SİDAS MEDYA
Akademik Gıda®
ISSN Online: 2148-015X
http://www.academicfoodjournal.com
http://dergipark.gov.tr/akademik-gida

Akademik Gıda 17(2) (2019) 217-225, DOI: 10.24323/akademik-gida.613575

Araştırma Makalesi / Research Paper

Chlorella protothecoides Mikroalg Yağının Karakterizasyonu, Biyoaktif Özellikleri ve Antifungal Etkinliği

Azime Yılmaz

Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalürji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Davutpaşa Kampüsü, 34220, İstanbul

Geliş Tarihi (Received): 16.03.2019, Kabul Tarihi (Accepted): 31.07.2019
Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): yilmaz@yildiz.edu.tr (A. Yılmaz)
0 212 383 46 26 0 212 383 46 25

ÖZ

Mikroalgler protein, yağ asitleri, karbonhidrat, mineral, pigment, vitaminler, steroller, antioksidanlar ve biyoaktif polifenoller gibi değerli metabolitler üretilebilen, aktif bileşenler açısından zengin kaynaklardır. Bu değerli metobolitleri sayesinde günümüzde mikroalgler gıda, kozmetik, eczacılık, tarım gibi birçok alanda kullanım potansiyeline sahiptir. *Chlorophyta* grubuna ait yeşil tek hücreli *Chlorella* sp. antitümör, antikoagülan, antibakteriyel, antiviral, antifungal ve antioksidan aktivite göstermektedir. Mikroalg türlerinden elde edilen mikroalg yağlarının fungal mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve gıdalarda koruyucu olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada gıdalarda kalitatif ve kantitatif kayıplara yol açan *Penicillium chrysogenum* ve *Aspergillus parasiticus* funguslarına karşı, kimyasal gıda koruyucularına alternatif olabilecek *C. protothecoides* mikroalg yağının antifungal etkinliği incelenmiştir. *Penicillium chrysogenum* ve *Aspergillus parasiticus* funguslarına karşı %5 ve %10'luk konsantrasyonlarda dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak hazırlanan *C. protothecoides* mikroalg yağı, disk difüzyon metodu kullanılarak antifungal etkisi araştırılmıştır. Her iki fungal patojende *C. protothecoides* mikroalg yağının misel gelişimini azalttığı tespit edilmiştir. *C. protothecoides* mikroalg yağının antioksidan aktivitesi 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Mikroalg yağının antioksidan etkisi %45.93 olarak tespit edilmiştir. *C. protothecoides* mikroalg yağının, denenen *P. chrysogenum* ve *A. parasitıcus*'a karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda *C. protothecoides* yağının gıda endüstrisinde gıda koruyucu olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mikroalg yağı, Antioksidan aktivite, Antifungal aktivite, *Chlorella protothecoides*, Disk difüzyon metodu

Characterization, Bioactive Properties and Antifungal Activity of *Chlorella protothecoides* Microalgae Oil

ABSTRACT

Microalgae can produce valuable metabolites such as protein, fatty acids, carbohydrates, minerals, pigments, vitamins, sterols, antioxidants and bioactive polyphenols, which are rich sources of active ingredients. Thanks to these valuable metabolites, microalgae today have the potential to be used in many areas such as food, cosmetics, pharmaceuticals and agriculture. Green single cell *Chlorella* sp. belonging to the *Chlorophyta* group shows antitumor, anticoagulant, antibacterial, antiviral, antifungal and antioxidant activity. It is known that microalgae oils have antimicrobial effect against fungal microorganisms and can be used as a preservative in foods. In this study, the antifungal activity of *Chlorella protothecoides* microalgae oil, an alternative to chemical preservation, against *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus parasiticus* fungi, which may cause qualitative and quantitative losses in foods, was determined. The antifungal effect of *C. protothecoides* microalgae oil prepared by using 5% and 10%

concentrations in dimethyl sulfoxide (DMSO) against these fungi was determined by the disc diffusion method. In both fungal pathogens, *C. protothecoides* microalgae oil decreased micellar growth. The antioxidant activity of the *C. protothecoides* microalgae oil was determined using the 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) free radical removal method. Antioxidant effect of microalgae oil was determined as 45.93%. *C. protothecoides* microalgae oil had an antifungal activity against *P. chrysogenum* and *A. parasiticus*. According to the results, it can be concluded that *C. protothecoides* oil may be used as a food preservative in the food industry.

Keywords: Microalgae oil, Antioxidant activity, Antifungal activity, *Chlorella protothecoides*, Disc diffusion method

GİRİŞ

Gıda ve tarım ürünleri pek çok fungal mikroorganizmanın gelişmesi ve toksik metobolitlerini üretebilmeleri için uygun bir ortam sağlar. Bu fungal mikroorganizmalar gıda güvenliği ve ürün kalitesi açısından istenmeyen değişiklere yol açarak büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ürünlerdeki kalite ve kantititenin düşmesi sonucunda oluşan bu ekonomik kayıpların %30 civarında olduğu ancak gelişmekte olan ülkelerde bu kayıpların %30'dan daha fazla olduğu bilinmektedir [1].

Aspergillus ve *Penicillium* türleri gıdalarda bozulmalara neden olan fungal mikroorganizmalrın başında gelmektedir [2]. Bu fungusların gıdalarda gelişimi, lezzet kaybına, alerjik bileşiklerin oluşumuna ve mikotoksinlerin oluşumuna sebep olmaktadır. Bununla beraber bu fungusların aflatokin, okratoksin, patulin gibi toksik, mutajenik ve kanserojen etki gösteren insan sağlığına son derece zararlı mikotoksinler de salgıladıkları bilinmektedir [3].

Günümüzde gıda endüstrisinde gıdaların raf ömrünü uzatmak ve fungal mikroorganizmaların gelişimine engel olmak için kimyasal koruyucuların kullanımı başta olmak üzere çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Ancak fungal mikroorganizmaların kimyasal koruyuculara karşı zamanla direnç kazanması ve yüksek düzeyde kalıntı bırakmaları, ve tüketicilerin doğal ürünlere olan taleplerinin artmasından dolayı doğal koruyucu maddelerin kullanımı giderek yaygın bir hale gelmektedir [1]. Bu doğal koruyucu ajanlar arasında yer alan mikroalgler; antimikrobiyal etkilerinin olmasından dolayı gıdalarda yeni nesil koruyucu olarak kullanılma potansiyeline sahiptir [4,5]. Algler denizlerde, tatlı ve atık sularda yetişebilen fotosentetik organizmalardır [6]. Mikroalgler doğada bulunan biyolojik aktivitesi en yüksek kaynaklardan biri olup; protein, peptid, karbonhidrat, yağ asidi, pigment, vitamin, mineral ve daha pek çok metoboliti bünyelerinde biriktirebilmektedir [7]. Mikroalgler, bünyelerinde biriktirdikleri bu değerli metobolitleri nedeniyle günümüzde kozmetik, gıda, hayvan yemi, eczacılık, tarım, gibi geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir.

Chlorophyta grubuna ait yeşil tek hücreli *Chlorella* sp. mikroalgi klorofiller, proteinler, polisakkaritler, vitaminler, mineraller ve elzem aminoasitler açısından oldukça zengindir. Bu mikroalg türü, %53 (w/w) protein, %23 (w/w) karbonhidrat, %9 (w/w) lipit, ve %5 (w/w) minerallerden oluşmaktadır. *Chlorella* sp. ile yapılan çalışmalar, bu mikroalgin, antifungal, antibakteriyel, antioksidan antikanserojen, antiviral ve nutrasötik etkiye sahip olduğunu göstermiştir [8]. Mikroalglerde bulunan ve antifungal aktiviteye sahip biyoaktif bileşikler fungal misel büyümesini ve gelişimini durdurarak veya inhibe ederek, çimlenmeyi önleyerek veya patojenlerin sporülasyonunu azaltarak etki etmektedirler [7]. Bununla birlikte mikroalglerin antimikrobiyal aktiviteleri, alg türlerine ve ekstraksiyonunda kullanılan çözücülerede bağlı olarak değişebilmektedir [9, 10]. Mikroalgler yüksek antioksidan etkili bileşikler de içermektedir. Mikroalglerin yüksek antioksidan etkisi, α-tokoferol, β-karoten, glutatyon, askorbik asit, flavonoidler, hidrokinonlar, fikosiyaninler, prolin, fenolik bileşikler ve poliaminler gibi antioksidan bileşiklerinden kaynaklanmaktadır [11]. *C. protothecoides*'in içerdiği; lutein, astaksantin ve zeaksantin gibi biyoaktif bileşikler antioksidan aktiviteye sahiptir, aynı zamanda bakterilere ve fungal mikroorganizmalara karşı da etkilidirler [12]. Son yıllarda mikroalglerle ilgili pek çok çalışma olmasına ragmen gıda koruyucusu olarak antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı çalışmalar sınırlı kalmıştır.

Bu çalışmanın amacı, dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak %5 ve %10 konsantrasyonlarda hazırlanan *C. protothecoides* mikroalg yağının antioksidan etkisini belirleyerek, gıdalarda bozulma etmeni *Aspergillus parasiticus* ve *Penicillium chrysogenum*'a karşı, disk difüzyon yöntemi kullanılarak antifungal etkisini belirlemektir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Çalışmada kullanılan *C. protothecoides* mikroalg yağı, Soley Biyoteknoloji Enstitüsü'nden (El Sobrante, CA, ABD) temin edilerek, Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Algal Biyoteknoloji ve Biyomalzeme Laboratuvarı'ndan muhafaza edilmiştir. Mikroalg yağının özellikleri Tablo 1' de verilmiştir [15]. *C. protothecoides* mikroalg yağının antifungal etkisini incelemek amacıyla alg yağı DMSO'da (Merck) çözülerek 50 ve 100 mg/mL'lik konsantrasyonlar şeklinde hazırlanarak kullanılmıştır.

Tablo 1. *C. protothecoides* mikroalg yağının özellikleri [15].

Özellikler	Birim	Sonuç	Standart
Yoğunluk (15°C)	kg/m^3	867	ISO 3675
Viskozite (40°C)	Mm^2/s	3.8	ISO 3104
Alevlenme noktası	°C	124	ISO 15267
Karbon kalıntısı (% 10'luk distilasyonla elde edilen kalıntı)	% (m/m)	0.2	EN ISO 10370
Toplam kontaminasyon	mg/kg	2	EN 12662
Oksidasyon stabilitesi,110°C	saat	12	EN 14112
Kalori değeri	MJ/kg	37.49	DIN 51900
Asit değeri	mg.KOH/g	0.3	EN 14104
İyot değeri	mg.KOH/g	47	EN 14111
Su içeriği	mg/kg	80	ENISO12937
Sülfür İçeriği	mg/kg	2	ISO 3987
Fosfor içeriği	mg/kg	3	ISO 10540

Fungal mikroorganizmalar; *Aspergillus parasiticus* ve *Penicillium chrysogenum* Yıldız Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir [13, 14]. Fungal mikroorganizmaların aktif hale getirilerek antifungal etkinin belirlenmesinde Patates Dekstroz Agar (PDA) (Merck) besiyeri kullanılmıştır. *C. protothecoides* mikroalg yağının antioksidan aktivitesi 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH, Sigma) serbest radikali kullanılarak tayin edilmiştir.

C. protothecoides'in Gaz Kromatografi (GC) Analizi

Mikroalg yağının içeriğinin belirlenmesi amacıyla gaz kromatografisi cihazı kullanılmıştır. Analizler, gaz kromatografisine entegre alev iyonlaşma detektörüyle (YL Instruments 6100 GC) gaz kromatografisi cihazında gerçekleştirilmiştir. Gaz kromatografisi cihazı (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm) ZB-FFAP kolonu içermektedir. Kolon sıcaklık programı 75°C ile başlayıp, 16°C/dk hızla 145°C'ye, ardından 15°C/dk hızla 300°C'ye çıkmaktadır. Akış hızı 2 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak hidrojen gazı ve iç standart olarak Metil margarat (C17:0) kullanılmış ve örnekler metil margarat ve n-heptan ile karıştırılarak gaz kromatografisi için hazır hale getirilmiştir [15].

C. protothecoides'in Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Analizi

FTIR spektroskopisi, organik veya inorganik bileşiklerin karakterize edilmesinde kullanılmıştır. FTIR spektrumu, maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimiyle oluşan frekanslara karşılık gelen absorpsiyon pikleri ile örneğin parmak izini göstermektedir. Her maddenin kendine özgü bir spektrumu vardır. Organik madde spektrumlarının özellikle de 2000 cm^{-1} den sonra gelen kısmı daha ayrıntılıdır ve bu bölgeye parmak izi bölgesi denir [16]. Bu çalışmada Bruker Tensor 27 (Bremen, Almanya) FTIR cihazı kullanılmış, örnek ATR kristaline damlatılarak 600-4000 cm^{-1} aralığında içerdiği fonksiyonel grupların absorbans değerleri belirlenmiştir.

C. protothecoides'in Antifungal Etkisinin Belirlenmesi

Antifungal etkinin belirlenmesi için disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. PDA besi ortamları otoklavda 121°C'de, 1,1 atmosfer basınçta 15 dk sterilize edilerek hazırlanıp, steril petri kaplarına 15 mL PDA besiyeri dökülmüştür. PDA ortamında 28°C'de 7-10 gün süresince geliştirilen fungal kültürlerden mantar delici ile alınan fungal diskler (6mm) petrilerin ortasına yerleştirilmiştir. Daha sonra petrilerin üst kapaklarına steril kültür antibiyogram disk kağıtları yerleştirilerek DMSO ile 50 ve 100 mg/mL (%5 ve %10) konsantrasyonlarında hazırlanan alg yağları 50 µL/disk dozlarında otomotik pipetlerle antibiyogram disk kağıtlarına (6 mm, Bioanalyse) uygulanmıştır [17]. Petri kapakları sıkıca parafilmlendikten sonra ters çevrilerek 6 gün boyunca 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerde gelişen fungusların koloni çapları 3, 4, 5 ve 6. günlerde ölçümler alınmıştır. Denemeler üç tekerrürlü ve her tekerrürde üç paralel olacak şekilde yürütülmüştür. Kontrol olarak hazırlanan petrilerin kapaklarındaki antibiyogram disk kağıtlarına ise aynı oranda DMSO emdirilmiştir [18, 19].

C. protothecoides'in Antioksidan Etkisinin Belirlenmesi

C. protothecoides mikroalg yağının serbest radikal giderme etkinliği 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak Brand-Williams ve ark.'nın [20] kullandığı metot uygulanarak 20µg/mL DPPH çözeltisi metanolde çözülmüş ve bu çözeltiden 3.5 mL alınarak üzerine farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 µg/mL) [19] hazırlanan *C. protothecoides* mikroalg yağından 0.5 mL ilave edilmiştir. DPPH çözeltisi ve *C. protothecoides* mikroalg yağı ile hazırlanan karışımlar 30 dk., 60 dk. ve 90 dk. karanlıkta inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sürecinden sonra karışımların absorbansları 515nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur [21]. *C. protothecoides* mikroalg yağının serbest radikal giderme aktivitesi tayin edilmiş, standart olarak kullanılan bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)'e göre aktivite karşılaştırmaları yapılmıştır. DPPH radikal giderme aktivitesi aşağıdaki (Eşitlik 1) yardımı ile hesaplanmıştır [19]:

$$\text{DPPH. Radikal Giderme Aktivitesi (\%)} = [(A_0-A_1) / A_0] \times 100 \qquad \text{(Eşitlik 1)}$$

A_0: Kontrolün absorbans değeri
A_1:Örnek veya standardın absorbans değeri

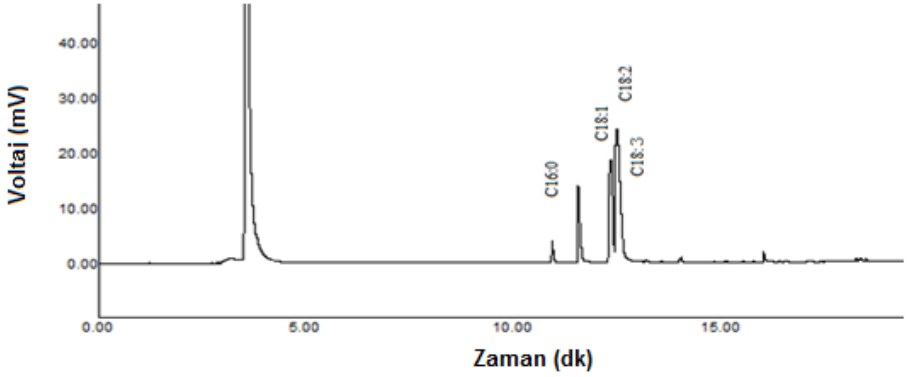
İstatistiksel Analizler

In vitro analizlerden elde edilen verilerin istatistiksel analizinde, herbir fungus türü kendi içerisinde değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Tek yönlü varyans analizleri JMP (release 6.0.0, SAS) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ortalamalar arasındaki önem dereceleri ise aynı paket program kullanılarak, Student's *t* karşılaştırma testi ile tespit edilen ortalamalar arasındaki asgari önemdeki farklara (AÖF) göre belirlenmiştir. Araştırma sonrasında elde edilen veriler, deney desenlerine uygun olarak varyans analizlerine tabi tutulmuştur.

BULGULAR VE TARTIŞMA

C. protothecoides'in Gaz Kromatografi (GC) Analizi

Gaz kromatografisi analizleri sonucunda alınan kromatogram incelendiğinde *C. protothecoides* yağının içeriğinde palmitik (16:0), oleik (18:1) ve linoleik (18:2) ve linolenik asitlerin (18:3) varlığı görülmektedir [15]. Diğer yağ asitleri eikosatrienoik asit (20:3) ve eikosapentaenoik asit (EPA) (20:5) asitlerin varlığı eser miktarlarda bulunduğundan sonuçlarda değerlendirilememiştir. Elde edilen kromatograma göre en baskın yağ asidi içeriği linoleik asit olarak görülmüştür (Şekil 1). Bu analiz ile *C. protothecoides* biyoaktif değere sahip olan ve faydalı çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin olduğu görülmüştür. Alg kaynaklı yağ asitleri adenozin trifosfat enerji transferini engeller ve bakteriyel enoil-açil taşıyıcı protein redüktaz gibi enzimleri inhibe eder ve daha sonra hücre lizizi ve peroksidasyonu ve oto-oksidasyon bozunma ürünleri meydana gelir [12]. Çalişkan Eleren ve Öneri [22], sürdürülebilir ve çevre dostu biyoyakıt hammaddesi üretimi için yaptıkları çalışmada *C. protothecoides*'in lipit içeriğini %50.50 olarak belirlemiştirler. *C. protothecoides* yağının yüksek antioksidan ve antifungal etkisi yağ asidi içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



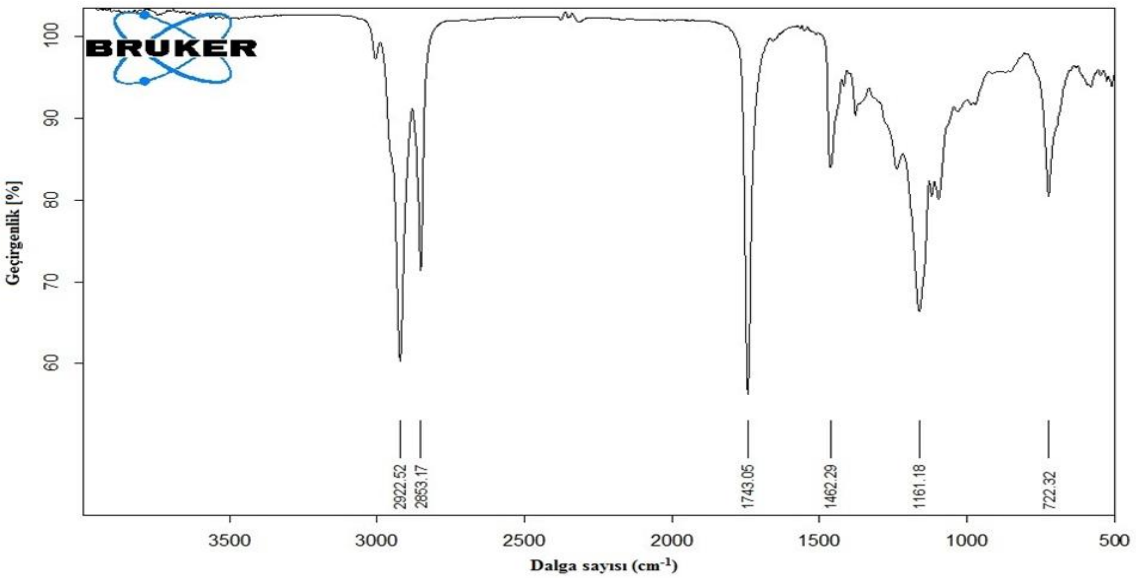
Şekil 1. *C. protothecoides* yağının metil esterlerinin kromatogramı

C. protothecoides'in Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Analizi

FTIR spektroskopisi, maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimiyle oluşan frekanslara karşılık gelen absorpsiyon piklerini göstermektedir. *C. protothecoides* mikroalg numunesinin FTIR sonucu Şekil 2'de gösterilmiştir.

FTIR spektroskopisi tek bir numunede hücre biyokimyasal bileşiminin (proteinler, lipitler, nükleik asitler ve karbonhidratlar) eşzamanlı olarak belirlenmesi imkanı sunar [23].

FTIR spektrumlarından tanımlanan fonksiyonel gruplar, Tablo 2'de gösterilmiştir. *C. protothecoides* örneğinde görülen 900-1800 cm^{-1} pikleri karbonhidrat - protein içeriğinden kaynaklanmaktadır [23]. 1743 cm^{-1} noktasında görülen spektral bant protein yapılarının N-H eğilme vibrasyonlarıyla ilişkilidir. *C. protothecoides* kimyasal yapısının %46.3 proteinle ilişkilidir. [22]. Alg kaynaklı polisakkaritler, fungal ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı antimikrobiyal etki göstermektedir [7]. 900-1200 cm^{-1} arasındaki spektral bölge karbonhidratlarla ilişkilidir ve Şekil 2'de de söz konusu spektral aralıkta belirgin şekilde görülmektedir [24]. *C. protothecoides* %15.43 oranında karbonhidrat içeriğine sahiptir [22]. 2853-2922 cm^{-1} aralığında görülen bantlar CH_2'nin C − H titreşim gerilmesi ile ilişkilidir. *C. protothecoides* örneğinde görülen 2800-3000 cm^{-1} (Tablo 2) pikleri lipit içeriğinden kaynaklanmaktadır [23]. Yapılan çalışmalarda, mikroalglerin içeriğindeki proteinler, polisakkaritler, lipidler, vitaminler, enzimler, steroller ve diğer değerli metabolitlerin antimikrobiyal ve antioksidan özellik gösterdiği belirtilmiştir [7].



Şekil 2. *C. prototheco*ides örneğinin FTIR sonuçları

Tablo 2. *C. prototheco*ides mikroalgin FTIR spektrumundaki fonksiyonel grupları

Dalga Sayısı (cm^{-1})	Fonksiyonel Gruplar
2853-2922	CH_2'nin C − H titreşim gerilmesi [23]
1462	metil (CH3) ve metilen (CH2) gruplarının gerilmesi [23]
1743	N-H eğilme [23]
1161	C-O ester ve C-N gerilmesi [23]
900-1200	C-O-C, C-O halka karbomhidrat titreşimleri [23, 24]

*C. prototheco*ides Yağının *Aspergillus parasiticus* Misel Gelişimine Etkisi

Aspergillus parasiticus koloni çapına inkübasyon süresinin etkisi incelendiğinde, fungal koloni çaplarında inkübasyon süresine bağlı olarak engelleme oranının arttığı gözlemlenmiştir (Tablo 3). İnkübasyonun 6. gününde *C. prototheco*ides yağının fumigasyon uygulamasında *A. parasiticus*'un 50 mg/mL konsantrasyonda 17.30 mm ve 100 mg/mL konsantrasyonda 17.10 mm en yüksek misel gelişimi elde edilmiştir. Kontrolün misel gelişimi ise 20.00 mm olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3). *A. parasiticus*'un misel gelişimine *C. prototheco*ides'in antifungal etki göstermesinin *C. prototheco*ides'te yoğun olarak bulunan terpenlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda antifungal aktiviteye sahip olan terpenlerin, özellikle *Aspergillus* sp.'ye karşı etkili olduğu gözlemlenmiştir [25]. Tablo 3'te *C. Prototheco*ides konsantrasyonun fungal koloni çapı değerleri üzerine etkisi incelendiğinde, *Aspergillus parasiticus*'un disklere uygulanan mikroalg yağının konsantrasyonu arttıkça misel gelişiminin 3. ve 4. günlerde azaldığı gözlemlenmiştir.

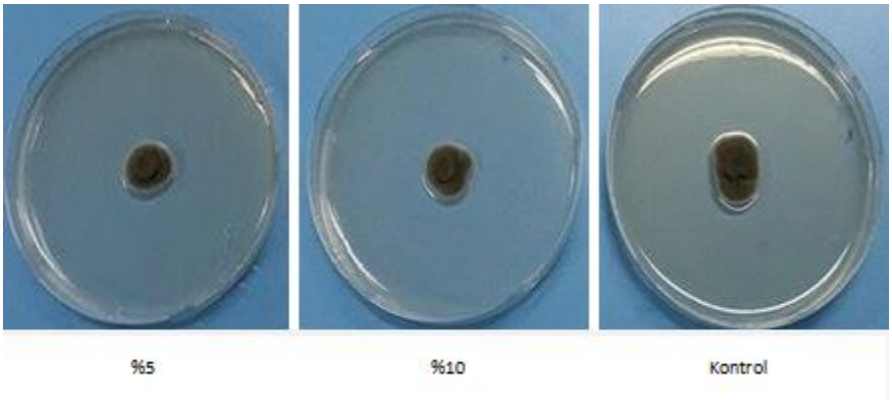
*C. prototheco*ides Yağının *Penicillium chrysogenum* Misel Gelişimine Etkisi

İnkübasyon 6. gününde *C. prototheco*ides yağının fumigasyon uygulamasında *Penicillium chrysogenum* en düşük misel gelişimini 100 mg/mL konsantrasyonda 19.00 mm gösterirken en yüksek misel gelişimini 50 mg/mL lik konsantrasyonda 21.00 mm göstermiştir. Kontrolün misel gelişiminin ise 30.70 mm olduğu gözlenmiştir (Tablo 3). Şekil 4'te *C. prototheco*ides konsantrasyonun fungal koloni çapı değerleri üzerine etkisi incelendiğinde, *P. chrysogenum*'un disklere uygulanan *C. prototheco*ides konsantrasyonu arttıkça misel gelişiminin azaldığı gözlemlenmiştir. Fumigasyon uygulamasında *P. chrysogenum*'un misel gelişimini durdurması veya inhibe etmesinin nedeninin fenolik ve terpenoid bileşiklere bağlanmaktadır [25]. Antifungal aktiviteye sahip sekonder metabolitler misel büyümesinin gelişimini durdurarak veya inhibe ederek, çimlenmeyi önleyerek veya fungal patojenlerin sporülasyonunu azaltarak etki etmektedirler. Örneğin, mikroorganizmalardaki polifenollerin toksisitesi, bileşiklerin oksidasyonu ile enzim inhibisyonuna atfedilir.

Tablo 3. *C. prototheco*ides mikroalg yağının (50 µL/petri) farklı günlerde ve konsantrasyonlardaki fumigasyon uygulamasının *Aspergillus parasiticus* misel gelişimini engelleme değerleri (mm)

İnkübasyon Süresi	Misel Büyüme Çapı (mm)	
	Konsantrasyon	*A. parasiticus*
3 gün	Kontrol	13.00±0.00[a]
	%5	12.00±0.11[b]
	%10	11.00±0.09[c]
4 gün	Kontrol	16.50±0.07[a]
	%5	15.00±0.10[b]
	%10	14.30±0.08[c]
5 gün	Kontrol	19.00±0.07[a]
	%5	16.10±0.04[b]
	%10	16.00±0.21[b]
6 gün	Kontrol	20.50±0.00[a]
	%5	17.30±0.06[b]
	%10	17.10±0.17[b]

*Sayılar; ortalama koloni çapı ± SD (standart sapma değerlerini) (mm) temsil etmektedir (n=6). P değerleri 0.05'ten küçük olduğunda ($p<0.05$) istatistiksel açıdan önemli olarak kabul edilmiştir. *a-c: Sütun içinde, farklı küçük harfli üst simge her bir inkübasyon günündeki *C. prototheco*ides mikroalg yağının fungal misel gelişimini engelleme oranları (mm) arasındaki farklar gösterilmektedir ($p<0.05$).

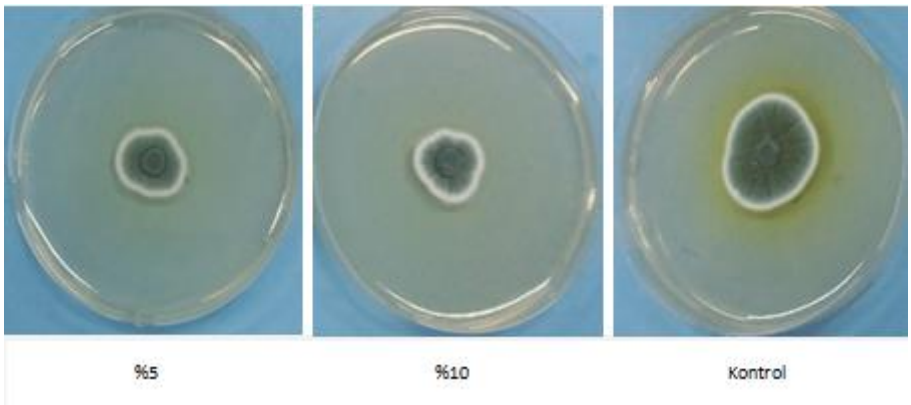


Şekil 3. DMSO kullanılarak 50 ve 100 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan *C. prototheco*ides mikroalg yağının *Aspergillus parasiticus* misel gelişimine etkisi

Tablo 3. *C. prototheco*ides mikroalg yağının (50 µL/petri) farklı günlerde ve konsantrasyonlardaki fumigasyon uygulamasının *Penicillium chrysogenum* misel gelişimini engelleme oranları (mm)

İnkübasyon Süresi	Misel Büyüme Çapı (mm)	
	Konsantrasyon	*P. chrysogenum*
3 gün	Kontrol	19.20±1.60[a]
	%5	17.33±0.27[b]
	%10	16.50±0.00[c]
4 gün	Kontrol	24.00±2.00[a]
	%5	20.20±0.70[b]
	%10	18.20±2.68[c]
5 gün	Kontrol	27.00±3.60[a]
	%5	20.20±0.70[b]
	%10	18.20±2.68[c]
6 gün	Kontrol	30.70±2.00[a]
	%5	21.00±2.64[b]
	%10	19.00±2.17[c]

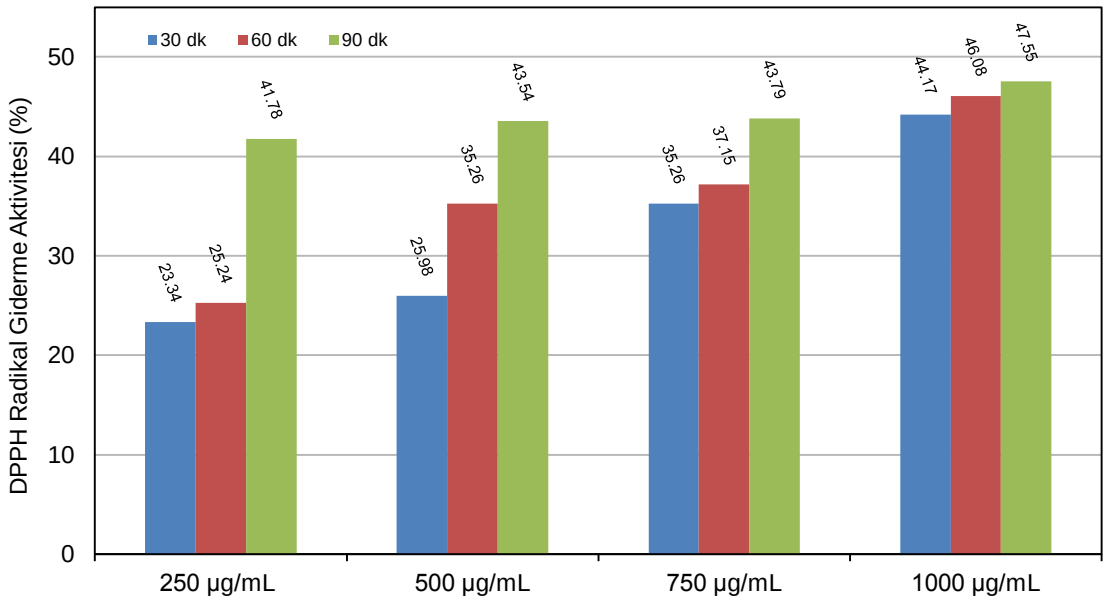
*Sayılar; ortalama koloni çapı ± standart sapma SD (mm) değerlerini temsil etmektedir (n=6). P değerleri 0.05'ten küçük olduğunda ($p<0.05$) istatistiksel açıdan önemli olarak kabul edilmiştir. *a-c: Sütun içinde, farklı küçük harfli üst simge her bir inkübasyon günündeki *C. prototheco*ides mikroalg yağının fungal misel gelişimini engelleme oranları arasındaki farklar gösterilmektedir ($p<0.05$).



Şekil 4. DMSO kullanılarak %5 ve %10 konsantrasyonlarda hazırlanan *C. protothecoides* mikroalg yağının *Penicillium chrysogenum* misel gelişimine etkisi

C. protothecoides Yağının Antioksidan Aktivitesi

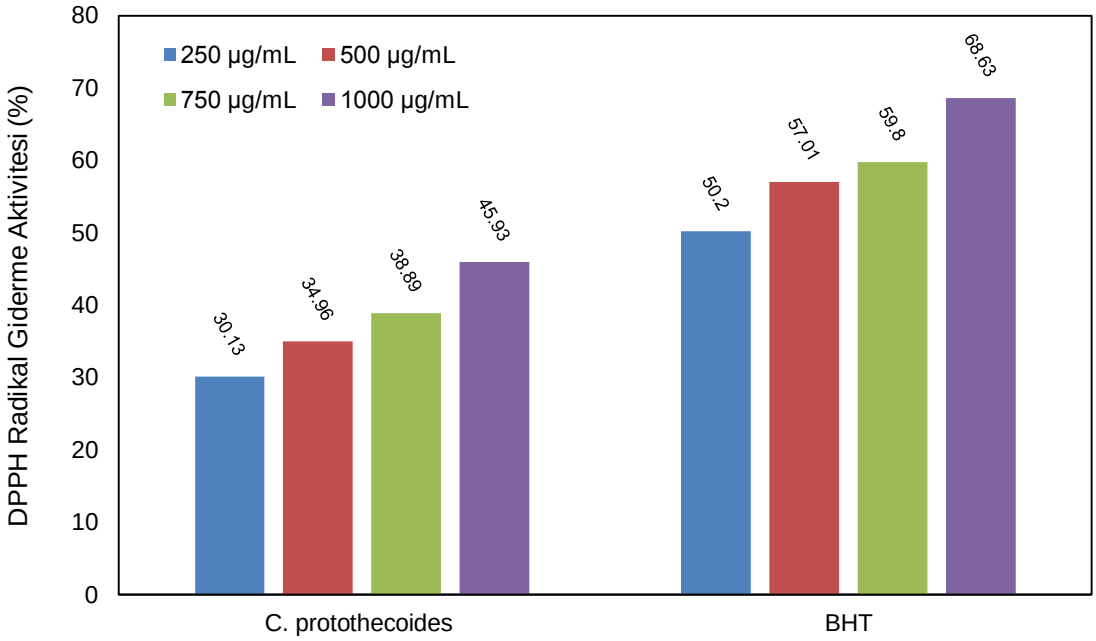
Mikroalgler fototrof organizmalardır ve yüksek oksijen ve serbest radikal stresine maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle mikroalgler reaktif oksijen ve serbest radikallere karşı etkin koruyucu sistemlere sahiptirler. Oleik asit, linoleik asit, palmitoleik asit, bioflavonoidler, retinoidler, tokoferoller, B12, askorbik asit, karotenoidler, β-karoten [26], fikosiyanin, lutein ve zeaksantin mikroalglerde bulunabilen biyoaktif bileşikler olup, antimikrobiyal, antioksidan ve antifungal, [27] özelliklerine sahiptir ve hastalıkların azaltılması ve önlenmesinde önemli rol oynarlar [7].



Şekil 5. *C. protothecoides* mikroalg yağının farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 µg/mL) ve zamana bağlı (30, 60 ve 90 dk.) serbest radikal giderme aktivitesi.

Şekil 5'te *C. protothecoides* mikroalg yağının zamana bağlı (30, 60 ve 90 dk) serbest radikal giderme aktivitesi incelenmiş ve antioksidan aktivitesinin zamana bağlı arttığı ve *C. protothecoides*'in 90 dk.'da daha yüksek etki gösterdiği görülmüştür. Lutein, astaksantin ve zeaksantin gibi antioksidan maddeleri alglerde ışık toplayıcı pigmentler gibi işlev görürler ve antioksidan aktiviteye sahiptirler. Serbest radikallere karşı etkili olan lutein, α-karoten, β-karoten, askorbik asit ve α-tokoferol gibi birçok antioksidan bileşik *Chlorella*'nın fonksiyonel faaliyetlerinden sorumlu olabilir. Bu bileşikler, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı durumlarda alglerin sahip olduğu güçlü antioksidan özellikten dolayı kanserin etkilerini azaltmakta ve yaşlanmayı geciktirmededir [12, 27].

C. protothecoides'in 1000 µg/mL'lik konsantrasyonda zamana bağlı değişimin düşük, ancak diğer konsantrasyonlara oranla en yüksek antioksidan etki gösterdiği görülmüştür. Maadane ve ark. [28]; alglerin antioksidan aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmada, özellikle *Chlorella* türünün zamana bağlı antioksidan aktivitesinin arttığını ve 120 dk.'da en yüksek antioksidan etki gösterdiğini belirlemiştirler.



Şekil 6. *C. prototheco ides* mikroalg yağının ve standart BHT'nin farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000 µg/mL) serbest radikal giderme aktivitesi.

Vehapi ve ark. [18], yaptıkları çalışmada, 1000 µg/mL'lik konsantrasyonda BHT'nin %58.37 oranında serbest radikal giderme aktivitesi olduğunu, *C. prototheco ides* mikroalg yağının *ise* %48.91 oranında antioksidan özelliği olduğunu gözlemiştirler. Şekil 6'da *C. prototheco ides* mikroalg yağının 1000 µg/mL'lik konsantrasyonda %45.93, standart olarak kullanılan BHT'nin ise %68.63 oranında serbest radikal giderme aktivitesi olduğunu görülmektedir. *C. prototheco ides* mikroalg yağının antioksidan etkisinin lutein, zeaksantin ve kantaksantin gibi antioksidan bileşikler içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [7]. Standart madde ile karşılaştırıldığında *C. prototheco ides* mikroalg yağının radikal giderme aktivitesi yönünden oldukça başarılı sonuçlar göstermiştir. Li ve ark. [29] birçok makro ve mikroalgin antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmiştirler.

SONUÇ

C. prototheco ides mikroalg yağının, *A. parasiticus,* ve *P. chrysogenum* gibi gıda kaynaklı fungal mikroorganizmalarin misel gelişimini engelleme oranları incelenmiş ve her iki fungal patojene karşı mikroalg yağının fungal gelişim üzerine inhibe edici etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Dimetil sülfoksit (DMSO) solventi kullanılarak 50 ve 100 mg/mL oranında hazırlanan *C. prototheco ides* mikroalg yağının uygulamasında *P. chrysogenum* tüm artan konsantrasyonlarda inkübasyon süresi boyunca misel gelişimini azaltırken, *A. parasiticus*'da konsantrasyon farkının 3. ve 4. günlerde daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikteyapılan çalışmada *C. prototheco ides* mikroalg yağının zamana bağlı; 30, 60 ve 90 dk.'da yapılan ölçümlerde serbest radikal giderme aktivitesi incelenmiş ve antioksidan aktivitesinin zamana bağlı arttığı ve *C. prototheco ides*'in 90 dk.'da daha yüksek etki gösterdiği görülmüştür. Mikroalglerin içerdikleri biyoaktif bileşiklerin antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerine sahip olmalarından dolayı gıda endüstrisinde fonksiyonel olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Luz, C., Saladino, E., Luciano, F.B., Manes, J., Meca, G. (2017). In vitro antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT- Food Science and Technology*, 81, 128-135.

[2] Saravanakumar, D., Ciavorella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 121-128.

[3] Pawlowska, A.M., Zannini, E., Coffey, A., Arendit, E.K. (2012). Green preservatives combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. *Advanced in Foods and Nutrition Research*, 66, 217-238.

[4] Dai, J., Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.

[5] Devi, K.P., Suganthy, N., Kesika, P., Pandian, S.K. (2008). Bioprotective properties of seaweeds: in vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8(1), 38-49.

[6] Akyıl, S., İlter, I., Koç, M., Kaymak-Ertekin, F. (2019). Alglerden elde edilen yüksek değerlikli bileşiklerin biyoaktif/biyolojik uygulama alanları, *Akademik Gıda*, 52, 166-178.

[7] De Morais, M.G., Vaz Bda, S., de Morais, E.G., Costa, J.A. (2015). Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed Research International*, 1 -15.

[8] Danielli, M.M., Dantas, Romero, M.P.B., Costa, Maria, G., Carneiro-da-Cunha, A.O., Galvez, A.R., Drummond, Bezerra, R.S. (2015). Bioproduction, antimicrobial and antioxidant activities of compounds from *Chlorella vulgaris*. *Journal Botany Science*, 4, 12-18.

[9] Prakash, J.W., Johnson, M., Solomon, J. (2011). Antimicrobial activity of certain fresh water microalgae from Thamirabarani. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1 (2), 170-173.

[10] Radhika, D., Veerabahu, C., Priya, R. (2012). Antibacterial activity of some selected seaweeds from the Gulf of Mannar Coast, South India. Asian *Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(4), 89-90.

[11] Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y. (2006). Algal antioksidanlar. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23(1), 85-89.

[12] Shannon, E., Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: an overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, 14(81) 1-23.

[13] Yilmaz, A., Ermis, E., Boyraz, N. (2016). Investigation of in vitro and in vivo anti-fungal activities of different plant essential oils against postharvest apple rot deseases *Colletotrichum gleosporioides*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Journal Food Safety and Quality*, 67, 113-148.

[14] Yilmaz, A., Bozkurt, F., Cicek, P.K., Dertli, E., Durak, Z.M., Yilmaz, M.T. (2016). A novel antifungal surface-coating application to limit postharvest decay on coated apples: molecular, thermal and morphological properties of electrospun zein–nanofiber mats loaded with curcumin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 37, 74-83.

[15] Gülyurt, M.Ö., Özçimen, D., Inan, B. (2016). Biodiesel production from *Chlorella protothecoides* oil by microwave-assisted transesterification. International *Journal Molecular Science*, 17(4), 579-587.

[16] Büyüksırıt, T., Kuleaşan, H. (2014). Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve gıda analizlerinde kullanımı. *Gıda*, 39(4), 235-241.

[17] Özçimen, D. (2018). Chlorella protothecoides mikroalg yağının *Botrytis cinerea* ve *Aspergillus niger* küflerine karşı antifungal etkisinin incelenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(02), 45-52.

[18] Vehapi, M., Yilmaz, A., Özçimen, D. (2018). Antifungal activities of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella minutissima* microalgae cultivated in bold basal medium, wastewater and extract water against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *Romanian Biotechnological Letter*, doi: 10.26327/RBL2018.228

[19] Vehapi, M., Yilmaz, A., Ozcimen, D. (2018b). Investigation of antibacterial and antioxidant activities of some algae species. *Journal of Biotechnology*, 280, 80.

[20] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.

[21] Boutennoun, H., Boussouf, L., Kebieche, M., Al-Qaoud, K., Madani, K. (2017). In vivo analgesic, anti-inflammatory and antioxidant potentials of *Achillea odorata* from north Algeria. *South African Journal of Botany*, 112, 307-313.

[22] Çalişkan Eleren, S., Öneri B. (2019). Sürdürülebilir ve çevre dostu biyoyakıt hammaddesi: mikroalgler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 25 (3), 304-319.

[23] Krzemińska, I., Nawrocka, A., Piasecka, A., Jagielski, P., Tys, J. (2015). Cultivation of *Chlorella prototheco*ides in photobioreactors: the combined impact of photoperiod and CO_2 concentration. *Engineering Life Science*, 15, 533-541.

[24] Jebsena Christian, Noricib, A., Wagnera, H., Palmuccib, M., Giordanob, M., Wilhelma, C. (2012). FTIR spectra of algal species can be used as physiological fingerprints to assess their actual growth potential. *Physiologia Plantarum*, 146(4), 427-438.

[25] Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Rodríguez, R., Aguilar, C.N. (2012). Antifungal properties of bioactive compounds from plants. In Dhanasekaran D (ed) Fungicides for Plant and Animal Diseases. InTech Croatia, 81-106.

[26] Thomas, N.V., Kim, S.K. (2013). Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals. *Marine Drugs*, 11, 146-164.

[27] Pérez, M.J., Falqué, E., Domínguez, H. (2016). Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Marine Drugs*, 14, 52.

[28] Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., Arroussi, E.H., Benhima, R., Amzazi, S., Bakri, Y., Wahby, I. (2015). Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: PUFA profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal Biotechnology*, 10(215), 13-9.

[29] Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102, 771-6.