

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POTASYUM SORBATIN *ARTHROSPIRA PLATENSIS* GOMONT
GELİŞİMİ VE ANTIOKSİDAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE
ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eyüp ŞAŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

OCAK 2023

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POTASYUM SORBATIN *ARTHROSPIRA PLATENSIS* GOMONT
GELİŞİMİ VE ANTIOKSİDAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE
ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eyüp ŞAŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tuğba ONGUN SEVİNDİK

OCAK 2023





ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “POTASYUM SORBATIN ARTHROSPIRA PLATENSIS GOMONT GELİŞİMİ VE ANTIOKSİDAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmanın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(...../...../2023)

Eyüp ŞAŞ



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ihtiyaç duyduğum her türlü bilgi ve deneyimi benimle paylaşan, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Tuğba ONGUN SEVİNDİK'e, her zaman çalışmalarla ilgili konuları danıştığım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali DOĞRU'ya ve diğer bölüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Deney çalışmalarımın tamamında, ihtiyacım olan her türlü desteği sağlayan arkadaşım Ayşe Gül TEKBABA'ya tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında manevi desteğiyle bana güç veren kıymetli eşim Aslı Gül ŞAŞ'a teşekkür ederim.

Varlığıyla hayatıma değer katan, moral ve motivasyon kaynağım olan oğlum Ahmet Selim ŞAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatımın tamamında emekleri bulunan annem Esmer ŞAŞ'a, babam Nuri ŞAŞ'a ve ablam Ebru ŞAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eyüp ŞAŞ



İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ | v |
| TEŞEKKÜR | vii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| KISALTMALAR | xi |
| SİMGELER | xiii |
| TABLO LİSTESİ | xv |
| ŞEKİL LİSTESİ | xvii |
| ÖZET | xix |
| SUMMARY | xxi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ | 3 |
| 2.1. Gıda Katkı Maddeleri | 3 |
| 2.1.1. Gıda katkı maddelerinin sınıflandırılması | 3 |
| 2.1.1.1. Kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatanlar (Koruyucular) | 4 |
| 2.1.1.2. Yapıyı hazırlama, pişirme özelliğini geliştirenler | 4 |
| 2.1.1.3. Aromayı ve rengi geliştiriciler | 5 |
| 2.1.1.4. Besin değerini koruyucu, geliştiriciler | 5 |
| 2.1.2. Antimikrobiyal katkı maddeleri | 5 |
| 2.1.3. Potasyum sorbat (E-202) | 6 |
| 2.2. Potasyum Sorbatın Canlılar Üzerine Etkileri | 7 |
| 2.3. Serbest Radikaller | 9 |
| 2.4. Antioksidan Sistem | 10 |
| 2.4.1. Endojen antioksidanlar | 11 |
| 2.4.2. Eksojen antioksidanlar | 12 |
| 2.5. Arthrospira Platensis Gomont | 12 |
| 2.6. Çalışmanın Amacı | 13 |
| 3. MATERYAL VE METOD | 15 |
| 3.1. Çalışma Materyali | 15 |
| 3.2. Kullanılan Cihazlar | 15 |
| 3.3. Yöntem | 16 |
| 3.3.1. Hücre kültürünün hazırlanması | 16 |
| 3.3.2. Uygulanan potasyum sorbat konsantrasyonları | 17 |
| 3.3.3. Deney ortamı ve düzeneği | 17 |
| 3.4. Ölçüm ve Analizler | 18 |
| 3.4.1. Optik yoğunluğun (OD) ve büyüme oranının belirlenmesi | 18 |
| 3.4.2. Fotosentetik pigment analizi (Klorofil- <i>a</i>) | 18 |
| 3.4.3. pH'ın Büyüme Oranı ve Klorofil- <i>a</i> üzerine etkisi | 18 |
| 3.4.4. Toplam çözüner protein analizi | 18 |
| 3.4.5. Toplam süperoksit dismutaz aktivitesi (SOD) | 19 |
| 3.4.6. Toplam askorbat peroksidaz aktivitesi (APOD) | 19 |
| 3.4.7. Toplam glutatyon redüktaz aktivitesi (GR) | 19 |
| 3.4.8. Malondialdehit (MDA) miktarı | 20 |
| 3.4.9. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarı | 20 |
| 3.4.10. Prolin miktarı | 20 |
| 3.4.11. İstatistiksel analizler | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 4. BULGULAR | 23 |
| 4.1. Optik Yoğunluk | 23 |
| 4.2. Fotosentetik Pigment Analizi (Klorofil-a) | 24 |
| 4.3. pH'ın Büyüme Oranı ve Klorofil-a üzerine etkisi | 24 |
| 4.4. Toplam Süperoksit Dismutaz Aktivitesi | 26 |
| 4.5. Toplam Askorbat Peroksidaz Aktivitesi | 27 |
| 4.6. Toplam Glutasyon Redüktaz Aktivitesi | 28 |
| 4.7. Malondialdehit (MDA) Miktarı | 28 |
| 4.8. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı | 29 |
| 4.9. Serbest Prolin Miktarı | 30 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 31 |
| KAYNAKLAR | 39 |
| ÖZGEÇMİŞ | 45 |



KISALTMALAR

| | |
|-------------|--------------------------|
| AOT | : Aktif oksijen türleri |
| APOD | : Askorbat peroksidaz |
| GPOD | : Guaiakol peroksidaz |
| GR | : Glutasyon redüktaz |
| LP | : Lipid peroksidasyonunu |
| SOD | : Süperoksit dismutaz |
| Ppm | : Milyonda bir birim |



SİMGELER

| | |
|------------------------|-----------------------|
| H_2O_2 | : Hidrojen peroksit |
| O_2^- | : Süperoksit radikali |
| OH^- | : Hidroksil radikali |





TABLO LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Tablo 2.1. Bazı antioksidan enzim ve moleküllerin temel görevleri | 10 |
| Tablo 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması | 11 |
| Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar | 15 |
| Tablo 3.2. Spirulina Medium ortamında kullanılan besin tuzu içeriği | 16 |
| Tablo 3.3. Spirulina Medium ortamında kullanılan mikrobesein tuzu içeriği | 16 |
| Tablo 3.4. A. platensis'e uygulanan potasyum sorbat konsantrasyonları | 17 |



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Arthrospira platensis alginin mikroskop görüntüsü | 13 |
| Şekil 4.1. A. platensis'in potasyum sorbat konsantrasyonlarına bağlı OD 560 absorbansındaki 10 günlük değişimi | 23 |
| Şekil 4.2. A. platensis'in potasyum sorbat konsantrasyonlarına bağlı klorofil-a miktarındaki 10 günlük değişimi | 24 |
| Şekil 4.3. A. platensis'in potasyum sorbat konsantrasyonlarına bağlı karanlığın son saatindeki (Saat 08:00) 10 günlük pH değişimi | 25 |
| Şekil 4.4. A. Platensis'in potasyum sorbat konsantrasyonlarına bağlı aydınlığın son saatindeki (Saat 20:00) 10 günlük pH değişimi | 26 |
| Şekil 4.5. A. platensis'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğine bağlı olarak toplam SOD aktivitesinde görülen değişim | 27 |
| Şekil 4.6. A. platensis'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğine bağlı olarak toplam APOD aktivitesinde görülen değişim | 27 |
| Şekil 4.7. A. platensis'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğini bağlı olarak toplam GR aktivitesinde görülen değişim | 28 |
| Şekil 4.8. A. platensis'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğine bağlı olarak MDA miktarında görülen değişim | 29 |
| Şekil 4.9. A. platensis'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğine bağlı olarak H ₂ O ₂ miktarında görülen değişim | 29 |
| Şekil 4.10. A. platensis'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğine bağlı olarak serbest prolin miktarında görülen değişim | 30 |



POTASYUM SORBATIN *ARTHROSPIRA PLATENSIS* GOMONT GELİŞİMİ VE ANTIOKSİDAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Artan dünya nüfusu ile birlikte besin ihtiyacını karşılamada çıkan sorunlar gıda katkı maddelerine ilgiyi arttırmıştır. Bir tür gıda katkı maddesi olarak gıda koruyucularının güvenli kullanımı da giderek daha fazla dikkat çekmektedir. İzin verilen bileşen ve kullanım konsantrasyonları ülkeden ülkeye farklılık gösterse de potasyum sorbat (PS) Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin güvenli koruyucular listesinde kabul edilmektedir. Maya ve küf engelleme özelliği sayesinde neredeyse tüm hazır gıda ve unlu mamullerin içeriğinde bulunan potasyum sorbatın insan vücuduna günlük alım miktarına dikkat edilse de suda çözünme özelliği nedeniyle kontrolsüz bir şekilde üretimden kaynaklı oluşan atık sularla birlikte sucul ekosistemde yaşayan canlılar üzerinde tehdit oluşturmaktadır. Bu durumda sucul ekosistemlerde birincil üretimde önemli bir yere sahip olan prokaryotik mavi-yeşil alglerde strese bağlı olaylar nedeniyle hasarlar oluşabilmektedir.

Yapılan bu çalışmada, potasyum sorbat bileşiğinin *Arthrospira platensis* alginin klorofil-*a*, OD 560 ve kültür ortamı pH değerlerinde oluşturduğu değişimler ile birlikte antioksidan parametrelerinde meydana getirdiği cevaplar incelenmiştir. Bu amaçla, *A. platensis* algi kültürleri 3 tekrarlı olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda (100, 200, 300, 400, 500 ve 600 ppm) potasyum sorbat bileşiğine 10 gün boyunca maruz bırakılmış, klorofil-*a* ve OD 560 değerlerindeki değişim günlük olarak ölçülmüştür. Kültür ortamı pH değerlerindeki değişim karanlık periyodun son saatinde (saat 08:00) ve aydınlık periyodun son saatinde (saat 20:00) olmak üzere günde iki defa 10 gün boyunca ölçülmüştür. Antioksidan parametrelerdeki değişimlerin belirlenmesi için 10. günün sonunda kültürlerden pelletler alınmıştır. Bu pelletler üzerinden algin prolin, hidrojen peroksit (H_2O_2), malondialdehit (MDA) miktarlarındaki ve glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APOD) gibi antioksidan enzimlerinin aktivitelerindeki değişimler incelenmiştir.

Çalışmada, potasyum sorbat bileşiğine maruz bırakılan *A. platensis* alginin OD 560 ve klorofil-*a* değerlerinde konsantrasyon artışına ve zamana bağlı olarak kontrole göre 7. günden itibaren azalma gözlenmiştir. Sadece 100 ppm konsantrasyonda kontrole göre istatistiksel bir değişim gözlenmemiştir. Kültür ortamı pH değerleri 6. gün aydınlık periyodun son saatinden (saat 20:00) itibaren 200, 300, 400, 500 ve 600 ppm konsantrasyonlarda azalmaya başlamış, 9. günden itibaren tüm konsantrasyonlarda kontrole göre azalma görülmüştür. SOD aktivitesi kontrole göre 100 ve 500 ppm hariç diğer tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak azalma gösterirken, GR aktivitesi 100 ppm hariç diğer tüm konsantrasyonlarda azalma göstermiştir. Prolin miktarında sadece 500 ppm konsantrasyonunda azalma görülürken, diğer tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı artma tespit edilmiştir. APOD aktivitesinde, H_2O_2 ve MDA miktarlarında kontrole göre bir değişim gözlenmemiştir. Ortaya çıkan sonuçlarda potasyum sorbatın *A. platensis* alginin gelişimi üzerine olumsuz etki ederek metabolik

dengeyi değiştirdiği saptanmış, prokaryotik alglerde toksik etkileriyle ilgili ipuçları elde edilmiştir.



EFFECT OF POTASSIUM SORBATE ON ARTHROSPIRA PLATENSIS GOMONT DEVELOPMENT AND ANTIOXIDANT PARAMETERS

SUMMARY

With the increasing world population, the problems in meeting the nutritional needs have increased the interest in food additives. The safe use of food preservatives as a type of food additive is also getting increased attention. The food additives in question are generally defined as "substances used to affect the properties of foods in the desired way". These properties include storage life, appearance and flavor. Potassium sorbate is one of the most widely recognised and used food additives.

Potassium sorbate (E-202) is accepted on the US Food and Drug Administration's list as a safe preservative, although the permitted ingredients and usage concentrations vary from country to country. It has white colour, soft, odourless and shiny appearance. It is easy to dissolve in water. Although potassium sorbate is preferred at many points, it has been developed especially for liquid stock solutions.

Although attention is paid to the daily intake of potassium sorbate to human body, which is in the content of all ready-made foods and bakery products due to its yeast and mold inhibition feature, studies have been carried out that it causes toxic effects both in humans and other living things. Moreover, it poses a threat to organisms in the aquatic ecosystem with the wastewater resulting from uncontrolled excretion due to its water-soluble feature. In addition to food additives that are mixed into aquatic ecosystems due to unconscious waste management during and after the production phase in the industry, these substances are somehow contaminated to aquatic ecosystems directly or indirectly as a result of the use of foodstuffs by humans. In this case, damage may occur due to stress-related events in prokaryotic blue-green algae, which have a key place in photosynthesis production in the aquatic ecosystem.

Algae, which are very quickly affected by the changes that may occur in the ecosystem, respond rapidly to favourable and unfavourable conditions in the environment. Since there are changes in the amount of biomass, photosynthesis and reproductive capacity of the organism, species distributions in the algal community of the aquatic ecosystem can be affected. Moreover, highly structured organisms at the top of the food chain are also affected by these changes. Therefore, algae are an extremely important group of organisms used to investigate the effects of chemicals that may be harmful to the environment.

In this study, the changes in the chlorophyll-*a* and OD 560 values, pH values of the culture medium and antioxidant parameters of *Arthrospira platensis* algae were investigated for the potassium sorbate compound. *A. platensis* (M2) algae obtained from Soley Microalgae Institute was cultured under axenic conditions in the Plant Physiology and Algal Ecology laboratory of Sakarya University Biology Department. Potassium sorbate (C₆H₇KO₂) chemical used in the study was obtained from commercial suppliers. During the study period, *A. platensis* algae cultures were exposed to potassium sorbate compound at different concentrations (100, 200, 300,

400, 500 and 600 ppm) for 10 days in 3 repetitions, and the daily changes in chlorophyll-*a* and OD 560 values were measured. The change in pH values of the culture medium was measured twice a day for 10 days, at the last hour of the dark period (08:00) and at the last hour of the light period (20:00). Pellets were taken from the cultures at the end of the 10th day to determine the changes in antioxidant parameters. The changes in the amounts of malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H₂O₂), proline, and the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) were investigated on these pellets. Different modified methods were used to determine enzyme activities and other antioxidant parameters, and measurements were made spectrophotometrically. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed on the data and LSD test was applied to determine the difference between the variables using the SPSS 20.0 program.

In the study, addition of potassium sorbate to the culture medium of *A. platensis* for 10 days significantly decreased both OD 560 and chlorophyll-*a* values from the 7th day compared to the control in a dose dependent manner. No statistical change was observed at 100 ppm concentration compared to the control. The pH values of the culture medium started to decrease at 200, 300, 400, 500 and 600 ppm concentrations from the last hour of the bright period (20:00) on the 6th day, and a decrease was observed in all concentrations from the 9th day compared to the control. SOD activity decreased statistically at all concentrations except 100 and 500 ppm, while GR activity decreased at all concentrations except 100 ppm compared to control. While a decrease was observed in the amount of proline only at 500 ppm concentration, a statistically significant increase was found at all other concentrations. No change was observed in APX activity, H₂O₂ and MDA amounts compared to control.

It was concluded that potassium sorbate compound negatively affected the OD 560 (indicator of development), and chlorophyll-*a* and pH values (indicators of photosynthetic activity) of *A. platensis* algae. Moreover, the antioxidant responses to potassium sorbate applied to *A. platensis* showed that potassium sorbate had toxic effects. The changes in enzyme activities and an increase in the amount of proline can be considered as proof that potassium sorbate affects the metabolic balance in the cell. Although it was determined that the inhibitory effect appeared much earlier in similar studies with different chemicals, the negative effect of potassium sorbate on growth and photosynthetic activity appeared from the 7th day in this study. It was also considered that the devastating effect of 100 ppm was lower than the other doses used in the study. Moreover, the doses applied to this prokaryotic blue-green algae were lower than those applied to other eukaryotic algae in other studies. This finding indicated that prokaryotic algae may be more sensitive to potassium sorbate compound.

The necessity of keeping the food additives under control, which is used extensively in the food and pharmaceutical industry has emerged once again. As shown in our study, other studies have also shown the toxic effect of these kind of chemicals on different algae, other living organisms such as zebra fish, invertebrates, and humans. It is seen that it is extremely necessary to limit the consumption of food additives and to follow up the resulting wastes. The use of these small organisms in the detection of environmental pollution caused by food additives and especially potassium sorbate compound will shed light on future studies as fast and reliable indicators. Increasing

the number of such studies will also be important in terms of providing scientific data for future toxicology studies on algae with different chemicals.





1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artması, gıda sektörünün beslendiği ham madde kaynaklarının azalması, insanların hayat standartlarını arttırma eğilimi ve mevsimsel besinlerin yılın farklı zamanlarında tüketilme isteklerinin artması gibi etkenler; katkı maddelerinin gıda endüstrisindeki kullanımını zaruri hale getirmiştir (Saldamlı ve Uygun, 2005). Genel manada gıda katkı maddeleri; yiyeceklerin hazırlanması esnasında besin maddelerinin bozulmasının önüne geçmek, tadını, yapısını ya da sahip olduğu besin değerini korumak veya artırmak amacıyla besinlere eklenmiş maddelerdir (Gürsoy, 2002). Son 30 yılda, başta gelişmiş olan ülkelerde, yiyeceklere katılan kimyasal madde sayıları hızla artış göstermiştir (Arslan, 2004).

Gıda katkı maddelerinin kullanım amacı her ne kadar mikrobiyolojik bozulmanın önlenmesi ve dayanıklılığın arttırılması, besleyici değerin korunması, teknolojik işlemlerde kolaylık sağlaması, görüntü, renk, koku ve lezzet gibi duyuşal özelliklerin düzeltilmesi gibi hususlar olsa da bunun yanında pek çok sağılık sorununu da beraberinde getirebilmektedirler. Bu maddeler kontrolsüz, tüzüğe uygun olmadan ve sürekli olarak kullanıldıklarında, tüketicilerde hem alerjik hem de toksik reaksiyonların görölmesine sebebiyet vermektedirler (Arslan, 2004). Dünya üzerinde kullanımı devam eden pek çok gıda katkı maddesinin toksik etkisinin olup olmadığı bilinmemekte ve bu maddelerin kullanımını kontrolsüz bir şekilde devam etmektedir (Abe ve Sasaki, 1977; Meng ve Zhang, 1994; Arslan, 2004; Kaya ve Topaktaş, 2007; Yılmaz, 2008; Mpountoukas ve ark., 2008).

Gıda katkı maddelerinin insanlar, hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve sucul ekosistemde bulunan canlı grupları üzerine toksik etkisi yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (Kulacki ve ark., 2012; Husarova ve OSTATnikova, 2013; Kobetičová ve ark., 2016; Hall ve ark., 2019). Antimikrobiyal gıda katkı maddesi olarak yaygın olarak kullanılan kimyasallardan birisi de potasyum sorbattır (E-202). Bu kimyasalın canlılar üzerine olan toksik etkisi yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, potasyum sorbatın insan vücudunda DNA hasarına neden olabileceği bildirilmiştir (Mpountoukas ve ark., 2008; Dolatabadi ve Kashanian, 2010). Bir başka çalışmada

ise, potasyum sorbat içeren ürünlerin, insanlarda ağız boşluğu ve cilt sağlığı üzerinde olumsuz etkiye yol açtığı tespit edilmiştir (Coz ve Abensour, 2005).

Endüstride üretim aşamasında ve sonrasında bilinçsiz atık yönetimi nedeniyle sucul ekosistemlere karışan gıda katkı maddelerinin yanı sıra, gıda maddelerinin insanlar tarafından kullanımı sonucu bu maddeler direkt ya da dolaylı yollarla da sucul ekosistemlere bir şekilde kontamine olmaktadır. Sucul bir organizma olan zebra balığı ile yapılan bir çalışmada, potasyum sorbata maruz kalma sonucu, bu maddenin balığın bağışıklık düzenlemesini tetikleyerek, bağırsaktaki çeşitli biyobelirteçlerin içeriğini önemli ölçüde azalttığı ortaya çıkartılmıştır (Peng ve ark., 2019).

Ekosistemde oluşabilen değişikliklerden çok çabuk etkilenen algler, ortamdaki olumlu ve olumsuz şartlara karşı hızlıca cevap oluşturmaktadırlar. Bahse konu canlıların biyokütle miktarında, fotosentez ve üreme kapasitesinde değişimler olduğundan sucul ekosistemdeki alg komunitesindeki tür dağılımları etkilenebilmektedir. Besin zincirinin üst basamağında görülen yüksek yapılı organizmalar da bu değişimden etkilenmektedirler (Pierzynski ve Schwab, 1992). Bundan ötürü algler, çevre için zararlı olabilecek kimyasalların etkilerinin araştırılması hususunda kullanılan son derece önemli bir canlı grubudur. Bu çalışmanın amacı, gıdalarda antimikrobiyal katkı maddesi olarak sıklıkla kullanılan ve ticari kullanımı giderek artmakta olan potasyum sorbatın (E-202) olası toksik etkilerini; sucul ekosistemin birincil üreticileri olan algler üzerinde belirlemektir. Çalışmada potasyum sorbatın çevresel etkilerini değerlendirmek üzere model organizma olarak *Arthrospira platensis* Gomont algi seçilerek, bu maddenin algin gelişimi ve antioksidan parametreleri [süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), malondialdehit (MDA), askorbat peroksidaz (APOD), prolin ve hidrojen peroksit (H₂O₂)] üzerindeki etkisi incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

Katkı maddelerinin gıdalarda kullanımını neredeyse insanlık tarihi kadar eskidir. Toplumların bilinçsiz ve teknolojiden uzak olduğu zamanlarda dahi gıda katkı maddeleri her zaman tüketilmişlerdir (Saldamlı, 1985). Bahse konu gıda katkı maddeleri genel manada “gıdaların özelliklerini istenilen biçimde etkilemek amacıyla kullanılan maddeler” olarak tanımlanmaktadır. Bu özellikler arasında depolama ömrü, görünüm ve lezzet sayılabilmektedir (Altuğ ve ark., 2000).

Gıdalarda kullanılan katkı maddeleri, Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde “Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham ya da yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir” şeklinde tanımlanmaktadır (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1977).

2.1.1. Gıda katkı maddelerinin sınıflandırılması

Gıda katkı maddeleri incelendiğinde; kullanım amaçlarına, buldukları madde grubuna ve ya üretimine katıldığı gıdaya göre gruplandırılabilir.

Türk Gıda Kodeksi tarafından, bu maddelerin kullanım amaçlarına göre yapılmış sınıflandırması aşağıda gösterilmiştir (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 1977).

2.1.1.1. Ürünün kalitesini muhafaza ederek raf ömrü uzatanlar

a) Antimikrobiyaller: Besinlerin küf, maya ve bakteri bozulmalarına karşı korunması, doğal renk ve aromanın muhafazası ve raf ömürlerinin uzatılması amacıyla kullanılan maddelerdir.

b) Antioksidanlar: İstenmeyen her türlü kokunun, aroma ve tat değişikliklerinin, enzimatik kararmanın veya oksidasyona bağlı renk kaybının geciktirilmesi ve önlenmesi gibi amaçlarla gıdalarda ek olarak kullanılan maddelerdir.

2.1.1.2. Yapıyı hazırlama, pişirme özelliğini geliştirenler

a) pH ayarlayıcılar: Besinlerin pH'sının (asitlik/bazlık) kontrol edilmesi, değiştirilmesi ve istenilen düzeyin sağlanması amacıyla kullanılan maddelerdir.

b) Topaklanmayı önleyenler: Gıdalarda bulunan partiküllerin bir araya toplanmasının önüne geçmek amacıyla kullanılan maddelerdir.

c) Emülsifiyerler: Bir sıvının farklı bir sıvı içinde muntazam ufak partiküller şeklinde dağılmasının sağlanması, sıvının yüzey geriliminin azaltılması ve emülsiyon sağlanması için eklenen maddelerdir.

ç) Stabilizörler: Gıdalarda birbirleriyle karışmayan, iki veya daha fazla fazın tek düze dağılımının sağlanması adına kullanımda olan maddelerdir.

d) Kıvam artırıcılar: Modifiye nişastalar gibi kıvam artırıcılar gıdalarda kıvamın yoğunlaştırılması amacıyla kullanılırlar.

e) Tatlandırıcılar: Aromanın ve tadın daha cazip hale getirilmesi, tatlı tadın verilmesi amacıyla kullanılan maddelerdir.

f) Mayalanma sağlayan ajanlar: Startırlar olarak da bilinen laktobasiller mayalanmanın hızlandırılması, pişmenin ve ürün kalitesinin geliştirilmesi gibi amaçlarla eklenen maddelerdir.

g) Nem ayarlayıcılar: Son derece düşük nemlilikte bir ıslatma ajanı gibi davranarak, gıdaların kurummasının önlenmesi amacıyla kullanılmakta olan maddelerdir.

ğ) Ağartıcılar: Unun işlenmesinden sorumlu molekülü olup, unun pişme kalitesinin veya renginin düzenlenmesi amacıyla kullanımda olan maddelerdir.

h) Dolgu maddeleri: Dolgu maddesi olarak işlev gören jelleştiriciler, gıdaya doku kazandırılması adına kullanımda olan maddelerdir.

ı) Köpük ayarlayıcılar: Gıdalarda köpüklenmeyi önleyen veya azaltan katkı maddeleridir.

i) Parlaticılar: Gıdalarda dış yüzeye parlaklık kazandırılması veya koruyucu nitelikte tabaka oluşturulması amacıyla gıdalara eklenen maddelerdir.

2.1.1.3. Aromayı ve rengi geliştiriciler

a) Çeşniyi arttıranlar: Aromanın daha cazip hale getirilmesi, doğal aromanın düzeltilmesi veya korunması amacıyla gıdalara eklenen maddelerdir.

b) Çeşni verenler: Tat ve kokunun daha cazip duruma getirilmesi, doğal lezzetin geliştirilmesi ve işleme esnasında azalan tat ve kokunun kazandırılması amacıyla kullanılan maddelerdir.

c) Renklendiriciler: Tüketici beğenisinin kazanılması, doğal rengin kuvvetlendirilmesi, işlem sırasında kaybolan rengin kazandırılması veya renksiz olan bir ürünün renklendirilmesi amacıyla kullanımda olan maddelerdir.

2.1.1.4. Besin değerini geliştiriciler veya koruyanlar

a) İşleme esnasında azalan ve ya kaybolan besin öğelerinin yerine koyulması (B1, B2, niasin)

b) Diyetle noksan olabilecek besin öğelerinin eklenmesi (A, D vitaminleri)

FDA tarafından günümüze dek kullanımı uygun görülen gıda katkı maddesi sayısı 2800'e yakındır. Bununla birlikte; onay alan gıda katkı maddelerinin önemli bir bölümü için daha uygun alternatifler söz konusu olduğundan kullanılmamaktadırlar. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre 300'e yakın gıda katkı maddesi, çeşitli gıdalarda ve değişen miktarlarda kullanılabilir. Avrupa Birliği tarafından ise kullanımı uygun bulunan 297 adet gıda katkı maddesi bulunmaktadır (Sarıkaya, 2005).

2.1.2. Antimikrobiyal katkı maddeleri

Çok eski yıllardan beri gıda muhafazası için mikroorganizmalara karşı çeşitli asitler, tuzlar, şeker ve onun isleri (tütsü) kullanılmaktaydı. Günümüzde ise antimikrobiyal katkı maddeleri kullanılmaktadır. Antimikrobiyal nitelikli katkı maddeleri, gıdalarda bulunması istenmeyecek farklı türde bakteriler, küfler ve mayaları, patojen nitelikte ve ya patojen olmayan her tür mikroorganizmanın ortamdan uzaklaştırılması, mikroorganizmaların çoğalmalarının ve faaliyetlerinin önlenmesi amacıyla gıdalara eklenen maddelerdir. Ayrıca besin değeri olmayan, miktarları oldukça sınırlı ve

gıdalara ait raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan kimyasal bileşenlerdir (Saldamlı, 1985; Yentür ve Bayhan, 1990). Bununla birlikte antimikrobiyal maddeler tat ve koku korumakla birlikte, yağ türevi maddelerin acımasını da önlerler (Saldamlı, 1985).

Antimikrobiyal nitelikli maddeler; meyvelerde ve sebzelerde, her türlü et ürününde, su ve süt ürünlerinde, margarin yağlarında, hububatlarda ve alkol ihtiva eden içecekler gibi örnekleri artırılabilir alanlarda kullanılmaktadırlar (Parlak, 2007).

Koruyuculara ait antimikrobiyal özellikler; etki şekli, maddenin antimikrobiyal spektrumu, gıdanın bileşimi, kimyasal ve fiziksel özellikler, pH'sı, sorbat derişimi ve depolama sıcaklığı gibi faktörlerle bağlantılıdır. Bu faktörler sorbatların aktivitesine antagonistik veya sinerjistik etki gösterebilmektedir (Davidson ve ark., 1993). Bir koruyucu katkı maddesinin antimikrobiyal etkinliği mikroorganizmaya göre değişkenlik göstermektedir. Bazı tiplere karşı etkisi diğerlerinden daha fazladır. Buna antimikrobiyal maddenin "spesifikliği" denilmektedir (Ekşi, 1988; Eker, 1995).

Antimikrobiyal maddeler, sayılabilecek pek çok olumlu etkilerin yanı sıra; kanserojen etkiler de gösterebilirler. Bu yüzden izin verilen maddelerin ve kullanım dozlarının üzerinde kullanılmamalıdır (Oğan, 1996). Bugün pek çok gıdada ve sıklıkla kullanımda olan antimikrobiyal nitelikli maddeler; kükürt dioksit ve bazı sülfidler, sorbik asit ve tuzları (potasyum sorbat), propiyonik asit, nitrit ve nitrat bileşikleri, asetik asit, benzoik asit ve tuzlarıdır (Saldamlı ve Uygun, 2005).

2.1.3. Potasyum sorbat (E-202)

$C_6H_7KO_2$ şeklinde formülize edilebilen sorbik asidin potasyum tuzu; iyi çözünebilen, stabilitesi yüksek ve işlem basitliği sunan, bu nedenlerle gıdalarda yaygın kullanılan antimikrobiyal gıda katkı maddesidir (Saldamlı, 1985). Beyaz renkli, yumuşak, kokusuz ve parlak görünüme sahiptir. Su içinde çözünümü kolaydır. Potasyum sorbat pek çok nokta da tercih edilse de özellikle sıvı stok solüsyonlar adına geliştirilmiştir (Chichester ve Tanner, 1972). Önerilen günlük kullanım miktarı (ADI değeri) $0-25 \text{ mg kg}^{-1}$ (vücut ağırlığı/gün) şeklinde saptanmıştır. Ayrıca Güvenilir Katkı Maddeleri (GRAS) listesinde gıdalara eklenmesinde sakınca görülmeyen bir madde olarak da yer almıştır (Saldamlı, 1985). Özellikle *Penicillium roquforti* ve *Penicillium patulin* isimli mikroorganizmalar üzerinde, bu mikroorganizmaların üremelerinin engellenmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Bullerman, 1984). Ayrıca gıda takviyesi olarak

nitelendirilen ürünler genelde potasyum sorbat içerir, bu da küf ve mikropların büyümesini engeller ve raf ömrünü uzatır.

2.2. Potasyum Sorbatın Canlılar Üzerine Etkileri

Potasyum sorbatın insanlar üzerine toksik etkileriyle ilgili geçmiş yıllarda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalara baktığımızda, potasyum sorbat gıda endüstrisinde yasal olarak kullanılmasına rağmen, alımı izin verilen limitlerin üzerinde olduğunda insanlar üzerinde alerji, ürtiker ve astım gibi zararlı yan etkilere neden olabildiği gösterilmiştir (Taghavi ve ark., 2013; Zamani Mazdeh ve ark., 2014). Benzer bir çalışmada, diş macunu ve süt ürünleri gibi potasyum sorbat içeren ürünlerin, tüketici tarafından kullanıldıktan sonra ağız boşluğu ve cilt üzerinde tahrişe ve uzun süreli hassasiyete yol açtığı tespit edilmiştir (Le Coz ve Abensour, 2005). Yine bir başka çalışmada, yüksek dozda potasyum sorbat tüketiminin, insan kan lenfositlerinde kromozomal anormalliklere ve göz tahrişine neden olduğu belirtilmiştir (Furia, 1972; Fisher, 1980). Ayrıca potasyum sorbatın insan periferik kan lenfositlerinde in vitro olarak genotoksik veya mutajenik etkilere neden olduğu gösterilmiştir. Potasyum sorbatın, lipid peroksidasyonunu (LP) etkilediği ve sıçan hepatosit hücrelerine ve zarına zarar verdiği belirlenmiştir (Mamur ve ark., 2010). Başka bir çalışmada, potasyum sorbatın insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik, mutajenik ve klastojenik etkileri in vitro olarak araştırılmış ve kansere neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Türkoğlu, 2007; Soares ve ark., 2015). Potasyum sorbatın insan vücudundaki metabolizması sonucu DNA ile reaksiyona giren ve DNA hasarına neden olan aktif bileşiklere ayrışabileceği bildirilmiştir (Dolatabadi ve Kashanian, 2010; Mpountoukas ve ark., 2008). Çeşitli araştırma sonuçları, artan potasyum sorbat alımının (> 25 mg/kg), mutajenik bileşikler üreterek ve kromozom aberasyonlarını, kardeş kromatid değişimini, DNA kırılmasını indükleyerek sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açabileceğini göstermiştir. Yukarıda bahsedilen faktörlerin, diyabet, kanser vb. birçok kronik hastalığı geliştirebileceği düşünülmüş, bu nedenle potasyum sorbatın halk sağlığı üzerindeki etkilerinin araştırılması ve çeşitli organ ve hücreler üzerindeki etki mekanizmasının belirlenmesi önerilmiştir (Dehghan ve ark., 2018).

Arslan ve ark. (2009), amonyum bikarbonat ve potasyum sorbat'ın birkaç istisna dışında diğer gıda katkı maddelerine kıyasla toprak kaynaklı patojenler için daha toksik olduğunu göstermişlerdir. Potasyum sorbatın *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* adlı patojenik fungiye tamamen inhibe ettiği, toprak testlerinde amonyum

bikarbonata kıyasla tüm çalışılan diğer fungi türlerine (*Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* ve *Sclerotinia sclerotiorum*) karşı daha yüksek toksisite gösterdiği ortaya konmuştur.

Farklı canlılar üzerinde EC₅₀ değerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara baktığımızda, potasyum sorbatın 48 saat boyunca uygulandığı *Daphnia magna* adlı su piresinde EC₅₀ değeri 750 mg L⁻¹ olarak hesaplanırken (OECD 1992), bakterilerdeki (*Pseudomonas putida*) EC₅₀ değeri 1000 mg L⁻¹ olarak belirlenmiştir (Merck 2010). Potasyum sorbat kullanılarak 96 saatlik yapılan bir diğer çalışmada, sucul ortamlarda balıklar (*Danio rerio*) için EC₅₀ değeri 1250 mg L⁻¹ olarak tanımlanmıştır (OECD 1992).

Zebra balığı (*Danio rerio*), potasyum sorbatın bağırsak mikrobiyotasının mikroekolojik dengesi ve bağışıklık sistemi üzerindeki etkisini araştırmak için 2 hafta boyunca 0.1 g L⁻¹ ve 1 g L⁻¹ sulu potasyum sorbat çözeltilerine maruz bırakılmıştır. Potasyum sorbata maruz kalmanın, zebra balığının bağışıklık düzenlemesini tetikleyerek, immunoglobulin G (IgG), interlökin-1β (IL-1β) ve tümör nekroz faktörü (TNF-α)'da dahil; bağırsaktaki çeşitli biyobelirteçlerin içeriğini önemli ölçüde azalttığı ortaya çıkartılmıştır (Peng ve ark., 2019).

Denizlerdeki biyolojik kirlilik kaynaklarından biri olan zehirli boya pigmentleri yerine uygun farklı ürünler aranmaya başlanmıştır. Bu nedenle potasyum sorbatın *Balanus amphitrite* larvaları üzerindeki potansiyel etkinliği laboratuvar ve saha deneylerinde test edilmiştir. Gemiler üzerine uygulanan bir vernik içerisine potasyum sorbat katılarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Buna göre EC₅₀ ve LC₅₀ için elde edilen değerler sırasıyla 9.91 mM ve 36.73 mM'dir. Terapötik oran 3.71 olup, potasyum sorbatın toksik olmayan bir mekanizma yoluyla etki ettiğini göstermiştir. Potasyum sorbat içeren bir vernik kaplamanın, mikro ve makro kirlilik yoğunluğu ve çeşitliliğinde önemli bir azalmaya sebep olduğu, potasyum sorbatın geleneksel toksik bileşiklerin yerini almak için umut verici bir koruyucu ajan olduğu gösterilmiştir (Blustein ve ark., 2009).

Chen ve ark. (2017), tek hücreli *Dunaliella tertiolecta* algi üzerinde yaptıkları çalışmada, bütıl paraben (BP), sodyum diasetat (SDA) ve potasyum sorbatın (PS) olası toksisitelerini test etmişlerdir. Sonuçlara göre üç gıda koruyucu maddesi de algin klorofil ve karotenoid içeriğinde, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktivitelerinde önemli bir azalmaya sebebiyet vermiştir. Ayrıca çalışmada BP, SDA ve PS'nin hafif alkali koşullar altında *D. tertiolecta*'ya karşı düşük toksisiteye sahip

olduğu, asidik koşullar altında ise SDA'nın orta düzeyde toksisiteye sahip olduğu ve PS'nin yüksek toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Potasyum sorbatın *Euglena gracilis*'in hareketi ve fotosentetik parametreleri üzerindeki kısa süreli etkileri incelenmiştir. Potasyum sorbat, *E. gracilis* alginin hareketliliği, yerçekimi oryantasyonunun kesinliği (r-değeri), yukarı doğru hareket şekli ve hizalama kabiliyeti gibi farklı fizyolojik parametrelerini etkilemiştir. Bu alg için EC₅₀ değeri 2867.2 mg L⁻¹ olarak bildirilmiştir. 625 mg L⁻¹ potasyum sorbat üzerindeki konsantrasyonlar, fotosentetik verimliliği ve elektron taşıma hızının inhibisyonunu indüklemiştir. 2500 mg L⁻¹ üzerindeki konsantrasyonlarda ise, *E. gracilis* alginin düşük ışık varlığında bile tam bir fotosentez inhibisyonuna uğradığı tespit edilmiştir (Engel ve ark. 2014).

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikal türleri, moleküler oksijenin indirgenmesinde art arda tek elektronlu adımlardan kaynaklanan toksik ara maddelerdir. Stres sonucunda bitkilerde saptanan baskın formlar, süperoksit anyonu (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalidir (OH⁻) (Mehdy, 1994).

Süperoksit radikali (O₂⁻): Bu moleköl, oksijenin bir elektron alması sonucu redüklenmesi ile oluşmaktadır (Denklem 2.1). Oksijenli solunum yapan tüm hücrelerde görölmektedir. Bu radikal orta derecede reaktif bir moleküldür.



Hidrojen peroksit (H₂O₂): Süperoksidin bir elektron alımı ya da oksijenin diğer moleküllerden iki elektron alımı sonrasında peroksit molekölü meydana gelmektedir. İki hidrojen atomu ile oluşan peroksit molekölü bir araya gelerek ise hidrojen peroksidi oluşurmaktadır (Denklem 2.2). Süperoksit radikali gibi orta derecede reaktiflik göstermektedir.



Hidroksil radikali (OH⁻): Bu moleköl bazı geçiş metallerrinin (fenton reaksiyonları) (Denklem 2.3.) ya da süperoksidin (haber-weiss reaksiyonları) (Denklem 2.4) varlığında hidrojen peroksidin redüklenmesi sonucunda oluşmaktadır. Reaktiflik

seviyesi çok yüksek olup, olduğu bölgede hücrel hasarlarla birlikte aşırı birikim sonucu hücreyi ölüme götürebilmektedir.



2.4. Antioksidan Sistem

Genellikle dengede giden serbest radikal üretimi oluşumu ile ROS temizleme kapasitesi arasında meydana gelen dengesizlik sebebiyle oksidatif stres görülebilmektedir (Pisoschi ve Pop, 2015). Serbest radikal üretiminin artışı durumunda, savunma mekanizmaları serbest radikalleri nötralize etmek için yeterli değilse hücre yaralanmasına ve geri dönüşü olmayan hasara sebebiyet veren çok çeşitli biyomoleküllerde ciddi hasara neden olabilmektedir (Cerqueira ve ark., 2007; Wang ve ark., 2011; Gupta, ve ark., 2015).

Bahse konu hususlarda, biyolojik sistemler serbest radikalleri reaktif olmayan türevlere dönüştürmek için savunma mekanizmaları geliştirmiştir (Tablo 2.1.). Bahse konu mekanizmalar eksojen ve endojen olarak iki grupta incelenir (Tablo 2.2.).

Tablo 2.1. Bazı antioksidan molekül ve enzimlerin temel görevleri.

| Bileşik İsimleri | Görevleri |
|----------------------------|---|
| Askorbat Peroksidaz (APOD) | H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir. |
| Süperoksit dismutaz (SOD) | $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'i H_2O_2 'ye dönüştürür. |
| Guaiakol peroksidaz (GPOD) | H_2O_2 'yi ve lipit peroksidlerini etkisizleştirir. |
| Glutasyon redüktaz (GR) | H_2O_2 'yi ve lipit peroksidlerini etkisizleştirir. |
| Askorbik asit | Direk olarak $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{OH}\cdot$ ve H_2O_2 'yi temizler. |
| Karotenoidler | Peroksi radikalleri ile $\text{O}_2^{\bullet-}$ ve $\text{OH}\cdot$ 'ı temizler. |
| Tokoferoller | Lipit peroksidlerini, $\text{O}_2^{\bullet-}$ ve $\text{OH}\cdot$ 'ı temizler. |
| Fenolik bileşikler | $^1\text{O}_2$ 'yi temizler. |

Tablo 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması.

| Antioksidanlar | |
|------------------------|---|
| Endojen Antioksidanlar | Enzimatik Antioksidanlar |
| | Süperoksit dismutaz (SOD) |
| | Askorbat peroksidaz (APOD) |
| | Glutasyon redüktaz (GR) |
| | Guaiakol peroksidaz (GPOD) |
| Eksojen Antioksidanlar | Nonenzimatik Antioksidanlar |
| | Glutasyon |
| | Prolin |
| | Vitamin Eksojen Antioksidanlar |
| | α -Tokoferol (Vitamin E) |
| | β -karoten (Vitamin A) |
| | Askorbik asit (Vitamin C) |
| | İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar |

2.4.1. Endojen antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, süperoksit radikallerinden H_2O_2 ve reaktif oksijen oluşturan reaksiyonları katalizleyerek (Valentine ve ark., 1998), hücre detoksifikasyonunu sağlar (Asada, 1999). Glutasyon redüktaz (GR) ise; hidrojen peroksidin glutasyon peroksidaz aracılığıyla indirgenmesi sonucunda ortaya çıkan okside glutasyonu (GSSG), NADPH harcayarak tekrar redükte glutatyona (GSH) dönüştürmektedir (Urso ve Clarkson, 2003). Askorbat peroksidaz (APOD) hücreden H_2O_2 'yi süpüren ana enzim olarak görev yapmaktadır (Asada, 2006).

Reaktif oksijen türleri, hücredeki birikimleri arttıkça hücre zarında oksidatif hasara neden olmaktadır. Hücre zarındaki gerçekleşen bu hasar lipitleri etkileyerek lipit peroksidasyonu başlatmaktadır. Lipit peroksidasyonu işleminin sonunda ortaya çıkan malondialdehit (MDA) oksidatif hasarın düzeyini göstermek için referans kabul edilmektedir (Urso ve Clarkson, 2003; Benzer ve Temizer, 2003).

Proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biri olan prolin; reaktif oksijen türevlerinin hücre zarını tahrip etmesi sonucu oluşan osmotik dengesizliği, birikimi sayesinde önlemektedir. Hücredeki prolin artışı ve birikimi, hasarın göstergesi şeklinde kabul edilmektedir (Demiral ve Türkan, 2005).

2.4.2. Eksojen antioksidanlar

Tokoferoller, tilakoid membranlarda bazı lipit radikalleri ile doğrudan etkileşime girebilme özelliğine sahiptir (Munné-Bosch ve Alegre, 2002). Karotenoidler, fotosentetik (siyanobakteriler, algler ve bitkiler) canlıların yanı sıra fotosentetik olmayan (bazı omurgasızlar, mantarlar ve bakteriler) canlılarda ve bitki dokularının plastidlerinde de bulunan lipofilik antioksidanlar grubunda yer almaktadır (Nisar ve ark., 2015). Askorbik asit (C vitamini), bitkilerde bol miktarda bulunan antioksidan yapıda bir bileşiktir. Bununla beraber hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonları katalizleyebilmektedir (Barnes ve ark, 2002). Fenolik bileşikler, serbest radikalleri süpürme yöntemiyle ortadan kaldıran ikincil metabolitlerdir. Bitkisel dokularda bol miktarda bulunurlar (Agati ve ark., 2012).

2.5. *Arthrospira platensis* Gomont

Birbirinden farklı kimyasal ve biyolojik bileşikler üretme niteliği sebebiyle mikroalgler yüksek öneme haiz organizmalardır. Mikroalglerden pigmentler, proteinler, vitaminler, lipidler, polisakkaritler ve mineraller gibi birçok madde elde edilebilmektedir. Mikroalgler; gelişmiş ülkelerde sağlık sektöründe ve gıda endüstrilerinde, özellikle pigmentler gibi yüksek katma değerli bileşiklerin elde edilmesinde kullanılırken, gelişmekte olan ülkelerde ise proteince zengin gıda ve yem katkısı üretimini birleştiren hem küçük ölçekli projelerde hem de büyük ölçekli atık su arıtma projelerinde kullanılmaktadırlar (Dalay ve ark., 2001).

Özellikle hasadının ve üretiminin kolay olması sebebiyle Cyanobacteria grubunda yüksek öneme sahip olan *Arthrospira platensis* türünün üretimi yüksek popülariteye sahip hale gelmiştir. *A. platensis*, insanlar için gıda olarak uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Geleneksel olarak, Meksika'daki Aztek uygarlığı sırasında ve daha yakın zamanda Afrika'daki yerliler tarafından yemek olarak kullanılmıştır (Belay ve ark., 1996). *A. platensis* içeriğinde bulunan yüksek miktarda proteinler, pigmentler ve gamma linolenik asit (GLA) gibi ürünler bakımından büyük öneme haiz olan bir alg

türüdür (Cirik, 1989, Chen ve ark., 1996; Glazer, 1999). *Arthrospira*, %62 aminoasit içeriğine sahip olmakla birlikte dünyanın en zengin doğal B12 vitamini kaynağıdır.

A. platensis, 200–300 µm uzunluğunda ve 5-10 µm genişliğinde sarmal filamentli bir algdir. Bununla birlikte sarmal oluşturmayan düz suşları da bulunmaktadır (Şekil 2.1.). Yüksek pH değerlerine iyi tolerans göstermektedir. Sıcaklık, *Arthrospira* türlerinin çoğalmasını kontrol eden ana faktörlerden birisidir. *Arthrospira* büyümesi için optimum sıcaklık 30 ile 35°C aralığındadır (Oliveria ve ark., 1999). Bu sebeple yüksek sıcaklıklarda ve alkali koşullarda hızlıca büyüyerek kolaylıkla yetiştirilebilmektedir (Lupatini ve ark., 2016). *A. platensis*, yüksek seviyelerde bikarbonat, karbonat ve yüksek pH ile karakterize edilen subtropikal ve tropikal doğal su kütlelerinde büyük popülasyonlar oluşturabilmektedir.



Şekil 2.1. *Arthrospira platensis* alginin mikroskop görüntüsü.

2.6. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada besin takviyesi olarak endüstriyel kullanım alanına sahip olan ve sucul ekosistemlere sanayi atıklarının girmesi ile kontaminasyon riski taşıyan potasyum sorbat adlı kimyasal madde, sucul ekosistemlerdeki toksikoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılan model organizma olan *A. platensis* algi ile 7 gün boyunca muamele edilmiştir. Böylece algin klorofil-*a*, malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit (H₂O₂), biyokütle, prolin miktarları ile süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), askorbat peroksidaz (APOD) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişim

incelenmiştir. Sonuç olarak *A. platensis* algi ile potasyum sorbatın sucul ekosistem üzerinde meydana getirebileceği olası etkilerinin belirlenmesi adına yapılan toksikolojik çalışmalara katkı yapabileceği düşünülmektedir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışma Materyali

Soley Mikroalg Enstitüsünden temin edilen *A. platensis* (M2) algi, aksenik koşullar altında Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi ve Alg Ekolojisi laboratuvarında kültüre alınmıştır. Çalışmada kullanılan potasyum sorbat ($C_6H_7KO_2$) kimyasalı ticari tedarikçilerden temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmaların tamamında yer alan cihazlar Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar.

| Cihaz Adı | Cihaz İşlevi | Cihaz Markası |
|------------------------------|---|--------------------------|
| Etüv | Sterilizasyon ve kurutma işlemleri | Nüve |
| Buzdolabı | Çözelti ve numunelerin saklanması | Beko |
| Hassas terazi | Tartma işlemleri | Schimadzu SLB 320 |
| Isıtıcı manyetik karıştırıcı | Çözeltilerin hazırlanması | Dragon med M 10068 |
| Soğutuculu mikrosantrifüj | Süpernatant eldesi | Centrion scientific K3 |
| Soğutuculu santrifüj | Pelet eldesi | Nüve |
| İklimlendirme kabini | Alg kültürü | Dev/Pet |
| Otoklav | Sterilizasyon | Alp |
| Mikropipet | Enzim analizleri | Eppendorf (100- 1000 µL) |
| Mikropipet | Enzim analizleri | Nichipet (10-100 µL) |
| Mikropipet | Solüsyon hazırlanması ve enzim analizleri | Eppendorf (1-10 mL) |
| Spektrofotometre | Absorbans ölçümü | Shimadzu mini UV 1240 |
| pH metre | pH ölçümleri | Metler toledo |

3.3. Yöntem

3.3.1. Hücre kültürünün hazırlanması

Aksenik koşullarda hazırlanmış Spirulina Medium (Aiba ve Ogawa, 1977) ortamında *A. platensis* M2 suşu kültüre alınarak yetiştirilmiştir (Tablo 3.2., Tablo 3.3.). 20 mL kültür, 180 mL besiyerine ekilerek; 250 mL'lik erlenlerde on gün süreyle bekletilmiştir. Kültür yetiştirilmesi için hazırlanan ortam koşulları; full spektrum lambalarla 5000 lux ışık şiddetinde kabin içinin aydınlatılması (12 saat gece, 12 saat gündüz) ve 30 °C sıcaklık uygulanması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2. Spirulina Medium ortamında kullanılan besin tuzu içeriği.

| Solüsyon (SL) | Hacim (mL) | Bileşik | SL Konsantrasyon |
|---------------|------------|--------------------------------------|------------------------------|
| SL-A | 500 mL | NaHCO ₃ | 13.61 g 500 mL ⁻¹ |
| | | NaNO ₃ | 2.50 g 500 mL ⁻¹ |
| | | NaCO ₃ | 4.03 g 500 mL ⁻¹ |
| | | K ₂ HPO ₄ | 0.50 g 500 mL ⁻¹ |
| SL-B | 500 mL | NaCl | 1.00 g 500 mL ⁻¹ |
| | | K ₂ SO ₄ | 1.00 g 500 mL ⁻¹ |
| | | Mikrobesin tuzu | 5.0 mL 500 mL ⁻¹ |
| | | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.20 g 500 mL ⁻¹ |
| | | FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.01 g 500 mL ⁻¹ |
| | | EDTA | 0.08 g 500 mL ⁻¹ |

Tablo 3.3. Spirulina Medium ortamında kullanılan mikrobesin tuzu içeriği.

| Solüsyon (SL) | Bileşik | Miktar |
|---------------|--|--------|
| SL-1 | Distile su | 881 mL |
| | H ₃ BO ₃ | 5 mL |
| | CO(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | 5 mL |
| | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 5 mL |
| | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 1mL |
| | MNSO ₄ .4H ₂ O | 2 mL |
| | Cu So ₄ .5H ₂ O | 1 mL |
| | EDTA | 0.4 g |
| SL-2 | Distile su | 100 mL |
| | FE SO ₄ .7H ₂ O | 0.7 g |
| | EDTA | 0.4 g |

3.3.2. Uygulanan potasyum sorbat konsantrasyonları

Hazırlanan kültür ortamına eklenecek potasyum sorbat bileşiğine ayrı ayrı stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Potasyum sorbat bileşiğinin farklı konsantrasyonları ayrı ayrı erlenlerde bulunan ve klorofil-*a* değeri 1 µg mL⁻¹ olan taze *A. platensis* M2 suşu kültürlerine eklenmiştir. Bu kültürlere eklenen potasyum sorbat konsantrasyonları 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 ppm olarak belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilen bu konsantrasyonlar kullanılan bileşiğin en etkili olduğu konsantrasyonun yarısını ifade eden EC₅₀ değerinin altında belirlenmiştir (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4. *A. platensis*'e uygulanan potasyum sorbat konsantrasyonları.

| Potasyum Sorbat |
|-----------------|
| 100 ppm |
| 200 ppm |
| 300 ppm |
| 400 ppm |
| 500 ppm |
| 600 ppm |

3.3.3. Deney ortamı ve düzeneği

A. platensis kültürü, potasyum sorbat uygulamalarından önce 250 mL şeklinde hazırlanmış ve ortam adaptasyonu için belirtilen şartlarda 10 gün boyunca iklimlendirme dolabında bekletilmiştir. 10. günün sonunda kültürler, kullanılacak kültür miktarı 50 mL ve içerdikleri klorofil-*a* miktarı 1 µg mL⁻¹ olacak şekilde yenilenmiştir. Belirtilen konsantrasyonlarda potasyum sorbat çözeltileri hazırlanmış ve aktifleşmiş kültürlere uygulanmıştır. Ortam pH'ı 9 olarak ayarlanmıştır. Deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Bu süre zarfında *A. platensis* M2'nin fotosentetik pigment (klorofil-*a*) miktarlarındaki değişimi ve optik yoğunluğu (OD) 24 saatte bir ölçülerek kayıt altına alınmıştır. Kültürler 10. günün sonunda homojenizasyon işlemine tabii tutulduktan sonra bu homojenatlar -20°C'de askorbat peroksidaz (APOD), süperoksit dismütaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR) enzim deneyleri ve MDA, prolin ve H₂O₂ analizleri için saklanmıştır.

3.4. Ölçüm ve Analizler

3.4.1. Optik yoğunluğun (OD) ve büyüme oranının belirlenmesi

A. platensis alginin büyüme hızı ve optik yoğunluğu (OD) spektrofotometrede 560 nm'deki absorbans değerleri okunarak saptanmıştır. Yapılan ölçümler besiyerinin 1/10 oranında seyreltilmesi ile gerçekleştirilmiştir (900 µL Spirulina Medium besiyeri, 100 µL kültür). Kör çözeltisi olarak da Spirulina Medium besiyeri kullanılmıştır. 24 saatlik dilimlerle gerçekleştirilen ölçümlerle 10 gün boyunca OD değerlerindeki değişimler gözlemlenmiştir. Bu şekilde büyüme oranları hesaplanmıştır.

3.4.2. Fotosentetik pigment analizi (Klorofil-a)

Klorofil-a ölçümlerinde Mckinney (1941)'nin yönteminden yararlanılmıştır (Mackinney, 1941). Klorofil-a miktarları ise Denklem 3.1'e göre hesaplanmıştır:

$$\text{Klorofil-a mL}^{-1} = A_{665} \times 13.43 \times 10 \quad (3.2)$$

3.4.3. pH'ın büyüme oranı ve klorofil-a üzerine etkisinin belirlenmesi

Kültür ortam pH'ının büyüme oranı ve klorofil-a üzerine etkisini belirlemek için 10 gün boyunca karanlık ortamın son saatinde (saat 08:00) ve aydınlık ortamın son saatinde (saat 20:00) üç tekrarlı hazırlanan tüm kültürlerdeki pH ölçümleri Metler Toledo marka pH metre kullanılarak yapılmıştır.

3.4.4. Toplam çözümlü protein analizi

Toplam protein aktivitesinin belirlenmesi adına Bradford (1976)'a ait yöntem kullanılmıştır. 2 ml'lik kültürler alınarak 15000 rpm'de +4°C'de 20 dk. santrifüjlenmiş, daha sonra SOD ve GR analizleri için yaklaşık 0,2 g olan pellet elde edilmiştir. Bu pellet homojenizasyon için kullanılmış, gerekli olan ekstraksiyon solüsyonu 100 mM potasyum-fosfat (pH=7.0), %2'lik PVP (polivinilpirolidon) ve 1 mM sodyum EDTA (Na₂EDTA) ile hazırlanmıştır. APOD analizi için ise 50 mM Tris-HCl (pH=7.2), %2'lik PVP, 1 mM Na₂EDTA ve 2 mM askorbat ile hazırlanmıştır. 5.5 mL son hacimli reaksiyon solüsyonu için sırasıyla 100 µg protein ihtiva eden enzim karışımı, 0.031 M sitrat-fosfat tamponu (pH=5.5) ve %0.01'lik coomassie brilliant blue G-250 kullanılmıştır. Örnekler 10-15 sn. süre ile vorteksleme işlemine tabii tutulmuş, daha sonra 30 dk. karanlıkta bekletilmiştir. Spektrofotometrede 595 nm'de yapılan ölçümler sonucu elde edilen veriler ile protein miktarlarındaki değişimler; önceden hazırlanmış olan standart grafikten yararlanılarak bulunmuştur.

3.4.5. Toplam süperoksit dismutaz aktivitesi (SOD)

Toplam SOD aktivitesinin belirlenmesi için Beyer ve Fridovich (1987)'in metodu kullanılmıştır. 2 mL hacimde alınan kültürler 15000 rpm ve +4°C'de 20 dk. santrifüjlendikten sonra elde edilen pellet 100 mM potasyum-fosfat (pH=7.0), %2'lik PVP (polivinilpirolidon) ve 1 mM sodyum EDTA (Na₂EDTA) içeren çözelti ile ekstrakte edilmiştir. 14.000 rpm ve +4°C'de 20 dk. santrifüjden sonra, süpernatantlar alınmıştır. 100 mM potasyum-fosfat tamponu (pH=7.8), 9.9x10⁻³ M metionin, 5.7x10⁻⁵ M NBT, (nitroblue tetrazolyum), %1'lik triton X 100 ile hazırlanan reaksiyon çözeltisine son hacim 1030 µL olacak şekilde eklenmiştir. Reaksiyonun başlaması adına 0.9 µM riboflavin ilave edilmiştir. Tüpler 375 µmol m⁻²s⁻¹ şiddetinde ışığa 15 dk. boyunca maruz bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda 560 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. Toplam SOD aktivitesi daha önce hazırlanmış olan standart grafik kullanılarak bulunmuştur (U/mg protein).

3.4.6. Toplam askorbat peroksidaz aktivitesi (APOD)

Toplam APOD aktivitesi için Wang ve ark. (1991)'nin metodundan yararlanılmıştır. 2 mL'lik kültürler alındıktan sonra 15000 rpm ve +4°C'de 20 dk. santrifüjlenmiş, elde edilen pellet 50 mM tris-HCl (pH=7.2), %2'lik PVP, 1 mM sodyum EDTA (Na₂EDTA) ve 2 mM askorbat ihtiva eden çözelti ile ekstrakte edilmiştir. 14.000 rpm ve +4°C'de 20 dk. santrifüjden sonra süpernatantlar alınmıştır. 100 µg protein içeren enzim karışımı, 50 mM potasyum-fosfat tamponu (pH=6.6), 2.5 mM askorbattan oluşan reaksiyon çözeltisine eklenmiştir. Reaksiyon, son hacim 1000 µL olacak şekilde 10 mM hidrojen peroksit (H₂O₂) eklenmesiyle başlatılmıştır. Absorbans değerleri spektrofotometrede 290 nm'de 1 dk. boyunca alınmıştır. Enzim aktivitesi hesaplanırken, askorbatın ekstinksiyon katsayısı (2.8 mM/cm.290 nm) ile reaksiyonun başlangıç hızı esas alınmıştır (nmol askorbat/dakika/mg protein).

3.4.7. Toplam glutatyon redüktaz aktivitesi (GR)

Toplam GR aktivitesi, Sgherri ve ark. (1994)'nin yöntemine göre belirlenmiştir. 2 mL'lik kültürler alındıktan sonra 15000 rpm ve +4°C'de 20 dk. santrifüjlendikten sonra elde edilen pellet, 100 mM potasyum-fosfat (pH=7.0), %2'lik PVP (polivinilpirolidon) ve 1 mM sodyum EDTA (Na₂EDTA) ihtiva eden çözelti ile ekstrakte edilmiştir. 14.000 rpm ve +4°C'de 20 dk. santrifüj işleminden sonra süpernatantlar alınmıştır. İçeriğinde 100 µg protein olan süpernatant, 100 mM potasyum-fosfat tamponu (pH=7.8), 2 mM sodyum EDTA (Na₂EDTA), 0.5 mM okside glutatyon (GSSG) içerisine eklenmiştir.

Reaksiyon, son hacim 1000 µL olacak şekilde, 0.2 mM nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) eklenmesiyle başlatılmıştır. Absorbans değerleri spektrofotometrede 320 nm’de 1 dk. boyunca alınmıştır. Düzeltme, NADPH yokluğunda GSSG yükseltgenmesi ile yapılmıştır. Enzim aktivitesi hesaplanırken, NADPH’nin ekstinksiyon katsayısı (6.2 mM/cm. 340 nm) ile reaksiyonun başlangıç hızı esas alınmıştır (nmol NADPH/dakika/mg protein).

3.4.8. Malondialdehit (MDA) miktarı

Malondialdehit miktarının tespit edilmesi Heath ve Packer (1968)’in yöntemine göre yapılmıştır. 15 mL kültür ortamı 4000 rpm ve +4°C’de 15 dk. santrifüj edildikten sonra pellet elde edilmiştir. Elde edilen bu pellet 5 mL 0.1% trikloroasetik asit (TCA) (4°C) ile homojenize edilmiş, sonra 4100 rpm’de 10 dk. santifürülenmiştir. 0.5 mL süpernatant, 0.5 mL 0.1 M tris-HCl (pH=7.6) ve 1 mL TCA-TBA çözeltisi (15% w/v) (trikloroasetik asit-0.375% w/v tiyobarbitürikasit) ile karıştırılmış, sonrasında 30 dk. sıcak su banyosunda (95°C) bekletilmiştir. Reaksiyon karışımlarının absorbansları 532 ve 600 nm dalga boyunda ölçülmüş ve MDA miktarı ekstinksiyon katsayısı ile hesaplanmıştır.

3.4.9. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı

H₂O₂ miktarı Heath ve Packer (1968)’in yöntemine göre bulunmuştur. 15 mL hacimde alınan kültürlerden; 4000 rpm ve +4°C’de 15 dk. santrifüj edildikten sonra yaklaşık ağırlığı 0.2 g olan pellet elde edilmiştir. Elde edilen bu pellet 5 mL 0.1% TCA (4°C) ile homojenize edilmiş, daha sonra ise 4100 rpm’de 10 dk. santrifüjlenmiştir. 0.5 mL süpernatanta, 0.5 mL 0.1 M Tris-HCl (pH=7.6) ve 1 mL 1 M KI (potasyum iyodür) ilave edilmiş ve 390 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüştür. H₂O₂ miktarı daha önce hazırlanmış olan standart grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.4.10. Prolin miktarı

Prolin miktarının elde edilebilmesi adına Bates ve ark., (1973)’in metodu modifiye edilmiştir. 15 mL hacminde alınan kültürlerden; 4000 rpm ve +4°C’de 15 dk. Santrifüj işlemi uygulandıktan sonra yaklaşık ağırlığı 0.2 g olan pellet elde edilmiştir. Elde edilen bu pellet 10 mL saf su ile homojenize edilmiş, daha sonra ise tüpler sıcak su banyosunda (95°C) 30 dk. bekletilmiştir. Yapılan bu işlemten sonra örnek soğutulmuş; ardından 10 dk. 4100 rpm’de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan prolin

miktarı ($\mu\text{mol/g}$ kuru ağırlık) asit-ninhidrin yöntemine göre 520 nm dalga boyunda yapılan okumalarla spektrofotometrik olarak bulunmuştur.

3.4.11. İstatistiksel analizler

İstatistikler için, verilere SPSS 20.0 paket programında yer alan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmış ve değişkenler arasındaki farklılığın belirlenmesi için LSD testi uygulanmıştır. Anlamlı Önemli Fark (AÖF) olan her bir bağımsız değişken için uygulama ve çeşitler arasındaki farkın önem kontrolü %5 düzeyinde hesaplanmıştır.



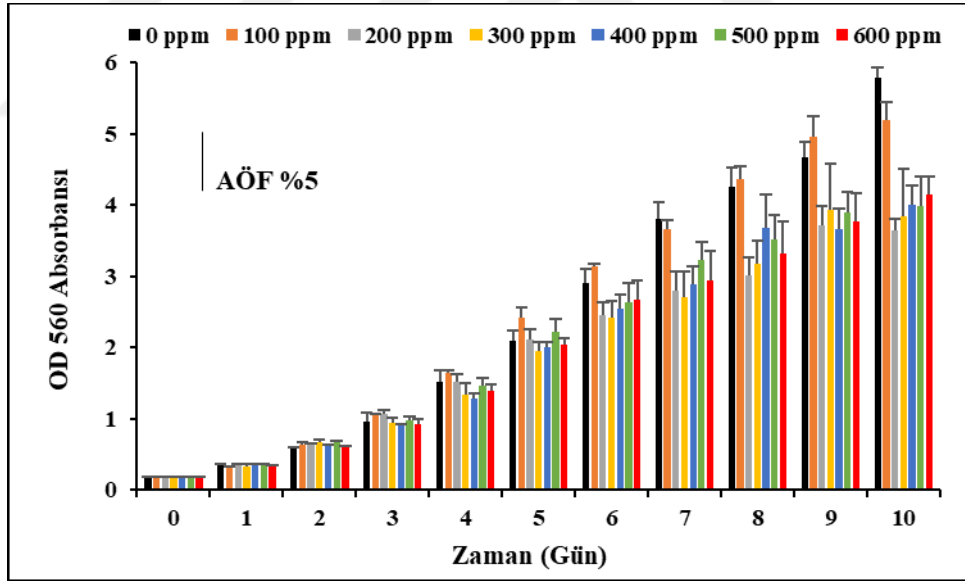


4. BULGULAR

4.1. Optik Yoğunluk

A. platensis'e uygulanmış çeşitli konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğinin OD 560 absorbansı üzerine etkisi Şekil 4.1.'de verilmiştir.

Birinci günden onuncu güne kadar günler kendi aralarında kıyaslandığında, potasyum sorbat bileşiğine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinde ilk altı gün uygulanan dozlarda kontrole göre bir değişim gözlenmemiştir. Yedinci, 8. ve 9. günlerde uygulanan farklı dozlarda (200, 300, 400 ve 600 ppm) istatistiksel olarak anlamlı azalmalar görülmekle beraber, 10. günde 100 ppm hariç diğer tüm dozlarda (200, 300, 400, 500 ve 600 ppm) kontrole göre anlamlı azalma görülmüştür ($p < 0.05$).

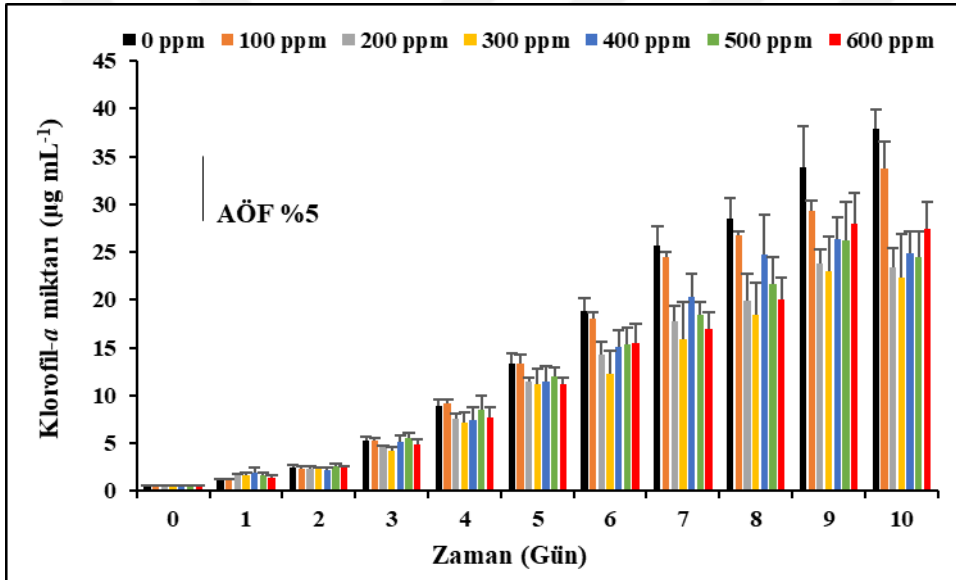


Şekil 4.1. *A. platensis*'in potasyum sorbat konsantrasyonlarına bağlı OD 560 absorbansındaki 10 günlük değişimi.

4.2. Fotosentetik Pigment Analizi (Klorofil-a)

A. platensis'e uygulanmış çeşitli konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğinin klorofil-a üzerine etkisi Şekil 4.2.'de verilmiştir.

Birinci günden onuncu güne kadar günler kendi aralarında kıyaslandığında, potasyum sorbat bileşiğine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinde ilk altı gün uygulanan dozlarda kontrole göre bir değişim gözlenmemiştir. Yedinci günde 100 ppm ve 400 ppm hariç diğer tüm dozlarda kontrole göre klorofil-a miktarında istatistiksel olarak azalma görülmüştür ($p < 0.05$). Sekizinci günden 10. güne kadar 100 ppm hariç uygulanan diğer tüm dozlarda (200, 300, 400, 500 ve 600 ppm) istatistiksel olarak anlamlı azalmalar görülmüştür ($p < 0.05$).



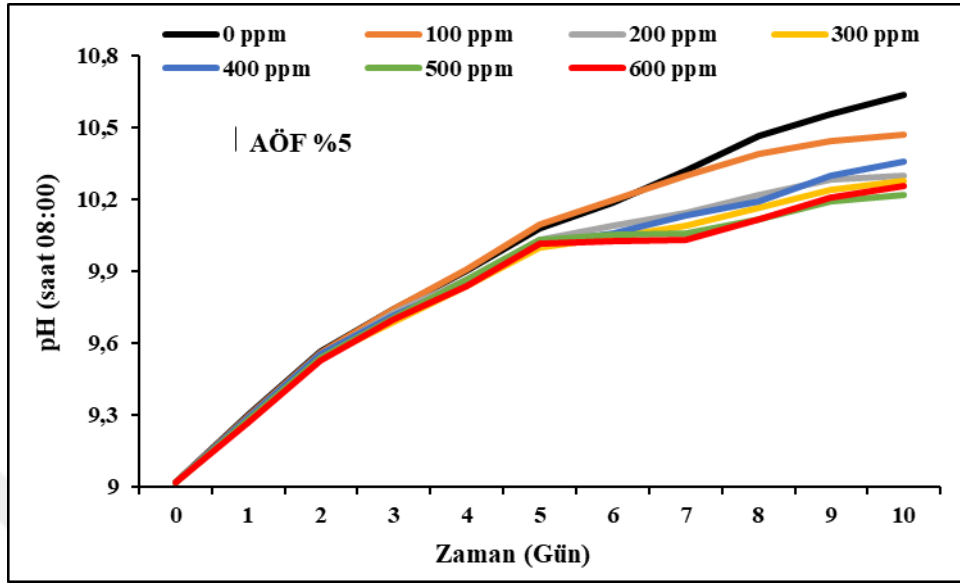
Şekil 4.2. *A. platensis*'in potasyum sorbat konsantrasyonlarına bağlı klorofil-a miktarındaki 10 günlük değişimi.

4.3. pH'ın Büyüme Oranı Ve Klorofil-A Üzerine Etkisi

A. platensis'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğinin pH'da meydana getirdiği değişimlerin karanlığın son saatindeki (saat 08:00) değerleri Şekil 4.3.'de verilmiştir.

Birinci günden onuncu güne kadar günler kendi aralarında kıyaslandığında, potasyum sorbat bileşiğine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinde ilk beş gün uygulanan dozlarda kontrole göre bir değişim gözlenmemiştir. Altıncı günde 300, 400, 500 ve 600 ppm konsantrasyonlarda, 7. ve 8. günlerde 200, 300, 400, 500 ve 600 ppm

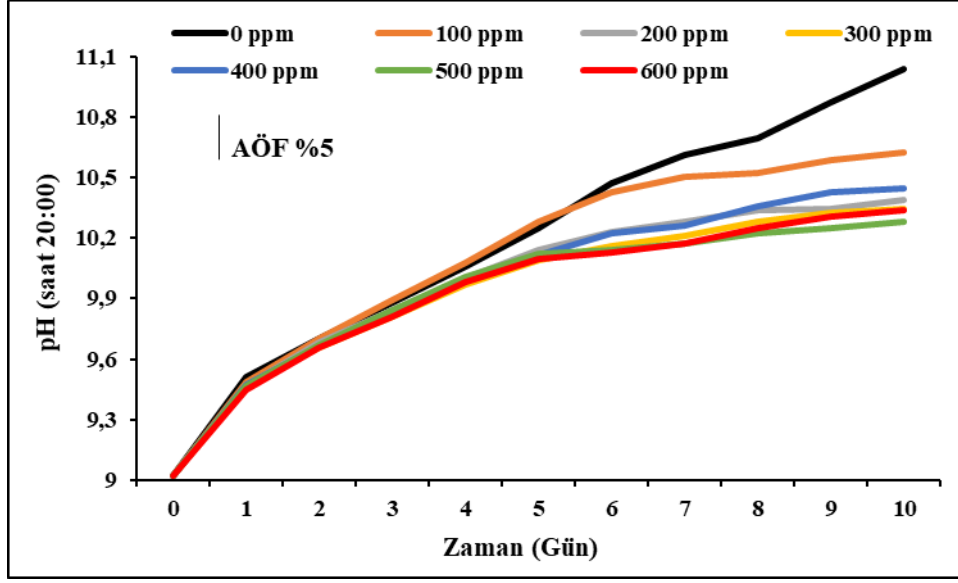
konsantrasyonlarda, 9. ve 10. günlerde ise tüm konsantrasyonlarda (100, 200, 300, 400, 500 ve 600 ppm) kontrole göre pH değerlerinde istatistiksel olarak azalma görülmüştür ($p < 0.05$).



Şekil 4.3. *A. platensis*'in potasyum sorbat konsantrasyonlarına bağlı karanlığın son saatindeki (saat 08:00) 10 günlük pH değişimi.

A. platensis'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğinin pH'da meydana getirdiği değişimlerin aydınlığın son saatindeki (saat 20:00) değerleri Şekil 4.4.'de verilmiştir.

Birinci günden onuncu güne kadar günler kendi aralarında kıyaslandığında, potasyum sorbat bileşiğine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinde ilk beş gün uygulanan dozlarda kontrole göre bir değişim gözlenmemiştir. Altıncı 7.ve 8. günlerde 200, 300, 400, 500 ve 600 ppm konsantrasyonlarda, 9. ve 10. günlerde ise tüm konsantrasyonlarda (100, 200, 300, 400, 500 ve 600 ppm) kontrole göre pH değerlerinde istatistiksel olarak azalma görülmüştür ($p < 0.05$).

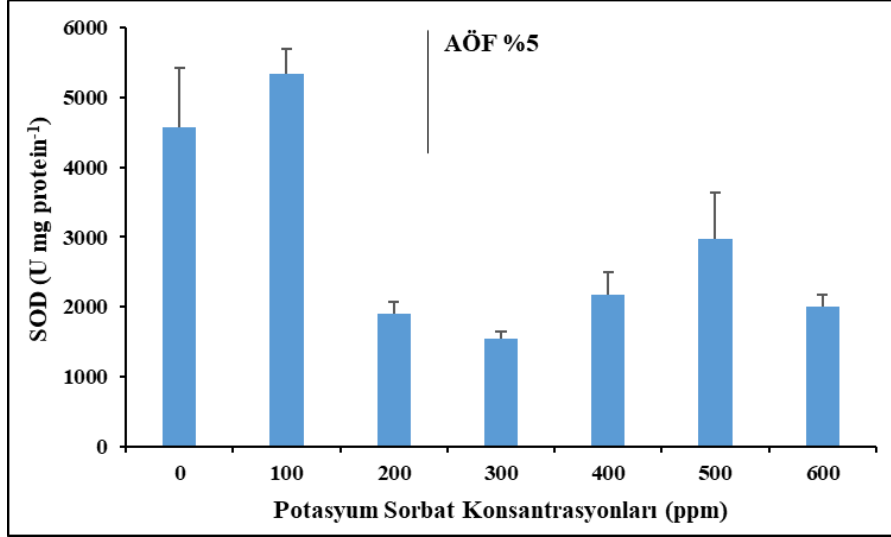


Şekil 4.4. *A. platensis*'in potasyum sorbat konsantrasyonlarına bağlı aydınlığın son saatindeki (saat 20:00) 10 günlük pH değişimi.

4.4. Toplam Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

A. platensis'e uygulanmış çeşitli konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğinin toplam süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.5.'de verilmiştir.

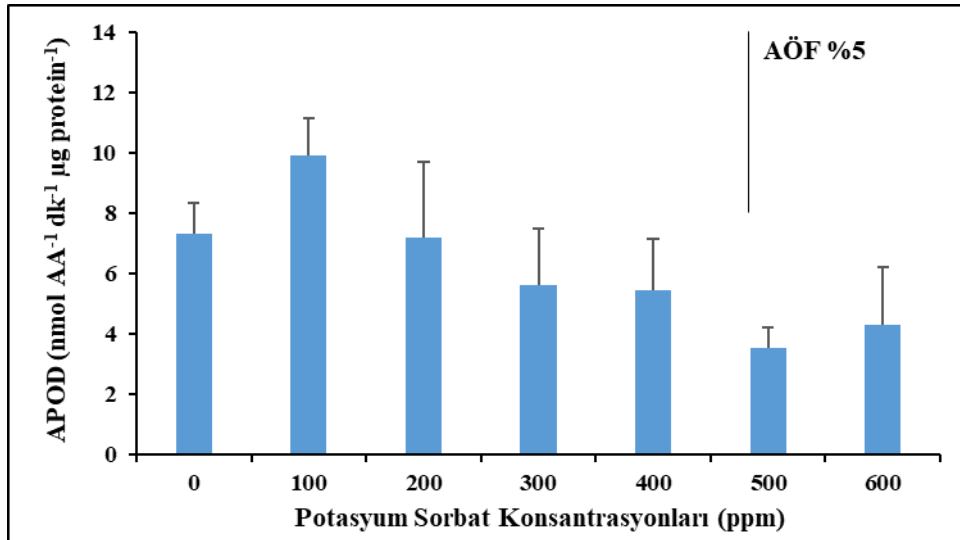
100 ve 500 ppm hariç diğer tüm konsantrasyonlarda potasyum sorbat etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin toplam SOD aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermiştir ($p < 0.05$). Toplam SOD aktivitesinin en yüksek (5335,29 U mg protein⁻¹) ve en düşük (1545,17 U mg protein⁻¹) olduğu değerler sırasıyla 100 ppm ve 300 ppm potasyum sorbat konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. *A. platensis*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğine bağlı olarak toplam SOD aktivitesinde görülen değişim.

4.5. Toplam Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

A. platensis'e uygulanmış çeşitli konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğinin toplam askorbat peroksidaz (APOD) aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.6.'da verilmiştir. Uygulanan tüm konsantrasyonlarda potasyum sorbat etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin toplam APOD aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ($p > 0.05$). Toplam APOD aktivitesinin en yüksek (9,89 nmol AA⁻¹ dak⁻¹ µg protein⁻¹) ve en düşük (3,55 nmol AA⁻¹ dak⁻¹ µg protein⁻¹) olduğu değerler sırasıyla 100 ppm ve 500 ppm konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

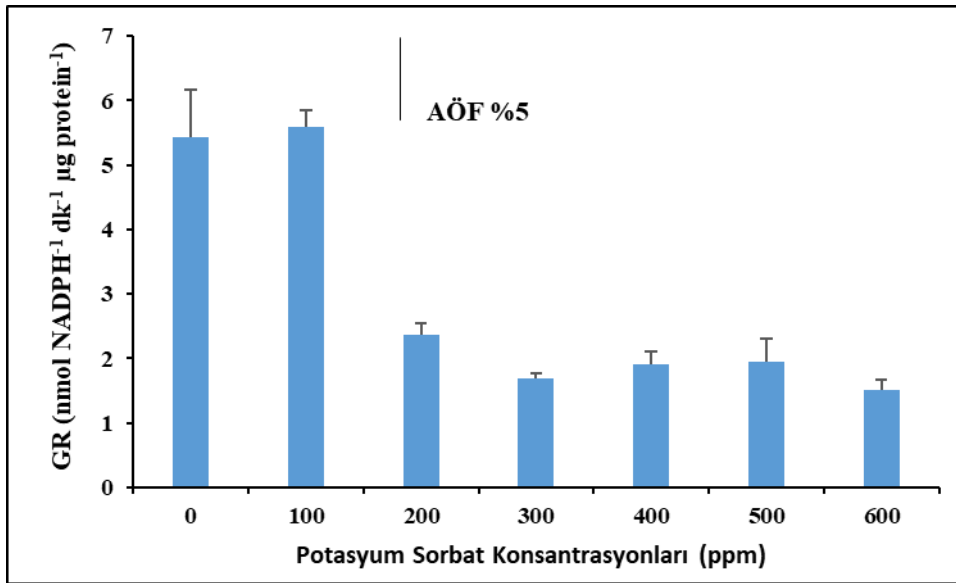


Şekil 4.6. *A. platensis*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğine bağlı olarak toplam APOD aktivitesinde görülen değişim.

4.6. Toplam Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

A. platensis'e uygulanmış çeşitli konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğinin toplam glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.7.'de verilmiştir.

Potasyum sorbat etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin toplam GR aktivitesi 100 ppm konsantrasyon haricindeki diğer tüm konsantrasyonlarda (200, 300, 400, 500 ve 600 ppm) kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p < 0.05$). Toplam GR aktivitesinin en yüksek ($5,59 \text{ nmol NADPH}^{-1}\text{dk}^{-1}\mu\text{g protein}^{-1}$) ve en düşük ($1,51 \text{ nmol NADPH}^{-1}\text{dk}^{-1}\mu\text{g protein}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 100 ppm ve 600 ppm potasyum sorbat konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

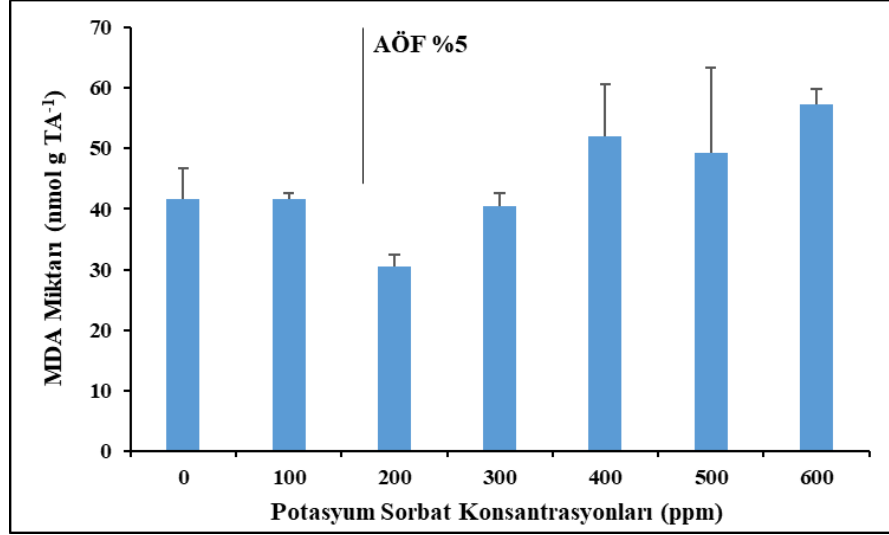


Şekil 4.7. *A. platensis*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğini bağı olarak toplam GR aktivitesinde görülen değişim.

4.7. Malondialdehit (MDA) Miktarı

A. platensis'e uygulanmış çeşitli konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğinin malondialdehit (MDA) miktarı üzerine etkisi Şekil 4.8.'de verilmiştir.

Tüm konsantrasyonlarda (100, 200, 300, 400, 500 ve 600 ppm) potasyum sorbat etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin MDA miktarı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir ($p > 0.05$). MDA miktarının en yüksek ($57,33 \text{ nmol g TA}^{-1}$) ve en düşük ($30,58 \text{ nmol g TA}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 600 ve 200 ppm potasyum sorbat konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

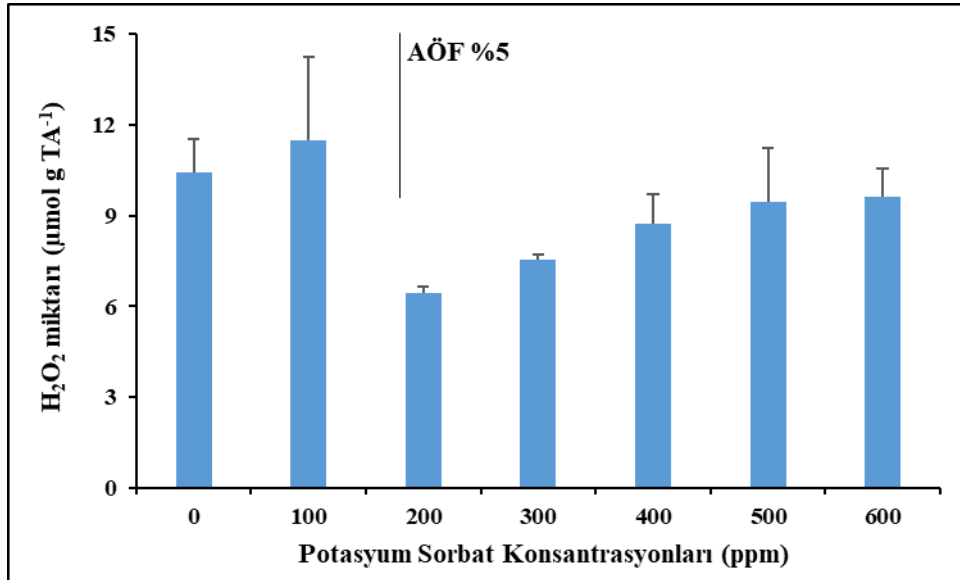


Şekil 4.8. *A. platensis*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğine bağlı olarak MDA miktarında görülen değişim.

4.8. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı

A. platensis'e uygulanmış çeşitli konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğinin hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı üzerine etkisi Şekil 4.9.'da verilmiştir.

Tüm konsantrasyonlarda (100, 200, 300, 400, 500 ve 600 ppm) potasyum sorbat etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin H₂O₂ miktarı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir ($p > 0.05$). H₂O₂ miktarının en yüksek (11,49 $\mu\text{mol g TA}^{-1}$) ve en düşük (6,43 $\mu\text{mol g TA}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 100 ve 200 ppm potasyum sorbat konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

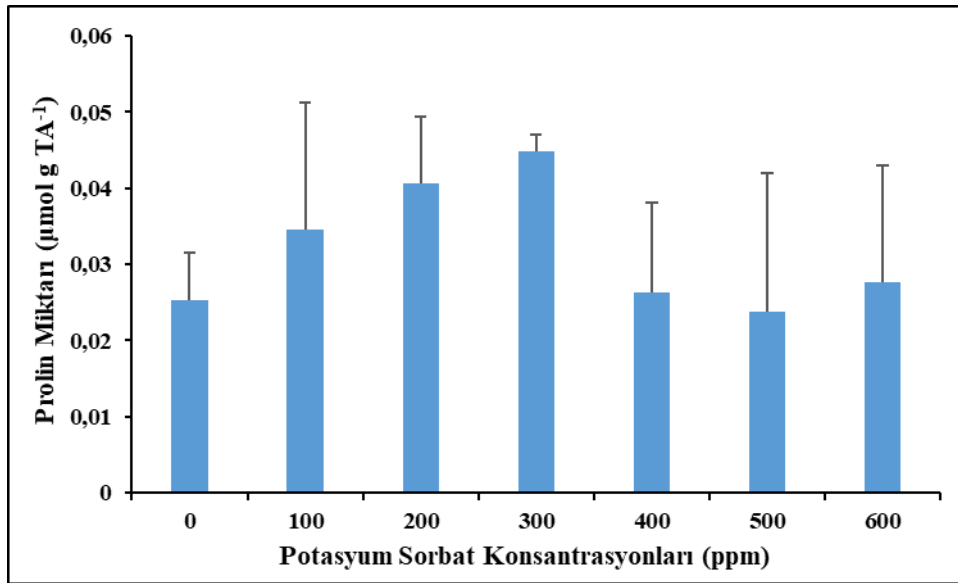


Şekil 4.9. *A. platensis*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğine bağlı olarak H₂O₂ miktarında görülen değişim.

4.9. Serbest Prolin Miktarı

A. platensis'e uygulanmış çeşitli konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğinin serbest prolin miktarı üzerine etkisi Şekil 4.10.'da verilmiştir.

Potasyum sorbat etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin serbest prolin miktarı 500 ppm konsantrasyonunda kontrole göre istatistiksel olarak azalma gösterirken; diğer tüm konsantrasyonlarda (100, 200, 300, 400 ve 600 ppm) kontrole göre istatistiksel olarak artma göstermiştir ($p < 0.05$). Serbest prolin miktarının en yüksek ($0.044 \mu\text{mol g TA}^{-1}$) ve en düşük ($0.024 \mu\text{mol g TA}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 300 ve 500 ppm konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. *A. platensis*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki potasyum sorbat bileşiğine bağlı olarak serbest prolin miktarında görülen değişim.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada *Arthrospira platensis* algine uygulanan potasyum sorbat bileşiğinin çeşitli konsantrasyonlarının OD 560, klorofil-*a* miktarı, pH değerleri, bazı antioksidan enzimlerin aktiviteleri [süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APOD) ve glutatyon redüktaz (GR)] ile hidrojen peroksit (H₂O₂), malondialdehit (MDA) ve prolin miktarında neden olduğu değişimler araştırılmıştır.

Alglerde büyüme ve gelişmeyi yorumlamak için klorofil-*a* ve OD 560 değerleri önemli birer parametredirler. Çalışma süresinin ilk 6 gününde *A. platensis*'de klorofil-*a* ve OD 560 değerlerinde kontrole göre değişim gözlenmemiştir. Yedinci, 8. ve 9. günlerde 100 ve 500 ppm hariç diğer tüm konsantrasyonlarda (200, 300, 400 ve 600 ppm) kontrole göre azalma görülmüş olup; 10. gün ise 100 ppm hariç diğer tüm konsantrasyonlarda (200, 300, 400, 500 ve 600 ppm) azalma görülmüştür. Potasyum sorbat, sorbik asidin potasyum tuzudur. Bitkilerde birçok işlevi olan yaygın ve etkili bir antioksidandır. Bununla birlikte, sıçan, balık, bakteri ve insan sağlığı dahil olmak üzere çeşitli türler için orta derecede toksisiteye sahiptir. Yapılan bir çalışmada, potasyum sorbatın *Euglena gracilis*'in hareketi ve fotosentetik parametreleri üzerindeki etkileri kısa süreli maruz kalma sırasında incelenmiştir. Çalışmaya göre, kamçılı bir alg olan *E. gracilis* için potasyum sorbat bileşiğinin hareketlilik, yerçekimi oryantasyonunun kesinliği (*r*-değeri), yukarı doğru hareket ve hizalama gibi farklı fizyolojik parametreleri etkilediği ve 2867.2 mg L⁻¹ olan EC₅₀ değeriyle akut toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda uygulanan potasyum sorbat için belirlenen konsantrasyonlar *E. gracilis* alginin EC₅₀ değerinden daha düşüktür. Bu durum prokaryotik *A. platensis* alginin potasyum sorbat toksisitesine daha hassas olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, aynı kimyasala maruz bırakılan prokaryot alglerin ökaryotik alglere göre daha hassas olduğu tespit edilmiştir (Tekbaba ve ark., 2021).

Çalışmamızda klorofil-*a* değerlerinde görülen değişimler büyüme oranında görülen değişimlerle paralel şekilde seyretmiştir. Çalışma süresinin ilk 6 gününde *A. platensis*'de klorofil-*a* değerlerinde kontrole göre değişim gözlenmemiştir. Yedinci, 8., 9. ve 10. günlerde 100 ppm hariç diğer tüm konsantrasyonlarda (200, 300, 400, 500 ve

600 ppm) kontrole göre azalma görülmüştür. Yine *E. gracilis* üzerinde yapılan aynı çalışmada, 625 mg L⁻¹ potasyum sorbat üzerindeki konsantrasyonlarda, fotosentetik verimliliğin ve elektron taşıma hızının inhibisyonunun indüklendiği ve 2500.0 mg L⁻¹ üzerindeki konsantrasyonlarda, *Euglena* hücrelerinin düşük ışık varlığında bile tam bir fotosentez inhibisyonuna uğradığı belirtilmiştir (Engel ve ark., 2015). Bir karbon kaynağının yüksek konsantrasyonlarında gelişen hücrelerin klorofil pigmenti oluşturamamasının, bazı esansiyel azotlu metabolit ya da rezerv materyal eksikliğinden kaynaklanabileceği ya da kimyasal bir maddenin fazla miktarda varlığından dolayı bu kimyasal maddenin temel genleri bastırması ve biyosentetik enzimleri inhibe etmesinden kaynaklanabileceği varsayılmaktadır. Kimyasal bir madde varlığında klorofil sentezinde görevli genlerin baskılanması en yaygın kabul gören hipotezdir. Yüksek konsantrasyonlarda potasyum sorbat varlığında klorofil oluşumundaki azalma ve bu azalmaya bağlı olarak gerçekleşen fotosentez inhibisyonu olayı bu hipotezle desteklenebilir (Harris ve Kirk, 1969).

Çalışmamızda ilk 5 gün boyunca pH değerlerinde kontrole göre bir değişim gözlenmemiştir. Altıncı günün karanlığın son saatinde (saat 08:00) yapılan pH ölçümünde 100 ve 200 ppm hariç diğer tüm konsantrasyonlarda, aynı günün aydınlığın son saati (saat 20:00) yapılan pH ölçümlerinde 100 ppm hariç diğer tüm konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiki azalma görülmüştür. Yedinci ve 8. günlerde gün içinde yapılan iki pH ölçümünde de sadece 100 ppm'de değişim görülmezken, 9. ve 10. günlerde artık tüm konsantrasyonlarda azalma gözlenmiştir. pH'nın 6. günün karanlık saatine denk gelen ölçümünün yüksek konsantrasyonlarda azalma göstermesi durumu, canlının artan konsantrasyonlarla birlikte büyüme ve klorofil-*a* miktarlarında 7. günden itibaren görülmeye başlanan azalmanın habercisidir. pH değerlerinde de 7. ve 8. günlerde 100 ppm de değişim görülmemesi aynı günler için büyüme ve klorofil-*a* miktarları için de benzerlik arz etmiştir. Bununla birlikte pH değerleri 9. ve 10 gün kontrole göre azalma göstermiştir fakat bu değişim büyüme ve klorofil-*a* verilerinde de azalma olarak görülse de istatistiksel olarak fark oluşturmamıştır. Onuncu günden sonra ölçümlere devam edilmesi durumunda büyüme ve klorofil-*a* miktarlarında azalmaya neden olması muhtemeldir. CO₂ suda çözünerek geri dönüşümlü olacak şekilde H₂CO₃, HCO₃ ve CO₃ bileşiklerini oluşturmaktadır. Bu bileşikler ortamın pH değerlerini dengede tutan tampon sistemini oluşturur. Eğer fotosentez artış gösterirse CO₂ aşırı tüketildiğinden dolayı H₂CO₃ tersinir reaksiyonla

CO₂'ye dönüştürülür ve ortamın asitliği azaldığından pH artar. Ters olarak fotosentezin azalması sonucu ortamda kullanılmayan CO₂'in H₂CO₃ bileşiğine dönüşümü artış gösterir ve ortam asitleşir. Bunun sonucu olarak da pH düşer (Wetzel, 2001). Çalışmamızda 7. günden itibaren klorofil-*a* miktarında artan konsantrasyonlarla birlikte azalmanın görülmesi fotosentetik aktivitenin azaldığını göstermektedir. pH değerlerinde de klorofil-*a* miktarında görülen azalma ile paralellik gözlenmesi fotosentetik aktivitede görülen azalmayı desteklemektedir.

Çalışmamızda, potasyum sorbat bileşiği uygulanan *A. platensis* kültüründe 100 ppm hariç tüm konsantrasyonlarda (200, 300, 400, 500 ve 600 ppm) SOD aktivitesinde azalma görülse de 500 ppm konsantrasyondaki azalma istatistiki olarak kontrole göre farklı değildir. Scandalios (1993), fotosentetik hücrelerde, süper oksit (O⁻²) esas olarak solunum sırasında ve fotosentez sırasında üretildiğini bildirmiştir. Süper oksit radikalini hidrojen peroksit (H₂O₂) parçalayan reaksiyonu SOD enzimi katalizlemektedir (Abouzari ve Fakheri, 2015). Fujita ve ark. (2009), *Euglena* üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada antioksidan biyosentezinin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olan yüksek ışık yoğunluğu ve tuz gibi birçok çevresel stres tarafından desteklendiğini bildirmiştir. Klorofil tarafından absorbe edilen ışık esas olarak hücre büyümesi için (fotosentez yoluyla) kullanılmasına rağmen, aynı zamanda fotoinhibisyona yol açan ROS oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedendir ki SOD aktivitesinin stres koşullarında genellikle artan bir grafik oluşturduğu bilinmektedir (Allen, 1995). Ökaryotik tek hücreli bir alg olan *Chlorella vulgaris* üzerinde bakır (Cu) ile yapılan stres çalışmasında, Piotrowska-Niczyporuk ve ark. (2012), SOD enzim aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Yapılan başka bir Cu stres çalışmasında da *Scenedesmus bijugatus* alginde, Nagalakshmi ve Prasad (2001), SOD aktivitesinde artış gözlemlendiğini bildirmişlerdir. *Tetraselmis gracilis* alginde kadmiyum (Cd) ağır metalinin antioksidan enzim sistemi üzerine etkilerini araştıran Okamoto ve ark. (1996), SOD enzim aktivitesinin artan Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak arttığını bildirmişlerdir. Fakat literatürde yukarıdaki stres cevaplarının tersinin görüldüğü çalışmalarda mevcuttur. Buradaki farklılıklar, çalışılan maddelerin hücredeki farklı yapı ve moleküllere karşı afinitesinden kaynaklanmaktadır. Chen ve ark. (2017), tek hücreli *Dunaliella tertiolecta* algi üzerinde yaptıkları çalışmada, bütil paraben (BP), sodyum diasetat (SDA) ve potasyum sorbatın (PS) olası toksisitelerini test etmişlerdir. Sonuçlara göre üç gıda koruyucu maddesi de algin klorofil ve karotenoid içeriğinde,

süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktivitelerinde önemli bir azalmaya sebebiyet vermiştir. Ayrıca çalışmada BP, SDA ve PS'nin hafif alkali koşullar altında *D. tertiolecta*'ya karşı düşük toksisiteye sahip olduğu, asidik koşullar altında ise SDA'nın orta düzeyde toksisiteye sahip olduğu ve PS'nin yüksek toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu duruma paralel olarak bizim çalışmamızda 100 ppm konsantrasyondaki pH değerinin (pH = 10.62) kontrol grubuna (pH = 11.03) en yakın pH değeri olduğundan istatistiki olmasa da bir artışın olduğunu belirtebiliriz. Çalışmamızda uyguladığımız yüksek konsantrasyonlardaki ölçülen düşük pH değerleri ortamın asiditesinin arttığına ve yukarıdaki açıklanan çalışmadaki gibi potasyum sorbatın toksisitesinin artmasına işaret edebilir. Bu sebeple azalan pH değerleri SOD aktivitesindeki azalmalara neden olmuş olabilir. Yüksek potasyum sorbat konsantrasyonlarının muamelesi sonucunda SOD aktivitesindeki azalmanın nedenlerine ek olarak literatürdeki çalışmalarda, insan kan lenfositlerinde kromozomal anormalliklere, insan periferik kan lenfositlerinde in vitro olarak genotoksik veya mutajenik etkilere neden olduğu ve sıçan hepatosit hücrelerine ve zarına zarar verdiği bildirilmiştir (Furia, 1972; Fisher, 1980; Mamur ve ark., 2010). Ayrıca potasyum sorbatın insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik, mutajenik ve klastojenik etkileri in vitro olarak çalışılmış ve kansere neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Türkoğlu, 2007; Soares ve ark., 2015). Başka yapılan çalışmalarda, potasyum sorbatın insan vücudundaki metabolizması sonucu DNA ile reaksiyona giren ve DNA hasarına neden olan aktif bileşiklere ayrışabileceği bildirilmiştir (Dolatabadi ve Kashanian, 2010; Mpountoukas ve ark., 2008). Çeşitli araştırma sonuçları, insanlarda artan potasyum sorbat alımının (> 25 mg/kg), mutajenik bileşikler üreterek ve kromozom aberasyonlarını, kardeş kromatid değişimini, DNA kırılmasını indükleyerek sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açabileceğini göstermiştir (Dehghan ve ark., 2018). Yukarıdaki değinilen literatür bilgileri ışığında, yapmış olduğumuz çalışmadaki yüksek konsantrasyonlardaki azalan SOD enzim aktivitesinin nedeninin *A. platensis* alginin genetik materyalinde oluşturduğu muhtemel hasardan kaynakladığını söyleyebiliriz.

Yapmış olduğumuz çalışmada APOD aktivitesinde potasyum sorbat bileşiğinin kontrole göre anlamlı bir farklılık oluşturmadığı görülmektedir. Bununla birlikte kontrole göre tüm dozlarda aktivitede bir azalma görülmüştür. APOD ve GR enzimleri hücrenin redoksunu koruyan antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimlerdir. Bu

durumu öncelikli olarak hücrede üretilen H₂O₂'yi temizleyerek gerçekleştirirler (Asada, 1992; Verma ve Dubey, 2003). APOD aktivitesinin aksine, çalışmamızda GR enzim aktivitesinin 100 ppm hariç diğer tüm konsantrasyonlarda anlamlı azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Bir kimyasal bileşiğin, yüksek konsantrasyonlarında ilk olarak GSH havuzu etkileneceğinden GR enzim aktivitesinde azalma görülebilir. Bu durumun redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) dönüşümünün baskılanmasıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Galhano ve ark., 2010). *Ulva fasciata* alginde Cd ağır metalinin antioksidan savunma sistemi üzerine etkilerini araştıran Wu ve Lee (2008), artan Cd konsantrasyonu ile paralel olarak GSH ile GSSG miktarlarının azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Bakır (Cu) ve çinko (Zn) ağır metallerinin *Scenedesmus* sp. alginin antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkilerini araştıran Tripathi ve ark. (2006), GR enzim aktivitesinde, iki metalinde artan konsantrasyonlara bağlı olarak azalma olduğunu belirtmişlerdir. Suda yüksek oranda çözünme özelliğinden dolayı sucul alanlarda yaşayan organizmalar için toksik etkiye neden olan kadmiyum klorür tuzu (CdCl₂) ile yapılan bir stres çalışmasında, Liu ve Pang (2010), *Grateloupia turuturu* ve *Palmaria palmata* alglerinde GR enzim aktivitesinde azalma gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda da GR aktivitesinin tüm yüksek konsantrasyonlarda azalma göstermesi GSH havuzunun etkilendiğine işaret etmektedir.

Bu çalışmada potasyum sorbat uygulanan tüm konsantrasyonlarda *A. platensis* kültürlerinin MDA miktarlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir. *Oryza sativa* bitkisi üzerinde tuz stresi çalışması yapan Lin ve Kao (2000), MDA miktarında değişim olmadığını belirterek bu durumu antioksidan savunma sistemi üyelerinin aktivitelerindeki değişimle açıklamışlardır. Yapılan başka bir çalışmada ise *A. platensis* algi üzerinde bentagran herbisitinin antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri araştırılmış olup, bu çalışmada da MDA miktarında bir değişim gözlenmemiştir (Er, 2019).

Çalışmamızda *A. platensis* kültürlerinde potasyum sorbat bileşiğinin uygulanan tüm konsantrasyonlarda H₂O₂ miktarında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa neden olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, *Anabaena cylindrica* algine bentazon uygulanmış ve GR, KAT ve APOD enzimlerinin H₂O₂ miktarını azalttığı rapor edilmiştir (Galhano ve ark., 2010). Aslında APOD enziminin hücrelerde H₂O₂ birikimini engelleyen en önemli enzim olduğu bilinmektedir (Asada, 1992). Bizim

çalışmamızda APOD enziminde ve H₂O₂ miktarında istatistiksel bir farklılığın gözlenmemesi KAT enzim aktivitesinin öne çıktığını gösterebilir.

Yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarına göre 100, 200, 300, 400 ve 600 ppm konsantrasyonlarında potasyum sorbatın etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin serbest prolin miktarı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma gösterirken; 500 ppm konsantrasyonlarında potasyum sorbat bileşiği etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin serbest prolin miktarı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir.

Literatürde genellikle, stres koşullarında serbest prolin miktarının arttığından bahsedilmektedir. Bunun nedenleri, hücrede stres koşullarında reaktif oksijen türlerinin oluşumunun engellenmesi, osmotik düzenleme, enzimleri korunması, organellerin stabilizasyonunun sağlanması ve sitozolik pH'ın düzenlenmesi gibi olaylarda görev almasından kaynaklanmaktadır (Venekamp, 1989; Nikolopoulos ve Manetas, 1991; AliaSaradhi, 1993; Delauney ve Verma, 1993). *C. vulgaris* algi üzerinde yapılan bir çalışmada yüksek Cu konsantrasyonlarında hücre içi metal birikimden kaynaklı serbest prolin miktarında da artma gözlemlendiği bildirilmiştir (Mehta ve Gaur, 1999). Fakat bizim çalışmamızda 500 ppm konsantrasyonunda olduğu gibi literatürde serbest prolin miktarının azaldığını bildirilen çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, sodyum sülfite (Na₂SO₃) uygulanan *Trebouxia* sp. alginde serbest prolin miktarının azaldığı belirtilmiştir. Ewald ve Schlee (1983), yaptıkları çalışmada prolin miktarının azalması sonuçlarını stres koşulları nedeniyle prolin sentezinin herhangi bir aşamasında inhibe edilmiş olabileceği durumu ile açıklamışlardır. Başka bir neden ise, serbest prolin miktarındaki azalışın, bir amino asit olan bu molekülün serbest radikaller tarafından kullanılmış olacağı olasılığı ile açıklanabilir.

Çalışmamızda *A. platensis*'e uygulanan potasyum sorbat maddesine verilen antioksidan cevaplar incelenmiştir. Ortaya çıkan sonuçlarda potasyum sorbatın *A. platensis* alginin gelişimi üzerine olumsuz etki ettiği saptanmış, toksik etkileriyle ilgili ipuçları elde edilmiştir. Ortaya çıkan reaktif oksijen türleri ve hücrelerde görülen diğer cevaplar potasyum sorbatın hücre içerisindeki metabolik dengeyi etkilediğinin bir kanıtı olarak değerlendirilebilir. Gıda ve ilaç sektöründe fazlaca kullanılan ve kullanım miktarları günden güne artan gıda katkı maddelerinin kontrol altında tutulmasının gerekliliği bir kez daha ortaya çıkmıştır. Gün geçtikçe azalan gıda kaynaklarının raf

sürelerinin uzatılması, tat ve koku kalitesinin artırılması, sıvı formdaki ilaçların kontaminasyona karşı korunması gibi insanlık adına birçok kritik noktada kullanımı gerçekleştirilen bu maddelerin tüketiminin ve sonunda oluşan atık takibinin yapılmasının son derece gerekli olduğu bir kez daha ortaya çıkmıştır.

Gıda katkı maddeleri ve özellikle de potasyum sorbat bileşiminin neden olduğu çevresel kirlenmelerin tespitinde çeşitli yüksek yapıya sahip organizmalara kıyasla bu küçük organizmaların kullanımının hızlı ve güvenilir göstergeler olarak daha sonraki çalışmalara da ışık tutabileceği düşünülmektedir.





KAYNAKLAR

- Abe, S. & Sasaki, M. (1977). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *Journal of the National Cancer Institute*, 58(6), pp. 1635-1641.
- Abouzari, A. & Fakheri, B. A. (2015). Reactive oxygen species: generation, oxidative damage, and signal transduction. *International Journal of Life Sciences*, 9(5), pp. 3-17.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. & Tattini, M. (2012). Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, Issue 196, pp. 67-76.
- AliaSaradhi, P. P. (1993). Suppression in mitochondrial electron transport is the prime cause behind stress-induced proline accumulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 193(1), pp. 54-58.
- Allen, J. (1995). *Natural language understanding*. basım yeri bilinmiyor: Benjamin-Cummings Publishing Co.
- Altuğ, T., Boyacıoğlu, D., Kurtcan, Ü. & Demirağ, K. (2000). Gıda Katkı Maddeleri Analiz Yöntemleri. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, Issue 22, pp. 1-244.
- Arslan, M. (2004). Borik asitin insan periferel lenfositlerinde in vitro kromozom aberasyonu ve kardeş kromatid değişimi üzerindeki etkileri. *Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, pp. 1-62.
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(2), pp. 235-241
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*, 50(1), pp. 601-639.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology*, 141(2), pp. 391-396.
- Barnes, J., Zheng, Y. & Lyons, T. (2002). Plant resistance to ozone: the role of ascorbate. %1 içinde *In Air pollution and plant biotechnology*. Tokyo: Springer, pp. 235-252.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D. (1973). Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), pp. 205-207.
- Benzer, F. & Temizer, O. (2003). Fasciola hepatica ile enfekte koyunlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzimler ve nitrik oksit düzeyleri. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(3), pp. 657-661.
- Beyer, W. F. & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry*, 161(2), pp. 559-566.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp. 248-254.
- Bullerman, L. (1984). Effects of potassium sorbate on growth and patulin production by *Penicillium patulum* and *Penicillium roqueforti*. *Journal of Food Protection*, 47(4), pp. 312-315.
- Cerqueira, F. M., Medeiros, M. H. G. D. & Augusto, O. (2007). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, 30(2), pp. 441-449.
- Chichester, D. F. & Tanner, F. W. (1972). Antimicrobial food additives. %1 içinde T. E. Furia, dü. *Handbook of food additives*. Ohio: Rubber Publ. Co. Cleveland, pp. 138-159.
- Coz, C. J. L. & Abensour, M. (2005). Occupational contact dermatitis from potassium sorbate in milk transformation plant. *Contact Dermatitis*, 53(3), pp. 176-177.
- Davidson, P. M., Sofos, J. N. & Branen, A. L. (1993). *Antimicrobials in Food*. 2 dü. New York: yazarı bilinmiyor
- Delauney, A. J. & Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The plant journal*, 4(2), pp. 215-223.
- Demiral, T. & Türkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and experimental botany*, 53(3), pp. 247-257.
- Dolatabadi, J. E. N. & Kashanian, S. (2010). A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. *Food Research International*, 43(5), 1223-1230., 43(5), pp. 1223-1230.
- Eker, Ü. Ö. (1995). Reçellere katılan benzoik asit miktarının spektrofotometrik tayini. *Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, pp. 9-10.
- Ekşi, A. (1988). *Gıda muhafazası için koruyucu madde (antimikrobiyal) uygulamaları*. Ankara, T.C. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı Sınai Eğitim ve Geliştirme Merkezi Genel Müdürlüğü, pp. 1-8.
- Engel, F. ve diğerleri, (2015). Comparative toxicity of physiological and biochemical parameters in *Euglena gracilis* to short-term exposure to potassium sorbate. *Ecotoxicology*, 24(1), pp. 153-162.
- Er, Ş. (2019). İki farklı herbisit in *arthrospira platensis* gomont ve *chlorella vulgaris* beyerinck (beijerinck) alglerinin gelişimi ve antioksidan parametrelerinin üzerine etkisi. *Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*.
- Ewald, D. & Schlee, D. (1983). Biochemical effects of sulphur dioxide on proline metabolism in the alga *Trebouxia* sp.. *New Phytologist*, 94(2), pp. 235-240.
- Fujita, T., Ogbonna, J. C., Tanaka, H. & Aoyagi, H. (2009). Effects of reactive oxygen species on α -tocopherol production in mitochondria and chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Journal of applied phycology*, 21(2), pp. 185-191.
- Galhano, V., Peixoto, F. & Gomes-Laranjo, J. (2010). Bentazon triggers the promotion of oxidative damage in the Portuguese ricefield cyanobacterium *Anabaena cylindrica*: response of the antioxidant system. *Environmental toxicology*, 25(5), pp. 517-526.

- Gupta, D. K., Palma, J. M. & Springer., F. J. C. (2015). *Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress*. basım yeri bilinmiyor:yazarı bilinmiyor
- Gürsoy, S. (2002). Besinlerde katkı maddelerinin kullanımı ve sitrik asit toksisitesi. *Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, pp. 1-21.
- Hall, E. T. ve diğerleri, (2019). Patient-reported outcomes for cancer patients receiving checkpoint inhibitors: opportunities for palliative care—a systematic review. *Journal of pain and symptom management*,, 58(1), pp. 137-156.
- Harris, R. C. & Kirk, J. T. O. (1969). Control of chloroplast formation in *Euglena gracilis*. Antagonism between carbon and nitrogen sources. *Biochemical Journal*, 113(1), pp. 195-205.
- Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), pp. 189-198.
- Husarova, V. & Ostatnikova, D. (2013). Monosodium glutamate toxic effects and their implications for human intake: a review.. *Jmed Research*, 2013(2013), pp. 1-12.
- Kaya, F. F. & Topaktaş, M. (2007). Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Issue 626, pp. 48-52.
- Kobetičová, K., Mocová, K. A. & L. Mrháková, Z. F. (2016). Artificial sweeteners and the environment.. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(2), pp. 149-153.
- Kulacki, K. J. ve diğerleri, (2012). How do stream organisms respond to, and influence, the concentration of titanium dioxide nanoparticles? A mesocosm study with algae and herbivores. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(10), pp. 2414-2422.
- Lin, C. C. & Kao, C. H. (2000). Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant growth regulation*, 30(2), pp. 151-155.
- Liu, F. & Pang, S. J. (2010). Stress tolerance and antioxidant enzymatic activities in the metabolisms of the reactive oxygen species in two intertidal red algae *Grateloupia turuturu* and *Palmaria palmata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 382(2), pp. 82-87.
- Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solution. *Journal of Biological Chemistry*, 140(2), pp. 315-322.
- Mehta, S. K. & Gaur, J. P. (1999). Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytologist*, 143(2), pp. 253-259.
- Meng, Z. & Zhang, L. (1994). Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei induced in human lymphocytes by sodium bisulfite (sulfur dioxide).. *Yi Chuan xue bao= Acta Genetica Sinica*, 21(1), pp. 1-6.
- Mpountoukas, P., Vantarakis, A., Sivridis, E. & Lialiaris, T. (2008). Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), pp. 2390-2393.

- Munné-Bosch, S. & Alegre, L. (2002). Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(1), pp. 31-57.
- Nagalakshmi, N. & Prasad, M. N. V. (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, 160(2), pp. 291-299.
- Nikolopoulos, D. & Manetas, Y. (1991). Compatible solutes and in vitro stability of *Salsola soda* enzymes: proline incompatibility. *Phytochemistry*, 30(2), pp. 411-413.
- Nisar, N. ve diğerleri, (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular plant. Molecular plant*, 8(1), pp. 68-82.
- Oğan, H. (1996). *Gıda: insan sağlığı ile ilgili yasalar*. İstanbul: İstanbul Yayınevi.
- Okamoto, O. K., Asano, C. S., Aidar, E. & Colepicolo, P. (1996). Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (prasinophyceae). 1. *Journal of phycology*, 32(1), pp. 74-79.
- Parlak, Ş. (2007). Gıda koruyucu maddesi olan bifenil'in insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronükleus oluşumu üzerine etkileri. *Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Peng, Q. ve diğerleri, (2019). Potassium sorbate suppresses intestinal microbial activity and triggers immune regulation in zebrafish (*Danio rerio*). *Food & Function*, 10(11), pp. 7164-7173.
- Pierzynski, G. M. & Schwab, A. P. (1992). *Reducing heavy metal availability to soybeans grown on a metal contaminated soil. In Proceeding Conference on Hazardous Waste Research*. Boulder, CO, pp. 543-553.
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E. & Godlewska-Żyłkiewicz, B. (2012). Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, Issue 52, pp. 52-65.
- Saldamlı, İ. (1985). *Saldamlı, İ. (1985). Gıda katkı maddeleri ve ingredientler*. Yy. Ankara: Önder Matbaası.
- Saldamlı, İ. & Uygun, Ü. (2005). Gıda Kimyası/Gıda Katkı Maddeleri. *Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, pp. 533-547.
- Sarıkaya, R. (2005). Sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrit ve potasyum nitrat'ın genotoksik etkisinin somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırılması. *Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, pp. 1-110.
- Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, 101(1), pp. 7-12.
- Sgherri, C. L. M., Loggini, B., Puliga, S. & Navari-Izzo, F. A. (1994). Sgherri, C. L. M., Loggini, B., Puliga, S., & Navari-Izzo, F. Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: changes in response to desiccation and rehydration. *Phytochemistry*, 35(3), pp. 561-565.

- Tekbaba, A., Özpınar, S. Ç., Tunca, H., Sevindik, T. O., Doğru, A., Günsel, A., Bilgiçli, A. T., Yarasir, M. N. (2021). Synthesis, characterization and investigation of algal oxidative effects of water-soluble copper phthalocyanine containing sulfonate groups. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 26(2), 355-365.
- Tripathi, B. N., Mehta, S. K., Amar, A. & Gaur, J. P. (2006). Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short-and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. *Chemosphere*, 62(4), pp. 538-544.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, (1977). basım yeri bilinmiyor:T.C. Resmi Gazete.
- Urso, M. L. & Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), pp. 41-54.
- Valentine, J. S. ve diğerleri, (1998). The dark side of dioxygen biochemistry. *Current opinion in chemical biology*, 2(2), pp. 253-262.
- Venekamp, J. H. (1989). Regulation of cytosol acidity in plants under conditions of drought. *Physiologia Plantarum*, 76(1), pp. 112-117.
- Verma, S. & Dubey, R. S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164(4), pp. 645-655.
- Wang, S., Melnyk, J. P., Tsao, R. & Marcone, M. (2011). How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*, 44(1), pp. 14-22.
- Wang, S. Y., Jiao, H. J. & Faust, M. (1991). Wang, S. Y., Jiao, H. J., & Faust, M. (1991). Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during thidiazuron-induced bud break of apple. *Physiologia Plantarum*, 82(2), pp. 231-236.
- Wetzel, R. G. (2001). Limnology: lake and river ecosystems. Gulf professional publishing. USA.
- Wu, T. M. & Lee, T. M. (2008). Regulation of activity and gene expression of antioxidant enzymes in *Ulva fasciata* Delile (Ulvales, Chlorophyta) in response to excess copper. *Phycologia*, 47(4), pp. 346-360.
- Yentür, G. & Bayhan, A. (1990). Bazı gıda maddelerinde sorbik asit ve benzoik asit miktarlarının araştırılması. *Gıda*, 15(2), pp. 79-82.
- Yılmaz, S. (2008). Bazı gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri. *Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, pp. 36-76.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Eyüp ŞAŞ

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2016, Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2023, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER

- 2017-2020 yılları arasında ilaç sektöründe Tıbbi Tanıtım Temsilcisi olarak çalıştı.
- 2020 yılından beri Başakşehir Belediyesi'nde İlaçlama Birim Şefi olarak çalışmaktadır.