

**HALOFİLİK MİKROORGANİZMALARDAN PİGMENT ÜRETİMİ VE
HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI**

Murat Yasin YÜKSEK

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Volkan KILIÇ

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Nisan 2022

ÖZET

HALOFİLİK MİKROORGANİZMALARDAN PİGMENT ÜRETİMİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

Murat Yasin YÜKSEK

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Nisan 2022

Danışman: Doç. Dr. Volkan KILIÇ

Pigmentler, farklı alanlarda kullanımı olan önemli bileşiklerdir. En genel kullanım alanları katkı maddesi ve renk arttırıcı olarak tıp, gıda, hayvancılık, tekstil, kozmetik endüstrisidir. Pigmentler; sentetik olarak da üretilebilmelerine rağmen, genellikle doğal pigmentler olarak tercih edilmektedir. Yürütülen yüksek lisans tez çalışması kapsamında, *Haloferax alexandrinus*'un pigment üretim koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda *H. alexandrinus* pigment üretimi için ideal tuz konsantrasyonu, sıcaklık ve pH koşulları belirlenmiştir. *H. alexandrinus* 'dan pigment ekstraksiyonu için farklı çözücüler kullanılmış ve en uygun çözücü aseton olarak bulunmuştur. Pigment içeriğinin saflaştırılması ve belirlenebilmesi için TLC, LC-MS/MS ve NMR teknikleri kullanılmıştır. Elde edilen karotenoid ekstraktının antikanser özelliğinin belirlenebilmesi için SH-SY5Y nöroblastom hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

Pigment üretimi için; en uygun besiyeri olarak %20'lik tuz içeren MGM-20 sıvı besiyeri seçilmiştir. *Haloferax alexandrinus* en yüksek pigment üretimi için kültürel parametreler incelendiğinde; karanlık inkübasyon, 120 rpm çalkalama hızı, 37°C sıcaklık, 7 günlük inkübasyon ve başlangıç pH değeri 8'in en uygun koşullar oldukları belirlenmiştir. Karotenoid ekstraktının SH-SY5Y nöroblastom hücreleri için IC50 değeri 2 µg/ml olarak bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Haloferax alexandrinus, Pigment, Mgm-20, Sh-sy5y.

ABSTRACT

PIGMENT PRODUCTION FROM HALOPHILIC MICROORGANISMS AND CELL CULTURE APPLICATIONS

Murat Yasin YÜKSEK

Department of Biology

Programme in General Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, April 2022

Supervisor: Doç. Dr. Volkan KILIÇ

Pigments are important compounds with use in different fields. The most common usage areas are medicine, food, livestock, textile, cosmetics industry as additive and color enhancer. Pigments; Although they can also be produced synthetically, they are generally preferred as natural pigments. Within the scope of the master thesis study, it was aimed to determine the pigment production conditions of *Haloferax alexandrinus*. In this context, ideal salt concentration, temperature and pH conditions were determined for *H. alexandrinus* pigment production. Different solvents were used for pigment extraction from *H. alexandrinus* and acetone was found to be the most suitable solvent. TLC, LC-MS/MS and NMR techniques were used for the purification and determination of the pigment content. In order to determine the anticancer properties of the obtained carotenoid extract, its cytotoxic effects on SH-SY5Y neuroblastoma cells were investigated.

For pigment production; MGM-20 broth containing 20% salt was selected as the most suitable medium. When cultural parameters were examined for the highest pigment production in *Haloferax alexandrinus*; Dark incubation, 120 rpm shaking speed, 37°C temperature, 7 day incubation and initial pH value of 8 were determined as the most suitable conditions. The IC50 value of the carotenoid extract for SH-SY5Y neuroblastoma cells was found to be 2 µg/ml.

Keywords: *Haloferax alexandrinus*, Pigment, Mgm-20, Sh-sy5y.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince düşünce, önerileri, pratiklik ve iyi kalbiyle beni yönlendirip destek olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Volkan KILIÇ'a,

Saflaştırma basamaklarında elinden geldiğinden fazlasıyla ilgili ve yardımcı olan hocam Sayın Prof. Dr. İlhami ÇELİK'e,

Hücre kültürü çalışmalarında yardımcı olan hocam Sayın Doç. Dr. Emel ERGENE'ye

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen Doktora Öğrencisi Samal Berdibekova'ya, çok teşekkür ederim.

Bugüne kadar olumlu veya olumsuz verdiğim tüm kararlar doğrultusunda desteklerini esirgemeyen sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecim boyunca beni destekleyen yakın arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Murat Yasin YÜKSEK

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Murat Yasin YÜKSEK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
DANIŞMAN ONAYI	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Pigment Nedir?	3
1.2. Pigmentlerin Sınıflandırılması.....	6
1.2.1. İnorganik pigmentler	7
1.2.2. Sentetik pigmentler	7
1.2.3. Doğal pigmentler	7
1.2.3.1. Bitki pigmentler	8
1.2.3.2. Hayvansal pigmentler.....	8
1.2.4. Mikrobiyal Pigmentler	9
1.2.4.1. Bakteriyel pigmentler	9
1.2.4.2. Fungal pigmentler	10
1.3. Mikroorganizmalardan Pigment Üretimi.....	10
1.3.1. Karotenoidler	11
1.3.1.1. Beta-karoten	14
1.3.1.2. Kantaksantin.....	15
1.3.1.3. Lutein	16

1.3.1.4. <i>Likopen</i>	16
1.3.1.5. <i>Astaksantin</i>	17
1.3.1.6. <i>Bakteriuberin</i>	18
1.4. Doğal Pigmentlerin Kullanım Alanları	19
1.4.1. Renklendirici olarak kullanımı	19
1.4.2. Gıda katkısı ve fonksiyonel gıda olarak kullanımı	20
1.4.3. Nutrasötik ve farmasötik olarak kullanımı	20
1.4.4. Hayvan yemlerinde koruyucu gıda olarak kullanımı	20
1.5. <i>Haloferax</i> Türlerinin Genel Özellikleri	21
1.5.1. <i>Haloferax alexandrinus</i>	21
1.6. Biyolojik Analizler	22
1.6.1. Sitotoksosite testleri	22
1.6.1.1. <i>Mtt sitotoksosite testi</i>	23
2. MATERYAL VE METOD	24
2.1. Materyal	24
2.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri	24
2.1.1.1. %12,5 <i>MGM (Modifiye Geliştirme Medium)</i>	24
2.1.1.2. %15 <i>MGM</i>	24
2.1.1.3. %17,5 <i>MGM</i>	25
2.1.1.4. %20 <i>MGM</i>	25
2.1.1.5. %25 <i>MGM</i>	25
2.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler	26
2.1.2.1. %30 (w/v) konsantre tuzlu su stok çözeltisi	26
2.1.2.2. <i>MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- difenil tetrazolium bromid]</i>	26
2.1.3. Kimyasal maddeler ve çözücüler	26
2.2. Yöntem	27
2.2.1. <i>Haloferax alexandrinus</i> suşu üretimi	27
2.2.2. Liyofilize kültürün geliştirilmesi	27
2.2.3. Hücrelerin gram boyama ile boyanması	27
2.2.4. <i>Haloferax alexandrinus</i> 'un besiyerine ekim ve üretimi	28
2.2.5. Pigment üretimi için uygun besiyerinin seçimi	29
2.2.6. <i>Haloferax alexandrinus</i> 'un büyüme eğrisinin çıkarılması	29

2.2.7. Pigment ekstraksiyonu ve analizi.....	30
2.2.8. Karotenoid kısmi saflaştırılması	31
2.2.8.1. <i>Diyaliz yöntemi</i>	31
2.2.9. Kromatografik analizler	31
2.2.9.1. <i>Kolon kromatografisi</i>	32
2.2.9.2. <i>İnce tabaka kromatografi (TLC)</i>	33
2.2.9.3. <i>Preparatif ince tabaka kromatografisi (P-TLC)</i>	34
2.2.10. Total karotenoid miktarı.....	34
2.2.11. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi).....	35
2.2.12. UV-VIS analizi.....	36
2.2.13. Sıvı kromatografi-Kütle spektrometresi (LC-MS/MS).....	37
2.2.14. Hücre kültürü çalışmaları	37
2.2.14.1. <i>SH-SY5Y hücrelerinin üretimi ve pasajlanması</i>	37
2.2.14.2. <i>MTT testi</i>	38
3. BULGULAR	39
3.1. <i>Haloferax alexandrinus</i> ile Pigment Üretimini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması.....	39
3.2. Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Koşullarda <i>Haloferax alexandrinus</i> ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi	39
3.3. <i>Haloferax alexandrinus</i> ile Pigment Üretiminde Uygun Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....	40
3.4. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında <i>Haloferax Alexandrinus</i> 'un Üreme Yoğunluğu.....	41
3.5. Karanlık ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının <i>Haloferax alexandrinus</i> ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi	42
3.6. <i>Haloferax Alexandrinus</i> ile Pigment Üretiminde Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi.....	42
3.7. Diyaliz Yöntemi	44
3.8. Kolon Kromatografisi.....	45
3.9. İnce Tabaka Kromatografi (TLC).....	45
3.9.1. Preparatif ince tabaka kromatografisi (P-TLC)	46
3.10. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi).....	47

3.11. UV-VIS Analizi.....	48
3.12. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS).....	50
3.13. MTT Testi	51
4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKÇA.....	61
ÖZGEÇMİŞ	



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Ostwald diyagramında yer alan birbirlerini tamamlayan komplementer renkler	4
Tablo 2.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım amaçları	27



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Renklerin, dalga boyu eksenindeki dizilişleri	4
Şekil 1.2. Karotenoidlerin poliizoprenoid yapısı.....	11
Şekil 1.3. Gıdalarda yaygın olarak bulunan bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları.....	12
Şekil 1.4. Beta-karoten moleküler yapısı.....	15
Şekil 1.5. Kantaksantin moleküler yapısı	15
Şekil 1.6. Lutein moleküler yapısı.....	16
Şekil 1.7. Likopen moleküler yapısı	16
Şekil 1.8. Astaksantin moleküler yapısı	17
Şekil 1.9. Bakteriuberin moleküler yapısı	18
Şekil 1.10. Doğal pigmentlerin çeşitli uygulamala alanları.....	19
Şekil 1.11. Haloferax alexandrinus taramalı elektron mikroskopundaki morfolojik görüntüsü.....	22
Şekil 2.1. Haloferax alexandrinus 100x’lik büyütmedeki ışık mikroskobu görüntüsü.....	28
Şekil 2.2. Haloferax alexandrinus’un pigment üretiminin şematik sunumu	29
Şekil 2.3. Haloferax alexandrinus türünün 9.000 RPM’ de 20 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çöktürülmüş görüntüsü	30
Şekil 2.4. Kolon kromatografisi ile pigment saflaştırılması.....	33
Şekil 2.5. Total karotenoid pigment özütü hücrelerinin kuru ağırlık görüntüsü	35
Şekil 2.6. NMR spektroskopisi için alınan örnek.....	36
Şekil 3.1. Haloferax alexandrinus’un çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarında sırasıyla 0, 60 ve 120 rpm hızında oluşturdukları pigment üretimi.....	40
Şekil 3.2. Haloferax alexandrinus’un farklı sıcaklık değerlerinde büyüme eğrisi	41
Şekil 3.3. Haloferax alexandrinus’un farklı tuz konsantrasyonlarında üreme yoğunluğu	41
Şekil 3.4. Haloferax alexandrinus’un karanlık ve aydınlık inkübasyon koşullarında oluşturdukları pigmentler	42
Şekil 3.5. Haloferax alexandrinus’un çalkalamalı inkübasyon koşullarında oluşturdukları pigmentler.....	43

Şekil 3.6. Haloferax alexandrinus'un farklı pH ve tuz oranında pigment üretimleri ve üreme miktarları	44
Şekil 3.7. Pigment'in diyaliz yöntemi ile tuzdan arındırılma görüntüleri (Diyaliz öncesi ve sonrası elde edilen ürün)	44
Şekil 3.8. Kolon kromatografisi sonucu elde edilen pigment görünümü	45
Şekil 3.9. İnce tabaka kromatografisinde, ultraviyole (UV) ışık altında karışımdaki maddelerin bant görüntüsü	46
Şekil 3.10. Preparatif ince tabaka kromatografisi (P-TLC) yöntemi kullanılarak karışımdaki maddelerin ayrılması	47
Şekil 3.11. Haloferax alexandrinus'tan üretilen pigmentlerden birinin proton NMR spektrumu	48
Şekil 3.12. Aseton ile ekstrakte edilen Haloferax alexandrinus'un UV-VIS Spektrum analizi	49
Şekil 3.13. Metanol ile ekstrakte edilen Haloferax alexandrinus'un UV-VIS Spektrum analizi	49
Şekil 3.14. Etanol ile ekstrakte edilen Haloferax alexandrinus'un UV-VIS Spektrum analizi	50
Şekil 3.15. Haloferax alexandrinus türüne ait LC kromatogramı	50
Şekil 3.16. Haloferax alexandrinus türünün aseton ekstraktının LC kromatogramında 11. dakikadaki pike ait MS spektrumu	51
Şekil 3.17. İnsan nöroblastom hücre hattı SH-SY5Y hücrelerinde 24,48 ve 72 saatlik karotenoid pigment hücre özütlerinin uygulaması sonrası MTT testi yüzde (%) canlılık sonuçları	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
C	: Karbon
H	: Hidrojen
N	: Azot
m	: Metre
nm	: Nanometre
mm	: Milimetre
cm	: Santimetre
mg	: Miligram
g	: Gram
ml	: Mililitre
μ	: Mikro
μ l	: Mikrolitre
pH	: Hidrojen potansiyeli
rpm	: Dakika başına devir
dk	: Dakika
°C	: Santigrat derece
Abs	: Absorbans
lt	: Litre
mM	: Milimolar
BHT	: Butil hidroksi toluen
MTT	: 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide
ROS	: Reaktif oksijen türleri
FBS	: Sığır serumu
DMSO	: Dimetil sülfoksit
OD	: Optik yoğunluk

1. GİRİŞ

Ekstremofiller arasında yer alan halofiller, hipersalin ortamlarda yaşayan tuz seven organizmalardır. Halofiller, deniz tuzluluğundan (0,6 M) tuzun doyma noktasına kadar ulaştığı (>5 M NaCl) ve tuz kristalleri üzeri de dahil olmak üzere çeşitli tuz konsantrasyonları aralığında gelişebilirler. Archaea domainine ait üyeler, yüksek ya da düşük sıcaklık, yüksek pH, aşırı tuzluluk gibi ekstrem çevrelerde yaşayabilme kabiliyetlerinden dolayı hipersalin ortamlarda oldukça fazla bulunmaktadır. Farklı tuz gereksinimlerine sahip olan türler genellikle tek bir cins veya aile içinde sınıflandırılmaktadır. En iyi ekstem halofiller, Archaea domainindeki Halobacteriales sınıfı içerisinde yer alan ve sadece halofilik üyelerden oluşan Halobacteriaceae familyasında bulunmaktadır. Dünya üzerinde halofiller; tuz gölleri, tuzlu su kuyuları, tuzlu bataklıklarda, denizlerin derin bölgelerinde, denizden tuz elde etmek için oluşturulmuş yapay tuzlalarda ve fermente balık sosları gibi çeşitli gıda ürünlerinde bulunmaktadır. Halofil mikroorganizmalardan elde edilen karotenoidlerin kırmızı-turuncu renge sahip olması toksik etkisi bulunmayan, renkli, kokulu, yüksek antioksidan özelliklerine sahiptirler. Hayvan yemleri, gıda boyası, meyveli içecek gibi pek çok çeşitli üretiminde renk verici özelliği kullanılmaktadır. Günümüz sanayisinde özellikle içecek ve hayvan yemlerinde kullanılması kırmızı rengine sahip olması ve doğal ürün pazarında yer alması tüketimini arttırmaktadır [1].

Karotenoidler, çevremizin pek çok yerinde yaygın bulunan doğal pigmentlerdir. 600'den fazla doğal karotenoid tanımlanmıştır ve bilinen karotenoid yapılarının sayısının şu anda çok daha fazla olması muhtemeldir. Parlak renklerden (sarı, turuncu, kırmızı veya mor) kolaylıkla tespit edilirler. Karotenoidler, bakteriler, algler, mantarlar ve bitkiler tarafından biyosentezlenen, ancak onları yiyeceklerinden elde etmesi gereken hayvanlar tarafından yapılmayan terpenoid bileşiklerdir. Karotenoidler bakteri, alg ve bitkilerin fotosentetik zarlarında iki temel biyolojik işlevi yerine getirir: ışık enerjisi toplama ve ışıktan koruma özelliklerine sahiptirler [2].

Karotenoidler gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde renklendirici ve antioksidan olarak kullanılabilen bileşiklerdir. İnsan sağlığına fayda sağladıkları için, mikrobiyal olanlar da dahil olmak üzere doğal karotenoid kaynakları bulmak için büyük gayrette bulunulmuştur. Karotenoid verimini artırmak için kültür koşullarının uygun optimizasyonu, mikroorganizmalar tarafından karotenoid üretiminin yüksek maliyetini

düşürmek için kullanılan stratejilerinden biridir. Halofilik arkealar, kültür koşullarına göre karotenoid üretebilir. Karotenoid, hücre zarı takviyesi görevi gördüğü ve mikroorganizmayı DNA'ya zararlı ajanlara karşı koruduğu için önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Dahası, halofilik arkelerden elde edilen karotenoid özütleri, yüksek antioksidan kapasitesi göstermiştir. Karotenoidin gıda sanayisi dışında, ilaç ve yem sanayilerinde de renklendirici olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Halofil mikroorganizmalardan çıkarttığımız ve doğal kırmızı-turuncu renk bulunduran karotenoidin üretim miktarı ilgi uyandırmaktadır. Antioksidan özellikten dolayı serbest radikallere karşı etki ederek farmasötik olarak kullanım alanına da sahip olmaktadır. Karotenoidin geniş yelpazede sahip olduğu kullanım alanları özellikle yakın günümüzde 15-20 senedir pozitif yönde kullanımı ilerlemektedir [2-3].

Karotenoid pigmentlerinin önemli işlevlerinden başlıca A vitamininin temel bir besin maddesi olarak sağlık kısmı göz önüne alındığında klinik önemi giderek daha açık hale gelmektedir. A vitamini aktivitesine sahip olduğu karotenoidler renkli meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. Mevcut tıbbi araştırmaların ana karotenoidleri arasında karotenler, likopen, lutein ve zeaksantin bulunur ve bu pigmentlerin çeşitli kanser, kalp-damar rahatsızlıklarına ve yaşa bağlı oluşmakta olan göz rahatsızlıklarına iyi geldiği ve bağışıklığımızı arttırdığı araştırmalar sonucunda gösterilmektedir. Karotenoidler, sebzeler aleminde yaygın olarak bulunur ve insanlar da dahil olmak üzere sebze tüketen hayvanlar tarafından kolaylıkla biriktirilir. Karotenoidlerin oksidatif parçalanması oksijen, sıcaklık, ışık ve su aktivite etkileri sonucu meydana gelebilmektedir. Burada okside olan konjuge çift bağların kırılması sonucu çift bağların zayıflamasına ve zayıflayan çift bağların renk yoğunluğu miktarının azalmasına neden olan oksijen faktörü görülebilmektedir. Ayrıca pigmentin gelişiminde ışık faktöründe göz önüne alındığında metabolizmayı olumsuz yönde etkileyerek karotenoid fonksiyonunun yapısını değiştirmektedir [3-4].

Ortam koşullarında bulunan nem faktörü de karotenoidlerin yapısal fonksiyonlarının uygunluğunu muhafaza ederek önemli bir rol üstlenmektedir. Karotenoidlerin (%10- %14) değerlerinde artan nem koşullarında parçalanma biriminin azaldığı fakat (<% 8) değerlerinde düşük nem koşullarında parçalanmasının yükseldiği görülmektedir. Ortam koşullarında bulunan nem değerlerinin serbest radikaller üzerinde dolaylı yünden etkisi bulunmakta serbest radikal değerlerini düşürmekte ve

karotenoidlerin yapısal fonksiyonlarında meydana gelebilecek olası oksidasyonun önüne geçebileceği veya yavaşlatabileceği belirlenmiştir [5].

Günümüzde karotenoidin ekstraksiyonunda ve saflaştırılmasında temel sorun, verimin ve saflığın düşük olması olarak görülmektedir. Ayrıca çok az halobakteri suşu yüksek verimde karotenoid üretebildiği için, karotenoidin üretiminde temel mikroorganizma olan ve bir halobakteri türü olan *Haloferax alexandrinus*'a alternatif mikroorganizma tespiti araştırmacıları yeni ve verimli suş elde etmeye yönelmektedir. Yapılan çalışmalarda karotenoidin saflaştırılması için çeşitli yöntemler geliştirilmiş bulunmaktadır [3-4].

Karotenoidler, insan diyetinde meyve ve sebzelerin mikro bileşenleri olarak bulunan renkli tonlara sahip (sarı, turuncu ve kırmızı) bitki pigmentlerinden oluşmaktadır. Karotenoid içeren besinleri tüketen insanlar, oluşabilecek sağlık sorunlarını da hafif düzeylere indirebilmektedir. 1980'den itibaren hem epidemiyolojik hem de deneysel çalışmalardan elde edilen çalışmaların sonuçlarında provitamin A aktivitesine sahip yaygın gıda karotenoidlerinin kanserinin başlamasını önleyebileceği üzerindeki çalışmalar yapılmıştır [6].

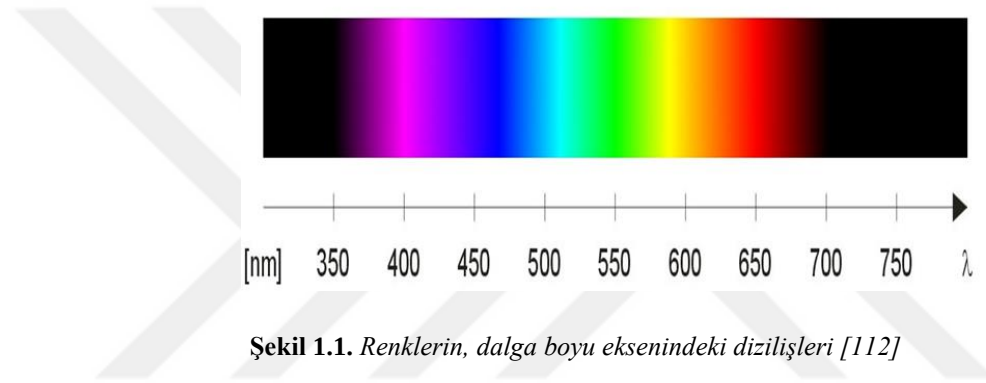
Bu çalışmada; *Haloferax alexandrinus*'un alternatif üretim ortamlarında pigment artışını araştırmak için uygulanan çeşitli parametreler sonucu pigmenti saflaştırılıp SH-SY5Y nöroblastom hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. *Haloferax alexandrinus*'un pigment üretimleri farklı besiyeri ortamlarında karşılaştırıldı. İnkübasyon ortamında üretimin miktarını yükseltmek amacıyla bazı parametre değerleri değiştirilerek aydınlık ve karanlık koşullarda farklı pH, sıcaklık ve inkübasyon zamanları kullanılarak mikroorganizma için en uygun parametreler değerlendirilip gelecek çalışmalar için pozitif olabileceği bulgusu değerlendirilmiştir [7].

1.1. Pigment Nedir?

Biyoloji dilindeki terminolojide pigment kelimesinin hücre granüllerinde oluşan ve dokuların içinde depolanan hayvan ve bitkilerde yaygın olarak bulunan bir renk maddesi olduğunu söyleyebiliriz. Bütün doğal ve yapay katmanlara “pigment” adı verilir.

Latince kökene sahip pigment kelimesi renkli cisimleri belirtmek amacıyla kullanılmıştır. Işığın meydana getirdiği enerji dağılmasıyla kırılır ya da yansır ve ortaya çıkan bu enerjinin beyin organımızda algılanmasıyla renk algısı oluşmaktadır.

Pigmentin tanecik büyüklüğü azaldıkça pigmentin; rengi kısa dalga boyuna doğru kayar. Renk şiddeti artar. Saydamlığı artar, örtücülüğü azalır. Renklerin içindeki tüm aşamalarda ışıkların etkisi vardır. Pigmentlerle ışıklar arasında da bağlantı vardır (Şekil 1.1.)’de gösterilmiştir. Ostwald diyagramında yer alan birbirlerini tamamlayan renkler (Tablo 1.1.)’de gösterilmiştir. Güneş ışığı, canlılardaki renkler veya pigmentler için gereklidir [8].



Şekil 1.1. Renklerin, dalga boyu eksenindeki dizilişleri [112]

Pigment moleküllerinde belli bir enerji söz konusudur. Kimyasal moleküllerden oluşan bir pigmentin temel tanecik büyüklüğünün değişmesi de birçok pigment özelliğini etkiler.

Tablo 1.1. Ostwald diyagramında yer alan birbirlerini tamamlayan komplementer renkler [10]

<i>Dalga boyu aralığı</i>	<i>Absorblanan renk</i>	<i>Yansıyan renk</i>
400-435	<i>Mor</i>	<i>Yeşil-Sarı</i>
435-480	<i>Mavi</i>	<i>Sarı</i>
480-490	<i>Mavi-Yeşil</i>	<i>Turuncu</i>
490-500	<i>Yeşil-Mavi</i>	<i>Kırmızı</i>
500-560	<i>Yeşil</i>	<i>Kırmızı-Mavi</i>
560-580	<i>Yeşil-Sarı</i>	<i>Mor</i>
580-595	<i>Sarı</i>	<i>Mavi</i>
595-605	<i>Turuncu</i>	<i>Mavi-Yeşil</i>
605-700	<i>Kırmızı</i>	<i>Yeşil-Mavi</i>

Pigmentler amorf ve belli kristal yapıda olabilir. Üretim parametreleri bazı moleküllerde kristal bozukluklarına veya birden fazla kristal örgünün ortaya çıkmasına yol açabilir. Bunun sonucu olarak da pigmentte renk değişiklikleri ve parlaklık değişimi ortaya çıkabilir. Pigmentlerin renk özelliklerini, öncelikle pigment molekülünün kimyasal yapısında yer alan renk verici gruplar (kromofor gruplar) ve yardımcı renk grupları (oksokrom gruplar) belirlemektedir [8].

Milat'tan önce 1900-2600 yılları arasında İndus vadisi uygarlık dönemlerinde elbiselerin iplik ve bez kısımlarının boyanmasında rol oynamış kök boyasının izleri kullanılmıştır. Boyaların dönemler arasında çoğu yerde kullanılmakta olduğu bilinmekte ve boyama sanatının çok öncelerden beri kullanıldığı gerçeğini göz önüne koymaktadır. Boyalar Avrupa'da değişik dönemlerde özellikle Bronz çağı boyunca kullanılmıştır. 2600 yılında doğal boyaların ilk kullanımı Çin'de görülmüş ve kayıt altına alınmıştır [9]. Pigmentler tüm canlı maddelerde bulunur ve çekici renkler sağlar ve organizmaların gelişiminde temel roller oynar. Çoğu hayvan gibi insan da çevresiyle renk yoluyla temas eder ve renk özelliklerine göre nesneler kabul eder veya etmez. Pigment aslında gözdeki özel pigmentlerin bir tepkimesidir. Pigment, gelen ışığın dalga boyunu beyinden yayılan elektrik sinyallerine çevirerek beyne iletir. Beyin de rengi algılar. Çevremizdeki görünür ışığın sahip olduğu enerji seviyesinde, canlıların ciltlerinde, derilerinde, tüylerinde, kürklerinde, pullarında veya yüzeylerinde küçük pigmentlere sahip olduğunu görürüz. İhtiyaçları olan renklere gelen ve görünür ışığın içinde olan dalga boyları bu pigmentleri geçirerek canlıların üzerinde renklerin oluşumunu sağlar [10].

18.yüzyılda ticaret yollarının açılması, teknoloji ve bilimdekilerle geliştiğinde, daha fazla deneye izin verdi. 1704'te Almanya renk Johann Jacob Diesbach, laboratuvarından Prus mavisini yarattı. Bu, kimyasal olarak sentezlenen ilk renk oldu. 19. yüzyılda yeni pigmentlerin patlaması, metal borunun icadı ve demiryollarının gelişi bu hareketi hızlandırmak için bir araya geldi. Taşınabilir, sabit tüplerdeki parlak yeni renkler ve ülke çapında kolay bir seyahat yöntemi, dünyanın en güzel tablolarından bazılarının ortaya çıkmasına yardımcı oldu. Günümüzde modern teknolojiye rağmen, eski çağlardan bugüne insanların özellikle mağara sanatçıları tarafından kullanılan doğal pigmentler, organik bileşiklerin bir karışımı olmaya devam ediyor. Ticari açıdan daha fazla tercih edilerek kullanımı yaygınlaşınca doğal lifler, kürk ve deri gibi farklı amaçlar dahilinde kullanıldı. 1856 yılında Perkin tarafından daha ucuz, kullanışlı sentetik pigmentlerde

ortaya çıkmıştır. Sentetik pigmentler ise kâğıt, tekstil, pillerde ve saç renklendiricilerinde kullanılmaya başlanmıştır [11].

Pigmentler, farklı endüstrilerde kullanılan (gıda, hayvancılık, boya) endüstrisinde önemli bileşiklerdir. Sentetik olarak da üretilebilseler de genel olarak doğal pigmentler tercih edilmektedir. Pigmentler, ışığı emebilen ve belirli bir rengin gösterilmesinden sorumlu olan bileşiklerdir. Çeşitli canlılar tarafından doğal pigment kaynağını meydana getirirler. Böcekler, bitkiler, mikroplar doğal pigmentlerin kaynağıdır. Bununla birlikte mikroorganizmalar, stabilitesi, mevcudiyeti, üretkenliği, kolay sonraki işleme süreci ve verimi nedeniyle pigment üretiminde muazzam bir potansiyele sahiptir. Mikrobiyal pigmentler, sadece gıda, plastik, tekstil, boya, baskı ve kâğıt gibi endüstrilerde renklendirici olarak kullanılmaları nedeniyle değil, aynı zamanda antimikrobiyal, antioksidan, antikanser ve çeşitli biyolojik özelliklere sahip olmaları nedeniyle mevcut araştırmalarda daha fazla ilgi kazanmıştır [12].

1.2. Pigmentlerin Sınıflandırılması

Pigmentler sınıflandırma yapılırken farklı özellikleri dikkate alınarak yapılmıştır. Bir gıda maddesinin renginin güzel görünümlü ve göze hoş gelen bazı estetiksel olarak görünümlü ve tazeliğini ve güvenliğini göstermesi açısından önemlidir. Doğal kaynaklardan üretilen pigmentlerin renklendirilme çalışmalarında son yıllarda dünya çapında ilgi görmekte ve önem kazanmaktadır. Bu pigmentler, istenmeyen pazar nedeniyle sentetik olanların yerine doğal bir gıda boyası olarak güvenli kullanımları için aranmaktadır. Besin ve lezzet açısından zengin bir besin ögesi olması tüketimini artırmaktadır. Doğal bileşiklerin sağlığa olumlu faydalarının bilinmesi nedeniyle bu tür bileşiklerin doğal kaynaklarına olan talep her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle renklendiricilerin gıda endüstrisinde kullanımı çeşitli doğal kaynaklarını ve potansiyellerini araştırmakla mümkündür. Birçok doğal renk mevcut olmasına rağmen, mikrobiyal renklendiriciler, üretimi ve kolay akış süreci nedeniyle gıda renklendirme maddesi olarak önemli bir rol oynamaktadır. Doğal gıda renklendiricilerinin mikrobiyal fermantasyon yoluyla endüstriyel üretimi, daha ucuz üretim, daha kolay ekstraksiyon gibi iyileştirme yoluyla daha yüksek verim elde edilmektedir [13].

1.2.1. İnorganik pigmentler

İnorganik pigmentler karbon zincirlerine ve halkalarına dayalı değildir. Bunun yerine kuru öğütülmüş minerallerden, genellikle metallerden ve metalik tuzlardan oluşurlar. Bileşimleri nedeniyle, inorganik pigmentler genellikle organik pigmentlerden daha opak ve daha çözünmezdir. Genel olarak, inorganik pigmentler endüstride en yaygın olarak kullanılanlardır ve ışık haslıkları ve düşük maliyetleri nedeniyle tercih edilirler. İnorganik pigmentler, endüstride çeşitli nedenlerle popüler bir seçim olma eğilimindedir, ancak dezavantajları vardır. İnorganik pigmentler genellikle metal oksitler ve/veya sentetik kimyasallardır, bunların bazıları bileşim olarak çok basittir ancak boya ve kaplamalarda geniş kullanım alanı bulur. İnorganik pigmentlerin bir avantajı, ışığa maruz kaldıklarında solmaya karşı mükemmel dirençleridir. Ayrıca açık havaya ve ısıya maruz kaldıklarında solmaya karşı daha dirençli olma eğilimindedirler. İnorganik pigmentler, özellikle endüstriyel uygulamalar için ihtiyaç duyulan büyük miktarlarda, daha ucuza üretilir [14].

1.2.2. Sentetik pigmentler

Gıda renklendiricileri veya renk katkı maddeleri olarak da bilinen sentetik pigmentler, gıdayı tüketicinin gözüne daha çekici kılan ve gıda veya içeceğe eklendiğinde doğal renk değişimlerini telafi eden herhangi bir boya, pigment veya maddedir. Sıvılar tozlar, jeller ve macunlardan oluşan birçok formda gelirler. Sentetik pigmentlerde farklı üretim ve koşullarda kullanılmaktadır [16].

1.2.3. Doğal pigmentler

Organik pigmentler karbon zincirlerine ve halkalara dayanır. Bazıları stabilizatör olarak inorganik elementler içerirken, organik pigmentler öncelikle bu faktör tarafından tanımlanır. Bu güçlü karbon zincirleri onları oldukça kararlı hale getirir. Karbon bazlı pigmentler hayvanlardan, sebzelerden veya sentetik organik kimyadan elde edilir. Geleneksel pigmentler tipik olarak flora ve fauna kullanılarak oluşturulurken, modern pigmentlerin çoğu sentetik organik kimya ile oluşturulur. Sentetik organik pigmentler en yaygın olarak kömür katranı ve diğer petrokimyasallar dahil olmak üzere aromatik hidrokarbonlardan türetilir [15].

Organik pigmentler, parlak, zengin renkler ile karakterize edilir. Şeffaflıklarına rağmen genellikle güçlü renk tonu gücü sağlarlar. Organik pigmentlerin, özellikle sentetik organik pigmentlerin üretilmesi daha pahalı olma eğilimindedir. Sentetik pigmentler üretmek için çok fazla kimyasal işlem gerektirir ve bu da hacim olarak maliyeti artırır. Birçok farklı organik pigment çeşidi vardır, ancak çoğu ışığa maruz kaldığında zayıf bir şekilde tutunma eğilimindedir. Bazıları ışığa ve ısıya maruz kalmaya iyi dayanabilirken çoğu zamanla bozulmaya uğramaktadır [15].

1.2.3.1. Bitki pigmentler

Bitkiler, gördüğümüz çeşitli renkleri ortaya çıkaran birçok pigment içerir. Çiçekler ve meyveler, ışığı emen çok sayıda organik molekül içerir. Yapraklar, gövdeler ve kökler de çeşitli pigmentler içerir. Bu tür pigment molekülleri arasında antosiyaninler flavanoidler, flavinler, kinonlar ve sitokromlar sayılabilir. Ancak bunların hiçbiri fotosentetik pigment olarak kabul edilmemelidir. Fotosentetik pigmentler, güneş ışığından gelen enerjiyi absorbe etme ve fotosentetik aparat için kullanılabilir hale getirme yeteneğine sahip olan pigmentlerdir [17].

1.2.3.2. Hayvansal pigmentler

Hemen hemen tüm bitkiler kendi pigmentlerini sentezler; hayvanlar ya bitki besinlerinden pigment elde ederler ya da bunları kendileri sentezlerler. Başlıca hayvan pigmentleri, kan hemoglobininin hemleri (kırmızı), karotenler, melaninler (siyah ve kahverengi) ve guanindir (beyaz ve yanardöner). Son üçü, çoğu hayvanın yüzey rengini üretir. Pigmentler sadece dış renklenme sağlamakla kalmaz, aynı zamanda bazı önemli fizyolojik süreçlerde de işlev görür. Gözün retinasında pigment hücreleri (çubuklar ve koniler) giren ışığı ayarlar veya düzenler. Diğer işlevleri arasında karoten, vitaminlerin ve klorofilin sentezinde çalışır. Klorofil bitki fotosentezi için gereklidir. Kandaki hemoglobin, solunum için oksijen taşır. Klorofil ve hemoglobin, her ikisi de pirol pigment grubuna ait olan yapısal olarak oldukça benzerdir. Hayvanlar aleminde boya sentezleme yeteneği bitkilerdekinden daha az gelişmiştir. Ancak, özellikle kuşlarda ve böceklerde, pigment renk yelpazesini tamamlayan yapısal renkler vardır. Hemen hemen tüm hayvanlar melanin sentezleyebilir. Memelilerin kürkleri, kuşların tüyleri, birçok böceğin

dış iskeletleri ve kelebek kanatlarındaki siyah alanlar melanin ile renklendirilir. Böcekler arasında kelebekler renkleri nedeniyle dikkat çekicidir. Kanatlardaki pullardaki boyalar veya pigmentler ile siyah, kahverengi, kırmızı, turuncu ve sarı üretilebilir. Kelebek kanatlarındaki mavi ve yeşil hemen her zaman lekesiz oluşan yapısal renklerdir. Hayvanların karotenoidleri genellikle bitkisel gıda karotenoidlerinin dönüşüm ürünleridir. Pek çok kuş tüyünün (flamingolar gibi) ve uğur böceği kabuğu, Colorado böceği ve diğer birçok böceğin sarıdan kırmızıya renginden sorumludurlar [21].

1.2.4. Mikrobiyal Pigmentler

Mikroorganizmalar, halihazırda karotenoidler ve antosiyaninler gibi endüstriyel olarak faydalı doğal renklendiriciler üretmektedir. Mikrobiyal gıda renklendiricileri, nispeten düşük maliyetlerle ölçekte üretilebilir. Çeşitlendirilmiş renklendirme özelliklerinin seri üretimi için bakteri pigmentlerinin potansiyeli ilk önce ileriye dönüktü ve şimdi hem araştırmacıların hem de endüstrilerin kayda değer önemini ve dikkatini çekiyor. Literatür, mikroplardan üretilen doğal renklendiricilerin gıda ve ilaç ürünlerinde başarıyla uygulandığını ortaya koymaktadır. Bakteriyel pigmentler, gıda renklendiricileri olarak hizmet etmenin yanı sıra, büyük ekonomik potansiyele sahip anti-mikrobiyal, anti-kanser, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-alerjik özellikler gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahiptir ve bitkisel kaynaklara kıyasla bakteri kaynaklarından her mevsim kolay ve ucuz doğal renklendirici üretimi için geniş bir kapsam vardır. Mikroorganizma ve mikroalg üreten pigmentler doğada oldukça yaygındır. Mikroorganizmalar, bulunabilirlik açısından bitkilere göre avantajları nedeniyle pigment üretimi için potansiyel bir kaynak olarak bilinirler [22].

1.2.4.1. Bakteriyel pigmentler

Çevre dostu ve toksik olmayan bakteriyel pigmentler, gıda, ilaç, tekstil ve kozmetikte yavaş yavaş sentetik renklendiricilerin yerini almaktadır. Bakteriyel pigmentler, çok sayıda uygulamada kullanılan mevcut renk paletini büyütebilir. Bakteriyel pigmentler güvenli kabul edilir ve insan sağlığına fayda sağlayacak ve ekosistemi kurtaracak doğal renklendiriciler olarak kullanılabilir. Bakteriler arasında pigment üretimi oldukça değişkendir, ancak genellikle Actinobacteria'da bulunur [23].

1.2.4.2. Fungal pigmentler

Fungusların sekonder metabolitleri kısmında bulunan pigmentler ticari pazar olarak yer almaktadır. Mantarların doğal pigmentlerin iyi ve kolayca bulunabilen bir alternatif kaynağı olduğu gösterilmiştir. Mantarlar, mevsimden bağımsız pigment üretimi, ucuz bir kültür ortamında kolay ve hızlı büyüme, farklı renk tonlarına sahip pigmentlerin üretimi ve daha kararlı, çözünür pigmentler ve kolay işleme gibi bitkilere göre çok büyük avantajlara sahiptir. Mantar kolonileri tarafından üretilen pigmentler, 19. yüzyıldan beri mikologlar arasında ilgi uyandırmıştır ve gıda sınıfı pigmentlerin üretimi için bir mikrobiyal rezerv olarak kabul edilebilir. Mantarların, melaninler, antrakinonlar, hidroksiantrakinonlar, azafilonlar, karotenoidler, oksopolien, kinonlar ve naftokinon gibi çeşitli sınıflardan metabolitleri içeren çok çeşitli pigmentler ürettiği bilinmektedir [24].

1.3. Mikroorganizmalardan Pigment Üretimi

Son yıllarda doğal ürünlere yönelik güçlü tüketici talebi nedeniyle, sentetik renklendiricilerin doğal pigmentlerle değiştirilmesine yönelik artan bir eğilim olmuştur. Doğal pigmentler ve sentetik boyalar, gıda üretimi, tekstil endüstrileri, kâğıt üretimi, tarımsal uygulamalar ve araştırmalar, su bilimi ve teknolojisi gibi günlük yaşamın çeşitli alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal pigmentler sadece ürünlerin pazarlama bilirliliğini artırma kapasitesine sahip olmakla kalmaz aynı zamanda antioksidanlar ve antikanser ajanlar olarak avantajlı biyolojik aktiviteler sergilerler. Sentetik pigmentler ise önemli ölçüde çevre kirliliğine ve olumsuz toksikolojik yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, gıda sınıfı renklendiricilerin çeşitli doğal kaynaklarını ve bunların kullanım potansiyellerini araştırmak esastır. İşlenmiş gıdalarda mikrobiyal pigmentlerin kullanımı, büyük ekonomik potansiyele sahip umut vaat eden bir alandır. Bununla birlikte, mikrobiyal pigmentler, yüksek maliyet, daha düşük stabilite ve pH'daki değişikliklerden dolayı renk tonlarındaki değişiklik nedeniyle daha geniş imkanlar sunmaktadır [12].

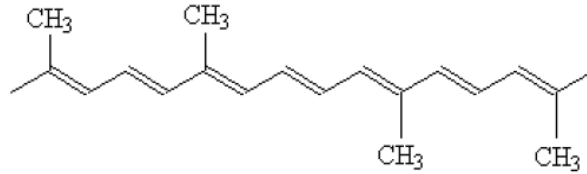
Mikroorganizmaların yüksek hızda üreme kapasiteleri olması nedeniyle, çeşitli ekstaksiyon ve yöntemler ile düşük ekonomik fırsat olduğundan güçlü bir kaynak model üzerinden kullanımları önemli derecede önem sarf etmektedir. Mikrobiyal kaynaklı pigmentlerin günümüzde çok fazla değerlendirildiği görülmektedir. Literatürde bulunan çalışmalar arasında pigment üretiminin mikroorganizmalardaki ürün eldesi göz önüne

alındığında biyolojik kaynaklar içerisinde yer alan önemine göre büyük potansiyel olarak kullanımı artmaktadır [25].

Doğal olarak oluşan mikrobiyal pigmentlerden bazıları;

1.3.1. Karotenoidler

Karotenoidler, esas olarak bitkilerde üretilen biyoaktif bileşiklerdir ve önemlidir. Karotenoidler, bitkiler, algler ve fotosentetik mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, doğal olarak oluşan yağda çözünen pigmentlerin bir ailesidir. Karotenoidlerin genel yapı modeli beş karbonlu olması ve sekiz izoprenoid modülünün (Şekil 1.2.)’de birbiri ardına dizilmesi ile oluşan 40 karbonlu bir merkezi iskelet yapısından meydana gelmektedir. Karoten gruplarına (örneğin, β -karoten likopen) ait 700’den fazla karotenoid ve bunların hidroksillenmiş türevleri içeren ksantofiller (örneğin, lutein, zeaksantin , astaksantin) gösterilmektedir. Karotenoidler, steroidler ve giberellik asit gibi çeşitli diğer önemli doğal maddelerle birlikte genel izoprenoid biyosentetik yoldan türetilir. Tüm izopren türevlerini sentezlemek için gereken başlangıç ürünü, fosforilasyon üzerine fosforile edilmiş bir izoprene dönüştürülen mevalonik asittir; bu izopren daha sonra polimerleşir. Polimerizasyon sırasında çift bağların sayısı ve konumu sabitlenir [26].

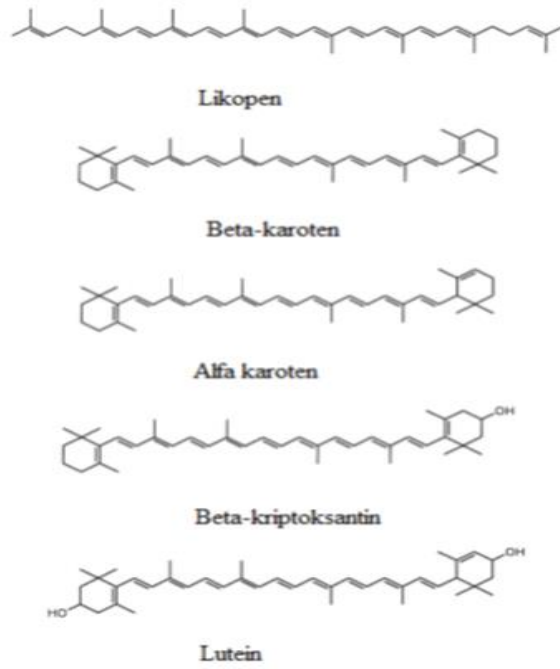


Şekil 1.2. Karotenoidlerin poliizoprenoid yapısı [26]

Karotenoidler, mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunan doğal pigmentlerdir. Polar olmayan karotenoidler olarak karotenler (β -karoten, α -karoten ve likopen) ve polar karotenoidler olarak ksantofiller (astaksantin, lutein, β -kriptoksantin ve zeaksantin) dahil olmak üzere iki ana karotenoid grubu vardır. Karotenoidler ayrıca provitamin A (β -karoten, β -kriptoksantin ve α -karoten) ve provitamin olmayan A (likopen, lutein, astaksantin ve zeaksantin) olarak sınıflandırılır. Doğada çeşitli işlevlere sahip 600

karotenoid bulunmuştur, bununla birlikte insan diyetinde sadece yaklaşık 50 karotenoid vardır [5-6].

Sığır sütünde ana karotenoid β -karotendir ve somon balığı ve kabuklularda astaksantin (AST) ve kantaksantin önemli karotenoidlerdir. Karotenoidlerin çoğu, C40 hidrokarbonlara sahip tetraterpenoidlerdir. Karotenoidler, uzun konjuge zincirli, birkaç çift bağlı ve merkezi çift bağlarında simetrik bir poliizoprenoid yapıya sahiptir. Biyolojik uygulama açısından karotenoidler, bazıları insan sağlığında önemli bir rol oynayan antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik gibi farklı fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Karotenoidler, doğada en bol bulunan pigmentler olduklarından, deniz kaynaklı karotenoidlerin yapısal olarak karasal ortamlarda bulunanlardan farklı olması nedeniyle artan bir ilgi görmüştür. Gıdalarda yaygın olarak bulunan bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları (Şekil 1.3.)’de görülmektedir.



Şekil 1.3. Gıdalarda yaygın olarak bulunan bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları [27]

Halofilik mikroorganizmalarda bakteriuberin, C50 karotenoidlerinin ana temsilcisi olarak kabul edilir. Birkaç kırmızımsı gıda ürünü, kırmızı Archaea ve birçok bitkideki sarı ve kırmızı renklerden sorumlu bir grup ve yağda çözünen bileşik olan karotenoidlerin, cilt kanseri ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli kronik hastalıkların önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Karotenoidler ayrıca

doğada geniş bir dağılıma sahiptir ve diyet antioksidanları olarak uygulama için önemli bir potansiyele sahiptirler [27-28].

Doğal ortam koşulları içinde karotenoidlerin yapısal fonksiyonlarının korunması gereklidir. Hassasiyetleri yüksektir ve oksidasyona uğramaması için dikkat edilmektedir. Karotenoidler gıda uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek derecede doymamış yapıları, özellikle ağır işleme ve depolama koşulları altında oksidasyon ve termal işlemlerle bozulmaya karşı hassas olmalarını sağlar. Termal bozunmanın bir sonucu olarak karotenoid molekülünün izomerizasyonu, oksidasyonu ve parçalanması meydana gelir. Isıya, ışığa ve oksijene karşı hassastır [52-59]. Karotenoidlerin ekstrakte aşamalarında organik solvent karışımları kullanılması lipofilik bileşikler olduğu için genellikle tercih sebebidir. Karotenoidlerin polaritesi, örnek matriksi ve türüne bağlı olarak kullanılan solvent türü belirlenir. Karotenoid bileşiklerin içeriğine bakılarak çözücü solvent kullanımı en uygun olanının belirlenmesi ve su ile karışabilmesi pozitif yönde kullanımı sağlamaktadır [60].

Karotenoidlerin hassas yapılarından kaynaklı oksijen, ısı ve sıcaklığa karşı duyarlılık toleransı yüksektir. Ortamda bu faktörlere bağlı doğrudan ya da dolaylı şekilde parçalanmalar meydana gelebilmektedir. Karotenoid yapımızın uygun optimal şartlarında muhafaza edilerek bozunmayı en aza indirmek öncelikli amaçlar doğrultusunda olmaktadır [53-61].

Karotenoidlerin bulunduğu ortam şartlarında artan sıcaklık değer parametresi sonucu yapısal formlarında değişikliklere dönüşerek miktar ve renk yoğunluğu olumsuz yönde etkilenmektedir. Trans form yapısının cis forma dönüşmesi bu çalışmayı optimal şartlardan çıkarmaktadır. Aynı zamanda ortam şartlarında artan sıcaklığın karotenoid pigment değerlerini önemli derecede eksilttiği belirlenmiştir [62-63].

Karotenoidlerin yapılarını asit varlığında farklı parametreler oluşturarak olumsuz derecede etkileyebilmekte ve izomerize olabilmektedir. Karotenoid yapılarının alkali ortamda uygun derecede muhafaza edilmesi sağlanmalı ve bazı nötralize bileşimler eklenerek optimal değerlerini koruması ön plandadır ve bu şekilde yapılacak saflaştırma basamakları güzel bir analiz sonucu elde etmemizi sağlamaktadır [64].

Karotenoidler, çeşitli çözücülerin karışım içinde uygulaması sonucu ekstrakte işlemi gerçekleştirilmiş olur. Deneylerdeki çözücüler, numune matrisine ve ilgili

karotenoidlerin nispi polaritesine bağlıdır. Meyve ve sebzelerin yüksek su içeriği nedeniyle, örneğin tam penetrasyonu için aseton ve tetrahidrofuran gibi suyla karışabilen çözücülere ihtiyaç vardır. Aseton, heksan, tetrahidrofuran, dikloroetan ve çeşitli çözücüler yardımıyla ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilir [50-51].

Ekstraksiyon çözücülerinin farklı karotenoidlerin çözünürlüğü ve stabilitelerine göre dikkate alınmaktadır. Lutein gibi polar ksantofiller alkollerde daha fazla çözünürken, β -karoten gibi polar olmayan karotenler hidrofobik çözücülerde daha fazla çözünür. Tetrahidrofuranın çok çeşitli karotenoidleri çözündürmek için en iyi çözücü olduğu gösterilmiştir, ancak peroksit oluşturma eğilimi nedeniyle, genellikle bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) gibi antioksidanlarla birlikte kullanılır. Eterler ayrıca, aktifleştirilmiş alümina yoluyla çözücünün filtrelenmesiyle giderilebilen peroksitler oluşturmaya da eğilimlidir. Heksan ve daha polar aseton gibi çözücülerinde karışımlarda karotenoidlerin çıkarılmasında etkili olmaktadır [54-55].

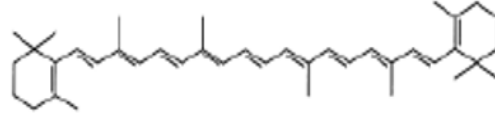
Kromatografik yöntemler, gıda, kan ve doku örneklerindeki karotenoidleri ayırmak, tanımlamak ve miktarını belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Analizden önce karotenoidler ilk olarak numune matrisinden çıkarılmalıdır. Bu bileşiklerin doğal kararsızlığı nedeniyle, doğru analitik sonuçlar sağlamak için bu adımın izomerizasyon, oksidasyon ve bozunmayı en aza indirmesi önemlidir. Karotenoidler yüksek oranda konjuge olup, onları ısı, ışık, oksijen ve metal iyonları tarafından bozulmaya karşı hassas hale getirir. Örneğin, β -karoten, aerobik bir ortamda ultraviyole ve görünür ışık altında hızla bozunur [56-57].

Bu nedenle numuneler loş veya kırmızı ışık altında tutulmalı, solvent gazla (azot, argon veya helyum) buharlaştırılmalı ve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altındaki sıcaklıklarda karanlıkta saklanmalıdır. Karotenoidler, ekstraktlarda genellikle gıda veya biyolojik matrislere göre daha az stabildir ve bu nedenle, bozulmayı önlemek için numuneler ekstraksiyondan hemen sonra analiz edilmelidir [58].

1.3.1.1. Beta-karoten

Haloferax alexandrinus suşundan beta karoten üretildiği bilinmektedir. Beta karotenin içerdiği pigmentin renklendirici olarak kullanımı Avrupa Birliği komisyonu tarafından kabul görmüştür. Beta-karoten kırmızı, turuncu ve sarı renk pigmentlerinden

oluşur. Moleküler yapısı (Şekil 1.4.)’te gösterilmektedir. Genellikle sebze ve meyvelerde bulunan yağda çözünen bir doğal pigmentdir.



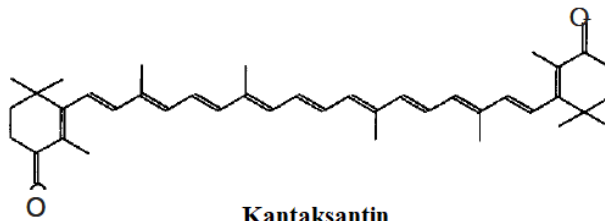
Beta-karoten

Şekil 1.4. Beta-karoten moleküler yapısı [30]

Beta-karoten, vücutta eksik olduğunda A vitaminine dönüştürülür. Beta-karoten hücrelere zarar verebilecek aktif oksijen moleküllerinin etkisini engelleyen bir bileşik olan bir antioksidandır [29].

1.3.1.2. Kantaksantin

Kantaksantin, ksantofil grubuna ait kırmızı-turuncu rengine sahip bir karotenoiddir. Bu doğal olarak oluşan pigment, bakteri, alg ve bazı mantarlarda bulunur. Kantaksantin, gıda boyası maddesi, fotokoruyucu, bronzlaştırıcı bir madde ve cildi koyulaştırmak için kullanılan bir pigment maddesi olarak kullanılır. Kantaksantin ayrıca flamingo tüylerinin, koi sazan derisinin ve deniz kabuğu gibi kabukluların üzerinde etkisi görülmektedir. (Şekil 1.5.)’te moleküler yapısı görülmektedir.



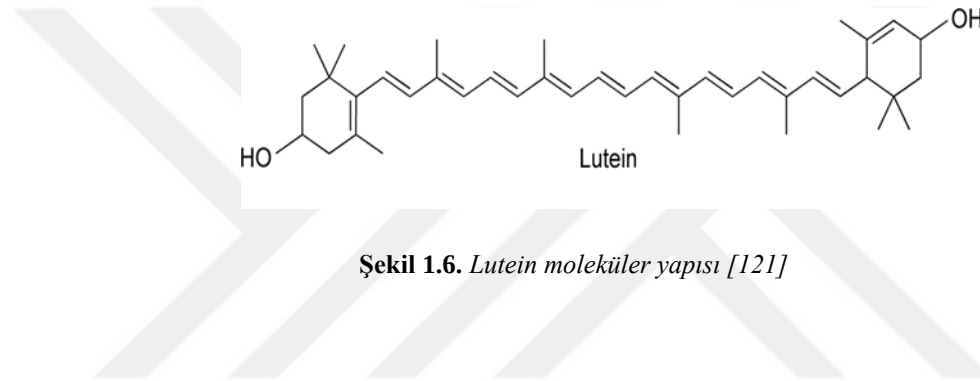
Kantaksantin

Şekil 1.5. Kantaksantin moleküler yapısı [30]

Kantaksantin, kümes hayvanlarında (etlik piliçler, yumurta tavukları) yem katkı maddesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Kantaksantin, toplam sentez yoluyla elde edilebilir. Gıdaların kantaksantin aracılı rengi, tüketiciler için önemli bir kalite kriteridir [30].

1.3.1.3. Lutein

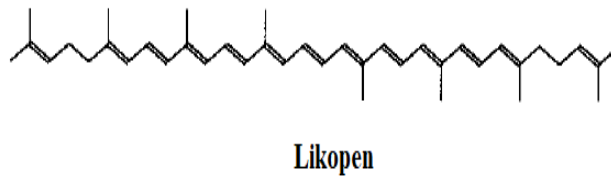
Bir ksantofil bileşik olan lutein görme organının fizyolojik işlevinden sorumludur. Lutein doymamış polienik hidrokarbonlara aittir ve β -iyon halkalarında 40 karbon atomlu karbon zincirini ve 2 hidroksil grubunu oluşturan 8 izopren kalıntısından oluşur. Lutein'in ana kaynakları, yeşil yapraklı sebzeler ve turuncu-sarı meyve ve sebzeler, örneğin, lahana, lahana, ıspanak veya avokado ve ayrıca bitki beslemesinin bir sonucu olarak yumurta sarısı ve yumurta ürünleridir. Lutein moleküler yapısını (Şekil 1.6.)'da gösterilmiştir. İnsan vücudunda, lutein serbest radikallerle reaksiyona girer ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu ve katarakt gibi yaşa bağlı görme bozukluğunun profilaksisinde esastır [31].



Şekil 1.6. Lutein moleküler yapısı [121]

1.3.1.4. Likopen

Likopen, karotenoid ailesindeki bir C40 izoprenoid bileşiğidir. Anti-oksidatif ve anti-kanser aktiviteleri nedeniyle likopen, besin takviyeleri, farmasötik ve kozmetik ürünler için yaygın olarak kullanılmaktadır. Likopen üretimi için geleneksel yöntemler, bitkilerden doğrudan ekstraksiyon, kimyasal sentez ve mikrobiyal fermentasyonu içerir. Bu yöntemler arasında likopenin mikrobiyal üretimi daha ekonomik ve sürdürülebilirdir. Son zamanlarda metabolik mühendislik tekniklerinin ve sentetik biyolojinin gelişmesiyle birlikte likopen pigmentininde aşırı üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.7.).

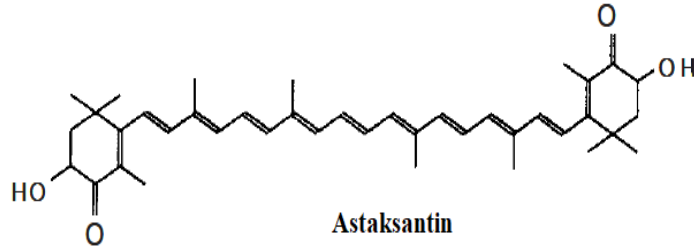


Şekil 1.7. Likopen moleküler yapısı [30]

Halofilik arkeler, Archaea alanına aittir ve yüksek tuz koşullarında hayatta kalan benzersiz mikroorganizmalardır. Birçok Haloarchaeal tür; β -karoten, likopen, astaksantin gibi karotenoid ailesinin bileşiklerini ve ayrıca bakteriuberin ve başka türevlerini üretme yeteneğine sahiptir. Özellikle karotenoid üretimi için çeşitli avantajlara sahiptirler. Yüksek tuz toleransı, steril olmayan koşullar altında haloarchaea yetiştirmeyi mümkün kılar ve böylece enerji maliyetini düşürür. Ek olarak, haloarchaea'dan karotenoid ekstraksiyonu işlemi, hücre lizisi düşük sodyum klorür (NaCl) durumunda gerçekleştiğinden nispeten basittir. Sonuç olarak, Haloarchaea karotenoidler için alternatif bir üretici olarak kabul edilir [32].

1.3.1.5. Astaksantin

Astaksantin pigmenti gıda boyası maddesi, kümes hayvanları endüstrisi ve su ürünleri yetiştiriciliği için doğal yem katkı maddesi olarak, özellikle somon, alabalık ve karides kültüründe yem takviyesi olarak kullanımına artan bir ilgi vardır. Astaksantin moleküler yapısı (Şekil 1.8.)'de gösterilmektedir. Astaksantin'in kültür balıkçılığı endüstrisinde kullanımı, pigmentasyon ve tüketici çekiciliği açısından değil, aynı zamanda yeterli büyüme ve üreme için temel bir besin bileşeni olarak önemlidir [33].



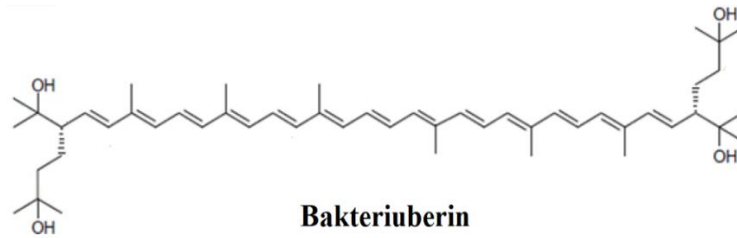
Şekil 1.8. Astaksantin moleküler yapısı [30]

Dünya pazarlarının çoğunu kapsayan sentetik pigmente alternatif olarak astaksantin'in doğal kaynaklarının (yosun, maya ve kabuklu yan ürünleri) tanımlanması, üretimi ve kullanımı üzerinde de birçok çalışma yapılmıştır. Üstün antioksidan aktivitesiyle bağlantılı benzersiz bir yapıya sahip kırmızı-turuncu rengine sahip karotenoid olarak astaksantin umut verici ve çok hedefli bir kullanım alanı barındırmaktadır [34].

Astaksantin iki karbonil grubuna, iki hidroksil grubuna ve on bir konjuge etilenik çift bağa sahiptir. Her iyonon halkası üzerindeki hidroksil ve keto parçalarının varlığı esterleşme yeteneği ve diğer karotenoidlerden daha yüksek bir antioksidan aktivite ve daha polar bir yapı gibi benzersiz özelliklerinden bazılarını açıklar. Astaksantin, elektron vererek onları daha kararlı ürünlere dönüştürmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek ve çok çeşitli canlı organizmalarda serbest radikal zincir reaksiyonunu sonlandırarak güçlü bir antioksidan görevi görebilir [35].

1.3.1.6. Bakteriuberin

Bakteriuberin, birkaç Halobacterium ve Haloarcula türünde bulunan kırmızı-turuncu renkli bir pigment olan bir C50 karotenoiddir. Bakteriuberin, on üç konjuge karbon-karbon ünitesi ve terminal uçlardan kaynaklanan dört hidroksil grubu ile birincil konjuge izoprenoid zincirinden oluşan bir C50 karotenoiddir. Hücre zarının akışkanlığını artırır ve güçlü antioksidan özelliklerinden dolayı hücreleri ozmotik stresin yanı sıra radyasyonun zararlı etkilerinden korur [36]. C50 karotenoidleri, çoğu fotosentetik organizma tarafından üretilen -karoten gibi C40 karotenoidlerinden daha yüksek bir antioksidan kapasite gösterir [89]. Bu özellik, bu karotenoidleri gıda ve ilaç endüstrileri için oldukça ilginç kılan konjuge çift bağ çiftlerinin sayısının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 1.9) [90].

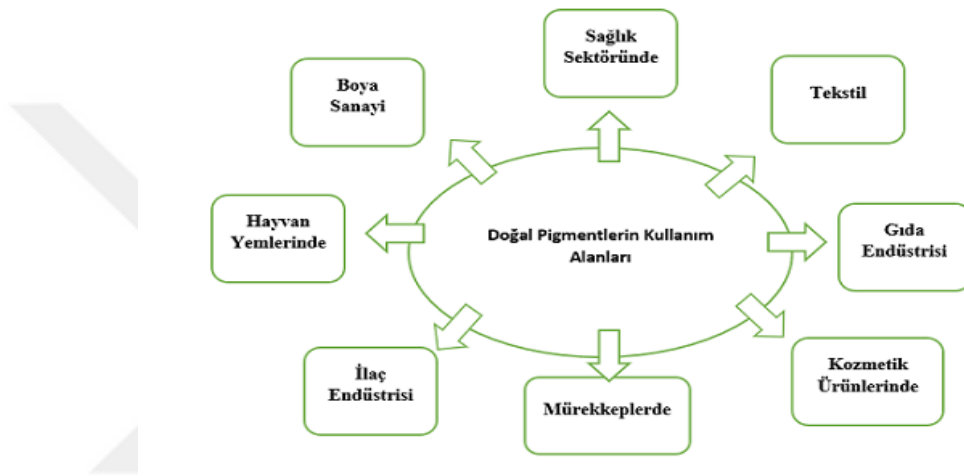


Şekil 1.9. Bakteriuberin moleküler yapısı [96-97]

Bu pigmentin uygulamaları arasında, antitümör ve antiviral olarak biyotiptaki potansiyel kullanımları özellikle önemlidir. Ayrıca, ultraviyole radyasyon (UVR) gibi iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma nedeniyle insan DNA ipliklerinde meydana gelen hasarı onarabildiği için cilt kanserinin önlenmesinde de potansiyel bir strateji sağlamaktadır [91].

1.4. Doğal Pigmentlerin Kullanım Alanları

Pigmentlerin kullanım alanları çok eski tarihlere dayanır. M.Ö. 2600’lü yıllarda Çin’de kullanımına denk gelinmiştir. Pigmentlerin pek çok farklı alanlarda kullanımı bulunmaktadır. Hayvanlardan, bitkilerden veya mikroorganizmalar tarafından doğal kaynaklı pigmentler üretilmektedir. Parlak ve ışıltılı renklerinden dolayı kozmetik, tekstil, gıda ve boya endüstrisi gibi çok geniş kullanım alanına sahiptir (Şekil 1.10) [37].



Şekil 1.10. Doğal pigmentlerin çeşitli uygulamala alanları [37]

1.4.1. Renklendirici olarak kullanımı

Astaksantin gibi güçlü A vitamini etkisi gösteren karotenoid grubunun, insan beslenmesinde güçlü öneme sahiptir. Genel yapısında su ve yağ bazlı; dondurma, margarin, peynir, çorba, bazı jelatin bazlı tatlı grupları, şeker, yumurta akı gibi gıdaların renklendirici olarak kullanılmasında ekonomik ve teknik olarak kullanılmaktadır [38]. Renk kalitesini arttırmak amacıyla günümüzde gıda boyaları pek çok üründe kullanılmaktadır. Gıdaların çeşitli işlemler sırasında kaybolan rengi vermek, ürünün sahip olduğu rengi kuvvetlendirmek renksiz olan ürünü renklendirmek gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Günümüzde özellikle gıda, içecek ürünleri endüstrisi kullanımının oldukça geniş yelpaze içinde bulunduğu görülmektedir. Astaksantin; ilaç, gıda, yem sanayilerinde karsinogen olduğu düşünülen sentetik pigmentlerin yerini alabileceği bildirilmiştir. Bu doğrultuda *Haloferax alexandrinus*’dan üretilen ve parlak kırmızı

tonuna sahip renk yapısı astaksantin çalışılması adına pozitif yönelime geçiş sağlamaktadır [38].

1.4.2. Gıda katkısı ve fonksiyonel gıda olarak kullanımı

Karotenoidlerin gıda endüstrisi için önemi aynı zamanda insanların tüketiimi doğrultusunda artmaktadır. Gıda katkı maddesinde kullanılacak olan karotenoidlerin bu süreç içerisinde iyi muhafaza edilerek depolanması ve uygun şartlarda kullanımı sağlanmalıdır. Karotenoidlerin gıdaların hazırlanma koşullarına duyarlılıkları birbirinden farklıdır ve ısı, sıcaklık, nem gibi çeşitli faktörlere maruz kalması sonucu belli kayıplar oluşabileceği belirtilmektedir [39-40].

1.4.3. Nutrasötik ve farmasötik olarak kullanımı

Doğada en yaygın yağda çözünen bitki pigmentleri olan karotenoidler, insanda peroksil radikallerinin ve singlet oksijenin temizlenmesinde önemli roller oynamaktadır. Diyet karotenoidlerinin, belirli kanserler, kardiyovasküler hastalıklar ve göz hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların önlenmesinde faydalı olduğu düşünülmektedir. Karotenoidlerin bu tür biyoaktiviteleri nedeniyle, genellikle besin takviyelerinde, cilt bakımı kozmetiklerinde ve farmasötik ürünlerin yanı sıra gıdalar ve yemler için doğal bir renkte kullanılırlar. Özellikle son yıllarda nutrasötik ve farmasötik uygulamalar için -karoten, likopen, astaksantin, lutein ve zeaksantin talepleri artmaktadır [41].

1.4.4. Hayvan yemlerinde koruyucu gıda olarak kullanımı

Yem pigmentleri genellikle hayvan yeminin görünümünü ve besleyici değerini arttırmak için kullanılır. Tüm yem pigmentleri arasında karotenoidler en önemli rolü oynar ve yem pigmentleri pazarına da hakimdir. Hayvanlar karotenoidleri sentezleyemezler ve bu bileşikler için diyetlerine güvenirler. Yeme farklı bir renk vermek olan birincil işlevi dışında, bağışıklık ve üreme sistemlerini güçlendirerek ve metabolizma seviyesini artırarak hayvana fayda sağlar. Bu tür yemler ayrıca hayvanlara kilo alımı gibi yardımcı faydalara da katkıda bulunabilir. Karotenoidlerin çok yüksek besinsel faydaları vardır ve genel bağışıklık durumunu belirlemeye yardımcı olan beyaz kan hücrelerinin üretimini uyarır. Alerjileri, cilt hastalıklarını, bağışıklık bozukluklarını

göz bozukluklarını ve bir dereceye kadar hayvanlarda bulunan herhangi bir kardiyovasküler hastalığı tedavi edebilen antioksidanlar olarak hareket ettikleri bilinmektedir. Hayvan yemi endüstrisinde karotenoidlerin hayvanlar için sağlığa faydaları konusunda artan bir farkındalık var ve bu da yem pigmentleri pazarını yönlendiriyor [42].

1.5. Haloferax Türlerinin Genel Özellikleri

Basil, kupa ve disk şekillerinden oluşan haloferax türlerinin hücre boyutu 1-3 x 2-3 µm'dir. Hareketsiz veya hareketlidirler. Anaerob koşullar altında nitrat indirgenebilir. Optimum tuz konsantrasyonu 1.5 M- 4.3 NaCl ortamında gelişirler. Gelişmeleri için sıcaklık aralığı 35-57 °C, olup optimum gelişme sıcaklığı 37 °C'dir. Gelişmeleri için pH aralığı 5-8 arasındır. Optimum pH ise 7'dir. Bu organizmaların ürettikleri pigment renkleri özellikle kırmızı, turuncu, açık pembe, pembe'dir. Bu organizmaların gelişmeleri için Mg+2 ihtiyacı 0.01-0.04 M'dir. İzolasyon kaynakları olarak yüksek tuz içeren İsrail, İspanya, Mısır bölgeleri verilebilir. Birçok substratı karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığından kemoorganotroftur ve şekerlerden asit oluştururlar [43]. Tüm örnekler penisilin, kloramfenikol, streptomisin ve tetrasikline karşı dirençli, anisamisin, basitrasin, novobiosin ve vibrostat ayıraçlarına karşı duyarlıdır [7-44].

1.5.1. *Haloferax alexandrinus*

Haloferax alexandrinus suşu TM JCM 10717T = IFO 16590T, Mısır'daki İskenderiye Şehri yakınında bulunan bir güneş tuzlası El-Mallahet'ten izole edilmiştir. *Haloferax alexandrinus*, astaksantin'in ticari üretimi için en umut verici mikroorganizmalardan biridir. Halofilik bir arke üyesi olarak, bu türün yüksek NaCl konsantrasyonlarında çoğalabilmesi ve hücrelerinin düşük iyonik kuvvetli çözelti (tatlı su) içinde kolayca çözünmesi, biyoteknolojik açıdan dikkate değer avantajlar sağlar. Belirgin ekonomik avantaj, aseptik koşullar yerine aseptik olmayan şartlar altında kültürlenerek ve karotenoidleri mekanik parçalanma olmadan hasat ederek elde edilebilir [7].

Karotenoid pigmentler içeren bu mikroorganizmanın, serbest radikalleri veya tekli oksijeni söndürerek, in vitro antikor üretimini arttırmanın yanı sıra A vitaminin öncüleri

ile görsel sistemler sağlayarak kanser ve kalp hastalıklarının önlenmesinde fizyolojik fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, karotenoidlerin, alkolsüz içecekler ve margarin dahil olmak üzere işlenmiş gıdalar için renklendirici ajanlar olarak kullanımı iyi bilinmektedir [47].

Astaksantin, doğal olarak çeşitli canlı organizmalarında ortaya çıkan, canlılık göstergelerinde ve dokuların korunmasında önemli rol oynamaktadır. Oksitleyici serbest radikallere karşı. Bazı kuş türlerinin tüylerinde, bazı yosunlarda, bakteri, kabuklu deniz ve balıkta bulunur. Birçok çalışma astaksantin gibi ketokarotenoidlerin, oksijene olmayan analoglarına kıyasla daha büyük antioksidan aktivitesi olduğu belirtilmektedir [46-48].



Şekil 1.11. *Haloferax alexandrinus* taramalı elektron mikroskopundaki morfolojik görüntüsü [49]

1.6. Biyolojik Analizler

Farklı analiz metodları kullanılarak ilaç geliştirme çalışmaları sürdürülerek çeşitli metodlar uygulanmaktadır. Bunlardan önemli olarak sitotoksisite çalışmaları gelmektedir. İlaç geliştirme sürecinde yapılan MTT, LDH testleri gibi birbirinden farklı tepkileri ve davranışları ölçebilen testler bulunmaktadır. Bunlardan farklı olarak western blot, imünofloresan boyamalar, elektron mikroskobu taramaları vb. farklı analiz yöntemleri ile çeşitli hastalıkların tedavi aşamalarında moleküllerin optimizasyon sistemlerinin tespiti çalışmalarında kullanılmaktadır [113].

1.6.1. Sitotoksisite testleri

Canlılık testlerinin temeli hücre içi etkinliklerin, yapılan bir uygulama sonrası doğrudan canlı hücre sayısı ile orantılı olmasıdır. Bu testler ile uygulama sonrası kalan hücrelerin göreceli olarak miktarı ölçülür ve bu sayede uzun süreli uygulamalarda bile oldukça önemli yarar sağlanır. Sitotoksisite; canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını

ifade eder. Sitotoksisite testleri, toksik olduğu düşünölen maddenin, uygun hücre kültüründe, hücre çoğalma oranı ve hücre üzerindeki toksik etkisi dikkate alınarak değerdendirme yapılan testlere denir. Bu test sistemleri; morfolojik olarak hücresel hasarın gözlenmesi, hücresel hasarın çeşitli ölçüm yöntemleri ile belirlenmesi, hücresel büyümenin belirlenmesi, hücresel metabolizmadaki herhangi bir değışikliğin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Sitotoksisite testleri invivo veya invitro olarak yapılabilmektedir. İnvitro testlerde, sitotoksisitesi araştırılan madde konsantrasyonlarda hücrelere uygulanır. Bu maddenin hücre morfolojisi ve hücrelerin yaşama oranları üzerine etkileri araştırılır [114].

1.6.1.1. Mtt sitotoksisite testi

İlk olarak Mosmann (1983) tarafından tanımlanan 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) testi canlı hücrelerin metabolik aktivitelerinin ölçümü esasına dayanan kolorimetik bir yöntemdir. MTT boyası içerisindeki sarı renkteki suda çözülebilen tetrazolyum tuzu, canlı hücrelerin içine girdikten sonra meydana gelen enzimatik reaksiyonlar ile mor renkte ve kristal formdaki formazana indirgenir. Reaksiyon sonucu meydana gelen formazan hücre zarından geçemediği için canlı hücre içerisinde birikir. Gerçekleşen reaksiyon sonucu ortamdaki canlı hücrelerin sayısı ile orantılı olarak renk değışimi meydana gelir. Bu yöntemde üzerinde değışik sayılarda kuyucuk bulunan plakalara ekimi yapılan hücreler belirli süre ile etkisi belirlenmek istenen madde ile muamele edilir. MTT çözeltisinin uygulanması sonucu oluşan formazan kristalleri suda çözünür hale getirildikten sonra kuyucuklardaki optik yoğunluk spektrofotometre ile saptanır. Spektrofotometrede okunan değerin (O. D) büyüklüğü kullanılan MTT çözeltisinin yoğunluğu, inkübasyon süresi, canlı hücrelerin sayısı ve bu hücrelerin metabolik aktiviteleri gibi birçok faktöre bağıdır. MTT testi birçok farklı maddenin sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde başarı ile kullanılmıştır [115].

Bu çalışmada *Haloferax alexandrinus*'tan elde edilen karotenoid ekstraktı SH-SY5Y nöroblastom hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

Çalışmada karotenoid verimlerini karşılaştırmak ve en yüksek karotenoid veriminin elde edildiği parametreleri belirlemek amacıyla Halobacteriaceae türü cinse ait *Haloferax alexandrinus* (TM JCM 10717T) suşu kullanılmıştır.

2.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri

2.1.1.1. %12,5 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

%30'luk tuzlu su çözeltisi	416 mL
Saf su	551 mL
Pepton	5 g
Maya Özütü	1 g

Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcı içine atılan manyetik balık yardımıyla iyice çözündürme basamağı uygulanıp 1M Tris-Base katılarak pH 7,5 değerine ulaşana kadar beklenilmeli. Diğer adımda otoklava koyularak sterilizasyon çalışmaları yapılmalıdır [65].

2.1.1.2. %15 MGM

%30'luk tuzlu su çözeltisi	500 mL
Saf su	467 mL
Pepton	5 g
Maya Özütü	1 g

Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcı içine atılan manyetik balık yardımıyla iyice çözündürme basamağı uygulanıp 1M Tris-Base katılarak pH 7,5 değerine ulaşana kadar beklenilmeli. Diğer adımda otoklava koyularak sterilizasyon çalışmaları yapılmalıdır [65].

2.1.1.3. %17,5 MGM

%30'luk tuzlu su çözeltisi	583 mL
Saf su	384 mL
Pepton	5 g
Maya Özü	1 g

Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcı içine atılan manyetik balık yardımıyla iyice çözündürme basamağı uygulanıp 1M Tris-Base katılarak pH 7,5 değerine ulaşana kadar beklenilmeli. Diğer adımda otoklava koyularak sterilizasyon çalışmaları yapılmalıdır [65].

2.1.1.4. %20 MGM

%30'luk tuzlu su çözeltisi	666 mL
Saf su	301 mL
Pepton	5 g
Maya Özü	1 g

Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcı içine atılan manyetik balık yardımıyla iyice çözündürme basamağı uygulanıp 1M Tris-Base katılarak pH 7,5 değerine ulaşana kadar beklenilmeli. Diğer adımda otoklava koyularak sterilizasyon çalışmaları yapılmalıdır [65].

2.1.1.5. %25 MGM

%30'luk tuzlu su çözeltisi	833 mL
Saf su	134 mL
Pepton	5 g
Maya Özü	1 g

Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcı içine atılan manyetik balık yardımıyla iyice çözündürme basamağı uygulanıp 1M Tris-Base katılarak pH 7,5 değerine ulaşana kadar

beklenilmeli. Diğer adımda otoklava koyularak sterilizasyon çalışmaları yapılmalıdır [65].

2.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler

2.1.2.1. %30 (w/v) konsantre tuzlu su stok çözeltisi

NaCl	240 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	35 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	30 g
NaBr	0,8 g
NaHCO ₃	0,2 g
KCl	7 g
CaCl ₂	0,5 g

Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcı içine atılan manyetik balık yardımıyla iyice çözündürme basamağı uygulanıp çözelti hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlanarak sterilize edilmektedir [66].

2.1.2.2. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- difenil tetrazolium bromid]

MTT	50 mg
PBS (1X)	100 mL

Hazırlandıktan sonra 0,2 mm por çaplı filtreden geçirilerek ışık almayacak şekilde -20°C de saklanır.

2.1.3. Kimyasal maddeler ve çözücüler

Bu tez çalışması süresince kullanılan kimyasal maddeler ve özellikleri (Tablo 2.1.)'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım amaçları

Malzeme adı	Biçim	Markası
NaCl	Besiyeri hazırlığı	Merck
MgCl ₂ .6H ₂ O	Besiyeri hazırlığı	Merck
Tris-HCl	Besiyeri hazırlığı	Amresco
Maya özütü	Besiyeri hazırlığı	Merck
Tris Base	Besiyeri hazırlığı	Sigma
Pepton	Besiyeri hazırlığı	Oxoid
BHT	Antioksidan	Merck
Aseton	Çözücü	Merck
Metanol	Çözücü	Merck
Etanol	Çözücü	Merck
DMSO	Hücre kültürü deneyleri	Merck
FBS	Hücre kültürü deneyleri	Merck
Heksan	Çözücü	Merck
Kloroform	Ekstraksiyon	Merck

2.2. Yöntem

2.2.1. *Haloferax alexandrinus* suşu üretimi

Haloferax alexandrinus suşu SW-30 besiyerinde 37°C’de 24 saat karanlık ortamda, çalkalamalı koşullarda (120 devir/dakika) 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen kültürler +4 °C’ de buzdolabında saklanmıştır.

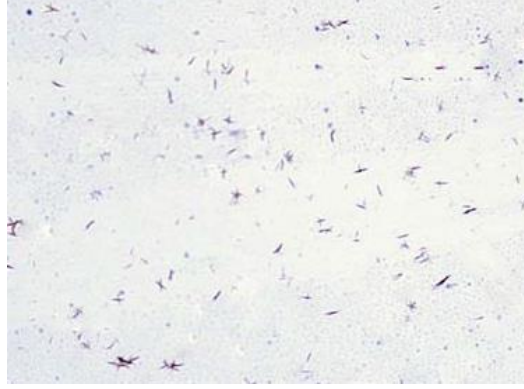
2.2.2. Liyofilize kültürün geliştirilmesi

Liyofilize haldeki kültürden bir miktar alınarak sıvı besi yerine (25 ml) ekim yapılmıştır. Kültür 37°C, 120 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi 9-10 gündür. Bu gelişen kültürden sıvı besi yerine ekim yapılarak erlenler 37°C’de çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.3. Hücrelerin gram boyama ile boyanması

Sıvı besiyerinden alınan hücreler lam üzerinde yayılmıştır ve havada kurutulmuştur. Hücrelerin üzerine fiksasyon amaçlı %2’lik asetik asit damlatılmıştır.

Daha sonra kristal viyoleto damlatılıp ve 1-2 dakika beklenmiştir. Sonra preparat distile su ile yıkanmıştır.



Şekil 2.1. *Haloferax alexandrinus* 100x'lik büyütmedeki ışık mikroskobu görüntüsü [116]

Bu işlemin ardından preparatın üzerine lugol damlatılıp 1-2 dakika beklenmiştir. Tekrar distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra %100'lük alkol ile renksiz sıvı akana kadar renk giderilmiştir. Ardından tekrar distile su ile yıkanmıştır. Sonra safranin damlatılıp ve 20-30 saniye kadar beklenmiştir. Distile su ile yıkandıktan sonra 100'lük objektifte imersiyon yağı ile gözlemlenmiştir.

2.2.4. *Haloferax alexandrinus*'ün besiyerine ekim ve üretimi

Haloferax alexandrinus suşunun pigment üretimlerinin belirlenmesi amacıyla MGM (%20) sıvı besiyerleri hazırlandı. *Haloferax alexandrinus* suşunun liyofilize besiyerinde ön kültürasyon ile üretilmiş olan kültürden 10 ml alınarak, 100 ml' MGM (%20) besiyerimize ekim yapılmıştır. *Haloferax alexandrinus* suşunun pigment gelişimini (Şekil 2.2.) değerlendirmek için üretimi 37°C'de, 120 rpm hızındaki inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi [67].



Şekil 2.2. *Haloferax alexandrinus*'un pigment üretiminin şematik sunumu

2.2.5. Pigment üretimi için uygun besiyerinin seçimi

Çalışmada kullanılan *Haloferax alexandrinus* suşunun pigment üretimlerinin değerlendirilmesi amacıyla farklı tuz yoğunluğu konsantrasyonunda (%12,5 MGM, %15 MGM, %17,5 MGM, %20 MGM) besiyerlerine ekildi. Kültürün 37°C'de, 120 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 7 günde üretimleri gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda üreme miktarı filtrasyon yöntemi ile kuru ağırlık olarak belirlenirken, suşların pigment üretimleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Oluşan renkler ve sonuçların karşılaştırılması ile pigment üretiminde en uygun besiyeri belirlendi. Karotenoid oranının değişmeden depolanması için ışık geçirgenliği az olan ambalajlarda muhafaza edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Değişen NaCl konsantrasyonlarında konsantrasyon seviyesinin artması pigment yoğunluğunu arttırmıştır [70].

2.2.6. *Haloferax alexandrinus*'un büyüme eğrisinin çıkarılması

Haloferax alexandrinus petrisinden tek bir koloni alınarak 1 litre maksimal besiyerine ekim yapıp, 37°C ve 120 rpm mikroorganizma gelişmesi için inkübasyona bırakılmıştır. Belirli zaman aralıklarla 500 µl örnek alınıp spektrofotometrede (BioTek Epoch 2 Microplate UV/VIS Okuyucu) 600 nm'de ölçüm yapılmıştır.

2.2.7. Pigment ekstraksiyonu ve analizi

Sıvı minimal besiyerinde geliştirilen 5 lt' lik hacime sahip hücreler 9.000 RPM' de 20 dakika santrifüj edilerek hücreler toplanmıştır ve süpernatant kısım atılmıştır. Tüm hücreleri toplayana kadar bu işlem aynı şekilde devam etmiştir (Şekil 2.4.). Pelet kısmındaki hücrelerin üzerine aseton (10 ml) eklenmiştir ve sonikatörde 3'er dakika boyunca 5 kez tekrarlanarak parçalanmıştır. Parçalanmış hücre özütü +4°C' de 9.000 RPM' de 20 dk boyunca santrifüj edilmiştir ve renkli süpernatant kısım hem çözücü hem de hücreler renksiz olana kadar ardışık ekstraksiyonlar gerçekleştirildi. (Şekil 2.3.). Çözücü, bir nitrojen akımı altında buharlaştırıldı ve pigmentler, 10 ml aseton (%0,1 BHT) içinde çözüldü. Numuneler ışıktan korumak için alüminyum folyo ile sarılmıştır.



Şekil 2.3. *Haloferax alexandrinus* türünün 9.000 RPM' de 20 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çöktürülmüş görüntüsü

Ekstraktlar nitrojen altında -20°C'de saklandı. Ekstraksiyon prosedürleri ve analiz testleri karanlık koşullarda gerçekleştirilmiştir. Aynı prosedür kullanılarak metanol ve etanol ile de ekstaksiyon aşamaları uygulanmış olup en uygun aseton çözücüsünün pik aralığı görülmüş UV-VIS Tarama Spektrofotometresi ölçülerek (Şekil 3.12.)' de gösterilmiştir.

2.2.8. Karotenoid kısmi saflaştırılması

Saflaştırma ve ayrıştırma işlemleri, saf olarak elde edilmek istenen maddenin belirli tekniklerle, saf olmayan karışımdan elde edilmesi için kullanılır. Saflaştırmanın gıda mühendisliğinden farmasötiğe, petrol endüstrisinden suyun saflaştırılmasına kadar birçok alanda uygulaması vardır. Bunun yanında kullanılan teknikler, temelde benzer bir mantığa sahiptir [117].

2.2.8.1. Diyaliz yöntemi

Diyaliz, süspansiyon içindeki partiküllerin çözülmüş iyonlardan veya küçük boyutlu moleküllerden yarı geçirgen bir membrandan kendiliğinden ayrılması işlemi olarak tanımlanabilir. Küçük molekülleri bir numuneden almak veya çıkarmak için diyaliz kullanılabilir, çünkü küçük moleküller zar boyunca her iki yönde serbestçe hareket eder. Bu, diyalizi çeşitli uygulamalar için yararlı bir teknik yapar. Yüksek hacimlerde çalışılabilmesi ve ekonomik olması nedeni ile avantajlı, ancak çok zaman alması nedeni ile de dezavantajlı bir yöntemdir. Ekstraksiyon sonrası elde edilen ham ekstraktı tuzdan arındırmak için diyaliz yöntemi uygulanmıştır. Yöntemin işlem aşamaları şu şekildedir; +4°C’de devamlı karıştırılan süpernatanta, distile su ilave edilmiş ve ardından 12 saat bekletilmiştir. Tuzdan arındırma işlemi için diyaliz tüpü, distile su ile dolu bir kabın içinde manyetik balık yardımıyla sürekli döngü halinde olacak şekilde her 12 saatte bir distile suyun değiştirilerek numunenin tuzdan arındırma işlemi gerçekleştirilmiş işlem 2 gün sürmektedir [68].

2.2.9. Kromatografik analizler

Kromatografi, birbirine yakın özellikteki madde karışımlarını ayırmak için kullanılan güçlü bir ayırma ve saflaştırma yöntemidir. Genel tanımı ise, kromatografi bir karışımın sabit bir faz üzerinde hareketli bir çözücü yardımıyla karışımı oluşturan bileşiklerin farklı hareketleri sonucu bileşenlerine ayrılması olarak tanımlanır. Kromatografide sabit ve hareketli olmak üzere iki faz vardır. Sabit faz katı ve sıvı hareketli faz sıvı ve gaz olabilir. Ayrımı istenen karışım hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinden geçirilir. Karışımı oluşturan bileşikler sabit faz tarafından farklı ölçüde tutulması nedeniyle her bir bileşik sistemi farklı zamanlarda terk eder. Böylece bileşikleri

birbirinden ayırmak, tanımak ve ayrı ayrı toplamak olasıdır. Karotenoidler yüksek oranda konjuge olup, onları ısı, ışık, oksijen ve metal iyonları tarafından bozulmaya karşı hassas hale getirir. Örneğin, β -karoten, aerobik bir ortamda ultraviyole ve görünür ışık altında hızla bozunur. Bu nedenle numuneler karanlık ortamda tutulmalı ve solvent gazla (azot, argon veya helyum) buharlaştırılmalı ve -20°C 'nin altındaki sıcaklıklarda karanlıkta saklanmalıdır. Ekstraksiyon ve analiz sırasında kullanılan çözeltilerin pH'ı da dikkate alınmalıdır. Karotenoidler, ekstraktlarda genellikle gıda veya biyolojik matrislere göre daha az stabildir ve bu nedenle bozulmanın oluşmaması için numuneler ekstraksiyondan hemen sonra analiz edilmelidir [69].

Karotenoidlerin serbest formdaki yapısı, yağ bazlı ve suda dağılabilen formdaki özellikleri ve stabilitesi değerlendirilir ve analizinin tüm pratik yönleri incelikli aşamalarla devam edilmelidir. Karotenoidlerin analizinin farklı pratik yönleri, bunların HPLC, TLC, çeşitli kolon vb. dahil kromatografi yöntemleri ile saflaştırılması ve tanımlanması ve UV görünür ve NMR spektroskopisi gibi fizikokimyasal yöntemlerle karakterizasyonu ve kantitatif tayini üzerinde durularak çalışma gerçekleştirilmiştir. Kromatografi analizleri karotenoidlerin ayrılması ve miktarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir. Bu amaçla farklı tipte durağan fazlar ve çözücüler kullanılır [70].

2.2.9.1. Kolon kromatografisi

Kromatografide sabit faz, bir katı veya katı üzerine tutturulmuş bir sıvı fazdır. Genellikle katı sabit fazlar silika ya da alümina gibi gözenekli maddelerdir. Sabit fazın yapısı kullanılan kromatografiye göre değişir. Kolon kromatografisinde, kromatografi türlerinde, sabit faz genelde cam bir borunun içerisine sabitlenir.



Şekil 2.4. *Kolon kromatografisi ile pigment saflaştırılması*

Karışımın içerdiği sabit faz, hareketli faz ve maddeler arasındaki etkileşim türü, moleküllerin birbirinden ayrılmasında etkili olan temel bileşendir. Yaygın bir sabit faz olan silika jel yüzeyinin çok kutuplu olduğu, hidrojen bağları oluşturabildiği ve ayrıca Van der Waals, dipol-dipol ve indüklenmiş dipol-dipol etkileşimlerinde de yer alabileceği anlamına gelir. Bir ayırma yöntemi olarak kromatografinin kristalleştirme, çözücü ekstraksiyonu ve damıtma gibi diğer eski tekniklere göre çok sayıda avantajı vardır. Solvent çok dikkatli bir şekilde aktarılamazsa band oluşumu istenilen şekilde gerçekleşemez, çözünen madde sabit faz ile çözünmezse de karışır ve çözünme dengesi bozulmalar oluşabilmektedir [71].

2.2.9.2. İnce tabaka kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi (TLC) hazırlık ve tanı için kullanılan bir ayırma yöntemidir. Sabit ve hareketli iki fazı bulunmaktadır. Bir tank içerisinde ince bir plak vardır, bu plağın üstünü adsorban dediğimiz maddeyle kaplarız, tankın dibinde olan çözücü, plağın altından üstüne doğru kılcal etkisiyle hareket eder, kimyasallar da bu çözücü yardımıyla plağın üstüne doğru hareket etmeye başlar. Çözücü sistem (tankın

dibindeki sıvı), adsorban (plak) üzerinden kapiler hareketle yükselirken karışımdaki maddeler de birbirinden ayrılır. İnce tabaka kromografi karotenoid standartlarını elde etmek için saflaştırma amacıyla kullanılmaktadır. Kolon kromatografisi sonucu saflaştırılan pigmenti doğrulamak için ince tabaka kromatografisi (TLC) analizi yapılmaktadır. Bu analiz için aseton, bir TLC silika jel plakasına (Merck, Darmstadt, Almanya) yerleştirildi ve heksan:aseton (1:1) çözücüsü içinde yüzdürüldü. Ultraviyole (UV) ışık altında karışımdaki maddelerin bant görüntüsü (Şekil 3.9.) gösterilmiştir [72-73].

2.2.9.3. Preparatif ince tabaka kromatografisi (P-TLC)

Az miktardaki maddelerin birbirinden ayrılması ve saflaştırılması için bazen kolon kromatografisi yerine preparatif ince tabaka kromatografisi kullanılır. Bunun için 20 x 20 cm ebatlarında 0.25-2 mm kalınlıklarında uygun adsorban ile kaplanmış cam plakalar kullanılmaktadır. Bu plakalar laboratuarda kolaylıkla hazırlanabilmektedir. Kaplanacak cam plakalar önce deterjanlı suyla sonra destile su ve asetonla yıkanıp kurutulur. Adsorban çözücü karışımı (örneğin 35 g silikajel 85 ml diklormetan ve 15 ml metanol ya da 72 ml su karışımı olabilir) ağız kapalı kap içinde homojen akışkan bir karışım olana dek karıştırılır. Cam plakalar yan yana dizilerek ayarlı uygulayıcı yardımıyla homojen karışım üzerine dökülür. Kaplanan camlar 1 saat kadar havada kurutulmaya bırakılır. Sonra 110°C' lik etüvde 1,5 saat ısıtılarak aktive edilir. Aktive edilen plakalar desikatörde saklanmalı ve kaplanan yüzeylere asla dokunulmamalıdır [118].

2.2.10. Total karotenoid miktarı

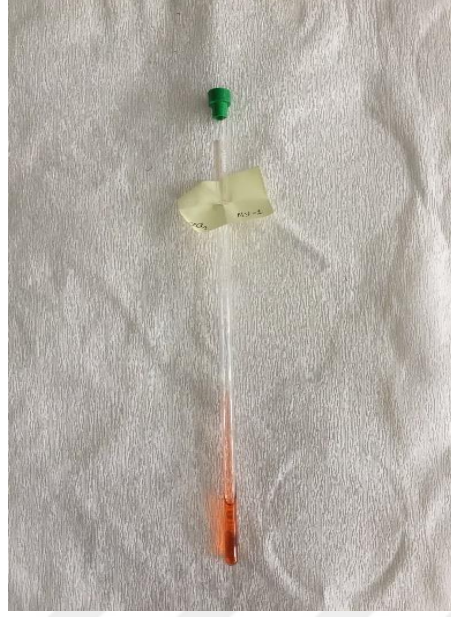
Saflaştırmadan sonra elde edilen örnekler rotary evaporatör ile sıvı kısım uçurulduktan sonra geriye kalan karotenoid kuru ağırlığı 2,40 gram olarak ölçülmüştür. (Toplam sıvı kültür 5 Lt). Standart besiyerinde 37°C'de, 120 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 7 günde üretilen *Haloferax alexandrinus* türü öncelikle filtre kâğıdı ile süzüldü. 24 saat kurumaya bırakıldı ve ardından kültürlerde üreme miktarı hücre biyokütlesindeki kuru ağırlık cinsinden hesaplandı ve 2.40 g olarak hesaplandı [67-68].



Şekil 2.5. Total karotenoid pigment özütü hücrelerinin kuru ağırlık görüntüsü

2.2.11. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi)

Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, yaygın bilinen adıyla NMR spektroskopisi, atom çekirdeğinin belirli manyetik özelliklerini kullanan bir araştırma tekniğidir. İçerisindeki atomların ya da moleküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirler. Günümüzde analitik kimyadan tıbbi görüntülemeye kadar birçok alanda maddenin özelliklerini araştırmak için kullanılan bir teknolojinin çıkış noktası olan Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), güçlü bir manyetik alan etkisi altındaki “NMR aktif” olarak nitelendirilen atomların çekirdeklerinin dışarıdan uygulanan, kısaca radyo frekans (RF) enerjisi diye anılan RF bandındaki elektromanyetik ışıma enerjisi ile etkileşimidir.



Şekil 2.6. NMR spektroskopisi için alınan örnek

NMR spektroskopisi moleküllerin yapıları hakkında bilgi veren spektroskopik yöntemler içerisinde tartışmasız en ileri seviyede olanıdır. Molekül yapısının yanı sıra, moleküllerin çeşitli fiziksel özellikleri; bağ ve açış değerleri, gerilim, molekül içi dinamik dengeler, elektron delokalizasyonu ve kinetik veriler hakkında önemli bilgiler ortaya koyan ve kimya biliminin olmazsa olmazı haline gelmiş spektroskopik bir yöntemidir. Protonların bulundukları çevreye bağlı olan T1 ve T2 gevşeme süreleri, ilgili atomların içinde bulundukları moleküler yapıların algılanmasına olanak sunmaktadır [119].

2.2.12. UV-VIS analizi

UV-VIS analizi için (BioTek Epoch 2 Microplate UV/VIS Okuyucu) cihazı kullanılmıştır. Ölçümler 300-600 nm dalga boyu aralığında yapılmıştır. Literatürdeki çalışmalardan pigment dalga boyu aralığı dikkate alınmıştır ve buna bağlı olarak (Standart fluorometre küvet, kapaklı, Cam 5 mm Işık Yollu) küvetler kullanılmıştır. Cam küvetlerin tipik olarak görünür ışığın dalga boyu aralığında kullanımı için uygundur. Dalga boyu aralığı 340–2500 nm'dir. Aseton, metanol ve etanol ile ekstrakte edilen *Haloferax alexandrinus* türünün pik aralığı UV-VIS spektrumunda verdiği maksimum absorptans değeri 496 nm'de görülmüştür (Şekil 3.12).

2.2.13. Sıvı kromatografi-Kütle spektrometresi (LC-MS/MS)

LC/MS, HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ve MS (Kütle Spektrometresi) ünitelerinin birlikte çalıştırılarak yapı aydınlatması ve miktar tayininde kullanılan bir cihazdır. LC-MS/MS tekniğinde UPLC cihazı sayesinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan örnek moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. Kütle spektrometreleri molekülleri iyonizasyon işlemi ile uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Birinci kuadrupol filtrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılan moleküller collision gaz adı verilen yüksek saflıkta özel bir gaz ile (Azot) parçalanmaya tabi tutulmaktadır. İkinci kuadrupol filtrede parçalanma sonucu oluşan iyonların üzerinden teşhis ve miktar tayini yapılmaktadır [111].

Örnekte bulunan bileşenlerin miktarı, yapısı ve molekül ağırlığı hakkında bilgi verir. Küçük bileşiklerden büyük proteinlerin tayinine kadar, polar iyonik, termal kararsız ve uçucu olmayan bileşiklerin analizleri yüksek hassasiyetle ve hızlı bir şekilde yapılabilir. LC-MS/MS çok düşük konsantrasyonlarda (ng/pg) maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca sonuçların doğrulanmasına da gerek duyulmaktadır [120].

2.2.14. Hücre kültürü çalışmaları

Hücre kültürü çalışmasında kullanılan insan nöroblastom hücre hattı olan SH-SY5Y hücre hattı kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri Eskişehir Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünden Doç. Dr. Emel ERGENE'den temin edilmiştir.

2.2.14.1. SH-SY5Y hücrelerinin üretimi ve pasajlanması

SH-SY5Y hücrelerinin optimum büyüme ortamları için FBS (Pan biotech P30-3305), EMEM (ATCC 30-2003), alternatif olarak DMEM (Hyclone SH30249, (Sigma Aldrich D6429 + 20ml/L L-glutamin 200mM Hyclone SH30034.01)) kullanılmıştır. SH-SY5Y hücrelerinin farklılaşması için FBS (Pan biotech P30-3305), DMEM (Hyclone SH30249, (Sigma Aldrich D6429 + 20ml/L L-glutamin 200mM Hyclone SH30034.01)), all trans retinoik asit (Galenik 2106H0049), NCS21 (Capricorn Scientific C21-H) kullanılmıştır. Kaplama materyali olarak jelatin, poly-L-lisin (Sigma Aldrich P4707), tip 1 kolajen (Bugamed Biyoteknoloji), ECM (Sigma aldrich E1270), Matrigel (Corning

354234) materyalleri kullanılmıştır. Hücre pasajında phosphate buffered saline (PBS) (invitrogen), Phosphate buffered Saline-etilendiamintetraasetik asit (PBS-EDTA) (invitrogen), Tripsin/etilendiamintetraasetik (Tripsin-EDTA), (Biological Industries, Sigma aldrich) kullanılmıştır.

2.2.14.2. MTT testi

SH-SY5Y hücre hattının optimal şartlar altında en uygun büyüme ortamı olarak %16 inaktive edilmiş FBS, DMEM (Sodyum piruvat ve L- glutamin içeren), (%1) penisilin streptomisin içeriği kullanılmıştır. Hücreler, 37°C, %5 CO₂, %95 atmosfer havası ortamındaki inkübatör de kültüre edilmiştir. Hücreler T25 ve T75 flasklarında büyütülmüşlerdir.

Total karotenoidin sitotoksik etkilerinin gözlemlenebilmesi amacıyla yapılan MTT analizi için öncelikle SH-SY5Y hücreleri 7500 hücre/kuyu olacak şekilde, 3 tekrarlı olarak, 96'lı kuyucuklu plakalara ekilmiştir ve büyüme eğrisi çalışması yapılmıştır. Ardından, test maddelerinin sitotoksitesinin belirlenebilmesi için konsantrasyon taraması amacıyla bir 72 saatlik MTT deneyi kurulmuştur. Uygun aralıklar 0-2 µg olarak belirlendikten sonra 3 tekrarlı 72 saatlik deney kurulmuştur. Bir gün sonra, hücrelerin medyumları aspire edilmiş ve test maddelerini sırasıyla, 0 µg, 0,2 µg, 0,5 µg, 1,0 µg, 1,5 µg, 2,0 µg konsantrasyonlarda içeren 100µL kültür medyumuna kuyucuklara eklenmiştir. Maddeler suda çözündükleri için negatif kontrol olarak medyum kullanılmıştır. Ardından, 100µL MTT-medyum karışımı her kuyucuğa eklenip 4 saat optimum koşullarda (karanlıkta) inkübe edilmiştir. İnkübasyon ardından, kuyulardaki boya karışımı dökülerek, 100ml/kuyu DMSO eklenmiş, formazan tuzu 15 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda ve karanlıkta bekletilerek çözünmüş ve 594nm dalga boyu ışıktaki absorbans değerleri Eliza plaka okuyucu (BioTek, Epoch 2)'da kolorimetrik olarak analiz edilmiştir. Veriler Excel programıyla değerlendirilmiş ve grafikler çizilmiştir.

3. BULGULAR

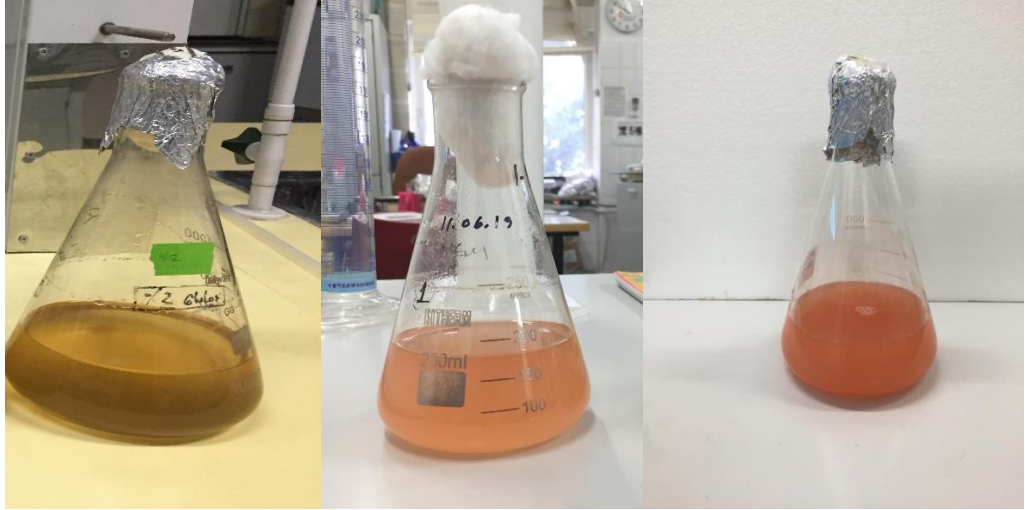
3.1. *Haloferax alexandrinus* ile Pigment Üretimini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması

Haloferax alexandrinus tarafından doğal pigment üretiminde gözlemlenen artış, pigment üretim ortamının fizyolojik özelliklerine bağlı olarak gerçekleşebilmektedir. Pigment üretiminin etkisini sıcaklık, pH, ortam koşulları ve besiyeri gibi parametrelerinin araştırılarak başlıca etmen koşullarının bulunması gerekmektedir. *Haloferax alexandrinus*'un pigment üretimi için stabil değerlerinin bulunması amacıyla (karanlık-aydınlık özellikleri, sıcaklık ve inkübasyon değerleri) pigment üretimi için çeşitli parametre faktörleri değerlendirilerek araştırma sonuçları gözlemlenmiştir.

3.2. Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Koşullarda *Haloferax alexandrinus* ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Yaptığımız çalışmada inkübasyon koşullarında pigment üretiminin önemini belirlemek amacıyla örnek grubumuzu 0, 60 ve 120 rpm hızındaki çalkalamalı ve statik inkübatörde 37 °C'de 7 günde üretildiler. Üretim sonrası *Haloferax alexandrinus* suşunun kültür ortamındaki rengi, pigment üretimi ve üreme miktarı belirlendi. Bunun sonucunda 120 rpm hızında inkübasyon koşullarında kırmızı pigment üretimi ve üreme oluşması gözlemlenerek değerlendirildi (Şekil 3.1.).

Yapılan deneyden elde ettiğimiz verilere göre pigment üretimi için çalkalamalı inkübasyon koşulunda üreme ortamı tercih edilmesi idealdir.

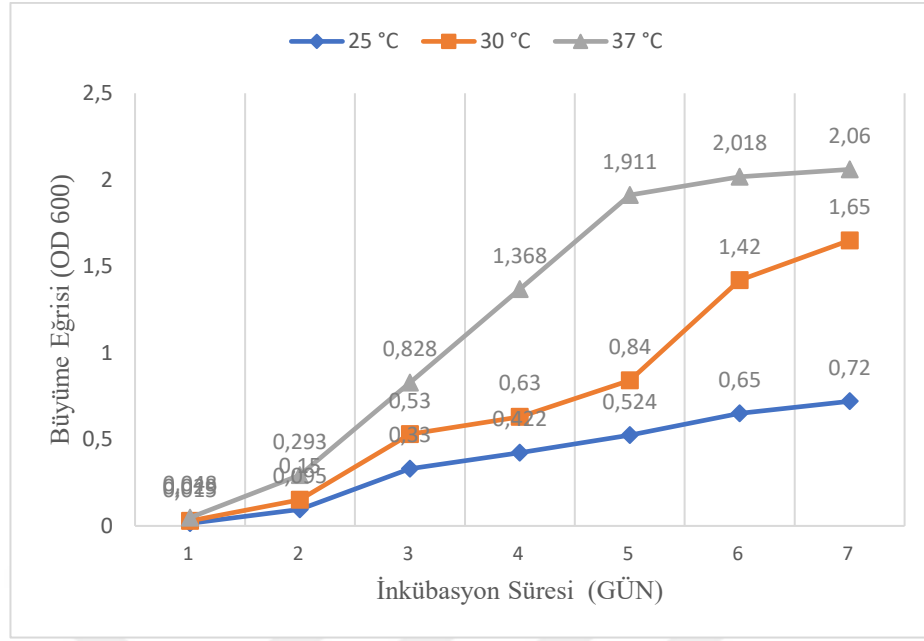


Şekil 3.1. *Haloferax alexandrinus*'un çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarında sırasıyla 0, 60 ve 120 rpm hızında oluşturdukları pigment üretimi

3.3. *Haloferax alexandrinus* ile Pigment Üretiminde Uygun Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Haloferax alexandrinus suşu mikroorganizmasının biyoteknolojik üretim koşullarında kullanılmasında optimal sıcaklık 30-40 °C parametresi olarak kullanılır. Yapılan çalışmada optimal parametre değerlerinin belirlenmesi amacıyla inkübasyon sıcaklığının MGM (%20) sıvı besiyerlerinde 25, 30, 37 °C çeşitli sıcaklık değerlerinde geliştirilen *Haloferax alexandrinus* suşunun, inkübasyon sonrası görünümü, pigment üretimleri ve üreme miktarları belirlendi. Farklı sıcaklık parametre değerlerinde gözlemlenen renkler ve üremelerine bakıldığında 37 °C sıcaklıklarda üretilen mikroorganizmanın kırmızı pigment üretimi ve üremesinin gözlemlenmiştir.

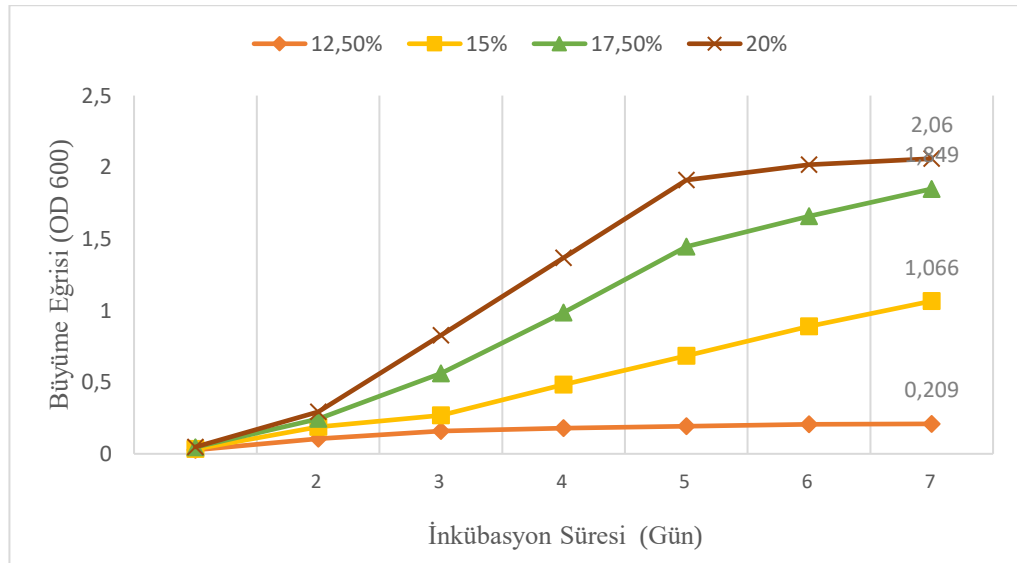
Haloferax alexandrinus'un 37 °C sıcaklık değerinin pigment üretimi ve üreme için araştırılan sıcaklık değerleri arasında en uygunu olduğu belirlendi. 37 °C'de ise sıcaklık miktarının artması pigment üretimi ve üreme miktarının üzerinde herhangi bir ekstra sonuca yer almadığı gözlemlenmiştir. Deneyde kullanılan mikroorganizmamızda belirlenen en uygun sıcaklık değeri dışında üremenin azaldığı ve buna paralel olarak oluşan pigment miktarının azaldığı belirlendi. *Haloferax alexandrinus* suşu ile MGM (%20) sıvı besiyerlerinde üretim çalışmaları için en optimal verinin 37 °C sıcaklık parametresinin kullanılması ile sonuçlanacağı çıkarılmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. *Haloferax alexandrinus*'un farklı sıcaklık değerlerinde büyüme eğrisi

3.4. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında *Haloferax Alexandrinus*'un Üreme Yoğunluğu

Çalışmada kullanılan MGM (%20) sıvı besiyerine ekilen *Haloferax alexandrinus* suşu 37°C'de 120 rpm hıza sahip inkübatörde geliştirildi. 24 saatte bir üretim ortamlarından örnek alınarak pigment üretimi değerleri tespit edilmiştir (Şekil 3.3.).

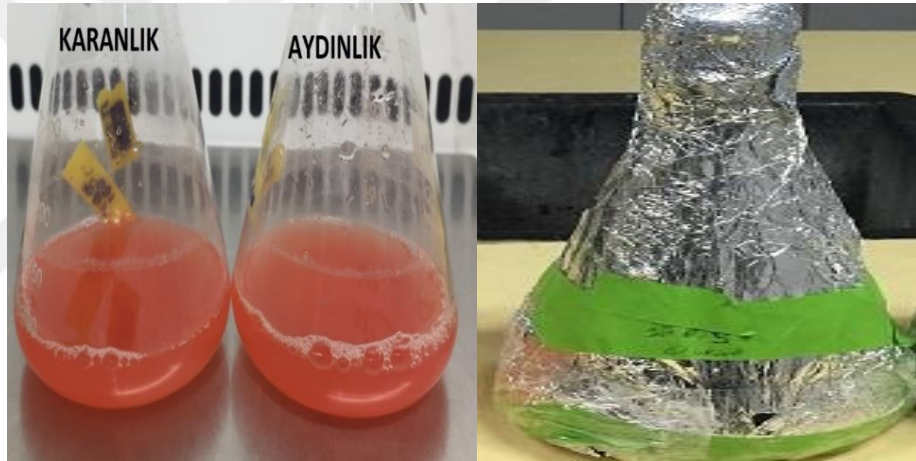


Şekil 3.3. *Haloferax alexandrinus*'un farklı tuz konsantrasyonlarında üreme yoğunluğu

Pigment üretiminin 7. güne kadar artarak devam ettiği görülmektedir. *Haloferax alexandrinus*'un 7 günlük inkübasyon koşullarına uygun olduğu değerlendirilmiştir. *Haloferax alexandrinus*'un 3. günün sonunda pigment üretiminin pozitif yönde artış eğilimi gözlemlenmiştir.

3.5. Karanlık ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının *Haloferax alexandrinus* ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Deneyde kullanılan besiyerimiz MGM (%20) ekilen *Haloferax alexandrinus* 37°C'de 120 rpm çalkalamalı inkübatörde ve 7 gün süreyle aydınlık ve karanlık parametre yönlerinin tespit edilmesi için inceleme sonucunda renklerin birbirine çok yakın olduğu kırmızı pigment görüntüsü gözlemlenmiştir (Şekil 3.4.).

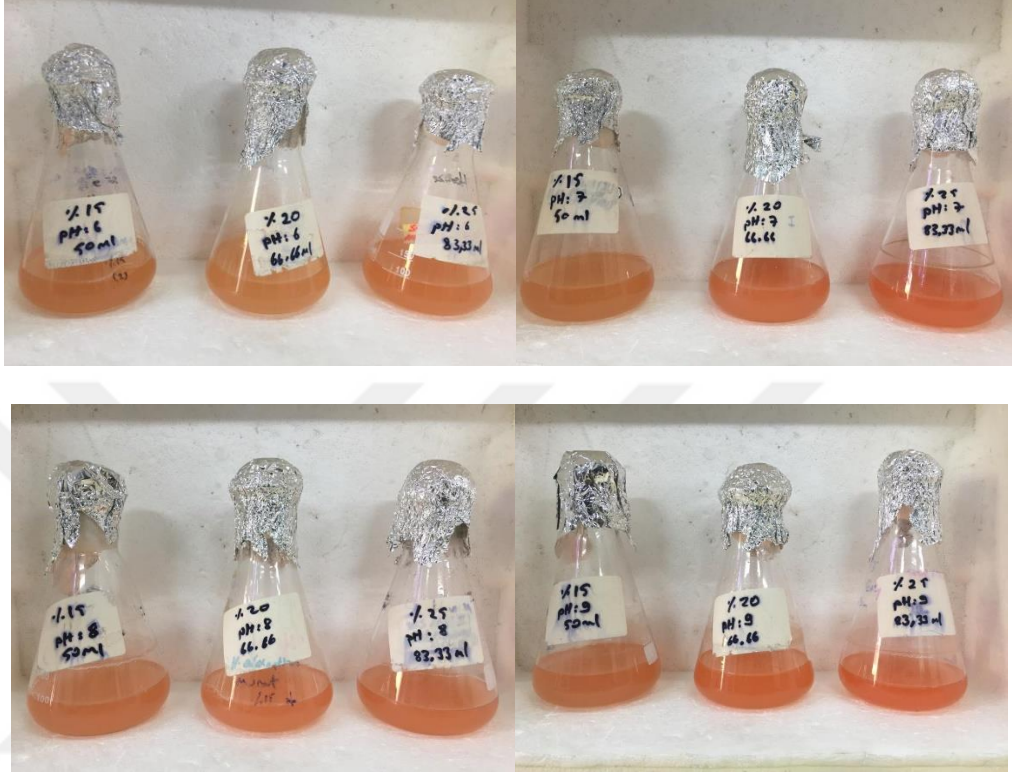


Şekil 3.4. *Haloferax alexandrinus*'un karanlık ve aydınlık inkübasyon koşullarında oluşturdukları pigmentler

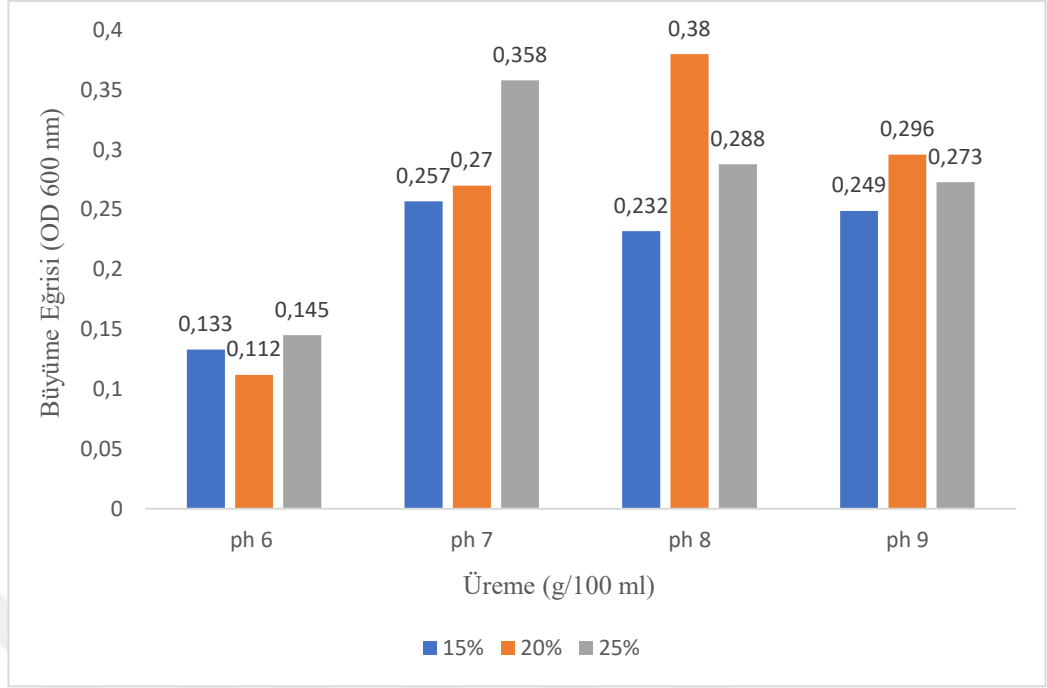
3.6. *Haloferax Alexandrinus* ile Pigment Üretiminde Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi

Haloferax alexandrinus suşunun uygun başlangıç pH değer parametresinin belirlenmesi için pH 6 ile 9 arasında değişen pH'larda ve %15, %20, %25 MGM tuzlu sıvı besiyerlerinde üretildi. İnkübasyon sonunda oluşan renklerin ve üretim miktar tayinlerini yapılarak çalışma sürdürüldü. Farklı parametre değerleri içinde oluşan *Haloferax alexandrinus* suşunun oluşturdukları renkleri incelediğimizde pH 6 aralığında suşun rengi açık pembe pigment, pH 7 ile 9 arasında üretilen suşlarda kırmızı pigment görüldü (Şekil 3.5.). *Haloferax alexandrinus*'un farklı pH ve tuz oranında pigment

üretimleri ve üreme miktarları (Şekil 3.5.)’te gösterilmiştir. Bunun sonucunda suşun pigment üretiminde pH 8 ve %20 MGM besiyerinde en uygun optimal başlangıç değeri olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6.).



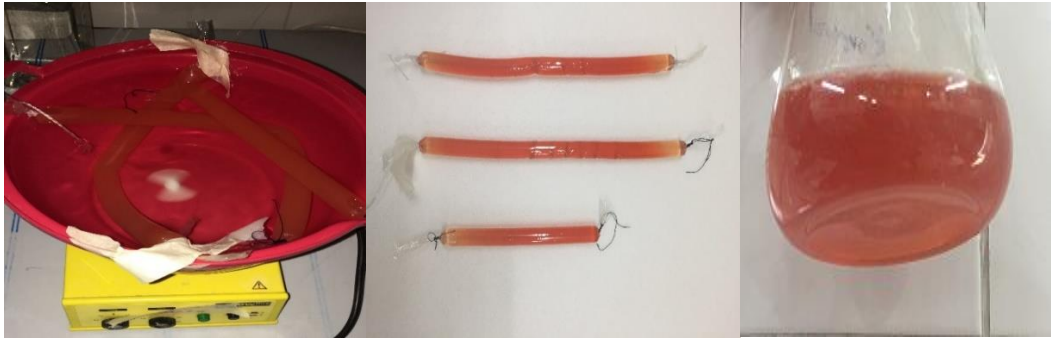
Şekil 3.5. *Haloferax alexandrinus*’un çalkalamalı inkübasyon koşullarında oluşturdukları pigmentler



Şekil 3.6. *Haloferax alexandrinus* 'un farklı pH ve tuz oranında pigment üretimleri ve üreme miktarları (BioTek Epoch 2 Microplate UV/VIS Okuyucu cihazında ölçümler yapılmıştır.)

3.7. Diyaliz Yöntemi

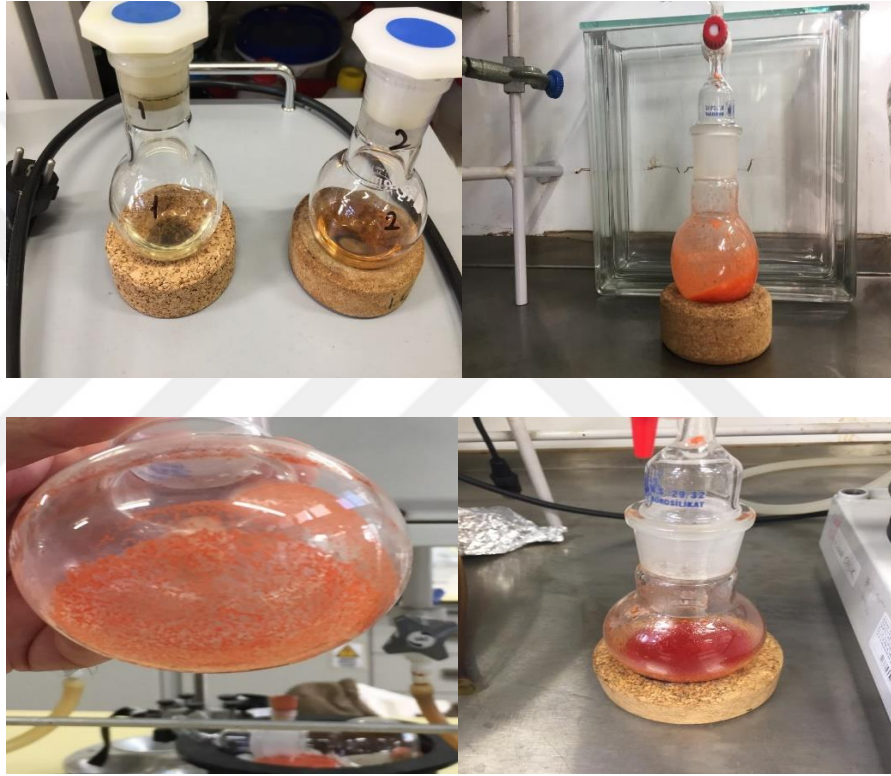
Çalışmada daha yüksek verimde pigment elde edebilmek için diyaliz yöntemi denenmiştir ve diyaliz yöntemi kullanılarak tuzdan arındırma işlemi yapılmıştır. Tuz uzaklaştırma işleminden sonra tuzdan arındırılmış pigment'in analizi diyaliz içinde tuzun bulunmadığını gösterdi. Diyaliz yöntemi ile pigment tuzdan çöktürülerek ortamdan ayrılmıştır. Diyaliz yöntemi işleminin aşamaları (Şekil 3.7)'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Pigment'in diyaliz yöntemi ile tuzdan arındırılma görüntüleri (Diyaliz öncesi ve sonrası elde edilen ürün)

3.8. Kolon Kromatografisi

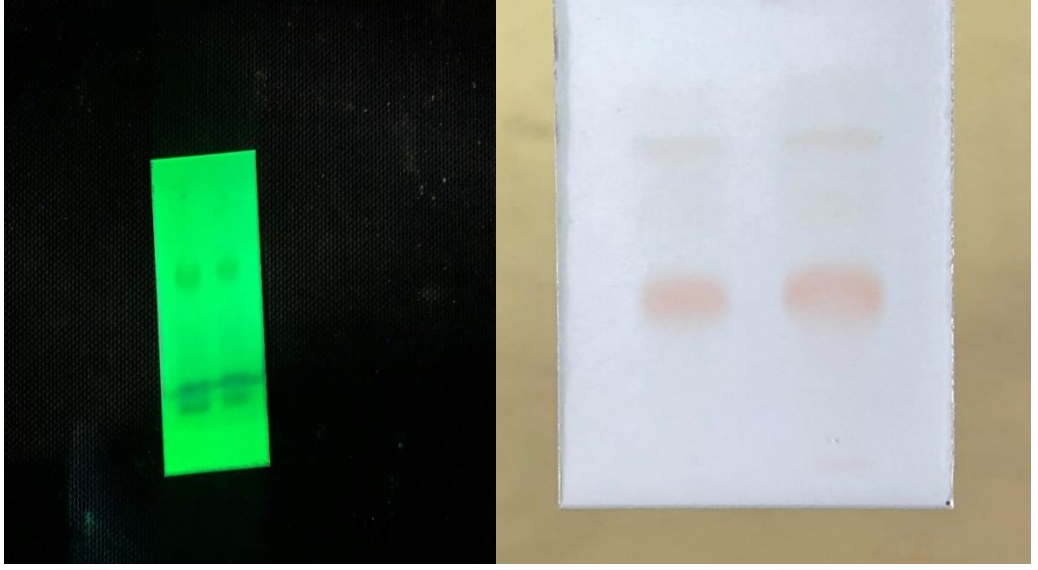
Temel kolon kromatografisinde polariteye göre ayrışma görülür. Karışımın içerdiği sabit faz, hareketli faz ve maddeler arasındaki etkileşim türü, moleküllerin birbirinden ayrılmasında etkili olan temel bileşendir. Kolonu silika ile doldurup biraz çözücü eklenmektedir ve hareketli faz heksan: aseton (1:1), durağan faz olarak silika kullanılmıştır. Ayrıştırmak istediğimiz maddemizi dökeriz kolonun çatlamaması için çözücü eklenir sürekli. Farklı polaritede madde olduğundan şeritler halinde ayırım gerçekleştirilmektedir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Kolon kromatografisi sonucu elde edilen pigment görünümü

3.9. İnce Tabaka Kromatografi (TLC)

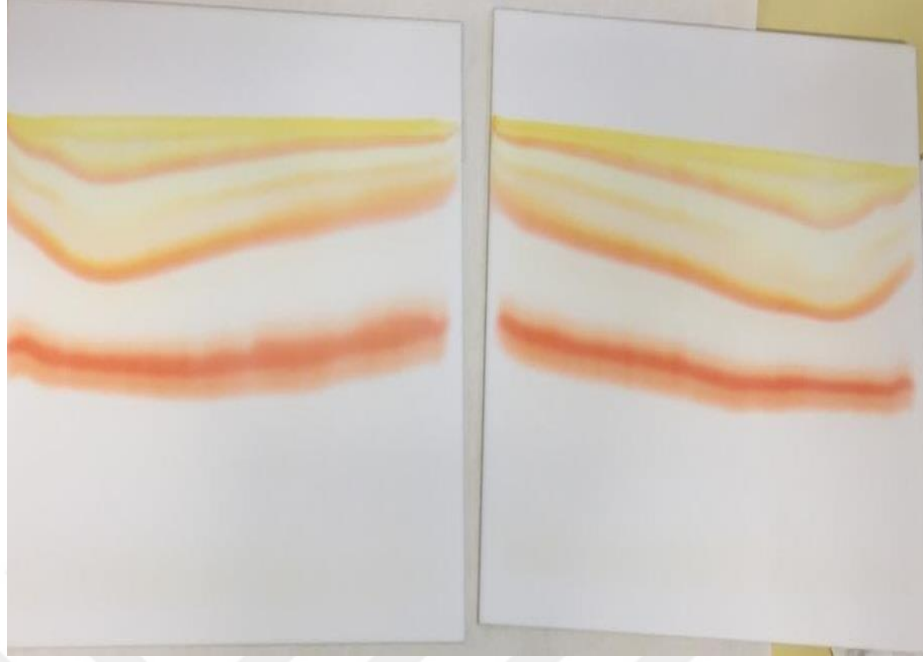
Bu analiz için aseton özütü, bir TLC silika jel plakasına (Merck, Darmstadt, Almanya) yerleştirildi ve heksan: aseton (1:1) çözücüsü içinde yüzdürüldü. Ultraviyole (UV) ışık altında karışımındaki maddelerin bant görüntüsü (Şekil 3.9.) gösterilmiştir.



Şekil 3.9. İnce tabaka kromatografisinde, ultraviyole (UV) ışık altında karışımdaki maddelerin bant görüntüsü

3.9.1. Preparatif ince tabaka kromatografisi (P-TLC)

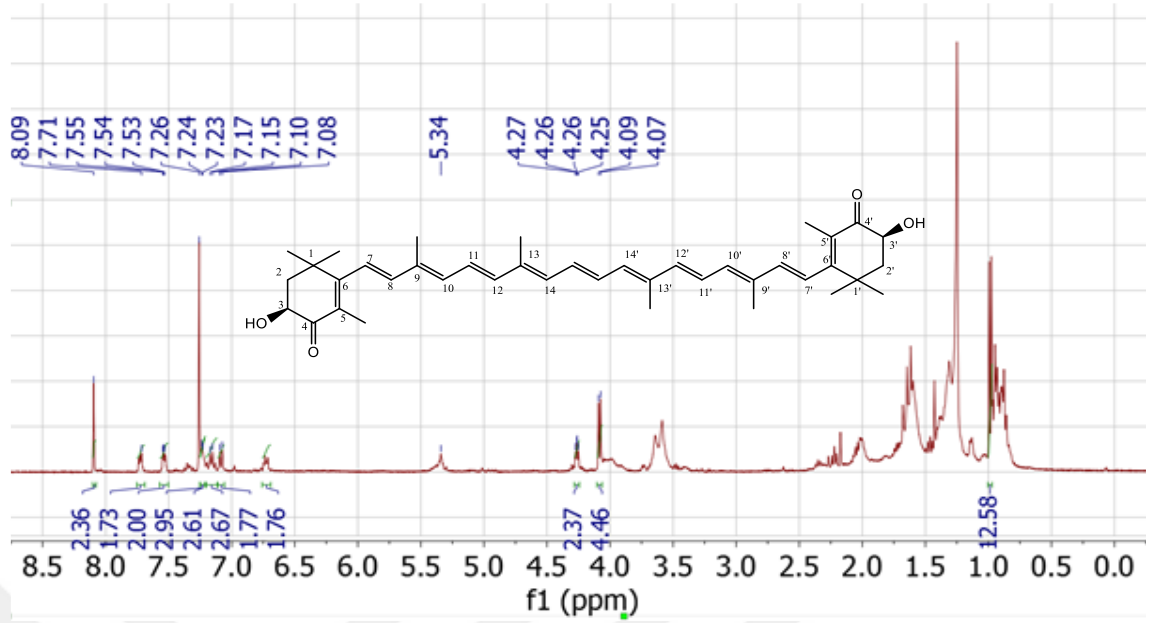
P-TLC öncesi uygun adsorban ve çözücü seçiminden sonra işlem aynen ince tabaka kromatografisine benzer şekilde uygulanmıştır. Yürütücümüz heksan: aseton (1:1) çözücüsü tercih edilmiştir. Ekme işlemi ucu sıcaklıkla inceltilmemiş kapiler tüp yardımıyla şeritler halinde ekim yapılır. Yürütme tankına çözücü konularak uygun boyutta süzgeç kâğıdı ile tank doygunluğu sağlanır. Ekilen plakalar tanka yerleştirilerek tankın ağzı sıkıca kapatılır. Yürütme işleminden sonra plakalara UV lambası ile bakılarak şeritler spatül yardımıyla belirgin hale getirilir. Her bir şerit ayrı ayrı cam plaka yüzeyinden kazınarak maddeleri çözen kloroform ile ekstrakte edilir (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. Preparatif ince tabaka kromatografisi (P-TLC) yöntemi kullanılarak karışımdaki maddelerin ayrılması

3.10. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi)

İnce tabaka kromatografileri Merck Kieselgel 60 GF254 hazır tabakalarda alındıktan sonra NMR analizi gerçekleştirildi. Yapı NMR ve LC-MS/MS ile karakterize edilmiştir. (Şekil 3.11)'de görüldüğü üzere *Haloferax alexandrinus*'tan üretilen pigmentin proton NMR analizi görülmektedir.

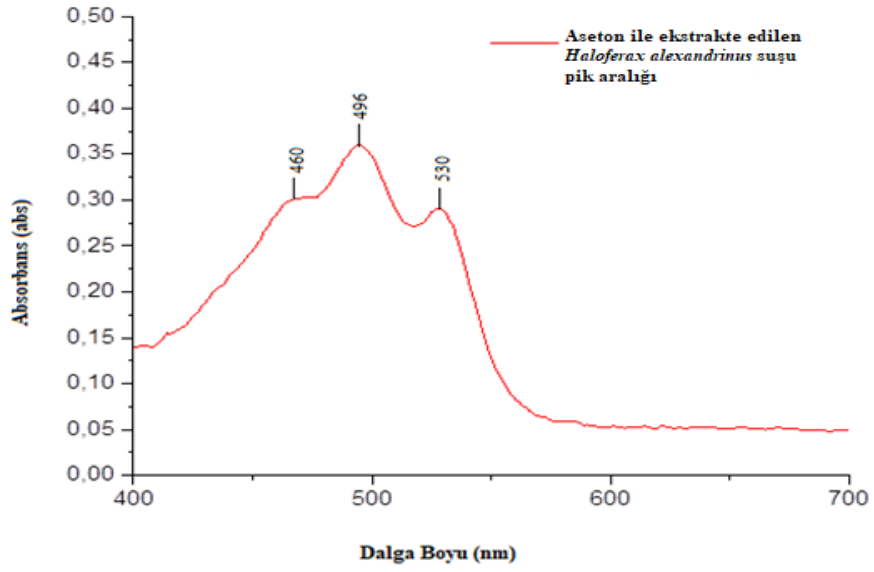


Şekil 3.11. *Haloferax alexandrinus*'tan üretilen pigmentlerden birinin proton NMR spektrumu

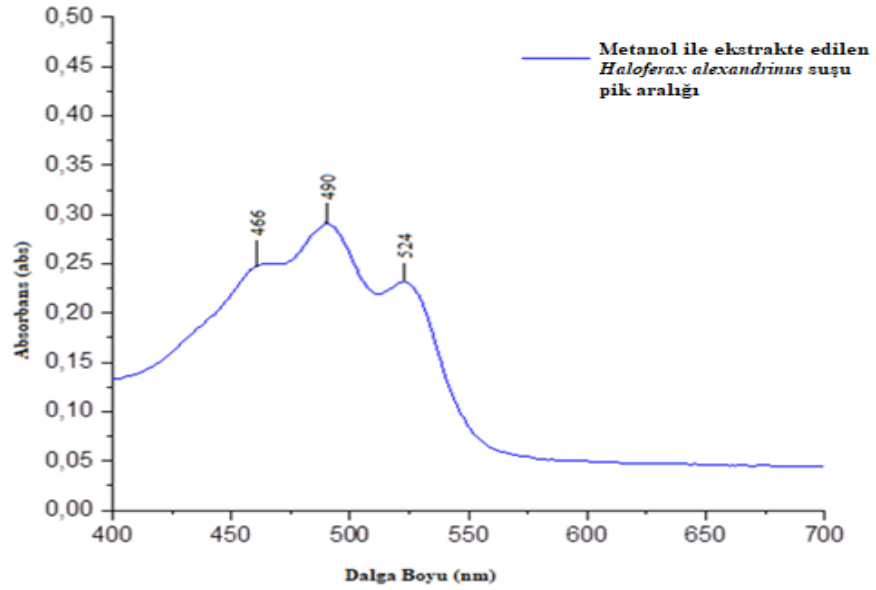
Proton NMR'ı yorumlandığında, 7.08-7.71 ppm aralığında gelen 7 farklı ve toplamda 14 hidrojenin astaxanthinin olefinik hidrojenlerine ait olduğu düşünülmektedir. 4.26 ppm de triplet ve 2H olarak gelen sinyalin 3 ve 3' nolu karbonlara bağlı olan hidrojenlere ait olduğu düşünülmektedir. Ayrıca 4.08 ppm de dublet 2H olarak gelen sinyalin 2 ve 2' nolu karbon atomlarına bağlı hidrojenlere ait olduğu düşünülmektedir.

3.11. UV-VIS Analizi

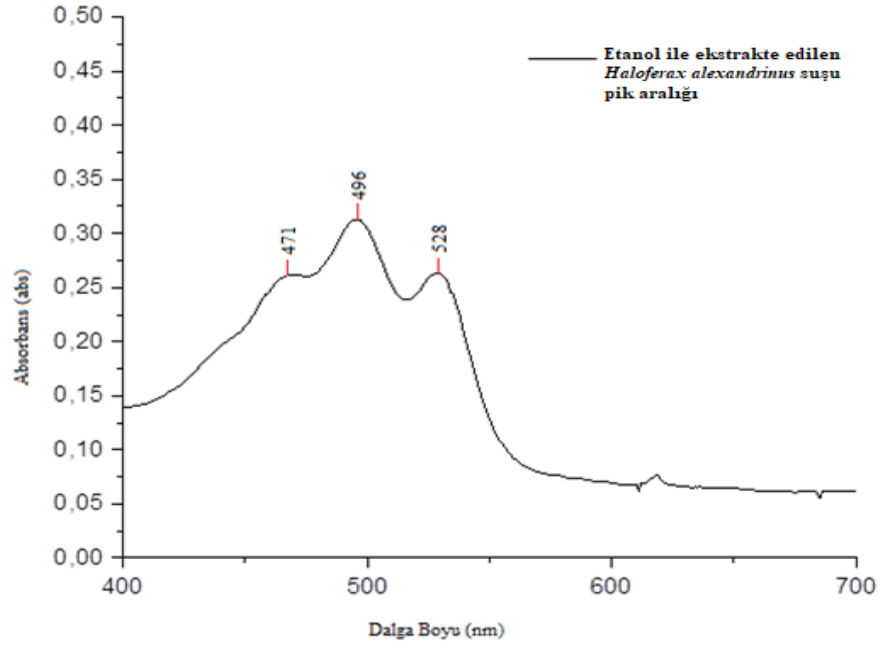
UV-VIS analizleri Shimadzu UV-2101PC UV-VIS Tarama Spektrofotometresi cihazında ölçümleri yapılarak en yüksek absorbans değerleri gösterilmiştir. Aseton ile ekstrakte edilen *Haloferax alexandrinus* suşu pik aralığı UV-VIS spektrumunda verdiği maksimum absorbans değeri 496 nm'de görülmüştür ve (Şekil 3.12.)'de gösterilmiştir. Metanol ile ekstrakte edilen *Haloferax alexandrinus* suşu pik aralığı UV-VIS spektrumunda verdiği maksimum absorbans değeri 490 nm'de görülmüştür ve (Şekil 3.13.)'de gösterilmiştir. Etanol ile ekstrakte edilen *Haloferax alexandrinus* suşu pik aralığı UV-VIS spektrumunda verdiği maksimum absorbans değeri 496 nm'de görülmüştür ve (Şekil 3.14.)'de gösterilmiştir.



Şekil 3.12. Aseton ile ekstrakte edilen *Haloferax alexandrinus* 'un UV-VIS Spektrum analizi (Shimadzu UV-2101PC UV-VIS Tarama Spektrofotometresi)



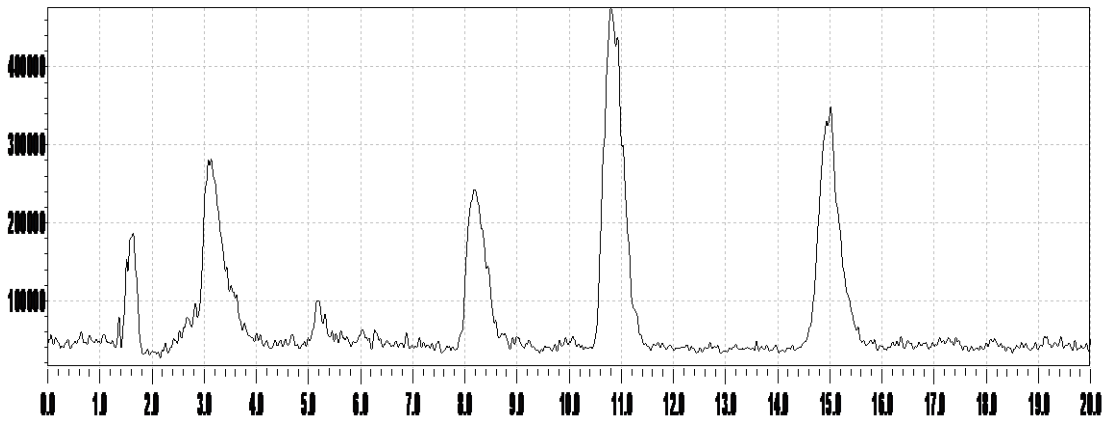
Şekil 3.13. Metanol ile ekstrakte edilen *Haloferax alexandrinus* 'un UV-VIS Spektrum analizi (Shimadzu UV-2101PC UV-VIS Tarama Spektrofotometresi)



Şekil 3.14. Etanol ile ekstrakte edilen *Haloferax alexandrinus*'un UV-VIS Spektrum analizi (Shimadzu UV-2101PC UV-VIS Tarama Spektrofotometresi)

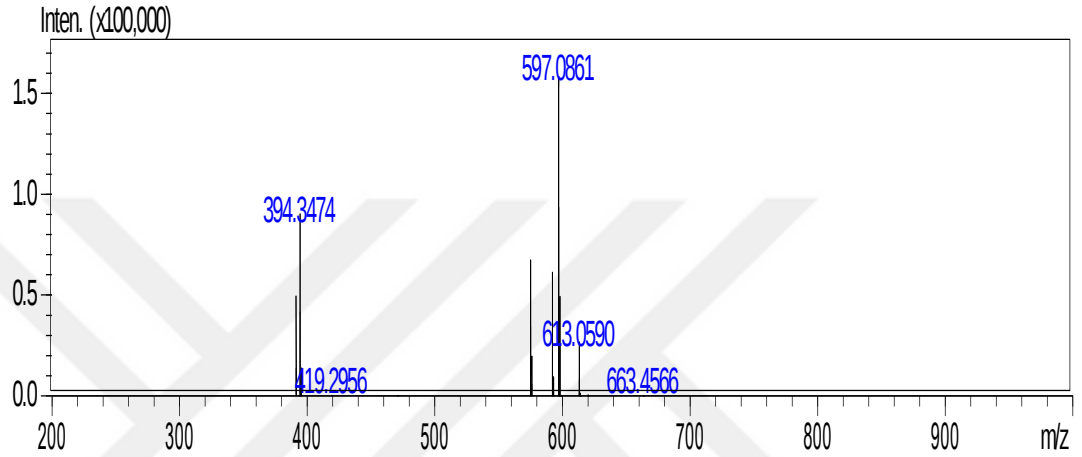
3.12. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

Haloferax alexandrinus türünün aseton ekstraktına LC-MS/MS analizi yapılarak m/z değerleri belirlenmeye çalışılmıştır. *Haloferax alexandrinus* türünün aseton ekstraktının yapılan LC analizinde 6 farklı beta karoten türünün varlığı belirlenmiştir. LC analizine ait kromatogram (Şekil 3.15.)'de gösterilmiştir.



Şekil 3.15. *Haloferax alexandrinus* türüne ait LC kromatogramı

Yapılan LC-MS analizleri sonucunda alıkonma zamanı 11 dakika olan pike ait $[M+H]^+$ değeri 597.0861 olarak bulunmuştur. Elde edilen deneysel $[M+H]^+$ değer, Haloferax alexandrinus türü tarafından üretilen astaksantin pigmentine ait teorik $[M+H]^+$ değeri olan 579.39 değeri ile örtüşmektedir. MS spektrumu (Şekil 3.16.)'da gösterilmiştir. MS ve NMR sonuçları birlikte değerlendirildiğinde alıkonma zamanı 11 dakika olan beta karotenoidin astaksantin olduğu düşünülmektedir.

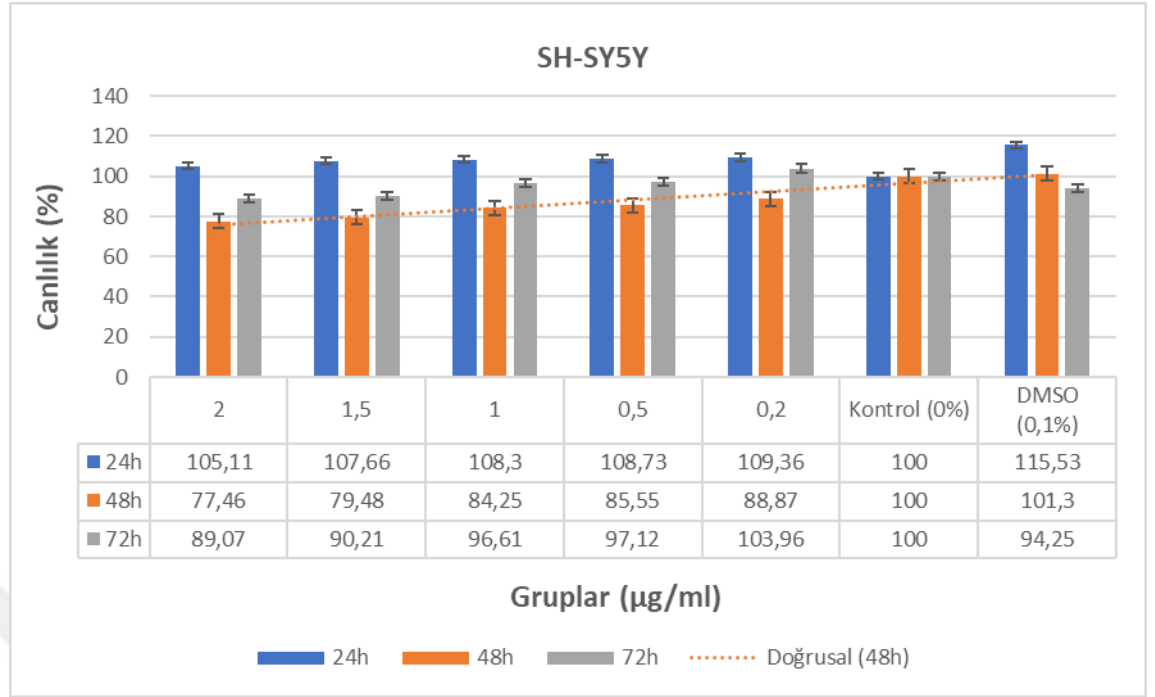


Şekil 3.16. Haloferax alexandrinus türünün aseton ekstraktının LC kromatogramında 11. dakikadaki pike ait MS spektrumu

LC kromatogramındaki diğer 5 pike ait beta karoten türlerinin izolasyonları gerçekleştirilemediği için yapıları NMR ve MS ile aydınlatılamamıştır.

3.13. MTT Testi

Sinir hücrelerinde ortaya çıkan hasar çeşitli fizyolojik bozukluklara neden olabildiği gibi, nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkili olabilmektedir. Bu çalışmada insan sinir hücresi hattı olan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında total karotenoid pigment özütü hücreleri maruziyet sonucunda oluşabilecek nörotoksik etkiler araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında SH-SY5Y hücreleri 24,48 ve 72 saat süresince 0.2, 0.5, 1, 1.5, ve 2 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında total karotenoid pigment özütü hücrelerine maruz bırakılmıştır. Uygulama sonrasında karotenoid hücrelerinin nörotoksitesi MTT (3-(4 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2 5 difenil tetrazolium bromid) testi ile incelenmiştir (Şekil 3.17.).



Şekil 3.17. İnsan nöroblastom hücre hattı SH-SY5Y hücrelerinde 24,48 ve 72 saatlik karotenoid pigment hücre özütlerinin uygulaması sonrası MTT testi yüzde (%) canlılık sonuçları

Karotenoid ekstraktının farklı dozları ile yapılan MTT testinde en iyi etki 48 saatlik bölümde gerçekleşmiştir. 48 saatte artan doza bağlı olarak hücre canlılığında 2 µg/ml konsantrasyonda kanser hücrelerindeki canlılık %23 azalmıştır. IC₅₀ değeri >2 µg/ml olarak bulunmuştur.

4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Karotenoid pigmentler birçok alanda özellikle gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde renklendirici ve gıda takviyesi olarak kullanılmaktadırlar. Karotenoidler insan sağlığına da fayda sağladıkları için olağanüstü önem kazanmışlardır. Bu yüzden mikrobiyal alanlarda doğal karotenoid kaynaklarını araştırmak için büyük çabalar sarf edilmektedir ve karotenoid kullanımı göz ardı edilemeyecek derecede artmıştır. Karotenoid üretiminin verimini artırmak için kültür koşullarının uygunluğu, mikroorganizmalar tarafından karotenoid üretiminin yüksek maliyetini düşürmek için kullanılan önemli stratejilerden biridir. Kullanım alanlarının artışından, dolaylı olarak mevcut saflaştırma yöntemlerinden farklı yöntemlerinin ihtiyacına gerek duyulmaktadır [84].

Parlak çekici renkleri toksik madde içermemeleri, ucuz ve kolay elde edilebilme özelliklerinden dolayı çevre dostu mevcut fiziksel ve kimyasal analiz yöntemlerinde avantaj sağlamaktadır. Ayrıca biyolojik kökenli doğal pigmentler, antioksidan, antimikrobiyal, katkı maddeleri, renk yoğunlaştırıcılar ve antikanser olarak kullanıldığı için tıbbi öneme sahiptir ve ekonomiktirler. Doğal gıda renklendiricilerinin mikrobiyal fermentasyon yöntemiyle endüstriyel üretimi, daha ucuz ve kolay ekstraksiyon yöntemi, yüksek verim, hammadde eksikliği ve mevsimlik olmaması gibi birçok avantaja sahiptir [85].

Bu çalışma, halofilik bir arke olan *Haloferax alexandrinus*'tan elde edilecek pigmentin optimum üretim şartlarının belirlenmesine yöneliktir. Doğal karakterleri ve kullanım güvenliği, tıbbi özellikleri, vitaminler gibi besin maddeleri, mevsim ve coğrafi koşullardan bağımsız üretim, kontrol edilebilir ve öngörülebilir verim nedeniyle mikrobiyal pigmentlere artan bir ilgi vardır [86].

Birçok halofilik arke türleri, kültür koşullarına göre pigment üretme yeteneğine sahiptir. Aslında pigmentin hücre zarına destek görevi gördüğü ve mikroorganizmayı DNA'ya zarar veren ajanlara karşı koruduğu için önemli biyolojik işlevlere sahiptir. Ayrıca, halofilik arkelerden elde edilen karotenoid özleri, yüksek antioksidan kapasite göstermiştir [88].

Haloferax alexandrinus'dan karotenoid üretimi renginden dolayı öncelikli olarak gösterişli yapısı dikkat çekmektedir. Ayrıca bu mikroorganizma tarafından sentezlenen pigment, hücrelerini iyonlaştırıcı radyasyon, UV radyasyonu ve hidrojen peroksitin öldürücü etkilerine karşı koruma işlevine sahip olduğu bulunmuştur. Halofilik arkeler tarafından üretilen karotenoidler hem membran stabilizasyonu hem de oksitleyici ajanlara karşı koruma rolleri oynayabildiğinden, bu bileşikler bu tür mikroorganizmaların hayatta kalması için büyük öneme sahiptirler. Artan tüketicilerin istekleri sonucunda sağlık ve çevre şartları düşünüldüğünde bu tür kaygıları aza indirebilmek nedeniyle endüstride sentetik pigmentlerin günümüzde geçerliliğini yavaş yavaş yitirdiğini görmek ve doğal pigment arayışı ve kullanımına geçmek için artık bir alternatif olarak karşımıza çıkıp kullanılması önerilmiştir [88].

Bu çalışmada, *Haloferax alexandrinus*'un pigment üretme yeteneğini kullanarak izole edilen karotenoidlerde saflaştırma çalışması yapılmıştır. Mikroorganizmalarda

birçok çeşitli pigment saflaştırma ve belirleme yöntemleri kullanılmıştır. Ancak *Haloferax alexandrinus*'da saflaştırma tekniklerinin kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca izole edilen karotenoidlerin TLC, NMR ve LC/MS-MS ile tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz pigment ile sitotoksite testi (MTT) yapılarak çalışma genişletilmiştir. *Haloferax alexandrinus* türünün kullanılarak saflaştırılan pigmentin çevre dostu ve pratik olması çoğu endüstride kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Haloferax alexandrinus pigment üretim aşamasında ışığın etkisinin pigmentasyonunda veya biyokütle konsantrasyonunda hiçbir fark olmadığı ortaya konmuştur. Işık halofilik arkelerin pigmentasyonu üzerindeki etkisi büyük ölçüde türlere bağlıdır. *Halobacterium salinarum* türü (ATCC 33170) ile yapılan benzer bir çalışmada da ışığın bir etkisi ortaya konmamıştır [87].

Tuz konsantrasyon seviyesinin pigmentin kazanımına etkisini araştırdığımızda %20'lik tuzlu su besiyerinde pigmentin koyu renge dönüştüğünü ve optimal üreme derecesine çıktığı gözlemlenmiştir. Tuzlu konsantrasyonu %25'e çıkarıldığında pigmentin renginin değişmediği fakat üreme oranının düştüğü gözlemlenmiştir. Belli bir yerden sonra pigmentin renk ve üreme değişiminin fazlar arasındaki gerçekleşen yapısal polaritesine bağlı olarak değişimden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Farklı pH derecelerinin konsantrasyon seviyesinin pigmentin kazanımına etkisini araştırdığımızda en uygun pH değerinin 8 olduğu yapılan çalışmada gözlemlenmiştir.

Haloferax alexandrinus'un ekstraksiyon aşamalarından sonra gerçekleşen kolon kromatografi analizi sonuçlarına göre pigmentimizin oksijen ile teması ile ince tabaka kromatografisinde UV ışık altında bakıldığında birden fazla spot oluşumunun gözlemlendiği ve pigmentin yapısının bozulmasına yol açtığı gözlemlenmiştir. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi analizinden sonra bozulmanın olduğu desteklenmiştir.

Haloferax alexandrinus'un aseton ile ekstraksiyonundan sonra yapılan UV-VIS spektrum analizleri sonucunda elde ettiğimiz 460, 496, 530 dalga boyları, benzer çalışmalarda belirtilen değerler aralığında olduğu ortaya konmuştur. Elde edilen UV-VIS spektrum analiz sonuçları çalışmayı destekler niteliğindedir.

Karotenoid pigment özütü hücrelerinin potansiyel antikanser aktivitesi bulunmaktadır. Epidemiyolojik araştırmalar, bu bileşiklerin etki mekanizmaları hakkında

nadiren kanıt sağlar ve farklı tedavi zamanlarındaki biyolojik etkileri hala belirsizdir [99]. Bu çalışmanın amacı, insan nöroblastom hücrelerinin dizilerinde karotenoidlerin hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemektir. İnsan nöroblastom hücre hatları, 24, 48 ve 72 saat boyunca karotenoid ekstraktı (0.2-2 µg) ile muamele edilmiştir. Nöroblastom hücre hattında total karotenoid ekstraktına maruziyet sonucunda oluşabilecek toksik etkiler araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında SH-SY5Y nöroblastom hücreleri 24,48 ve 72 saat süresince 0.2, 0.5, 1, 1.5, ve 2 µg dozlarında total karotenoid ekstraktına maruz bırakılmıştır. Uygulama sonrasında karotenoid ekstraktının sitotoksikite etkisi belirlenmiştir ve 48 saatlik uygulamada doza bağlı olarak sitotoksikite etkisinin arttığı gözlemlenmiştir. 48 saatlik uygulamada IC50 değeri >2 µg/ml olarak bulunmuştur.

Abbes (2013) ve arkadaşlarının *Halobacterium halobium*'dan ekstrakte edilen karotenoidlerin biyolojik özellikleri insan hepatoma (HepG2) hücre hatları üzerinde araştırılmış ve canlılığı MTT testi ile değerlendirilmiştir. Hücreler, 0,2 ila 1,5 uM arasında değişen öldürücü konsantrasyonlarda 24 ve 48. saatlerde kaydedilmiş. Artan konsantrasyonlar karotenoid özütü ile tedavi edilen HepG2 hücreleri, zamana ve doza bağlı bir şekilde hücre canlılığında önemli bir (P <0.05) azalma göstermiş. Aslında düşük karotenoid özütü konsantrasyonlarında (0.2- 0.5 uM), optik mikroskopi ile ortaya çıkan morfolojik modifikasyonlara rağmen, kontrole kıyasla hücre canlılığında önemli bir düşüş kaydedilmemiştir. Bu ekstraktın doza bağlı bir şekilde hücre ölümünü indüklediği bildirilmektedir [100].

Burgess (2008) ve arkadaşları çalışmasında, likopenin normal insan plazma konsantrasyonları boyunca hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini ölçmek için yedi insan hücre hattı kullanmış ve yedi hücre tipi, kanserli ve kanserli olmayan hücreleri 24, 48 ve 72 saat boyunca 0.0001 ila 10 µM likopen ile tedavi edilmiş ve elektronik olarak sayıldığı bildirilmiş. Kontroller ve deney numuneleri, Mann-Whitney U-testi kullanılarak %95 güven seviyesinde karşılaştırıldığı belirtilmiş. Tüm hücreler normal olarak büyüdüğü ve kontrollerin hiçbirisi arasında önemli bir fark bulunmadığını tespit edildiği belirtilmektedir. Hep-G2, karaciğer adenokarsinom hücre çizgisi, 24 saat sonra yüksek dozlarda bir azalma göstermekte ve IMR-90, kanserli olmayan akciğer hücre hattı 72 saat sonra solvent kontrolüne kıyasla en yüksek dozda bir azalma gösterdiği belirtilmektedir. A431, cilt karsinomu DU-145, prostat karsinomu HS-68, kanserli olmayan cilt A549, akciğer karsinomu ve HS-578T meme karsinomu proliferasyonda hiçbir azalma

göstermediği tespit edilmiştir. Bu, fizyolojik aralıktaki likopenin, bir hücre proliferasyonunu önemli ölçüde etkilemediği bildirilmektedir [101].

Kim (2016) ve arkadaşları astaksantin pigmentinin mide kanseri hücreleri olan (AGS, KATO-III, MKN-45 ve SNU-1) hücre hatları dizilerinde antikanser etkilerinin mekanizmasını araştırılmış ve her hücre çizgisi, kültür ortamında 24 saat boyunca %1 DMSO içinde 0, 10, 50 ve 100 μ M astaksantine maruz bırakıldığı bildirilmektedir. KATO-III ve SNU-1 hücrelerinin proliferasyonu, doza bağlı bir şekilde astaksantin uygulaması ile önemli ölçüde baskılandığı ve 100 μ M'deki astaksantin protein sentezinin inhibisyonunu ve hücre proliferasyonunun baskılandığı, MKN-45 hücre hatlarının ise hücre döngüsünü etkilemedi bildirilmektedir. İstatistiksel anlamlılık Mann-Whitney U testi ile araştırılmıştır. Farklılıklar, <0.05 bir p-değerinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildiği bildirilmiştir. Astaksantin ve likopen gibi diğer karotenoidler, hücre döngüsü ilerlemesini modüle ederek tümör hücrelerinin büyümesini azaltacağı ve astaksantin pigmentinin, hücre döngüsü durmasıyla ilgili hücre büyümesini inhibe edebilir ve ayrıca kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebileceği yapılan çalışmada belirtilmiştir [102].

Lizama (2021) ve arkadaşları aşırı halofilik mikroorganizmalardan *Haloarcula* sp. ALT-23; *Haloarcula* sp. TeSe-41; *Haloarcula* sp. TeSe-51; *Haloarcula* sp. Te Se-89 ve *Halorubrum tebenquichense* suşları TeSe-85 ve Te Se-86 ile insan epidermal keratinositleri (HaCaT) hücrelerinin canlılık üzerindeki etkisini belirlemek için 24, 48 ve 72 saat 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31, 15 μ g/mL karotenoid antioksidan bileşenlerine maruz bırakılmış ve MTT tahlili ile değerlendirilmiş hücre canlılığının 6 saat sonra önemli bir düşüş gösterdiği bildirilmektedir. Ancak aynı konsantrasyonlar 24, 48 ve 72 saat sonra farklılık göstermediği bildirilmektedir. 250 μ g/mL'lik konsantrasyon hücre canlılığını artırma eğilimi göstermiş, 15 μ g/mL'lik konsantrasyonda hücre canlılığında 6. ve 48. saatlerde bir azalma gözlenirken, 24 ve 72. saatlerde anlamlı bir farklılık gözlenmediği belirtilmektedir. İstatistiksel anlamlılık Kruskal–Wallis istatistik testi kullanılarak testi ile araştırılmıştır. Farklılıklar, $\pm$ SD, $p < 0.05$ değerinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildiği bildirilmiştir [103].

Çıkan veriler sonucunda karotenoid ekstraktın tedavi gören tümör hücrelerinin sayısında önemli bir düşüş göstermektedir. Karotenoidlerin ayrıca yapılan kontroller sonucunda 72 saatlik uygulamada da hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Bu bulgular,

karotenoidlerin kanserle biyolojik etkileşim için potansiyel ajanlar olduğunu göstermektedir. İnsan nöroblastom hücreleri üzerinde yapılan çalışmanın sonuçlarında tümör hücreleri üzerindeki karotenoid ekstraktının sitotoksitesinde doza bağlı bir artış gösterdiği ortaya koyulmuştur. Ekstraktların konsantrasyonu arttıkça hücrelerde sitotoksite artar, bu da karotenoidlerin hücrelerinin antikanser aktivitesini göstermektedir.

Naziri (2014) ve arkadaşlarının *Halorubrum sp.*, TBZ126 halofilik bir arke türünden karotenoid üretiminin analiz çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada karotenoidlerin aseton-metanol (7:3 v/v) çözücü ile ekstrakte edildiği ve karotenoidlerin tanımlanması UV-VIS spektroskopisi ile yapılmış ve ince tabaka kromatografisi (TLC) ile doğrulanmıştır. Sıvı kromatografi kütle spektroskopisi (LC-MS) teknikleri kullanılarak analiz edilmiştir. LC-MS analitik sonuçları sonucunda üretilen karotenoidlerin bakteriorun, likopen ve β -karoten olduğunu ortaya koymuştur. Bakteriuberin, üretilen baskın karotenoid olarak bulunmuştur. TLC'si analizi sırasında heksan:aseton (7:3) solvent kullanmış. Çalışmasında 0.1% BHT antioksidan olarak kullanılmıştır. Kütle spektrumları, 300 ila 2000 m/z kütle aralığında pozitif iyon modunda kaydedilmiştir ve karotenoidlerin tanımlanması, alıkonma süresi, UV spektrumları ve kütle spektrumlarının (protonlanmış molekül ([M+H]) özellikleri karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir.) ve onun MS/MS fragmanları tüm karotenoidler için UV-görünür bir dedektör ile 450 nm'de izlenmiştir. UV absorpsiyon özellikleri ile ve ayrıca elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Bakteriuberinler için 466 nm, 495 nm ve 528 nm, Likopen için 448 nm, 474 nm ve 505 nm ve β -karoten için 425 nm, 455 nm ve 482 nm'dir [104].

Bizim çalışmamızda ise *Haloferax alexandrinus* türünün UV-VIS spektrum analizleri sonucunda pik değerleri 530,496 ve 460 nm'de absorpsiyonları karşılaştırıldığında bakteriuberin pigmentine benzediği fakat LC-MS karakterizasyon çalışmalarını yapmış ve MS/MS kütle spektrumu analizleri sonucumuzda istediğimiz bölgenin iyi parçalanmaması nedeniyle bakteriuberin pigmentinin tespiti yapılamamış olasılık olarak yüksek olduğu gösterilmektedir.

Stokkeland (2019) yaptığı mikroalglerdeki farklı yetiştirme ortamlarından pigmentlerin, LC-MS karakterizasyon çalışmalarını yapmış ve MS/MS kütle spektrumu analizleri sonucunda kırmızı renkte yetiştirilen *Porosira glacialis* örneklerinin 147.1165

m/z'de parçalandığını ve astaksantin varlığının kütle spektrumu sonucu belirlenmiştir [105].

Sui (2014) güneş tuzlarından izole edilen halofilik C50 karotenoid üreten arkelerin karakterizasyon çalışması yapmış ve hipersalin ortamlarda bulunan mikroorganizmaların çoğunu oluşturduğundan arke hücrelerinde biriken C50 karotenoidleri, potansiyel biyoteknolojik ürünler olarak kabul edilebileceği ve bir dizi biyolojik işlevlere sahip olduğunu belirtmiştir. *Haloferax alexandrinus*'un elde edilen pigmentin turuncu-kırmızı olduğu ve TLC analizleri sonucu bakteriuberin, β -karoten ve kantaksantin pigmentlerini içerdiği belirtilmiştir. *Halobacterium SP-2* ve *Halorubrum SP-4* iki suşun pigmentasyonunun tuza bağımlı olduğunu ve 150-300 g aralığında tuzlulukla arttığını göstermektedir. Bu bulgular, Rodríguez-Valera (1980) ve arkadaşlarının, *Halobacterium volcanii* kolonilerinin 150 g tuzluluk altında güçlü pigmentli olduğunu ve 250 g tuzluluktan 20 kat daha fazla pigment yoğunluğunun olduğunu bildirmiştir. Asker ve Ohta (2002), ayrıca, %25 ve %20 NaCl'de, *Haloferax alexandrinus* kolonilerinin turuncu-kırmızı olduğunu, esas olarak bakteriuberinler, astaksantin, β -karoten ve kantaksantin içerdiğini, ancak konsantrasyon %15'e düşürüldüğünde pigmentin yoğunluğunun, renginin ve içeriğinin değişebileceği belirtilmiştir. 250 g tuzluluk ortamında ve pH 7'de optimal büyüme gösterdiği pigment üretiminin pH 8'de en yüksek olduğu ve tuzluluk seviyesinin 150-300 g aralığından fazla tuz yoğunluğunun artması pigment birikiminin azaldığı bildirilmektedir. Ek olarak, C50 karotenoid bakteriuberin, her iki suşta da ana pigment olarak görüldüğü saptanmıştır [106].

Herrero (2012) ve arkadaşlarının yaptığı analizler sonucu *Haematococcus pluvialis*'ten astaksantin ekstraksiyonu için dört farklı ekstraksiyon yöntemi uygulanmış ve yoğun bir şekilde değerlendirilmiştir, spektrofotometrik analiz ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri sonucu astaksantin'in maksimum absorbans değerinin 470-480 nm arasındaki dalga boyu ile tespit edildiği bildirilmiştir. *Haematococcus pluvialis*'ten astaksantin konsantrasyonunun ölçülmesinde HPLC daha fazla tercih edilmektedir [107].

Will (2015) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Haloferax mediterranei* türü kullanılarak karotenoid pigmenti üretimi ve optimal şartların belirlenmesi rapor edilmiştir. Çıkarılan pigmentin kırmızı renkli olduğu ve %52,4 oranında bakteriuberin

pigmenti olduğunu HPLC analiz ve kütle spektrometrisi analizleri sonuçları belirlemişlerdir. *Haloferax mediterranei*, *Halobacterium salinarium* ve *Haloferax volcanii* türlerinin polar olmayan çözücüler ile ekstrakte edilerek yapılan çalışmalar doğrultusunda bakteriuberin, astaksantin, β -karoten, likopen ve kantaksantin gibi karotenoid pigmentlerin üretiminin olduğu belirlenmiştir [108].

Simó (2021) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Haloferax mediterranei* türü kullanılarak yedi günlük kültürle optimum büyüme oranı %17,5 tuz konsantrasyonunda gözlemlendiği ve 1 mL kültür hesaplamaları sonucunda toplam karotenoid içeren miktar 22,4 mg kuru ağırlık biyokütlesi ürettiği bildirilmiştir. Ayrıca UV-VIS spektrum analizleri sonucunda elde edilen değerlerin, benzer çalışmalarda belirtilen değerler aralığında olduğu için elde edilen UV-VIS analiz sonuçları çalışmayı destekler niteliktedir. Simó (2021) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Haloferax mediterranei* türü kullanılarak spektrum analizleri sonucunda pik değerleri 530, 495 ve 470 nm'de maksimum ile, karakteristik absorpsiyon spektrumu ile belirlendiği üzere bakterioruberin içerdiği ve pembemsi/kırmızımsı pigmentasyon rengi gözlemlendiği belirtilmiştir [109].

Bizim çalışmamızda ise *Haloferax alexandrinus* türünün spektrum analizleri sonucunda pik değerleri 530,496 ve 460 nm'de maksimum ile, karakteristik absorpsiyon spektrumu ile belirlendiği üzere astaksantin içerdiği ve turuncu/kırmızımsı pigmentasyon rengi gözlemlendiği belirtilmiştir.

Minyuk (2018) yeşil bir mikroalg türü olan *Bracteacoccus minor* ile karotenoidlerin TLC ve UV-Vis Spektroskopisi ile analizini yapmış astaksantin pigmentinin biyoteknolojik olarak önemini vurguluyarak, üreticilerine vurgu yaparak TLC ve UV-Vis spektroskopisi ile pigment analizlerinin yapılmasının diğer potansiyel saflaştırma tekniği olan HPLC gibi ayırma tekniklerinin kullanmanın yanı sıra TLC ile ayırmanın yapılmasının daha kolay ve güvenilebilirlik açısından özel önem verilmesi gerektiğini belirtmiştir. TLC'si analizi sırasında sırayla iki solvent kullanmış: (1) heksan-aseton (9:1); (2) benzen-heksan-aseton (10:7:1.6) oranlarıyla ayırıştırma yapmıştır. UV-VIS analiz sonuçlarında 480, 474 ve 450 nm'de astaksantin pigmentini, 476,474 ve 450 nm'de kantaksantin pigmentinin absorbans değerlerini tespit etmiştir. Çalışmasında 0.1% BHT antioksidan olarak kullanılmıştır [110].

Bu çalışmanın devam ettirilmesi ile;

Haloferax mediterranei, türü üzerinde yapılan çalışmada karbon/azot dengesinin karotenoid biyosentezi üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir ilerleyen çalışmalar doğrultusunda buna benzer çalışmalar *Haloferax alexandrinus* türü kullanılarak da yapılabilir.

Karotenoidlerin farklı saflaştırma teknikleri kullanılarak elde edilen pigment miktarına olan etkisi araştırılabilir. Çeşitli haloferax türleri kullanılarak C50 pigment üretimi alanında derinlemesine çalışma eksikliği bulunmaktadır. Ekstrem şartlar altında yaşayabilen bu tür mikroorganizmaların kullanımı, büyümeleri için gerekli koşullar, enerji maliyetlerinin azaltılmasında çok önemli bir rol oynayan steril olmayan koşullar altında bile diğer mikroorganizmalar tarafından kontaminasyonu önlediğinden tavsiye edilir.

Karotenoid üretimi için koşulların optimizasyonu, ekonomik maliyetleri değerlendirilerek çalışmalar yapılabilir. Elde ettiğimiz verilere göre karotenoid pigment hücre özütleri antioksidan etki göstermektedir. Bu çalışmalar doğrultusunda karotenoidlerin çeşitli hücre kültürü testleri yapılarak yeni bulgular elde edilebilir.

Sonuç olarak bu çalışma; *Haloferax alexandrinus*'un, güçlü biyoaktif ajanların geliştirilmesi için yeni bir umut verici fırsatlar açabilecek ve güçlü bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varıldı. Bu çalışmada sunulan halofilik arke türünün, antitümör özelliği ile potansiyel kaynaklar olarak da kullanılabilir olabileceği belirtilmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Madern, D., Ebel, C., & Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4(2), 91-98.
- [2] Armstrong, G. A., & Hearst, J. E. (1996). Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB journal*, 10(2), 228-237.
- [3] Abushita, A. A., Daood, H. G., & Biacs, P. A. (2000). Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2075-2081.
- [4] Ağaoğlu, S., Çelik, H., Çelik, M., Fidan, Y., Gülşen, Y., Günay, A., ... & Yanmaz, R. (1997). Genel Bahçe Bitkileri, AÜ Ziraat Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları No: 4.
- [5] Velmurugan, P., Kamala-Kannan, S., Balachandar, V., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J. C., & Oh, B. T. (2010). Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 262-268.
- [6] Kumar, A., Vishwakarma, H. S., Singh, J., Dwivedi, S., & Kumar, M. (2015). Microbial Pigments: Production and Their Applications in Various Industries. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 5(1).
- [7] Asker, D., & Ohta, Y. (1999). Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *Journal of bioscience and bioengineering*, 88(6), 617-621.
- [8] Dağ, T. (2017). *Fusarium sp. İle Pigment Üretiminin Araştırılması*.
- [9] Siva, R. (2007). Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current science*, 916-925.
- [10] Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.
- [11] Casadio, F., Bezúr, A., Fiedler, I., Muir, K., Trad, T., & Maccagnola, S. (2012). Pablo Picasso to Jasper Johns: a Raman study of cobalt-based synthetic inorganic pigments. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(11), 1761-1771.

- [12] Korumilli, T. (2015). Studies on pigment production by microorganisms using raw materials of agro-industrial origin (Doctoral dissertation).
- [13] Soliev, A. B., Hosokawa, K., & Enomoto, K. (2011). Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: ECAM, 2011.
- [14] Mortensen, A. (2005). Analysis of a complex mixture of carotenes from oil palm (*Elaeis guineensis*) fruit extract. Food research international, 38(8-9), 847-853.
- [15] Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation structural and chromatic aspects. Journal of food science, 71(4), R41-R50.
- [16] Durán, M., Ponezi, A. N., Faljoni-Alario, A., Teixeira, M. F., Justo, G. Z., & Durán, N. (2012). Potential applications of violacein: a microbial pigment. Medicinal Chemistry Research, 21(7), 1524-1532.
- [17] Gamon, J. A., Qiu, H. L., & Sanchez-Azofeifa, A. (2007). Ecological applications of remote sensing at multiple scales. In Functional plant ecology (pp. 655-684). CRC Press.
- [18] Inoue, H., Yamashita, H., Furuya, K., Nonomura, Y., Yoshioka, N., & Lib, S. (1994). Determination of copper (II) chlorophyllin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 679(1), 99-104.
- [19] Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. The FASEB Journal, 9(15), 1551-1558.
- [20] Joy IV, R. W., Sugiyama, M., Fukuda, H., & Komamine, A. (1995). Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. Plant Physiology, 107(4), 1083-1089.
- [21] Dwarka, D., Murugan, N., Thaver, V., & Baijnath, H. (2020). A comparative microstructural study of the animal pigment, bilirubin, in seed arils of *Strelitzia nicolai*. South African Journal of Botany, 128, 109-118.

- [22] Joshi, V., & Attri, D. (2005). Solid state fermentation of apple pomace for the production of value added products. *Pollution in Urban Industrial Environment*, 180.
- [23] Chiba, S., Tsuyoshi, N., Fudou, R., Ojika, M., Murakami, Y., Ogoma, Y., & Yamanaka, S. (2006). Magenta pigment produced by fungus. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 52(4), 201-207.
- [24] Narsing Rao, M. P., Xiao, M., & Li, W. J. (2017). Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications. *Frontiers in microbiology*, 8, 1113.
- [25] Kumar, A., Vishwakarma, H. S., Singh, J., Dwivedi, S., & Kumar, M. (2015). Microbial pigments: Production and their applications in various industries. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 5(1).
- [26] Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). *Carotenoids Handbook* Eds, Compiled by AZ Mercadante and ES Egeland.
- [27] Ito, M., Yamano, Y., Tode, C., & Wada, A. (2009). Carotenoid synthesis: Retrospect and recent progress. *Archives of biochemistry and biophysics*, 483(2), 224-228.
- [28] Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Manabe, K., & Maoka, T. (2002). Structures of tobiraxanthins A1, A2, A3, B, C and D, new carotenoids from the seeds of *Pittosporum tobira*. *Tetrahedron letters*, 43(24), 4385-4388.
- [29] Tsuchida, T., Koga, R., Horikawa, M., Tsunoda, T., Maoka, T., Matsumoto, S., & Fukatsu, T. (2010). Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science*, 330(6007), 1102-1104.
- [30] Yeung, A., & Brockbank, W. (1994). Lower cost, higher value: Human resource function in transfo. *People and Strategy*, 17(3), 1.
- [31] Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2017). Carotenoids: a colourful history. *Carote Nature*.
- [32] Stahl, W., & Sies, H. (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for humans. *Archives of biochemistry and biophysics*, 336(1), 1-9.

- [33] Lorenz, R. T., & Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in biotechnology*, 18(4), 160-167.
- [34] Johnson, E. A., & An, G. H. (1991). Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(4), 297-326.
- [35] Hussein, G., Goto, H., Oda, S., Sankawa, U., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (2006). Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: III. Antioxidant and histopathological effects in spontaneously hypertensive rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(4), 684-688.
- [36] Jones, D. L., & Baxter, B. K. (2017). DNA repair and photoprotection: Mechanisms of overcoming environmental ultraviolet radiation exposure in halophilic archaea. *Frontiers in microbiology*, 8, 1882.
- [37] Zhang, J., Sun, Z., Sun, P., Chen, T., & Chen, F. (2014). Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. *Food & function*, 5(3), 413-425.
- [38] Tee, E. S., & Lee, C. Y. (1992). Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 31(1-2), 103-163.
- [39] Mangels, A. R., Holden, J. M., Beecher, G. R., Forman, M. R., & Lanza, E. (1993). Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *Journal of the American Dietetic Association*, 93(3), 284-296.
- [40] Gerster, H. (1993). Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 63, 93-93.
- [41] Age-Related Eye Disease Study Research Group. (2001). A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Archives of ophthalmology*, 119(10), 1417-1436.
- [42] Karnaukhov, V. N. (1990). Carotenoids: recent progress, problems and prospects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 95(1), 1-20.

- [43] Garrity, G. M., & Holt, J. G. (2001). The road map to the manual, p 119– 166. Bergey's manual of systematic bacteriology, 1.
- [44] Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G., & Imhoff, J. F. (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbial Ecology*, 11(2), 107-115.
- [45] Tindall, B. J. (1992). The family halobacteriaceae. *The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria*, 768-808.
- [46] Asker, D., Awad, T., & Ohta, Y. (2002). Lipids of *Haloferax alexandrinus* strain TMT: an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon. *Journal of bioscience and bioengineering*, 93(1), 37-43.
- [47] Raghavan, T. M., & Furtado, I. (2005). Expression of carotenoid pigments of haloarchaeal cultures exposed to aniline. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 20(2), 165-169.
- [48] Martinez-Espinosa, R. M., Marhuenda-Egea, F. C., & Bonete, M. J. (2001). Assimilatory nitrate reductase from the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: purification and characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 204(2), 381-385.
- [49] Dufossé, L. (2006). Microbial production of food grade pigments. *Food technology and Biotechnology*, 44(3), 313-323.
- [50] Quirós, A. R. B., & Costa, H. S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2-3), 97-111.
- [51] O'Neil, C. A., & Schwartz, S. J. (1992). Chromatographic analysis of cis/trans carotenoid isomers. *Journal of Chromatography A*, 624(1-2), 235-252.
- [52] Khachik, F., Spangler, C. J., Smith, J. C., Canfield, L. M., Steck, A., & Pfander, H. (1997). Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Analytical chemistry*, 69(10), 1873-1881.
- [53] Ferruzzi, M. G., Sander, L. C., Rock, C. L., & Schwartz, S. J. (1998). Carotenoid determination in biological microsamples using liquid chromatography with a

- coulometric electrochemical array detector. *Analytical Biochemistry*, 256(1), 74-81.
- [54] Craft, N. E., & Soares, J. H. (1992). Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and. beta-carotene in organic solvents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(3), 431-434.
- [55] Dasler, W., & Bauer, C. D. (1946). Removal of peroxides from organic solvents. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 18(1), 52-54.
- [56] Scita, G. (1992). [16] Stability of β -carotene under different laboratory conditions. In *Methods in enzymology* (Vol. 213, pp. 175-185). Academic Press.
- [57] Henry, L. K., Catignani, G. L., & Schwartz, S. J. (1998). Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and all-trans β -carotene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(7), 823-829.
- [58] Leavitt, P. R., & Hodgson, D. A. (2002). Sedimentary pigments. In *Tracking environmental change using lake sediments* (pp. 295-325). Springer, Dordrecht.
- [59] Yatsunami, R., Ando, A., Yang, Y., Takaichi, S., Kohno, M., Matsumura, Y., & Nakamura, S. (2014). Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Frontiers in microbiology*, 5, 100.
- [60] Kopec, R. E., Cooperstone, J. L., Cichon, M. J., & Schwartz, S. J. (2012). Analysis methods of carotenoids. *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*, 5, 105-148.
- [61] Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2008). *Food chemistry*. Springer Science & Business Media.
- [62] Markom, M., Hasan, M., Daud, W. R. W., Singh, H., & Jahim, J. M. (2007). Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and purification technology*, 52(3), 487-496.
- [63] Mezzomo, N., & Ferreira, S. R. (2016). Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: a review. *Journal of Chemistry*, 2016.

- [64] Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Analysis of carotenoids in orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7), 638-649.
- [65] Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of bacteriology*, 41(5), 653-673.
- [66] Burns, D., & Dyall-Smith, M. (2006). 22 Cultivation of haloarchaea. In *Methods in Microbiology* (Vol. 35, pp. 535-552). Academic Press.
- [67] Strand, A., Shivaji, S., & Liaaen-Jensen, S. (1997). Bacterial carotenoids 55. C50-carotenoids 25. Revised structures of carotenoids associated with membranes in psychrotrophic *Micrococcus roseus*. *Biochemical systematics and ecology*, 25(6), 547-552.
- [68] Zhang, Y. M., & Chen, F. (1999). A simple method for efficient separation and purification of c-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biotechnology Techniques*, 13(9), 601-603.
- [69] Scita, G. (1992). [16] Stability of β -carotene under different laboratory conditions. In *Methods in enzymology* (Vol. 213, pp. 175-185). Academic Press.
- [70] Kull, D. (1995). In *Carotenoids vol 1A: Isolation and Analysis* (G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, eds).
- [71] Britton, G. S. (1995). Liaaen-Jensen, and Pfander. H.: *Carotenoids today and challenges for the future*. eds. By Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., in *Carotenoids*, 1.
- [72] Oliver, J., & Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography a*, 881(1-2), 543-555.
- [73] Chen, B. H., & Chen, Y. Y. (1992). Determination of carotenoids and chlorophylls in water convolvulus (*Ipomoea aquatica*) by liquid chromatography. *Food chemistry*, 45(2), 129-134.
- [74] Horiishi, N., Kathrein, H., Krieg, S., Pfaff, G., Pitzer, U., Ronda, C., Buxbaum, G. (2005). Specialty pigments. *Industrial Inorganic Pigments*, 195-295.

- [75] Quirós, A. R. B., & Costa, H. S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2-3), 97-111.
- [76] Rivera, S. M., & Canela-Garayoa, R. (2012). Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*, 1224, 1-10.
- [77] Freund, P. R., Washam, C. J., & Maggion, M. (1988). Natural color for use in foods. *Cereal Foods World*, 33(7), 553.
- [78] Erdal, P., & Ökmen, G. (2013). Gıdalarda kullanılan mikrobiyal kaynaklı pigmentler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 56-68.
- [79] Eilbert, F., Thines, E., & Anke, H. (1999). Effects of antifungal compounds on conidial germination and on the induction of appressorium formation of *Magnaporthe grisea*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 54(11), 903-908.
- [80] Nelis, H., & De Leenheer, A. P. (1991). Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(3), 181-191.
- [81] Lee Chang, K. J., Dunstan, G. A., Abell, G. C., Clementson, L. A., Blackburn, S. I., Nichols, P. D., & Koutoulis, A. (2012). Biodiscovery of new Australian thraustochytrids for production of biodiesel and long-chain omega-3 oils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(5), 2215-2231.
- [82] Galaup, P., Flamin, C., Carlet, E., & Dufossé, L. (2005). HPLC analysis of the pigments produced by the microflora isolated from the 'Protected Designation of Origin' French red-smear soft cheeses Munster, Epoisses, Reblochon and Livarot. *Food Research International*, 38(8-9), 855-860.
- [83] Counsell, J. N., Jeffries, G. S., & Knewstubb, C. J. (1979). Some other natural colors and their applications. *Natural Colors for Foods and Other Uses*. Appl. Sci., London, 122-151.
- [84] Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.

- [85] Calo, P., De Miguel, T., Sieiro, C., Velazquez, J. B., & Villa, T. G. (1995). Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxy-echinenone and trans-astaxanthin. *Journal of applied bacteriology*, 79(3), 282-285.
- [86] Malik, K., Tokkas, J., & Goyal, S. (2012). Microbial pigments: a review. *Int J Microbial Res Technol*, 1(4), 361-365.
- [87] Calegari-Santos, R., Diogo, R. A., Fontana, J. D., & Bonfim, T. M. B. (2016). Carotenoid production by halophilic archaea under different culture conditions. *Current microbiology*, 72(5), 641-651.
- [88] Shahmohammadi, H. R., Asgarani, E., Terato, H., Saito, T., Ohyama, Y., Gekko, K., & Ide, H. (1998). Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarium* against DNA-damaging agents. *Journal of radiation research*, 39(4), 251-262.
- [89] Saito, T., Miyabe, Y., Ide, H., & Yamamoto, O. (1997). Hydroxyl radical scavenging ability of bacterioruberin. *Radiation Physics and Chemistry*, 50(3), 267-269.
- [90] Rodrigo-Baños, M., Garbayo, I., Vilchez, C., Bonete, M. J., & Martínez-Espinosa, R. M. (2015). Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology. *Marine drugs*, 13(9), 5508-5532.
- [91] Shahmohammadi, H. R., Asgarani, E., Terato, H., Saito, T., Ohyama, Y., Gekko, K., & Ide, H. (1998). Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarium* against DNA-damaging agents. *Journal of radiation research*, 39(4), 251-262.
- [92] Mussagy, C. U., Winterburn, J., Santos-Ebinuma, V. C., & Pereira, J. F. B. (2019). Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(3), 1095-1114.
- [93] Sui, L., Liu, L., & Deng, Y. (2014). Characterization of halophilic C50 carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai Bay, China. *Chinese journal of oceanology and limnology*, 32(6), 1280-1287.

- [94] Naziri, D., Hamidi, M., Hassanzadeh, S., Tarhriz, V., Zanjani, B. M., Nazemyieh, H., & Hejazi, M. S. (2014). Analysis of carotenoid production by *Haloerubrum* sp. TBZ126; an extremely halophilic archeon from Urmia Lake. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(1), 61.
- [95] Hechler, T., Frech, M., & Pfeifer, F. (2008). Glucose inhibits the formation of gas vesicles in *Haloferax volcanii* transformants. *Environmental microbiology*, 10(1), 20-30.
- [96] Mandelli, F., Miranda, V. S., Rodrigues, E., & Mercadante, A. Z. (2012). Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1781-1790.
- [97] Fang, C. J., Ku, K. L., Lee, M. H., & Su, N. W. (2010). Influence of nutritive factors on C50 carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation. *Bioresource technology*, 101(16), 6487-6493.
- [98] Will Chen, C., Hsu, S. H., Lin, M. T., & Hsu, Y. H. (2015). Mass production of C50 carotenoids by *Haloferax mediterranei* in using extruded rice bran and starch under optimal conductivity of brined medium. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(12), 2361-2367.
- [99] Afra, S., Makhdoumi, A., Matin, M. M., & Feizy, J. (2017). A novel red pigment from marine *Arthrobacter* sp. G20 with specific anticancer activity. *Journal of applied microbiology*, 123(5), 1228-1236.
- [100] Abbes, M., Baati, H., Guermazi, S., Messina, C., Santulli, A., Gharsallah, N., & Ammar, E. (2013). Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 1-8.
- [101] Burgess, L. C., Rice, E., Fischer, T., Seekins, J. R., Burgess, T. P., Sticka, S. J., & Klatt, K. (2008). Lycopene has limited effect on cell proliferation in only two of seven human cell lines (both cancerous and noncancerous) in an in vitro system with doses across the physiological range. *Toxicology in vitro*, 22(5), 1297-1300.

- [102] Kim, J. H., Park, J. J., Lee, B. J., Joo, M. K., Chun, H. J., Lee, S. W., & Bak, Y. T. (2016). Astaxanthin inhibits proliferation of human gastric cancer cell lines by interrupting cell cycle progression. *Gut and liver*, 10(3), 369.
- [103] Lizama, C., Romero-Parra, J., Andrade, D., Riveros, F., Bórquez, J., Ahmed, S., & Simirgiotis, M. J. (2021). Analysis of Carotenoids in Haloarchaea Species from Atacama Saline Lakes by High Resolution UHPLC-Q-Orbitrap-Mass Spectrometry: Antioxidant Potential and Biological Effect on Cell Viability. *Antioxidants*, 10(8), 1230.
- [104] Naziri, D., Hamidi, M., Hassanzadeh, S., Tarhriz, V., Zanjani, B. M., Nazemyieh, H., & Hejazi, M. S. (2014). Analysis of carotenoid production by *Halorubrum* sp. TBZ126; an extremely halophilic archeon from Urmia Lake. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(1), 61.
- [105] Stokkeland, I. M. (2019). LC-MS characterization of pigments in microalgae from different cultivation regimes (Master's thesis, UiT Norges arktiske universitet).
- [106] Sui, L., Liu, L., & Deng, Y. (2014). Characterization of halophilic C50 carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai Bay, China. *Chinese journal of oceanology and limnology*, 32(6), 1280-1287.
- [107] Herrero, C., Orosa García, M., Abalde, J., Rioboo, C., & Cid, Á. (2012). Astaxanthin production in cysts and vegetative cells of the microalga *Haematococcus pluvialis* Flotow.
- [108] Will Chen, C., Hsu, S. H., Lin, M. T., & Hsu, Y. H. (2015). Mass production of C50 carotenoids by *Haloferax mediterranei* in using extruded rice bran and starch under optimal conductivity of brined medium. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(12), 2361-2367.
- [109] Simó-Cabrera, L., García-Chumillas, S., Hagagy, N., Saddiq, A., Tag, H., Selim, S., & Martínez-Espinosa, R. M. (2021). Haloarchaea as cell factories to produce bioplastics. *Marine Drugs*, 19(3), 159.

- [110] Minyuk, G. S., & Solovchenko, A. E. (2018). Express analysis of microalgal secondary carotenoids by TLC and UV-Vis spectroscopy. In *Microbial Carotenoids* (pp. 73-95). Humana Press, New York, NY.
- [111] Zhou, B., Xiao, J. F., Tuli, L., & Resson, H. W. (2012). LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*, 8(2), 470-481.
- [112] Zeren Alakuş, Y. (2009). Renk olgusu ve günümüz mimarisindeki yeri (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [113] Specian, A. F. L., Serpeloni, J. M., Tuttis, K., Ribeiro, D. L., Cilião, H. L., Varanda, E. A., Colus, I. (2016). LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. *Cytotechnology*, 68(6), 2729-2744.
- [114] Twarużek, M., Zastempowska, E., Soszczyńska, E., & Ałtyn, I. (2018). The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Acta Universitatis Lodzensis. Folia Biologica et Oecologica*, 14, 23-32.
- [115] Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical reports*, 3(5), 617-620.
- [116] KILIÇ, V. (2010) “Haloferax alexandrinus’dan (Euryarchaeota-Archaea) Asimile Edici Nitrat Redüktaz’ın Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu.
- [117] Fleischmann, P., Studer, K., & Winterhalter, P. (2002). Partial purification and kinetic characterization of a carotenoid cleavage enzyme from quince fruit (*Cydonia oblonga*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1677-1680.
- [118] Yamada, M., & Fujimoto, M. (1976). Preparative Thin-Layer Chromatography of Semi-Xylenol Orange and Xylenol Orange by Development with Solvents Giving Discrete pH Change on the Plate. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 49(3), 693-696.

- [119] Lambert, J. B., Mazzola, E. P., & Ridge, C. D. (2019). Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods. John Wiley & Sons.
- [120] Sinha, S. N. (2011). Liquid chromatography mass spectrometer (LC-MS/MS) study of distribution patterns of base peak ions and reaction mechanism with quantification of pesticides in drinking water using a lyophilization technique. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2(05), 511.
- [121] Stahl, W. (2005). Macular carotenoids: lutein and zeaxanthin. *Nutrition and the Eye*, 38, 70-88.

