol, madde uygulanmamış besin ortamı içerisindeki HaCaT hücreleri, NK; negatif kontrol, DMSO uygulanmış HaCaT hücreleri98
- Şekil 4.38.** *N. linckia CALU-129*'dan elde edilen içinde shinorine içeren ekstrenin farklı konsantrasyonlarda HaCaT hücre hatları üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saatteki etkisi. PK; pozitif kontrol, madde uygulanmamış besin ortamı içerisindeki HaCaT hücreleri, NK; negatif kontrol DMSO uygulanmış HaCaT hücreleri98
- Şekil 4.39.** HaCaT hücre hattının UV maruziyeti sonucu % canlılık- UV uygulama süresi grafiği. 100
- Şekil 4.40.** TPA grafiğinin genel görünümü. 102
- Şekil 4.41.** Boş krem formülasyonunun TPA grafiği 104
- Şekil 4.42.** Shinorine içeren krem formülasyonunun TPA grafiği..... 104
- Şekil 4.43.** Boş krem $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%60\pm\%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (1 ay)..... 107
- Şekil 4.44.** Boş krem $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%60\pm\%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (2 ay)..... 107
- Şekil 4.45.** Boş krem $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%75\pm\%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (1 ay)..... 108

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.46. Boş krem $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%75\pm\%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (2 ay).	108
Şekil 4.47. Shinorine içeren krem $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%60\pm\%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (1 ay).	109
Şekil 4.48. Shinorine içeren krem $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%60\pm\%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (2 ay).	109
Şekil 4.49. Shinorine içeren krem $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%75\pm\%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (1 ay).	110
Şekil 4.50. Shinorine içeren krem $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%75\pm\%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (2 ay).	110
Şekil 4.51. Gradyan PCR sonrası agaroz jelde yürütülen örneklerin görüntüsü. 112	
Şekil 4.52. Koloni PCR sonrası jel görüntüsü.	113
Şekil 4.53 Ekspresyon konağına transformasyon sonrası koloni PCR jel görüntüsü.	114
Şekil 4.54. Ekspresyon sonucundaki ekstrelerin HPLC/MS kromatogramı.....	115

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Mikroalglerden elde edilen bazı biyoaktif maddeler, üreten türler ve kullanım alanları.	8
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar.....	25
Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar.....	26
Tablo 3 3. Guillard's f/2 besin ortamı reçetesi (Guillard and Ryther, 1975).....	27
Tablo 3.4. Zarrouk besin ortamı (Pawar et al., 2015).....	28
Tablo 3.5. BG11 besin ortamının reçetesi.....	28
Tablo 3.6. Seçilen mikroalg türleri ve besin ortamları.	30
Tablo 3.11. Kullanılan primerların listesi.	58
Tablo 3.12. Q5 polimeraz için reaksiyon karışımı reçetesi.....	59
Tablo 3.13. Gradyan PCR metodu.	59
Tablo 3.17. DpnI restriksiyon enzimi ile hazırlanan reaksiyon karışımı	61
Tablo 4.1 Seçilen mikroalg türlerinin farklı solvent sistemleri ile ekstraksiyonu sonrası ekstraksiyon verimleri	66
Tablo 4.2. Siyanobakteri ve mikroalg türlerinin farklı solventler kullanılarak hazırlanan ekstrelerinin güneş koruma faktörleri (SPF). (*) Spektrofotometrik olarak okuması yapılamayacak kadar büyük değerde; (-) Veri yok.	72

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

Tablo 4.3. Algatech kültür koleksiyonundan seçilen siyanobakteri türlerinin farklı solventler kullanılarak hazırlanan ekstrelerinin güneş koruma faktörleri (SPF). (-): Veri yok.....	73
Tablo 4.4. Siyanobakteri ve mikroalg türlerinin farklı solventler kullanılarak hazırlanan metanol ve kloroform ekstrelerinin radikal süpürücü aktiviteleri (%RSA).....	75
Tablo 4.5. Siyanobakteri ve mikroalg türlerinin farklı solventler kullanılarak hazırlanan kloroform:metanol (1:1(v/v) ve hekzan ekstrelerinin radikal süpürücü aktiviteleri (%RSA).....	76
Tablo 4.6. Algatech kültür koleksiyonundan seçilen siyanobakteri türlerinin farklı solventler kullanılarak hazırlanan metanol ve kloroform ekstrelerinin radikal süpürücü aktiviteleri (%RSA). (-): Veri yok.....	77
Tablo 4.7. Aylara göre dış alan sıcaklık ortalamaları.....	84
Tablo 4.8. Nostoc sp. CALU-997 ve N. linckia CALU-129 türlerinin farklı reaktör tiplerinde ve farklı çalışma hacimlerinde spesifik büyüme hızı ve ikilenme süreleri.	94
Tablo 4.9. HaCaT hücre hattına uygulanan ekstrelerin farklı konsantrasyonlarının UV maruziyeti sonucu canlılıkları (%).	100
Tablo 4.10. Formülasyonlarının mekanik özelliklerine ait bulgular.	103
Tablo 4.11. Shinorine içeren krem formülasyonunun 2 aylık stabilite çalışmasındaki pH değerleri.....	105
Tablo 4.12. Formülasyonlarının stabilite çalışması sonucu saptanan mekanik özelliklerine ait bulgular.	106

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
mg	miligram
g	gram
mL	mililitre
µm	mikrometre
mm	milimetre
mM	milimolar
Rpm	Rate per minute
BG-11	Blue Green-11
MAA	Mikosporin benzeri amino asit
km	kafi miktarda
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
RSA	Radikal süpürme aktivitesi
UV	Ultraviyole
MTT	3-(4,5- di metil tiyazol -2-il)-2,5-di fenil tetrazolyum bromür
SLIC	dizi ve bağlamadan bağımsız klonlama
Ar-Ge	Araştırma-Geliştirme



1. GİRİŞ

Mikroalgler oksijeni ilk üreten organizmalardandır ve çok eskiden beri var olan bir organizma olmanın evrimsel gelişimini etkilemesi nedeniyle deniz, tatlı su, toprak, biyolojik toprak kabukları, kar vb. gibi neredeyse tüm habitatlarda bulunabildiklerinden çok benzersizdirler (Gaysina et al., 2019; Kumar et al., 2019; Percival and Williams, 2014). Mikroalgler doğal ortamlarında stres koşullarına sıklıkla maruz kalırlar, bu nedenle bu koşullara dirençli olmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. UV radyasyon, reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller gibi stres koşullarına maruz kaldığında, kozmetik endüstrisinin dikkatini çeken ve özellikle cildi güneş hasarından koruyabilen değerli maddeler üretmeleri nedeniyle mikroalgler kozmetik ürünler için potansiyel aday haline gelmektedir (Pereira, 2018). Bu değerli maddeler antioksidan, antikanser, antibakteriyel, antiviral ve antifungal ve immün sistemi uyarıcı etki göstermektedir (Gamal, 2010; Kumar et al., 2019; Sahin, 2018). Mikroalglerin ürettiği biyoaktif maddeler, onları farmasötik ve kozmetik bileşikler ve gıda endüstrisi için bir kaynak olarak çok önemli mikroorganizmalar haline getirmektedir. İnsanlar, yüzyıllar önce kıtlık yaşadıklarında siyanobakterilerin yiyecekler için kullanılabileceğini keşfetmiştir (Spolaore et al., 2006). Yüzyıllardır siyanobakterilerin insanlar için değerli bir besin kaynağı olduğu bilindiği halde günümüzde su ürünleri yetiştiriciliğinde yem olarak kullanımı daha yaygın bir haldedir ancak artan nüfusla birlikte gıdaya olan talebin de artması bilim insanlarının siyanobakterilerin besin değerini yeniden keşfetmesiyle sonuçlanmış ve siyanobakteriler özellikle *Spirulina* gıda endüstrisinde popüler hale gelmiştir (Nicoletti, 2016).

Günümüzde kozmetik ürünlerin içerisinde kullanılan sentetik maddelerin ciltte çeşitli reaksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Fotosensitivite, fototoksisite, fotoalerji ve fotokarsinojenite gibi reaksiyonlar deriye uygulanan güneş kremlerindeki kimyasal maddelerin UV ile teması sonucu oluşur ve deride ani ya da kronik hasarlara ve sonuç olarak cilt kanserine neden olmaktadır. Sentetik maddelerin zararlı etkileri nedeniyle, kozmetik araştırmaları doğal ürünlere artan bir yönelim göstermesiyle sonuçlanmaktadır (Morone et al., 2019). Sentetik bileşikler, düşük stabilite ve sitotoksisite gibi nedenlerden dolayı doğal biyoaktif

maddelerle değiştirilmeye başladıktan sonra siyanobakterilerden elde edilen biyoaktif moleküllerin araştırılmaya başlaması doğal ürünlerde yeni bir çağ başlamasına neden olmuştur. Biyoaktif moleküller genellikle fotosentetik canlılardan elde edilmektedir ve bitkiler bu konuda önemli bir yerdedir ve birçok üretici tarafından tercih edilen bir seçenek halindedir (Derikvand et al., 2017). Ancak bitkilerin büyümeleri için özel maddelere ihtiyaç duyması ve bunun sonucunda pahalı bir üretim gerçekleşmesi, mikroalgelere göre daha yavaş büyümesi, ışık enerjisinin biyokütleye dönüşüm veriminin düşük olması gibi dezavantajları vardır (Wagner vd., 2015). Bu nedenle mikroalgler doğal kozmetik bileşen kaynağı olarak daha fazla popülerlik kazanmıştır (Derikvand et al., 2017).

UV'nin deride oluşturduğu etkilere bakıldığında UV'den korunmak cilt kanserinin önüne geçmek için en önemli önlemlerden biridir. UV ışınları UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) ve UVA (315-400 nm) ışınları olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (McMillan et al., 2010). Bu ışınlardan UVC ışınlarının yeryüzüne ulaşması ozon tarafından engellenmektedir. UVB ışınlarının ise %90'ı ozon tarafından tutulmaktadır. UVA ışınlarının ise tamamı yeryüzüne ulaşmaktadır. Hızlı sanayileşme sonucu atmosferik kirleticilerdeki artış nedeniyle stratosferin ozon tabakası zarar görmüştür. Bunun sonucunda da yeryüzüne ulaşan UV ışınlarının miktarı artmıştır. UV ışınları deride farklı etkiler göstermektedir; UVB ışınları kızarıklık, yanık ve cilt kanserine neden olurken; UVA ışınları karsinojenik değildir ve daha çok yaşlanmayla ilişkilidir. Deride epidermal değişikliklerden UVB, dermisteki değişikliklerden hem UVB hem UVA sorumludur. UVB ışınları direkt olarak DNA hasarına neden olan siklopirimidin dimerleri ve 6-4 fotoürünlerin oluşumuna neden olurken, UVA ışınları reaktif oksijen türlerinin üretilmesine neden olarak dolaylı bir DNA hasarı oluşturur (Rastogi et al., 2015; Richa et al., 2017). UV ışınlarından korunmak üzere ortaya atılan bir terim olan fotokoruma, radyasyon tarafından indüklenen deri hasarı ve cilt kanserindeki azalmayla belirlenir. Fotokorumayı sağlamak adına üretilmiş 14 tanesi organik, 2 tanesi organik olmayan UV filtre bulunmaktadır. Bu filtrelerin UV ışınlarından korunmayı sağlaması iki farklı yolla olmaktadır: UV ışınlarını absorblama ve yansıtma. Kimyasal güneş koruyucuları (organik filtreler) UV ışınlarını absorblayarak, ışınları daha düşük bir enerji ve ısı olarak hücrelere yayar ve

hücreleri bu ışıklardan korur. Fiziksel güneş koruyucuları (organik olmayan filtreler) ise güneş ışınlarını yansıtarak ve dağıtarak hücreleri bu zararlı UV ışınlarından korur. Mikroalglerden elde edilen güneş koruyucu moleküller kimyasal güneş koruyucular gibi davranarak zararlı UV ışınlarını daha düşük enerji ve ısı halinde hücrelere yaymaktadır. Aynı zamanda uyarılmış hücrelerin kararlı hale gelmesini sağlayarak reaktif oksijen türlerinden hücreyi korumaktadır (Nafisi and Maibach, 2017). Reaktif oksijen türleri dolaylı olarak DNA hasarına neden olmakta ve tümör oluşumunu tetiklemektedir. Bu nedenle güneş koruyucularının kullanılması cilt kanserinden korunmak için oldukça önemlidir. Çoğu güneş koruyucunun formülasyonunda kimyasal ve fiziksel filtreler bir arada kullanılmaktadır ancak buna rağmen cildi UVA ve UVB'den aynı anda koruyamıyor olabilir ve aynı zamanda çevreye, özellikle deniz organizmalarına ve insan cildine ciddi zararlar verebilir (Downs et al., 2016; Raffa et al., 2019). Kimyasal ve fiziksel filtrelerin cilde verdiği zararlar nedeniyle son yıllarda güneşten korunurken aynı zamanda cilde hasar vermemek için güvenli olan biyoaktif ürünlere yönelim bulunmaktadır (Derikvand et al., 2017; Kim et al., 2015). Bu noktada siyanobakterilerden üretilen biyoaktif moleküller, farmasötik ve kozmetiklerde birçok fonksiyon sağlamaları ile bilinmektedir. Siyanobakteriler UV ışınlarından yararlanırken aynı zamanda kendilerini koruyabilmek adına çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan kozmetik sektörü için en önemlisi güneş koruyucu moleküllerin üretimidir. Bu moleküller geniş spektrumlu UV koruma sağlarken aynı zamanda oldukça fotostabildir ve herhangi bir toksik etkisi bulunmamaktadır (Lawrence et al., 2018). Mikroalglerin ürettiği güneşten koruyucu moleküller, kimyasal güneş koruyucuları gibi davranır ve UV radyasyonu emer ayrıca uyarılmış hücreleri stabil hale getirerek hücrenin oksidatif stresten korunmasını sağlar. Mikroalglerden türetilen, sporopollenin, mikosporin benzeri amino asitler (MAA), sitonemin gibi birçok biyoaktif bileşik güneş koruyucu özelliklere sahiptir (Priyadarshani and Rath, 2012).

Bu tez çalışmasında, mikroalg türleri mikosporin benzeri amino asit üretme kapasitelerine göre taranmış ve seçilen türler ile maliyeti en aza indirmek açısından üretimler planlanmıştır. Bunun için yapay bir ışık kaynağı kullanmadan dış alan üretimleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca pilot ölçekli biyoreaktör üretimleri de

gerçekleştirilmiştir. Üretimler sonrasında elde edilen biyokütleden kısmı saflaştırma yapılarak mikosporin benzeri amino asit içeren ekstraler elde edilmiş ve kozmetik stabilite testleri ile sitotoksisite testleri yapılmıştır. Üretim maliyetini azaltabilmek adına ayrıca mikosporin benzeri amino asit gen bölgesi bakteriye aktararak, heterolog olarak mikosporin ekspresyonu sağlanmıştır. Tez çalışması boyunca mikosporin benzeri amino asitlerin üretimine üç farklı açıdan yaklaşılmıştır ve böylelikle hem laboratuvar ortamında hem dış alanda hem de bakteride üretimlerinin gerçekleştirildiği gözlenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Mikroalgler

Mikroalgler genellikle boyutları 1-50 μm arasında değişmekte olan, bazı türlerinde 0,2 μm gibi oldukça küçük bazı türlerinde ise 200 μm gibi oldukça büyük boyutlara da ulaşabilen, fotosentez yapabilme özelliğindeki mikroskobik canlılardır. Hem prokaryot özellikte (siyanobakteriler) hem de ökaryot özellikte (yeşil algler, kırmızı algler, diatomlar, vs.) olabilmektedirler. Taksonomik olarak bazı çalışmalar prokaryot özellikte olan siyanobakterileri ayrı bir sınıf olarak incelese de özellikle ekolojik ve uygulamalı bilimlerde benzer ekolojik rolleri olduğu için ve fotosentez yapabildikleri için temel farklılıklarına rağmen siyanobakteriler mikroalgler altında incelenmektedir (Metting, 1996).

Mikroalgler dünyadaki yaşamın en başından beri bulunan atmosferdeki karbondioksiti ve güneş ışığını kullanarak fotosentez yaparak ürettiği enerjiyi kimyasal olarak depolayan ve atmosfere oksijen salan bir canlıdır. Yaklaşık 1,5 milyar yıldır dünyada olan bu canlılar, atmosferin oksijenlenmesinde rol oynamışlar ve evrimsel sürecinde farklı ortam koşullarına uyum sağlayarak türünün devamlılığını sağlamıştır. Mikroalglerin tüm evrimsel süreçleri incelendiğinde biyogeokimyasal döngüde önemli bir rol oynamalarının yanı sıra, su yaşamının önemli bir parçasıdır. Sudaki kimyasalların bulunurluğunun, miktarının ve dağılımını düzenleyerek besin ağını önemli ölçüde kontrol ederler (Lobus and Kulikovskiy, 2023).

Mikroalgler ile ilgili çalışmalar 1940'larda fotosentez ve büyük ölçekli üretimler üzerine başlamıştır. 1940-1960 yılları arasında çalışmalar daha çok mikroalglerin biyoyakıt üretimi için ve gıda kaynağı olarak kullanımına odaklanmıştır. 1970 ve 1980 yıllarında ise açık havuz sistemleri ve fotobiyoreaktörler olmak üzere büyük ölçekli üretim sistemleri üzerine çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Li et al., 2008). Mikroalglerin biyolojisi ve optimum büyüme koşulları açısından oldukça önemli gelişmeler gerçekleştirilmiştir. Bu

yıllarda ayrıca beta-karoten ve astaksantin gibi önemli maddelerin ticari olarak üretimlerine başlanmıştır. 1990-2000’li yıllara bakıldığında ise biyoteknoloji ve genetik mühendisliğindeki önemli gelişmelerle birlikte mikroalgal üretimlerin verimliliğinin artırılması sağlanmış ve enerji ve gıda sektörleri dışındaki sektörlerde de yeni uygulamaları gözlenmiştir. Bu yıllar arasında mikroalgler biyoyakıt, nutrasötik ve farmasötik sektörleri için ticarileştirilmeye başlamıştır. Yapılan çalışmalar genellikle algal biyoyakıt üretimi ve spesifik maddelerin daha yüksek verimde üretimi için genetiği değiştirilmiş suşların elde edilmesi üzerine yoğunlaşmıştır (Deepa et al., 2023). 2010 sonrası “sürdürülebilirlik” kavramının önem kazanması ile birlikte mikroalglerin enerji, gıda ve sağlık sektörlerinde öncü hale geldiği söylenebilmektedir. Yıllar içinde yapılan çalışmalarla birçok türün optimum büyüme koşulları belirlenmiş ve fotobiyoreaktörlerde kontrollü üretimleri gerçekleştirilebilmiştir. Aynı zamanda hasat tekniklerinin gelişmesi ve biyorafineri yaklaşımıyla mikroalgal üretimlerden elde edilen biyokütlenin birden fazla amaç için kullanılabilmesi sürdürülebilir bir gelecek için mikroalglerin potansiyelini öne çıkarmaktadır (Barros et al., 2015; Occhipinti et al., 2024).

2.2 Mikroalglerin Kullanım Alanları

Mikroalglerden elde edilen biyokütle ya da bileşikler, gıda, kozmetik, farmasötik, nutrasötik gibi farklı endüstriler tarafından yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Huang et al., 2024). Farmasötik sektörü tarafından kullanımının yaygınlaşması, özellikle antikanser özellikte bileşikleri ürettiklerinin keşfedilmesine ve insan sağlığı açısından yine önemli birçok özellikte anti-obezite, anti-hipertansiyon ve kardiyovasküler koruma sağlaması ile alakalıdır (Ampofo and Abbey, 2022). Gıda sektörü tarafından ise zaten halihazırda binlerce yıldır gıda olarak tüketildiğinden kullanımın artmasından söz edilebilmektedir. Artan popülasyonun protein ihtiyacını karşılayabilmek için sürdürülebilir bir gıda kaynağı olarak görülen mikroalglerin bazı türlerinin hem yüksek protein içeriği ve hem de “genellikle güvenli kabul edilen” (generally recognized as safe (GRAS)) listesinde yer almasıyla gıda sektörü tarafından ilgi çekiciliği de oldukça artmıştır (Torres-Tiji et al., 2020). Nutrasötik sektörü ise aslında hem farmasötik hem de gıda

endüstrisinin birlikteliği ve ortak ilgisiyle mikroalglerin önem kazandığı başka bir sektör haline gelmiştir. İnsanların beslenme şekilleri, pandemi gibi tüm diyet ve yaşam şeklini etkileyen faktörler, hızlı ve hazır gıdaların tüketiminin artmasıyla insanlar yeteri kadar dengeli beslenememektedir ve diyetlerini takviye gıda ve vitamin alımı ile destekleyerek sağlamaktadır. Mikroalglerin ürettiği bileşiklerin de sağlığı olumlu yönden etkileyen bu takviye gıda maddelerinden olduğu ve mikroalgler tarafından hızlı bir şekilde üretilip doğal yollardan alınan besinlerin yerini doldurabildiği gözlenmiştir (Tan et al., 2023). Kozmetik sektörü açısından önemi ise mikroalgler tarafından üretilen bazı bileşiklerin antioksidan özelliklerinin öne çıkmasıyla birlikte, UV koruyucu, anti-enflamatuvar, yaşlanma karşıtı gibi özelliği olan maddeler üretebilmeleridir. Mikroalglerden elde edilen bazı biyoaktif bileşikler, üretici türler ve farklı sektörlerdeki kullanım alanları Tablo 2.1’de listelenmiştir.

Etraflıca tüm sektörlerin mikroalglerle olan ilgisi incelendiğinde ürettikleri değerli bileşiklerin yanı sıra mikroalglerin kolay ve hızlı bir şekilde yetiştirilebilmesi ve çevre konusunda bilinçlenen tüketicinin sürdürülebilir ve “doğal” ürünlere yönelmesi artan bu ilgi üzerinde oldukça etkili olmuştur (Castro et al., 2023). Bitkisel ya da denizel kaynaklı ürünlerin yine aynı özelliklere sahip olduğu ayrıca ekosisteme zararı olmadığı ve sürdürülebilir oldukları bilinse de mikroalgler kullanılarak yapılan üretimlerin çok daha etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu sektörler tarafından gelecek vaat ettiği düşünülen ve üzerine birçok Ar-Ge çalışması yürütülen mikroalglerin birçoğunun potansiyel birer üreticiye dönüşeceği öngörülmektedir.

Tablo 2.1. Mikroalglerden elde edilen bazı biyoaktif maddeler, üreten türler ve kullanım alanları.

Biyoaktif Madde	Mikroalg Türü	Kullanım Alanları			Kaynak
		Gıda ve Nutrasötik	Farmasötik	Kozmetik	
Astaksantin	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Antioksidan, gıda takviyesi	Antioksidan, antienflamatuvar, kardiyovasküler sağlık, sinir koruma	Yaşlanma karşıtı, antioksidan, cilt nemlendirici, UV koruma	(Higuera-Ciagara et al., 2006)
β -karoten	<i>Dunaliella salina</i>	Doğal gıda boyası, pro-vitamin A	Antioksidan, pro-vitamin A aktivitesi, bağışıklık sistemini destekleyen takviyeler	Cilt koruma, yaşlanma karşıtı, antioksidan, UV koruma	(Rao et al., 2013)
Fenolikler	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Nannochloropsis gaditana</i> , <i>Scenedesmus spp.</i>	Fonksiyonel gıda	Antioksidan, antienflamatuvar, anti-kanser	Antioksidan, antienflamatuvar, cilt bakım kremi	(Delsante et al., 2022)
Fikobiliprotein	<i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Spirulina platensis</i>	Doğal gıda boyası	Antioksidan, antienflamatuvar, tıpta tanımla floresan işaretleyici olarak	Antienflamatuvar, antioksidan, nemlendirici	(Li et al., 2022)
Fikosiyenin	<i>Spirulina platensis</i>	Doğal gıda boyası	Antioksidan, antienflamatuvar, sinir koruyucu, hepatoprotektif	Yaşlanma karşıtı, antienflamatuvar, cilt bakım kremi	(Silva et al., 2023)
Fukoksantin	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Fonksiyonel gıda	Anti-obezeite, anti-diyabetik, antioksidan, anti-enflamatuvar, anti-kanser	Cilt beyazlatıcı, antioksidan, yaşlanma karşıtı	(Méresse et al., 2020)
Mikosporin Benzeri Amino Asitler	<i>Porphyridium</i> , <i>Chlamydomonas</i> , <i>Nostoc</i>	Fonksiyonel gıda	UV koruma, yaşlanma karşıtı, antioksidan	UV koruma, yaşlanma karşıtı, antioksidan	(Sen and Mallick, 2021)
Omega-3 Yağ Asitleri (DHA, EPA)	<i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Schizochytrium spp.</i> , <i>Nannochloropsis spp.</i>	Gıda takviyesi, fonksiyonel gıda	Kardiyovasküler, beyin ve göz sağlığı, antienflamatuvar	Cilt bariyerini koruma özelliği, nemlendirici	(Mimouni et al., 2015)
Polisakkaritler	<i>Porphyridium cruentum</i>	Fonksiyonel gıda	Bağışıklık sistemi aktivitesini düzenleyici ajan, antienflamatuvar, antiviral, antikoagulant	Nemlendirici, yaşlanma karşıtı, cilt koruyucu	(Casas-Arrojo et al., 2021)

2.2.1 Kozmetikte Mikroalgler

Son yıllarda kozmetik sektörü, formülasyonlarında doğal ve sürdürülebilir içerikleri kullanmaya başlamıştır. Bu noktada mikroalgler ürettikleri oldukça zengin içerikli biyoaktif bileşikler nedeniyle ve sürdürülebilirlikleri açısından kozmetik sektöründe oldukça bilinen mikroorganizmalar haline gelmiştir (Alassali et al., 2016).

Özellikle sürdürülebilirliğin önem kazanmasıyla beraber mikroalgler de kozmetik sektörü için önemli hale gelmiştir. Mikroalglerin kozmetik sektörü için popüler hale gelmesi öncesinde doğal ve sürdürülebilir kaynak olarak bitkisel maddeleri içeren kozmetik ürünler önemli bir noktadaydı ancak bitkilerin geleneksel üretiminin aksine, mikroalgal üretimin kapalı ve kontrollü koşullarda minimum alan ve su kullanarak gerçekleştirilebiliyor olması onları daha sürdürülebilir bir alternatif haline getirmiştir (Derikvand et al., 2017). Büyüme hızlarının daha yüksek olması, yıl boyu üretimin gerçekleştirilebilmesi ve üretimin daha yüksek verimli gerçekleştirilebilmesi nedeniyle mikroalgal içerikli kozmetikler daha sürdürülebilir ürünler olarak görülmektedir. Ayrıca, mikroalglerin kozmetik üretimlerinin ekolojik ayak izinin düşürülmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Santoso et al., 2023). Çünkü üretimlerinde karbondioksitin tutulması ve atık su biyoremediasyonu sağlanabilmektedir ve bu da endüstriyel faaliyetin zararlı etkilerinin bir kısmını azaltabilmektedir.

Mikroalglerin ürettiği geniş yelpazeli biyoaktif maddeler cilt ve saç bakımı açısından oldukça önemlidir (Mohamed Abdoul-latif et al., 2021). Cilt sağlığı ve görüntüsü açısından mikroalgler tarafından üretilen vitaminler, mineraller, proteinler, lipitler ve pigmentler çok önemlidir. Örneğin, yüksek antioksidan içeriği cildin çevresel kirliliklerden korunmasına yardımcı olurken, nemlendirici ve yenileyici özellikleri cildin nemlenmesini ve onarımını desteklemektedir.

Mikroalgal biyokütle temel vitaminler açısından oldukça zengindir. Özellikle beta-karoten (A vitamini) açısından değerli bir üretici olduğu yapılan ilk çalışmalarda ortaya konmuş ve ticarileşmesi yine erken yıllarda başarılı bir şekilde

gerçekleştirilmiştir (Lucía Morocho-Jácome et al., 2020). *Dunaliella salina* tarafından yüksek miktarlarda üretilen beta-karoten, yüksek antioksidan özelliğinde ve A vitamini öncüsüdür (Celente et al., 2022). Yüksek antioksidan özelliği sayesinde yaşlanma karşıtı özellik göstermektedir (Zheng et al., 2022). Genellikle cildi oksidatif stresten korumak amacıyla kremlerde, losyonlarda ve serumlarda kullanıldığı ve cilt tonunu eşitleyerek cildi sağlıklı bir görüntüye ulaştırdığı gözlenmiştir (Wang et al., 2022). Beta-karoten üretiminin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi mikroalgal üretimlerin ticarileştirilmesi açısından öncülük etmiştir. Mikroalgler ayrıca B, C ve E vitaminleri açısından da zengindir (Koyande et al., 2019). Bu vitaminler cilt yenilenmesinde, kolajen sentezinde ve oksidatif strese karşı cildi korumada kritik bir rol oynamaktadır. Kalsiyum, magnezyum, potasyum gibi temel mineraller de mikroalglerde bulunmaktadır ve cildin nemlendirilmesi ve elastikiyeti açısından önemli kozmetik içeriklerindendir (Koyande et al., 2019). Mikroalgler cilt onarımı, yenilenmesi ve cilt bariyerinin koruması açısından önemli olan protein ve amino asitlerce de zengindir. Yağ asitlerinden omega-3 ve omega-6 üretimi de mikroalgler tarafından gerçekleştirilmektedir ve bu yağ asitleri de yine aynı şekilde cildin nem bariyerini korumak ve ciltten su kaybını önleme açısından önemli maddelerdir (Barta et al., 2021; Nayak et al., 2020). En çok bilinen karotenoid olan astaksantin ve en yaygın fikobiliprotein olan fikosiyanin oldukça yüksek antioksidan aktivite göstermektedir ve cildi çevresel stres koşullarından koruma açısından kozmetik formülasyonları için önemlidir (Dutta et al., 2023). Çevresel stres koşullarından biri olan UV radyasyondan koruyan bir bileşik olan mikosporin benzeri amino asitler mikroalgler tarafından üretilmekte ve geniş bir aralıkta UV radyasyonunu absorplayarak güneş koruma etkisi gösterebilmektedir (Sen and Mallick, 2021).

Kozmetik ürün kullanıcıları özellikle son yıllarda artan çevresel farkındalıkla beraber kullandıkları ürünlerle ekosisteme mümkün olduğunca az zarar verme gayretindedirler. Mikroalglerin doğal ve çevre dostu ürünler üretebiliyor olmaları kullanıcıların bu gayretini tatmin edecek noktadadır. Kozmetik endüstrisi, ürün stabilitesini ve etkinliğini korurken faydalarını en üst düzeye çıkaracak şekilde doğal bileşenleri dahil etmek için sürekli olarak çalışmalar yapmaktadır. Mikroalg ekstreleri, yüksek performanslı serumlardan ve nemlendiricilerden canlandırıcı

maskelere ve saç bakım ürünlerine kadar çok çeşitli formülasyonlara entegre edilmektedir (Imbimbo et al., 2024; Martínez-Ruiz et al., 2022; Yang et al., 2023). Çok yönlülükleri hem anında hem de uzun vadede faydalar sunan ürünlerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır.

Avantajlarına rağmen, kozmetiklerde mikroalg kullanımıyla alakalı bazı zorluklar bulunmaktadır. Mikroalg ekstraktlarının ya da saf madde elde ediminin maliyeti yüksek olabilmektedir ve bu da ürün fiyatlandırmasını etkileyebilmektedir (Mourelle et al., 2017). Ayrıca bu maddelerin stabilite ve etkinlikleri sağlamak dikkatli araştırma ve geliştirme gerektirmektedir (De Luca et al., 2021). Bu dezavantajları nedeniyle hali hazırda piyasada bulunan kozmetik ürünlerin yerini alabilmeleri için çalışmaların yapılması gerekmektedir.

2.3 Mikosporin Benzeri Amino Asitler (MAA)

UV koruma sağlayan moleküllerin keşfi 1960'lara dayanmaktadır. İlk olarak 1960 yılında denizanalarında Wittenburg tarafından daha sonra 1961 yılında Tsujino tarafından kırmızı alglerde ve 1969 yılında Shibata tarafından mercan ekstraktlarında oldukça güçlü UV absorplama özelliği olan maddeler keşfedilmiştir. Bu maddelerin UV ışınlarını 310-360 nm aralığında absorplayabildiği belirtilmiş ancak maddelerin karakterizasyonu yapılmamıştır (La Barre et al., 2014).

Mikroalgler güneş ışınlarını kullanırken aynı zamanda bu ışınların zararlı etkilerinden kendilerini korumak adına farklı mekanizmalar geliştirmiştir. Güneş koruyucu küçük moleküllerin üretimi ve depolanması da bu mekanizmalardan biridir. Bu küçük güneş koruyucu maddelerden biri olan mikosporin benzeri amino asitler (MAA), UV ışınlarını absorplayarak kimyasal enerji halinde hücre içerisine bu enerjiyi dağıtır ve böylelikle hücreyi UV ışınlarına bağlı oluşan DNA hasarından korumaktadır (Bhatia et al., 2011; Sun et al., 2020).

MAA'lar düşük moleküler ağırlıklı, küçük boyutlu, renksiz, oldukça stabil sekonder metabolitlerdir ve mikroalgler tarafından üretilmektedir (Vega et al., 2021). Maksimum absorplama dalga boyları MAA türüne göre değişmekle birlikte

310-365 nm aralığındaki dalga boylarındaki ışınları absorbe edebilmektedirler ki bu da UVA ve UVB radyasyon dalga boylarının aralığındadır (McMillan et al., 2010; Sun et al., 2020).

2.3.1 Yapısı ve biyosentezi

MAA'lar tipik olarak bir aminosikloheksenon veya bir aminosikloheksimin halkasından oluşmaktadır. Bu halkalara eklenen amino asitlerle birlikte, UV radyasyonunu absorplama yeteneklerini artmaktadır (Tartarotti and Sommaruga, 2006).

MAA'ların biyosentezi, basit amino asitleri karmaşık, UV absorplayan bileşiklere dönüştüren bir dizi karmaşık biyokimyasal reaksiyonu içermektedir. UV maruziyeti sonrasında biyosentez başlamaktadır. Marin mikroalglerde pentoz fosfat yolağı ile MAA sentezinin gerçekleştiği bilinmektedir. Sedoheptuloz-7-fosfat, farklı enzimlerle MAA'lar için öncü olan 4-deoksigadusolü oluşturur. Farklı amino asitlerin bu çekirdek yapıya bağlanması ile farklı MAA'lar elde edilmektedir (Peng et al., 2023).

MAA'lar azot sübstitüentleri içeren aminosiklohekzenon ve aminosiklohekzimin halkalarından oluşan düşük moleküler ağırlıklı moleküllerdir (Peng et al., 2023). Siklohekzenon grupları okso-MAA'lar, siklohekzemin grupları imino-MAA'lar olarak adlandırılmaktadır (Torres et al., 2018). İki ana MAA türü olan mikosporin-glisin ve mikosporin-taurin aminosiklohekzenon grubu MAA'lardandır ve aminosiklohekzenonlara bir amino asit bağlanmasıyla oluşmaktadır. Aminosiklohekziminler ise bir amino asit, metilamin ya da amino alkolün üçüncü karbon atomuna enaminon kromoforunun ise birinci karbon atomuna bağlanmasıyla oluşmaktadır. Genellikle MAA halka yapısının üçüncü karbon atomunda bir glisin substitüenti bulunur ancak imin grubu MAA'larda glikozidik bağlar ve sülfat esterleri de bulunabilmektedir. Siklohekzenon MAA'lara göre imin grupları çok daha fazla çeşit barındırmaktadır (Peng et al., 2023). Mikosporin glisine serin eklenmesiyle elde edilen shinorine, treonin eklenmesiyle elde edilen porphyra-334 gibi imino-MAA'lar primer olarak adlandırılırken amino

asit yan gruplarında gerçekleşen çeşitli modifikasyonlar ile de asterina-334, palythiol gibi sekonder imino-MAA'lar elde edilmektedir (Torres et al., 2018). MAA'lar maksimum absorpsiyon değerleri 310 ile 360 nm dalga boyları arasında yoğunlaşmaktadır. Molekülde bulunan konjüge çift bağların varlığına ve yan grupların ve azot substitüentlerine bağlı olarak maksimum absorpsiyonları değişmektedir. Siklohekzenon yapısındaki MAA'ların maksimum absorpsiyonu 310 nm iken siklohekzilamin yapılarında 360 nm'lerdedir (Peng et al., 2023). Farklı MAA'ların yapıları ve maksimum absorpsiyonları Tablo'da verilmiştir. Böylelikle geniş bir spektrumda UVA ve UVB ışınlarını absorplama özellikleri olduğundan bahsedilebilmektedir.

2.3.2 Güneş Kremi Olarak MAA'lar

MAA'lar UVA ve UVB ışınlarını güçlü bir şekilde absorplama özellikleri ile bilinen maddelerdir. Organizmaları zararlı güneş ışınlarından korumak için etkili bir şekilde UV radyasyonunu absorbe edebilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle güneş kremi olarak kullanılmak üzere umut vaat etmektedir (Álvarez-Gómez et al., 2019).

Sentetik UV filtrelerinin aksine MAA'lar doğal maddelerdir. Biyobozunurdur ve ciltteki olumsuz etkileri çok daha azdır. Bu da onları önemli çevre dostu ve hipoalerjenik kozmetik ürün haline getirmektedir (Rosic et al., 2023). UV filtrelere kıyasla aynı zamanda daha stabildirler. Güneş kremlerinin sıcaklıktan etkilenmemesi oldukça önemlidir. MAA'lar sıcaklık, pH değişimi gibi değişikliklerden etkilenmeden yapılarını ve fonksiyonlarını korumaya devam etmektedir (Vega et al., 2021).

Güneş kremi formülasyonunu geliştirme arayışında olan kozmetik sektörü tarafından diğer UV filtrelerinin yanı sıra yalnızca MAA'lar içeren kremler oluşturabilme potansiyelini araştırılmaktadır. Suda çözünür olan ve yüksek fotostabilite gösteren MAA'ların benzersiz özelliklerinden yararlanarak güneş kremlerinin etkinliğini artırmayı amaçlamaktadır. MAA'ların UVB bölgesinde UV radyasyonunu absorplama yeteneği, absorbans maksimumlarıyla kanıtlandığı gibi,

güneş kremi formülasyonları içerisinde bulunan UV filtreleri etkili bir şekilde tamamlayabileceklerini göstermektedir (Soilán et al., 2024). MAA'ların fotostabilitesi çeşitli analitik tekniklerle doğrulanarak kozmetik formülasyonlarında stabil kalarak uzun süreli raf ömrü için de uygun olduklarını göstermektedir (Soilán et al., 2024).

İstenen UV bölgesinde maksimum absorbansa sahip uygun MAA'yı seçmek, etkili güneş kremleri formüle etmek için çok önemlidir. Araştırmalar, MAA'ların kapsamlı güneş koruması sağlamak için kritik öneme sahip olan UVA ve UVB bölgelerinde, özellikle çeşitli dalga boylarında UV radyasyonunu absorplayacağını göstermektedir (de la Coba et al., 2019). MAA'ların güneş kremi formülasyonlarına dahil edilmesi yalnızca UV korumasını artırmak açısından değil, aynı zamanda cilt ve çevre için çeşitli sorunlara yol neden olan sentetik UV filtrelerinin de azaltılmasına olanak tanımaktadır. Örneğin, güneş kremi formülasyonlarında MAA'ların kullanımı ile diğer UV koruyucu kimyasal filtrelerin konsantrasyonu azaltılarak olumsuz reaksiyon riskinin en aza indirebileceği düşünülmektedir (de la Coba et al., 2019).

MAA içeren güneş kremlerinin formülasyonu ayrıca çözünürlüklerini ve stabilitelerini de dikkate almalıdır. MAA'ların tipik olarak suda çözünür olduğu göz önüne alındığında, çeşitli çevre koşullarında stabilitelerini ve etkinliklerini koruyan formülasyonlar geliştirmek esastır. Bu formülasyonların geliştirme sürecinde stabilite testleri, etkinlik değerlendirmeleri ve güvenlik değerlendirmeleri çok önemlidir. Bu tür testler, son ürünün yalnızca yeterli UV koruması sağlamasını değil, aynı zamanda tüketici kullanımı için güvenli olmasını da sağlamaktadır (Ma and Yoo, 2021).

MAA içeren güneş koruyucu formülasyonlarının son paketleme süreci, etkinliklerini korumak için kritik öneme sahiptir. Paketleme, formülasyonu zamanla aktif bileşenleri bozabilecek ışık ve hava maruziyetinden koruyacak şekilde tasarlanmalıdır. Çünkü yeterli şekilde korunmazlarsa fotokimyasal kararlılıkları tehlikeye girebilir (Losantos et al., 2015).

UV absorplama özelliklerine ek olarak, MAA'ların antioksidan özelliklere sahip olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir, bu da güneş koruyucu formülasyonlarında bileşen olarak çekiciliklerini daha da artırmaktadır. Bu bileşikler UV radyasyona maruziyet sonucu oluşan reaktif oksijen türlerini (ROS) süpürebilir ve böylece fotoyaşlanmaya ve cilt hasarına karşı ek bir koruma katmanı sağlayabilmektedir (Rosic, 2019). MAA'ların bu etkileri, değerli UV radyasyonunu absorplamak ve serbest radikalleri süpürmek, sayesinde bu bileşikler cilt sağlığını korumayı amaçlayan gelişmiş güneş kremlerinin formülasyonunda potansiyel bileşikler olarak önemli bir noktaya getirmektedir.

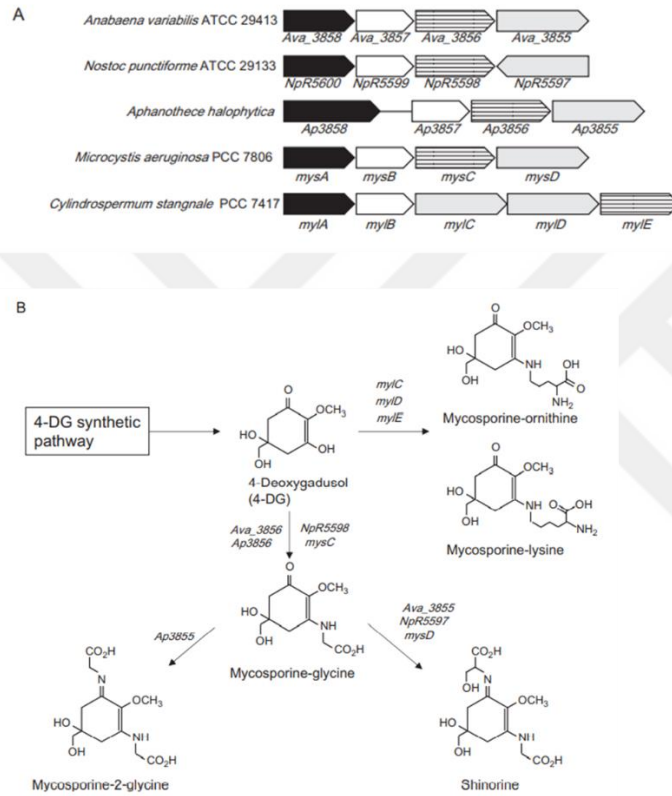
Sonuç olarak, MAA'ların güneş kremi formüllerine entegre edilmesi, tüketici güvenliğini ele alırken UV korumasını artırmak için umut verici bir yol sunmaktadır.

2.4 Mikosporin Benzeri Amino Asitlerin Heterolog Ekspresyonu

Mikosporin benzeri amino asitlerden (MAA) biri olan shinorine maddesinin biyosentezi *Escherichia coli*'de heterolog ekspresyonu ile aydınlatılmıştır ve shinorine biyosentezi MAA biyosentezinde model bir yolak haline gelmiştir. *Anabaena variabilis* ATCC 29413'te shinorine biyosentezine ait dört gen bölgesi keşfedilmiştir: *ava_3855* ve *ava_3858* gen bölgeleri arasındaki dört gen bölgesi (Şekil 2.1a). Shinorine sentezindeki ilk adım sedoheptuloz-7-fosfatın (SH-7P), 2-dimetil-4-deoksigidusole (DDG) çevrilmesidir. Daha sonra DDG, mikosporin benzeri amino asitlerin ana bileşeni olan 4-deoksigidusole (4-DG) çevrilir. Farklı gen bölgelerinin işlevleri ile farklı mikosporin benzeri amino asitler elde edilir (Şekil 2.1b) (Katoch et al., 2016).

Her ne kadar üretim yolları keşfedilmeye başlanmışsa da hala tam olarak anlaşılamamıştır. MAA'ların endüstride ekonomik açıdan uygun bir şekilde yaygın olarak kullanılmamasının nedenlerinden biri de spesifik MAA üretiminde yer alan biyosentetik yollar hakkındaki bilgi eksikliğidir. Bu biyosentez yollarının daha iyi anlaşılması, örneğin heterolog bir bakteriyel konakçıda daha büyük ölçekli üretimi kolaylaştırabilir. Balskus et al. (2010), shinorine üretimini açıklığa kavuşturmak

için *E. coli*'de heterolog ekspresyon kullanmıştır. *E. coli*'de MAA'ların heterolog ekspresyonu ile dört ürün daha üretilmiştir: mikosporin-glisin, mikosporin-ornitin, 4-deoksigadusol ve mikosporin-lizin. Bu günlerde çalışmaların çoğu, doğal olarak oluşan MAA'ların yerine MAA'lar üretmek için genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kullanılması üzerine yoğunlaşmaktadır. Yeni nesil güneş kremlerinin aktif maddesi olan MAA'ların üretiminde heterolog ekspresyonun önemli bir noktada olduğu düşünülmektedir (Geraldles and Pinto, 2021).



Şekil 2.1. Siyanobakteriyel MAA sentetik yolu. a) Farklı mikroalglerin MAA sentetik gen kümeleri. Siyah oklar DHQS/EVS (3-dehydroquinate sentaz/ 2-epi-5-epi-valiolone sentaz) beyaz oklar O-MT'yi (O-metiltransferaz), taranmış oklar ATP-grasp ve gri oklar NRPS(Nonribozomal peptid sentaz)/D-Ala-D-Ala ligazı göstermektedir b) MAA biyosentetik yolu (Kageyama and Waditee-Sirisattha, 2018).

2.4.1 SLIC (Dizi ve bağlamadan bağımsız klonlama)

Dizi ve bağlamadan bağımsız klonlama (sequencing and ligation independent cloning, SLIC), geleneksel restriksiyon enzimi tabanlı yöntemlerin getirdiği kısıtlamalar olmadan birden fazla DNA parçasının birleştirilmesine olanak tanıyan moleküler klonlama tekniklerinde önemli bir ilerlemeyi temsil eden bir yöntemdir.

SLIC'in geliştirilmesi, özellikle yüksek verimli uygulamalar ve karmaşık genetik yapılar bağlamında klonlama prosedürlerinin verimliliğini ve esnekliğini artırmada önemli bir rol oynamıştır.

SLIC'in temel prensipleri ilk olarak, Li ve Elledge (2007) tarafından ortaya konan hem vektör hem de DNA parçalarında tek zincirli uç uzantıları (overhang) oluşturmak için T4 DNA polimerazını kullanımına dayanmaktadır. Bu süreç, tamamlayıcı dizilerin primerlerin açılan DNA zincirine yapışmasını kolaylaştırarak tek bir reaksiyonda birden fazla parçanın birleştirilmesini sağlamaktadır (Li and Elledge, 2012, 2007). Doğal hücresel süreçleri taklit ederek bağlanmaya gerek kalmadan verimli ve hassas DNA birleştirilmesine olanak tanımaktadır (Li and Elledge, 2007; Unger et al., 2010). Bu yöntemin, aynı anda birden fazla DNA parçasının dahil edilmesine izin vererek klonlama sürecini önemli ölçüde kolaylaştırdığı için karmaşık plazmitler oluşturmak için özellikle etkili olduğu gösterilmiştir (Stevenson et al., 2013).

SLIC'in geleneksel klonlama yöntemlerine göre temel avantajlarından biri, belirli restriksiyon bölgelerinden bağımsız olmasıdır. Geleneksel klonlama genellikle DNA parçası ve vektör içinde benzersiz restriksiyon enzim bölgelerinin varlığını gerektirir; bu da dizi seçimini sınırlayabilir ve klonlama sürecini karmaşıklatabilmektedir (Quan and Tian, 2009; Stevenson et al., 2013). Buna karşılık, SLIC herhangi bir dizinin kullanılmasına izin vererek klonlama uygulamalarının çok yönlülüğünü artırmaktadır. Bu özellik, birden fazla yapının hızlı bir şekilde birleştirilmesinin önemli olduğu yüksek verimli klonlama bağlamında özellikle faydalı hale gelmektedir (Berrow et al., 2007; Jeong et al., 2012).

Metabolik mühendislikteki son gelişmeler, özellikle UV emici özellikleri ve potansiyel faydaları ile bilinen mikosporin benzeri bir amino asit (MAA) olan shinorine gibi değerli bileşiklerin üretiminde SLIC'in uygulanması için yeni yollar açmıştır (Katoch et al., 2016). Shinorine, siyanobakterilerde bulunan ve sedoheptuloz-7-fosfatın shinorinin öncüsü olan 2-demetil-4-deoksigidusol'e dönüştürülmesinden sorumlu genleri içeren belirli bir gen kümesi aracılığıyla

biyosentezlenir (Katoch et al., 2016). Bahsedildiği gibi SLIC'in metabolik mühendislik stratejileriyle bütünleştirilmesi, gerekli biyosentetik genlerin uygun bir ifade vektörüne verimli bir şekilde birleştirilmesini sağlamaktadır. Bu yaklaşım, çeşitli MAA'ların üretimi için etkili konaklar olduğu gösterilen *E. coli* veya *Saccharomyces cerevisiae* gibi model organizmalarda shinorine bileşiğinin heterolog üretimini kolaylaştırabilmektedir (Jin et al., 2021). Yapılan çalışmalar, SLIC yöntemini kullanarak shinorine bileşiğinin verimini artıran gen kümelerini hızla oluşturabilir ve optimize edebilir, böylece farmasötiklerde ve kozmetiklerde bu bileşiğe olan artan talebi karşılayabileceğini göstermektedir (Jin et al., 2021).

SLIC yönteminin birden fazla parçayı aynı anda birleştirme yeteneği ve belirli kısıtlama bölgelerinden bağımsız olması gibi avantajları, onu shinorine biyosentezinde yer alan karmaşık yolları oluşturmak için özellikle uygun hale getirebilmektedir. Örneğin, SLIC yönteminin kullanımı, shinorine bileşiğinin verimli üretimi için gerekli olan birden fazla geni tek bir vektöre entegre etme sürecini kolaylaştırmaktadır (Geu-Flores et al., 2007). Ayrıca, yöntemin yüksek verimli uygulamalarla uyumluluğu, çeşitli genetik yapıların hızlı bir şekilde taranmasını sağlayarak, shinorine üretimi için optimum yapılandırmaların belirlenmesini kolaylaştırmaktadır (Berrow et al., 2007; Jeong et al., 2012).

SLIC'nin shinorine bileşiğinin üretiminde başarılı bir şekilde uygulanması, klonlamanın gerçekleştiği koşulların optimize edilmesiyle daha da geliştirilebilir. Enzim konsantrasyonu ve sıcaklık gibi reaksiyon parametrelerinde yapılan optimizasyonlar, klonlama sürecinin verimliliğini önemli ölçüde iyileştirebilir ve istenen ürünün daha yüksek verimde elde edilmesini sağlayabilmektedir (Stevenson et al., 2013). Bu optimizasyon, gen ekspresyonu ile shinorine üretimini en üst düzeye çıkarmak için kritik olduğu karmaşık metabolik yollarla çalışırken çok önemli bir hale gelmektedir.

Sonuç olarak, shinorine biyosentezinin SLIC çerçevesine entegre edilmesi, bu değerli bileşiğin sürdürülebilir üretimi için umut verici bir strateji sunmaktadır. Bu yöntem ile shinorine ve diğer mikosporin benzeri amino asitler için verimli üretim sistemlerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynayacağı öngörülmektedir.

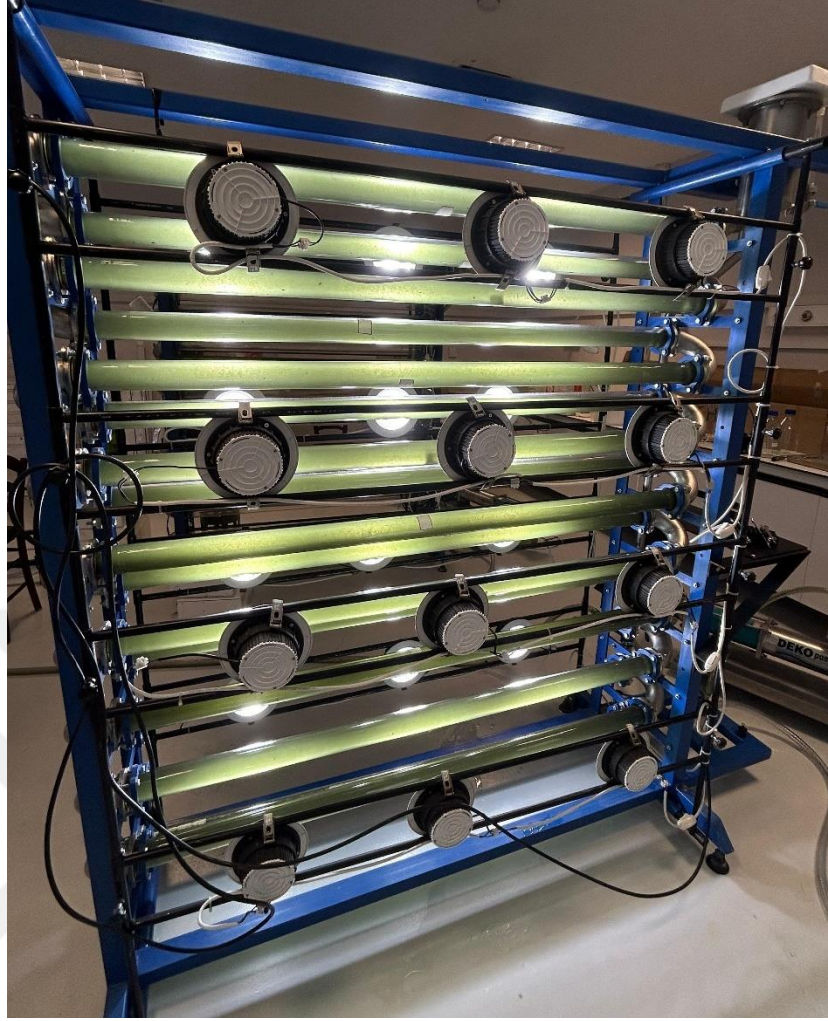
2.5. Mikroalglerin Fotobiyoreaktörlerde Üretimi

Mikroalglerin üretimleri için kullanılan en önemli iki sistemden biri kapalı bir kültür sistemi sağlayan çeşitli tipteki fotobiyoreaktörler, diğeri ise açık havuzlardır (Manu et al., 2024).

Açık havuzlarla karşılaştırıldığında fotobiyoreaktörlerin birçok avantajı bulunmaktadır. Kapalı kontrollü bir sistem olan fotobiyoreaktörler, üretimi gerçekleştirilen mikroalgin optimum sıcaklık ve pH koşullarında üretimini sağlamaktadır. Karbondioksit ve oksijen seviyeleri izlenebilir ve kontrol edilebilir. Fotobiyoreaktörler ayrıca ışık penetrasyonunu maksimize edecek şekilde tasarlandıklarından daha yüksek fotosentetik aktivite elde edilebilmektedir. Kapalı bir sistem oldukları için kontaminasyon riski minimize edilerek yüksek verimde ve saf mikroalg biyokütlesine ulaşılmaktadır (Narala et al., 2016). Fotobiyoreaktörlerin ayrıca kolaylıkla ölçekleri büyütülebilir ya da küçültülebilir böylelikle küçük ölçekli laboratuvar çalışmalarından büyük ölçekli endüstriyel üretimlere kadar, farklı ölçekte üretimler gerçekleştirilebilmektedir. Sürdürülebilirlik açısından avantajları ele alındığında ise açık havuzlardaki buharlaşmadan kaynaklanan su kaybı gözlenmediği için daha az su kullanılmaktadır (Penloglou et al., 2024). Ayrıca fotobiyoreaktörler dik konumlandırılacak şekilde tasarlandıkları için açık havuzlara göre daha az arazi alanı kullanarak her bir birim alan için daha yüksek biyokütle üretimi sağlanmaktadır. Fotobiyoreaktörlerin oldukça önemli avantajları olmasına rağmen hem yatırım hem de işletme maliyetleri çok yüksektir. Yüksek maliyetler nedeniyle farmasötik ve kozmetik gibi sektörler için katma değeri yüksek bileşiklerin üretiminde daha fazla tercih edilmektedirler.

İstenilen ürüne göre maliyeti en aza indirebilmek için farklı biyoreaktörler tasarlanmıştır. En çok kullanılan fotobiyoreaktör tipleri tübüler fotobiyoreaktörler, panel fotobiyoreaktörler, kabarcık kolon ve hava kaldırma fotobiyoreaktörler ve karıştırma tank fotobiyoreaktörlerdir.

Tübüler fotobiyoreaktörler etkili bir üretim sistemi olmaları ve ölçek büyütmeye olanak sağlamaları nedeniyle fazla tercih edilen fotobiyoreaktörlerden biridir. Genellikle uzun, cam ya da plastik transparan tüplerin farklı konfigürasyonlarda düzenlenmesiyle oluşturulmaktadır (Şekil 2.2) (De Vree et al., 2015). Karıştırma, kültür ortamının pompalar yardımıyla tüplerin içerisinde dolaştırılmasıyla sağlanmaktadır. Fotosentetik aktivitenin artırılması amacıyla mikroalg kültürünün maksimum ışık alabilmesi için uzun ince tüpler şeklinde tasarlanmaktadır (Penloglou et al., 2024). Kültür ortamının sürekli olarak tüpler içerisinde dolaştırılması sayesinde etkili bir besin dağılımı gerçekleşmektedir. Her ne kadar yüksek fotosentetik aktivite ve sonucunda yüksek biyokütle verimi sağlasa da geniş yüzey alanı nedeniyle fazla ısınmaya neden olabilmektedir ve bu da soğutma sistemlerine ihtiyaç doğurmaktadır. Dolayısıyla pompalama sistemi ve bu soğutma sistemlerinin kullanılması nedeniyle maliyeti yüksek olabilmektedir. Ayrıca tüplerde biyofilm oluşabilmekte ve bu da ışığın kültüre ulaşmasını engelleyebilmektedir (De Vree et al., 2015).



Şekil 2.2. Tübüler fotobiyoreaktör (Fotoğraf yazar tarafından çekilmiştir.)

Panel fotobiyoreaktörler etkili alan kullanımı ve ışığın iyi bir şekilde kültüre dağılması nedeniyle oldukça yaygın olarak kullanılan bir başka çeşit fotobiyoreaktördür. Tasarımsal olarak düz ve transparan cam ya da plastik panellerden oluşmaktadır (Şekil 2.3) (Penloglou et al., 2024). Işığın kullanımını maksimize etmek için yatay ya da dikey konumlandırılabilir. Havalandırma yardımıyla ya da mekanik olarak karışım sağlanarak kültürün ışığa ve nutrientlere eşit bir şekilde ulaşması sağlanmaktadır. Modüler ek paneller monte edilerek ölçek büyütmesi sağlanabilmektedir. Genellikle dikey konumlandırıldıkları için çok fazla alan kaplamamaktadır. Dış alanda konumlandırmaya uygundur. Kullanımı ve temizliği oldukça kolaydır. Tüm bu avantajlarına rağmen fotoinhibisyon ve

sıcaklığın kontrolündeki sıkıntılar dezavantajlarındandır (Abdur Razzak et al., 2024).



Şekil 2.3. Panel fotobiyoreaktör (Fotoğraf yazar tarafından çekilmiştir.)

2.6. Mikroalglerin Dış Alanda Fotobiyoreaktörlerde Üretimi

Dış alanda mikroalg üretimi büyük ölçeklerde çalışma potansiyeli ve doğal ışığı kullanma nedeniyle daha düşük işletme maliyeti olduğu için yaygın bir uygulamadır. Açık havuzlardaki üretimlerin yanı sıra fotobiyoreaktörlerin de dış alanlara kurulumu gerçekleştirilebilmektedir. Fotobiyoreaktörler de her ne kadar kapalı alanlarda daha yaygın olarak kullanılsa da özellikle tübüler ve panel fotobiyoreaktörlerin dış alanlarda kullanımıyla beraber daha az enerji tüketimi sağlanmakta ve daha enerji dostu sistemler haline gelmektedir.

Dış alanlarda yapılan üretimlerin en büyük avantajı güneş ışığından yararlanılarak yapay bir ışık kaynağı kullanmanın önüne geçebilmesidir. Böylelikle enerji maliyeti önemli bir şekilde azaltılmış olur. Ancak en önemli dezavantajlarından biri ise tamamen çevresel koşullara bağımlı olmasıdır. Kapalı olmayan ortamlarda sıcaklık dalgalanması, ışık yoğunluğunun sürekli olarak değişmesi ve mevsimsel farklılıklar nedeniyle verimlilik etkilenebilmektedir (Ras et al., 2013). Bu kısıtlamalar nedeniyle dış alanda mikroalg üretimi iklimsel koşulların daha ılıman olduğu yerlerde daha etkili bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Mazzelli et al., 2020).





3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu bölümde tez çalışmasında; kullanılan kimyasal ve cihazlar ile uygulanan yöntemler açıklanmıştır. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü ve Centre Algatech, Institute of Microbiology, The Czech Academy of Sciences (Çek Bilimler Akademisi Mikrobiyoloji Enstitüsü Algatech Merkezi) bünyesinde gerçekleştirilmiştir.

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Marka
Agaroz	Merck
Amonyum Ferik Sitrat	Merck
Asetonitril	Merck
BHT	Merck
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	Merck
CuSO ₄ .5H ₂ O	Merck
DMEM High Glucose	Serox
DMSO	Sigma
DpnI restriksiyon enzimi	New England Biolabs
DPPH	Sigma
EDTA-Na ₂	Merck
FBS	Serox
Gentamisin	BI Biological Industries
H ₃ BO ₃	Merck
Hekzan	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
Kanamisin	Merck
Kloroform	Merck
LB Broth, Powder	Thermo Fisher Scientific
L-glutamin	Capricorn Scientific
M9 Minimal Medium	Thermo Fisher Scientific
Metanol	Merck
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck

Tablo 3.1. (devam)

MnCl ₂ .4H ₂ O	Merck
MTT	Sigma
Na ₂ CO ₃	Merck
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Merck
NaCl	Merck
NaCO ₃	Merck
NaNO ₃	Merck
OneTaq DNA polimeraz enzimi	New England Biolabs
PBS	Capricorn Scientific
Q5 DNA polimeraz enzimi	New England Biolabs
S.O.C Medium	Thermo Fisher Scientific
Sitrik Asit	Merck
Tris-EDTA	Merck
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Merck

3.2 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar.

Cihaz	Marka
-80°C derin dondurucu	Thermo Scientific
Bilgisayar kontrollü penetromere	TA-XT Plus, Stable Micro System
CO ₂ ’li inkübatör	Thermo Scientific
Çalkalamalı inkübatör	ZHWY-2112B, ZCICHENG
Etüv	WiseVen
HPLC	Thermo Scientific DionexUltiMate 3000 UHPLC (Thermo Scientific)
HPLC/MS	ESI-HRMS; Impact HD Mass Spectrometer, Bruker
Işık ölçer	Inkatech
Laminar akışlı steril kabin	HFSafe 1200, Heal Force
Laminer hava akışlı biyogüvenlik seviyesi-II kabin	Heraeus
Liyofilizatör	Christ, Alpha 1-2 L-D plus
Manyetik karıştırıcı	MSH-20A, Wise Stir
Mikroplaka okuyucu	BioTek Instruments, USA
Mikroskop	Micros

Tablo 3.2. (devam)

Nanodrop	Thermo Scientific
Otoklav	HV-50L, Hirayama
PCR	Analytik Jena
pH metre	HI2211 pH/ORPmeter, HANNA Instruments
Reometre	Brookfield DVNext
Rotary Vakum Evaporatör	Stuart RE300
Santrifüj	NF400, Nüve
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf
Sonikatör	Bandelin
Spektrofotometre	Optizen POP, MECASYS
Stabilite kabini	TK 252, Nüve
Su Banyosu	Stuart
Tek noktalı viskozimetre	And Vibro Viscometer SV-10
Terazi	Explorer Pro, OHAUS
Ultrasonik banyo	Lab Companion UC-10
Vorteks karıştırıcı	VM-10, ViseMix

3.3 Kullanılan Besin Ortamları

Mikroalglerin büyütülmesinde kullanılan ortamların reçetesi Tablo 3.3, Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3 3. Guillard's f/2 besin ortamı reçetesi (Guillard and Ryther, 1962)

Kimyasal Adı	Miktar
NaNO ₃	0,075 g/L
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,005 g/L
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	0,03 g/L
İz Metal Solüsyonu ^a	1 ml
Vitamin Solüsyonu ^b	1 ml
İz Metal Solüsyonu^a	Miktar
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15 g/L
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4,36 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8 g/L
Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	6,3 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22 g/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	10 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	180 g/L

Tablo 3.3. (devam)

f/2 Vitamin Solüsyonu^b	Miktar
Tiyamin	200 mg
Biotin	0,1 g/L
Cyanocobalamin	1 g/L

Tablo 3.4. Zarrouk besin ortamı (Pawar et al., 2015)

Kimyasal Adı	Miktar (g/L)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,5
NaNO ₃	2,5
K ₂ SO ₄	1
NaCl	1
MgSO ₄	0,2
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄	0,01
Na-EDTA	0,08
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222
Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	0,07
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079
A5 metal solüsyonu ^a	1 ml
A5 metal solüsyonu^a	Miktar (g/L)
H ₃ BO ₃	2,86
(NH ₄) ₆ Mo	0,02
MnCl ₂	1,8
CuSO ₄	0,08
ZnSO ₄	0,22

Tablo 3.5. BG11 besin ortamının reçetesi

Kimyasal Adı	Miktar (mg/L)
NaNO ₃	1500
K ₂ HPO ₄	40
MgSO ₄ .7H ₂ O	75
CaCl ₂ .2H ₂ O	36

Tablo 3.5. (devam)

Sitrik Asit	6
Amonyum Ferik Sitrat	6
EDTA-Na ₂	1
Na ₂ CO ₃	20
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,05

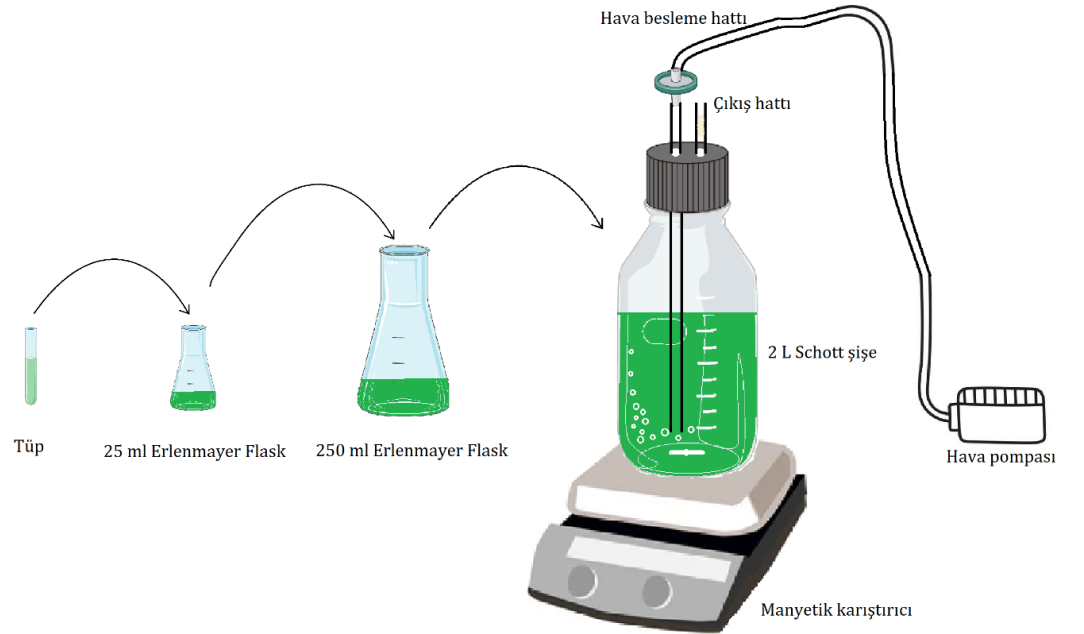
3.4 Siyanobakterilerin Kültüre Alınması

EGEMACC kültür koleksiyonunda bulunan çeşitli mikroalg türlerinden *Anabaena variabilis* (Llewellyn et al., 2020; Pope et al., 2015; Singh et al., 2010), *Anabaena sp.* (Llewellyn et al., 2020), *Lyngbya sp.* (Fuentes-Tristan et al., 2019; Rastogi and Incharoensakdi, 2014), *Nodularia sphaerocarpa* (Sinha et al., 2003), *Nostoc linckia* (Chen et al., 2021), *Nostoc muscorum* (Mushir and Fatma, 2011), *Spirulina platensis*, *Synechococcus nidulans* (Kumar et al., 2021), *Nannochloropsis oculata* (Llewellyn and Airs, 2010), *Phaeodactylum tricornutum* (Savio et al., 2017), *Scenedesmus protuberans* (Dionisio-Sese, 2010; Xiong et al., 1999), türlerinin güneş koruyucu maddeleri üretme potansiyeli olduğu bilindiğinden üretim için seçilmiştir. Seçilen türler ve besin ortamları Tablo 3.6’da belirtilmiştir.

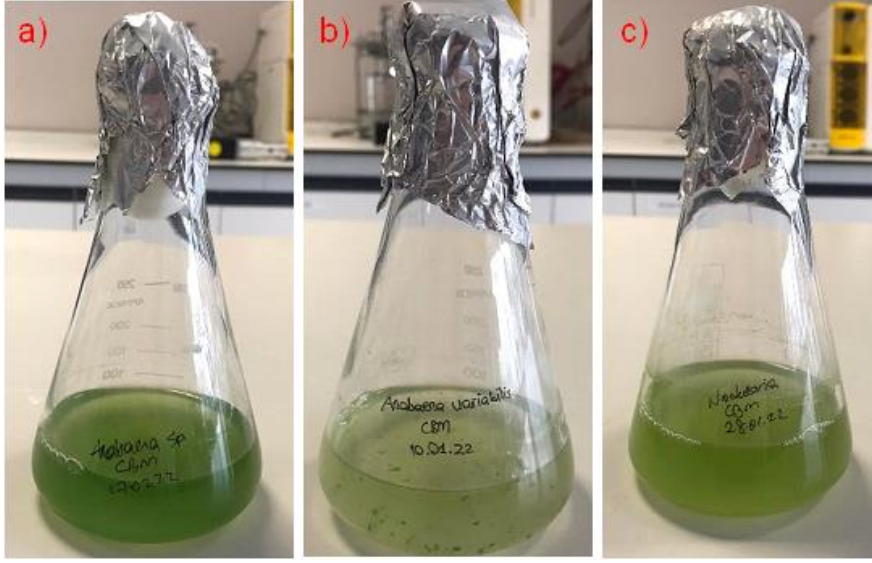
Tablo 3.6. Seçilen mikroalg türleri ve besin ortamları.

Tür adı	Besin ortamı
<i>Anabaena variabilis</i>	BG11
<i>Anabaena sp.</i>	BG11
<i>Nodularia sphaerocarpa</i>	BG11
<i>Spirulina platensis</i>	Zarrouk
<i>Nostoc linckia</i>	BG11
<i>Lyngbya sp.</i>	BG11
<i>Nostoc muscorum</i>	BG11
<i>Synechococcus nidulans</i>	BG11
<i>Scenedesmus protuberans</i>	BG11
<i>Nannochloropsis oculata</i>	BG11
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Guillard's f/2
<i>Nostoc sp.</i> Lukesova'9/94	BG11
<i>Nostoc calcicola</i> Lukesova'3/97	BG11
Strain #23	BG11
<i>Nostoc muscorum</i> str. Lefevre CALU-304	BG11
<i>Nostoc sp.</i> CALU-870	BG11
<i>Nostoc linckia</i> f. <i>Piscinale</i> CALU-982	BG11
<i>Nostoc sp.</i> str. Gromov CALU-996	BG11
Strain #68	BG11
<i>Calothrix sp.</i>	BG11
<i>Nostoc sp.</i> BROMEL	BG11
<i>Nostoc sp.</i> BR RQ11	BG11
Strain #117	BG11
<i>Nostoc sp.</i> CC2 symbiont of <i>Cycas circinalis</i>	BG11

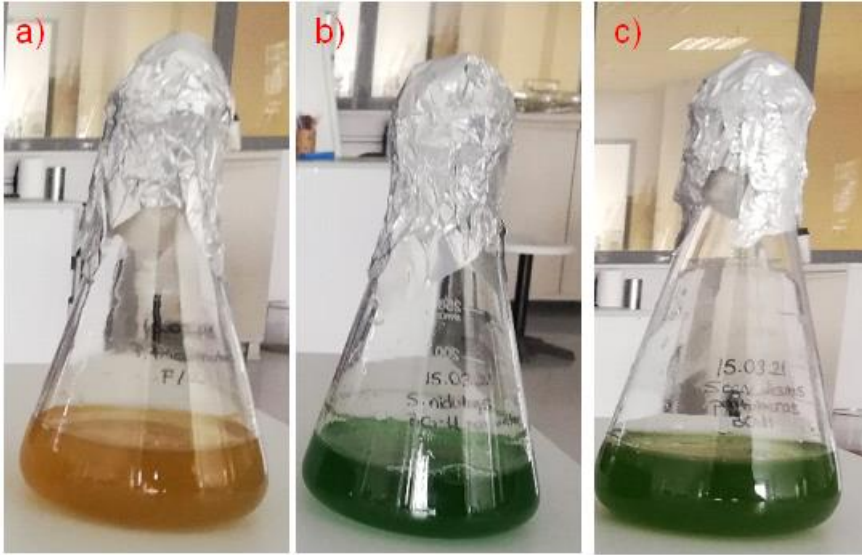
Güneşten koruyucu etkinliğe sahip bileşikler üreten türleri belirleyebilmek için biyokütle üretimi gerçekleştirilmiştir. Tüplerde besin ortamı içerisinde bulunan stok kültürler, sırasıyla ölçek büyütülerek 25 ml ve 250 ml erlenlerde 100 rpm çalkalama hızı, 20 ± 1 °C sıcaklıkta, $40 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sürekli aydınlatma inkübe edilmiştir. 250 ml erlenlerde büyüyen türler, 2 L Schott şişelere ekilmiş (1,5 L çalışma hacmi, %10 inokulum), manyetik karıştırıcı ve havalandırma ile kültürlerin karışması sağlanarak biyokütle üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretimin diyagramı Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Şekil 3.2-3.4’te türlerin Tablo 3.6’da belirtilen besin ortamlarında erlenmayer flasklardaki üretimi gösterilmiştir. Şekil 3.5’te ise Schott şişelerdeki üretim sistemi gösterilmiştir. Tüm türler bu şekilde üretilmiş, *S. platensis* için kabarcık kolon ile de üretim gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6). Şekil 3.7’de gösterildiği şekilde üretim sonrası 4100 rpm’de 5 dakika santrifüjlenerek hücreler hasat edilmiştir. Hasat edilen biyokütle liyofilize edilmiştir ve kilitli plastik poşetlere koyularak -20 °C’de ham ekstraların hazırlanması işlemi için saklanmıştır.



Şekil 3.1. Tüm türler için kullanılan üretim sisteminin diyagramı.



Şekil 3.2. 250 ml erlenmayer flasklarda üretim a) *Anabaena* sp.; b) *A. variabilis*; c) *N. sphaerocarpa*



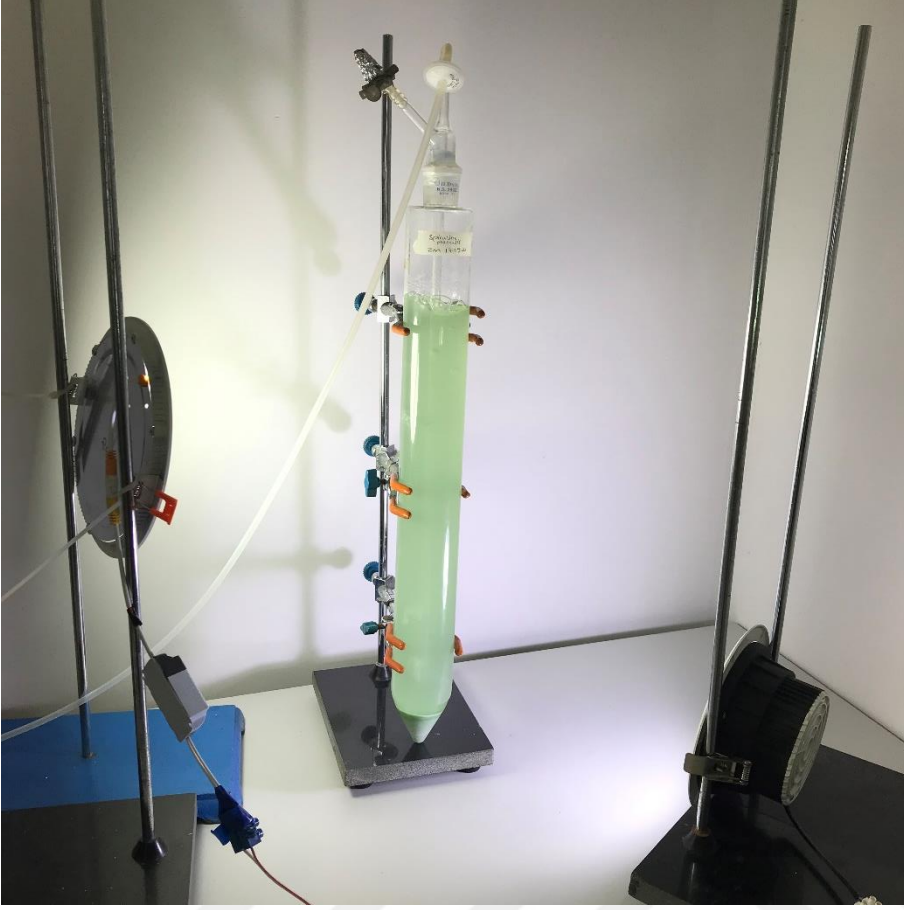
Şekil 3.3. 250 ml erlenmayer flasklarda üretim a) *P. tricornutum*; b) *S. nidulans*; c) *S. protuberans*.



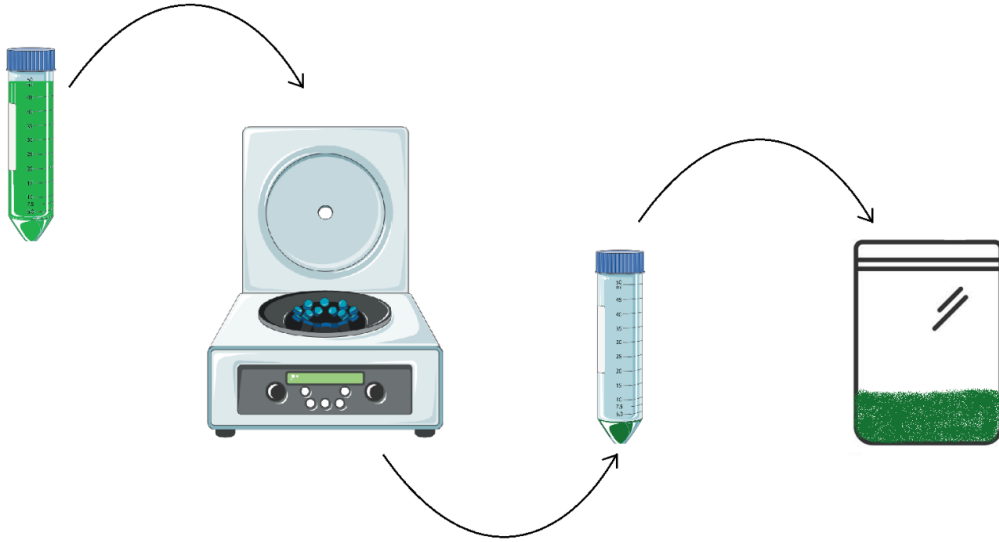
Şekil 3.4. 250 ml erlenmayer flasklarda üretim a) *N. muscorum*; b) *S. platensis*; c) *N. linckia*.



Şekil 3.5. Türlerin üretim sistemi a) Karşıdan görüntüsü; b) Yandan görüntüsü (2 L Schott şişelerde, havalandırma, hortum ve pompa ile; karıştırma, manyetik karıştırıcı ile gerçekleştirilmiştir).



Şekil 3.6. Kabarcık kolon biyoreaktörde *S. platensis* türünün üretimi.

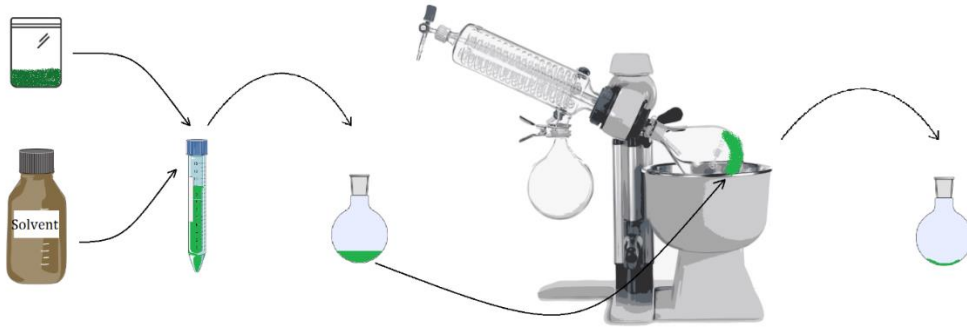


Şekil 3.7. Üretim sonrası hasat işleminin diyagramı.

3.5 Ham Ekstrelerin Elde Edilmesi

Güneşten koruyucu moleküllerden en bilinen polar olan mikosporin benzeri amino asit ve apolar olan sitonemin maddeleri haricinde yeni moleküller tarandığı için farklı polaritelere sahip solvent sistemleri ile ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.6’da belirtilen tüm türler ile ekstraksiyonlar %100 Hekzan, %100 Kloroform, Kloroform : Metanol (1:1 (v/v)), %70 metanolün sulu çözeltisi solvent sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon işleminde biyokütle (100 mg) üzerine 10 ml solvent eklenmiştir. Metanolün %70 sulu çözeltisinin eklendiği biyokütle, sonikatör kullanılarak 9 döngü, %61-64 güç ile 4 dakika sonikasyon işlemi gerçekleştirilerek hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Güneş koruyucu maddeler, hücreleri UV hasarından koruduğu için hücre içi moleküllerdir bu nedenle hücrelerin parçalanması gerekmektedir (Bhatia et al., 2011). Hücre parçalama sonrası +4 °C’de bir gece ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Diğer solvent sistemleri [hekzan, kloroform, kloroform : metanol (1:1)] ile yapılan ekstraksiyon işleminde ise üzerine solvent eklenen biyokütle için 30 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Biyokütle +4 °C’de ekstraksiyonun gerçekleşmesi için bekletilmiştir. Ekstraksiyon sonrası örnekler, 0,2 µm şırınga filtrelerinden geçirilerek balonlara alınmış ve rotary evaporatör yardımı ile vakum altında 40°C’lik su banyosu içerisine daldırılarak solvent uzaklaştırılmıştır. Evaporasyon işlemi sonucunda balonlar öncelikle desikatöre konulmuş daha sonra da hassas terazi ile tartılarak ekstre miktarları belirlenmiştir. Şekil 3.8’de ekstraksiyon yönteminin diyagramı gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Hasat sonrası ekstraksiyon işlemi.

3.6 Ham Ekstrelerin Ön Tarama Analizleri

Üretimi gerçekleştirilen biyokütleden elde edilen ham ekstraktların kozmetikte kullanımını ve güneş koruma aktivitesini ölçebilmek için güneş koruma faktörünü (SPF) ve antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. UV ışık geçirgenliği spektrofotometrede ölçüldükten sonra Mansur denklemi kullanılarak SPF değerleri belirlenmiş ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) metodu ile radikal süpürücü aktivite (%RSA) ölçülerek ekstraktların antioksidan aktivitesi hesaplanmıştır.

3.6.1 Güneş koruma faktörünün belirlenmesi

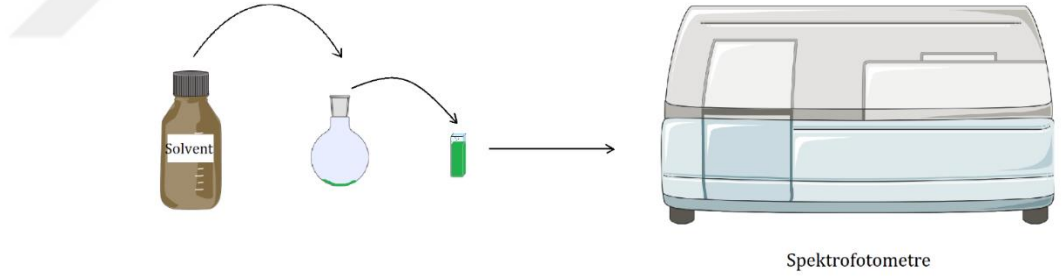
SPF hesaplama yönteminde 290-320 nm aralığındaki dalga boylarında 5 nm aralıklarla örneklerin farklı konsantrasyonlarının (%70 metanol, kloroform, kloroform:metanol (1:1 (v/v)) ekstraktları için 1000, 500, 250, 125 µg/ml; hekzan ekstraktları için 1000, 500, 250 µg/ml) absorbansları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ekstraktların dalga boyları quartz küvetler kullanılarak ölçülmüştür. SPF hesaplama yönteminin diyagramı Şekil 3.9’da gösterilmiştir. Güneş koruma faktörünü (SPF) hesaplamak için Mansur denklemi (Denklem 1) ve Tablo 3.7’deki değerler kullanılmıştır (Sayre et al., 1979).

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (\text{Denklem 1})$$

CF: düzeltme faktörü=10 ; EE (λ): eritem etki spektrumu; I(λ): solar yoğunluk spektrumu; Abs(λ): örneğin absorbanası.

Tablo 3.7. Molar katsayı sabitleri (Sayre et al., 1979)

Dalga boyu (λ nm)	EE x I (normalize edilmiş)
290	0,015
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,018



Şekil 3.9. Ekstrelerin SPF değerlerinin hesaplanması yönteminin diyagramı.

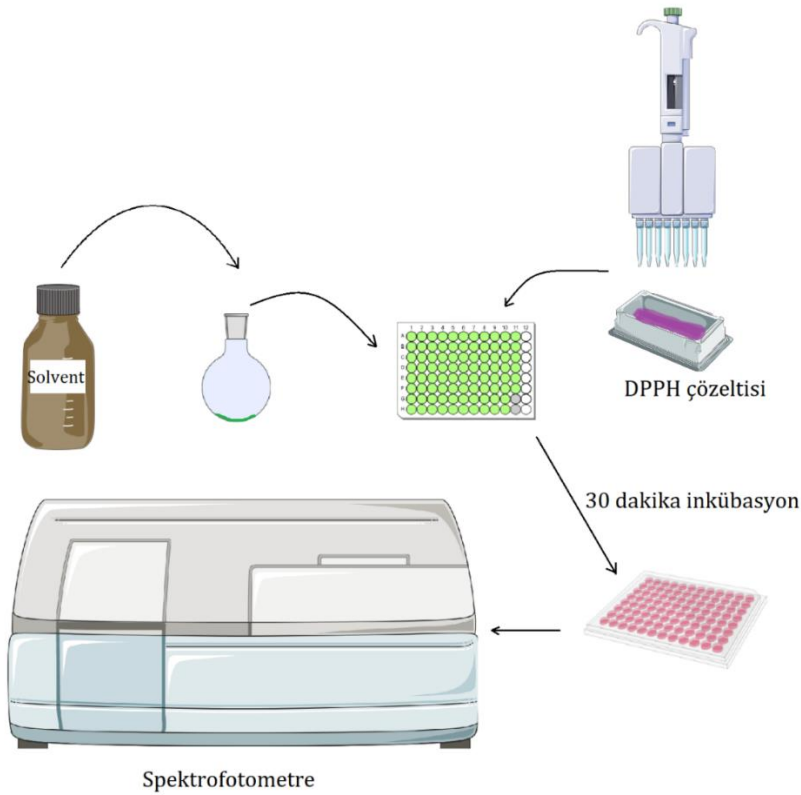
3.6.2 Radikal süpürme aktivitesinin belirlenmesi

Türlerin antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH radikal süpürme aktivite tayini yapılmıştır. Her bir ekstrenin 1000 µg/ml konsantrasyondaki metanol çözeltileri hazırlanmıştır. DPPH metodunda kullanılan DPPH'in çözügeni metanol olduğu için ekstrelerin hepsi metanol ile çözdürülmüştür. 96 kuyulu plakalarda her bir kuyunun içerisine bu örneklerden eklenmiştir ve seyreltmeler yapılarak 500,

250, 125, 67,5 µg/ml konsantrasyonlarındaki örnekler elde edilmiştir. Her bir kuyuda bulunan 100 µl örneğin üzerine 25 µl 1 mM DPPH çözeltisi eklenmiştir. Kör olarak metanol, negatif kontrol olarak 1 mM DPPH çözeltisi kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak da antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu bilinen bütül hidroksi tolüenin (BHT) 2,5 mg/ml ve 1 mg/ml konsantrasyonlarındaki metanol çözeltisi hazırlanmıştır. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Metodun diyagramı Şekil 3.10'da gösterilmiştir. Tüm örneklerin ve kontrollerin absorbansları 517 nm'de ölçülmüştür. Pozitif ve negatif kontrolden kör olarak kullanılan metanolün absorbansı çıkarılarak Denklem 2'ye göre radikal süpürme aktivitesi (%RSA) hesaplanmıştır (Akay et al., 2011; Gürlek et al., 2020).

$$\text{Radikal süpürme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{DPPH}}}\right) \times 100 \quad (\text{Denklem 2})$$

A_{sample} : Örneğin absorbansı; A_{DPPH} : DPPH çözeltisinin absorbansı



Şekil 3.10. DPPH metodunun diyagramı.

3.7 Mikosporin benzeri amino asit biyosentetik gen bölgelerinin belirlenmesi için PCR tabanlı tarama

MAA analizi Korbee-Peinado et al (2004) metodu modifiye edilerek yapılmıştır (Korbee Peinado et al., 2004). Bunun için iki farklı solvent sistemi kullanılmıştır: %20 metanolün sulu çözeltisi ve distile su. Yaklaşık 1 gram liyofilize biyokütle 1 ml solvent eklenerek 45 °C'lik su banyosunda 2 saat ekstraksiyona bırakılmıştır. Ekstraksiyon süresi tamamlandıktan sonra santrifüjlenerek süpernatant toplanmış ve evapore edilmiştir. Ekstre, %100 metanol, HPLC mobil fazı (%1,5 metanol ve %0,15 asetik asidin sulu çözeltisi) ve su ile çözündürülmüştür ve 30 saniye karıştırılmıştır. Örnekler 0,2 µm membran filtreden geçirildikten sonra örneklerin analizi DAD dedektörü bulunan Thermo Scientific DionexUltiMate 3000 UHPLC (Thermo Scientific) ile yapılmıştır. HPLC ayrımı, terz faz Kinetex Phenomenex C₁₈ kolonu (150 X 4.6 mm, 2.6 µm) ile gerçekleştirilmiştir ve mobil faz (%1,5 metanol ve %0,15 asetik asidin sulu çözeltisi) izokratik olarak 0,5 ml/min hız ile kolondan geçirilmiştir. HPLC, elektrosprey iyonizasyonu kaynağına sahip yüksek çözünürlük kütle spektrometrisine (ESI-HRMS; Impact HD Mass Spectrometer, Bruker) bağlanmıştır. Kütle spektrometrisinin parametreleri belirtildiği gibi ayarlanmıştır: kuru sıcaklık 200 °C; kurutma gazı akışı 12 L/min; nebulizatör 3 bar, kapiler voltaj 4500 V; endplate offset 500 V. Spektrumlar, spektrum oranı 2 Hz ile 20-700 m/z aralığında toplanmıştır.

Kültür koleksiyonundan MAA ürettiği bilinen *Nostoc sp.*'nin filamentleri, cam kapiler tekniği ile izole edilmiştir. Filamentler, Tris-EDTA (TE) tamponunda seri olarak yıkanmış ve Repli-G Mini Kit (Qiagen) kullanılarak çoklu yer değiştirmeli amplifikasyon (MDA) ile amplifiye edilmiştir. 16S rRNA dizilimi ile kalite kontrolünden geçen on filament bir araya toplanmış ve 250 bp okuma, 350 bp ortalama uç uzunluğuna sahip bir Illumina MiSeq Çift Uç kitaplığı kullanılarak ticari *de novo* genom dizilimi (EMBL Genomics Core Facility, Heidelberg, Almanya) için gönderilmiştir. Gelen veri, tek hücre seçeneği etkinleştirilmiş protein kodlama genleri ile SPAdes 3.14 *de novo* assembler kullanılarak birleştirilmiş ve 999 bp'den daha uzun birleştirilmiş yapı iskelelerinde Prodigal 2.6.3 kullanılarak tahmin edilmiştir. Öngörülen tüm protein kodlayan diziler, MMSeqs26 kullanılarak

NCBI-nr veri tabanı ile karşılaştırılmış ve analizin geri kalanı için yalnızca siyanobakterilere en çok isabet eden contig'ler tutulmuştur. Anabaenopeptin gen kümesi, önceden yayınlanmış genler kullanılarak *Nostoc sp.* genom düzeneğine karşı BLASTp aramalarına dayalı olarak tanımlanmıştır. Hedef genomik yapı iskelesinde öngörülen açık okuma çerçeveleri çevrilmiş ve fonksiyonel açıklama için BLASTp, NCBI korunan alan araştırması ve antiSMASH 5 analizine tabi tutulmuştur. Bu metodun sonucunda mikosporin benzeri amino asit üreten gen bölgeleri belirlenmiş ve ekspresyon çalışmaları için seçilmiştir.

3.8 Güneş Koruyucu Molekül Üretiminin İndüklenmesi

Mikosporin benzeri amino asit üretimini indükleyebilmek için *Nostoc sp.* CALU-997 türü için farklı stres koşulları incelenmiştir:

- Deniz Tuzu: BG11 ortamına farklı konsantrasyonlarda (%1, %2, %3) deniz tuzu eklenmiştir.
- Azot açlığı: Azotsuz BG11 ortamı kullanılmıştır.
- MgSO₄: BG11 ortamına ekstra 1 mM ilave edilmiştir.
- NaCl: BG11 ortamına farklı konsantrasyonlarda (% 1-3) ilave edilmiştir.
- Kontrol olarak BG11 ortamı kullanılmıştır.

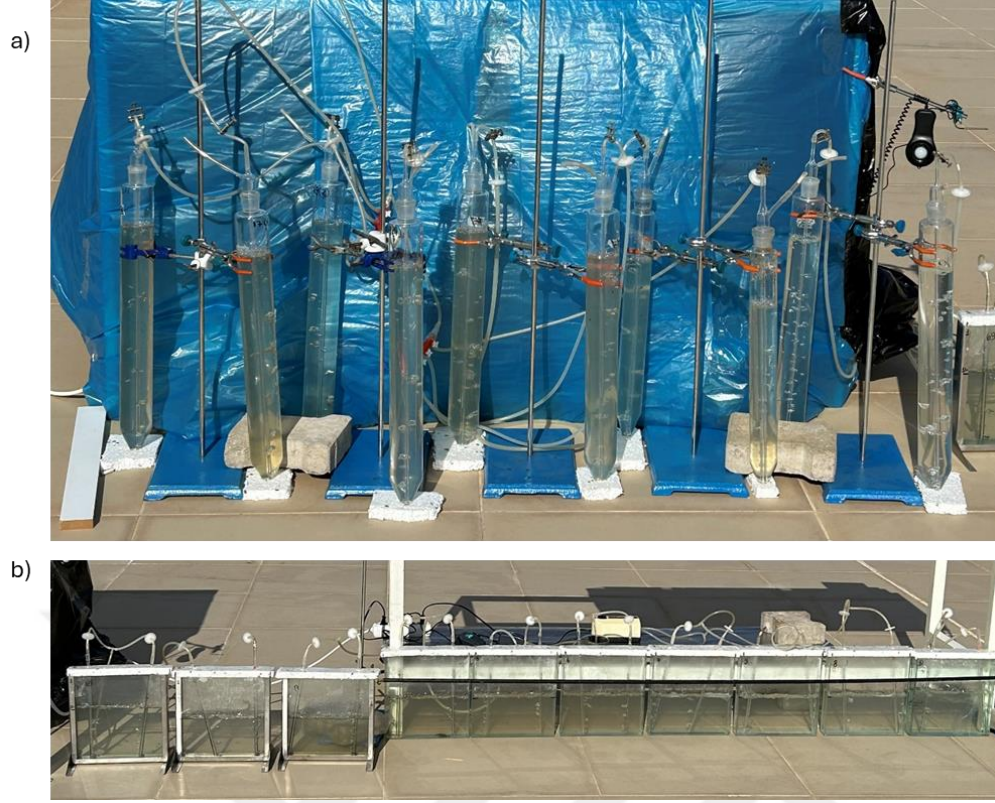
Nostoc sp. CALU-997 türü 7 gün boyunca 20 °C'de 120 rpm karıştırma hızında inkübe edilmiştir. Üretim sonrasında 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek hasat edilmiştir. Liyofilize edilerek daha sonraki analizler için -20 °C'de saklanmıştır. Liyofilize edilen biyokütle üzerine metanol eklenerek bir gece ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında rotary vakum evaporatör kullanılarak metanolden uzaklaştırılan ekstre üzerine su eklenmiştir. Elde edilen sulu çözelti üzerine kloroform eklenerek sıvı sıvı ekstraksiyon ile pigmentlerden uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Su fazı toplanarak sonraki HPLC/MS analizleri için saklanmıştır.

3.9 Siyanobakteri Türlerinin Panel Ve Tübüler Fotobiyoreaktörlerde Dış Alan Üretimleri

Mikosporin benzeri aminoasitlerin (MAA) üretimi UV stresi ile indüklenmektedir (Gupta et al., 2020). Türkiye yıl boyunca güneş ışığı alan bir ülkedir ve İzmir'in güneşlenme süresi 2,986 saat/yıl, radyasyon değeri ise 1496 KWh/m²-yıl'dır. Bu nedenle herhangi bir ekstra ışık kaynağından yararlanmadan, dış alanda güneş enerjisinden yararlanarak seçilen türlerin üretiminin gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Bu amaçla Şubat-Temmuz ayları arasında ve Ekim ve Kasım ayları arasındaki periyotta üretimler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.11-3.16). Kurulan ilk dış alan üretimi 1 Şubat 2023'te başlatılmış ancak olumsuz hava şartları ve fırtına nedeniyle 5 Şubat 2023'te üretim sonlandırılmıştır. Hasat edilen hücreler liyofilize edilerek -20 °C'de saklanmıştır. Diğer aylar için ise, 14 günlük üretim tamamlanmıştır. Temmuz ayında artan sıcaklık ve hücrelerin UV radyasyona daha uzun süre maruz kalması nedeniyle gölgelik yapılmıştır. Üretimler, panel FBR ve kabarcık kolon FBR'lerde gerçekleştirilmiştir. Çalışma hacmi olarak 1 litre belirlenmiş ve seçilen türlerden (Tablo 3.8) %10 inokulum yapılmıştır. Tüm türler (*Nostoc* sp. CALU-997 hariç), CO₂ kaynağı olarak 10 mM NaCO₃ ile zenginleştirilmiş BG11 besin ortamına ekilmiştir. 17 türünde oluşan kontaminasyon nedeniyle kasım ayında ekimi gerçekleştirilememiştir. Karıştırma, akvaryum hava pompaları ile havalandırma yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Üretim boyunca spektrofotometrik yöntemlerle (650 ve 750 nm dalga boyunda absorbans ölçülerek) hücre büyümesi takip edilmiştir. Ayrıca alınan örnekler mikroskop altında incelenerek hücre canlılığı ve kontaminasyon varlığı incelenmiştir. Üretim boyunca gün içerisinde değişkenlik gösteren ışık şiddeti, UV radyasyon ve sıcaklık takip edilmiştir.

Tablo 3.8. Dış alan üretimleri için seçilen türler.

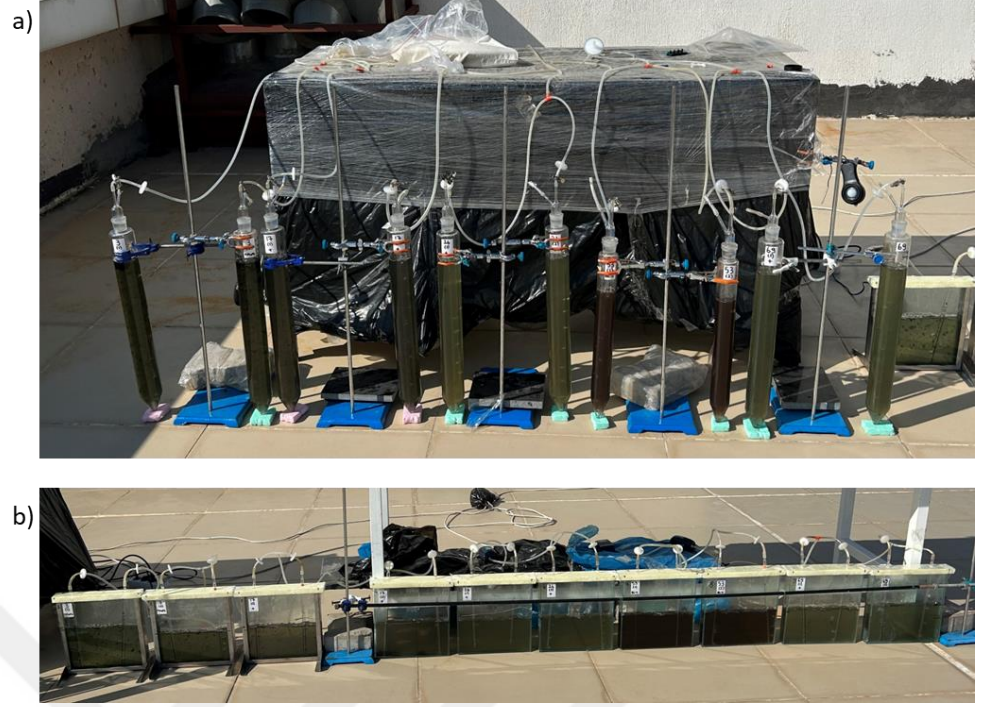
Tür Adı	Besin Ortamı
<i>Nostoc</i> sp. Lukesova'9/94	BG11+10 mM NaCO ₃
<i>Nostoc</i> sp. Lukesova'30/93	BG11+10 mM NaCO ₃
<i>Nostoc linckia</i> CALU-129	BG11+10 mM NaCO ₃
<i>Nostoc</i> sp. CALU-997	BG11
<i>Calothrix</i> sp.	BG11+10 mM NaCO ₃



Şekil 3.11. Seçilen türlerin Şubat ayı dış alan üretimleri, a) Kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; b) Panel fotobiyoreaktörler.



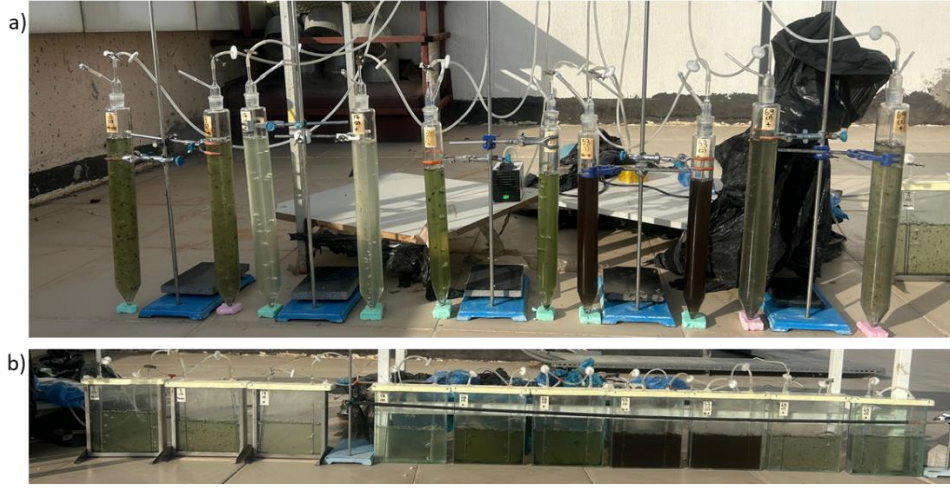
Şekil 3.12 Seçilen türlerin Mart ayı dış alan üretimleri, solda, kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; sağda, panel fotobiyoreaktörler.



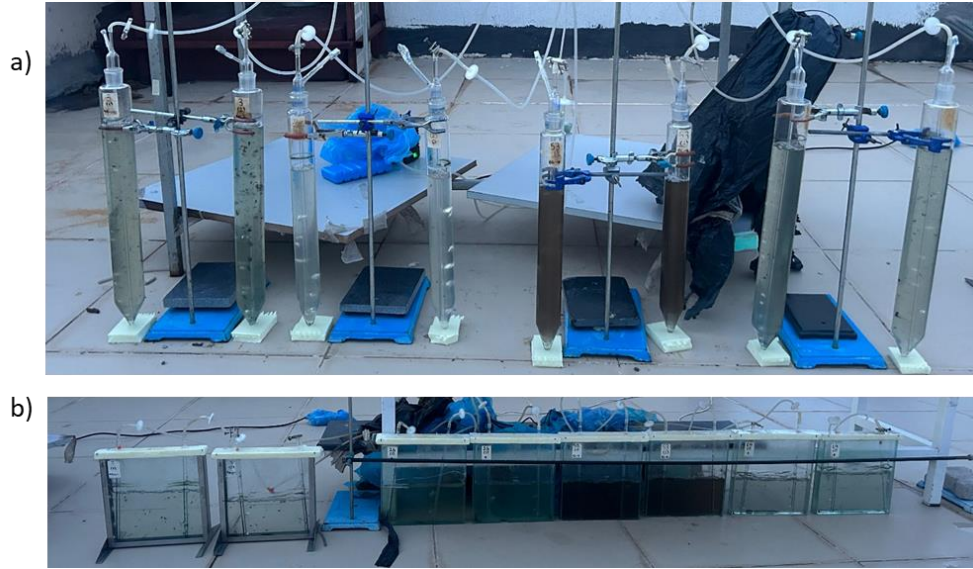
Şekil 3.13. Seçilen türlerin Nisan ayı dış alan üretimleri, a) Kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; b) Panel fotobiyoreaktörler.



Şekil 3.14. Seçilen türlerin Mayıs ayı dış alan üretimleri, a) Kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; b) Panel fotobiyoreaktörler.



Şekil 3.15. Seçilen türlerin Ekim ayı dış alan üretimleri, a) Kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; b) Panel fotobiyoreaktörler.

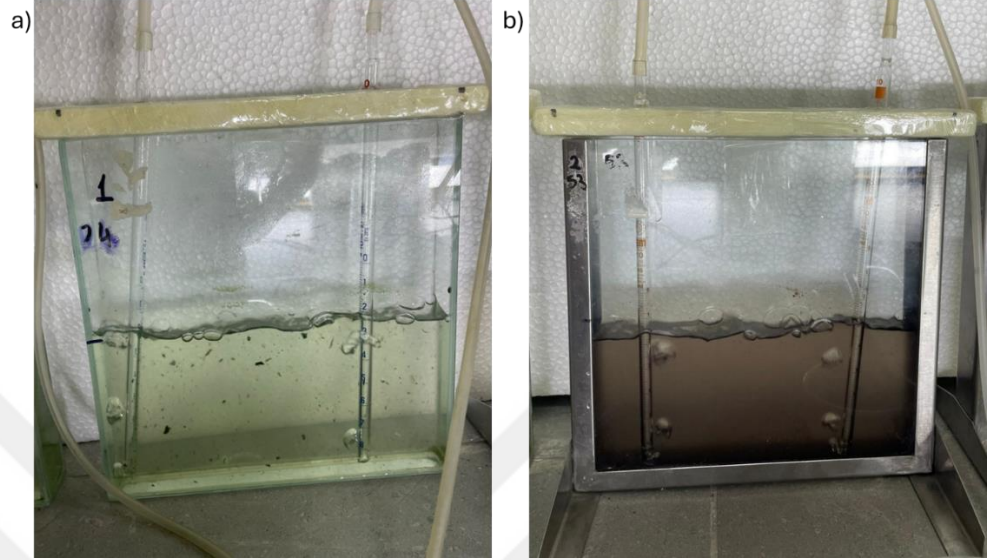


Şekil 3.16. Seçilen türlerin Kasım ayı dış alan üretimleri, a) Kabarcık kolon fotobiyoreaktörler; b) Panel fotobiyoreaktörler.

3.10 Siyanobakteri Türlerinin Pilot Ölçekli Panel ve Tübüler Fotobiyoreaktörlerde Üretimleri

Ölçek büyütme çalışmaları için laboratuvar ölçeği olarak *N. linckia* CALU-129 ve *Nostoc* sp. CALU-997 türlerin 1 L panel fotobiyoreaktörlerde üretimi

gerçekleştirilmiştir. Türler, hacimce %10 olacak şekilde BG11 ortamına inoküle edilmiştir. Üretim boyunca kültürün pH, fotosentetik aktivite ve spektrofotometrik olarak büyüme takibi yapılmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. 1 L panel fotobiyoreaktörlerde a) *N. linckia* CALU-129; b) *Nostoc* sp. CALU-997 üretimi.

Toplam hacmi 25 L olan tübüler fotobiyoreaktörlere *Nostoc* sp. CALU-997 türünün %20'lik inokülasyonu BG11 besin ortamına yapılmıştır (Şekil 3.18). Üretimlerin pH, fotosentetik aktivite ve spektrofotometrik olarak büyüme takibi yapılmıştır. Karıştırma peristaltik pompa yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Havalandırma cam damacanalara hava hattı çekilerek sağlanmıştır.

Çalışma hacmi 50 L olan panel fotobiyoreaktörlere *N. linckia* CALU-129 türünün %20'lik inokülasyonu yapılmıştır (Şekil 3.19). Besin ortamı olarak ekstra CO₂ kaynağı olarak 10 mM Na₂CO₃ ile zenginleştirilmiş BG11 ortamı kullanılmıştır. Üretim boyunca pH, fotosentetik aktivite ve spektrofotometrik olarak büyüme takibi yapılmıştır. Karıştırma havalandırma ile sağlanmıştır. Spesifik büyüme hızı hesabı için lag fazın sonundan logaritmik fazın yavaşladığı noktaya kadar olan absorbanslar dikkate alınmıştır. Denklem 3 kullanılarak spesifik büyüme hızları, Denklem 4 kullanılarak ikilenme süreleri hesaplanmıştır.

$$\text{Spesifik büyüme hızı } (\mu) = \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{t_2 - t_1} \quad (\text{Denklem 3})$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Denklem 4})$$



Şekil 3.18. Toplam hacmi 25 L olan tübüler fotobiyoreaktörlerde *Nostoc* sp. CALU-997 türünün inkübasyonu, solda; uzaktan, sağda; yakından görüntüsü.



Şekil 3.19. *N. linckia* CALU-129 türünün 50 L panel fotobiyoreaktörlerdeki üretimi, solda, 3. gün; sağda, 12. gündeki durumu.

3.11 Güneş koruyucu moleküllerin kısmi saflaştırılması

1 L panel fotobiyoreaktörlerde üretimi gerçekleştirilen *Nostoc* sp. CALU-997 kültürü 3500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hasat edilmiştir. Hasat edildikten sonra dondurulmuş ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen hücreler %100 metanol ile muamele edilerek problu sonikatör kullanılarak (%50 güç, 9 döngü, 1'er dakika bekleme süreleriyle toplamda 4 dakika) hücrelerin parçalanması sağlanmış, daha sonra +4 °C'de bir gece ekstraksiyona bırakılmıştır. Ekstraksiyon sonrasında 4000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenerek süpernatantı balonlara koyulmuştur. Rotary vakum evaporatör kullanılarak 40 °C'de vakum yardımı ile metanol uzaklaştırılmıştır. Balon içerisinde kalan kuru ham ekstrenin üzerine distile su eklenmiş ve ekstre tekrar çözündürülmüştür. Çözünen ekstre bir santrifüj tüpünde toplanarak üzerine pigmentleri uzaklaştırmak için kloroform eklenmiş ve 4000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenerek kloroform-su fazı oluşturularak sıvı-sıvı partiyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.20). Daha sonra su fazı toplanarak liyofilize edilmiştir ve kuru kısmi saflaştırılmış ekstre elde edilmiştir. Kozmetik formülasyon ve hayvan hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.20. Sıvı-sıvı partiyon. Altta pigmentleri sudan uzaklaştıran kloroform fazı, üstte shinorine içeren su fazı.

3.12 HPLC/MS analizi

Tüm üretimlerde elde edilen kısmi saflaştırılmış mikosporin benzeri amino asit içeren ekstraler HPLC/MS ile analiz edildi. DAD dedektörü bulunan Thermo Scientific DionexUltiMate 3000 UHPLC (Thermo Scientific) kullanılarak ham ekstralelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. HPLC’de TSKgel Amide-80HR 5 µm (250 × 4.6 mm, 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak 0.1% HCOOH içeren su (Solvent A) ve 0.1% HCOOH içeren asetonitril (Solvent B) kullanılmıştır. HPLC metodu Tablo 3.9’da verilmiştir. Akış hızı 1 ml/min olarak belirlenmiştir. HPLC, elektrosprey iyonlaştırma kaynağına sahip yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisine bağlanmıştır. Kütle spektrometri ayarları: kuru sıcaklık 250 °C, kurutucu gaz akışı 12 ml/min, nebulizer 4 bar, kapiler voltaj 4500 V, endplate offset 500 V. Spektrum 20-1000 m/z aralığında 3 Hz hızında toplanmıştır. Collision enerjisi 35 eV’den 100 eV’ye değişmiştir. Kalibrasyon, dahili kalibrasyon solüsyonu olan LockMass 622 ve her analizin başında CH₃COONa kümeleri kullanılarak belirlenmiştir.

Tablo 3.9. HPLC metodu.

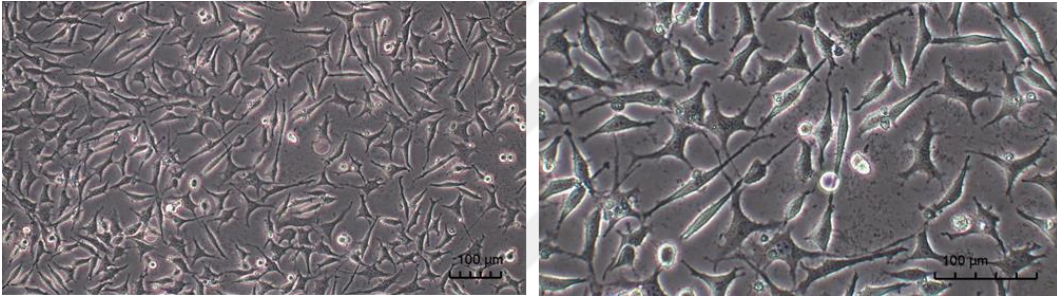
Zaman (dk)	Solvent A (0.1% HCOOH içeren su)	Solvent B (0.1% HCOOH içeren asetonitril)
0	5	95
5	5	95
35	95	5
36	95	5
40	5	95

3.13 Güneş Koruyucu Moleküllerin Kozmetik Uygulamalar İçin Test Edilmesi

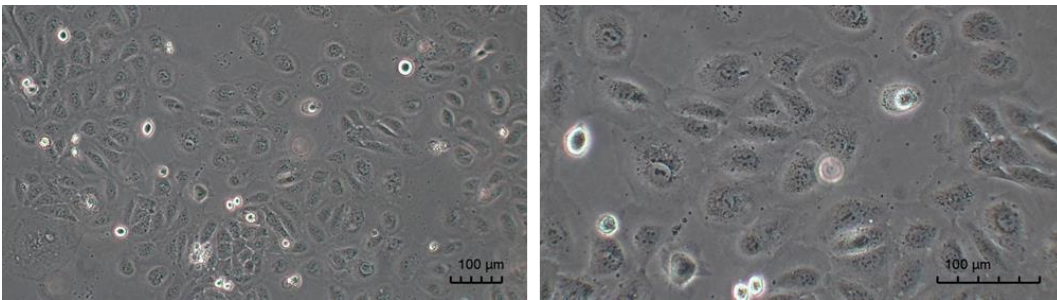
3.13.1 Sitotoksisite analizi

Sitotoksisite analizi için L929 fare fibroblast hücre hattı ve HaCaT insan immortalize keratinosit hücre hatları kullanıldı. Her iki hücre hattı da içerisine %10 FBS, %1 L-glutamin ve %0.02 Gentamisin eklenen DMEM High Glucose besin ortamına pasajlandı. Kriyotüplerde bulunan hücreler (L929 ve HaCaT) -80 °C'den alınıp, 37 °C'de su banyosunda 3/4'ü çözünene kadar bekletildi. Üzerine 3 ml FBS eklendi ve resüspanse edildi. Santrifüj tüpüne alınan FBS-hücre karışımı +4 °C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatantı atıldı ve pellet üzerine 4 ml besin ortamı (DMEM High Glucose, %10 FBS, %1 L-glutamin, %0,02 Gentamisin eklendi ve T25 flask içerisinde 37 °C'de CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Büyüyerek %80 konfluense ulaşan hücrelerin (Şekil 3.21, 3.22) üzerindeki besin ortamı döküldü ve steril karbon ve magnezyum içermeyen PBS ile yıkandı. Üzerine 1 ml tripsin eklendi ve 37 °C'de hücreler yüzeyden kalkana kadar maksimum 5 dakika olacak şekilde CO₂'siz inkübatörde inkübe edildi. Tripsin miktarının 2-3 katı kadar serumlu besin ortamı (DMEM High Glucose, %10, %1 L-glutamin, %0,02 Gentamisin eklendi ve santrifüj tüpüne alınıp +4 °C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üzerine 3 ml besin ortamı eklendi ve homojenize edildi. 100 µl PBS üzerine 100 µl tripan mavisi eklendi ve bu karışımın üzerine 100 µl hücre (L929 ve HaCaT) eklenerek hücreler sayıldı. Hücre sayımı sonrasında her bir kuyucuğa 10⁵ hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat, 37 °C'de CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. 24 saatin sonunda tüm besin ortamları kuyulardan uzaklaştırıldı ve L929, HaCaT ve pozitif kontrolün olacağı kuyulara 100 µl besin ortamı (DMEM High Glucose, %10 FBS, %1 L-glutamin, %0,02 Gentamisin) eklendi. *E. coli*'den elde edilen shinorine bileşiğinin sitotoksik etkisini incelemek için 96 kuyulu plakaların ilk kuyularına 2 mg/ml shinorine çözeltisinden 100 µl eklendi ve seri dilüsyonlar ile 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125 µg/ml konsantrasyonlarında shinorine eklendi. Negatif kontrol olarak hücrelerin üzerine DMSO eklendi. Her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı. *Nostoc* sp. CALU-997 ve *N. linckia* CALU-129

mikroalglerinden elde edilen içerisinde shinorine bulunan ekstrenin sitotoksik etkisini incelemek için 1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/ml konsantrasyonlarında seri dilüsyon ile 96 kuyulu plakalarda bulunan HaCaT hücre hattı üzerine eklendi. Negatif kontrol olarak hücrelerin üzerine DMSO eklendi. Her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı. MTT canlılık testi 24, 48 ve 72. saatlerde gerçekleştirildi. İnkübasyon süreleri dolan her bir plakadaki hücrelerin üzerlerindeki ortam uzaklaştırılarak her bir kuyuya 100 µl MTT solüsyonu (%90 (v/v) besin ortamı, %10 (v/v) 5 mg/ml MTT) eklendi. 37 °C’de CO₂’li inkübatörde 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra MTT solüsyonu uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için 100 µl DMSO eklendi ve 5 dakika boyunca çözünmesi için beklendi. Mikroplaka okuyucu ile 570 nm’de absorbans ölçüldü.



Şekil 3.21. L929 fare fibroblast hücre hattının mikroskop görüntüsü.



Şekil 3.22. HaCaT insan immortalize keratinosit hücre hattının mikroskop görüntüsü.

3.13.2 UV koruma özelliğinin test edilmesi

Elde edilen ekstrelerin UV koruma özelliğinin test edilmesi için HaCaT insan immortalize keratinosit hücre hatları kullanıldı. Hücre çözdürme işlemi sitotoksosite analizinde anlatıldığı gibi gerçekleştirildikten sonra her bir kuyuya 10^5 hücre/ml olacak şekilde 24 kuyulu plakalara hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Hücrelerin üzerine güneş ışığını simüle eden UV lamba (OSRAM, Ultravitalux, 300W, E27) UV uygulandı UV şiddeti UV metre (Apogee, MU200) yardımı ile ölçüldü. $31,2 \pm 2,5 \text{ W m}^{-2}$ UV radyasyonu, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 dakika boyunca uygulandı. Hücreleri ISO 10993-5'e göre toksik olan UV maruziyet süresi belirlendi. Bu belirlenen dozlara göre HaCaT hücreleri tekrar 24 kuyulu plakalara 10^5 hücre/ml ekildi ve 1000, 500, 250, 125, 62,5 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde 5 farklı konsantrasyonda shinorine içeren ekstreler ilave edilerek 30 dakika 37°C 'de CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra UV lamba ile (OSRAM, Ultravitalux, 300W, E27) $27,8 \pm 5 \text{ W m}^{-2}$ UV uygulandı. 24 saat 37°C 'de CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi. 24 saatin sonunda MTT canlılık testi gerçekleştirildi.

3.13.3 Stabilite testleri

Siyanobakteriden elde edilen ekstrelerin kısmi saflaştırılması sonrasında shinorine içeren ekstrenin eklendiği krem formülasyonu, $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 'de $\%60 \pm \%5$ bağıl nem oranına sahip ve $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 'de $\%75 \pm \%5$ bağıl nem oranına sahip farklı stabilite kabinlerinde bekletildi. Ardından yarı-katı formülasyonun organoleptik karakteri ve fizikokimyasal özellikleri incelendi. Öncelikle organoleptik özelliklerdeki değişimler koku, renk ve genel görüntüdeki değişimlerin takibi ile belirlendi. Fizikokimyasal özellikler ise, oda sıcaklığında pH ve viskozite değerlerinin ölçülmeleriyle belirlendi. Ayrıca, bu kapsamda krem formülasyonunun akış ve mekanik özellikleri de tayin edildi. Akış özelliklerinin belirlenmesi için farklı kayma oranlarında kayma gerilimi ve viskozite değerleri ölçüldü. Krem formülasyonunun mekanik özellikleri ise bilgisayar kontrollü penetrometre ile tespit edildi. Mekanik özelliklerinin belirlenmesi için yürütülecek çalışmalar sonunda formülasyonlara ait kuvvet-zaman grafikleri elde edildi ve bu grafiklerden

formülasyonlara ait sertlik, adezivlik, koheziflik, elastikiyet ve sıkıştırılabilirlik değerleri hesaplandı.

3.13.3.1 Shinorine içeren krem formülasyonunun hazırlanması

Krem formülasyonu Tablo 3.10'a göre hazırlandı. 240 g stearik asit ve 10 g setil alkol porselen kapsülde su banyosu üzerinde 70-75°C'de eritildi. 12 g potasyum hidroksit toz haline getirildi, üzerine 100 g gliserin ve 638 g distile su ilave edildi ve su banyosu üzerinde ısıtıldı (70-75°C). Daha sonra su fazı, porselen kapsüldeki yağ fazının içine yavaşça karıştırılarak ilave edildi. Homojen oluncaya kadar karıştırıldı. Formülasyonun sıcaklığı 40-45°C'nin altına düştükten sonra üzerine birkaç damla esans damlatıldı ve karıştırılmaya devam edildi. Tamamen soğuduktan sonra ambalajlandı. Shinorine içeren krem formülasyonunun hazırlanması için, 50 mg shinorine ekstresi bir miktar distile su içerisinde çözdürülerek %0,05 (w/w) konsantrasyonunda olacak şekilde formülasyona ilave edildi (Şekil 3.23).

Tablo 3.10. Krem formülasyonunun içeriği.

Madde	Miktar
Stearik asit	240 g
Setil alkol	10 g
Gliserin	100 g
Potasyum hidroksit	12 g
Distile su	k.m. 1000 g
Esans	k.m.



Şekil 3.23. Shinorine içeren krem formülasyonunları.

3.13.3.2 Formülasyonun Viskozitesinin Ölçülmesi

Tek noktalı viskozimetre (And Vibro Viscometer SV-10) ile üçer kez tekrarlanarak viskozite ölçümü yapıldı (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. Tek noktalı viskozimetre cihazı.

3.13.3.3 Formülasyonların pH değerinin ölçülmesi

Formülasyonun oda sıcaklığındaki pH değeri pH-metre (Hannah Edge pH meter) ile ölçüldü. Denemeler üçer kez tekrarlandı.

3.13.3.4 Formülasyonların akış özelliklerinin incelenmesi

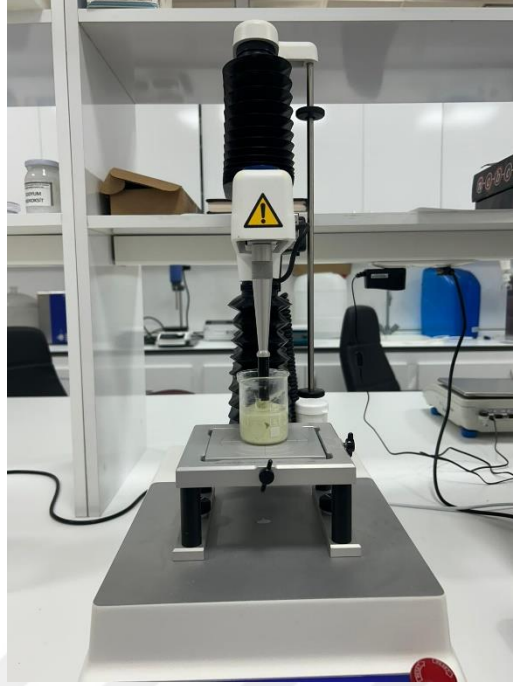
Formülasyonlarının akış özellikleri 25°C’de Brookfield DVNext reometresi ile incelendi (Şekil 3.25). Çalışmada 27 numaralı spindle kullanıldı. Hız 10-100 rpm arasında değiştirildi. Her örnek için çalışma en az üç tekrarla gerçekleştirildi.



Şekil 3.25. Brookfield DVNext reometresi

3.13.3.5 Formülasyonun mekanik özelliklerinin incelenmesi

Formülasyonun mekanik özellikleri bilgisayar kontrollü penetrometre (TA-XT Plus, Stable Micro System, UK) ile incelendi (Şekil 3.26). Bu çalışma için P/10 prob, her bir formülasyona iki kez batırıldı. Her seferinde prob, jel içerisinde 15 mm boyunca 2 mm/sn hızla ilerletildi. Probun, birinci ve ikinci batması arasında 15 sn ara verildi. Hazırlanan formülasyonların mekanik özellikleri 25°C’de incelendi ve her bir çalışma en az 3 kere tekrarlandı.



Şekil 3.26. Formülasyonlarının mekanik özelliklerinin incelenmesi için kullanılan bilgisayar kontrollü penetrometre

Elde edilen grafikten jel formülasyonunun sertliği, sıkıştırılabilirliği, adezifliği, kohezifliği ve elastikliği saptandı. Elde edilen grafikte ilk pikin yüksekliği formülasyonların sertlik değerini, ilk eğri altı alan formülasyonların sıkıştırılabilirlik değerini, ikinci eğri altı alan ise formülasyonun adeziflik değerini vermektedir. Koheziflik ve elastikiyet değerlerinin hesaplanmasında ise aşağıda verilen eşitlikler kullanıldı (Denklem 5-6).

$$\text{Koheziflik} = \text{AUC}_3 / \text{AUC}_1 \quad (\text{Denklem 5})$$

$$\text{Elastikiyet} = \text{Zaman fark}_{13-4} / \text{Zaman fark}_{11-2} \quad (\text{Denklem 6})$$

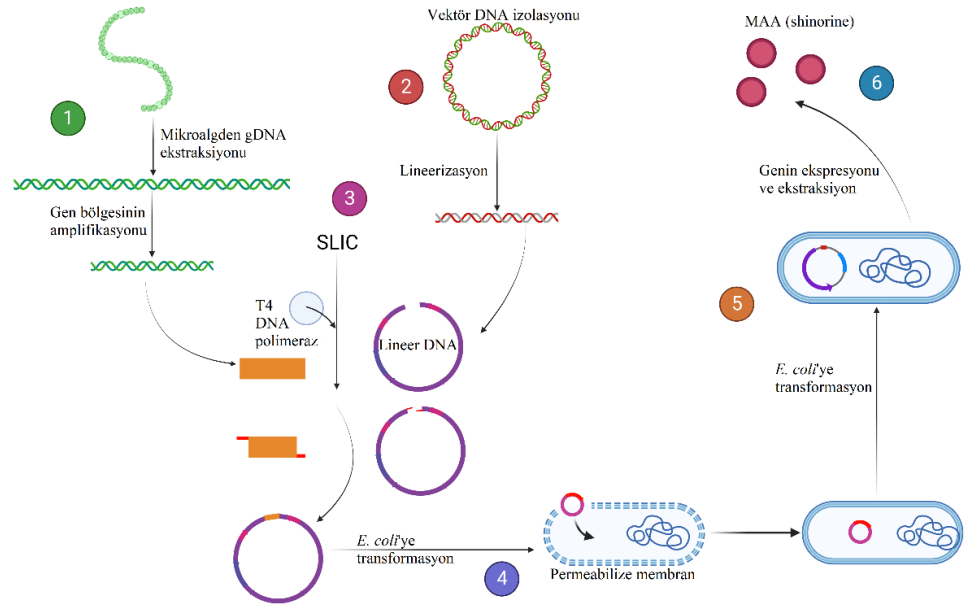
Formülasyon $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de %60 relatif nemdeki ve $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de %75 relatif nemdeki stabilite kabinlerine (TK 252, Nüve, Türkiye) yerleştirildi (Şekil 3.27). 30. ve 60. günde alınan örnekler organoleptik özellikleri, pH, akış özellikleri ve mekanik özellikler açısından incelendi.



Şekil 3.27. $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de $60 \pm 5\%$ bağıl nem oranına sahip (yukarıda) ve $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de $75 \pm 5\%$ bağıl nem oranına sahip (aşağıda) farklı stabilite kabinleri.

3.14 *E. coli*'de Heterolog Ekspresyon

E. coli'de heterolog ekspresyon için kullanılan metot Şekil 3.28'de gösterilmiştir. İlk aşamada mikroalgden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada vektör DNA'sından plazmid izolasyonu gerçekleştirilerek plazmid DNA'sı lineerize edilmiştir. Üçüncü aşamada SLIC reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Dördüncü aşamada istenilen gen bölgesini içeren plazmidin üretimini sağlayacak taşıyıcı konağa transformasyon gerçekleştirilmiştir ve plazmidin ekstraksiyonu sağlanarak beşinci aşamada ekspresyonu gerçekleştirecek olan konağa plazmidin transformasyonu gerçekleştirilmiştir ve ekspresyon için inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında son aşamada MAA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.28. Heterolog ekspresyon için DNA izolasyonundan başlayarak son ürüne kadar uygulanan metodun şeması.

3.14.1 Siyanobakteriden DNA ekstraksiyonu

15 ml kültür 4000 rpm 5 dakika santrifüjlenerek hücreler toplandı ve pellet 500 µl TE tampon kullanılarak tekrar süspansiyon haline getirildi. Yatay pozisyonda 2 dakika vorteksledi ve homojenize edilen hücreler sıvı nitrojen ile dondurulduktan sonra 70 °C’de eritildi ve bu işlem 5 kez tekrarlandı. Son dondurma işleminden sonra hücreler 100 °C’de 10 dakika boyunca ısıtıldı. Daha sonra NucloSpin® Soil kit kullanılarak genomik DNA izole edildi. Elüsyon aşamasına kadar kitteki protokol uygulandı. Elüsyon aşaması için kitte bulunan Buffer SE’den 20 µL eklendi ve 70 °C’de 2 dakika inkübe edildikten sonra 11,000g, 2 dakika santrifüjlendi. Bu basamak bir kez daha tekrarlandı. Nanodrop ile DNA konsantrasyonu belirlendi.

3.14.2 Shinorine gen bölgesinin amplifikasyonu

Kullanılan primerlerin listesi Tablo 3.11’de verilmiştir. Tasarlanan primerlerin optimum tekrar birleşme (annealing) sıcaklığını belirlemek için gradyan PCR yapıldı. Polimeraz olarak Q5 kullanıldı ve bu polimeraza göre 25 µl reaksiyon karışımı hazırlandı. Tablo 3.12’de karışımın içeriği verilmiştir. 150 µl reaksiyon karışımı hazırlanarak 6 farklı PCR tüpüne 25 µl eklendi. 58,7, 60,6, 62,1,

65,4, 67,3, 68 °C sıcaklıklarının olduğu kolonlara tüpler yerleştirildi. PCR metodu Q5 polimeraza göre ve amplifiye edilmek istenen gen bölgesine (7712 kb) göre geliştirildi. Tablo 3.13'te PCR metodu gösterilmiştir ve reaksiyon 35 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. %0,8 agaroz jel hazırlanmıştır ve örnekler kuyulara yüklendikten sonra 90 V ile 70 dakika boyunca yürütülmüştür.

Tablo 3.71. Kullanılan primerlerin listesi.

Primer	Uzunluk	Dizi (5' → 3')	Erime Sıcaklığı (° C)	Tanım
SF1	20 mer	TGCGCTGTTAATCACTTTAC	53.2	pET28_pTet_GFPv2 Koloni PCR için tarama forward primer (vektör tabanlı)
SR2	20 mer	TTACCGTTGGTCGCATCACC	59.4	pET28_pTet_GFPv2 Koloni PCR için tarama reverse primer (vektör tabanlı)
p28tet Backbone F	20 mer	CATGGTTAGCAAAGGTGAAG	55.3	Vektörü lineerize etmek için forward primer
p28tet Backbone R	20 mer	GGTCGATCCTCTTCTCTATC	57.3	Vektörü lineerize etmek için reverse primer
53MAA_S LIC_F	39 mer	GATAGAGAAGAGGATCGACCATGAGCATCGTCCAGGCAG	68.4	Gen bölgesini amplifiye etmek için forward primer
53_MAA_SLIC_R2	39 mer	CTTCACCTTTTGCTAACCATGTCTCTCTTTCCTTACGTCC	64.5	Gen bölgesini amplifiye etmek için forward primer

Tablo 3.82. Q5 polimeraz için reaksiyon karışımı reçetesi.

Bileşen	25 µl RXN (µl)
Su	17,25
Q5 tamponu	5
dNTPs	0,5
DNA	1
Q5 polimeraz	0,25
Forward primer (250)	0,5
Reverse primer (281)	0,5

Tablo 3.93. Gradyan PCR metodu.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)
Ön denatürasyon	98	30
Denatürasyon	98	10
Yeniden birleşme	58-68	30
Uzatma	72	240
Son uzatma	72	120

Gen bölgesinin amplifikasyonu için Tablo 3.12’de yer alan PCR reaksiyon karışımına göre 200 µl karışım hazırlanmıştır ve Tablo 3.14’teki PCR metodu kullanılmıştır ve reaksiyon 35 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel (%0,8) hazırlanarak örnekler kuyulara yüklenmiştir ve 90 V ile 90 dakika yürütülmüştür. Yürütülen jel örneklerin bir kısmını içerecek şekilde kullanılan 1 kb ladder ile kesilmiş ve UV’ye maruz bırakılarak görüntülenmesi sağlanmıştır. Jelin kesilen bölgesindeki amplifiye edilmesi istenen genin olduğu bölge işaretlenmiş ve UV’ye maruz bırakılmayan örneklerin olduğu jel bu bölgeye göre kesilmiştir. Daha sonra NucleoSpin PCR and Gel Clean Up kit kullanılarak jelden ekstrakte edilmiştir. Nanodrop ile konsantrasyonu belirlenmiştir.

Tablo 3.14. Amplifikasyon PCR metodu.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)
Ön denatürasyon	98	30
Denatürasyon	98	10
Yeniden birleşme	65	30
Uzatma	72	240
Son uzatma	72	120

3.14.3. Plazmid Ekstraksiyonu

E. coli pET28_pTet_GFPv2 bakterisi 37 °C’de bir gece inkübe edilmiştir. 11,000 g’de 1 dakika santrifüjlenerek hasat edilen hücrelerden plazmid, NucleoSpin Plasmid DNA Purification kit kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Daha sonra DNA’nın lineerizasyonu için Tablo 3.15’teki PCR reaksiyonu karışımı hazırlanmış ve Tablo 3.16’daki PCR metodu kullanılmıştır ve reaksiyon 35 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası %0.8 agaroz jel hazırlanarak örnekler kuyulara yüklenmiştir ve 90 V ile 50 dakika yürütülmüştür. Yürütülen jel örneklerin bir kısmını içerecek şekilde kullanılan 1 kb ladder ile birlikte kesilmiş ve UV’ye maruz bırakılarak görüntülenmesi sağlanmıştır. Jelin kesilen bölgesindeki amplifiye edilmesi istenen genin olduğu bölge işaretlenmiş ve UV’ye maruz bırakılmayan örneklerin olduğu jel bu bölgeye göre kesilmiştir. Daha sonra NucleoSpin PCR and Gel Clean Up kit kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Lineer vektör metil grubu içeren DNA fragmentlerinden kurtulmak için DpnI restriksiyon enzimi ile muamele edilmiştir. Tablo 3.17’de gösterilen reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı, 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra ısı inaktivasyonu için 80 °C’de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnaktivasyon sonrası %0.8 agaroz jel hazırlanarak örnekler kuyulara yüklenmiştir ve 90 V ile 50 dakika yürütülmüştür. Yürütülen jel örneklerin bir kısmını içerecek şekilde kullanılan 1 kb ladder ile birlikte kesilmiş ve UV’ye maruz bırakılarak görüntülenmesi sağlanmıştır. Jelin kesilen bölgesindeki amplifiye edilmesi istenen genin olduğu bölge işaretlenmiş ve UV’ye maruz bırakılmayan örneklerin olduğu jel bu bölgeye göre kesilmiştir. Daha sonra NucleoSpin PCR and Gel Clean Up kit kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Nanodrop ile konsantrasyonu belirlenmiştir.

Tablo 3.15. Lineerizasyon için Q5 polimeraz için reaksiyon karışımı reçetesi

Bileşen	25 µl RXN (µl)
H ₂ O	17,25
Q5 tamponu	5
dNTPs	0,5
DNA	1
Q5 DNA polimeraz	0,25
Forward primer (111)	0,5
Reverse primer (112)	0,5

Tablo 3.16. Lineerizasyon PCR metodu

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)
Ön denatürasyon	98	30
Denatürasyon	98	10
Yeniden birleşme	62	30
Uzatma	72	200
Son uzatma	72	120

Tablo 3.107. DpnI restriksiyon enzimi ile hazırlanan reaksiyon karışımı

Bileşen	50 µl RXN (µl)
H ₂ O	31,83
CutSmart tamponu	5
Lineer Vektör	12,17
DpnI	1

3.14.4 SLIC Metodu

Plazmid ve insert edilmek istenen DNA fragmenti elde edildikten sonra SLIC reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. SLIC metodunu gerçekleştirmek için plazmid ve DNA fragmenti 3:1 oranında karıştırılmış ve bu reaksiyon Tablo 3.18'e göre hazırlanmıştır. Ayrıca kontrol olarak aktarılmak istenen DNA fragmentini içermeyen sadece plazmid için de bu reaksiyon hazırlanmıştır. SLIC reaksiyonu, 37 °C'de 60 saniye ve 50 °C'de 30 saniye olmak üzere iki farklı sıcaklık ve zamanda inkübe edilerek optimum klonlama koşulları belirlenmiştir.

Tablo 3.18. SLIC reaksiyon karışımı

Bileşen	SLIC (Plazmid-DNA fragmenti) reaksiyon karışımı (µl)	SLIC (Plazmid) reaksiyon karışımı (µl)
H ₂ O	4	5,03
Tampon r2.1	1	1
DNA fragmenti	1,03	0
Vektör	3,97	3,97
Toplam Reaksiyon	10	10
+ T4 DNA polimeraz	0,5	0,5

3.14.5. Transformasyon

SLIC reaksiyonu sonrasında kriyotüplerde bulunan *E. coli* TOP10 ve DH5α kompetan hücreleri kullanılarak genin taşıyıcı konağa transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir hücre tüplerinden iki tekrarlı olacak şekilde farklı sıcaklıklarda inkübe edilen SLIC reaksiyon karışımlarından eklenmiştir. 1 tüp de kontrol olarak kullanılmış ve reaksiyon karışımı eklenmemiştir. Sonrasında tüm tüpler buzda 30 dakika inkübe edilmiştir ve 42 °C’de 45 saniye inkübe edilerek ısı şoku uygulanmıştır. Isı şoku sonrasında 2 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra tüm tüplere 950 µl SOC besin ortamı eklenerek 37°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. 50 µg/ml Kanamisin antibiyotiği içeren %1,5 agarlı Lisogeny Broth (LB) besin ortamı hazırlanarak petrilere dökülmüştür. İnkübasyon süresi tamamlanan hücrelerden pipetle 100 µl çekilerek petrilerin üzerine cam baget yardımı ile yayılmıştır ve 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Petrilere büyüyen koloniler pipet uçları yardımı ile alınarak PCR tüplerine koyulmuş ve Tablo 3. 19’deki PCR reaksiyon karışımı hazırlanıp üzerlerine eklenerek Tablo 3.20’de belirtilen metot ile 35 tekrarlı PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Pipet uçları ile alınan koloniler aynı zamanda 50 µg/ml Kanamisin antibiyotiği içeren LB besin ortamına ekilmiştir.

Tablo 3.19. Koloni PCR için OneTaq polimeraz için reaksiyon karışımı reçetesi.

Bileşen	25 µl RXN (µl)
H ₂ O	18,375
OneTaq tamponu	5
dNTPs	0,5
OneTaq DNA polimeraz	0,125
Forward primer (107)	0,5
Reverse primer (249)	0,5

Tablo 3.20. Koloni PCR metodu.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)
Ön denatürasyon	94	30
Denatürasyon	94	10
Yeniden birleşme	52	30
Uzatma	68	60
Son uzatma	68	120

Koloni PCR sonrasında taşıyıcı konakta plazmid üretimi gerçekleştiren klonlar seçilmiştir. Pozitif olan klonlardan plazmid ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. *E. coli* BL21 ve *E. coli* BAP1 kompetan hücreleri kullanılarak taşıyıcı konak transformasyonundaki metot gerçekleştirilmiştir. SLIC reaksiyonu yerine pozitif klon plazmidleri eklenmiştir.

3.14.6. Ekspresyon Kültürü

Koloni PCR sonrasında ekspresyon için seçilen koloniler M9 ortamına ekilmiştir ve 37 °C’de inkübe edilmiştir. OD₆₀₀=0.3-0.4’ye ulaştığında promotör tetrasiklin kullanılarak indüklenmiştir. Daha sonrasında her bir koloni 20 °C’de ve 37 °C’de sırasıyla 4 gün ve 1 gün inkübe edilmiştir.

3.14.6.1. Hasat Ve Ekstraksiyon

İnkübasyon süreleri tamamlanan kültürler 4000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenerek hasat edilmiştir ve süpernatant ile pellet birbirlerinden ayrılmışlardır. Pellet, metanol kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Süpernatant ise

üzerine etil asetat eklenerek sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile birbirinden ayrılmış ve etil asetat fazı toplanmıştır. Etil asetat fazı, rotary vakum evaporatör yardımı ile etil asetatтан uzaklaştırılmış ve metanolde çözdürülmüştür. Başlık 3.11’de belirtilen HPLC/MS analiz metoduyla süpernatant ve pellette MAA olup olmadığı analiz edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1 Siyanobakterilerden Biyokütle Elde Edilmesi Ve Ekstraksiyon Verimi

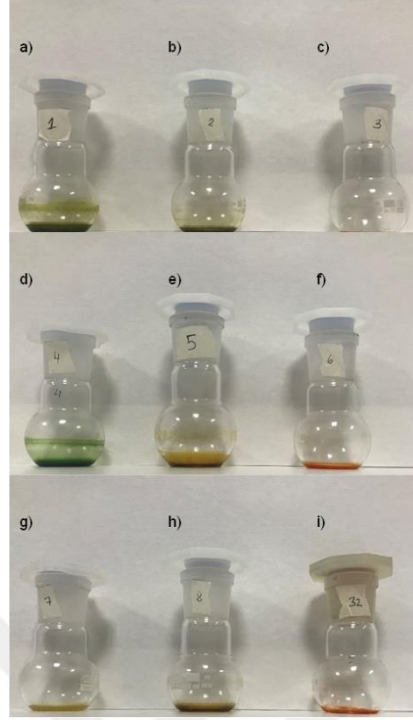
Ekstre miktarı biyokütle miktarına oranlanarak ekstraksiyon verimi hesaplanmıştır. Elde edilen ekstre miktarları ve verimleri Tablo 4.1’de belirtildiği gibi bulunmuştur. Ekstraksiyon verimleri %2,3 ile %37,4 arasında değişmektedir. En yüksek ekstre miktarı *S. nidulans* türünün kloroform:metanol ekstresinde gözlenmiştir. *S. nidulans*’ın kloroform ekstre miktarı da yine diğer türlerle karşılaştırıldığında en yüksek olarak ölçülmüştür. En düşük verim, *Spirulina platensis*’in hekzan ekstresinde görülmüştür. *Spirulina*, yaklaşık %70 protein ve %15 karbonhidrat içeriğine sahiptir. Bu nedenle hekzanın aksine daha polar solventlerin kullanıldığı solvent sistemlerinde daha fazla ekstre miktarına ulaşılması literatürle uyusmaktadır. Hekzan ile yapılan ekstraksiyonların tüm türlerde (*Anabaena* sp. ve *Nodularia* hariç) oldukça düşük çıkması, bu türlerin yağ içeriğinin düşük olabileceğini göstermektedir. Metanol ekstralarında *P. tricornutum*’un ekstre miktarı diğer türlere göre oldukça yüksek olarak bulunmuştur. *P. tricornutum*’un yüksek miktarda fukoksantin içeriğine sahip olması ve fukoksantin polar solventlerle çözünabilir olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Bhatia et al., 2010; Hossain et al., 2021). Şekil 4.1-4.4’te türlerin ekstralarının balonlardaki hali görülmektedir. Şekil 4.5’te ise Algatech türlerinin ekstralarının viallerdeki görüntüsü verilmiştir.

Tablo 4.1 Seçilen mikroalg türlerinin farklı solvent sistemleri ile ekstraksiyonu sonrası ekstraksiyon verimleri

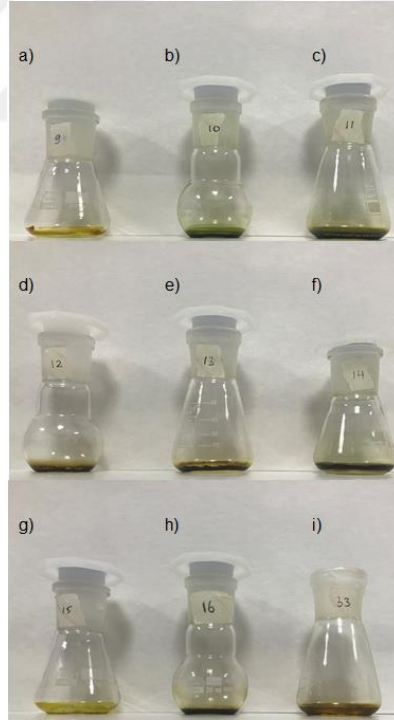
Tür	%70 Metanol Ekstreleri Verim (% mg ekstre/mg biyokütle)	Kloroform Ekstreleri Verim (% mg ekstre/mg biyokütle)	Kloroform: Metanol (1:1) Ekstreleri Verim (% mg ekstre/mg biyokütle)	Hekzan Ekstreleri Verim (% mg ekstre/mg biyokütle)
<i>Anabaena sp.</i>	8,7	13,5	11,1	12,8
<i>Anabaena variabilis</i>	10,3	15,2	13,7	7,4
<i>Nodularia sphaerocarpa</i>	4,5	12,2	12,2	7,4
<i>Nostoc linckia</i>	9,9	11,9	16,6	4,1
<i>Nostoc muscorum</i>	14,8	15,6	-	-
<i>P.tricornutum</i>	34,7	11,1	22,4	3,5
<i>S. nidulans</i>	18,4	24,5	37,4	4,6
<i>S. protuberas</i>	20,6	19,7	23	7,7
<i>S. platensis</i>	12,4	21,6	16,4	2,3
<i>Nostoc sp. Lukesova</i> '9/94	9	8	2	1
<i>Nostoc calcicola</i> Lukesova'3/97	1	2	2	1
<i>Strain #23</i>	3	6	2	1
<i>Nostoc muscorum</i> str. Lefevre CALU-304	4	8	2	3
<i>Nostoc sp. CALU-870</i>	6	7	3	1
<i>N. linckia</i> f. <i>Piscinale</i> CALU-982	3	7	3	1

Tablo 4.1. (devam)

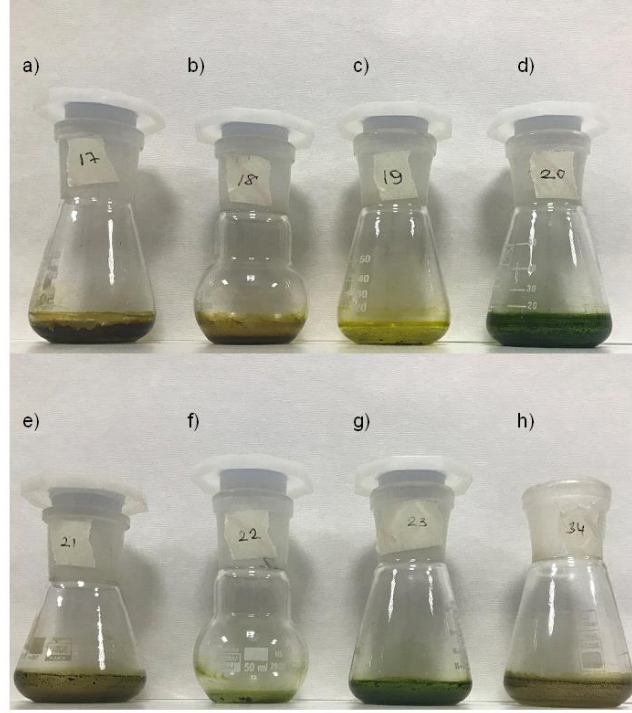
<i>Nostoc</i> sp. str. Gromov CALU-996	3	5	4	1
Strain #68	1	4	3	2
<i>Calothrix</i> sp. strain#15	4	4	1	1
<i>Nostoc</i> sp. BROMEL	4	6	3	2
<i>Nostoc</i> sp. BR RQ11	4	6	3	1
Strain #117	2	3	1	1
<i>Nostoc</i> sp. CC2 symbiont of <i>Cycas circinalis</i>	8	18	4	1



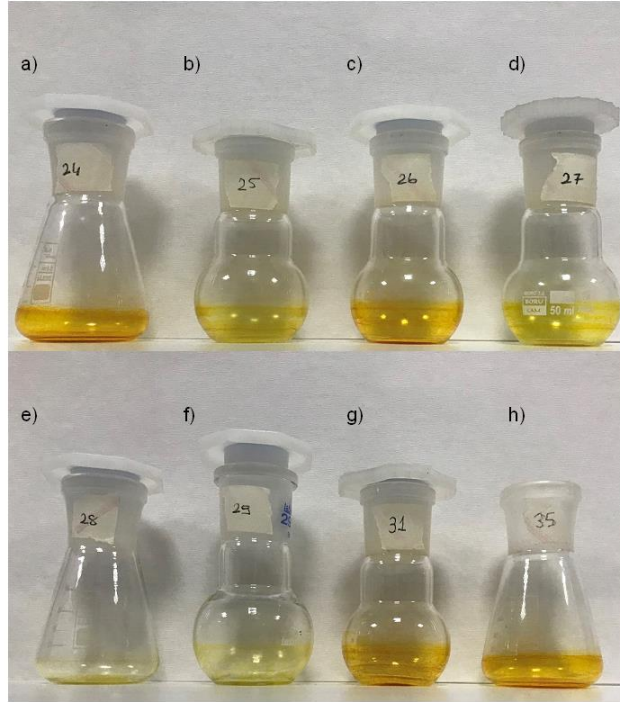
Şekil 4.1. Evaporasyon sonrası %70 metanol ekstrahları a) *P. tricornutum*; b) *N. muscorum*; c) *Anabaena* sp.; d) *S. protuberans*; e) *N. linckia*; f) *N. sphaerocarpa*; g) *S. nidulans*; h) *S. platensis*; i) *A. variabilis*



Şekil 4.2. Evaporasyon sonrası kloroform ekstrahları a) *P. tricornutum*; b) *N. muscorum*; c) *Anabaena* sp.; d) *S. protuberans*; e) *N. linckia*; f) *N. sphaerocarpa*; g) *S. nidulans*; h) *S. platensis*; i) *A. variabilis*



Şekil 4.3. Evaporasyon sonrası kloroform: metanol (1:1) ekstreleri a) *Anabaena* sp.; b) *N. sphaerocarpa*; c) *P. tricornutum*; d) *S. protuberans*; e) *N. linckia*; f) *S. nidulans*; g) *S. platensis*; h) *A. variabilis*



Şekil 4.4. Evaporasyon sonrası hekzan ekstreleri a) *Anabaena* sp.; b) *S. platensis*; c) *N. sphaerocarpa*; d) *S. protuberans*; e) *S. nidulans*; f) *P. tricornutum*; g) *N. linckia*; h) *A. variabilis*.



Şekil 4.5. Algatech kültür koleksiyonundan seçilen siyanobakteri türlerinin ekstraksiyonu sonrası elde edilen ekstraktların görüntüleri. 1-13 %70 metanol ekstraktları; 13-26 kloroform:metanol ekstraktları; 27-39 kloroform ekstraktları; 39-52 hekzan ekstraktları.

4.2. Ham Ekstrelerin Ön Tarama Analizleri

4.2.1. Güneş koruma faktörü (SPF) sonuçları

Hesaplanan güneş koruma faktörü değerleri Tablo 4.2 ve 4.3'te verilmiştir. Kullanılan solvent sistemlerinde en yüksek SPF miktarı türden türe değişmek üzere kloroform-metanol ve kloroform ekstraktlarında gözlenmiştir. 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyona sahip ekstraktların, kloroform ve kloroform-metanol ekstraktlarında yoğunluklarından dolayı ölçüm gerçekleştirilememiştir. Bu örneklerde en yüksek konsantrasyon olarak 500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyona sahip örneklerin SPF'leri hesaplanmıştır ve buna göre kloroform ekstraktlarındaki en yüksek SPF değerinin (19,76 SPF) *N. linckia* türünde olduğu görülmüştür. Metanol ekstraktlarının 1 mg/ml konsantrasyondaki SPF miktarları da literatür verileri ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek (6,8-16,8 SPF aralığında) olduğu belirlenmiştir. *S. nidulans* türünün tüm ekstraktlarının oldukça düşük SPF'e sahip olduğu gözlenmiştir.

Cephalothrix komarekiana mikroalgi ile yapılan bir çalışmada etanol ekstresinin SPF değeri 2,37 olarak belirlenmiştir (Hossain et al., 2021). Ekstrelerin SPF değerlerinin hesaplandığı çalışmaların yanısıra, saflaştırılan MAA solüsyonlarının SPF değerlerinin hesaplandığı çalışmalar da bulunmaktadır. *Porphyra vietnamensis* makroalginden elde edilen bir MAA olan porphyra-334 bileşiğinin farklı miktarlarının (100, 50 ve 25 µl) SPF değerleri hesaplanmış ve sırasıyla 1,23, 0,78 ve 0,491 olarak bulunmuştur (Bhatia et al., 2010). Yapılan çalışmalar tez çıktıları ile kıyaslandığı zaman, kullanılan türlerin SPF değerlerinin oldukça yüksek olduğu ve güneş koruma özelliği olan maddeleri üretme açısından yüksek potansiyeli olduğu görülmektedir.



Tablo 4.2. Siyanobakteri ve mikroalg türlerinin farklı solventler kullanılarak hazırlanan ekstralarının güneş koruma faktörleri (SPF). (*) Spektrofotometrik olarak okuması yapılamayacak kadar büyük değerde; (-) Veri yok.

	SPF														
	Metanol ekstraları				Kloroform ekstraları				Kloroform-Metanol ekstraları				Hekzan ekstraları		
	Konsantrasyon (µg/ml)				Konsantrasyon (µg/ml)				Konsantrasyon (µg/ml)				Konsantrasyon (µg/ml)		
Tür adı	1000	500	250	125	1000	500	250	125	1000	500	250	125	1000	500	250
<i>Anabaena variabilis</i>	6,8	3,7	2,0	1,1	9,56	4,17	2,03	0,96	26,72	13,84	6,84	3,34	7,55	3,41	1,47
<i>Anabaena sp.</i>	6,9	3,5	1,7	0,8	22,78	10,97	4,85	2,36	*	15,52	7,58	3,73	7,05	3,29	1,57
<i>N. sphaerocarpa</i>	18,2	7,6	3,8	2,0	12,64	5,66	2,95	1,45	18,08	8,55	4,24	2,09	6,33	2,94	1,42
<i>S. platensis</i>	11,1	5,7	3,0	1,5	24,15	11,74	5,94	2,90	*	18,47	9,02	4,40	21,86	10,87	5,12
<i>N. linckia</i>	16,8	7,3	3,6	1,9	*	19,76	10,31	4,60	*	18,79	8,89	4,24	10,59	3,75	1,42
<i>N. muscorum</i>	9,6	4,7	2,2	1,0	16,83	7,85	3,99	1,98	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. nidulans</i>	1,5	0,8	0,4	0,2	2,88	1,09	0,79	0,47	8,78	4,18	1,92	0,81	2,32	1,18	0,65
<i>S. protuberans</i>	15,7	7,8	3,8	1,9	*	14,43	7,00	3,36	*	21,48	10,58	5,10	4,97	2,48	1,30
<i>P. tricornutum</i>	7,4	3,9	1,9	0,9	5,64	2,41	1,40	0,69	8,80	4,03	1,86	0,78	2,60	1,32	0,74

Tablo 4.3. Algitech kültür koleksiyonundan seçilen siyanobakteri türlerinin farklı solventler kullanılarak hazırlanan ekstralarının güneş koruma faktörleri (SPF). (-): Veri yok.

Tür adı	SPF									
	Metanol ekstraları					Kloroform ekstraları				
	Konsantrasyon (µg/ml)					Konsantrasyon (µg/ml)				
	1000	500	250	125	62,5	1000	500	250	125	62,5
<i>Nostoc</i> sp. Lukesova'9/94	-	0,73	0,43	-	0,2	0,53	2,57	0,3	0,24	0,15
<i>N. calcicola</i> Lukesova'3/97	-	2,36	0,41	-	0,5	0,06	0,41	0,05	-	0,004
Strain #23	-	1,07	0,36	-	0,47	-	0,61	-	-	0,51
<i>N. muscorum</i> str. Lefevre CALU-304	0,98	2,45	0,31	-	0,91	1,23	2,13	0,87	0,27	0,51
<i>Nostoc</i> sp. CALU-870	-	-	-	-	0,4	-	0,54	0,1	-	0,11
<i>Nostoc linckia</i> f. <i>Piscinale</i> CALU-982	0,85	2,31	0,17	-	0,2	0,23	1,02	0,3	0,06	0,18
<i>Nostoc</i> sp. str. Gromov CALU-996	-	1,07	0,95	0,4	0,98	1,27	1,34	1,06	0,16	0,53
Strain #68	1,54	7,35	1,78	0,59	1,55	0,8	2,42	1,36	0,89	1,18
<i>Calothrix</i> sp. strain#15	-	0,94	0,58	0,18	0,96	1,57	1,49	1,24	0,35	0,46
<i>Nostoc</i> sp. BROMEL	0,56	2,33	0,26	-	0,88	-	1,25	0,24	0,004	0,29
<i>Nostoc</i> sp. BR RQ11	0,08	0,72	0,27	0,01	0,95	-	1,12	0,49	0,05	0,37
Strain #117	1,10	2,2	0,26	-	0,28	-	0,47	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. CC2 symbiont of <i>Cycas circinalis</i>	-	0,56	0,57	-	0,45	-	0,57	0,13	-	0,03

Tablo 4.3. (devam)

Tür adı	SPF									
	Kloroform-Metanol ekstreleri					Hekzan ekstreleri				
	Konsantrasyon (µg/ml)					Konsantrasyon (µg/ml)				
	1000	500	250	125	62,5	1000	500	250	125	62,5
<i>Nostoc</i> sp. Lukesova'9/94	5,51	4,88	1,47	0,9	1,71	-	-	-	-	-
<i>N. calcicola</i> Lukesova'3/97	0,2	0,13	-	-	0,03	-	-	-	-	-
Strain #23	6,13	3,73	1,67	0,7	1,36	-	-	-	-	-
<i>N. muscorum</i> str. Lefevre CALU-304	5,48	7,17	2,94	1,4	2,37	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. CALU-870	0,93	0,52	0,71	-	0,22	-	-	-	-	-
<i>Nostoc linckia</i> f. <i>Piscinale</i> CALU-982	4,19	5,28	2,17	0,88	1,5	0,04	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. str. Gromov CALU-996	3,45	2,93	1,79	0,65	0,87	3,15	-	-	-	-
Strain #68	1,21	2,19	1,13	0,53	0,38	-	-	-	-	-
<i>Calothrix</i> sp. strain#15	-	7,37	3,85	2,79	2,9	0,39	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. BROMEL	2,12	2,83	1,59	0,67	0,43	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. BR RQ11	2,9	2,79	1,46	0,78	0,87	-	-	-	-	-
Strain #117	1,03	1,21	0,16	0,14	0,01	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. CC2 symbiont of <i>Cycas circinalis</i>	2,59	4,14	2,34	1,06	1,41	0,08	-	-	-	-

4.2.2. Radikal süpürme aktivitesi sonuçları

Pozitif kontrol olan BHT'nin metanol çözeltisinin antioksidan aktivitesi %96,45 olarak hesaplanmıştır. Tüm türlerde ve tüm ekstrelerde yüksek antioksidan aktivite gözlenmiştir (Tablo 4.4-4.6). Seçilen konsantrasyonlarda en düşük radikal süpürme aktivitesi %55,77 olarak bulunduğundan IC50 değerleri hesaplanamamıştır. En yüksek antioksidan aktivite %98,96, *S. nidulans* türünün %70 metanol ekstresinde 1000 µg/ml konsantrasyonunda gözlenmiştir.

Tablo 4.4. Siyanobakteri ve mikroalg türlerinin farklı solventler kullanılarak hazırlanan metanol ve kloroform ekstralarının radikal süpürücü aktiviteleri (%RSA).

	Metanol ekstraları					Kloroform ekstraları				
	%RSA					%RSA				
	Konsantrasyon (µg/ml)					Konsantrasyon (µg/ml)				
Tür adı	1000	500	250	125	62,5	1000	500	250	125	62,5
Anabaena variabilis	86,54	65,09	57,84	55,77	56,95	85,21	73,22	64,05	59,32	59,62
Anabaena sp.	67,01	61,09	58,88	57,84	58,73	70,12	63,17	61,24	60,80	61,83
Nodularia sphaerocarpa	98,67	80,33	78,85	78,40	69,97	78,99	70,86	68,34	64,50	60,65
Spirulina platensis	93,49	60,65	57,40	56,36	57,40	92,16	72,04	65,53	61,39	58,43
Nostoc linckia	86,24	69,23	62,13	62,57	63,76	66,86	59,91	61,98	59,17	59,47
Nostoc muscorum	72,34	61,69	58,14	56,21	58,28	76,92	66,86	61,39	58,58	60,50
Synechococcus nidulans	98,96	61,83	57,25	69,53	66,12	79,44	77,07	74,85	59,91	56,95
Scenedesmus protuberas	77,66	69,08	67,90	62,43	56,66	74,56	77,07	66,42	62,13	58,14
Phaeodactylum tricornutum	98,82	71,45	64,64	61,54	64,64	90,09	76,63	72,78	63,76	62,13

Tablo 4.5. Siyanobakteri ve mikroalg türlerinin farklı solventler kullanılarak hazırlanan kloroform:metanol (1:1(v/v) ve hekzan ekstralarının radikal süpürücü aktiviteleri (%RSA).

	Kloroform-Metanol ekstraları					Hekzan ekstraları				
	%RSA					%RSA				
	Konsantrasyon (µg/ml)					Konsantrasyon (µg/ml)				
Tür adı	1000	500	250	125	62,5	1000	500	250	125	62,5
Anabaena variabilis	83,73	57,54	59,47	56,80	58,43	96,15	77,37	73,37	63,17	60,95
Anabaena sp.	58,73	55,92	59,17	60,21	63,02	71,01	64,64	60,50	59,62	60,80
Nodularia sphaerocarpa	74,70	67,60	65,53	61,98	59,62	78,11	73,37	68,34	63,46	57,84
Spirulina platensis	81,07	64,20	67,31	72,63	69,23	98,67	84,32	83,14	80,62	77,51
Nostoc linckia	58,28	60,21	60,95	59,62	58,43	75,44	68,49	65,83	61,69	60,21
Synechococcus nidulans	78,11	72,93	74,70	59,91	57,10	88,76	88,76	86,69	67,46	63,31
Scenedesmus protuberas	74,41	68,05	66,57	61,39	57,99	84,47	75,30	69,23	62,72	57,99
Phaeodactylum tricornutum	91,86	64,20	58,28	57,54	57,54	90,09	72,19	65,53	60,65	57,69

Tablo 4.6. Algattech kültür koleksiyonundan seçilen siyanobakteri türlerinin farklı solventler kullanılarak hazırlanan metanol ve kloroform ekstralarının radikal süpürücü aktiviteleri (%RSA). (-): Veri yok

Tür adı	Metanol ekstraları					Kloroform ekstraları				
	%RSA					%RSA				
	Konsantrasyon (µg/ml)					Konsantrasyon (µg/ml)				
	1000	500	250	125	62,5	1000	500	250	125	62,5
<i>Nostoc sp. Lukesova '9/94</i>	64,4	46,1	45	48,6	55,1	51,9	26,9		38,2	39,9
<i>Nostoc calcicola Lukesova '3/97</i>	56,2	55,9	-	40,8	45,1	59,9	39,6	31,6	28,9	45,6
<i>Strain #23</i>	61,9	52,9	47,4	51,5	54	56,2	25,5	2,1	38,4	40,7
<i>Nostoc muscorum str. Lefevre CALU-304</i>	51,6	44,3	-	40,3	42	43,1	29,3	28,3	22,2	18,5
<i>Nostoc sp. CALU-870</i>	49,6	44	43,7	45,2	48	39,3	27,9	24,4	18,4	23,8
<i>Nostoc linckia f. Piscinale CALU-982</i>	50,4	49,4		34,5	41,7	38,4	33,8	35,8	21,6	10,5
<i>Nostoc sp. str. Gromov CALU-996</i>	58,7	35,6	44,8	44,1	46,4	39,9	37	23,7	20,3	22,4
<i>Strain #68</i>	47,4	43,1	-	42,2	26,9	42,8	31,8	40,2	24,8	22,2
<i>Calothrix sp. strain#15</i>	52	39,1	39,9	37,6	46,7	36	32,4	33,5	6,4	7,6
<i>Nostoc sp. BROMEL</i>	44,6	48,6	-	41,3	34,8	40,9	35,1	12,1	11,4	6,6
<i>Nostoc sp. BR RQ11</i>	46,4	25,8	42,9	40,7	46,8	45	25,2	28,7	18,5	19,7
<i>Strain #117</i>	48,6	38,4	-	39,2	38,1	51,7	49,8	47,7	49,3	51,5
<i>Nostoc sp. CC2 symbiont of Cycas circinalis</i>	60,9	37,9	30	38,8	47,1	49,3	44,1	29,2	36,7	38,7
Tür adı	Kloroform-Metanol ekstraları					Hekzan ekstraları				
	%RSA					%RSA				
	Konsantrasyon (µg/ml)					Konsantrasyon (µg/ml)				
	1000	500	250	125	62,5	1000	500	250	125	62,5
<i>Nostoc sp. Lukesova '9/94</i>	50,6	49,2	55,8	59,8	44,3	50	25,2	26,2	24,5	8,4
<i>Nostoc calcicola Lukesova '3/97</i>	43,6	38,7	37	38,4	32,7	19,2	17	9,9	15	5,8
<i>Strain #23</i>	50,3	52,5	44,5	58	46,3	20,3	10,6	4,7	1,9	-
<i>Nostoc muscorum str. Lefevre CALU-304</i>	43,7	41,4	31,3	34	36,9	22,4	20,3	20,1	8	14,5
<i>Nostoc sp. CALU-870</i>	41,5	48,1	43,4	50,2	45,2	-	5,2	14,1	-	-
<i>Nostoc linckia f. Piscinale CALU-982</i>	46,3	36,6	39,7	40,2	40,2	-	6	5,3	11,9	11,3
<i>Nostoc sp. str. Gromov CALU-996</i>	48,1	48,5	43,6	49	49,2	0,6	5,8	-	9,3	-
<i>Strain #68</i>	48	38,8	38,4	31,4	34,3	5	-	5,3	-	-
<i>Calothrix sp. strain#15</i>	51,6	42,8	45,8	58	65	13,5	14,2	-	0,5	12,9
<i>Nostoc sp. BROMEL</i>	34,8	33,9	40	30,7	39,3	-	36	25	27,1	33,8
<i>Nostoc sp. BR RQ11</i>	48,7	47,3	38,8	55,3	52,6	32,7	28,4	24	20,4	30,2
<i>Strain #117</i>	45,9	24	37,3	36,2	49,7	-	15,4	32,5	22,4	23
<i>Nostoc sp. CC2 symbiont of Cycas circinalis</i>	46,1	44,7	48,1	49,7	51,7	-	27,4	26,5	22	28,8

Mikroalg türlerinin farklı solventlerle hazırlanan ekstraları için antioksidan aktivite tayinin DPPH metodu kullanılarak yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Shanab ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada denedikleri türlerin (*N. muscorum*, *Anabaena flous aquae*, *Chlorella vulgaris*, *Oscillatoria sp*, *S. platensis*, *Anabaena oryzae*, *Wolleea saccata*, *Nostoc humifusum*, *Phormedium fragile*) 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki su ekstralarının antioksidan aktivitesini %30,1-72,4 aralığında belirlemişlerdir (Shanab et al., 2012). Bu çalışmada kullanılan konsantrasyondaki antioksidan aktivitesi ve kullanılan türlerin antioksidan aktivitesi birbirine yakın olarak gözlenmiştir. Başka bir çalışmada 42 türün 3-1 mg/ml konsantrasyon aralığında değişen etanol ekstralarının antioksidan aktivitesi (% inhibisyon olarak ifade edilen) %2,68-19,90 aralığında belirlemişlerdir (Assunção et al., 2017). Bu çalışma ile tez çıktıları karşılaştırıldığında, tezde

kullanılan türlerin antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Toplam ekstre miktarı en yüksek olan tür *S. nidulans*'ın antioksidan aktivitesi yüksek olduğu halde SPF miktarı oldukça düşüktür. Bu nedenle güneşten koruyucu aktivitesi olmayan ancak yüksek antioksidan özellikte maddeler ürettiği düşünülmektedir. Genel olarak tüm sonuçlara bakıldığında antioksidan aktivitesi ile SPF değerleri arasında bir korelasyon olmadığı görülmektedir. Bunun en büyük nedeni SPF değeri yüksek olan mikroalg ve siyanobakterilerin UV stresinden korunmak üzere ürettiği maddelerin olması ve bu sayede hücrenin serbest radikallere fazla maruz kalmaması olabileceği düşünülmektedir.

4.3. MAA Üreten Gen Bölgelerinin Belirlenmesi

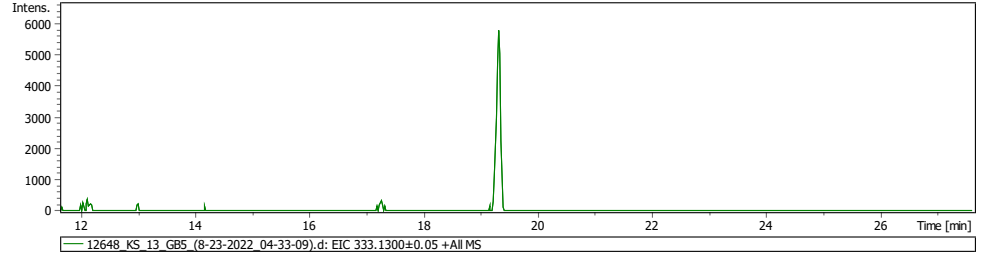
Kütle spektrometrisi sonucu elde edilen veriler, tarama yapılan türlerde shinorine ($C_{13}H_{20}N_2O_8$) mikosporin benzeri amino asit olduğunu göstermiştir. Daha sonrasında pozitif olduğu belirlenen 2 türün gen dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu türlerden *Nostoc* sp. CALU-997 türünde bulunan gen bölgeleri Şekil 4.6'da verilmiştir. NshA gen bölgesi 3-dehydroquinate sentaz geni, NshB gen bölgesi O-metiltransferaz, NshC gen bölgesi ATP-grasp bölgesi, metal iyon bağlama gen bölgesi, NshD gen bölgesi ise nonribozomal peptid sentaz (NRPS) gen bölgesi olarak belirlenmiştir. Bu dört gen bölgesinin shinorine üretimi ile alakalı olduğu belirlenmiştir.



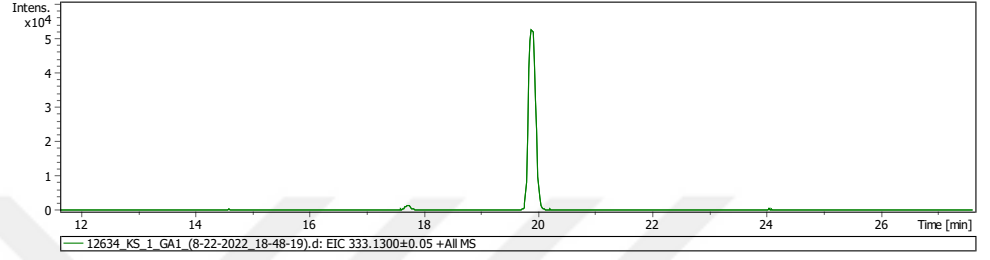
Şekil 4.6. *Nostoc* sp. CALU-997'de bulunan MAA sentezini sağlayan gen bölgeleri.

4.4 Güneş Koruyucu Molekül İçeren Türlerin Belirlenmesi

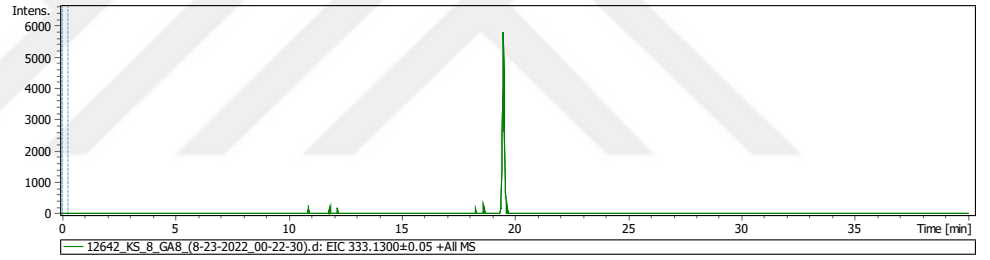
MAA'lardan en yaygın bulunan shinorine molekülünün (k_{max} : 334 nm; m/z 333) 50+ türde taraması gerçekleştirilmiştir. Pozitif olan türlerin HPLC/MS profilleri Şekil 4.7-4.11'de verilmiştir. Üretimler için shinorine üreten türlerle çalışılmasına karar verilmiştir.



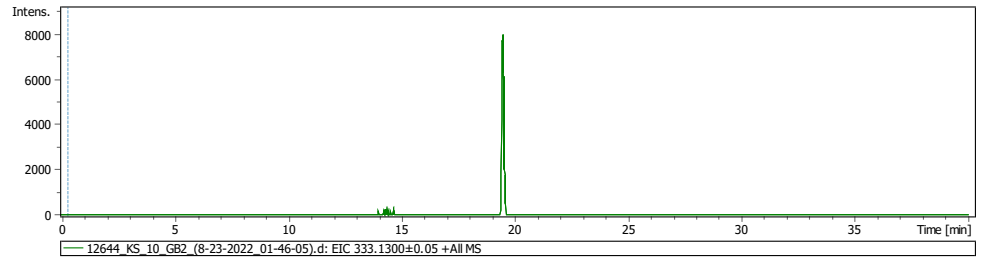
Şekil 4.7. *Nostoc* sp. Lukesova'9/94 türünün HPLC/MS profili (333 m/z).



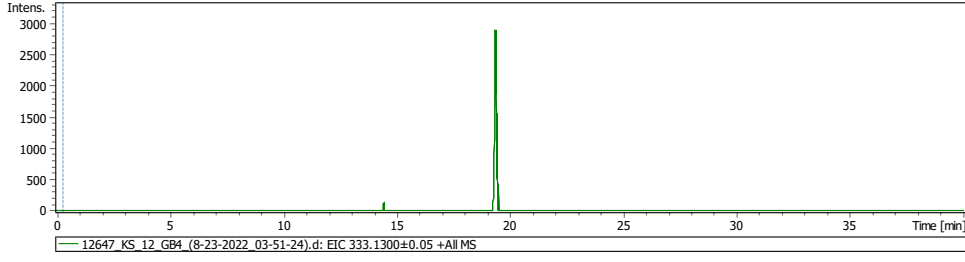
Şekil 4.8. *Nostoc* sp. Lukesova'30/93 türünün HPLC/MS profili (333 m/z).



Şekil 4.9. *N. linckia* CALU-129 türünün HPLC/MS profili (333 m/z).



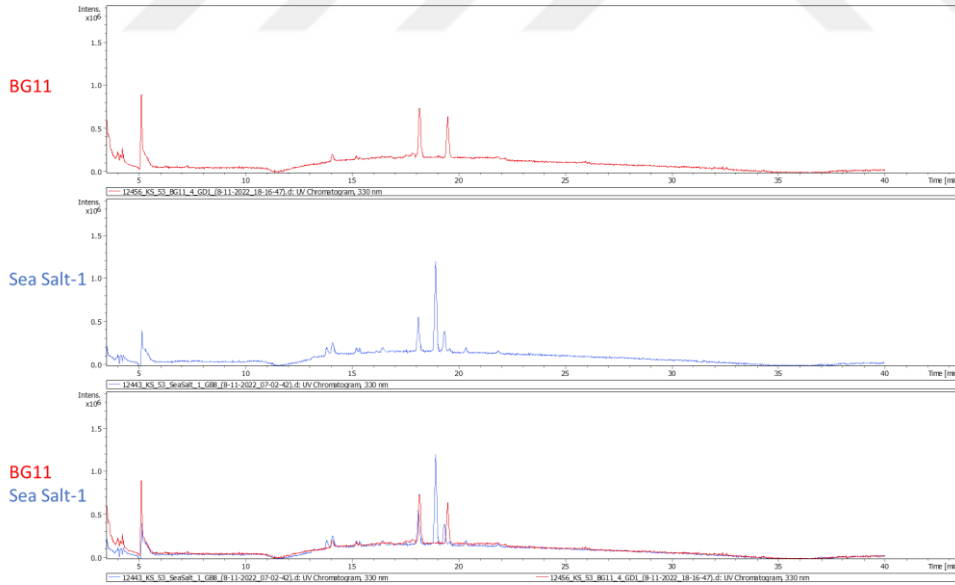
Şekil 4.10. *Nostoc* sp. CALU-997 türünün HPLC/MS profili (333 m/z).



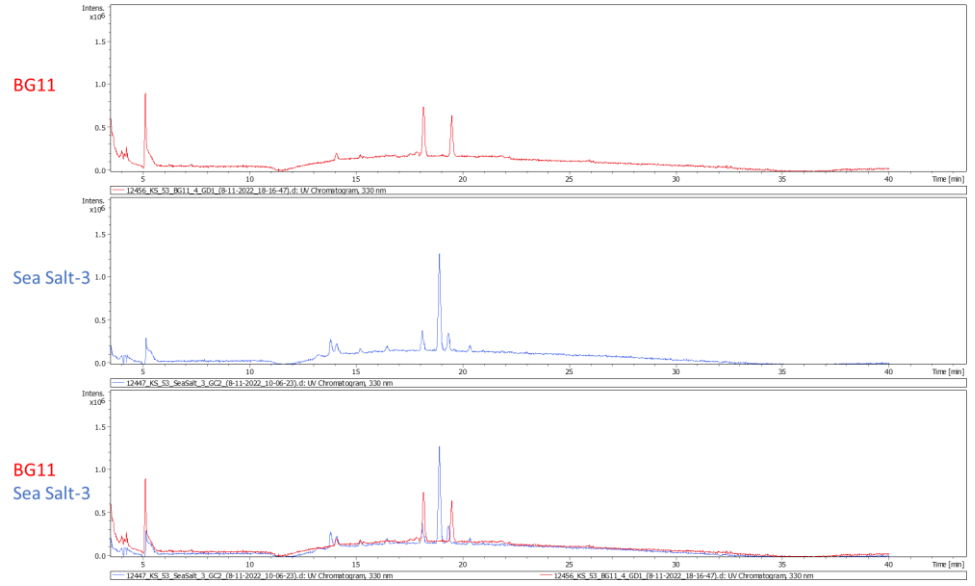
Şekil 4.11. *Calothrix* sp. türünün HPLC/MS profili (333 m/z).

4.5 Güneş koruyucu moleküllerin indüklenmesi

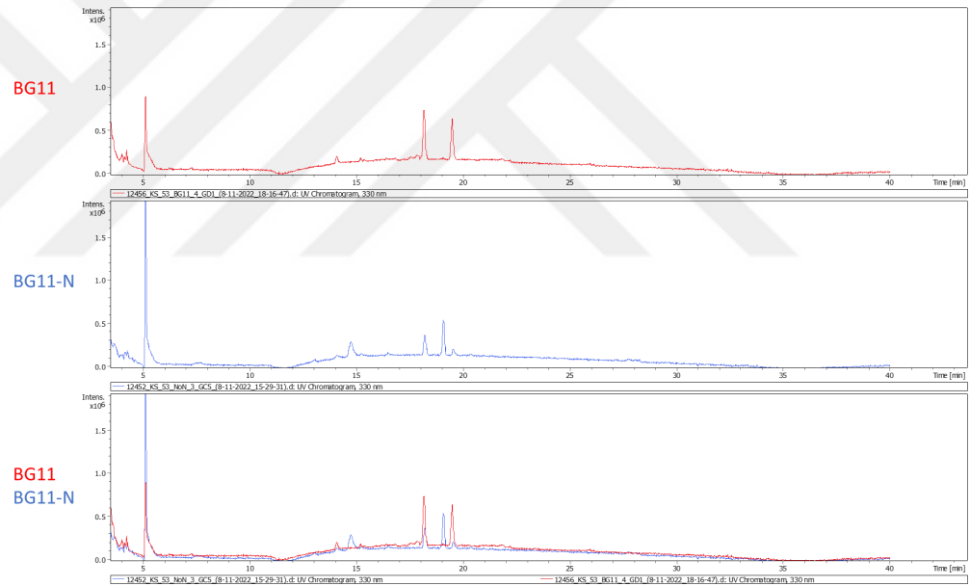
Elde edilen sonuçlara göre besin ortamı içeriğini değiştirmenin *Nostoc* sp. CALU-997 türünün ürettiği maddeleri etkilediği belirlenmiştir. Şekil 4.12-4.18’de ekstrelerin 333 nm’deki HPLC profilleri verilmiştir. Literatüre göre en fazla NaCl konsantrasyonundan etkilenen MAA’ların yapılan bu tez çalışması ile örtüşmediği belirlenmiştir (Gharib et al., 2020). En fazla değişim, MgSO₄ ve deniz tuzunda gözlenmiştir. Deniz tuzu ile farklı maddelerin de üretildiği, MgSO₄ ile ise üretilen maddelerde artış olduğu belirlenmiştir.



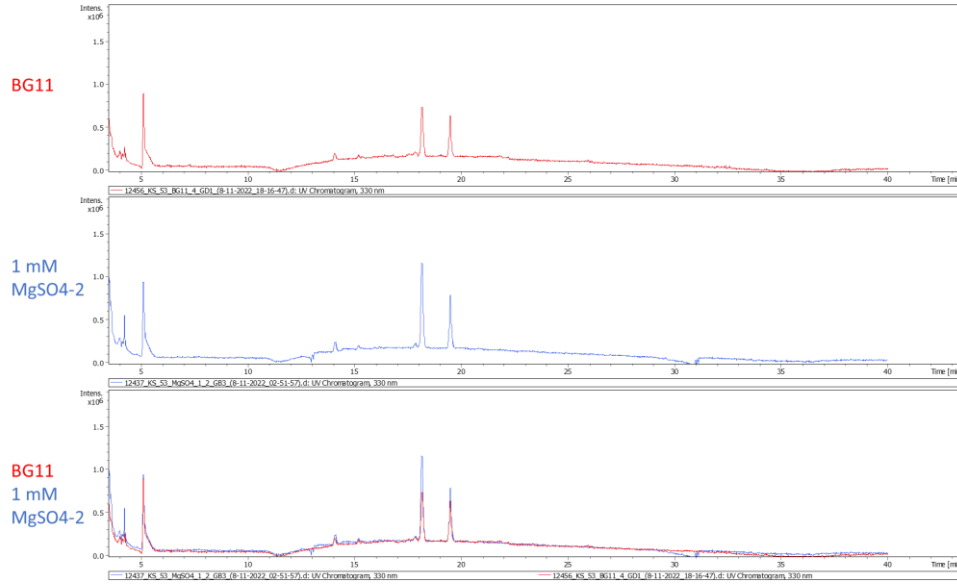
Şekil 4.12. BG11 ve BG11+Deniz tuzu (1%) üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm).



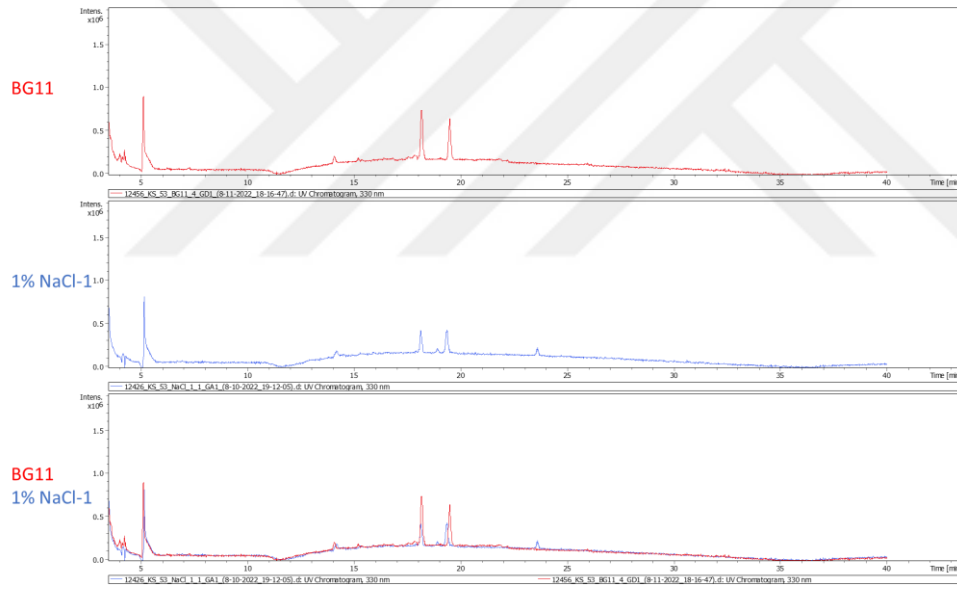
Şekil 4.13. BG11 ve BG11+Deniz tuzu (3%) üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm).



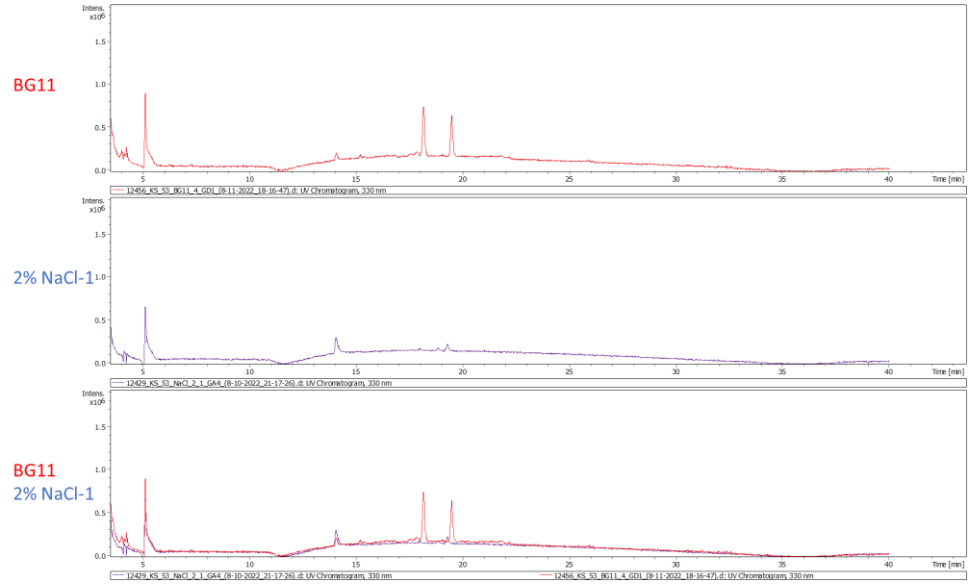
Şekil 4.14. BG11 ve BG11-N üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm).



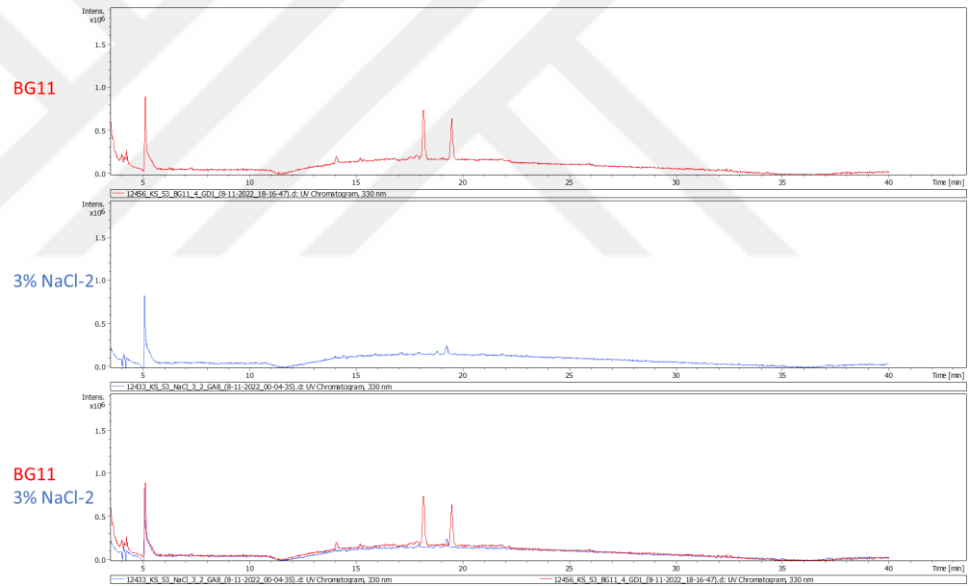
Şekil 4.15. BG11 ve BG11+1 Mm MgSO₄ üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm).



Şekil 4.16. BG11 ve BG11+%1 NaCl üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm).



Şekil 4.17. BG11 ve BG11+%2 NaCl üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm).



Şekil 4.18. BG11 ve BG11+%3 NaCl üretimlerinin HPLC profilleri (333 nm).

4.6 Siyanobakteri Türlerinin Panel Ve Tübüler Fotobiyoreaktörlerde Dış Alan Üretimleri

Üretim boyunca gün içerisinde değişkenlik gösteren ışık şiddeti, UV radyasyon ve sıcaklık takip edilmiştir. Işık şiddeti günün farklı saatlerinde ve havanın güneşli ya da bulutlu olmasına göre oldukça değişkenlik göstermiştir. UV

radasyonun da yine aynı şekilde ışık şiddetiyle paralel bir şekilde günün farklı saatlerine ve hava şartlarına bağlı olarak farklı olduğu gözlenmiştir. Üretim boyunca takip edilen 3 dakikada bir ölçüm alan termometrenin ölçtüğü sıcaklıklar Tablo 4.7’de gösterilmiştir. Laboratuvar ortamında 20-30 °C arasındaki sıcaklık değerlerinde üretimini gerçekleştirdiğimiz kültürlerin düşük sıcaklıklarda büyüme hızlarının oldukça fazla bir şekilde düştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.19-4.26).

Tablo 4.7. Aylara göre dış alan sıcaklık ortalamaları.

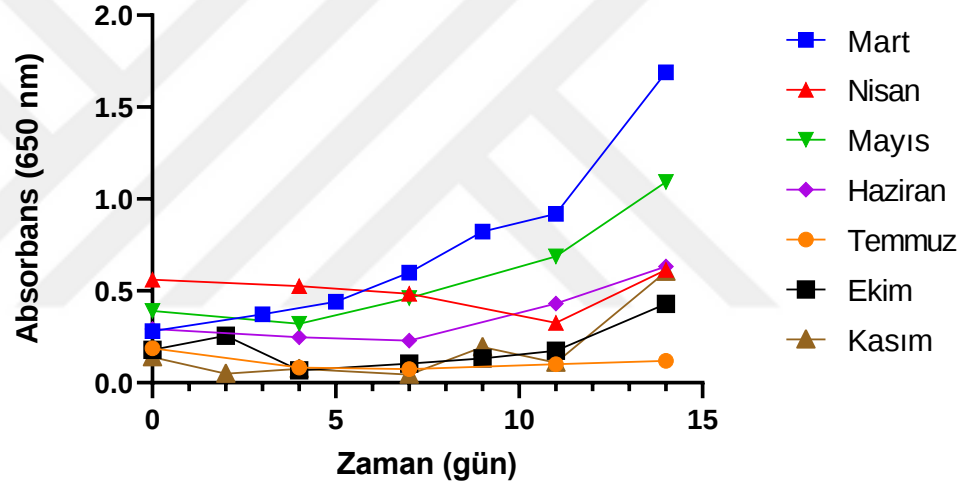
Üretim Yapılan Aylar	Sıcaklık (°C)		
	Minimum	Maksimum	Ortalama
Şubat	1,6	17,7	6,3
Mart	6,3	30,7	14,1
Nisan	10	33,4	20,3
Mayıs	15,2	34,1	22,4
Haziran	19,8	43,2	29,6
Temmuz	22,5	47,5	32,3
Ekim	14,6	35	23,7
Kasım	3,9	34,6	16,4

Büyüme eğrileri incelendiğinde en iyi üretimlerin bahar aylarında olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.19-4.26). Tüm üretimlerin analizleri yorumlandığında, hem ortalama sıcaklıkların laboratuvar koşullarındaki optimum üretimlerle aynı değerlerde olması hem de UV radyasyon miktarının daha uygun olması nedeniyle bahar aylarında dış alan üretimlerin İzmir koşullarında gerçekleştirilebileceği bulgusuna ulaşılmıştır. Üretim boyunca alınan örnekler -20 °C’de saklanmış ve HPLC/MS analizi için metanol ile muamele edilerek sonikasyon işlemi ile hücreler parçalanmıştır. Santrifüjledikten sonra HPLC/MS analizleri için viallere aktarılmıştır.

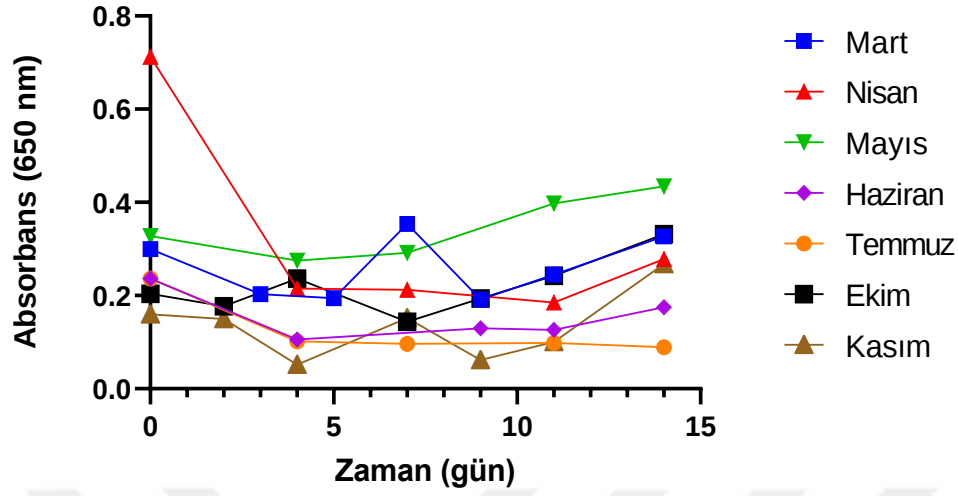
Üretim boyunca sıcaklık ölçümleri yapılmıştır ve ortalama sıcaklıklar, mart ayı için 14,1 °C, nisan ayı için 19,1 °C, mayıs ayı için 22,4 °C, haziran ayı için 29,6 °C, temmuz ayı için 32,3 °C, ekim ayı için 23,7 °C ve kasım ayı için 16,4 °C olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda güneş ışığının şiddeti ve UV radyasyonu da üretim boyunca takip edilmiştir. Işık şiddeti maksimum 60 klux, UV radyasyon ise 35 W.m⁻² olarak ölçülmüştür. UV radyasyona maruz kalma süresi, gün süresiyle doğru

orantılı olarak artmıştır. Üretimi gerçekleştirilen türlerin üretim boyunca yüksek radyasyon, yüksek ışık şiddeti ve değişken sıcaklıklara maruz kalması nedeniyle strese girdiği gözlenmiştir. Bazı türler, pigmentlerini kaybederken bazıları ise daha fazla miktarda pigment üreterek stres faktörlerinin sonuçlarını elimine etmeye çalışmıştır.

Şekil 4.19-4.20’de panel ve kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde *Nostoc* sp. Lukesova’9/94 türünün aylara göre absorbans değişimlerinin ortalaması görülmektedir. Aylara göre büyümeler karşılaştırıldığında en hızlı büyümenin panel fotobiyoreaktörler için mart ayında, kabarcık kolon fotobiyoreaktörler için mayısta olduğu gözlenmiştir.

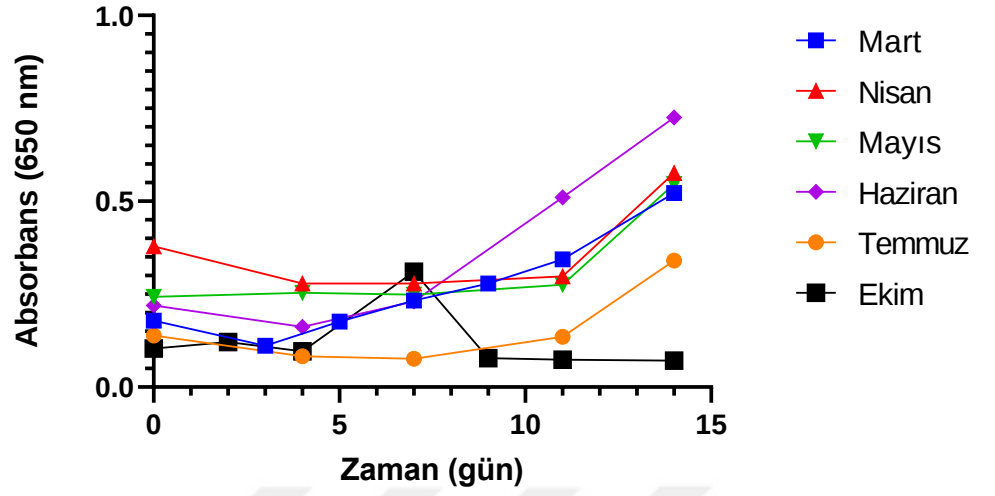


Şekil 4.19. Panel fotobiyoreaktörlerde *Nostoc* sp. Lukesova’9/94 türünün aylara göre absorbans değişimi.

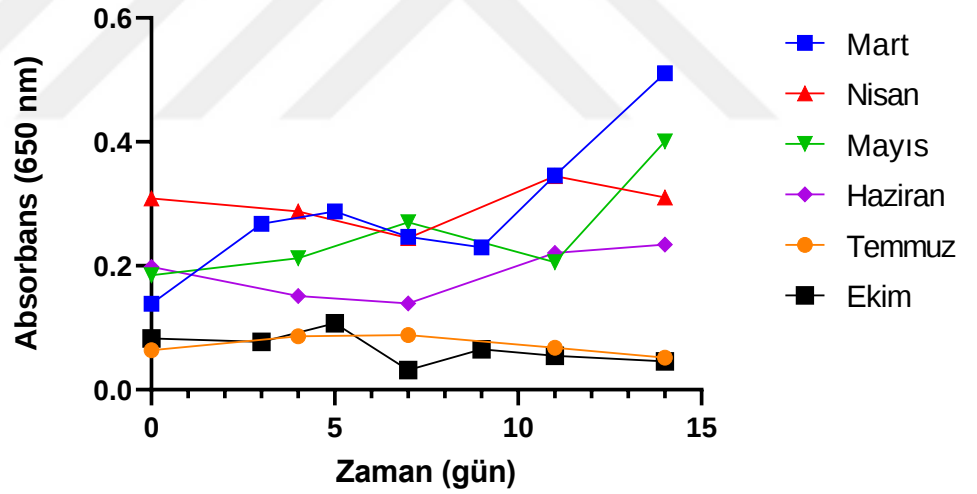


Şekil 4.20. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde *Nostoc* sp. Lukesova'9/94 türünün aylara göre absorbans değişimi.

Şekil 4.21-4.22'de panel ve kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde *Nostoc* sp. Lukesova'30/93 türünün aylara göre absorbans değişimlerinin ortalamaları görülmektedir. Aylara göre büyümeler karşılaştırıldığında en hızlı büyümenin panel fotobiyoreaktörler için haziran ayında, kabarcık kolon fotobiyoreaktörler için mart ayında olduğu gözlenmiştir.



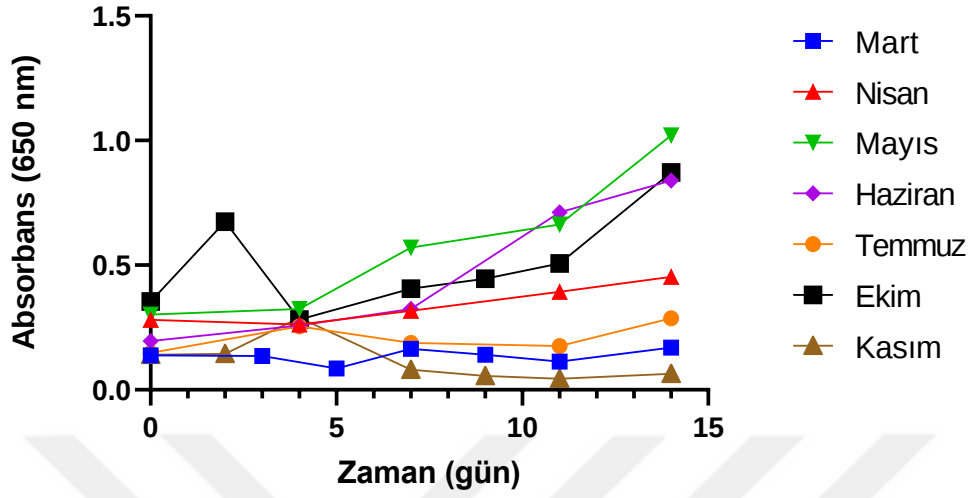
Şekil 4.21. Panel fotobiyoreaktörlerde *Nostoc* sp. Lukesova'30/93 türünün aylara göre absorbans değişimi.



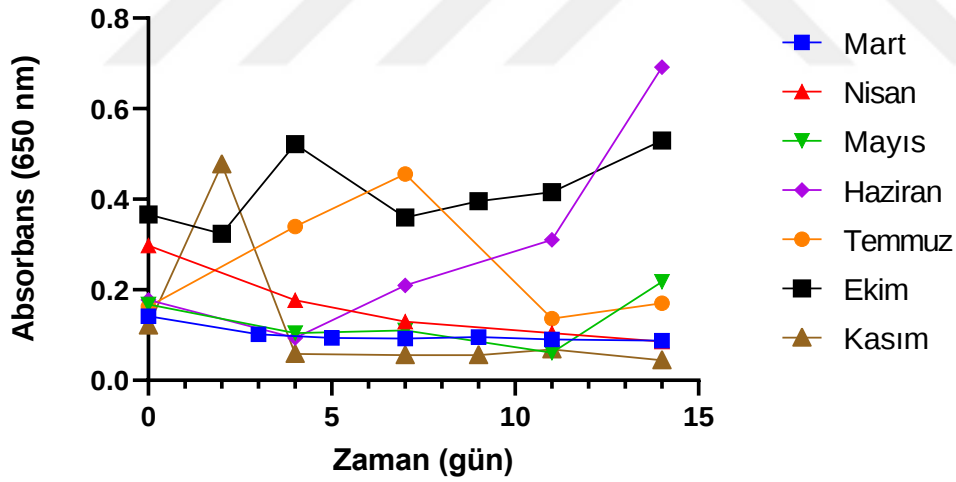
Şekil 4.22. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde *Nostoc* sp. Lukesova'30/93 türünün aylara göre absorbans değişimi.

Şekil 4.23-4.24'te panel ve kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde *N. linckia* CALU-129 türünün aylara göre absorbans değişimi görülmektedir. Aylara göre büyümeler karşılaştırıldığında en hızlı büyümenin panel fotobiyoreaktörler için

mayıs ayında, kabarcık kolon fotobiyoreaktörler için haziran ayında olduğu gözlenmiştir.



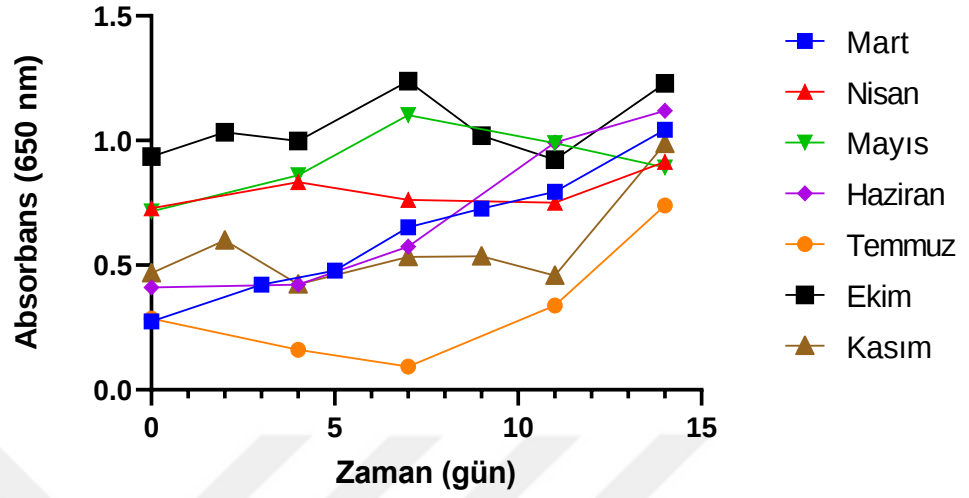
Şekil 4.23. Panel fotobiyoreaktörlerde *N. linckia* CALU-129 türünün aylara göre absorbans değişimi.



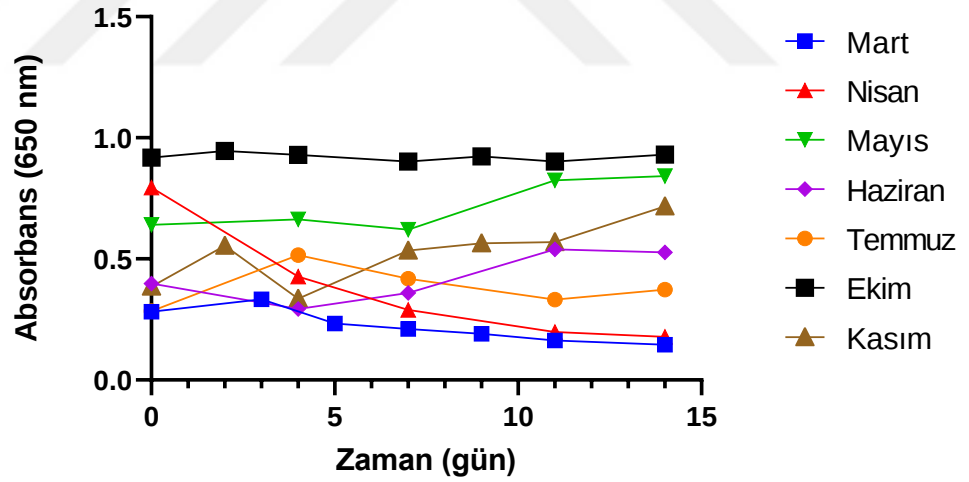
Şekil 4.24. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde *N. linckia* CALU-129 türünün aylara göre absorbans değişimi.

Şekil 4.25-4.26'da panel ve kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde *Nostoc* sp. CALU-997 türünün aylara göre absorbans değişimi görülmektedir. Aylara göre

büyümler karşılaştırıldığında en hızlı büyümenin hem panel fotobiyoreaktörler için hem kabarcık kolon fotobiyoreaktörler için mayıs ayında olduğu gözlenmiştir.



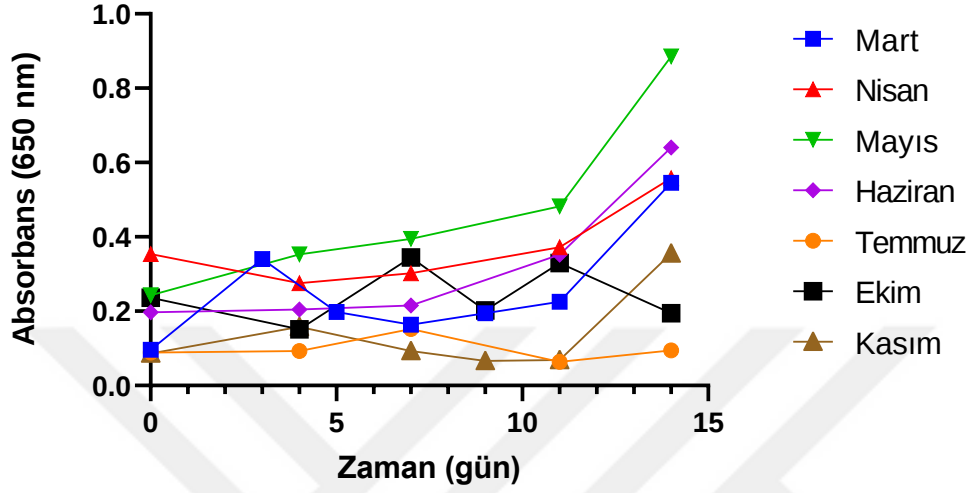
Şekil 4.25. Panel fotobiyoreaktörlerde *Nostoc* sp. CALU-997 türünün aylara göre absorbans değişimi.



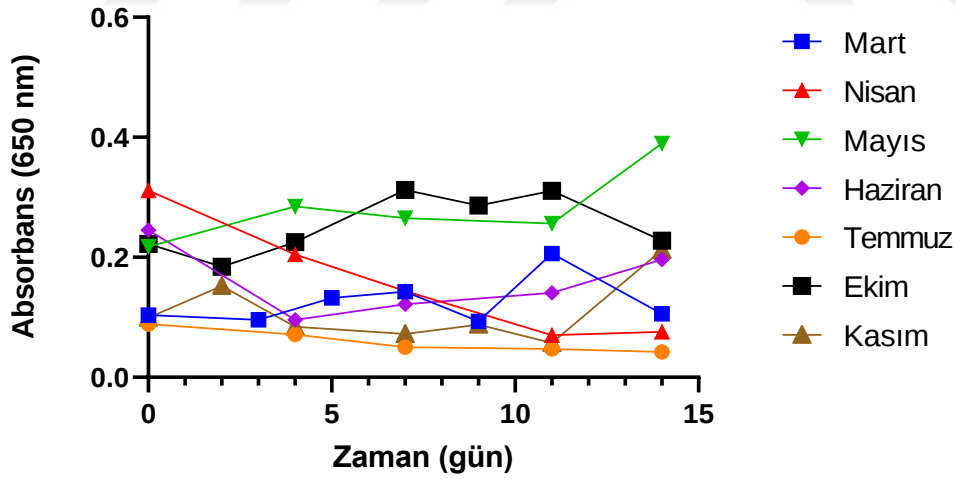
Şekil 4.26. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde *Nostoc* sp. CALU-997 türünün aylara göre absorbans değişimi.

Şekil 4.27, 4.28’de panel ve kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde *Calothrix* sp. türünün aylara göre absorbans değişimi görülmektedir. Aylara göre büyümler

karşılaştırıldığında en hızlı büyümenin hem panel fotobiyoreaktörler için hem kabarcık kolon fotobiyoreaktörler için mayıs ayında olduğu gözlenmiştir.

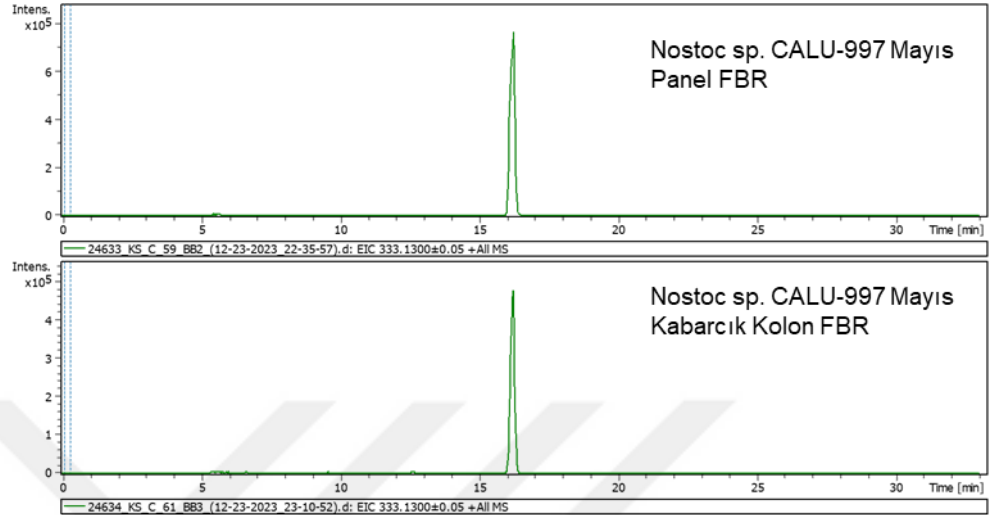


Şekil 4.27. Panel fotobiyoreaktörlerde *Calothrix* sp. türünün aylara göre absorbans değişimi



Şekil 4.28. Kabarcık kolon fotobiyoreaktörlerde *Calothrix* sp. türünün aylara göre absorbans değişimi

Dış alan üretimlerinden ekstraksiyon yapılarak HPLC/MS profilleri incelenmiştir. Shinorine açısından pozitif çıkan tür ve üretim koşulları Şekil 4.29’te gösterilmiştir.



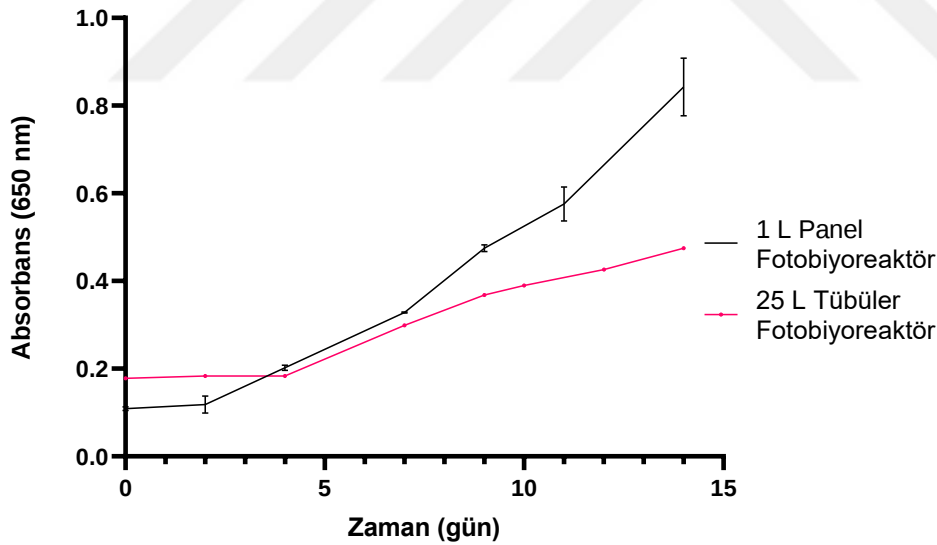
Şekil 4.29. Dış alan üretimlerin HPLC/MS profilleri.

4.7 Pilot Ölçek Üretimleri

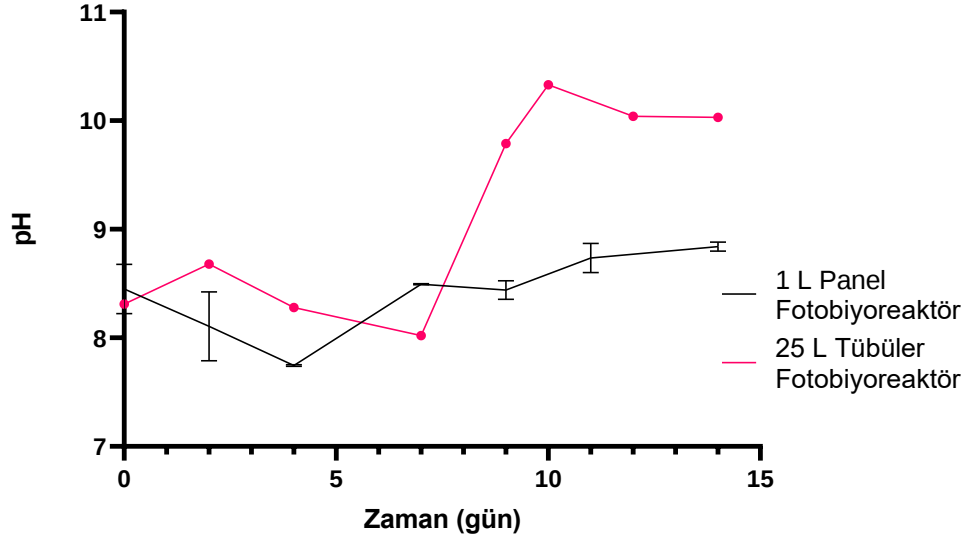
Çalışma hacmi 1 L olan panel fotobiyoreaktör ve 25 L olan tübüler fotobiyoreaktörlerde üretimi gerçekleştirilen *Nostoc* sp. CALU-997 türünün absorbands-zaman ve pH-zaman grafikleri Şekil 4.30 ve 4.31’de gösterildiği gibidir. Aşı kültürü schott şişelerde daha etkin bir karıştırma ve havalandırmaya sahip olduğundan tübüler fotobiyoreaktörlere inokülasyon yapıldığında lag süresi 4 gün olarak belirlenmiştir. 4. günden itibaren absorbanstaki artışa bağlı olarak büyümenin hızlandığı görülmüştür. Üretimin 8. günden itibaren CO₂ konsantrasyonunun düşük olması nedeniyle pH’ın arttığı gözlemlenmiş ve 25 L’lik tübüler fotobiyoreaktörden daha büyük ölçekteki hacimlere çıkarken inokülasyonun 15. günde yapılmasına karar verilmiştir.

25 L tübüler fotobiyoreaktörde yapılan üretimde, pH’ın lag fazının sonunda yükselmesi nedeniyle büyümenin etkilendiği düşünülmektedir. Siyanobakterilerin optimum büyüme pH değerleri 7.5-10 arasında değişmektedir. Bazı türler için alkali pH koşullarının büyümeyi indükleyebileceği literatürde belirtilmiştir (Nayak and

Prasanna, 2007). Ancak pH'ın 10'un üzerine çıkması büyümeyi olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Etkin bir havalandırma ile içeride biriken fotosentez ve metabolizma atığı olan gazların kültür ortamından uzaklaştırılması gerekmekte ve kültür ortamı içerisine yeterli oksijen ve karbondioksit transferi yapılmalıdır. Havalandırma ve karıştırmanın yetersiz olduğu durumlarda pH yükselerek üretimi olumsuz etkileyebilmektedir. 1 L panel fotobiyoreaktörde havalandırmanın daha etkili gerçekleştirilmesi nedeniyle pH değerlerinin 7,74 ile 8,84 arasında değiştiği buna bağlı olarak da biyokütle üretim veriminin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 25 L tübüler fotobiyoreaktörde ise pH 8,02 ile 10,33 arasında değişmiştir. pH'nin 10'un üzerine çıkması biyokütle verimini olumsuz yönde etkilemiştir. Karıştırma ve havalandırmanın, panel fotobiyoreaktörlere göre tübüler fotobiyoreaktörlerde daha az etkili olması nedeniyle büyüme daha yavaş gerçekleşmiştir. Optimum pH seviyelerinde ise büyüme daha hızlı gerçekleşecektir. Bu nedenle ölçek büyütme çalışmalarında tasarlanan fotobiyoreaktörlerde pH kontrolünün gerçekleştirilmesi ile daha yüksek verim elde edilebilecektir.

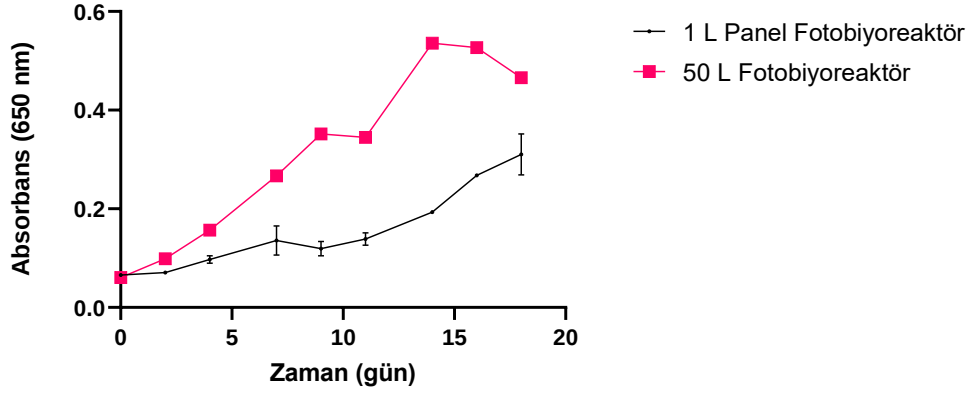


Şekil 4.30. *Nostoc* sp. CALU-997 türünün 1 L panel fotobiyoreaktör ve 25 L tübüler fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerin absorbans-zaman grafiklerinin karşılaştırması.

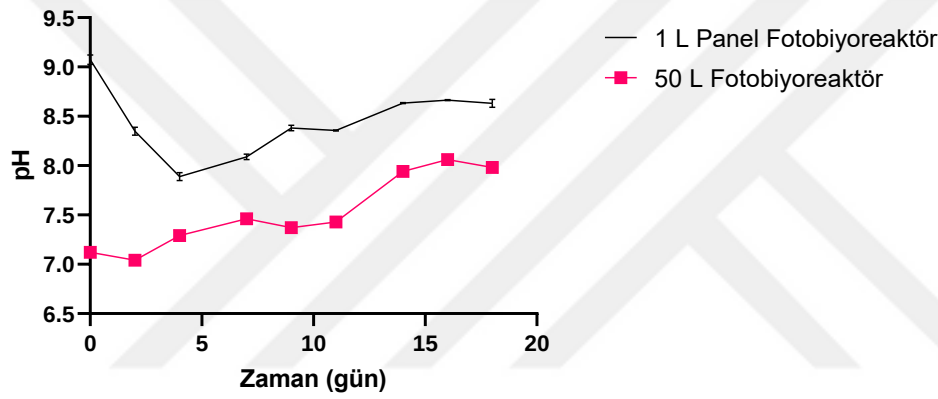


Şekil 4.31. 1 L panel fotobiyoreaktör ve 25 L tübüler fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerin pH-zaman grafiklerinin karşılaştırması.

N. linckia CALU-129 türünün 1 L ve 50 L panel fotobiyoreaktördeki absorbans-zaman ve pH-zaman grafiği Şekil 4.32 ve 4.33'te gösterildiği gibidir. Panel fotobiyoreaktörde karıştırma havalandırma ile sağlanmaktadır. Bu sistemde havalandırmanın yeterli olması nedeniyle tübüler fotobiyoreaktöre göre pH'ın daha stabil kalmasına neden olmuştur. Üretim boyunca örnek alınarak takip edilen pH değerleri 6.94 ile 7.94 arasında değişmiştir. 50 L panel fotobiyoreaktörde daha hızlı bir büyüme olduğu gözlenmiştir. Tablo 4.8'de tüm ölçek büyütme çalışmaları yapılan türlerin spesifik büyüme hızları (μ) ve ikilenme süreleri (t_d) hesaplanarak gösterilmiştir. Tübüler fotobiyoreaktörde ikilenme süresinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Yavaş büyüme, havalandırmanın ve buna bağlı olarak oksijen transferinin yetersiz olmasından kaynaklanmaktadır. Panel fotobiyoreaktörlerde *N. linckia* CALU-129 türü için 50 L'de büyümenin 1 L'ye göre daha hızlı olduğu gözlenmiştir. 50 L'lik bu üretimde kütle transferinin daha etkin gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Aynı zamanda 1 L panel fotobiyoreaktörde inokülasyon yapılan kültürün ortamının pH'sinin yüksek olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.32. *N. linckia* CALU-129 türünün 1 L panel fotobiyoreaktör ve 50 L panel fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerin absorpsiyon-zaman grafiklerinin karşılaştırması.



Şekil 4.33. *N. linckia* CALU-129 türünün 1 L panel fotobiyoreaktör ve 50 L panel fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerin pH-zaman grafiklerinin karşılaştırması.

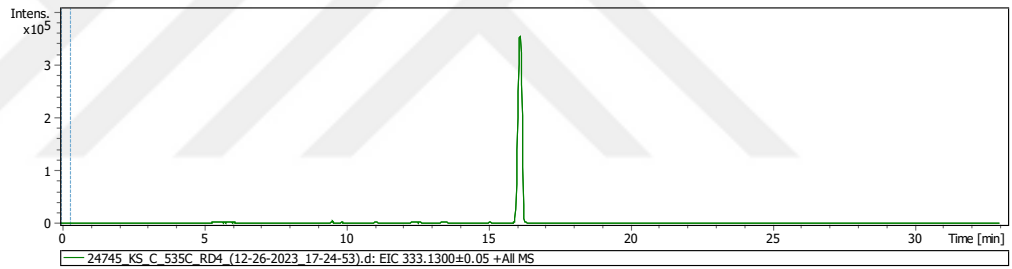
Tablo 4.8. *Nostoc* sp. CALU-997 ve *N. linckia* CALU-129 türlerinin farklı reaktör tiplerinde ve farklı çalışma hacimlerinde spesifik büyüme hızı ve ikilenme süreleri.

Tür adı	Reaktör tipi	Çalışma Hacmi (L)	Spesifik büyüme hızı (μ) (gün^{-1})	İkilenme süresi (td) (gün)
<i>Nostoc</i> sp. CALU-997	Panel FBR	1	0,16	4,23
	Tübüler FBR	25	0,08	8,20
<i>N. linckia</i> CALU-129	Panel FBR	1	0,09	7,67
		50	0,14	4,92

Tüm üretimler göz önünde bulundurulduğunda *N. linckia* CALU-129 türü ile ölçek büyütme çalışmalarının başarılı olduğu, üretimin verimli bir şekilde gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Bu siyanobakteri türünün hem MAA üretimi açısından hem de büyük ölçekli üretimlerde verimli olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca üretimi etkileyen en önemli parametrenin pH olduğu ve bu nedenle pH'ın üretim boyunca kontrol edilmesinin kritik önemde olduğu belirlenmiştir.

4.8 Güneş Koruyucu Moleküllerin Kısmi Saflaştırılması

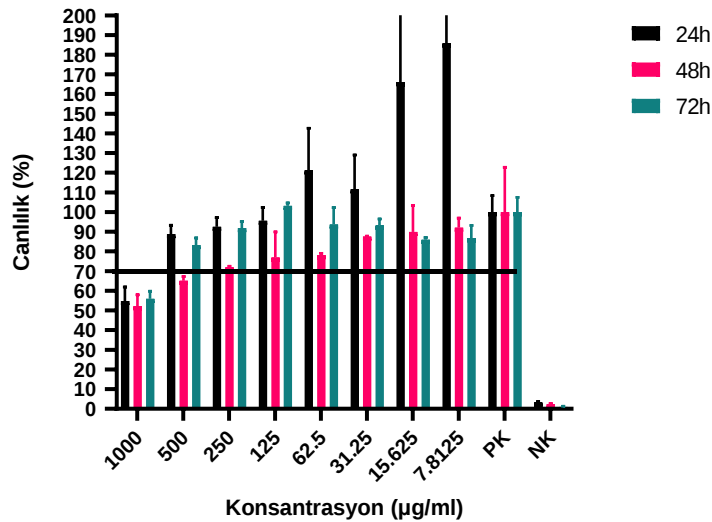
Panel fotobiyoreaktörden elde edilen *Nostoc* sp. CALU-997 türünün biyokütlesinin kısmi saflaştırma sonrasında HPLC/MS profilleri incelenmiştir ve ekstrenin içeriğinde yüksek miktarda shinorine olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.34). Ekstre krem formülasyonu için ve sitotoksisite analizleri için kullanılmıştır.



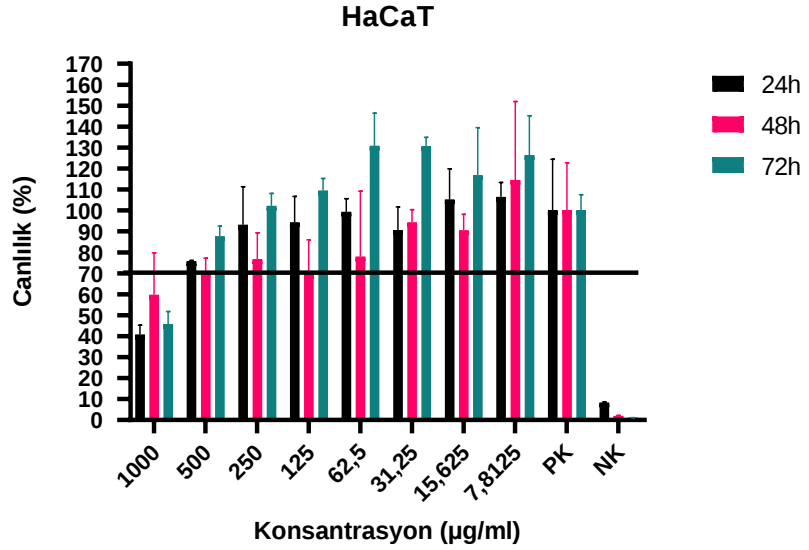
Şekil 4.34. Kısmi saflaştırma sonrası ekstrenin HPLC/MS profili.

4.9 Sitotoksosite Sonuçları

Absorbanslarına göre pozitif kontrol %100 canlılıkta kabul edilerek, madde uygulanan hücrelerin % canlılıkları hesaplandı. Buna göre hücre canlılığı ve shinorine konsantrasyonuna karşılık grafik GraphPad Prism kullanılarak oluşturuldu (Şekil 4.35, 4.36). Uygulanan konsantrasyonların hücreler için sitotoksitesinin oldukça az olduğu belirlendi. IC50 değerleri hücre canlılığının %50'nin altında olduğu tek bir konsantrasyon olduğu için hesaplanamadı. Sonraki dönemlerde IC50 değerini hesaplayabilmek için daha yüksek konsantrasyonların da uygulanmasına karar verildi. Şekil 4.35 ve 4.36'da görüldüğü üzere L929 fare fibroblast hücrelerinde 24 saat sonunda, HaCaT insan immortalize keratinosit hücrelerinde ise 72 saat sonunda, düşük konsantrasyonlarda uygulanan shinorine maddesinin hücre proliferasyonunu artırdığı gözlemlendi. Bunun nedeninin shinorine maddesinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Canlılığın %70 üzerinde olduğu dozlarda uygulanan bileşiğin sitotoksik etkisinin olmadığı söylenebilmektedir. Buna göre içeriğinde shinorine bulunan ekstrenin 500 µg/ml konsantrasyonların altında sitotoksik olmadığı belirlenmiştir.

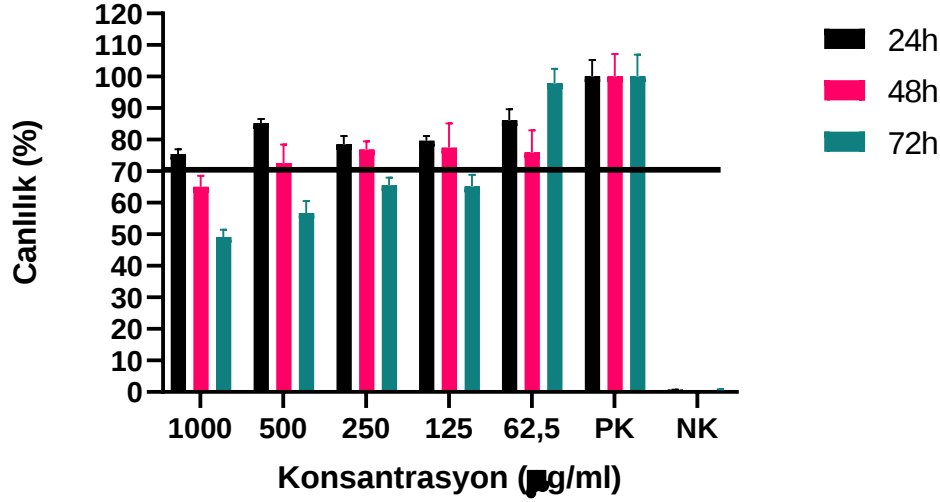


Şekil 4.35. Farklı konsantrasyonlardaki shinorine maddesinin L929 hücre hatları üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saatteki etkisi. PK; pozitif kontrol, madde uygulanmamış besin ortamı içerisindeki L929 hücreleri, NK; negatif kontrol, DMSO uygulanmış L929 hücreleri.

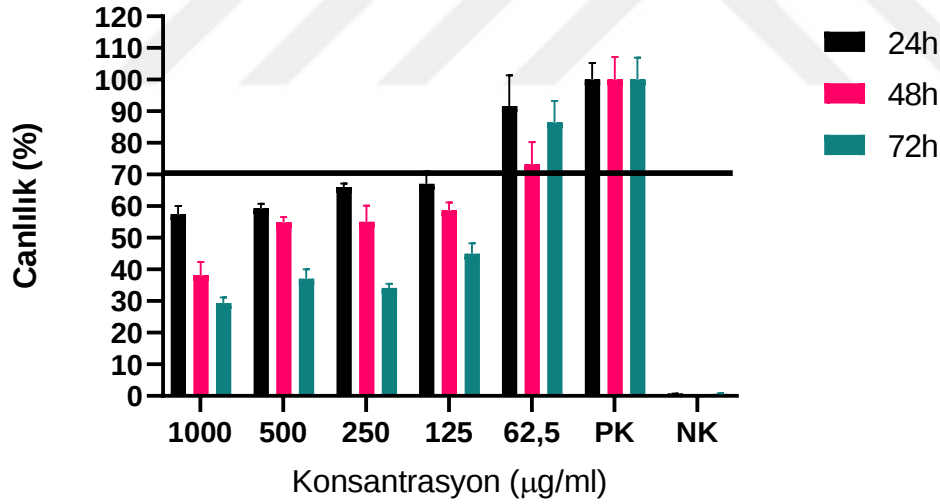


Şekil 4.36. *E. coli*'den elde edilen shinorine bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda HaCaT hücre hatları üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saatteki etkisi. PK; pozitif kontrol, madde uygulanmamış besin ortamı içerisindeki HaCaT hücreleri, NK; negatif kontrol, DMSO uygulanmış HaCaT hücreleri

Şekil 37'de *Nostoc sp.* CALU-997 türünden elde edilen shinorine içeren ekstrenin sitotoksosite analizinin sonuçları bulunmaktadır. Bu sonuçlara göre 24. saatte hiçbir dozun toksik olmadığı gözlenmektedir. 62,5 µg/ml konsantrasyonun ise 24, 48 ve 72. Saatlerin hiçbirinde toksik bir etki yaratmadığı belirlenmiştir. Şekil 38'de *N. linckia* CALU-129 türünden elde edilen shinorine içeren ekstrenin sitotoksosite analizinin sonuçları verilmiştir. Yüksek dozlarda uygulanan ekstrenin HaCaT hücre hattı üzerinde toksik olduğu ancak 62,5 µg/ml konsantrasyonda toksik bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.



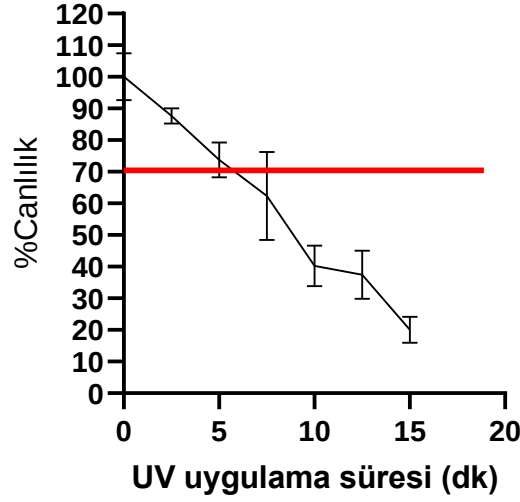
Şekil 4.37. *Nostoc* sp. CALU-997'den elde edilen içinde shinorine içeren ekstrenin farklı konsantrasyonlarda HaCaT hücre hatları üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saatteki etkisi. PK; pozitif kontrol, madde uygulanmamış besin ortamı içerisindeki HaCaT hücreleri, NK; negatif kontrol, DMSO uygulanmış HaCaT hücreleri



Şekil 4.38. *N. linckia* CALU-129'dan elde edilen içinde shinorine içeren ekstrenin farklı konsantrasyonlarda HaCaT hücre hatları üzerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saatteki etkisi. PK; pozitif kontrol, madde uygulanmamış besin ortamı içerisindeki HaCaT hücreleri, NK; negatif control DMSO uygulanmış HaCaT hücreleri

4.10 UV Koruma Özelliğinin Test Edilmesi

HaCaT hücre hattına farklı sürelerde UV uygulaması sonucunda %70'in altında canlılığın olduğu ilk süre olan 7.5 dakika madde uygulaması sonrasında UV uygulama süresi olarak seçilmiştir (Şekil 4.37). HaCaT hücrelerinin 7,5 dakika boyunca UV radyasyonuna maruz kalması, hücre canlılık yüzdelerinin %70'in altına düşmesiyle sonuçlanarak, UV radyasyonunun keratinositler üzerindeki zararlı etkilerini göstermektedir. Bu bulgu, UV radyasyonunun reaktif oksijen türleri (ROS) ve ardından apoptozis oluşumu yoluyla önemli hücresel hasara neden olma kapasitesini vurgulayan literatürle uyumludur. UV radyasyonunun, keratinositlerde DNA hasarına, inflamasyona ve hücre ölümüne yol açabilen oksidatif stresi tetiklediği bilinmektedir (Kuehne et al., 2015; Wu et al., 2021). Seçilen UV maruziyet süreleri, uzun süreli maruziyetin hücresel hasarı artırabileceğini göstermiştir. Yapılan araştırmalar UV radyasyonunun proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin yukarı regülasyonuna yol açabileceğini ve bunun da keratinosit apoptozuna neden olabileceğini göstermektedir (Reichert et al., 2015; Zhang et al., 2016). UV maruziyeti nedeniyle HaCaT hücrelerinde hücre canlılığının azalmasının etkileri, ani hücresel hasarın ötesine uzanır. UV kaynaklı hücre ölümü sonucu cilt bariyerinin bütünlüğünün bozulması, enfeksiyonlara ve diğer cilt rahatsızlıklarına karşı duyarlılığın artmasına yol açabilmektedir (Biniek et al., 2012). Ek olarak, stratum korneumun kohezyonunun ve mekanik bütünlüğünün azalması gibi cildin biyomekanik özelliklerinin değişmesi, UV radyasyonunun etkilerini daha da kötüleştirerek eritem ve fotoyaşlanma gibi durumlara yol açabilmektedir (Biniek et al., 2012). Sonuç olarak, 7:30 dakika UV maruziyetinden sonra gözlemlenen HaCaT hücre canlılığındaki azalma, UV radyasyonunun keratinositler üzerindeki zararlı etkilerinin açık bir göstergesidir. Bu nedenle UV maruziyeti süresi olarak 7:30 dakika seçilmiştir.



Şekil 4.39. HaCaT hücre hattının UV maruziyeti sonucu % canlılık- UV uygulama süresi grafiği.

HaCaT hücre hattı üzerine farklı konsantrasyonlarda madde uygulanması sonucunda % canlılık Tablo 4.9’da verildiği gibi değişmiştir. *Nostoc sp. CALU-997*’den elde edilen ekstrenin UV’ye karşı en fazla koruma gösteren konsantrasyonu 500 µg/ml olarak belirlenmiştir. Madde uygulanmayan kontrole göre hücrelerin canlılığını %20 daha fazla koruduğu gözlenmiştir. *Nostoc linckia CALU-129*’dan elde edilen ekstrenin ise en fazla koruma gösterdiği konsantrasyon 62.5 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda madde uygulaması yapılan hücrelerin hiç madde uygulanmaya hücrelere göre UV’ye %30 daha fazla koruma gösterdiği gözlenmiştir.

Tablo 4.9. HaCaT hücre hattına uygulanan ekstrelerin farklı konsantrasyonlarının UV maruziyeti sonucu canlılıkları (%).

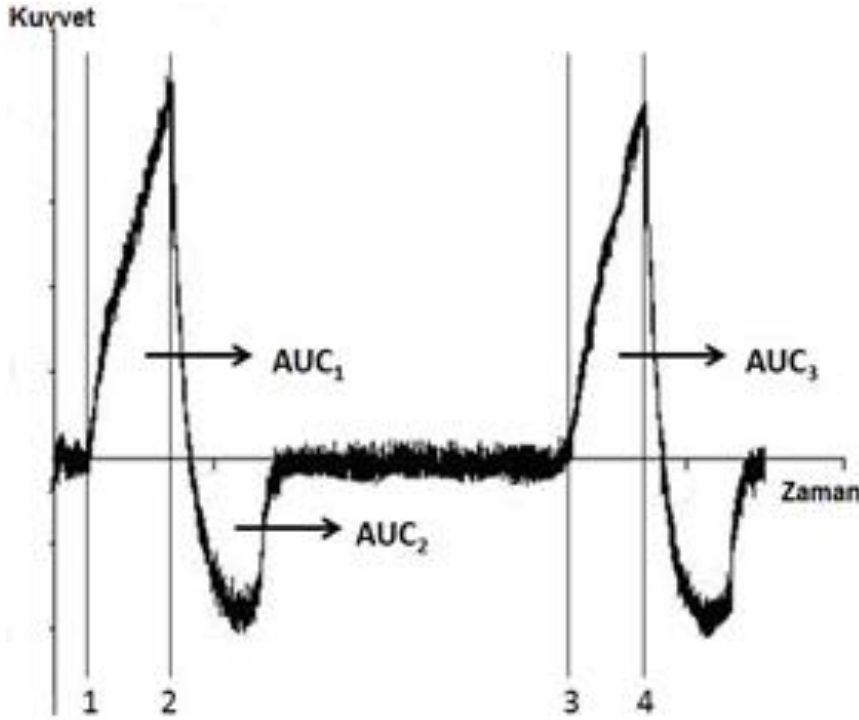
Konsantrasyon (µg/ml)	Canlılık (%)	
	<i>Nostoc sp. CALU 997</i> ekstresi	<i>N. linckia CALU-129</i> ekstresi
1000	50,92±4.2	10,70±2.5
500	59,89±4.4	8,68±0.6
250	48,81±0.42	27,31±4.2
125	43,62±0.04	42,05±5.1
62,5	42,37±0.24	57,45±0.7
0	50,35±0.1	44,48±2.7

Bu çalışmanın bulguları, HaCaT hücrelerine UV maruziyetinden önce shinorine içeren ekstrenin uygulanmasının hücre canlılığını önemli ölçüde artırdığını, *Nostoc sp.* CALU-997 ekstresinin negatif kontrole kıyasla %20'lik bir koruma artışı gösterdiğini, *N. linckia* CALU-129 ekstresinin ise %29'luk daha büyük bir koruyucu gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, UV radyasyonu absorpladığı ve cilt hücreleri üzerindeki zararlı etkilerini azalttığı bilinen shinorine gibi mikosporin benzeri amino asitlerin (MAA'lar) fotokoruyucu özelliklerini vurgulayan literatürle tutarlıdır. İnsan keratinositleri için bir model görevi gören HaCaT hücre hattında, shinorine ile muameleden sonra hücre canlılığında gözlenen artış, bu bileşiğin UV kaynaklı hasara karşı cilt hücrelerinin dayanıklılığını etkili bir şekilde artırabileceğini düşündürmektedir. Shinorine içeren iki farklı ekstre arasında gözlemlenen farklı koruyucu etkiler, ekstre içerisinde bulunan shinorine konsantrasyonu ve ekstre içerisinde etkinliğini artırabilecek diğer bileşiklerin varlığındaki değişiklikler nedeniyle gözlenmiş olabileceği düşünülmektedir. UV maruziyetiyle ilişkili cilt kanseri ve fotoyaşlanmadaki artış göz önüne alındığında, shinorine gibi doğal UV filtrelerinin topikal formülasyonlara dahil edilmesi, cilt korumasını artırmak ve genel cilt sağlığını desteklemek için umut verici bir potansiyele sahiptir (Biniek ve ark., 2012). Shinorine bileşiğinin hücrelerdeki biyoyararlanımının ve emiliminin de koruyucu kapasitesini etkileyebileceğini dikkate almak önemlidir. Shinorine bileşiğinin hedef hücrelere iletilmesini optimize eden formülasyonlar, potansiyel olarak UV radyasyonuna karşı daha belirgin koruyucu etki sağlayabileceği öngörülmektedir (Suh et al., 2017). Elde edilen sonuçlar shinorine'nin doğal bir fotokoruyucu ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

4.11 Kozmetik Stabilité Sonuçları

Boş krem formülasyonunun başlangıç pH değeri 6.61 ± 0.01 , shinorine içeren krem formülasyonunun başlangıç pH değeri 6.69 ± 0.01 olarak ölçüldü. Akış çalışmalarında formülasyonunun psödoplastik akış gösterdiği yani artan kayma hızına bağlı olarak viskozitesinin düştüğü saptandı.

Şekil 4.37’de çalışma sonunda elde edilen TPA grafiğinin genel görünümü verilmiştir. Elde edilen grafikten formülasyonunun sertlik, sıkışabilirlik, adeziflik, koheziflik ve elastikiyet değerleri saptandı. TPA grafiğinde ilk pikin yüksekliği formülasyonların sertlik değerini, ilk eğri altı alan formülasyonların sıkışabilirlik değerini, ikinci eğri altı alan ise formülasyonuna adeziflik değerini vermektedir.



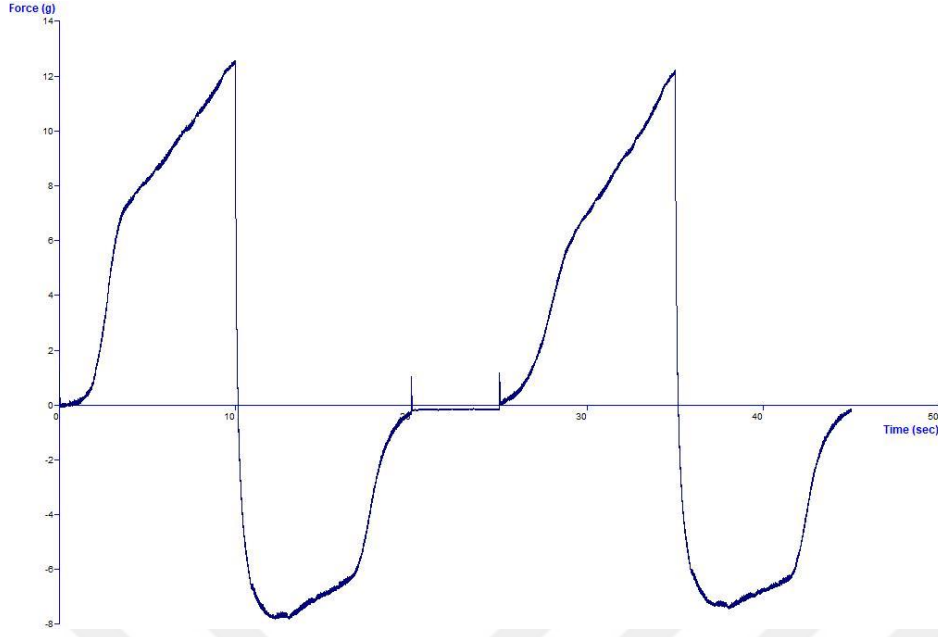
Şekil 4.40. TPA grafiğinin genel görünümü.

Sertlik, formülasyonun deformasyonunu sağlamak için gerekli olan kuvveti tanımlamaktadır. Bu parametre; formülasyonun istenen bölgeye uygulanabilirliğini ifade eder. Formülasyonların rahat uygulanabilmesi için sertlik değerinin düşük olması istenir. Sıkıştırılabilirlik, belli bir mesafe boyunca ürünün sıkıştırılabilmesi için gerekli işi tanımlar. Bu parametre, formülasyonun taşıyıcı kabından alınabilme ve uygulanacak bölgede yayılabilme kolaylığını ifade eder. Formülasyonu, taşıyıcı kabından kolayca alabilmek için ve formülasyonun mesane mukozası gibi uygulama bölgesinde kolayca yayılabilir özellikte olması için sıkıştırılabilirlik değerinin düşük olması gerekmektedir. Adeziflik, formülasyonun yüzeyi ile probun

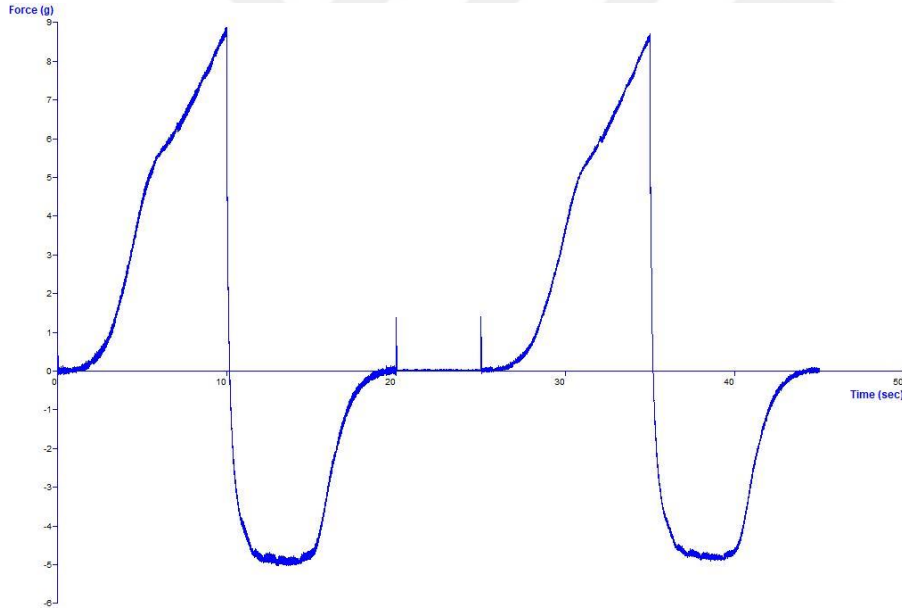
yüzeyi arasındaki çekme kuvvetlerini yenmek için gerekli işi tanımlamaktadır. Formülasyonların mekanik özelliklerinin analizi sırasında adeziflik, probun formülasyondan kurtulması için gerekli kuvveti ifade etmektedir. Dokuya tutunabilme özelliğini gösteren adheziflik değerinin yüksek olması gerekmektedir. Koheziflik, formülasyonun uygulandıktan sonra yapısal olarak tekrar eski halini almasının ölçüsünü tanımlar. Formülasyonların koheziflik değeri Eşitlik 5 yardımıyla hesaplandı. Bu parametre, ürünün uygulama bölgesinde önemlidir ve buradaki performansını artırmaktadır. Yüksek koheziflik, formülasyonun uygulanmasını sonrasında yapısının tamamen geri kazanılmasını sağlar. Koheziflik değeri yüksek bir formülasyon uygulandıktan sonra formunu uzun süre korur. Elastikiyet değeri, formülasyonun deforme olduktan sonra yapısal olarak eski halini almasının zamana bağlı olarak yönüdür. Formülasyonların elastikiyet değeri Eşitlik 6 yardımıyla hesaplandı. Formülasyonların mekanik özelliklerinin analizi sırasında elde edilen elastikiyetin sayısal değerinin artması, formülasyonun elastikiyetinin azaldığını gösterir. Formülasyonun bilgisayar-kontrollü penetrometre ile gerçekleştirilen mekanik özellik analizlerine ait bulgular Tablo 4.10 ve Şekil 4.38 ve 4.39’da verilmiştir.

Tablo 4.10. Formülasyonlarının mekanik özelliklerine ait bulgular.

	Sertlik (g) $\pm$ SD	Sıkışabilirlik (g.s) $\pm$ SD	Adeziflik (g.s) $\pm$ SD	Koheziflik $\pm$ SD	Elastikiyet $\pm$ SD
Boş krem	0,12 $\pm$ 0	67,909 $\pm$ 4,954	52,018 $\pm$ 0,957	0,908 $\pm$ 0,047	1,197 $\pm$ 0,023
Shinorine içeren krem	0,09 $\pm$ 0	40,638 $\pm$ 1,685	29,452 $\pm$ 1,535	0,934 $\pm$ 0,003	1,062 $\pm$ 0,030



Şekil 4.41. Boş krem formülasyonunun TPA grafiği



Şekil 4.42. Shinorine içeren krem formülasyonunun TPA grafiği.

4.11.1 Stabilité Çalışmaları

Hazırlanan boş krem ve shinorine içeren krem formülasyonlarının stabilite çalışmaları stabilite kabinlerinde (Nüve TK 252) $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%60\pm\%5$ BN ve $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%75\pm\%5$ BN koşullarında 2 ay süre ile gerçekleştirildi. 1. ay ve 2. aylarda krem formülasyonlarının organoleptik özellikleri, pH, akış ve mekanik özellikleri ölçüldü. Formülasyonların 1.ay ve 2. aylarda yapılan organoleptik incelemesinde görünüş, kıvam, renk ve koku açısından herhangi bir değişiklik olmadığı saptandı. Boş krem ve shinorine içeren krem formülasyonlarının pH değerlerine ait elde edilen veriler Tablo 4.11’de verilmiştir.

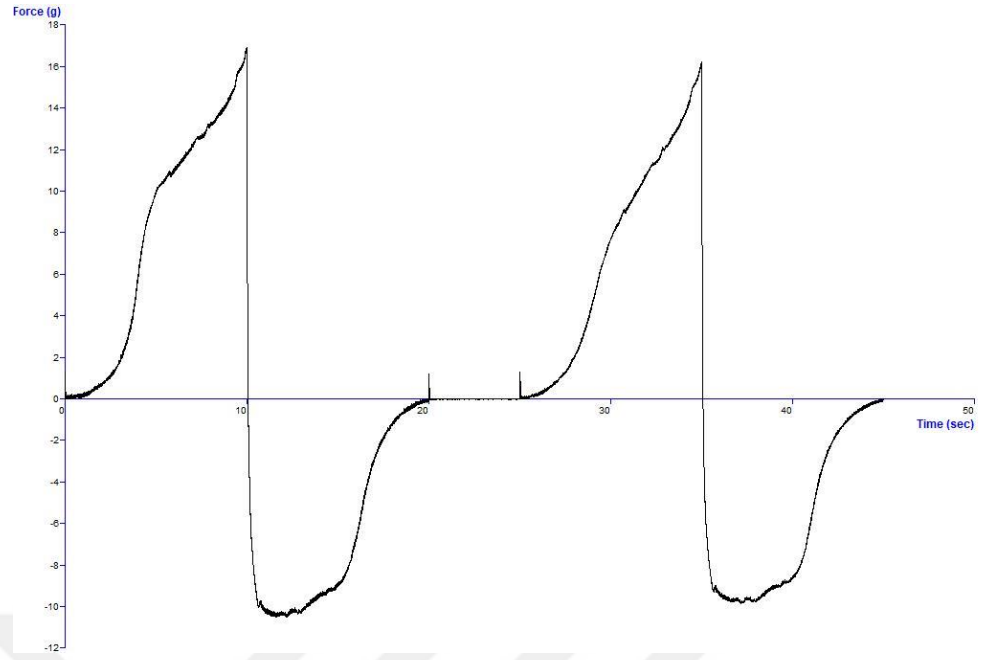
Tablo 4.11. Shinorine içeren krem formülasyonunun 2 aylık stabilite çalışmasındaki pH değerleri.

	1. ay	2. ay
Boş krem $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%60\pm\%5$ BN	6,64 $\pm$ 0,01	6,67 $\pm$ 0,02
Boş krem $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%75\pm\%5$ BN	6,65 $\pm$ 0,1	6,68 $\pm$ 0,03
Shinorine içeren krem $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%60\pm\%5$ BN	6,70 $\pm$ 0,03	6,75 $\pm$ 0,02
Shinorine içeren krem $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%75\pm\%5$ BN	6,75 $\pm$ 0,01	6,81 $\pm$ 0,02

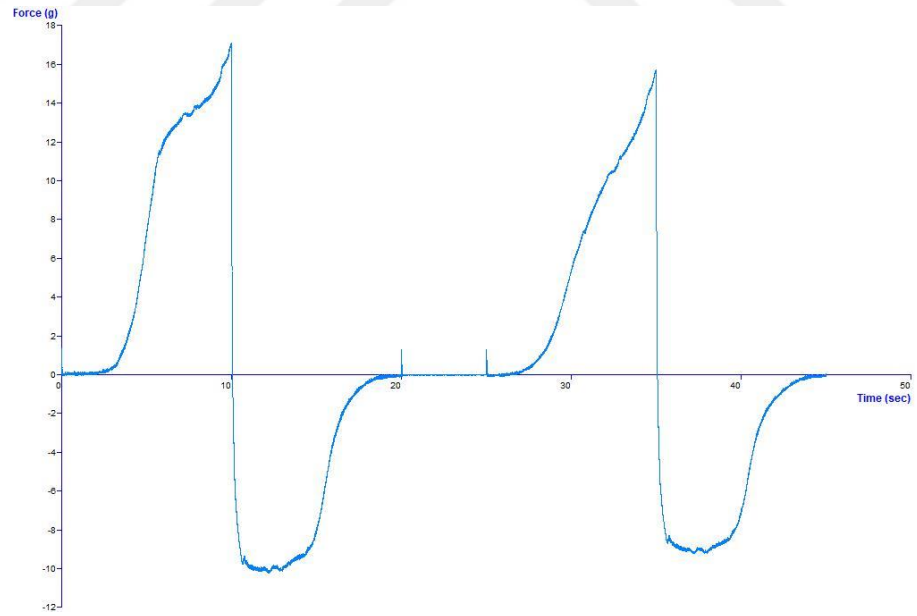
Akış çalışmalarında formülasyonunun psödoplastik akış özelliğinin stabilite çalışmaları boyunca değişmediği gözlemlendi. Stabilite çalışmaları kapsamında $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ ’de $\%60$ relatif nemdeki stabilite kabininde ve $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ ’de $\%75$ relatif nemdeki stabilite kabininde saklanan formülasyonların bilgisayar-kontrollü penetrometre ile gerçekleştirilen mekanik özellik analizlerine ait bulgular Tablo 4.12 ve Şekil 4.40- 4.47’de verilmiştir.

Tablo 4.12. Formülasyonlarının stabilite çalışması sonucu saptanan mekanik özelliklerine ait bulgular.

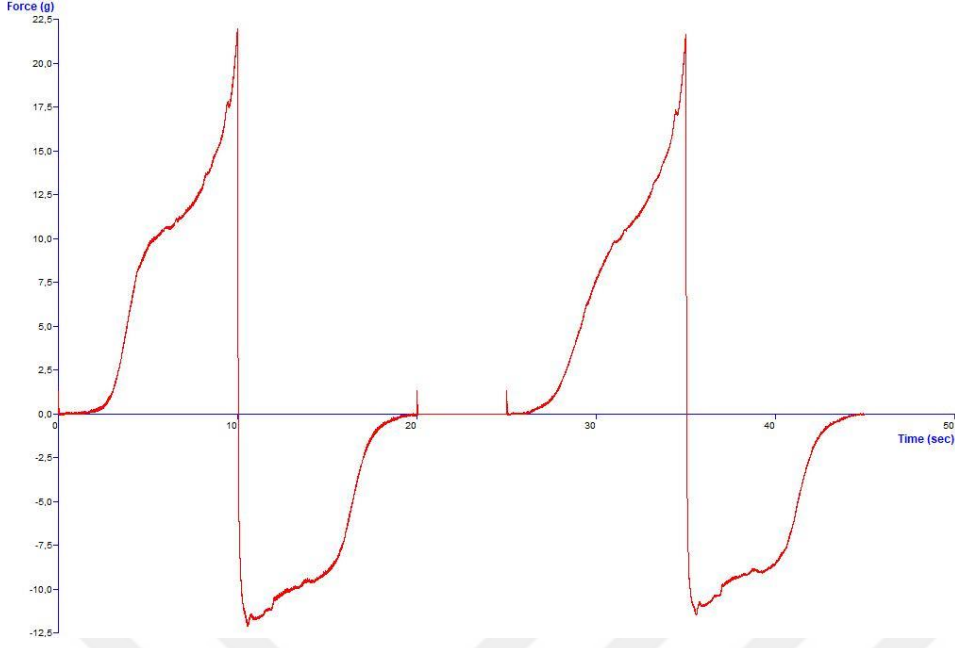
	Sertlik (g) $\pm$ SD	Sıkışabilirlik (N.mm) $\pm$ SD	Adeziflik (g.mm) $\pm$ SD	Koheziflik $\pm$ SD	Elastikiyet $\pm$ SD
Boş krem 25°C$\pm$2°C / %60$\pm$%5 BN (1 ay)	0,17 $\pm$ 0,01	78,222 $\pm$ 7,473	62,494 $\pm$ 7,497	0,884 $\pm$ 0,040	1,090 $\pm$ 0,097
Boş krem 25°C$\pm$2°C / %60$\pm$%5 BN (2 ay)	0,17 $\pm$ 0	75,690 $\pm$ 2,310	57,010 $\pm$ 0,727	0,774 $\pm$ 0,039	1,086 $\pm$ 0,056
Boş krem 40°C$\pm$2°C / %75$\pm$%5 BN (1 ay)	0,21 $\pm$ 0,01	75,108 $\pm$ 11,687	66,460 $\pm$ 2,240	0,966 $\pm$ 0,052	1,169 $\pm$ 0,024
Boş krem 40°C$\pm$2°C / %75$\pm$%5 BN (2 ay)	0,16 $\pm$ 0,01	56,513 $\pm$ 0,095	47,826 $\pm$ 4,292	0,929 $\pm$ 0,009	1,267 $\pm$ 0
Shinorine içeren krem 25°C$\pm$2°C / %60$\pm$%5 BN (1 ay)	0,15 $\pm$ 0,01	59,638 $\pm$ 4,493	49,320 $\pm$ 7,168	0,926 $\pm$ 0,005	1,103 $\pm$ 0,001
Shinorine içeren krem 25°C$\pm$2°C / %60$\pm$%5 BN (2 ay)	0,16 $\pm$ 0	82,128 $\pm$ 5,930	63,268 $\pm$ 6,596	0,922 $\pm$ 0,026	1,185 $\pm$ 0,132
Shinorine içeren krem 40°C$\pm$2°C / %75$\pm$%5 BN (1 ay)	0,17 $\pm$ 0,02	88,251 $\pm$ 15,552	66,004 $\pm$ 15,193	0,881 $\pm$ 0,013	1,109 $\pm$ 0,109
Shinorine içeren krem 40°C$\pm$2°C / %75$\pm$%5 BN (2 ay)	0,13 $\pm$ 0	53,760 $\pm$ 6,180	43,427 $\pm$ 5,052	0,913 $\pm$ 0,035	1,085 $\pm$ 0,081



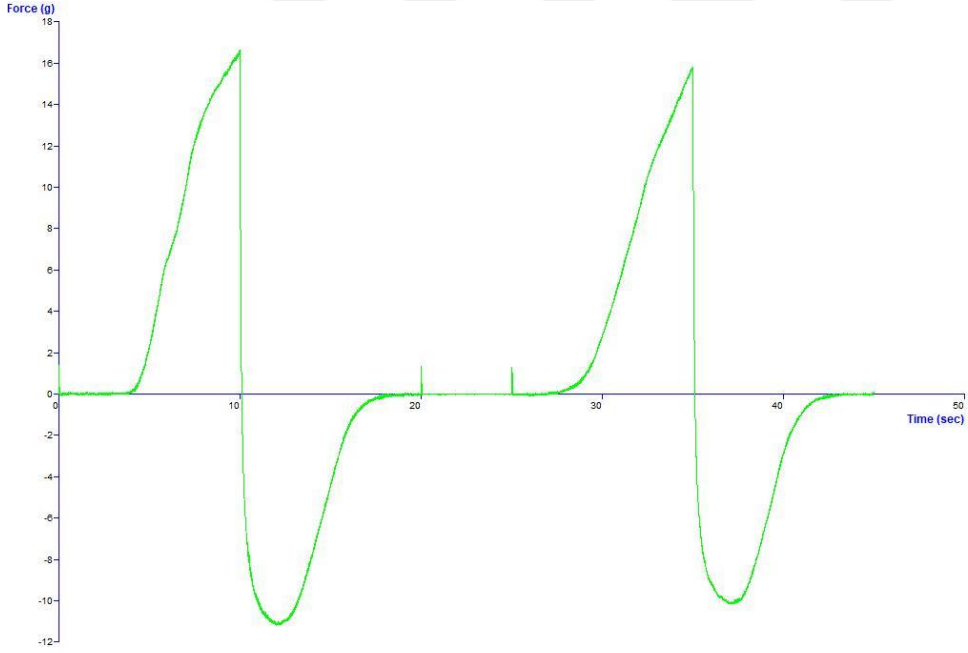
Şekil 4.43. Boş krem $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%60 \pm \%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (1 ay)



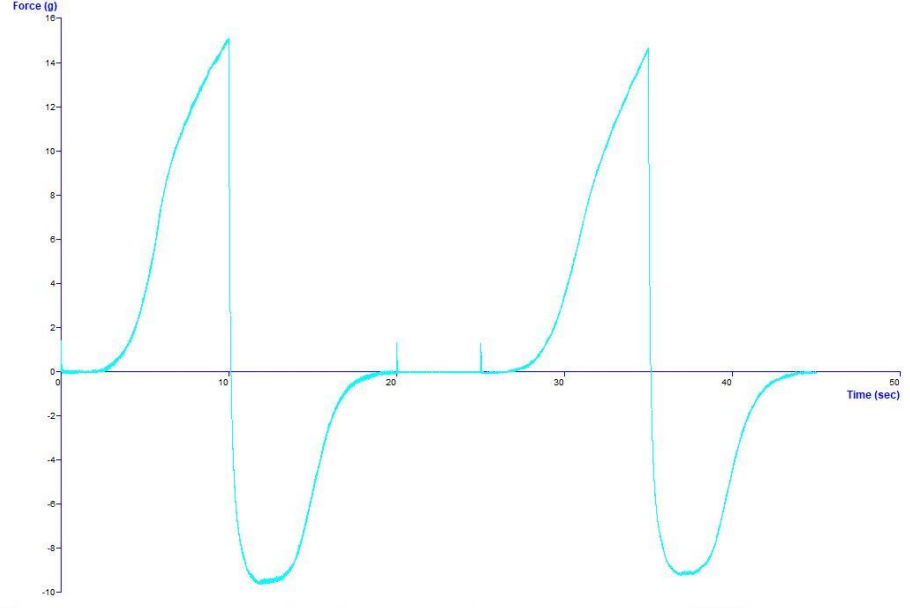
Şekil 4.44. Boş krem $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%60 \pm \%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (2 ay)



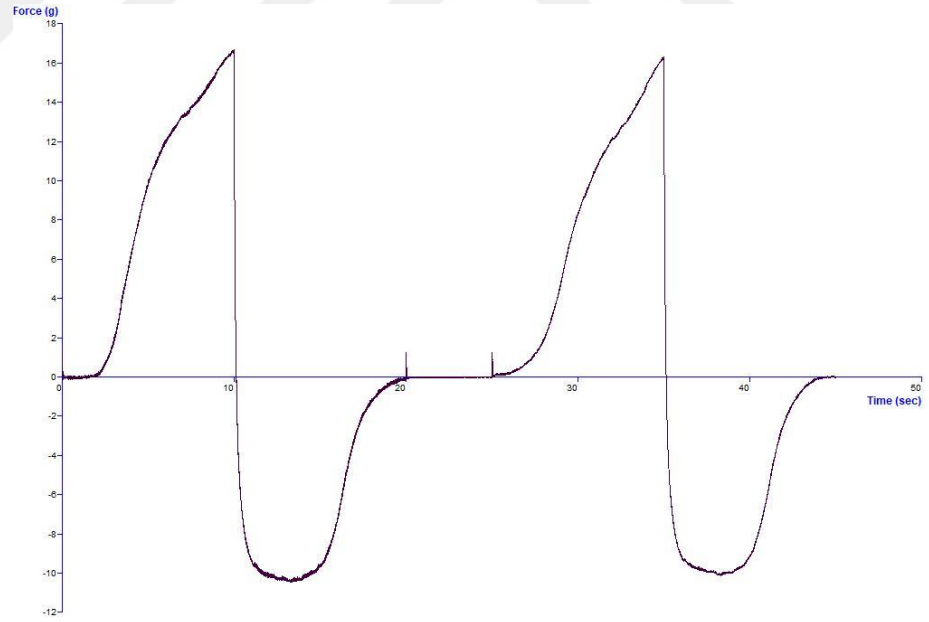
Şekil 4.45. Boş krem $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%75 \pm \%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (1 ay).



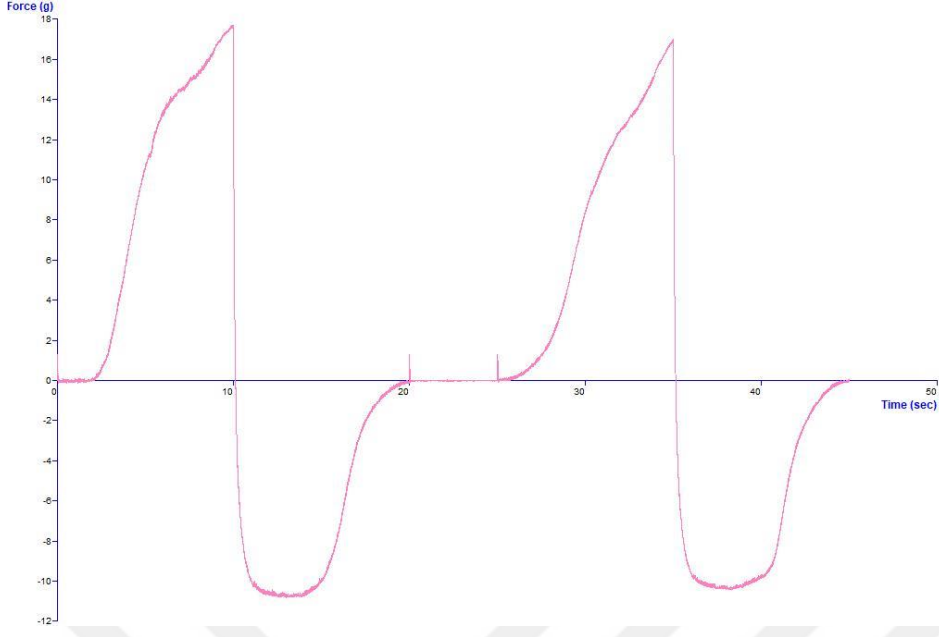
Şekil 4.46. Boş krem $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%75 \pm \%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (2 ay).



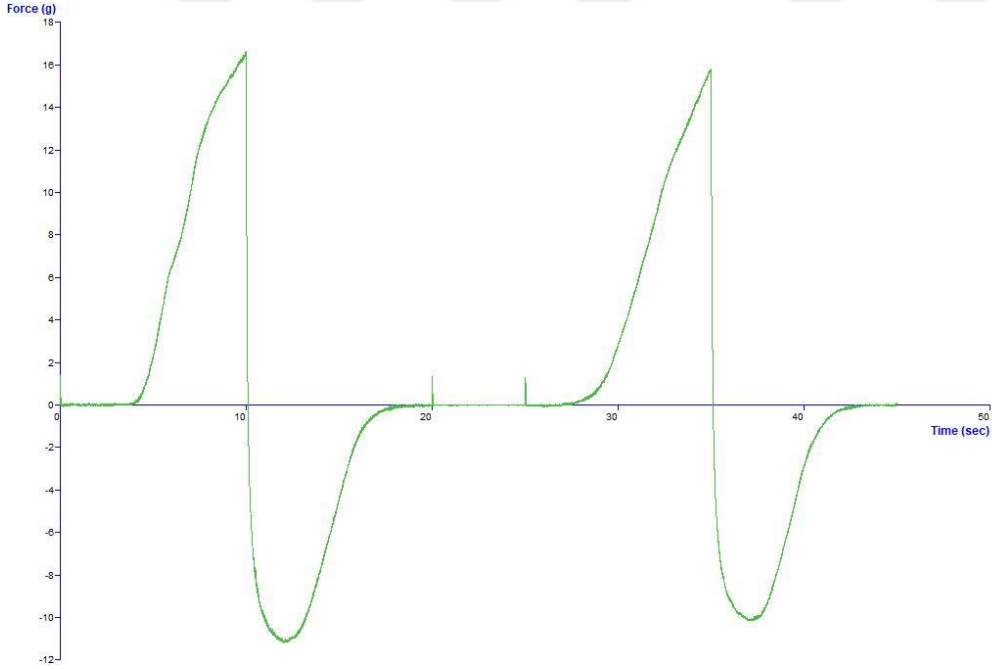
Şekil 4.47. Shinorine içeren krem $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%60 \pm \%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (1 ay).



Şekil 4.48. Shinorine içeren krem $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%60 \pm \%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (2 ay).



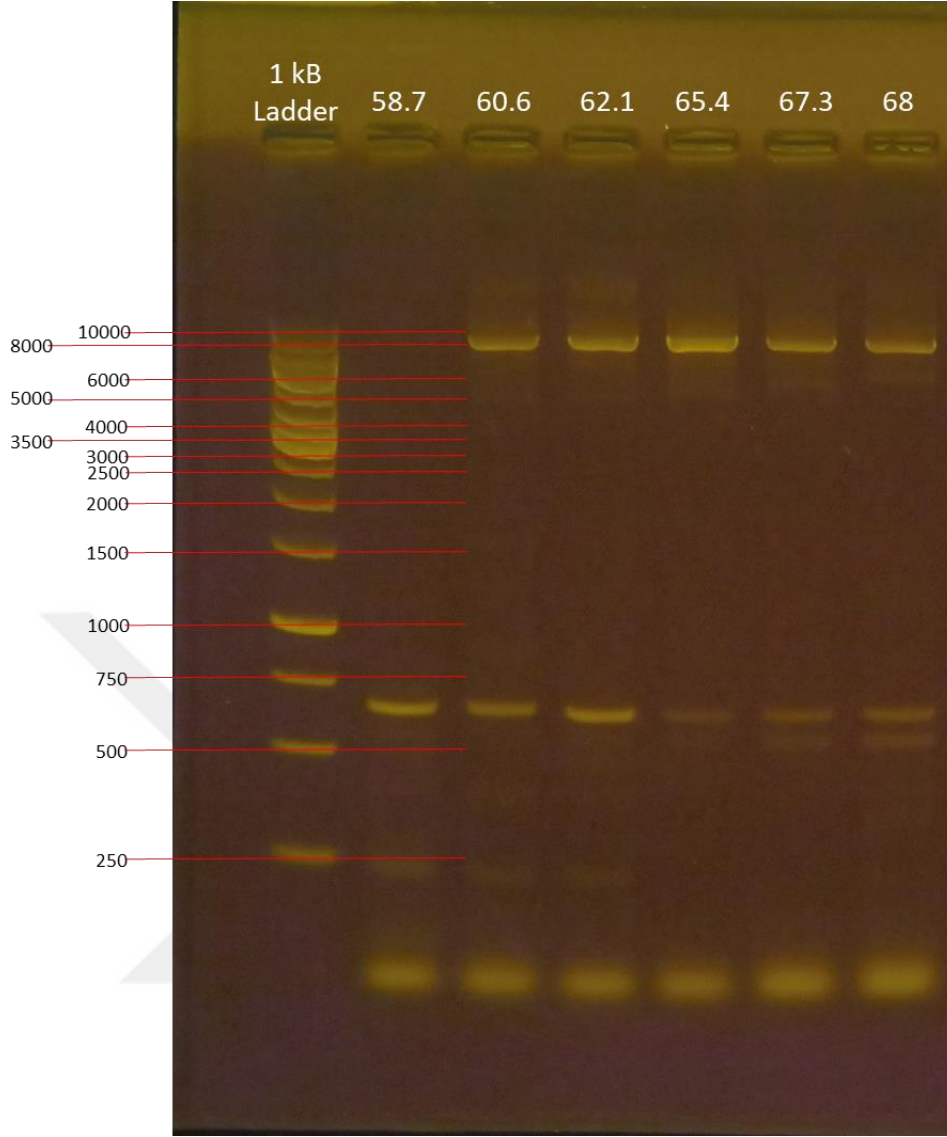
Şekil 4.49. Shinorine içeren krem $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%75 \pm \%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (1 ay).



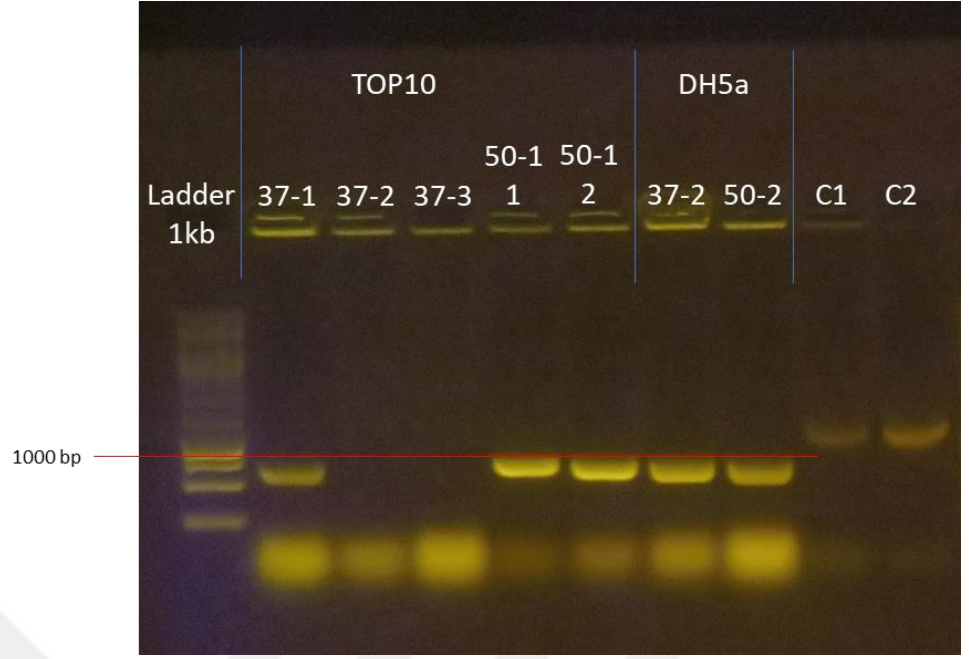
Şekil 4.50. Shinorine içeren krem $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $\%75 \pm \%5$ bağıl nemdeki stabilite kabininde elde edilen TPA grafiği (2 ay).

4.12 *E. Coli*'de Heterolog Ekspresyon

Mikroalgal DNA izolasyonu sonucunda 60,4 ng/ μ l konsantrasyonda DNA elde edilmiştir. Gradyan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.48'de gösterilmiştir. İstenmeyen genlerin amplifikasyonun en az olduğu 65 °C optimum kaynaşma sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Seçilen 65 °C sıcaklıkta gen bölgesinin amplifikasyonu sağlanmıştır. Amplifiye edilen gen bölgesi jelden ekstrakte edildikten sonra 114.9 ng/ μ l konsantrasyonda elde edilmiştir. Plazmid izolasyonu sonucu 82.2 ng/ μ l konsantrasyon elde edilmiştir. DpnI restriksiyon enzimi ile metil grubu içeren DNA'lar uzaklaştırıldıktan sonra ise elde edilen plazmid konsantrasyonu 27,6 ng/ μ l olarak ölçülmüştür. SLIC metodu ile plazmide istenilen MAA üreten gen bölgesi aktarılmış ve taşıyıcı konağa transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyonun başarılı olup olmadığı koloni PCR yapılarak incelenmiştir. Koloni PCR sonucundaki jel görüntüsü Şekil 4.49'da verilmiştir. LB sıvı besin ortamında büyüyen hücrelerden gliserol stokları hazırlanmıştır. Bu gliserol stokları NucleoSpin Plasmid kit kullanılarak ekstrakte edilmiş ve dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonucunda 50 °C'de gerçekleştirilen SLIC reaksiyonundan *E. coli* DH5 α klonu ekspresyon için seçilmiştir.

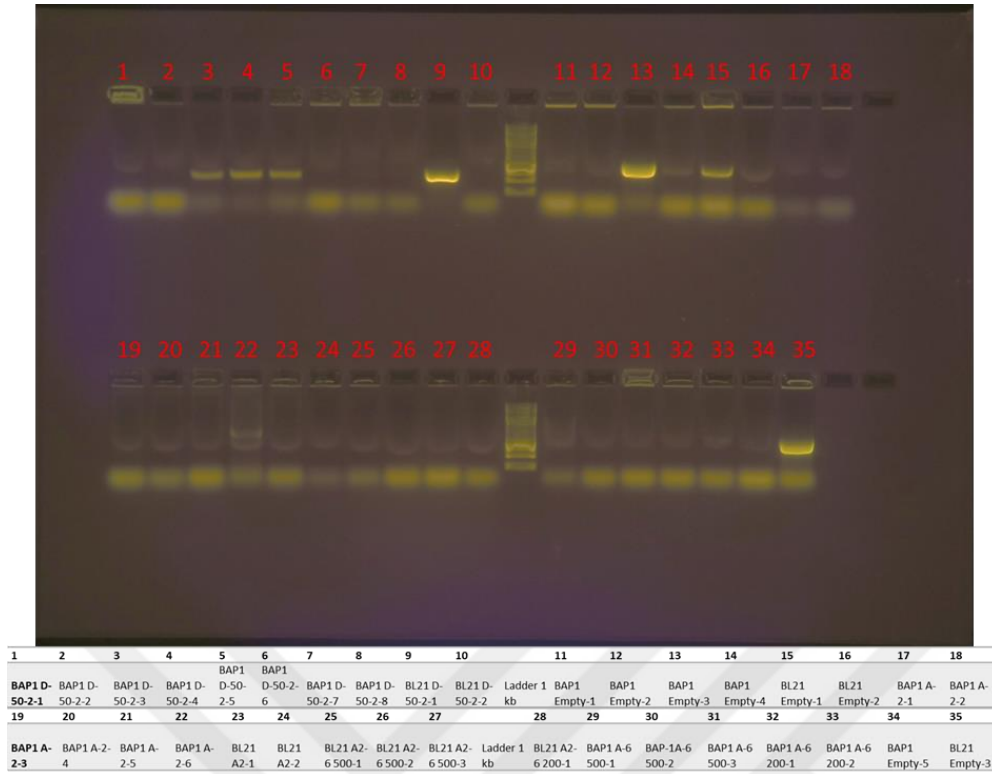


Şekil 4.51. Gradyan PCR sonrası agaroz jelde yürütülen örneklerin görüntüsü.



Şekil 4.52. Koloni PCR sonrası jel görüntüsü.

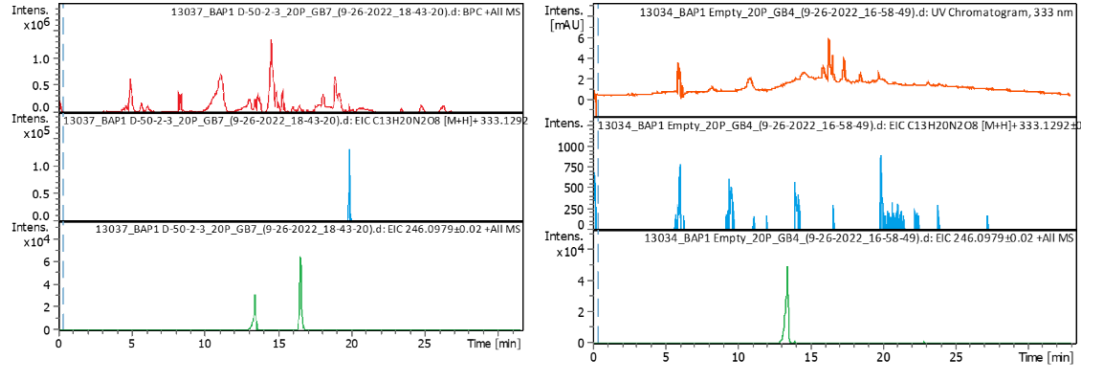
Seçilen *E. coli* DH5 α klonundan plasmid ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve ekspresyon konağına transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon konağı olarak BL21 ve BAP1 kompetent hücreleri kullanılmıştır. Transformasyon sonrasında gerçekleştirilen koloni PCR sonrası jel görüntüsü Şekil 4.50’de verilmiştir.



Şekil 4.53 Ekspresyon konağına transformasyon sonrası koloni PCR jel görüntüsü.

Koloni PCR sonrasında ekspresyon için Şekil 4.50'deki kolonilerden 3, 4, 5, 9, 13, 15, 20, 21, 24 ve 28. klonlar seçilerek M9 ortamına ekilmiştir ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. OD₆₀₀=0.3-0.4'ye ulaştığında promotör tetrasiklin kullanılarak indüklenmiştir. Daha sonrasında her bir koloni 20 °C'de ve 37 °C'de sırasıyla 4 gün ve 1 gün olarak kültive edilmiştir. Hasat ve ekstraksiyon sonrasında HPLC/MS profilleri Şekil 4.51'de verilmiştir. BAP1 ekspresyon konağında başarılı bir şekilde shinorine ve mycosporine-2-glycine MAA'larının üretilbildiği gözlenmiştir.

E. coli'de heterolog ekspresyon gerçekleştirebilmek için SLIC metodunda 50 °C sıcaklığın klonlama için inkübasyon sıcaklığı olarak seçilmesi ve BAP1 ekspresyon konak hücrelerinin kullanılması ile ekspresyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği gözlenmiştir. Ayrıca ekspresyon ortamına ekilen hücrelerin MAA üreten gen bölgelerinin 20 °C sıcaklıkta indüklenbildiği belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre sonuç olarak 50 °C sıcaklıkta SLIC reaksiyonu gerçekleştirilmeli, BAP1 hücrelerinin kullanılması ve M9 besin ortamında 20 °C'de 4 gün inkübe edilmesi ile optimum koşulların sağlandığı belirlenmiştir.



Şekil 4.54. Ekspresyon sonucundaki ekstrelerin HPLC/MS kromatogramı



5. TARTIŞMA

Kozmetik sektörü açısından oldukça popülerite kazanan doğal güneş kremlerinin eldesi için mikosporin benzeri amino asitlerin çok önemli bir noktada olduğu son yıllarda açıkça ortaya konmuştur. MAA'lar için mikroalglerin potansiyel bir üretici olduğu tez kapsamında farklı açılardan test edilmiş ve kanıtlanmıştır. MAA'ların hem mikroalgler tarafından doğal yollarla üretimlerinin gerçekleştirilmesi hem de mikroalgal MAA gen bölgelerinin bakteriye gen aktarım teknikleriyle aktarılması sonucunda bakteriler tarafından üretimlerinin gerçekleştirilmesi başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. Hücre kültürü çalışmaları sonucunda MAA'ların toksik bir etki yaratmadığı gözlenmiş ve buna bağlı olarak da piyasada bulunan güneş kremleri içeriklerine göre cilt üzerinde daha az zararlı oldukları kanıtlanmıştır. Piyasadaki sentetik güneş kremleri ile yarışabilmek için üretim maliyetlerinin düşürülmesi gerekmektedir. Bu noktada maliyeti düşürebilmek adına tez kapsamında herhangi bir ışık kaynağı kullanmadan ve sıcaklık kontrolü yapmadan dış alanda üretimler gerçekleştirilmiştir. İzmir, Türkiye'de gerçekleştirilen üretim sonuçları analiz edildiğinde hem yıllık sıcaklık ortalamalarının siyanobakterilerin büyüyebileceği koşullarda olması hem de güneşlenme süresinin yüksek olması nedeniyle UV tarafından da indüklenen MAA üretimlerinin dış alanda başarılı bir şekilde yürütülebileceği ortaya konmuştur.

Shinorine gibi mikosporin-benzeri amino asitlerin (MAA'lar) sürdürülebilir üretimi, özellikle güneş koruyucu formülasyonlarda kullanım potansiyeli açısından büyük ilgi görmektedir. Genetik mühendisliği ile siyanobakterilerin, özellikle *Synechocystis* türlerinin, shinorine üretimi için optimize edilmesi, bu değerli bileşiğin çevre dostu ve verimli bir şekilde üretilmesini sağlayacağı düşünülmektedir. Shinorine'in biyosentez yolu, sedoheptüloz-7-fosfatın çeşitli enzimler aracılığıyla dönüşümünü içerir ve bu süreç, genetik modifikasyon ile iyileştirilebilecek verimlilik fırsatları sunmaktadır. Bu sayede, biyoteknolojik yaklaşımlar kullanılarak shinorine'in büyük ölçekli üretimi mümkün hale gelmiştir.

Shinorine'in güçlü fotokoruyucu özellikleri, UV ışınlarını özellikle UVB aralığında absorbe etme yeteneği ile cilt hücrelerini koruma ve UV kaynaklı

hasarları önleme potansiyeli sayesinde kozmetik endüstrisinde ideal bir bileşik olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, shinorine'in termal olarak UV enerjisini ısıya dönüştürmesi ve bu enerjiyi deaktif etmesi, onun fotokoruyucu ajan olarak etkinliğini artıran önemli bir özellik olarak değerlendirilmektedir (Orallo et al., 2018). Yapılan *in vitro* çalışmalar, shinorine içeren formülasyonların UV kaynaklı hücresel hasara karşı koruyucu etkilerini göstererek, hücre canlılığını artırdığını ve apoptozu azalttığını göstermektedir (Singh et al., 2021). Ancak, shinorine ve diğer MAA'ların sitotoksikite profilleri dikkatle değerlendirilmelidir. Çeşitli çalışmalarda shinorine'in düşük sitotoksik etkilere sahip olduğu gösterilmiş olsa da uzun süreli maruziyet ve dokularda birikme potansiyeli dikkate alınarak farklı hücre tipleri üzerindeki etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir. Herhangi bir bileşiğin yüksek konsantrasyonlarda kullanılması toksik etkilere yol açabileceği için, shinorine'in güvenli kullanım seviyelerini belirlemek amacıyla kapsamlı güvenlik değerlendirmeleri ve sitotoksikite testleri yapılması önemlidir (Bhatia et al., 2011; Suh et al., 2014).

Mikroalgler, antioksidan özelliklerine katkıda bulunan karotenoidler, fenolik bileşikler ve tokoferoller dahil olmak üzere zengin biyoaktif bileşik içerikleriyle bilinir (Goiris et al., 2014; Safafar et al., 2015). Mikroalglerin antioksidan aktivitesi önemlidir, çünkü bu bileşikler serbest radikalleri temizleyebilir ve oksidatif stresi azaltabilir, bu da onları sağlık ve kozmetik uygulamaları için değerli hale getirir (Yeh and Chang, 2011). Örneğin, mikroalglerden elde edilen karotenoidlerin, cildin UV radyasyonuna karşı fotokorumasını artırabilen güçlü antioksidan özellikler sergilediği gösterilmiştir (Wongluang et al., 2012). Tez çalışması kapsamında elde edilen kısmi saf ekstraktların mikroalgler tarafından üretilen diğer değerli bileşikler nedeniyle de hücreleri UV'den korumuş olabileceği düşünülmektedir.

Fotobiyoreaktörler konvansiyonel olarak MAA üretim sürecinde kritik bir rol oynamaktadır. Düz panel fotobiyoreaktörler, ışık kullanımında yüksek verimlilik sağlarken, tübüler fotobiyoreaktörler büyük ölçekli üretim ve kontaminasyon riskinin azaltılmasında öne çıkmaktadır (Endres et al., 2016; Ubando et al., 2014). Her iki tasarım da shinorine üretimini optimize etme potansiyeline sahiptir ve ışık yoğunluğu, besin maddesi miktarı gibi parametrelerin optimize edilmesiyle üretim

verimi artırılabilir. Özellikle fotobiyoreaktörlerde ışık maruziyetinin düzenlenmesi ve büyüme koşullarının iyileştirilmesi, shinorine gibi MAA'ların üretimini önemli ölçüde artırabileceği öngörülmektedir. Fotobiyoreaktör tasarımının seçimi, mikroalglerin büyüme oranlarını ve dolayısıyla shinorine verimini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Bu sistemlerde ışık ve besinin kültüre ulaşmasının optimize edilmesinin, shinorine dahil olmak üzere MAA'ların genel verimliliğini artırabileceği düşünülmektedir (Slegers et al., 2011). Düz panel fotobiyoreaktörler, verimli ışık penetrasyonunu ve gaz değişimini kolaylaştıran geniş yüzey alanlarına sahiptir. Yüksek biyokütle konsantrasyonlarını korurken kontaminasyon risklerini en aza indirme kabiliyetleri nedeniyle mikroalg yetiştiriciliği için özellikle avantajlıdır (Yeh and Chang, 2011). Tasarım, büyüme koşullarını optimize etmek için gerekli olan çevresel parametrelerin kolay izlenmesini ve kontrolünü sağlamaktadır. Buna karşılık, uzun, şeffaf tüplerden oluşan boru şeklindeki tübüler fotobiyoreaktörler, etkili karıştırma ve kütle transferi kabiliyetleriyle bilinmektedir. Bu sistemler, kültür ortamı ile ışık arasındaki temas süresini artırarak mikroalglerin fotosentetik verimliliğini artırabilmektedir (Morochó-Jácome et al., 2017; Sawdon and Peng, 2014).

Düz panel ve tübüler fotobiyoreaktörler arasındaki seçim genellikle yetiştirilen mikroalg türlerinin özel gereksinimlerine bağlıdır. Örneğin, tübüler reaktörler, optimum ışık koşullarını korurken daha büyük hacimli kültürleri barındırabildikleri için özellikle yüksek yoğunluklu kültürler için uygundur (Abd El Baky and El Baroty, 2020). Tübüler fotobiyoreaktörlerin, özellikle karıştırmayı artıran ve ölü bölgeleri azaltan özelliklerle tasarlandığında, düz panel sistemlerine kıyasla daha yüksek biyokütle verimliliği elde edebileceği kanıtlanmıştır (Goiris et al., 2012; Yan et al., 2018). Bu reaktörlerdeki hidrodinamikler, mikroalglerin asılı kalmasını ve eşit şekilde dağılmasını sağlamada önemli bir rol oynar; bu, ışık maruziyetini ve besin emilimini en üst düzeye çıkarmak için hayati önem taşır (Michele et al., 2015; Wongluang et al., 2012).

Fotobiyoreaktörlerde mikroalglerin açık havada yetiştirilmesi, özellikle biyoyakıtlar ve yüksek değerli biyoürünler için sürdürülebilir biyokütle üretimi için umut verici bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Dış alanda fotobiyoreaktörler

kullanılarak yapılan üretim, geniş çaplı endüstriyel uygulamalarda maliyetleri düşürme, enerji verimliliğini artırma ve doğal kaynaklardan daha fazla yararlanma gibi önemli avantajlar sunmaktadır. Ancak, bu yaklaşımın uygulanmasında çeşitli teknik ve çevresel zorluklar mevcuttur. Dış alanda üretim, doğal güneş ışığından faydalanarak enerji maliyetlerini düşürmeyi amaçlar. Dış ortamlarda doğal ışığın kullanımı, yapay ışık kaynaklarına olan bağımlılığı azaltarak enerji tüketimini minimize edebilmektedir. Bununla birlikte, dış ortamlarda sıcaklık, ışık yoğunluğu ve diğer çevresel faktörler kontrol edilemediği için üretim sürecinin kararlılığı üzerinde olumsuz etkiler yaratabilmektedir. Dış alanda yapılan üretimde ayrıca çevresel değişkenlik de önemli bir faktördür. Güneş ışığının günlük ve mevsimsel değişiklikleri, sıcaklık dalgalanmaları ve yağış gibi unsurlar mikroalg büyümesini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, optimal üretim koşullarının sağlanması için hava koşullarına bağlı olarak soğutma, ısıtma veya gölgeleme gibi ek sistemlerin entegrasyonu gerekebilmektedir. Bu da dış ortamda yapılan üretim maliyetlerine ek yük getirebilmektedir. Buna karşın, dış alanda fotobiyoreaktörlerle üretim, sürdürülebilirlik açısından önemli fırsatlar sunmaktadır. Özellikle geniş alanlarda güneş enerjisinden faydalanarak yapılan üretim, fosil yakıt tüketimini azaltarak çevreye daha az zarar vermektedir.

6. ÖNERİLER

Fotobiyoreaktörlerde maliyetlerin düşürülmesi ve üretim kapasitesinin artırılması amacıyla, dış alanlarda ölçek büyütme çalışmaları büyük bir potansiyele sahiptir. Özellikle açık alanlarda daha geniş hacimlerde üretim yaparak, fotobiyoreaktörlerin kapalı sistemlere kıyasla maliyet avantajı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu yaklaşım, enerji ve kaynak kullanımını optimize ederek, üretim süreçlerini daha verimli hale getirebilir. Bunun yanı sıra, gen aktarım teknikleri sayesinde bakteriler üzerinde genetik modifikasyon yapılarak, gelişmiş fermentörlerde üretim gerçekleştirmek mümkündür. Bu tür fermentörler, daha kontrollü ve optimize edilmiş koşullarda çalışarak yüksek verim elde etmeyi sağlar, böylece piyasadaki mevcut güneş kremleri ile rekabet edebilecek düzeyde doğal güneş koruyucu bileşikler üretilir.

Genetik modifikasyon ve biyoteknoloji alanındaki ilerlemeler, özellikle transformasyon ve gen ekspresyonu verimliliğini artırmaya yönelik çalışmalarla desteklenmektedir. Transformasyon sürecinde genetik materyalin hücrelere daha etkin şekilde aktarılması, ardından bu genlerin yüksek verimle ifade edilmesi, biyoteknolojik üretimde kritik bir adımdır. Heterolog ekspresyon teknikleri kullanılarak, farklı organizmalardan alınan genlerin başka bir organizmada ifade edilmesi sağlanabilir. Bu yöntem, mikroalglerden elde edilen MAA'ların (mikroalg kaynaklı doğal güneş koruyucu maddeler) yüksek miktarlarda ve düşük maliyetle üretilbilmesine olanak tanımaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında, üretim verimliliğini artırmak, maliyetleri düşürmek ve endüstriyel ölekte rekabet edebilir ürünler elde etmek için gelecek çalışmalarda dış alan ölçek büyütme, gen aktarım teknikleriyle bakterilerden üretimin sağlanması ve fermentör kullanımı, transformasyon ve ekspresyon verimliliğini artırıcı araştırmalara ağırlık verilmesi önerilmektedir. Bu çalışmalar, biyoteknolojik üretim süreçlerini ticari olarak daha uygulanabilir hale getirirken, çevresel ve ekonomik sürdürülebilirlik açısından da önemli katkılar sağlayacaktır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abd El Baky, H.H., El Baroty, G.S.,** 2020. Optimization cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* in a tubular photobioreactor (2000 Liter) for biomass and green bioenergy (biodiesel) production. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 48, 1439–1457. <https://doi.org/10.15835/nbha48311803>
- Abdur Razzak, S., Bahar, K., Islam, K.M.O., Haniffa, A.K., Faruque, M.O., Hossain, S.M.Z., Hossain, M.M.,** 2024. Microalgae cultivation in photobioreactors: sustainable solutions for a greener future. *Green Chem. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.gce.2023.10.004>
- Akay, S., Alpak, I., Yesil-Celiktas, O.,** 2011. Effects of process parameters on supercritical CO₂ extraction of total phenols from strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: An optimization study. *J. Sep. Sci.* 34, 1925–1931. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100361>
- Alassali, A., Cybulska, I., Bruedcki, G.P., Farzanah, R., Thomsen, M.H.,** 2016. Methods for Upstream Extraction and Chemical Characterization of Secondary Metabolites from Algae Biomass. *Adv. Tech. Biol. Med.* 4. <https://doi.org/10.4172/2379-1764.1000163>
- Álvarez-Gómez, F., Korbee, N., Casas-Arrojo, V., Abdala-Díaz, R.T., Figueroa, F.L.,** 2019. UV photoprotection, cytotoxicity and immunology capacity of red algae extracts. *Molecules* 24, 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24020341>
- Ampofo, J., Abbey, Lord,** 2022. Microalgae: Bioactive Composition, Health Benefits, Safety and Prospects as Potential High-Value Ingredients for the Functional Food Industry. *Foods* 11. <https://doi.org/10.3390/foods11121744>
- Assunção, M.F.G., Amaral, R., Martins, C.B., Ferreira, J.D., Ressurreição, S., Santos, S.D., Varejão, J.M.T.B., Santos, L.M.A.,** 2017. Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *J. Appl. Phycol.* 29, 865–877. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0980-7>
- Barros, A.I., Gonçalves, A.L., Simões, M., Pires, J.C.M.,** 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41, 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barta, D.G., Coman, V., Vodnar, D.C.,** 2021. Microalgae as sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids: Biotechnological aspects. *Algal Res.* 58, 102410. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102410>
- Berrow, N.S., Alderton, D., Sainsbury, S., Nettleship, J., Assenberg, R., Rahman, N., Stuart, D.I., Owens, R.J.,** 2007. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res.* 35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm047>
- Bhatia, S., Garg, A., Sharma, K., Kumar, S., Sharma, A., Purohit, A.P.,** 2011. Mycosporine and mycosporine-like amino acids: A paramount tool against ultra violet irradiation. *Pharmacogn. Rev.* 5, 138–146. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.91107>
- Bhatia, S., Sharma, K., Namdeo, A.G., Chaugule, B.B., Kavale, M., Nanda, S.,** 2010. Broad-spectrum sun-protective action of Porphyrin-334 derived from *Porphyrin vietnamensis* 45–49. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.60578>
- Biniek, K., Levi, K., Dauskardt, R.H.,** 2012. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 17111–17116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206851109>
- Casas-Arrojo, V., Decara, J., Arrojo-Agudo, M. de los Á., Pérez-Manríquez, C., Abdala-Díaz, R.T.,** 2021. Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *porphyridium cruentum*. (s.f.gray) *nägeli. Biomolecules* 11. <https://doi.org/10.3390/biom11040488>
- Castro, V., Oliveira, R., Dias, A.C.P.,** 2023. Microalgae and cyanobacteria as sources of bioactive compounds for cosmetic applications: A systematic review. *Algal Res.* 76, 103287. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103287>
- Celente, G. de S., Rizzetti, T.M., Sui, Y., Schneider, R. de C. de S.,** 2022. Potential use of microalga *Dunaliella salina* for bioproducts with industrial relevance. *Biomass and Bioenergy* 167, 106647. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106647>
- Chen, M., Rubin, G.M., Jiang, G., Raad, Z., Ding, Y.,** 2021. Biosynthesis and Heterologous Production of Mycosporine-Like Amino Acid Palythines. *J. Org. Chem.* 86, 11160–11168. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c00368>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- de la Coba, F., Aguilera, J., Korbee, N., de Gálvez, M.V., Herrera-Ceballos, E., Álvarez-Gómez, F., Figueroa, F.L., 2019.** UVA and UVB Photoprotective Capabilities of Topical Formulations Containing Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) through Different Biological Effective Protection Factors (BEPFs). *Mar. Drugs* 17. <https://doi.org/10.3390/md17010055>
- De Luca, M., Pappalardo, I., Limongi, A.R., Viviano, E., Radice, R.P., Todisco, S., Martelli, G., Infantino, V., Vassallo, A., 2021.** Lipids from microalgae for cosmetic applications. *Cosmetics* 8. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8020052>
- De Vree, J.H., Bosma, R., Janssen, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., 2015.** Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnol. Biofuels* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0400-2>
- Deepa, P., Sowndhararajan, K., Kim, S., 2023.** A Review of the Harvesting Techniques of Microalgae. *Water* 15. <https://doi.org/10.3390/w15173074>
- Delsante, C., Pinna, C., Sportelli, F., Dalmonte, T., Stefanelli, C., Vecchiato, C.G., Biagi, G., 2022.** Assessment of the Effects of Edible Microalgae in a Canine Gut Model. *Animals* 12. <https://doi.org/10.3390/ani12162100>
- Derikvand, P., Llewellyn, C.A., Purton, S., 2017.** Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers : a comparison with current synthetic compounds. *Eur. J. Phycol.* 52, 43–56. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1214882>
- Dionisio-Sese, M.L., 2010.** Aquatic microalgae as potential sources of UV-screening compounds. *Philipp. J. Sci.* 139, 5–16.
- Downs, C.A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., Ciner, F.R., Jeger, R., Lichtenfeld, Y., Woodley, C.M., Pennington, P., Cadenas, K., Kushmaro, A., Loya, Y., 2016.** Toxicopathological Effects of the Sunscreen UV Filter, Oxybenzone (Benzophenone-3), on Coral Planulae and Cultured Primary Cells and Its Environmental Contamination in Hawaii and the U.S. Virgin Islands. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 265–288. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0227-7>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dutta, S., Kumar, S.P.J., Banerjee, R.,** 2023. A comprehensive review on astaxanthin sources, structure, biochemistry and applications in the cosmetic industry. *Algal Res.* 74, 103168. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103168>
- Endres, C.H., Roth, A., Brück, T.B.,** 2016. Thermal Reactor Model for Large-Scale Algae Cultivation in Vertical Flat Panel Photobioreactors. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3920–3927. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05414>
- Fuentes-Tristan, S., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H.M.N., Carrillo-Nieves, D.,** 2019. Bioinspired biomolecules: Mycosporine-like amino acids and scytonemin from *Lyngbya* sp. with UV-protection potentialities. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 201, 111684. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111684>
- Gamal, A.A. El,** 2010. Biological importance of marine algae 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001>
- Gaysina, L.A., Saraf, A., Singh, P.,** 2019. Cyanobacteria in Diverse Habitats, *Cyanobacteria*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00001-5>
- Geraldes, V., Pinto, E.,** 2021. Mycosporine-like amino acids (Maas): Biology, chemistry and identification features. *Pharmaceuticals* 14, 1–17. <https://doi.org/10.3390/ph14010063>
- Geu-Flores, F., Nour-Eldin, H.H., Nielsen, M.T., Halkier, B.A.,** 2007. USER fusion: A rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic Acids Res.* 35, 0–5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm106>
- Gharib, R., Tabarzad, M., Hosseinabadi, T.,** 2020. Effect of High Salinity on Mycosporine-Like Amino Acid Production. *Trends Pept. Protein Sci.* 5, 1–6.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., Brabanter, J. De, Cooman, L. de,** 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J Appl Phycol* 24, 1477–1486. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., E Baart, G.J., De Cooman, L.,** 2014. Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *J. Phycol.* 50, 483–492. <https://doi.org/10.1111/jpy.12180>
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H.,** 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239.
- Gupta, A., Bano, A., Rai, S., Pathak, N., Sharma, S.,** 2020. New Insights into Application of Nanoparticles for Plant Growth Promotion: Present and Future Prospects, in: Ghorbanpour, M., Bhargava, P., Varma, A., Choudhary, D. (Eds.), *Biogenic Nano-Particles and Their Use in Agro-Ecosystems*. Springer Singapore, pp. 259–279.
- Gürlek, C., Yarkent, Ç., Köse, A., Oral, İ., Öncel, S., Elibol, M.,** 2020. Evaluation of several microalgal extracts as bioactive metabolites as potential pharmaceutical compounds. *IFMBE Proc.* 73, 267–272. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17971-7_41
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., Goycoolea, F.M.,** 2006. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 185–196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
- Hossain, M.F., Bowange, R.W.T.M.R.T.K., Kumara, K.L.W., Magana-Arachchi, D.N., Ratnayake, R.R.,** 2021. First record of cyanobacteria species: *Cephalothrix komarekiana*, from tropical asia. *Environ. Eng. Res.* 26, 1–11. <https://doi.org/10.4491/eer.2020.040>
- Huang, H., Lang, Y., Zhou, M.,** 2024. A comprehensive review on medical applications of microalgae. *Algal Res.* 80, 103504. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103504>
- Imbimbo, P., Giustino, E., Ferrara, A., Alvarez-Rivera, G., Annaz, H., Ibanez, E., Di Meo, M.C., Zarrelli, A., Monti, D.M.,** 2024. Unveiling the potential of *Pseudococcomyxa simplex*: a stepwise extraction for cosmetic applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 108. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13229-9>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jeong, J.Y., Yim, H.S., Ryu, J.Y., Lee, H.S., Lee, J.H., Seen, D.S., Kang, S.G.,** 2012. One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5440–5443. <https://doi.org/10.1128/AEM.00844-12>
- Jin, C., Kim, S., Moon, S., Jin, H., Hahn, J.S.,** 2021. Efficient production of shinorine, a natural sunscreen material, from glucose and xylose by deleting HXK2 encoding hexokinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 21, 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab053>
- Kageyama, H., Waditee-Sirisattha, R.,** 2018. *Mycosporine-Like Amino Acids as Multifunctional Secondary Metabolites in Cyanobacteria: From Biochemical to Application Aspects*, 1st ed, *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00005-0>
- Katoch, M., Mazmouz, R., Chau, R., Pearson, L.A., Pickford, R., Neilan, B.A.,** 2016. Heterologous Production of Cyanobacterial Mycosporine-Like Amino Acids Mycosporine-Ornithine and Mycosporine-Lysine in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6167–6173. <https://doi.org/10.1128/AEM.01632-16>. Editor
- Kim, K., Park, H., Lim, K.,** 2015. Phototoxicity : Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods 31, 97–104.
- Korbee Peinado, N., Abdala Díaz, R.T., Figueroa, F.L., Helbling, E.W.,** 2004. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *J. Phycol.* 40, 248–259. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2004.03013.x>
- Koyande, A.K., Chew, K.W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.T., Show, P.L.,** 2019. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Sci. Hum. Wellness* 8, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kuehne, A., Emmert, H., Soehle, J., Winnefeld, M., Fischer, F., Wenck, H., Gallinat, S., Terstegen, L., Lucius, R., Hildebrand, J., Zamboni, N., 2015.** Acute Activation of Oxidative Pentose Phosphate Pathway as First-Line Response to Oxidative Stress in Human Skin Cells. *Mol. Cell* 59, 359–371. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.017>
- Kumar, J., Singh, D., Tyagi, M.B., Kumar, A., 2019.** Cyanobacteria : Applications in Biotechnology, in: Mishra, A.K., Tiwari, D.N., Rai, A.N. (Eds.), *Cyanobacteria from Basic Science to Application*. Elsevier Inc., pp. 327–346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00016-7>
- Kumar, V., Mondal, S., Gupta, A., Maurya, P.K., Sinha, R.P., Häder, D.P., Singh, S.P., 2021.** Light-dependent impact of salinity on the ecophysiology of *Synechococcus elongatus* PCC 7942: Genetic and comparative protein structure analyses of UV-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) biosynthesis. *Environ. Exp. Bot.* 191. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104620>
- La Barre, S., Roullier, C., Boustie, J., 2014.** Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in Biological Photosystems, in: *Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., pp. 333–360. <https://doi.org/10.1002/9783527681501.ch15>
- Lawrence, K.P., Long, P.F., Young, A.R., 2018.** Mycosporine-Like Amino Acids for Skin Photoprotection 5512–5527. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170529124237>
- Li, C., Wu, Houbo, Xiang, W., Wu, Hualian, Wang, N., Wu, J., Li, T., 2022.** Comparison of Production and Fluorescence Characteristics of Phycoerythrin from Three Strains of *Porphyridium*. *Foods* 11. <https://doi.org/10.3390/foods11142069>
- Li, M.Z., Elledge, S.J., 2012.** SLIC: A method for sequence- and ligation-independent cloning, in: Peccoud, J. (Ed.), *Gene Synthesis: Methods and Protocols*. Springer, pp. 51–59. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-564-0_5

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, M.Z., Elledge, S.J.**, 2007. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat. Methods* 4, 251–256. <https://doi.org/10.1038/nmeth1010>
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois-Calero, N.**, 2008. Biofuels from microalgae. *Biotechnol. Prog.* 24, 815–820. <https://doi.org/10.1021/bp.070371k>
- Llewellyn, C.A., Airs, R.L.**, 2010. Distribution and abundance of MAAs in 33 species of microalgae across 13 classes. *Mar. Drugs* 8, 1273–1291. <https://doi.org/10.3390/md8041273>
- Llewellyn, C.A., Greig, C., Silkina, A., Kultschar, B., Hitchings, M.D., Farnham, G.**, 2020. Mycosporine-like amino acid and aromatic amino acid transcriptome response to UV and far-red light in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912. *Sci. Rep.* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77402-6>
- Lobus, N. V., Kulikovskiy, M.S.**, 2023. The Co-Evolution Aspects of the Biogeochemical Role of Phytoplankton in Aquatic Ecosystems: A Review. *Biology (Basel)*. 12, 1–21. <https://doi.org/10.3390/biology12010092>
- Losantos, R., Sampedro, D., Churio, M.S.**, 2015. Photochemistry and photophysics of mycosporine-like amino acids and gadusols, nature's ultraviolet screens. *Pure Appl. Chem.* 87, 979–996. <https://doi.org/10.1515/pac-2015-0304>
- Lucía Morocho-Jácome, A., Ruscinc, N., Miliani Martinez, R., Carlos, J., De Carvalho, M., Santos De Almeida, T., Rosado, C., Guilherme Costa, J., Valéria, M., Velasco, R., Rolim Baby, A.**, 2020. (Bio)Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics. *Springer Nat.* 104, 9513–9522.
- Ma, Y., Yoo, J.**, 2021. History of sunscreen: An updated view. *J. Cosmet. Dermatol.* 20, 1044–1049. <https://doi.org/10.1111/jocd.14004>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Manu, L., Mokolensang, J.F., Ben Gunawan, W., Setyawardani, A., Salindeho, N., Syahputra, R.A., Iqhrammullah, M., Nurkolis, F., 2024.** Photobioreactors are beneficial for mass cultivation of microalgae in terms of areal efficiency, climate implications, and metabolites content. *J. Agric. Food Res.* 18, 101282. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101282>
- Martínez-Ruiz, M., Martínez-González, C.A., Kim, D.H., Santiesteban-Romero, B., Reyes-Pardo, H., Villaseñor-Zepeda, K.R., Meléndez-Sánchez, E.R., Ramírez-Gamboa, D., Díaz-Zamorano, A.L., Sosa-Hernández, J.E., Coronado-Apodaca, K.G., Gámez-Méndez, A.M., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldivar, R., 2022.** Microalgae Bioactive Compounds to Topical Applications Products—A Review. *Molecules* 27, 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules27113512>
- Mazzelli, A., Cicci, A., Di Caprio, F., Altimari, P., Toro, L., Iaquaniello, G., Pagnanelli, F., 2020.** Multivariate modeling for microalgae growth in outdoor photobioreactors. *Algal Res.* 45, 101663. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101663>
- McMillan, T.J., Leatherman, E., Ridley, A., Shorrocks, J., Tobi, S.E., Whiteside, J.R., 2010.** Cellular effects of long wavelength UV light (UVA) in mammalian cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 60, 969–976. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.8.0004>
- Méresse, S., Fodil, M., Fleury, F., Chénais, B., 2020.** Fucoxanthin, a marine-derived carotenoid from brown seaweeds and microalgae: A promising bioactive compound for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms21239273>
- Metting, F.B., 1996.** Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17, 477–489. <https://doi.org/10.1007/bf01574779>
- Michele, G. de M., Cleber, K. da S., Adriano, A.H., Jorge, A.V.C., 2015.** Carbon dioxide mitigation by microalga in a vertical tubular reactor with recycling of the culture medium. *African J. Microbiol. Res.* 9, 1935–1940. <https://doi.org/10.5897/ajmr2015.7632>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mimouni, V., Ulmann, L., Haimeur, A., Guéno, F., Meskini, N., Tremblin, G.,** 2015. Marine microalgae used as food supplements and their implication in preventing cardiovascular diseases. OCL - Oilseeds fats, Crop. Lipids 22. <https://doi.org/10.1051/ocl/2015015>
- Mohamed Abdoul-latif, F., Ainane, A., Tarik, A., International, A., Oumaskour, K., Boujaber, N., Mohamed, J., Ainane, T.,** 2021. Formulations of a cosmetic product for hair care based on extract of the microalga *Isochrysis galbana*: in vivo and in vitro activities. J. Anal. Sci. Appl. Biotechnol. 3, 15–19. <https://doi.org/10.48402/IMIST.PRSM/jasab-v3i1.25015>
- Morocho-Jácome, A.L., Dapievi Bresaola, M., Monteiro de Carvalho, J.C., Nicolai, M., Rosado, C., Rolim Baby, A.,** 2017. Carbohydrates in *Ankistrodesmus braunii* biomass cultivated in tubular photobioreactors. J. Biomed. Biopharm. Res. 14, 242–248. <https://doi.org/10.19277/bbr.14.2.166>
- Morone, J., Alfeus, A., Vasconcelos, V., Martins, R.,** 2019. Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals — A new bioactive approach. Algal Res. 41, 101541. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101541>
- Mourelle, M.L., Gómez, C.P., Legido, J.L.,** 2017. The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. Cosmetics 4. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040046>
- Mushir, S., Fatma, T.,** 2011. Ultraviolet Radiation-absorbing Mycosporine-like Amino Acids in *Cyanobacterium Aulosira fertilissima*: Environmental Perspective and Characterization. Curr. Res. J. Biol. ... 3, 165–171.
- Nafisi, S., Maibach, H.I.,** 2017. Nanotechnology in Cosmetics. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00022-7>
- Narala, R.R., Garg, S., Sharma, K.K., Thomas-Hall, S.R., Deme, M., Li, Y., Schenk, P.M.,** 2016. Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. Front. Energy Res. 4, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2016.00029>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nayak, S., Ashhab, A. Al, Zilberg, D., Khozin-goldberg, I.,** 2020. Dietary supplementation with omega-6 LC-PUFA- rich microalgae regulates mucosal immune response and promotes microbial diversity in the zebrafish gut. *Biology (Basel)*. 9, 1–21. <https://doi.org/10.3390/biology9060119>
- Nayak, S., Prasanna, R.,** 2007. Soil pH and its role in cyanobacterial abundance and diversity in rice field soils. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 5, 103–113. https://doi.org/10.15666/aeer/0502_103113
- Nicoletti, M.,** 2016. Microalgae Nutraceuticals. *Foods* 5, 54. <https://doi.org/10.3390/foods5030054>
- Occhipinti, P.S., Russo, N., Foti, P., Zingale, I.M., Pino, A., Romeo, F.V., Randazzo, C.L., Caggia, C.,** 2024. Current challenges of microalgae applications: exploiting the potential of non-conventional microalgae species. *J. Sci. Food Agric.* 104, 3823–3833. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13136>
- Orallo, D.E., Fangio, M.F., Poblet, M., Carignan, M.O., Bernal, L., Carreto, J.I., Bertolotti, S.G., Churio, M.S.,** 2018. Photochemistry and Photophysics of Shinorine Dimethyl Ester. *Photochem. Photobiol.* 94, 829–833. <https://doi.org/10.1111/php.12884>
- Pawar, Y., Dave, K., Phadnis, S., Iyer, G.,** 2015. Taxonomic evaluation of Cyanobacteria using cpcB and cpcA Gene Sequencing Taxonomic evaluation of Cyanobacteria using Morphological Characters and Molecular phylogeny using cpcB and cpcA Gene Sequencing. *J. Algal Biomass Utln* 6, 32–39.
- Peng, J., Guo, F., Liu, S., Fang, H., Xu, Z., Wang, T.,** 2023. Recent Advances and Future Prospects of Mycosporine-like Amino Acids. *Molecules* 28, 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules28145588>
- Penloglou, G., Pavlou, A., Kiparissides, C.,** 2024. Recent Advancements in Photo-Bioreactors for Microalgae Cultivation: A Brief Overview. *Processes* 12. <https://doi.org/10.3390/pr12061104>
- Percival, S.L., Williams, D.W.,** 2014. *Cyanobacteria*, Second Edi. ed, *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00005-6>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pereira, L.**, 2018. Seaweeds as Source of Bioactive Substances and Skin Care Therapy—Cosmeceuticals, Algotherapy, and Thalassotherapy, Cosmetics. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5040068>
- Pope, M.A., Spence, E., Seralvo, V., Gacesa, R., Heidelberger, S., Weston, A.J., Dunlap, W.C., Shick, J.M., Long, P.F.**, 2015. O-methyltransferase is shared between the pentose phosphate and shikimate pathways and is essential for mycosporine-like amino acid biosynthesis in *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *ChemBioChem* 16, 320–327. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402516>
- Priyadarshani, I., Rath, B.**, 2012. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass Util.* 3, 89–100. <https://doi.org/10.1021/jf901070g>
- Quan, J., Tian, J.**, 2009. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS One* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
- Raffa, R.B., Pergolizzi, J. V., Taylor, R., Kitzen, J.M.**, 2019. Sunscreen bans: Coral reefs and skin cancer. *J. Clin. Pharm. Ther.* 44, 134–139. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12778>
- Rao, A.R., Sindhuja, H.N., Dharmesh, S.M., Sankar, K.U., Sarada, R., Ravishankar, G.A.**, 2013. Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3842–51. <https://doi.org/10.1021/jf304609j>
- Ras, M., Steyer, J.P., Bernard, O.**, 2013. Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 153–164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Rastogi, R.P., Incharoensakdi, A.**, 2014. Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU2555. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 244–256. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12220>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rastogi, R.P., Sonani, R.R., Atomic, B., Incharoensakdi, A.,** 2015. The potential of mycosporine-like amino acids as uv-sunscreens, in: Sharp, S.H. (Ed.), *Sunscreens*. Nova Science Publishers, Inc., pp. 173–189.
- Reichert, O., Kolbe, L., Terstegen, L., Staeb, F., Wenck, H., Schmelz, M., Genth, H., Kaefer, V., Roggenkamp, D., Neufang, G.,** 2015. UV radiation induces CXCL5 expression in human skin. *Exp. Dermatol.* 24, 309–312. <https://doi.org/10.1111/exd.12652>
- Richa, Pathak, J., Sonker, A.S., Singh, V., Sinha, R.P.,** 2017. Nanobiotechnology of cyanobacterial UV-protective compounds: innovations and prospects, in: Grumezescu, A. (Ed.), *Food Preservation*. Elsevier Inc., pp. 603–644. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804303-5.00017-1>
- Rosic, N., Climstein, M., Boyle, G.M., Thanh Nguyen, D., Feng, Y.,** 2023. Exploring Mycosporine-like Amino Acid UV-Absorbing Natural Products for a New Generation of Environmentally Friendly Sunscreens. *Mar. Drugs* 21. <https://doi.org/10.3390/md21040253>
- Rosic, N.N.,** 2019. Mycosporine-Like Amino Acids : Making the Foundation for Organic Personalised Sunscreens 1–17.
- Safar, H., Wagenen, J. Van, Møller, P., Jacobsen, C.,** 2015. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Mar. Drugs* 13, 7339–7356. <https://doi.org/10.3390/md13127069>
- Sahin, S.C.,** 2018. The potential of *Arthrospira platensis* extract as a tyrosinase inhibitor for pharmaceutical or cosmetic applications. *South African J. Bot.* 119, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.004>
- Santoso, A.D., Hariyanti, J., Pinardi, D., Kusretuwardani, K., Widyastuti, N., Djarot, I.N., Handayani, T., Sitomurni, A.I., Apriyanto, H.,** 2023. Sustainability index analysis of microalgae cultivation from biorefinery palm oil mill effluent. *Glob. J. Environ. Sci. Manag.* 9, 559–576. <https://doi.org/10.22035/gjesm.2023.03.13>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Savio, S., Bellini, E., Canuti, L., Canini, A., Piredda, L., Rodolfo, C., Congestri, R.,** 2017. Characterization and bioactivity of mycosporine-like amino acids extracts of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum*, *Staurosirella pinnata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Phycologia* 56, 167.
- Sawdon, A., Peng, C.A.,** 2014. Internal deoxygenation of tubular photobioreactor for mass production of microalgae by perfluorocarbon emulsions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90, 1426–1432. <https://doi.org/10.1002/jctb.4444>
- Sayre, R.M., Agin, P.P., LeVee, G.J., Marlowe, E.,** 1979. A Comparison of in Vivo and in Vitro Testing of Sunscreening Formulas. *Photochem. Photobiol.* 29, 559–566. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07090.x>
- Sen, S., Mallick, N.,** 2021. Mycosporine-like amino acids : Algal metabolites shaping the safety and sustainability profiles of commercial sunscreens. *Algal Res.* 58, 102425. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102425>
- Shanab, S.M.M., Mostafa, S.S.M., Shalaby, E.A., Mahmoud, G.I.,** 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 608–615. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60106-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60106-3)
- Silva, N.C., Freitas, L. V.D., Silva, T.C., Duarte, C.R., Barrozo, M.A.S.,** 2023. Use of Refractance Window Drying as an Alternative Method for Processing the Microalga *Spirulina platensis*. *Molecules* 28. <https://doi.org/10.3390/molecules28020720>
- Singh, A., Čížková, M., Bišová, K., Vítová, M.,** 2021. Exploring Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) as Safe and Natural Protective Agents against UV-Induced Skin Damage. *Antioxidants* 10, 1–23.
- Singh, S.P., Klisch, M., Sinha, R.P., Häder, D.P.,** 2010. Genome mining of mycosporine-like amino acid (MAA) synthesizing and non-synthesizing cyanobacteria: A bioinformatics study. *Genomics* 95, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.10.002>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sinha, R.P., Ambasht, N.K., Sinha, J.P., Klisch, M., Häder, D.P.,** 2003. UV-B-induced synthesis of mycosporine-like amino acids in three strains of *Nodularia* (cyanobacteria). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 71, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.07.003>
- Slegers, P.M., Wijffels, R.H., van Straten, G., van Boxtel, A.J.B.,** 2011. Design scenarios for flat panel photobioreactors. *Appl. Energy* 88, 3342–3353. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.037>
- Soilán, J., López-Cóndor, L., Peñín, B., Aguilera, J., de Gálvez, M.V., Sampedro, D., Losantos, R.,** 2024. Evaluation of MAA Analogues as Potential Candidates to Increase Photostability in Sunscreen Formulations. *Photochem* 4, 128–137. <https://doi.org/10.3390/photochem4010007>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A.,** 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stevenson, J., Krycer, J.R., Phan, L., Brown, A.J.,** 2013. A practical comparison of ligation-independent cloning techniques. *PLoS One* 8, 8–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083888>
- Suh, S.-S., Hwang, J., Park, M., Seo, H.H., Kim, H.S., Lee, J.H., Moh, S.H., Lee, T.K.,** 2014. Anti-Inflammation Activities of Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in Response to UV Radiation Suggest Potential Anti-Skin Aging Activity. *Mar. Drugs* 12, 5174–5187. <https://doi.org/10.3390/md12105174>
- Suh, S.S., Oh, S.K., Lee, S.G., Kim, I.C., Kim, S.,** 2017. Porphyrin-334, a mycosporine-like amino acid, attenuates UV-induced apoptosis in HaCaT cells. *Acta Pharm.* 67, 257–264. <https://doi.org/10.1515/acph-2017-0015>
- Sun, Y., Zhang, N., Zhou, J., Dong, S., Zhang, X., Guo, L., Guo, G.,** 2020. Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in Marine Macroalgae and a Database for MAAs Based on. *Mar. Drugs* 18.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tan, K.Y., Low, S.S., Manickam, S., Ma, Z., Banat, F., Munawaroh, H.S.H., Show, P.L.,** 2023. Prospects of microalgae in nutraceuticals production with nanotechnology applications. *Food Res. Int.* 169, 112870. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112870>
- Tartarotti, B., Sommaruga, R.,** 2006. Seasonal and ontogenetic changes of mycosporine-like amino acids in planktonic organisms from an alpine lake. *Limnol. Oceanogr.* 51, 1530–1541. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.3.1530>
- Torres-Tiji, Y., Fields, F.J., Mayfield, S.P.,** 2020. Microalgae as a future food source. *Biotechnol. Adv.* 41. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536>
- Torres, P., Santos, J.P., Chow, F., Pena Ferreira, M.J., dos Santos, D.Y.A.C.,** 2018. Comparative analysis of in vitro antioxidant capacities of mycosporine-like amino acids (MAAs). *Algal Res.* 34, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.007>
- Ubando, A.T., Cuello, J.L., Culaba, A.B., Promentilla, M.A.B., Tan, R.R.,** 2014. Multi-Criterion Evaluation of Cultivation Systems for Sustainable Algal Biofuel Production using Analytic Hierarchy Process and Monte Carlo Simulation. *Energy Procedia* 61, 389–392. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.11.1132>
- Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R., Peleg, Y.,** 2010. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J. Struct. Biol.* 172, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.016>
- Vega, J., Schneider, G., Moreira, B.R., Herrera, C., Bonomi-Barufi, J., Figueroa, F.L.,** 2021. Mycosporine-like amino acids from red macroalgae: Uv-photoprotectors with potential cosmeceutical applications. *Appl. Sci.* 11. <https://doi.org/10.3390/app11115112>
- Wang, J., Hu, X., Chen, J., Wang, T., Huang, X., Chen, G.,** 2022. The Extraction of β -Carotene from Microalgae for Testing Their Health Benefits. *Foods* 11, 1–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods11040502>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wongluang, P., Chisti, Y., Srinophakun, T.,** 2012. Optimal hydrodynamic design of tubular photobioreactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 55–61. <https://doi.org/10.1002/jctb.3898>
- Wu, P., Zhang, B., Han, X., Sun, Y., Sun, Z., Li, L., Zhou, X., Jin, Q., Fu, P., Xu, W., Qian, H.,** 2021. HucMSC exosome-delivered 14-3-3(Formula presented) alleviates ultraviolet radiation-induced photodamage via SIRT1 pathway modulation. *Aging (Albany. NY).* 13, 11542–11563.
- Xiong, F., Kopecky, J., Nedbal, L.,** 1999. The occurrence of UV-B absorbing mycosporine-like amino acids in freshwater and terrestrial microalgae (Chlorophyta). *Aquat. Bot.* 63, 37–49. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(98\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(98)00106-5)
- Yan, H., Guan, C., Jia, Y., Huang, X., Yang, W.,** 2018. Mixing characteristics, cell trajectories, pressure loss and shear stress of tubular photobioreactor with inserted self-rotating helical rotors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93, 1261–1269. <https://doi.org/10.1002/jctb.5484>
- Yang, N., Zhang, Q., Chen, J., Wu, S., Chen, R., Yao, L., Li, B., Liu, X., Zhang, R., Zhang, Z.,** 2023. Study on bioactive compounds of microalgae as antioxidants in a bibliometric analysis and visualization perspective. *Front. Plant Sci.* 14, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1144326>
- Yeh, K.L., Chang, J.S.,** 2011. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. *Biotechnol. J.* 6, 1358–1366. <https://doi.org/10.1002/biot.201000433>
- Zhang, Q., Zhu, L., Wang, G., Zhao, Y., Xiong, N., Bao, H., Jin, W.,** 2016. Ionizing radiation promotes CCL27 secretion from keratinocytes through the cross talk between TNF- α and ROS. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 31, 1–6. <https://doi.org/10.1002/jbt.21868>
- Zheng, W. V., Xu, W., Li, Y., Qin, J., Zhou, T., Li, D., Xu, Y., Cheng, X., Xiong, Y., Chen, Z.,** 2022. Anti-aging effect of β -carotene through regulating the KAT7-P15 signaling axis, inflammation and oxidative stress process. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 27. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00389-7>



TEŞEKKÜR

Öncelikle öğrencilerine her zaman destek olan, yol gösteren, her türlü yeni bilgiye ve yeni çalışmaya açık olan sayın danışmanım Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL'e; manevi ikinci danışmanım, her zaman tüm öğrencilerine kapısı açık, güleryüzlü, sayın Prof. Dr. Murat ELİBOL'a; bana çalıştığı enstitünün ve evinin kapılarını sonuna kadar açan doktora sürecimde çok büyük desteği ve emeği olan sayın Dr. Kumar SAURAV'a; İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Eczacılık Bölümünün kapılarını bize açan her imkanını kullanmamıza olanak sağlayan birlikte laboratuvara girip çalışma şansı bulduğum sayın Prof. Dr. Zeynep ŞENYİĞİT'e; aynı laboratuvarıda çalışmış olmaktan gurur duyduğum akademik kariyerini hayranlıkla izlediğim her adımını sağlam ve bilgiyle atan, bana çok güzel yol göstermiş olan çok sevgili arkadaşım Ayşe KÖSE'ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kültür koleksiyonundan türlerini bizimle paylaşmış olan mikroalg sevgisine hayranlık duyduğum sayın Prof. Dr. Meltem CONK DALAY'a; mikroalg bilgisine hayran olduğum, her zaman her konuda bana yardımcı olan sayın Zeliha DEMİREL'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvarıda beraber çalışmaktan en çok keyif aldığım, her nazımı çeken yüksek biyomühendis Yaprak ŞAHİN'e; tez çalışmalarımda bana oldukça yardımı dokunmuş tezin son zamanlarında aynı yollardan geçtiğimiz Asena ATAY'a; hayvan hücre kültürü deneylerimde bana yardımcı olan her türlü tecrübesini ve bilgisini paylaşan desteğini asla eksik etmeyen Dr. Ilgın KIMIZ GEBOLOĞLU'na; yine hayvan hücre kültürü deneylerimde bana yardımcı olmak için elinden geleni yapan hücre sayarken neredeyse kör olan yüksek biyomühendis Süleyman Furkan DEMİRDEN'e; tüm lisans hayatım boyunca yanımda olmuş, doktorada da aynı kaderi ve laboratuvarı paylaştığım Çağla YARKENT'e; aynı laboratuvarı paylaştığım ve beraberinde birçok güzel anıyı paylaştığım bilimsel ve duygusal olarak bana desteklerini hissettiğim arkadaşlarım Tuğçe MUTAF KILIÇ'a, Yunus ÇELİK'e, Başak TUĞCU'ya, İzel ORAL'a; yardımları için lisans tez öğrencileri Şevval KURT'a, Ezgi SÜRGEVİL'a, Yaren KURT'a, Sualp KAVLAK'a ve yolu Mikroalgal Proses Laboratuvarından geçmiş tüm herkese teşekkürler.

Liseden beri bağıımızın hiç kopmadığı en yakın arkadaşım Evrim ERENOĞLU'NA; yaptığı güzel tatlılarla bana enerji verip tez çalışmalarına bu şekilde destek olan Gökselen GÖNÜLŞEN KURU'ya; geç saatlere kadar çalıştığım günler bana kapısını açan Bade İSKENT'e; canım avukatım Nermin ÖZDEMİR'e; bu zorlu süreçte kafa dağıtmamı sağlayan Birkan AKSOY, Mustafa EKİZ, Efe KURU, Hüsrev BEYAZIŞIK, Elbruz DUMBAY başta olmak üzere tüm arkadaşlarıma çok teşekkürler.

Doktora eğitim sürecinde bana bursiyer olarak maddi destek sağlayan 100/2000 Yüksek Öğretim Kurumu (YÖK) Doktora Bursu Programına; doktora tez çalışmamı 120N544 numaralı proje ile finanse etmemi sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Her koşulda yanımda olan maddi manevi hiçbir desteklerini esirgemeyen sevgili ailem Cansel GÜRLEK, Cengiz GÜRLEK ve Caner GÜRLEK'e; hayatıma girdiği günden beri beni her konuda destekleyen, doktora tez sürecinde her sorunuma çözüm bulmak için uğraşan, çözüm bulamadığı zaman sadece beni dinleyen sevgili eşim Filip KLIBER'e sabrı ve sevgisi için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Son olarak bu yol uğrunda kaybettiğim parmağımın ucuna teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Ceren GÜRLEK KLİBER

Biyomühendis

Eğitim Bilgileri	
Erasmus+ Eğitim Programı Şubat 2021-Temmuz 2021 GNO: 4.00/4.00	Mendel University, Department of Chemistry and Biochemistry Çalışma: Mikroalgal pigmentler ve antioksidan aktivitesi Research: Tuz stresinin mikroalgal pigmentleri ve antioksidan aktivitesi üzerindeki etkisinin mikosporin benzeri amino asitler üzerindeki etkisini araştırmak Danışman: Dr. Dalibor Huska
Lisans Dereceli Doktora 2017-2024 GNO: 3.92/4.00	Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı Doktora Tezi: Mikroalgal Güneş Koruyucu Maddelerin Üretimi ve Kozmetikte Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi Danışman: Doç. Dr. Suphi Ş. Öncel
Lisans 2013-2017 GNO: 3.09/4.00	Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü Lisans Tezi: Protein Ekspresyonlarında Ototregülasyon Parametrelerinin Simulasyonlar Yardımı ile Değerlendirilmesi Danışman: Dr. Öğretim Görevlisi İsmail Hakkı AKGUN

WORK EXPERIENCE	
Stajyer Mart 2015 – Eylül 2015	Bionorm Natural Products Production & Marketing Co., Izmir – TURKEY - Bazı bitki metabolitlerinin ayırma ve saflaştırma süreçlerinin optimizasyonu - Kromatografik teknikler; kolon kromatografisi, HPLC ve TLC
Stajyer Temmuz 2016 – Eylül 2016	Izmir International Biomedicine and Genome Institute, Cancer Research Groups, Ayar-Kayali Lab <i>In situ</i> sitotoksikite testleri <i>In vitro</i> sitotoksikite testleri

	• Western Blot • SDS-PAGE
Araştırmacı Eylül 2017 –	Ege Üniversitesi, Mikroalgal Proses Laboratuvarı
Erasmus+ Öğrenim Programı Nisan 2021 – Temmuz 2021	Mendel University, Research group for the Plants and Microalgae NanoBiotechnology (PM-NanoBio)
Erasmus+ Staj Programı Haziran 2022 – Eylül 2022	Czech Academy of Sciences, Institute of Microbiology, Centre Algatech, Laboratory of Algal Biotechnology, Research group for Natural Products: Biosynthesis and Regulation
Ziyaretçi Araştırmacı Şubat 2023 – Nisan 2023	Czech Academy of Sciences, Institute of Microbiology, Centre Algatech, Laboratory of Algal Biotechnology, Research group for Natural Products: Biosynthesis and Regulation

YAYINLAR

- **Gürlek, C.**, Yarkent, Ç., Köse, A., Tuğcu, B., Kımız Geboloğlu, I., Öncel, S.Ş., Elibol, M. (2020). Screening of antioxidant and cytotoxic activities of several microalgal extracts with pharmaceutical potential. Health Technol. 10, 111-117. <https://doi.org/10.1007/s12553-019-00388-3>
- **Gürlek, C.**, Yarkent, Ç., Köse, A., Oral, İ., Öncel, S.Ş., Elibol, M. (2020). Evaluation of Several Microalgal Extracts as Bioactive Metabolites as Potential Pharmaceutical Compounds. In: Badnjevic, A., Škrbić, R., Gurbeta Pokvić, L. (eds) CMBEBIH 2019. CMBEBIH 2019. IFMBE Proceedings, vol 73. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17971-7_41
- Yarkent, Ç., **Gürlek, C.**, Öncel, S.Ş. (2020). Potential of microalgal compounds in trending natural cosmetics: A review. Sustainable Chemistry and Pharmacy. 17, 100304. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100304>

KİTAP BÖLÜMLERİ

- **Gürlek, C.**, Yarkent, Ç., Köse, A., Öncel, S.Ş., Nutraceutical Aspects Of Microalgae Will Our Future Space Foods Be Microalgae Based?, G. A. Ravishankar [Editors], Handbook Of Algal Technologies And Phytochemicals(175 - 182), ISBN: 9780429054242, CRC Press, 23 July 2019.
- Yarkent, C., Aslanbay Guler, B., **Gurlek, C.**, Sahin, Y., Kose, A., S. Oncel, S., & Imamoglu, E. (2022). Algal Alginate in Biotechnology: Biosynthesis and Applications. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.101407

- Aslanbay Guler, B., **Gurlek, C.**, Sahin, Y., Oncel, S.S., Imamoglu, E. (2023). Renewable Bioethanol for a Sustainable Green Future. In: Oncel, S.S. (eds) A Sustainable Green Future. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-24942-6_21
- Tugcu, B., Celik, Y., Yarkent, C., **Gurlek, C.**, Kose, A., Oncel, S.S. (2023). Microbial Fuel Cell Technology: Scale-up and Potential for Industrial Applications. In: Oncel, S.S. (eds) A Sustainable Green Future. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-24942-6_29

SÖZLÜ VE POSTER SUNUMLARI

[POSTER] **Gürlek C.**, Yarkent Ç., Köse A., Oral İ., Öncel S.Ş., Elibol M. (2020) Evaluation of Several Microalgal Extracts as Bioactive Metabolites as Potential Pharmaceutical Compounds. In: Badnjevic A., Škrbić R., Gurbeta Pokvić L. (eds) CMBEBIH 2019. CMBEBIH 2019. IFMBE Proceedings, vol 73. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17971-7_41

[SÖZLÜ] **Gürlek, C.**, Sahin, Y., Yarkent, C., Macho, M., Saurav, K., Akgün, İ.H., Şenyiğit, Z., Conk Dalay, M., Elibol, M., Öncel, S.Ş. Discovery of mycosporine like amino acid (shinorine) gene cluster in *Nostoc sp.* (2022). III. International Enzyme & Bioprocess Days, 9-11 September, 2022.

Projeler

- Mikroalglerden potansiyel biyoaktif moleküllerin araştırılması ve gen regülasyonlarının incelenmesi (ALGACTIVE) Belçika-Güney Kore İşbirliği Projesi (KONNECT), TÜBİTAK 216M390, 2016/2018.
- Güneş Koruyucu Molekül Üreten Potansiyel Kimyasal Fabrikalar Olarak Siyanobakteriler (CyanoSun) Çekya İkili İşbirliği Projesi, TÜBİTAK, 120N544, Mart 2021/Mart 2024.

Çalışma Alanları

- Mikroalglerin büyük ölçekli üretimi
- Mikroalglerden sekonder metabolit üretimi
- Mikroalglerden potansiyel kozmetik ürün üretimi
- Mikroalglerin biyolojik yolları
- Biyoreaktör ve fotobiyoreaktör tasarımı ve ölçeklendirme
- Hayvan hücre kültürlerinde kozmetik uygulamaları (MTT, Comet Assay, vb.)

Dil ve Bilgisayar Yetenekleri

Dil	İngilizce: C2 Almanca: A1 Çekçe: A1
Bilgisayar	Microsoft Office, R Software, MATLAB, Design Expert

Referanslar**Doç. Dr. Suphi Şurişvan Öncel**

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

Prof. Dr. Murat Elibol

Ege University, Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, Turkey

Dr. Dalibor Huska

Mendel University, Faculty of Agrisciences, Department of Chemistry and Biochemistry, Czechia

Dr. Kumar Saurav

Czech Academy of Life Sciences, Centre of Algatech, Czechia