



## **Siyanobakterilerden Elde Edilen Pigment Maddeleri ve Kullanım Alanları**

**Hilal KARGIN YILMAZ<sup>1</sup>, Mahitap Duygu DİKBAŞ<sup>2</sup>, Murat BİLGÜVEN<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Yenişehir Kampüsü, Mersin.

<sup>2</sup>Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Ens. Su Ürünleri Ana Bilim Dalı, Mersin.

\*e-posta: wasp93@hotmail.com

*Geliş Tarihi: 25.10.2015; Kabul Tarihi:11.01.2016*

**Öz:** Siyanobakterilerden elde edilen önemli pigmentler; klorofil a,  $\beta$ -karoten, asta-ksantin, fikosiyanın, ksantofil ve fikoeitrin'dir. Fikosiyanın mavi renkli, kokusuz, toksik olmayan, suda çözünebilen, güçlü floresan özelliğe sahip doğal bir renk maddesidir. Bu pigmentler gıda, eczacılık, tekstil ve kozmetikte, kanserojen olduğundan şüphe edilen sentetik pigmentlerin yerine, doğal pigmentler olarak kullanılabilir. Floresan özelliklerinden dolayı mikroskopi, sitometri, bağışıklık, doku kimyası çalışmalarında floresan prob olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca, antioksidan ve radikalleri uzaklaştırıcı etkilerinden dolayı, nutrasötik ve farmasötik olarak kullanılma potansiyeline de sahiptirler. Bu bağlamda fikosiyanın üretimine ve kullanımına olan ilgi son yıllarda giderek artmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Siyanobakteriler, fikosiyanın, pigment maddeleri.

## **Pigment Substances and Usage Areas from Cyanobacteria**

**Abstract:** Important pigments from Cyanobacteria are chlorophyll a,  $\beta$ -carotene, asta-xanthine, phycocyanin, xanthophylls and phycoerythrin. Phycocyanin which is a natural colour substance, blue coloured, odourless, nontoxic, soluble in water, high fluorescent. These pigments can be used as natural pigments instead of synthetic pigments which are suspected carcinogens in food, pharmacy and cosmetic. They are used as fluorescence probe in microscopy, cytometry, immunology, histochemistry studies because of their fluorescent property. Additionally, they have potentials of usage as nutraceutical and pharmaceutical because of their effects of antioxidant and removing radicals. In this context, interest to production and usage of phycocyanin is increasing in recent years.

**Key Words:** Cyanobacteria, phycocyanin, pigment substances.

## Giriş

Mavi-yeşil algler olarak bilinen siyanobakteriler, silindirik hücrelerden oluşan iplikli yapıda, gaz vakuolleri içeren prokaryotik yapıda bir algdır (Richmond, 1986). Ayrıca, ticari değerli bazı metabolitleri biriktirme özelliği gösteren mikroskobik canlılardır. Algler; karbonhidratları, proteinleri, esansiyel aminoasitleri, vitaminleri ve biyoaktif molekülleri içermekte ve üretmektedir. Siyanobakterilerden *Spirulina platensis*'in (Resim 1.) pigment içeriği genel olarak tek klorofil, klorofil-a'dır ve miktarı kuru ağırlıkta 0.8%–1.5% arasında değişmektedir. Soğukta kurutulmuş (freze-dried) *Spirulina*'da ksantofil içeriği oldukça önemli düzeydedir (6.9 gkg<sup>-1</sup>). Diğer başlıca karotenoidleri, miksokksantofil (37%), β-karoten (28%), zeaksanthin (17%)'dir (Paoletti ve ark., 1980). *Spirulina*'nın proteinleri içinde en yüksek ekonomik değere sahip olanları biliproteinlerdir. *Spirulina* C-fikosiyanin ve allofikosiyanin olmak üzere iki tip biliprotein içermektedir. Bu mikroalgin protein fraksiyonunun yaklaşık 20%'si, suda çözünen mavi bir pigment olan C-fikosiyaninden oluşmaktadır. Fikosiyaninin maksimum absorpsiyonu 620 nm'dir (Cohen, 1997). Ürettikleri önemli pigmentler; klorofil a, β-karoten, astaksantin, fikosiyanin, ksantofil, fikoeritrosin'dir. Bu pigmentler gıdada, eczacılıkta, tekstilde, kozmetikte ve doğal bir pigment olarak, kanserojen olduğundan şüphe edilen sentetik pigmentlerin yerine kullanılabilir (Cohen, 1997; Sarada ve ark., 1999).

Bitkilerde fotosentez gibi ışık ile ilgili olayları gerçekleştiren çeşitli renk maddeleri (pigmentler) bulunur. Pigmentlerin bir bölümü plastidler içerisindeki zar sistemlerine (tilakoid membranlara) yerleşmiş olarak bulunurken; bir kısmı vakuolde çözünmüş durumdadır. Pigmentler ışık enerjisinin bitkiler tarafından kullanılabilmesini sağladığı gibi, bitkilerin şiddetli ışıktan zarar görmesini de önlemektedirler (Öncel ve ark., 2004). Fotosentetik organizmalardaki pigmentler aşağıdaki (Tablo 1.) verilmiştir.

**Çizelge 1.** Fotosentetik Organizmalardaki pigmentler (Öncel ve ark. 2004).

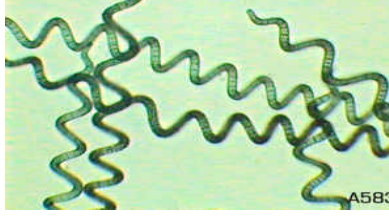
Organizma	Primer pigment	Aksesuar pigmentler	Absorbe ettiği dalgaboyu (nm)
Mor bakteriler	b.klo.a*	b klo.a b klo.b	Mavi, mor-kırmızı 470–750 Mavi, mor-kırmızı 400–1020
Yeşil kükürt Bakterileri	b.klo a	b klo.c Clorobium klo.	Mavi-kırmızı 470–750
Mavi-yeşil alg	klo.a**	fikosiyanin fikoeritrin allofikosiyanin	Turuncu 630 Yeşil 570 Kırmızı 650
Kırmızı alg	klo.a	fikosiyanin fikoeritrin allofikosiyanin	Turuncu 630 Yeşil 570 Kırmızı 650
Kahverengi Alg	klo.a	klo.c	Mor, mavi-kırmızı
Yüksek Bitkiler	klo.a	klo.b	Mavi, mor-turuncu, kırmızı 454–670
Çoğu yüksek bitki alg ve bakteri		a ve 13 karotenoidler ksantofiller	Mavi-yeşil 450

\* Bakteriyoklorofil-a

\*\* Klorofil- a

## Syanobakteri (mavi-yeşil alg)

Mavi-yeşil algler, prokaryotik doğası nedeniyle "siyanobakteri" olarak isimlendirilirler. Fotosentetik özelliğe sahip siyanobakteriler ilk kez fosillerde saptanmıştır. Koyu yeşilimsi-mavi pigmentlerinden dolayı mavi-yeşil algler olarak adlandırılırlar.



Şekil 1. Spirulina platensis

Texcoco gölü kıyısında yaşayan Aztekler'in XVI. y.y *Spirulina*'yı besin olarak kullanmış ve XX. y.y Çad Gölü'nün kuzey kıyısında yaşayan insanların gölden topladıkları *Spirulina* algini yiyecek olarak kullandıkları bilinmektedir. 1959 yılında Brandily, yaptığı gözlem ve araştırmalarında Kadjidi kabilesinin Çad gölünde çok yoğun bulunan *Spirulina* alginden elde ettikleri yeşilimsi unu yiyeceklerine kattıklarını; bu nedenle diğer bölgelerde yaşayan yerlilere göre daha uzun boylu ve sağlıklı olduklarını bildirmiştir. Araştırmacılar, laboratuvarlarında ürettikleri *Spirulina*'da 60%-70% oranında protein tespit ettiklerini belirtmişlerdir. NASA, uzay araştırmalarında *Spirulina*'dan besin tabletleri yapmak için konuyu sahiplenmiştir. Sonraki çalışmalar, üretim kapasitesini artırma ve kullanım alanlarını geliştirme amaçlı yoğunluk kazanmıştır (Dalay ve ark., 2001). Mavi-yeşil algler içerisinde *Spirulina*, *Oscillatoria* ve *Anabaena* gibi hızlı gelişen siyanobakteriyel cinsler; pigmentler, yağ asitleri, karbonhidratlar, proteinler ve diğer birçok besin bileşiklerini üretmeleri nedeniyle besin ve besleme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Yamada, 1994). Syanobakterilerden elde edilebilen mavi pigment fikosiyanın, kozmetik ve besinler için doğal bir renklendirici olarak kullanılır. Syanobakteriler fikosiyaninler, karotenoidler ve gamma-linoleik asit gibi yüksek katma değerli kimyasalları yüksek miktarlarda biriktirdiği fark edildiğinden beri, özellikle *S. platensis*'in potansiyel üretimi yoğunluk kazanmıştır (Dalay ve ark., 2008).

## Syanobakterilerin Yapısı

Syanobakterilerin hücre duvarının yapısında peptidoglikan mevcuttur ve bu nedenle gramnegatif *Bacteria*'lara benzerlik gösterirler. *S. platensis*'in elektron mikroskobu ile gözlenen hücresel organizasyonunda da morfolojik olarak sınırlandırılmış bir nukleus ve plastid mevcut olmadığı ve dışta gram negatif tipte bir zara sahip olduğu bildirilmiştir (Dalay ve ark., 2008). Klorofil ve karotenoid pigmentler "lamella" adı verilen hücre yüzeyi membranında, fikosiyanın ve fikoeritrin gibi pigmentlerde fikobilisomlarda bulunur. Fikobilisomlar tilakoid membran yüzeyinde bulunurlar.

- Fikosiyanın Yeşil ışığı absorblar (615-620A).
- Allofikosiyanın Turuncu ışığı absorblar (650-670A)
- Fikoeritrin Yeşil ışığı absorblar (495-570A)

## Syanobakterilerin (Mavi-yeşil alglerin) Biyoteknolojik Önemi

*Spirulina* ilk kez 1927 yılında Turpin tarafından izole edilmiştir. 1962 yılında Fransız Petrol Araştırma Enstitüsü (IFP)'nün mavi-yeşil algler grubundan *Spirulina*'nın çok zengin bir gıda maddesi olduğunu belirtmesi ile önemi anlaşılmıştır (Fox, 1996). *Spirulina*'nın koyu yeşil rengi, karotenoid (turuncu), fikosiyain (mavi) ve klorofil (yeşil) pigmentlerinden kaynaklanmaktadır (Tablo 2.). *Spirulina* hücrelerinin makromoleküler yapısıyla sıcaklık arasında da ilişki vardır. *Spirulina* kültürlerinde sıcaklık artışı, klorofil a'daki fikobiliprotein oranı da artar. Bu sebeple 42–43°C sıcaklıkta, *Spirulina* filamentlerinde klorofil a ve fikobiliproteinlerin bozulmasından ve karotenoidlerin artmasından dolayı 35°C'deki karakteristik mavi-yeşil renk, yeşile dönüşür (Cohen, 1997; Sarada ve ark., 1999; Becker, 1995). Plazmanın çevreye yakın kısmında serbest halde klorofil a bulunurken, klorofil b pigmentini içermez. Klorofil a yardımıyla organizma fotosentez yapabilir (Bourrelly, 1970; Yıldız, 2001).

**Çizelge 2.** Doğal Bitkisel Besleyiciler

Pigmentler	Renk	Her 10 g	<i>Spirulina</i> %
Fikosiyainin	Mavi	1400 mg	14.0
Klorofil	Yeşil	100 mg	1.00
Karotenoid	Turuncu	47 mg	0.47

**mg:** Miligram, **µg:** Mikrogram, **IU:** Uluslararası Birim

### Syanobakterilerin İçerdiği Pigmentler

Mavi-yeşil alglerde pigmentler protoplastın dış kısmında yoğunlaşmıştır. Kromatoplazma olarak adlandırılan bu bölgede yer alan tilakoidlerin, elektron mikroskop çalışmalarında hücre zarına paralel uzanan serbest sitoplazmik bileşenler olduğu görülmüştür. Tilakoid membranlar yağda çözünen klorofil-a ve karotenoidleri içerir. Suda çözünen fikobiliproteinler ise tilakoidlerin dış yüzeylerine tutunmuş küçük bölmelerde yer alırlar. Ayrıca tilakoid boşlukları içerisinde silindirik şeklindeki gaz vezikülleri bulunur. Bunlar *Spirulina*'ya yüzebilmeye özelliğini verir. Bunun dışında vezikül içermezler (Tomaselli, 1997).

### Klorofil

Fotosentetik organizmalar buldukları sınıflara göre farklı yardımcı (aksesuar) pigmentler içermektedirler. Klorofil-a tüm alglerde temel fotosentetik pigmenttir. (Tunail, 2009). Sianobakterilerdeki klorofil-a ve fikobiliprotein konsantrasyonları kültürün bulunduğu ortam koşullarına bağlıdır. Hücrelerin geliştiği ışık rengi fikosiyainin (PC)/klorofil-a (Kl-a) oranının saptanmasında önemlidir. Govindjee ve Yang, 1966; sianobakteri olan *Anacystis nidulans*'ın farklı ışık rejimlerinde (farklı ışık yoğunluğu ve farklı ışık renklerinde) pigment miktarı ve pigmentler arası enerji aktarımı üzerine yaptıkları çalışmada algin yetiştiği ışık yoğunluğunun, fikosiyaininden klorofil-a'ya enerji aktarımında önemli olduğunu ortaya koymuştur. Denemelerinde yoğun beyaz ışıkta

yetiştirilen kültürlerde (PC)/(Kla) oranı 0.74 olurken düşük yoğunluktaki beyaz ışıkta (PC)/(Kl-a) oranı 1.05 olmuştur.

Schagerl ve Müller, 2006; ise, parlak ışık altında gelişen siyanobakterilerde zeaksantin/klorofil-a oranının arttığını belirtmişlerdir. Ekstraksiyon yöntemi olarak genellikle sonikasyon, öğütme ve dondurma-çözdürme yöntemlerinden biri tercih edilir (Akoğlu, 2012). Burada amaç, kloroplastın parçalanarak pigment kaybı olmadan renk maddelerinin çözücüye geçmesidir. Çözücü olarak ise genellikle pigment yapısına zarar vermeyen 90%'lık aseton kullanılır. Hücreler parçalandıktan sonra tam ekstraksiyonun sağlanması ve yabancı maddelerin uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulanır. Santrifüjün ardından üstte kalan süpernatant çözünmüş saf pigment ekstraktı olarak kullanılır. Bu ekstrakt gerek florümetre (klorofil floresanının belirlenmesi için), gerek spektrofotometre (klorofil absorbansının saptanması için), gerekse diğer fitoplankton pigmentlerinden klorofilin ayrılması için kromatografide kullanılabilir (Newton, 2002).

Ekstraksiyon yönteminde kullanılan derişik HCl çözeltisi klorofil pigmentinin degradasyonuna yol açmaktadır. Hücrelerin asit ile hidrolizinin ardından spektrofotometrede 664.5, 606 ve 534 nm dalga boylarında en yüksek absorbans değerleri elde edilmektedir (Newton, 2002; Shan, 1998). Siyanobakteriler klorofil pigmentleri içerisinde yalnızca klorofil-a içerir. Bu nedenle siyanobakterilerde 90%'lık metanol içerisindeki klorofil-a miktarı:

$$\text{Klorofil-a (Wg/mL)} = 13.9 * A_{665}$$

eşitliği ile hesaplanır (Macías-Sánchez ve ark., 2007).

## **Karotenoidler**

Mikroalglerin karotenoidleri sentezi türlere, algin yaşına ve çevresel koşulların değişimine bağlı olarak, örneğin normal tuz değerlerinde sapmalar, sıcaklık, ağır metal konsantrasyonu, ortamdaki azotun kullanılabilirliği ve ışık yoğunluğunda artış, hücreler üzerinde stres yaratarak karotenoid sentezinin artmasına neden olurlar (Gouveia ve ark., 1996). Siyanobakterilerdeki karotenoid miktarı, baskın pigmentlerin miktarı sabit kalırken gelişme koşullarına göre değişkenlik gösterir. Z- karoten, zeaksantin, ketokarotenoidler (ekinenon ve kantaksantin) ve glikozidli karotenoid miksoksantofil siyanobakterilerde bulunan karotenoid maddelerdir. Miksoksantofiller yalnızca siyanobakterilere özgüdür (Schagerl ve Müller, 2006).

Goodwin, 1957; mavi-yeşil algler tarafından Z-karoten, ekinenon ve miksoksantofil olmak üzere 3 temel karotenoid sentezlendiğini tespit etmiştir. Zeaksantin ise çok az miktarda bulunmakta olup, toplam karotenoidlerin 30%-60%'ını Z- karotenin oluşturduğunu bildirmiştir. Siyanobakterilerin sahip olduğu toplam karotenoid miktarı 90%'lık metanol içerisinde çözüldürülerek,

$$\text{Toplam karoten (Wg/mL)} = 4.5 * A_{475}$$

formülü ile hesaplanır (Zou ve Richmond, 2000). Burada A 90%'lık metanol içerisinde çözülmüş karotenoidlerin 475 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değeridir.

## Fikobiliproteinler

Siyanobakteri ve kırmızı alglerde tilakoid membranın sitoplazmaya dönük kısmına yerleşik özel yapılar olan fikobilizomlar, içinde fikobiliproteinleri bulunduran yardımcı pigmentlerdir. Fikobilinler fikoeritrobilin, fikosiyanobilin gibi protein olmayan bileşiklerin, proteinlerle birleşmesi ile meydana gelirler (Abalde ve ark., 1998; Tunail, 2009).

Fikobiliproteinlerin 75%'ini fikosiyaninler, 12%'sini allofikosiyaninler, 12%'sini de fikoeritrinler ile pigmentiz polipeptidler oluştururlar (Tunail, 2009). Fikobilizomlar merkezinde allofikosiyanin bulunan, fikosiyaninle çevrilmiş olup ve (eğer varsa) en dış katmanda fikoeritrinden oluşurlar. Fikosiyanin temel bileşen olup, allofikosiyanin ise fikobilizomlar ve fotosentetik lameller arasında bağlayıcı pigment görevindedir (Sarada ve ark., 1999). Fikobiliproteinleri fikobilizoma ve fikobilizomları tilakoid membrana bağlama görevini renksiz polipeptidler üstlenirler (Abalde ve ark., 1998). Pigment-protein kompleksleri genellikle 550–650 nm dalga boyları arasındaki ışığı absorblar. Bu pigmentlerin amacı görünür ışığın daha geniş sınırlar arasında kullanılmasını sağlamaktır (Tunail, 2009).

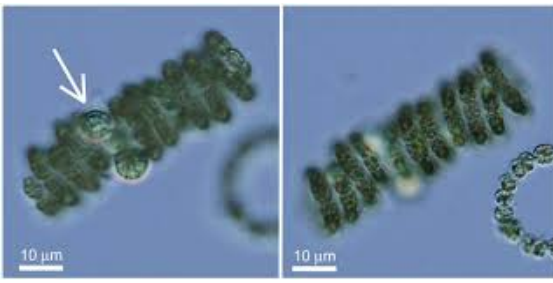
## Fikosiyanin Pigmenti

Fikosiyanin; kokusuz, toksik olmayan, suda çözülebilen, yüksek antioksidan ve güçlü floresan özelliğine sahip, mavi renkli bir toz olup ticari adı "lina mavisi" bir pigment maddesidir (Resim 2.). Siyanobakterilerde yüksek miktarda bulunan ve ekonomik anlamda en önemli fikobiliprotein çeşididir. Bu pigment ışığa olan hassasiyeti ile bilinmektedir. Bu sebeple pigmentin rengini kaybetmemesi için ürünün ışıktan korunması önemlidir.

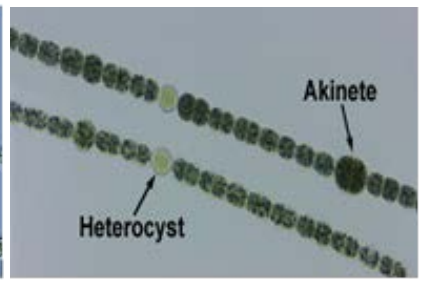


**Şekil 2.** *Spirulina platensis*' den elde edilen C-Fikosiyanin pigmenti

Fikosiyaninin protoplazma içinde hücre kuru ağırlığının yaklaşık 20%'sine varabilen oranlarda bulunabildiği bildirilmiştir (Santiago-Santos ve ark., 2004). Fikosiyanin yapısı ise bağlı bulunduğu mikroorganizma çeşidine ve ortam koşullarına göre farklılık göstermektedir. Fikosiyaninin prostetik grubu olarak kabul edilen ve proteinin karakteristik mavi renginden sorumlu olan fikosiyanobilin kromoforu farklı bölgelerden sistein aminoasitine bağlanarak fikosiyanin yapısının oluşumunu sağlamaktadır (Santiago-Santos ve ark., 2004; Stec ve ark., 1999; Contreras-Martel ve ark., 2007). Siyanobakteriler arasında en önemli fikosiyanin üreticisi fototrofik bir siyanobakteri türü olan *Spirulina platensis*'tir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar fikosiyanin üretimi açısından birçok siyanobakteri türünün (*Spirulina maxima*, *Spirulina fusiformis*, *Anabaena* sp., *Synechococcus* sp., *Aphanothece halophytica*, *Nostoc* sp., *Oscillatoria quadripunctulata*, *Phormidium ceylanicum*) *S. platensis*'e alternatif olabileceğini göstermiştir (Eriksen, 2008) (Resim 3, 4, 5,6,7,8,9).



Şekil 3. *Spirulina maxima*



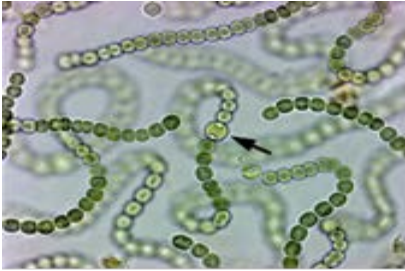
Şekil 4. *Anabaena* spp.



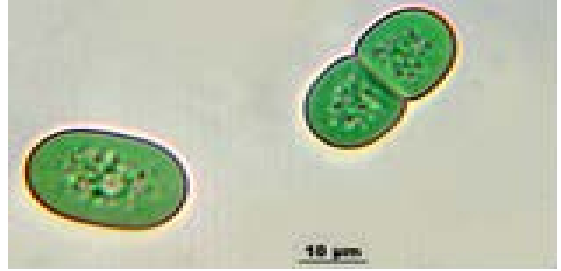
Şekil 5. *Spirulina fusiformis*



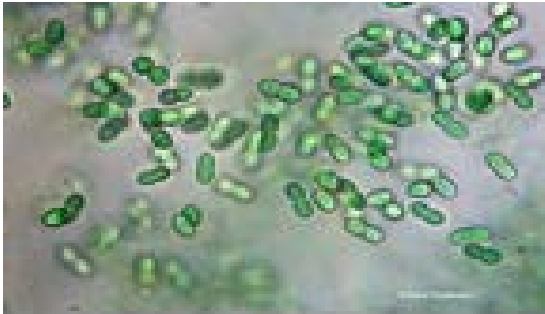
Şekil 6. *Oscillatoria* spp.



Şekil 7. *Nostoc* spp.



Şekil 8. *Synechococcus* spp.



Şekil 9. *Aphanothece halophytica*

Fikobiliproteinler suda çözünen protein-pigment kompleksleri halinde kolaylıkla izole edilebilirler (Abalde ve ark., 1998). *S. platensis*'te fikosiyanın miktarı hücre kuru ağırlığının 20%'sini oluşturmaktadır (Chaiklahan ve ark., 2011).

Fikosiyanın özellikle Uzakdoğu'da gıda ve kozmetik sanayiinde geniş kullanım alanı bulmaktadır. Ancak fikosiyanın ışığa ve sıcaklığa karşı duyarlı olması yaygın olarak kullanılmasını kısıtlamaktadır. Fikosiyanın kullanım alanını daraltan termal stabilitesinin düşük olması, ortama çeşitli karbonhidratların eklenmesi ile giderilebilmektedir (Furuki ve ark., 2003). Bir siyanobakteri veya kırmızı algin sahip olduğu fikosiyanın konsantrasyonu,

$$C-PC \text{ (mg/mL)} = (A_{620} - 0.47A_{652})/5.34$$

eşitliği ile hesaplanır (Moraes ve ark., 2011). Birim gramdan elde edilen fikosiyanın miktarını belirlemek amacıyla verim hesaplaması da;

$$\text{Verim (mg/g)} = (C-PC * V) / KM$$

formülü ile yapılır (Moraes ve ark., 2011).

Fikosiyanın kullanım alanını belirleyen saflık derecesi önemli bir parametredir. Saflık oranının belirlenmesi amacıyla fikosiyanına ait dalga boyu 620 nm'de elde edilen absorbans değerinin, 280 nm'de elde edilen toplam proteine ait absorbans değerine oranıdır (Moraes ve ark., 2011).

$$\text{Saflık} = A_{620} / A_{280}$$

Dondurma-çözme yoluyla parçalanmış hücreler aseton içerisinde çözüldükten sonra yapılan spektrum taramasında karotenoidlere özgü spesifik dalga boyu saptanamamıştır. Santrifüj yardımıyla hasat edilmiş ve 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7) ile sulandırılmış örnekler -21°C'de dondurma, ardından, 95°C'deki su banyosunda 2 dakika süreyle çözme işlemi arka arkaya 5 kez tekrarlanarak hücre duvarının parçalanması sağlanmalıdır.

Prokaryot bir siyanobakteri olan *S. platensis*'in peptidoglukan yapısındaki hücre duvarının parçalanması için yukarıda belirtilen, 5 tekrarlı dondurma (-21°C), çözme (95°C'de 2 dakika) işlemi uygulanmalıdır.

## **Fikosiyanın Ekstraksiyonu**

Ticari açıdan son derece önemli olduğu bilinen fikosiyanından faydalanabilmek için bu maddeyi fikobilizomlardan uygun şekilde ekstrakte etmek ve saflaştırmak gerekmektedir (Sekar ve Chandramohan, 2008). Siyanobakterilerden fikobiliproteinlerin ekstraksiyonu hücre duvarının aşırı dayanıklı olması nedeniyle oldukça zordur (Steward ve Farmer, 1984). Fikobiliproteinlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için çok çeşitli teknikler denenmiş olsa da henüz standart bir teknik belirlenmemiştir. Fikobiliproteinlerin, ekstraksiyon ve saflaştırmadaki zorlukları nedeniyle pigmentler oldukça pahalıdır ve bu pigmentleri saf olarak elde etmek ilgi çeken bir çalışma alanıdır (Reis ve ark., 1998).

Fikosiyanın hem kuru hem de ıslak biyokütleden ekstrakte edilebilmektedir. Kuru biyokütleden ekstraksiyon yönteminde hücre kültürü farklı sıcaklıklarda ve farklı kurutma yöntemleri ile kurutulmakta ve çeşitli tamponlarla çözüldürülerek C-PC açığa çıkartılmaktadır (Doke, 2005; Oliveira, 2008). Kuru biyokütleden fikosiyanın ekstraksiyonunda yüksek sıcaklık uygulaması fikosiyanın kaybına neden olmakta bu nedenle kurutma işlemi düşük sıcaklıklarda yapılmaktadır (Eriksen, 2008). Ancak genel



anlamda kuru biyokütleden yapılan ekstraksiyon verim ve saflığının düşük olması nedeniyle tercih edilmemektedir. Sarada vd., (1999); yapmış oldukları fikosiyenin ekstraksiyon çalışmalarında, kurutulmuş *Spirulina* sp.'nin yaklaşık 50% oranında fikosiyenin kaybına uğradığını, bu yüzden ıslak biyokütle kullanımının daha uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Islak biyokütleden C-PC ekstraksiyonu için fiziksel ve kimyasal birçok yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerden bazıları;  $-25^{\circ}\text{C}$ ,  $-18^{\circ}\text{C}$  veya sıvı azotta dondurma,  $4^{\circ}\text{C}$  veya  $30^{\circ}\text{C}$ 'de çözüme (Abalde ve ark., 1998; Doke, 2005; Zhang ve Chen, 1999; Minkova ve ark., 2003; Soni ve ark., 2006), homojenizasyon (Abalde ve ark., 1998; Doke, 2005; Boussiba ve Richmond, 1979; Schmidt ve ark., 2005), yüksek basınç uygulaması (Patil ve ark, 2006, Patil ve Raghavarao, 2007), sonikasyon (Abalde ve ark., 1998), asit uygulaması (Sarada ve ark, 1999), lizozim uygulaması (Boussiba ve Richmand, 1979) ve *Klebsiella pneumonia* ile ekstraksiyon (Zhu ve ark., 2007) yöntemleridir. Tüm bu yöntemlerin dışında süper kritik karbondioksit tekniği üzerinde yapılan çalışmalarla siyanobakterilerden renk maddelerinin ekstraksiyonunda gelişmeler sağlanmıştır (Macías-Sánchez ve ark., 2007; Herrero ve ark., 2006).

Genel olarak her yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları vardır ve bu nedenle ekstraksiyon sırasında harcanan süre, maliyet, elde edilen verim ve saflık gibi faktörler de dikkate alınarak çalışılan suşa ait en uygun ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi gerekmektedir. Endüstriyel açıdan düşünüldüğünde seçilen ekstraksiyon yönteminin ölçek büyütme uygun ve ekonomik olması gerekmektedir.

### **Fikosiyenin Saflaştırılması**

Siyanobakterilerden C-PC saflaştırılması için amonyum sülfatla çöktürme/diyaliz, ultrafiltrasyon, iyon değişim kromatografisi gibi birçok kromatografik teknik ve bu tekniklerin birbiri ile kombinasyonları denenmiştir (Santiago-Santos ve ark., 2004; Reis ve ark., 1998; Soni ve ark., 2006; Macías-Sánchez ve ark., 2007). Bu yöntemlerin temel sınırlayıcı unsurları; saflaştırma işleminin uzun vakit alması, pahalı olması, yüksek hacimlerde çalışılmaması ve saflık oranının düşük olmasıdır (Soni ve ark., 2006). Saflaştırma işlemi sırasında fikosiyenin saflığı  $620\text{ nm}$ 'deki absorbans değerinin  $280\text{ nm}$ 'deki absorbans değerine oranı ( $A_{620}/A_{280}$ ) ile tespit edilmektedir. Elde edilen bu saflık oranına göre fikosiyenin kullanım alanı belirlenmektedir. Buna göre, fikosiyenin saflık oranı 0.7 ve üstünde ise gıdaya uygun, 3.9 ise reaktif, 4 ve üzerinde ise analitik saflıkta olduğu kabul edilmektedir (Chen ve ark., 2006).

### **Fikosiyenin Miktarının Belirlenmesi**

*S. platensis* yaş biyokütlesinin (25 mL) hasat edilmesinin ardından, ardı ardına 5 kez  $-21^{\circ}\text{C}$ 'de dondurma ve  $95^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosunda çözündürme işleminden sonra fikosiyenin 0.1 M sodyum fosfat (pH 7) tamponunda çözünmesi amacıyla  $+4^{\circ}\text{C}$ ' de 18–20 saat süreyle bekletilen örnekler santrifüj edilmiş ve berrak, mavi süpernatantın fikosiyenin içeriği spektrofotometrede ölçülmüştür. Fikosiyanine ait en yüksek absorbansın saptandığı dalga boyu  $620\text{ nm}$  olarak belirlenmiştir. Fikosiyenin konsantrasyonu (C-PC) (mg/mL) 652 ve  $620\text{ nm}$ 'deki optik yoğunluk değerlerini kullanarak aşağıdaki eşitlikle hesaplanır (Moraes ve ark., 2011).

$$C-PC \text{ (mg/mL)} = (A620 - 0.47A652)/5.34$$

Bu denklemde A620 fikosiyanine özgü dalga boyundaki absorbands değerini, A652 ise fikoeritrine ait spesifik dalga boyunda oluşturduğu absorbands değerini ifade etmektedir. Safılık faktörü, fikosiyanınin 620 ve 280 nm'deki absorbands değerlerinin birbirine oranı (A620/A280) ile belirlenmiştir (Abalde ve ark., 1998). Birim gram *S. platensis* kuru maddesinin sahip olduğu fikosiyanın miktarının mg/g cinsinden belirlemek için,

$$\text{Verim (mg/g)} = (C-PC * V) / KM$$

eşitliği kullanılmıştır (Moraes ve ark., 2011). Bu eşitlikte C-PC fikosiyanın konsantrasyonunun mg/mL olarak değerini, V kullanılan tampon hacmini (mL) ve KM gram olarak kuru madde ağırlığını belirtmektedir.

## Syanobakterilerin Kullanım Alanları

Syanobakteriler içerdiği yüksek miktarda protein, pigmentler ve GLA (gamma linolenik asit) gibi ürünler bakımından öneme sahip olan bir alg türüdür. Syanobakterilerin içeriğinde bulunan  $\beta$ -karotenin kanser riskini azalttığı bildirilmektedir. Mide ve deri kanserinde de etkili olduğu araştırmalarla kanıtlanmıştır (Niu ve ark., 2007). Syanobakterilerden *Spirulina*'nın sentetik pigment maddeleri ile karşılaştırıldığında en çarpıcı özelliğinin doğal bir renklendirici olduğudur. *Spirulina*'nın içerdiği pigment maddeleri; Fikobiliproteinlerin 75%'i fikosiyanınler, 12%'si allofikosiyanınler, 12%'si de fikoeritrinler ve pigmentsiz polipeptitler oluşturur (Tunail, 2009).

Fikoeritrin; kırmızı renkli phycobiliproteinler; fikoeritrin, mavi phycobiliproteinler de; fikoksiyanin olarak isimlendirilmektedir. Bu pigmentler suda eriyebilirler ve gıdalarda doğal renklendirici olarak, ayrıca kozmetik ve eczacılık alanında kullanılırlar. *Porphyridium* sp.; floresan pembe renk veren pigment kaynakları olarak bilinmekte olup, bu mikroalgler biyoreaktörlerde güneş ışığı ya da yapay ışıkla karbondioksit ve tuz ortamında geliştirilmekte ve en çok pigment 20–30 °C de ve orta şiddete ışık altında sağlanmaktadır. Bu mikroalglerden elde edilen önemli fikobiliproteinler, B-fikoeritrin ile b-fikoeritrin olarak tanımlanmaktadır. Bu pembemsi-kırmızı renkli pigmentler; konfeksiyon giyimde, jelâtin içeren tatlılarda ve süt ürünlerinde renklendirici olarak kullanılmakta, gıdalara katılma oranları ise gıda çeşidine göre farklılık göstermekte ve ortalama 50–100 mg/kg olmaktadır. 60 °C'de 30 dk sabit olan pigment, pH 6–7 arasında tazeliğini ve etkinliğini korumaktadır. Kırmızı fikoeritrin sarı floresana sahip olması nedeniyle gıdalara bazı spesifik özellikler kazandırmaktadır. Bu amaçla lolipoplarda, alkollü ve alkolsüz içeceklerde kullanılmaktadır (Rito-Palomares ve ark., 2001; Fedkovic ve ark., 1993).

Porphyridium-Fikosiyanın; *Porphyridium aeuineum* kırmızı alginden elde edilen mavi bir pigmenttir. En önemli fikosiyanın C- fikosiyanınidir. *Porphyridium aeuineum* biyomasından 60% oranında üretilen mavi pigmentin gıdalarda ya da içeceklerdeki kullanılan dozu 140–180 mg/kg arasında değişmektedir. İçerdiği polisakkaritler ürünün rengine, stabilitesine katkı sağlamak yanında gıdaya fonksiyonel besleyici özellik sağlamaktadır.

Mikroalgden elde edilen pigment; pH ile değişmemekte ve 60 °C'de 40 dk' da stabil kalmaktadır. Özellikle asidik içeceklerde ve konfeksiyon giyimde kullanılan bu renk maddesi Pepsi® (sıcaklık uygulanmayan) ve Bacardi Breezer® içeceklerine ilave

edilmektedir. Dondurmalarda da sıklıkla kullanılan pigmentin gıdalarda kullanımı ticari olarak üretilmediği için yeteri kadar açık değildir (Fedkovic ve ark., 1993).

## **Fikosiyaninin Kullanım Alanları**

### ***Renklendirici Olarak Kullanımı***

Gıda boyaları, ürünlerin renk kalitesini artırmak amacıyla kullanılan gıda katkı maddeleri olarak bilinmektedir. Gıdalarda kaybolan doğal rengi vermek, zayıf olan doğal rengi kuvvetlendirmek, gerçekte renksiz olan gıdalara renk vermek, cezp edici ürünler elde etmek amacıyla kullanılır. Sentetik renk maddeleri daha sabit olmaları, kuvvetli renk vermeleri gibi birçok avantaja sahip olmalarına karşın, toksik ve alerjik etkilerinin olması doğal renk maddelerine olan ilginin artmasına neden olmuştur. Tüm bu nedenler, üreticileri doğal renk maddelerini kullanmaya yönelmiştir (Arad ve Yaron, 1992; Karaali, 1993).

Günümüzde gıda sanayisinde özellikle içecek ve şekerleme sanayisinde sentetik mavi renkli boyaların kullanımı kısıtlanmakta ve doğal mavi renkli boyaların kullanımına olan ilgi giderek artmaktadır (Karaali, 1993). Doğal pigment maddesi fikosiyanin, gıda, ilaç ve kozmetik sanayinde, kanserojen olduğundan şüphe edilen sentetik pigmentlerin yerini alabileceği bildirilmiştir (Sarada ve ark., 1999). Fikosiyanin dünyada çeşitli firmalar tarafından ticari olarak üretilmektedir. Japonya’da “Dainippon Ink. & Chemicals Inc.” şirketi “Lina mavisı” adıyla ticari olarak fikosiyanin üretimi yapmakta ve kg fiyatını 130 dolardan satmaktadır (Yentür ve ark., 1998; Jespersen ve ark., 2005).

*S. platensis*’den elde edilen C-PC, fermente süt ürünleri, dondurma, alkol­süz içkiler, tatlılar, sakızlar, buzlu şekerler, dekorasyon ürünleri gibi birçok gıda ürünü­nde renklendirici olarak özellikle de C-PC, Japonya’da kullanılmaktadır (Resim 13.). Ancak mavi renkli gıdaların sınırlı tüketimi bu maddenin gıdalarda renklendirici olarak kullanımına olan ilgiyi azaltmaktadır. Fikosiyaninin, sıcaklığa ve ışığa karşı stabilitesi zayıf olmasına rağmen indigo ve gardenya mavisinden çok daha elverişli olduğu kabul edilmiştir. Kırmızı mikroalg türü olan *Phorphyridium aeruginum*’dan elde edilen fikosiyaninin renginin ışığa ve pH değişimlerine karşı sabit kaldığı ancak sıcaklığa karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir. Fikosiyaninin farklı koşullardaki stabilitesinin belirlenmesi gıda proseslerindeki kullanım olanaklarının tespiti açısından oldukça önemlidir. Üretimleri sırasında ısı işlem görmeyen içeceklere (Pepsi® ve Bacardi Brezzer®) ilave edilmesi halinde oda sıcaklığında 1 ay boyunca renk kaybı olmadığı tespit edilmiştir. Kuru gıdalarda kullanılması durumunda renk stabilitesi çok yüksek olduğu, kek dekorasyonunda kullanılan şekerli içeceklerin renklerinin bir yıl boyunca sabit kaldığı belirlenmiştir (Eriksen, 2008; Sekar ve Chandramohan, 2008).

### ***Floresan Prob Olarak Kullanımı***

Fikobilizomlar sulu çözeltiden ekstrakte edildiklerinde fikobiliproteinler uyarılma enerjilerinin doğal alıcılarını kaybederler ve böylece yüksek floresan özelliğe sahip olurlar. Diğer floresan maddelerle karşılaştırıldıklarında fikobiliproteinler yüksek molar ekstinksiyon (sönüm) katsayısına, yüksek oligomer stabilitesine ve yüksek floresan kuantum verimine sahiptir ve bu özellikleri onların güçlü ve yüksek duyarlılıkta floresan etken olarak kullanımlarını sağlamaktadır (Herrera ve ark., 1989; Henrikson, 2011).

Floresan özelliği etkileyen en önemli değişkenlerden biri kuantum verimidir. Floresan prob olarak en yaygın kullanılan fikobiliprotein, 82%-98% floresan kuantum verimi ile fikoeitrindir (Herrera ve ark., 1989; Glazer, 1994). Fikosiyaninin ve allofikosiyaninin

kuantum verimlerinin düşük olduğu (sırasıyla 68% ve 50%) belirlenmiştir (Glazer, 1994). Stabilize edici bazı etkenlerin polipeptit zincirine bağlanması sonucu kimyasal stabilizasyon sağlanmış ve bu sayede fikosiyanınin histokimya, floresan mikroskopi, akış sitometrisi, bağışıklık testleri gibi birçok alanda floresan prob olarak kullanımı olanaklı hale getirilmiştir (Herrera ve ark., 1989; Henrikson, 2011; Glazer, 1994). Bunun yanı sıra, fikosiyanınin floresan özelliğinden faydalanarak, siyanobakterilerin gelişimi eş zamanlı olarak takip edilebilmekte, içme sularındaki toksik siyanobakteriler tespit edilebilmekte ve doğal su kaynaklarında siyanobakteri varlığı uzaktan belirlenebilmektedir (Eriksen, 2008).

### **Gıda Katkısı ve Fonksiyonel Gıda Olarak Kullanımı**

Siyanobakterilerin fonksiyonel gıda olarak tüketimi fikosiyanınin kullanım alanlarından bir diğerini oluşturmaktadır. Kurutulmuş *S. platensis*'in fonksiyonel gıda olarak tüketiminde fikosiyanınin fonksiyonunu gösteren bir dizi çalışma bulunmaktadır. Son zamanlarda ilgi fikosiyanınin fonksiyonel bileşenler içeren kurutulmuş *S. platensis* ile alınmasına doğru kaymaktadır (Resim 10, 11, 12). Besinsel değerlerinin ötesinde tüm siyanobakterilerin fikosiyanınin içerikleri nedeniyle, bağışıklık sistemini uyardığı, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antikanser ve kolesterol düşürücü etkiler gösterdiği öne sürülmüştür. Siyanobakteriler biyolojik olarak birçok aktif bileşik içerdiğinden, siyanobakterinin tüketilmesi ile oluşan bu sağlık etkilerinin yalnızca fikosiyanın içeriği ile ilişkilendirilmesi tam olarak mümkün değildir (Eriksen, 2008; Erdal ve Ökmen, 2013).



**Şekil 10.** *Spirulina platensis* unu



**Şekil 11.** Siyanobakterilerin yığın üretimi



**Şekil 12.** *Spirulina*'nin hasatı ve kurutulması



**Şekil 13.** Kek ve pastacılıkta ve içeceklerde gıda renklendiricisi olarak kullanımı

## Nutrasötik ve Farmasötik Olarak Kullanımı

Farklı siyanobakterilerden elde edilen saf fikosiyenin antioksidan ve radikal uzaklaştırıcı aktivitesi olduğu ve bu bağlamda saflaştırılmış C-PC'nin nutrasötik ve farmasötik olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Soni ve ark., 2006; Spolaore ve ark., 2006; Oi ve ark., 1982).



Şekil 14. *Spirulina* tableti

Şekil 15. *Spirulina* kapsül

Şekil 16. *Spirulina* ilacı

Bir dizi bozulmuş fizyolojik durumun C-PC uygulaması ile düzeltilebildiği ve birçok vakadaki sağlık üzerine olan bu olumlu etkinin, C-PC'nin antioksidan ve radikal parçalayıcı etkisi aracılığıyla oluştuğu ifade edilmiştir. C-PC'nin NADH oksidaz gibi diğer bazı enzimleri de inhibe ederek, memeli hücrelerinde ve deney farelerinde gen düzenlenmesini etkilediği, hücre çoğalmasını önlediği ve kanserojenik hücrelerde apoptozisi (programlı hücre ölümü) uyardığı gözlenmiştir. Bu gözlemler nutrasötik veya farmasötik olarak C-PC kullanımına olan ilginin giderek artmasına neden olmaktadır (Eriksen, 2008).

Bousibba ve Richmond, 1980; fikosiyanınin *Spirulina*'da depo besin maddesi olarak görev yaptığını belirtmişlerdir. Fikosiyanın ticari olarak üretilmektedir. Japonya'da doğal renk maddesi olarak yemlerde ve kozmetik alanında kullanılmakta ve 600 kg/ay oranında üretilmektedir. Fikosiyanın'ın esas kullanım alanı gıda boyası kullanımınıdır. Bağışıklık ile ilgili denemelerde biyokimyasal izotop olarak kullanılmaktadır. Bu pigmentin sahip olduğu flüoresan özellikten dolayı mikroskopi ve sitometri çalışmalarında yararlanılmaktadır. Şeker, dondurma, günlük ürünler ve içeceklerin renklendirilmesinde kullanılmaktadır. Fikosiyanınin genel anlamda bağışıklık sistemini desteklediği ve çeşitli hastalıklara karşı koruma sağladığı belirtilmiştir.

Fikosiyanın dünyada çeşitli firmalar tarafından ticari olarak üretilmektedir. Başlıca, sakızlar, süt ürünleri, jöle vb. gıdalarda renklendirici olarak kullanılmaktadır. Japonya, Tayland ve Çin'de kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadır. Mavi renkli bu pigment kozmetikte far, göz kalemi ve rujlarda da kullanılmaktadır (Benedetti ve ark., 2006).

Fikobilinler gıda ve kozmetik alanları dışında biyoteknolojik anlamda teşhis ve ilaçlarda kullanılmaktadır. Siyanobakterilerden elde edilen fikosiyanın kendi besin değeri dışında, bağışıklık sistemini artırıcı, kolesterol düşürücü, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral ve antikanser özellikler de göstermektedir (Boussiba and Richmond, 1980, Resim 14, 15, 16).

Günümüzde mümkün olduğunca az işlem görmüş, besleyici değeri yüksek insan sağlığına zarar vermeyen doğal besin maddelerine, renklendiricilere, antioksidanlara ve gıda katkı maddelerine rağbet artarak devam etmektedir. Siyanobakterilerden elde edilen

fikosiyenin kendi besin değeri dışında, bağımsızlık sistemini artırıcı, kolesterol düşürücü, antioksidan, antiinflamatuar, antiviral ve antikanser özellikler de göstermektedir (Cornejo, 1997). Tüm bu üstün özelliklerinden dolayı fikosiyenin geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Daha yüksek saflıkta ve verimde fikosiyenin elde edilebilmesi, dolayısıyla birçok alanda daha rahat kullanım potansiyeli yaratabilmek için, fikosiyenin üreticisinin yeni suşların belirlenmesi, etkili saflaştırma tekniklerinin geliştirilmesi, genetik ve protein mühendisliği çalışmaları ile üretim potansiyelinin ve fikosiyenin stabilitesinin artırılması gerektiği düşünülmektedir (Akoğlu, 2012).

## Kaynaklar

- Abalde, J., L. Betancourt, E. Torres, A. Cid and C. Barwell. 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, 136: 109–120.
- Akoğlu, A. 2012. Siyanobakterilerden elde edilen fikosiyenin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Ens. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, s. 109.
- Arad (Malis), S. and A. Yaron. 1992. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science and Technology*, 3: 92–96.
- Becker, E.W. 1995. *Microalgae: Biotechnology and microbiology*, Cambridge University Press, UK, 293 p.
- Benedetti, S., S. Rinalducci, F. Benvenuti, S. Francogli, S. Pagliarini, M. Giorgi, L. Micheloni, G.M. D'Amici, L. Zolla and F. Canestrari. 2006. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Chromatography B*, 833: 12–18.
- Bourrelly, R. 1970. *Les algues d'eau douce*. Tome 3, 1970, Algues bleues et rouges: 1–522 Edit Boubee' Paris.
- Boussiba, S. and A. Richmond. 1980. C-Phycocyanin as a Storage Protein in the blue-green Alga *Spirulina platensis*, *Arch. Microbial.*, 125: 145.
- Boussiba, S. and A.E. Richmand. 1979. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 120:155-159.
- Chaiklahan, R., N. Chirasuwan, V. Loha, S. Tia and B. Bunnag. 2011. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresour Technol.*, 102: 7159–64.
- Chen, T., Y. Wong and W. Zheng. 2006. Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. *Phytochemistry*, 67: 2424–2430.
- Cohen, Z. 1997. The Chemicals of *Spirulina*, In: Vonshak, A.(Ed.), *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology, Taylor and Francis, 175-204, London.
- Contreras-Martel, C., A. Matamala, C. Bruna, G. Poo-Caamaño, D. Almonacid, M. Figueroa, J. Martínez-Oyanedel and M. Bunster. 2007. The structure at 2 resolution of phycocyanin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer network in a PC-PC complex. *Biophysical Chemistry*, 125: 388–396.
- Cornejo, J. and S.I. Beale. 1997. Phycobilin Biosynthetic Reactions In Extracts Of Cyanobacteria. *Photosynth Res.*, 51: 223–230.
- Dalay, M.C., S. Cirik ve E. Koru. 2001. Türkiye Ege Bölgesi İklim Koşullarında Açık Hava Kültürleri İçin Uygun *Spirulina platensis* (Stiz.) Geitl, 1930 Suşunun Tespiti. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 18(3–4): 523–528.

- Dalay, M.C., E. İmamoğlu ve S. Öncel. 2008. Mikroalgal Biyokütle Üretimi için Düşük Maliyetli Fotobiyoreaktör Tasarımı. TÜBİTAK MAG Proje 104M354, 2008: s. 1–102.
- Doke, J.H. 2005. An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from *Spirulina* sp. *International Journal of Food Engineering*, 1: 2.
- Erdal, P. ve G. Ökmen. 2013. Gıdalarda Kullanılan Mikrobiyal Kaynaklı Pigmentler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 6 (2): 56-68.
- Eriksen, N.T. 2008. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 1-14.
- Fedkovic, Y., C. Astre, F. Pinguet, M. Gerber, M. Ychou and H. Pujol. 1993. *Spiruline* et cancer. In: Doumenge, F., Durand- Chastel, H., Toulemont, A., eds. *Spiruline* algue de vie. Musée Océanographique. Bulletin de l'Institut Océanographique Monaco. Numéro spécial, 12: 117–120.
- Fox, D.R. 1996. *Spirulina: Production and Potential*, 232 p., Edisud-France.
- Furuki, T., M. Schuichi, S. Imajo, T. Hiroi, T. Amaya, T. Hirokawa, K. Ito and H. Nozawa. 2003. Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. *J of Appl Phycol*, 15: 319–324.
- Glazer, A.N. 1994. Phycobiliproteins-a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*, 6: 105–112.
- Goodwin., W. 1957. The Nature and Distribution of Carotenoids in some Blue-Green Algae. *J. Gen. Microbiol.*, 17: 467-473.
- Gouveia, L., V. Veloso, A. Reis, H.L. Fernandes, J. Empis and J.M. Novais. 1996. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 57: 157–163.
- Govindjee A. and L. Yang. 1966. Structure of red fluorescence band in chloroplasts. *J. Gen. Physiol.*, 49(4): 763–780.
- Henrikson, R. 2011. Development of a *Spirulina* Industry-Marketing. <http://www.algaeindustrymagazine.com/special-report-spirulina-part-6/>, Erişim tarihi: 28.01.2012.
- Herrera, A., S. Boussiba, V. Napoleone and A. Hohlberg. 1989. Recovery of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Journal of Applied Phycology*, 1: 325–331.
- Herrero, M., C. Cifuentes and E. Ibanez. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry*, 98: 136–148.
- Jespersen, L., L.D. Strømdahl, K. Olsen and L.H. Skibsted. 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 220: 261–266
- Karaali, A. ve B. Özçelik. 1993. Natural and Synthetic Colours as Food Additives (in Turkish with English abstract). *Gıda*, 18(6):389-396.
- Macías-Sánchez, M.D., C. Mantell, M. Rodríguez, E.M. Ossa, L.M. Lubián and O. Montero. 2007. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp. *The Journal of Supercritical Fluids*, 39(3): 323–329.
- Minkova, K.M., A.A. Tchernov, M.I. Tchorbadjieva, S.T. Fournadjieva, R.E. Antova and M. Busheva. 2003. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, 102: 55–59.

- Moraes, P.C., C.W. Noce, L.A. Thomaz, M.L. Cintra and M.E. Correa. 2011. Pigmented lichenoid drug eruption secondary to chloroquine therapy: an unusual presentation in lower lip. *Minerva Stomatol.*, 60: 32–327.
- Newton, J. 2002. Fluorometric chlorophyll a and total phaeopigment, from TM (trace metal free rosette) casts, (chlTM) added 06-10-94 parameter names changed for DMO Alpha9 release, 06-24-2002.
- Niu, J.F., G.C. Wang, X.Z. Lin and B.C. Zhou. 2007. Large-scale recovery of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, 850: 267–276.
- Oi, V.T., A.N. Glazer and L. Stryer. 1982. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *The Journal of Cell Biology*, 93: 981–986.
- Oliveira, E.G., G.S. Rosa, M.A. Moraes and L.A.A. Pinto. 2008. Phycocyanin content of *Spirulina platensis* dried in spouted bed and thin layer. *Journal of Food Process Engineering*, 31: 34–50.
- Öncel, I., S.A. Üstün ve Y. Keleş. 2004. Bitki Fizyolojisi Laboratuvar Kılavuzu. A.Ü.F.F. Döner Sermaye İşletme Yayınları, ANKARA, No: 48, s. 72–74.
- Paoletti, C., M. Vincenzini, F. Boci and R. Materassi. 1980. Composizione Biochimica Gene-rale delle Biomasse di *Spirulina platensis* e *S. maxima* in Materassi. In: R.(Ed.) Prospet-tive della Coltura di Spirulina in Italia. Rome: Consiglio Nazionale delle Ricerche, pp. 111–125.
- Patil, G., S. Chethana, A.S. Sridevi and K.S.M.S. Raghavarao. 2006. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, 1127: 76–81.
- Patil, G. and K.S.M.S. Raghavarao. 2007. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochemical Engineering Journal*, 34: 156-164.
- Reis, A., A. Mendes, H. Lobo-Fernande, J.A. Empis and J.M. Novias. 1998. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp.. *Bioresource Technology*, 66: 181–187.
- Richmond, A. 1986. Microalgae of Economic Potential. In: A. Richmond (Ed). *Handbook of Microalgal Mass Cultures of Microalgae*. CRC Press, Inc., 201-283, Boca Raton, Flo-rida.
- Rito-Palomares, M., L. Nuñez and D. Amador. 2001. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76: 1273–1280.
- Santiago-Santos, M.C., T. Ponce-Noyola, R. Olvera-Ramírez, J. Ortega-López and R.O. Cañizares-Villanueva. 2004. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp.. *Process Biochemistry*, 39: 2047–2052.
- Sarada, R., M.G. Pillai and A. Ravishankar. 1999. Phycocyanin from *Spirulina* sp.: influence of processing of biomass an phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, 24: 795–801.
- Schagerl, M and B. Müller. 2006. Acclimation of chlorophyll a and carotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria. *J. Plant Physiol.*, 163: 709–716.
- Schmidt, R.A., M.G. Wiebe and N.T. Eriksen. 2005. Heterotrophic high cell density fed-batch cultures of the phycocyanin producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnology and Bioengineering*, 90: 77–84.
- Sekar, S. and M. Chandramohan. 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20: 113–136.
- Shan, Y. 1998. Effects of simulated acid rain on *Pinus densiflora*: inhibition of net photosynthesis by the pheophytization of chlorophyll. *Water, Air, and Soil Pollution*, 103: 121–127



- Soni, B., B. Kalavadia, U. Trivedi and D. Madamwar. 2006. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry*, 41: 2017–2023.
- Spolaore, P., C.J. Cassan, E. Duran and A. Isanbert. 2006. Commercial application of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2):87–96.
- Stec, B., R.F. Troxler and M.M. Teeter. 1999. Crystal structure of C-phycocyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective in phycobilisome assembly. *Biophysical Journal*, 76: 2912–2921.
- Steward, D.E. and F.H. Farmer. 1984. Extraction, identification and quantitation of phycobiliprotein pigments from phototrophic plankton. *Limnology and Oceanography*, 29(2): 392–397.
- Tomaselli, L. 1997. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: Vonshak, A., Ed. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cellbiology and biotechnology*. Taylor and Francis. London, 1997: 1–16.
- Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin ofset, 448 s., Ankara.
- Yamada, T. 1994. *Cyanobacteria and Algae/ Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications*, Marcel Dekker. Inc, 701–712.
- Yaron, A. and S. Arad (Malis). 1993. G. Charalambous, Editor, *Phycobiliproteins-blue and red natural pigments-for use in food and cosmetics, Food flavors, ingredients and composition, developments in food science*, Elsevier, London, 835–838.
- Yentür, G., M. Yaman and A. Bayhan. 1998. Studies conducted for the quantity determination of synthetic dyes added into some foodstuffs (*in Turkish with English abstract*). *Gıda*, 23(3):195–199.
- Yıldız, G. 2001. *Spirulina Sp. (Cyanophyceae) Kültürü Üzerine Araştırmalar*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Zhang, Y. and F. Chen. 1999. A simple method for efficient separation and purification of C-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biotechnology Technology journal*, 13: 601–603.
- Zhu, Y., X.B. Chen, K.B. Wang, Y.X. Li, K.Z. Bai, T.Y. Kuang and H.B. H.B. 2007. A simple method for extracting C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using *Klebsiella pneumonia*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 244–248.
- Zou, N. and A. Richmond. 2000. Light-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis sp.* (Eustigmatophyceae). *J. Appl. Phycol.*, 12: 349–354.

