

Özgün Araştırma/Original Article

Spirulina platensis ekstraktlarının antifungal aktivitelerinin incelenmesi

Determination of antifungal activities of *Spirulina platensis* extracts

Oya Irmak Şahin^{1*}, Begüm Kurbe²

¹Yalova Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, YALOVA, TÜRKİYE

²Yalova Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya ve Süreç Mühendisliği Ana Bilim Dalı, YALOVA, TÜRKİYE
(Yazar sıralamasına göre)

ORCID ID: 0000-0003-2225-7993, Dr. Öğr. Üyesi

ORCID ID: 0000-0003-4845-8064, Yüksek Lisans Öğrencisi

*Sorumlu yazar/Corresponding author: isahin@yalova.edu.tr

Geliş Tarihi : 28.01.2022

Kabul Tarihi : 08.03.2022

Öz

Amaç: Algler ve algal biyoteknoloji her geçen gün endüstrinin ve bilimsel araştırmaların daha fazla dikkatini çekmektedir. Makro ve mikroalglerin, protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitamin, mineral, pigmentler gibi hücre içi ve dışı metabolitleri; besin desteği, gıda katkı maddesi ve farmasötik olarak pek çok amaçla kullanılmaktadırlar. Özellikle yağ asitleri, pigmentler ve fenolik bileşiklerinin antibakteriyel, antioksidan, antifungal ve antiviral özelliklere sahip olduğu ve gıda kaynaklı hastalıkların azaltılması ve önlenmesinde kullanılabileceği bildirilmektedir. Gerçekleştirilen bu çalışmada, uygun kültür koşullarında üretilen *Spirulina platensis* mikroalginin, farklı solventler (su, metanol, hekzan) ile elde edilen ekstraktlarının gıdalarda bozulma ve ekonomik kayıplara sebep olan *Aspergillus flavus* ve *Penicillium verrucosum* küflerine karşı antifungal etkisi disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Materyal ve yöntem: Ekstraktların eldesinde kullanılacak solvent:biyokütle oranları ile solvent türü ve antifungal aktiviteyi tespit için kullanılacak ekstrakt konsantrasyonları etkili değişken faktörler olarak belirlenmiştir. Proses değişkenlerinin etkisini optimize etmek için yüzey yanıt metoduna (YYY) (Response Surface Methodology, RSM) bağlı merkezi tümleşik tasarım (Central Composite Design, CCD) kullanılmıştır. Buna göre elde edilen değişken parametreleri solvent:biyokütle için 4-16 (- α , + α) ve ekstrakt konsantrasyonu için 6-54 mg/mL (- α , + α) olarak tespit edilmiş ve denemeler gerçekleştirilmiştir.

Bulgular ve sonuç: Yapılan denemelerde, su ile elde edilen ekstraktlar herhangi bir aktivite gösteremezken, metanol ekstraktları en yüksek antifungal aktiviteyi göstermiştir. Her iki küf türü için de en etkili parametre olarak belirlenen solvent:biyokütle oranının "4" olduğu metanol ekstraktlarında, inhibisyon zonu her iki küf türü için de "9 mm" olarak tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Spirulina platensis*; antifungal aktivite; *Aspergillus flavus*; *Penicillium verrucosum*

Abstract

Objective: Algae and algal biotechnology have attracted increasing attention in industry and scientific research. Intracellular and extracellular metabolites of macroalgae and microalgae, proteins, carbohydrates, fatty acids, vitamins, minerals, pigments, etc., are used for many purposes as food supplements, food additives, and pharmaceuticals. It has been reported that especially fatty acids, pigments, and phenolic compounds have antimicrobial, antioxidant, antifungal, and antiviral properties and can be used to reduce and prevent foodborne diseases. In this study, the antifungal effect of the extracts of *Spirulina platensis* microalgae, which grown under suitable culture conditions, with different solvents (water, methanol, hexane) against *Aspergillus flavus* and *Penicillium verrucosum* molds, which cause food spoilage and economic losses, was investigated using disc diffusion method.

Materials and methods: Solvent:biomass ratios and extract concentrations with solvent-type were used as variable factors to determine antimicrobial activity. The process variables (3 factors with 4 levels) were applied within the response surface methodology (RSM) with central composite design (CCD). Experiments were

carried out due to the determined variable parameters as 4-16 (- α , + α) for solvent:biomass ratio and 6-54 mg/mL (- α , + α) for extract concentration.

Discussion and conclusion: According to the results obtained, the extracts obtained with water did not show any activity, while the methanol extracts showed the highest antifungal activity. In methanol extracts, where the solvent/biomass ratio, which was determined as the most effective parameter for both mold species, was “4”, the inhibition zone was determined as “9 mm” for both *Aspergillus flavus* and *Penicillium verrucosum*.

Keywords: *Spirulina platensis*; antifungal activity; *Aspergillus flavus*; *Penicillium verrucosum*

1. Giriş

Gıda maddeleri pek çok mikroorganizmanın gelişimi ve bunların toksinlerinin üretimi için oldukça uygun bir ortam olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriler, küfler ve mayalar gıda güvenliği ve ürün kalitesi açısından büyük problemlere neden olmaktadır. *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri gıdalarda bozulmalara neden olan en önemli küf cinsleridir. Küflerin gıdalarda gelişimi alerjik etkili bileşikler ile birlikte mikotoksin adı verilen toksin bileşiklerin oluşumuna da sebep olmaktadır. Bu toksinler kanserojen etki gösteren ve sağlığa zararlı bileşiklerdir (Luz vd., 2017; Pawlowska vd., 2012). Gıdaların raf ömrünün uzatılması, duyuşal niteliklerin iyileştirilmesi, kalite karakteristiklerinin korunabilmesi adına pek çok katkı maddesi kullanılmaktadır. Ancak mikroorganizmaların bu katkı maddelerine direnç göstermeleri, kullanılan katkıların son üründe kalıntı bırakabilmeleri ve tüketici gruplarının son yıllarda doğal ürünlere ilgi göstermeleri sebebiyle, bu kimyasal maddelerin yerine doğal olarak koruyucu etki gösteren katkı maddelerine ilgi giderek artmaktadır (Yılmaz, 2019).

Bitkisel ve sucul bir kaynak olarak nitelendirilen mikro ve makroalgler pek çok endüstride tercih edilen bir proses bileşeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle mikroalgler hem biyokütleleri hem de farklı izolat ya da ekstraktları ile ilaç ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Sarkar vd., 2020). Bitkisel ve mikrobiyal matrislerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda, yaygın olarak çeşitli solvent türleri kullanılmaktadır. Su, etil asetat, metanol, etanol, aseton ve hekzan sıklıkla kullanılan solventlerdir. Genel olarak hekzan, karotenoidleri ve klorofili uzaklaştırırken; metanol ise şekerleri, organik asitleri ve düşük moleküler ağırlıklı fenolleri ekstrakte edebilmektedir (Moure vd., 2001; Tantawy, 2011). Fenolik bileşikler gibi algal biyokütle bileşenlerinin de antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Pagnussatt vd., 2013; Souza vd., 2011). Alglerin antimikrobiyal aktivitesi klorofil türevleri, terpenler, fenolik maddeler, alifatik

bileşenler ve sülfür içeren heterosiklik bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Bu bileşenlerin yanında antimikrobiyal aktivitenin bazı aminoasitler, florotanninler, steroidler, halojenli ketonlar ve alkanlar, siklik polisülfidler ve yağ asitlerinden de kaynaklandığı belirtilmiştir (Martelli vd., 2020).

Dünyada endüstriyel düzeyde üretimi yapılan alg türlerinden biri olan *Spirulina* spp., içerdiği yüksek miktardaki pigmentler, protein ve gamma linolenik asit (GLA) gibi metabolitler sebebiyle oldukça önem taşıyan bir mikroalg türüdür. *S. platensis* türünün üretiminin ve hasadının kolay olması, ayrıca yapısındaki bu yüksek katma değerli maddeleri yüksek miktarda biriktirmesinden dolayı organizmanın potansiyel üretimi bu ürünler üzerine yoğunlaşmıştır. *S. platensis* mikroalginin sentezlediği bu bileşiklerin potansiyel antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve antiviral madde olarak tanımlanabileceği ve gıda kaynaklı hastalıkların azaltılması ve önlenmesinde kullanılabileceği bildirilmektedir (Al-Ghanayem, 2017; Hoseini vd., 2013). Mikroalgler ile gerçekleştirilen pek çok çalışmanın varlığının yanı sıra, bu alglerin ya da bileşiklerinin gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak değerlendirilmesi çalışmaları önem kazanmaktadır. Bu çalışmanın amacı, *Spirulina platensis* mikroalginin farklı solvent:biyokütle oranı kullanılarak elde edilen fenolik ekstraktlarının gıdalarda bozulmalara ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan *Aspergillus* ve *Penicillium* küflerine karşı antifungal aktivitelerini incelemektir.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Materyal

Schössler ortamındaki *Spirulina platensis*, Yalova Üniversitesi Gıda Biyokimyası ve Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda 25±2°C, 150 µmol foton m⁻²s⁻¹'de 24 saatlik kesintisiz aydınlatma koşulları ile 2 L'lik bir fotobiyoreaktörde geliştirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite tespiti için kullanılan suşlar (*Aspergillus flavus* CCT 1217 ve *Penicillium verrucosum*) Thermo Fisher (MA, ABD) firması tarafından temin edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin hazırlanması

Kültürler optik yoğunluk takibinden elde edilen sonuca göre, logaritmik fazın bitimi ve duraklama fazının başlamasıyla birlikte 0,45 µm göz açıklığına sahip olan Whatman GF/C membran filtre -kâğıtlarından vakumlu süzme düzeneği kullanılarak hasat edilmiştir. Elde edilen yaş biyokütleler liyofilizatörde (Teknosem, TRS2/2V, Türkiye) -68°C'de 30-40 Pa basınç altında 18-24 saat kurutulmuştur. Kurutulan biyokütle, boyutlarının küçültülmesi için öğütücüde (IKA, M 20, Almanya) öğütülerek, ekstraksiyon işlemine kadar hava almayacak bir şekilde ambalajlanarak bekletilmiştir.

2.2.2. Ekstraksiyon İşlemi

Toz haline getirilmiş *Spirulina* biyokütlesi belirlenen oranlarda ve cinslerde solventler kullanılarak, Farasat vd. (2013) tarafından belirlenen metodun geliştirilmesi sonucu, 45°C'de 20 dk. ultrasonik su banyosunda bırakılmış ve ardından oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Bu işlemden sonra ekstrakt 4.500 rpm'de 10 dk. süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak dönerli buharlaştırıcıda (Buchi, R-3) solventlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Solvent uzaklaştırıldıktan sonra Çizelge 1'de belirtilen konsantrasyonlardaki ekstraktlar hazırlanmıştır. Konsantrasyonları ayarlanan ekstraktlar benzer çalışmalarda olduğu üzere antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılmak üzere +4°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

2.2.3. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Spirulina platensis 'e ait farklı ekstraktların küfler üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Usharani vd., 2015). 6 mm çapında olan boş steril diskler her konsantrasyondan 40 µl alg ekstraktı emdirilmiştir. 2,3 x 10³ kob/mL küf süspansiyonları, Sabouraud's dekstroza agar (SDA) yüzeyine yayılmış ve 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Ardından farklı dilüsyonlarda algal ekstraktı içeren diskler küf yayılmış besiyeri üzerine yerleştirildikten sonra 30°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak sadece metanol ve hekzan emdirilmiş diskler kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda disklerin etrafında inhibisyon zonları oluşup oluşmadığı gözlenerek disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları milimetrik cetvel kullanılarak ölçülmüştür. (Gümüş ve Ünlüsayın, 2016).

2.2.4. Deneysel tasarım ve istatistiksel analiz

Algal ekstraktların antifungal aktivitelerini optimize etmek amacıyla Yüzey yanıt yöntemi (YYY) bağlı merkezi tümleşik tasarıma göre, 3 faktörlü ve 4 farklı seviyede deneme deseni kullanılmıştır (Çizelge 1). Solvent:biyokütle oranı ve ekstrakt konsantrasyonu numerik faktör, solvent cinsi ise kategorik faktör olarak seçilmiş ve 26 deney sayısından oluşan bir deneme deseni belirlenmiştir. Deneme deseni, optimizasyon verilerinin varyans analizi ve 3 boyutlu yüzey yanıt grafikleri Design Expert 11.0.5 paket programı kullanılarak oluşturulmuştur.

Çizelge 1. Deneme deseni faktörleri ve faktör değerleri

Faktör	Bağımsız Değişken	- α	-1	1	α
A	Solvent:Biyo-kütle Oranı	4	5	15	16
B	Ekstrakt Konsantrasyonu	6	10	50	54
C	Solvent Cinsi	Hekzan – Metanol			

3. Bulgular ve tartışma

Bu çalışma, *Spirulina platensis* örneklerinin metanol, hekzan ve sudan elde edilmiş ekstraktlarının *Aspergillus* ve *Penicillium* türü küfler üzerine olan etkilerini saptamak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. *Spirulina platensis* ekstraktlarının fungal inhibisyon zonu (mm)

Deney Sayısı	A	B	C	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
				Zon (mm)	
1	16	30	Metanol	0	0
2	10	54	Metanol	8	8,5
3	10	6	Hekzan	0	0
4	15	10	Hekzan	0	0
5	10	54	Hekzan	5	5
6	16	30	Hekzan	0	0
7	10	30	Metanol	6	5
8	10	30	Hekzan	7	7,5
9	15	50	Hekzan	0	0
10	10	6	Metanol	0	0
11	10	30	Hekzan	7,5	8
12	15	10	Metanol	0	0
13	10	30	Hekzan	7,5	7,5
14	10	30	Hekzan	7	6,5
15	10	30	Hekzan	7	6,5
16	4	30	Metanol	9	9
17	10	30	Metanol	6	6
18	4	30	Hekzan	9	8,5
19	10	30	Metanol	7,5	8
20	15	50	Metanol	0	0
21	5	10	Hekzan	5	6
22	5	50	Metanol	8	8,5
23	10	30	Metanol	6	7
24	5	10	Metanol	8	8
25	5	50	Hekzan	7,5	7,5
26	10	30	Metanol	7	7,5

A: Solvent:biyo-kütle oranı (h:h), B: Ekstrakt konsantrasyonu, C: Solvent cinsini ifade etmektedir.

Solvent olarak hekzan ve metanol kullanılarak elde edilen ekstraktlarda gözlenen antifungal etki inhibisyon zonu Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelge 2'den açıkça görüldüğü gibi yapılan denemeler sonucunda metanol kullanılarak elde edilen en yüksek inhibisyon zonu 9 mm olarak belirlenmiştir.

Regresyon analizi bağımsız değişkenler ve cevap arasındaki ilişkiyi belirlemek için yapılmaktadır. Regresyon analizinde, lineer, kuadratik, kübik, logaritmik ve ters regresyon modelleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Her iki küf türü için modellerin uyumu, uyum eksikliği testi (lack of fit), düzeltilmiş R^2 ve tahmini R^2 değerleri gibi üç faktörün sayısal değeri ile belirlenmiştir. İnhibisyon zonu için model belirleme analizine göre, uyum eksikliği değerinin uyumsuz olmasından, düzeltilmiş R^2 ve tahmini R^2

değerlerinin yüksek olmasından ve aynı zamanda bu iki değer makul ölçüde birbirine yakın olmasından dolayı kuadratik modelin uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Çizelge 3 ve Çizelge 4).

Varyans analizi (ANOVA) genellikle deneysel sonuçları daha iyi tanımlamak için kullanılan bir yöntem olup, yüksek F değerine ve düşük p değerine sahip bir modelin anlamlı olduğu kabul edilirken, en düşük p değeri regresyon denklemindeki en etkili parametreyi göstermektedir (Azma vd., 2011). Bu çalışmada, cevap ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla merkezi tümleşik tasarım yöntemi ile kuadratik model için ANOVA gerçekleştirilmiştir. *A. flavus* ve *P. verrucosum* inhibisyonu için ANOVA analizi Çizelge 3 ve Çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 3. *Aspergillus flavus* için ANOVA sonuçları

	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F-değeri	p-değeri	
Model	241,48	8	32,55	61,89	< 0.0001	*
A-Solvent:Biyokütle Oranı	182,41	1	182,41	374,00	< 0.0001	*
B-Ekstrakt Konsantrasyonu	1,20	1	42,25	2,45	0,1398	
C-Solvent	0,0008	1	0,9031	0,0016	0,9689	
AB	0,7813	1	0,7812	1,60	0,2263	
AC	0,8903	1	0,0879	1,83	0,1981	
BC	1,20	1	15,25	2,45	0,1398	
A ²	22,63	1	42,29	46,40	< 0.0001	*
B ²	12,63	1	19,22	25,90	0,0002	*
Uyum Eksikliği	4,23	6	0,9493	2,17	0,1537	
Hata	2,60	8	0,2875			
					R^2	0,9725
					Ayarlanmış R^2	0,9568
					Tahmin edilen R^2	0,8785

* $p < 0,05$ istatistiki açıdan önemli farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4. *Penicillium verrucosum* için ANOVA sonuçları

	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F-değeri	p-değeri	
Model	251,26	8	31,41	19,86	< 0.0001	*
A	189,03	1	189,03	119,51	< 0.0001	*
B	8,22	1	8,22	5,19	0,0377	*
C	0,2329	1	0,2329	0,1473	0,7065	
AB	0,5000	1	0,5000	0,3161	0,5823	
BC	0,9419	1	0,9419	0,5955	0,4523	
A ²	0,0784	1	0,0784	0,0496	0,8268	*
B ²	15,13	1	15,13	9,57	0,0074	*
Uyum Eksikliği	16,93	7	2,42	2,84	0,0831	
Hata	6,80	8	0,8500			
					R^2	0,9137
					Ayarlanmış R^2	0,8677
					Tahmin edilen R^2	0,7247

* $p < 0,05$ istatistiki açıdan önemli farklılıkları göstermektedir.

Modelin doğruluğu ve uyumu büyük F değerleriyle birlikte p değerleri <0,05 olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *A. flavus* küfü için, Modele ait F değeri 61,89 olarak belirlenmiş ve istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Kuadratik model incelendiğinde A, A², B² faktörleri önemli olarak, C faktörü ise önemsiz olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda uyum eksikliği p değeri 0,1537 olarak belirlenmiş ve istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur, ancak F değerinin 2,17 olarak belirlenmesi yüzde 10'dan düşük bir oranda modelde sapmaya sebep olabilmektedir.

Çizelge 4'te *Spirulina* ekstraktlarının *P. verrucosum* üzerine etkilerinin istatistiksel analiz sonuçları verilmiştir. Modele ait F değeri 19,86 olarak belirlenmiş ve istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Kuadratik model incelendiğinde A, B, A², B² faktörleri önemli olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda uyum eksikliği p değeri 0,0831 olarak belirlenmiş ve istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur, ancak F değerinin 2,84 olarak belirlenmesi yüzde 10'dan düşük bir oranda modelde sapmaya sebep olabilmektedir.

Her iki küf türü için de varyans analizleri incelendiğinde, ayarlanmış ve tahmin edilen (öngörülen) R² değerlerinin sırasıyla 0,9568 ile 0,8785 (Çizelge 3) ve 0,8677 ile 0,7247 (Çizelge 4) olduğu görülmektedir ki bu da modelin özellikle *A. flavus* inhibisyonu için tatmin edici olduğunu göstermektedir. Ayrıca uyum eksikliği değerleri, geliştirilen modelin uyumunu belirleyici özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum *Spirulina platensis* ekstraktlarının antifungal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan kuadratik modelin anlamlı olduğunu ve yanıt ile bağımsız değişkenler arasında iyi bir ilişki bulunduğunu göstermektedir.

İnhibisyon deneylerinin optimum koşulları, inhibisyon zonu değerlerinin maksimum düzeyde olduğu ve ekstraksiyon konsantrasyonu ile solvent:biyokütle oranının deney aralığında ve minimum olduğu, Design Expert yazılımı ile belirlenmiş ve optimizasyon standardı ve optimum bağımsız değişkenleri Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. Optimize faktör değerleri ve model validasyonu

Faktör	Aralık	En Düşük	En Yüksek
A: Solvent:Biyo kütle Oranı	en az	4	16
B: Ekstrakt Konsantrasyonu	en az	5	50
C: Solvent	Değer aralığı	Hekzan	Metanol
<i>Aspergillus flavus</i>	en çok	7	-
<i>Penicillium verrucosum</i>	en çok	7	-
Solvent:Biyo kütle Oranı	Ekstrakt Konsantrasyonu	Solvent	
			<i>Aspergillus flavus</i>
			<i>Penicillium verrucosum</i>
			Beklenen
			Gerçekleşen
4,00	32,00	Metanol	9,10
			8,90
			9,51
			9,30

Optimum proses değişkenleri; solvent:biyokütle oranı, ekstrakt konsantrasyonu ve ekstrakt eldesinde kullanılacak solvent cinsi sırasıyla 4, 32, 10 mg/mL ve metanol olarak belirlenmiştir. Bu proses koşullarında inhibisyon zonu oluşumu *A. flavus* ve *P. verrucosum* için sırasıyla 9,10 ve 9,51 mm olarak model vasıtasıyla tahmin edilmiş ve gerçekleştirilen validasyonun ardından 8,90 mm ve 9,30 mm olarak tespit edilmiştir.

Algal biyokütlenin kendisinin ya da ekstraktlarının gıda katkı maddesi olarak değerlendirilme çalışmaları "gıdaların zenginleştirilmesi" üzerine kurgulanmış algal biyokütlenin ya da ekstraktlarının "antimikrobiyal etkileri" göz ardı edilmiştir. Oysa mikroalglerin gıda katkı maddesi olarak kullanıldığı bazı çalışmalarda yapılan mikrobiyolojik analizler, biyokütlenin kendisinin ve ekstraktlarının bakteri gelişimini inhibe etmesiyle birlikte küf ve mayaların da gelişimini inhibe edebildiğini göstermektedir (Ak vd., 2016;

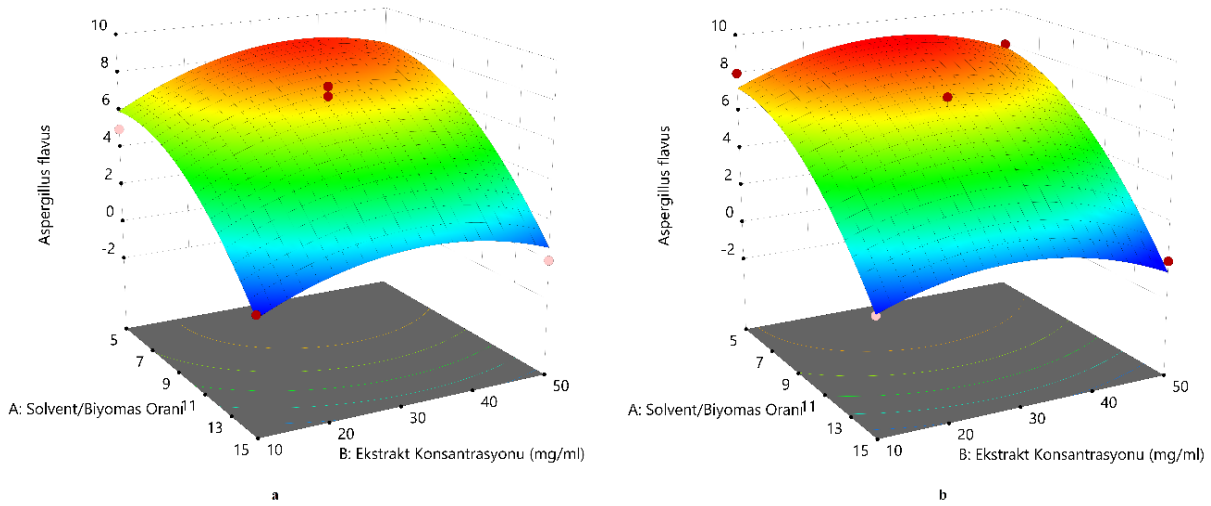
Almeida vd., 2021; Sahin ve Ozturk, 2021). Gıda katkı maddesi olarak değerlendirilmek istenen algal ekstraktların gıda matriksinde kullanım miktarı, ürünün tekstürel ve reolojik niteliklerinin yanı sıra duyu özelliklerini de etkileyebilmektedir. Alglerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri, gıdalarda algal bileşiklerin kullanım sıklığını ve çeşitliliğini de etkileyebilecek bir faktör olarak değerlendirilmelidir. Bu nedenle, gıda matriksine alglerin ilavesi çalışmalarının yalnızca fizikokimyasal ve tekno-fonksiyonel açıdan değil, aynı zamanda mikrobiyolojik açıdan ve raf ömrü açısından da değerlendirilmesi gerekmektedir.

Ekstraksiyon elde etme yöntemleri de kullanılan solvent cinsi kadar önem taşımaktadır. Gerçekleştirilen çalışmalarda farklılık gösteren ekstrakt konsantrasyonu faktörü için ekstraktın elde edilme yöntemi, sıcaklık ve diğer prosesler önem taşımaktadır. Algal ekstraktları üzerine

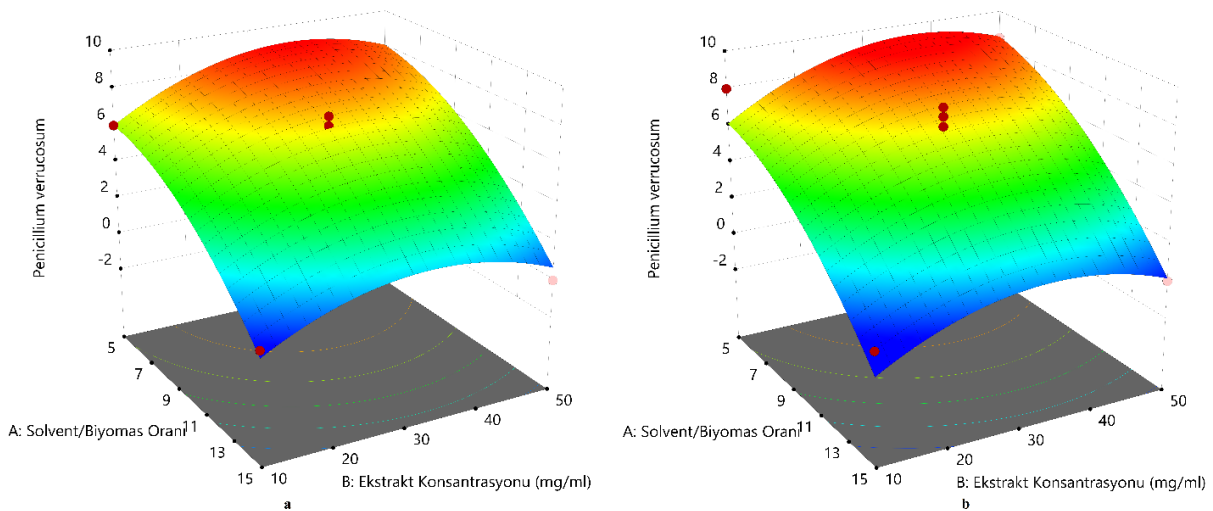
gerçekleştirilen çalışmalar solvent etkinliğinin, aynı zamanda kullanılan ekstraksiyon yöntemi ile de ilgili olduğunu ortaya koymaktadır (Keddar vd., 2020). Üç boyutlu yüzey yanıt grafiklerinde metanol ve hekzandan elde edilen sonuçların benzerliğinden de anlaşıldığı üzere (Şekil 1 ve Şekil 2), çalışmada kullanılan her iki küf türü için de solvent değişkeninin antifungal aktiviteye etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Ancak buradaki çalışma sonuçları ile uyumlu olacak şekilde Souza vd. (2011), metanol ekstraktlarının sayısal olarak daha yüksek inhibisyon zonu oluşturduğunu rapor etmiştir. Antifungal etkinliğin hem alg türlerine hem de ekstraksiyon için kullanılan solvent cinsine bağlı olduğu belirtilmektedir (Mohy El-Din ve Mohyeldin,

2018). Metanolün yüksek polaritesi sebebiyle antimikrobiyal bileşiklerin ekstraksiyonunda daha başarılı ve yüksek bir verimlilik sağladığı bildirilmiştir (Ponnanikajamdeen vd., 2014; Radhika vd., 2012).

Parametrenin etkileşim davranışını anlayabilmek için, çalışmada “solvent” faktörü sabit tutularak değişken faktörler için kuadratik polinom modele dayalı yanıt yüzey grafikleri incelenmiştir. *Spirulina* biyokütlesinden hekzan ve metanol kullanılarak elde edilen ekstraktların solvent:biyokütle oranı ve kullanılan ekstrakt konsantrasyonu faktörleri ile ilişkileri *Aspergillus flavus* için Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. *A. flavus* için hekzan (a) ve metanol (b) ekstraktlarının yüzey yanıt grafikleri



Şekil 2. *P. verrucosum* için hekzan (a) ve metanol (b) ekstraktlarının yüzey yanıt grafikleri

Solvent:biyokütle oranı arttıkça ve ekstrakt konsantrasyonu artış gösterdikçe elde edilen inhibisyon zonunda azalma gözlenmiştir. *Penicillium verrucosum* küfü için de değişken faktörler benzer etkiye sahip olmuştur (Şekil 2). Solvent:biyokütle oranının 10'un üzerine çıkmasıyla, her iki küf türü için de, elde edilen inhibisyon zonlarında ciddi bir azalma gözlenmiştir. Elde edilen verilerden farklı olarak, Al-ghanayem (2017) gerçekleştirdiği çalışmada *Aspergillus* ve *Penicillium* küflerine karşı inhibisyon etkisini incelediği *Spirulina platensis*'in ekstraksiyonunda su ve metanol kullanmış ve ekstrakt konsantrasyonunun 150 mg/mL'ye artırılması ile inhibisyon zonunun arttığını tespit etmiştir. Sonuçlardan, ekstraktların antifungal aktivitesinin patojenik ve filamentli küflere karşı etkili olduğu görülmektedir. *Spirulina platensis*'in hekzan ve metanolik ekstraktlarının *Aspergillus* spp. üzerindeki inhibitör etkileri önceki çalışmalarda da tespit edilmiştir (Kumar vd., 2011). Benzer antifungal aktivite Kaushik ve Chauhan (2008) ile Usharani vd. (2015) tarafından da belirlenmiştir. Çalışmalarda elde edilen inhibisyon değerleri birbirine yakın olmakla beraber, diğer araştırmaların aksine gerçekleştirilen denemelerde ekstrakt konsantrasyonu 30 mg/mL civarına düşürüldüğünde elde edilen inhibisyon zonu daha yüksek (9 mm) olmuştur. Aynı zamanda, ekstrakt konsantrasyonu solvent:biyokütle oranının azaldığı durumlarda artış göstermiş, ancak yine 10'un üzerindeki oranlarda ekstrakt konsantrasyonu değerlerinden bağımsız olarak inhibisyon zonları tespit edilememiştir.

Musbah vd., (2019) *Spirulina platensis* ile birlikte 5 farklı alg ekstraktında gerçekleştirdiği antifungal aktivite analizlerinde 100 mg/mL metanolik *Spirulina* ekstraktının *Candida* türlerine karşı ortalama 28,33 mm inhibisyon zonu oluşturduğunu bildirmiştir. Çalışmada elde edilen zon oluşumundan çok daha yüksek değerleri bulunmasına rağmen, antimikrobiyal aktivite için gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde ideal solventin metanol olduğu sonucuna ulaşılabilmektedir. *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Sargassum vulgare* ve *Sargassum wightii* alglerinden elde edilen metanolik (%70) ekstraktların *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* ve *Microsporum canis* küflerine karşı inhibisyon niteliğinin değerlendirildiği başka bir çalışmada da inhibisyon zon değerleri 25 mm'den yüksek tespit edilmiştir (El-Sheekh vd., 2015). Abedin ve Taha (2008) antifungal etkiyi mikroalglerin geliştirilmesi evresinden etkilendiğini ifade ederek farklı besiyeri konsantrasyonları kullandığı çalışmasında

metanolik *Spirulina platensis* ekstraktlarında 2 cm'den küçük inhibisyon zonları elde edilmiştir. Gözlemlenen zon değerlerindeki farklılıklar kullanılan ekstrakt ve solvent konsantrasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar *Spirulina* türlerinde antifungal özellik gösteren bileşiklerin polifenoller, siklik peptitler, lipopolisakaritler ve alkaloidler olduğunu ve bu yapıların küf gelişimini durdurabildiği hatta küflerin varlığını yok edebildiğini bildirmiştir. Metanolik ekstraktlarının güçlü antifungal aktivitesi ise yüksek toplam fenolik içeriği ile açıklanabilmektedir (Abdel-Moneim vd., 2022; Elshouny vd., 2021; Gheda ve Ismail, 2020, Abedin ve Taha, 2008).

4. Sonuç

Çalışma sonucunda *Spirulina platensis* mikroalgine ait biyokütleden metanol kullanılarak elde edilen ekstraktlarının *Aspergillus* ve *Penicillium* küflerine karşı etanole göre daha etkin olduğu bulunmuştur. Solvent oranının arttığı durumlarda ve kullanılan ekstraktın konsantrasyonu azaldığında inhibisyon zon oluşumunda da azalma gözlenmiştir. Metanol kullanılarak gerçekleştirilen validasyon çalışmalarında, biyokütlenin 4 katı kadar solventin kullanıldığı ve ekstraksiyon konsantrasyonunun 32 mg/mL olduğu koşullarda disk difüzyon yöntemine göre inhibisyon zonu *Aspergillus flavus* için 8,90 mm ve *Penicillium verrucosum* için ise 9,30 mm olarak tespit edilmiştir. Buna göre *Spirulina* biyokütlesinin metanolik ekstraktları biyoaktif içerikleri sebebiyle patojenik küflere karşı etkin bir koruyucu katkı maddesi olarak kullanımı mümkün olmaktadır.

Biyolojik ajanlar için kaynak arayışında "algler" önemli bir başlangıç noktası olmakla birlikte algal ekstraktlardaki biyoaktif bileşiklerin "doğal koruyucu katkı maddesi" olarak kullanımı da ilgi çekici bir alandır. Sonuç olarak, gelecekteki araştırmaların yönü biyoaktif bileşenlerin izolasyonu, saflaştırılması ve tanımlanması çalışmaları ile biyolojik beklentilerin karşılanmasına yönelik olacaktır.

5. Teşekkür

Bu çalışma, Yalova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen 2020/YL/003 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

6. Kaynaklar

- Abdel-Moneim, A.-M. E., El-Saadony, M. T., Shehata, A. M., Saad, A. M., Aldhumri, S. A., Ouda, S. M., and Mesalam, N. M. (2022). Antioxidant and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extracts and biogenic selenium nanoparticles against selected pathogenic bacteria and fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 1197-1209. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.046>
- Abedin, R. M., and Taha, H. M. (2008). Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 3(1), 22-31.
- Ak, B., Avsaroglu, E., Isik, O., Özyurt, G., Kafkas, E., and Etyemez, M. (2016). Nutritional and physicochemical characteristics of bread enriched with microalgae *Spirulina platensis*. *Int. J. Eng. Res. Appl*, 6(9).
- Al-Ghanayem, A. (2017). Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* extracts against certain pathogenic bacteria and fungi. *Advances in BioResearch*, 8, 96-101. <https://doi.org/10.15515/abr.0976-4585.8.6.96101>
- Almeida, L. M. R., da Silva Cruz, L. F., Machado, B. A. S., Nunes, I. L., Costa, J. A. V., de Souza Ferreira, E., Lemos, P. V. F., Druzian, J. I., and de Souza, C. O. (2021). Effect of the addition of *Spirulina* sp. biomass on the development and characterization of functional food. *Algal Research*, 58, 102387.
- Azma, M., Mohamed, M. S., Mohamad, R., Rahim, R. A., and Ariff, A. B. (2011). Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 53(2), 187-195.
- El-Sheekh, M. M., El-Shafay, S. M., and El-Ballat, E. M. (2015). Production and characterization of antifungal active substance from some marine and freshwater algae. *Int. J. Enviro. Sci. Engine*, 6, 85-92.
- Elshouny, W. A. E.-F., El-Sheekh, M. M., Sabae, S. Z., Khalil, M. A., and Badr, H. M. (2021). Antimicrobial Activity of *Spirulina platensis* Against Aquatic Bacterial Isolates. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021(vol. 10), 1203-1208.
- Farasat, M., Khavari-Nejad, R.-A., Nabavi, S. M. B., and Namjooyan, F. (2013). Antioxidant properties of some filamentous green algae (Chaetomorpha Genus). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56, 921-927. doi.org/10.1590/S1516-89132013000600005
- Gheda, S. F., and Ismail, G. A. (2020). Natural products from some soil cyanobacterial extracts with potent antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 92. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020190934>
- Gümüş, B., and Ünlüsayın, M. (2016). Determination of antimicrobial activity of two macro algae extracts. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 33(4), 389-395. <https://doi.org/10.12714/egejfas.2016.33.4.13>
- Hoseini, S. M., Khosravi-Darani, K., and Mozafari, M. R. (2013). Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(8), 1231-1237.
- Kaushik, P., and Chauhan, A. (2008). *In vitro* antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), 348-352. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0043-0>
- Keddar, M. N., Ballesteros-Gómez, A., Amiali, M., Siles, J. A., Zerrouki, D., Martín, M. A., and Rubio, S. (2020). Efficient extraction of hydrophilic and lipophilic antioxidants from microalgae with supramolecular solvents. *Separation and Purification Technology*, 251, 117327. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117327>
- Kumar, V., Bhatnagar, A. K., and Srivastava, J. N. (2011). Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(32), 7043-7048.
- Luz, C., Saladino, F., Luciano, F. B., Mañes, J., and 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.053>
- Martelli, F., Cirilini, M., Lazzi, C., Neviani, E., and Bernini, V. (2020). Edible seaweeds and *Spirulina* extracts for food application: *In vitro* and *in situ* evaluation of antimicrobial activity towards foodborne pathogenic bacteria. *Foods*, 9(10), 1442.
- Mohy El-Din, S. M., and Mohyeldin, M. M. (2018). Component Analysis and Antifungal Activity of the Compounds Extracted from Four Brown Seaweeds with Different Solvents at Different Seasons. *Journal of Ocean University of*

- China*, 17(5), 1178-1188. <https://doi.org/10.1007/s11802-018-3538-2>
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., José Núñez, M., and Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5)
- Musbah, H. A., Abouelkhair, W. S., Yousef, S. A. E., Moustafa, E. E., and Hasan, A. M. H. (2019). Screening of Antifungal Activities of Five Algal Crude Extracts. *Journal of Scientific Research in Science*, 36(1), 318-338. <https://doi.org/10.21608/jrsr.2019.57633>
- Pagnussatt, F. A., Kupski, L., Darley, F. T., Filoda, P. F., Ponte, É. M. D., Garda-Buffon, J., and Badiale-Furlong, E. (2013). Fusarium graminearum growth inhibition mechanism using phenolic compounds from *Spirulina* sp. *Food Science and Technology*, 33, 75-80.
- Pawlowska, A. M., Zannini, E., Coffey, A., and Arendt, E. K. (2012). Chapter 5 - "Green Preservatives": Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria. İçinde J. Henry (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (C. 66, ss. 217-238). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00005-7>
- Ponnanikajamdeen, M., Malini, M., Chelladurai, M., and Shanmugam, R. (2014). Bioactivity and Phytochemical Constituents of Marine Brown Seaweed (*Padina tetrastrum*) extract from Various Organic Solvents. *International Journal of Pharmacy & Therapeutics*, 5, 108-112.
- Radhika, D., Veerabahu, C., and 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.
- Sahin, O. I., and Ozturk, B. (2021). Microalgal biomass-a bio-based additive: Evaluation of green smoothies during storage. *International Food Research Journal*, 28(2), 309-316.
- Sarkar, S., Manna, M. S., Bhowmick, T. K., and Gayen, K. (2020). Extraction of chlorophylls and carotenoids from dry and wet biomass of isolated *Chlorella thermophila*: Optimization of process parameters and modelling by artificial neural network. *Process Biochemistry*, 96, 58-72. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.025>
- Souza, M. M. de, Prietto, L., Ribeiro, A. C., Souza, T. D. de, and Badiale-Furlong, E. (2011). Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1050-1058. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600003>
- Tantawy, S. T. (2011). Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. *Journal of food, agriculture & environment*, 9(1), 663-666.
- Usharani, G., Srinivasan, G., Sivasakthi, S., and Saranraj, P. (2015). Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* solvent extracts against pathogenic bacteria and fungi. *Advances in Biological Research*, 9(5), 292-298.
- Yilmaz, A. (2019). *Chlorella protothecoides* Mikroalg Yağının Karakterizasyonu, Biyoaktif Özellikleri ve Antifungal Etkinliği. *Akademik Gıda*, 17(2), 217-225. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.613575>