İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DENİZ ÜRÜNLERİNİN TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN SPEKTROSKOPİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elenur İMERT

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

TEMMUZ 2024

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DENİZ ÜRÜNLERİNİN TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN SPEKTROSKOPİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elenur İMERT

(509211256)

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK

Eş Danışman: Doç. Dr. Dilek ÖZYURT

TEMMUZ 2024

ISTANBUL TECHNICAL UNIVERSITY ★ GRADUATE SCHOOL

SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF SEAFOOD PRODUCTS

M.Sc. THESIS

Elenur İMERT

(509211256)

Departmant of Chemistry

Chemistry Programme

Thesis Advisor: Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK

Thesis Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Dilek ÖZYURT

JULY 2024

İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 509211256 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Elenur İMERT, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "DENİZ ÜRÜNLERİNİN TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN SPEKTROSKOPİK ANALİZİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK** .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Eş Danışman : **Doç.Dr. Dilek ÖZYURT** .....
İstanbul Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Araş. Gör. Dr. Kadriye Işıl BERKER ÇETİN** .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Gülçin YILMAZ .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Fatoş Ayça ÖZDEMİR OLGUN .....
İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi

Teslim Tarihi : 24 Mayıs 2024
Savunma Tarihi : 29 Temmuz 2024

ÖNSÖZ

Yüksek lisansım süresince, bana güler yüzlü ve içtenlikle yardımcı olan, danışmanım Sayın Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK'e

Tez sürecime başladığım ilk günden beri her konuda yanımda olan, desteğini hiçbir koşulda esirgemeyen eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Dilek ÖZYURT'a

Süreç boyunca her konuda destek sağlayan Sayın Arş.Gör. Dr. K. Işıl BERKER ÇETİN'e ve Yüksek Kimyager H. Reva BAYRAKTAR'a

Hayatım boyunca beni destekleyen, kararlarımın arkasında duran sevgili ailem Arzu İMERT, Seyhun İMERT ve Boğaçhan İMERT'e

Çalışma hayatım ve tez sürecimde beni destekleyen, süreci ilerletmemi sağlayan direktörüm Sayın Ali İbrahim AYŞAKAR'a

Tez teslim sürecimde beni destekleyen ve yardımını hiç eksik etmeyen sevgili arkadaşım Akif Yüce YÜKSEL'e

Tezimle aynı adı taşıyan TYL-2022-44138 numaralı projeme maddi destek sağlayan İTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2024

Elenur İMERT

(Kimyager)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ……ix
İÇİNDEKİLER xi
KISALTMALAR xiii
ÇİZELGE LİSTESİ xv
ŞEKİL LİSTESİ xvii
1. GİRİŞ……1
2. GENEL KISIMLAR 3
2.1 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar 3
2.2 Antioksidanların Sınıflandırılması 4
2.2.1 Endojenik Antioksidanlar 4
2.2.2 Eksojenik Antioksidanlar 5
2.3 Antioksidan Kapasite ve Tayin Yöntemleri 7
2.3.1 Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT) 8
2.3.2 Elektron transferine dayalı yöntemler 11
2.4 Fiber Optik Reflektans Spektroskopisi (FORS) ve Çalışma Prensibi 14
2.5 Algler ve Kullanım Alanları 16
2.6 FORS Cihazı ve Deniz Makroalgleri ile Yapılan Literatür Çalışmaları 17
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 19
3.1 Kullanılan Cihazlar 19
3.2 Kullanılan Kimyasal Malzemeler 19
3.3 Kullanılan Örnekler 19
3.4 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 21
3.4.1 Kullanılan antioksidan çözeltilerinin hazırlanması 21
3.4.2 pH çözeltilerinin hazırlanması 21
3.4.3 Fe(III)-Ferrozin yöntemi çözeltilerinin hazırlanması 22
3.4.4 CUPRAC yöntemi çözeltilerinin hazırlanması 22
3.4.5 Makroalg ekstraktlarının hazırlanması 22
3.5 Kullanılan Yöntemler 23
3.5.1 CUPRAC yöntemi 23
3.5.2 Ferrozin yöntemi 24
3.5.3 Fe(III)-Ferrozin (FZ) temelli FORS Yöntemi 24
4. SONUÇLAR VE BULGULAR 27
4.1 UV-VIS Spektrofotometre ile Ferrozin Yöntem Optimizasyonu 27
4.1.1 Reaktif Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 27
4.1.2 pH Etkisi 28
4.2 Fe(III)-Ferrozin (FZ) temelli FORS Yöntem Optimizasyonu 29
4.2.1 Reaktif Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 29
4.2.2 pH etkisi 31
4.2.3 Adsorpsiyon Süresi 32
4.3 Fe(III)-Ferrozin (FZ) temelli FORS Yöntemi ile Antioksidanların Analizi 33

4.4 Geliştirilen FORS Yönteminin Tekrarlanabilirliği Ve Geri Kazanımın Belirlenmesi 37
4.5 Fiber Optik Reflektometrik Sensörünün Makroalg Örneklerine Uygulanması 37
5. TARTIŞMA 39
KAYNAKLAR 41
6. ÖZGEÇMİŞ 47

KISALTMALAR

AA : Askorbik Asit
AO : Antioksidan
ABTS : 2,2'- azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonat)
ABTS+ : ABTS Radikal Katyonu
ABTS/TEAC : Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
CAT : Kateşin
CERAC : Seryum (IV) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite
CFA : Kafeik asit
CUPRAC : Bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite
Cys : Sistein
DPPH : 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ET : Elektron transferi
FCR : Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP : Demir(III) iyonu indirgetici antioksidan gücü
GA : Gallik asit
GSH : Glutatyon (indirgenmiş hali)
HAT : Hidrojen atomu transferi
LOD : Gözlenebilme sınırı (Limit of detection)
LOQ : Tayin Sınırı (Limit of quantitation)
ORAC : Oksijen radikal absorbans kapasitesi
QR : Kuersetin
TAC : Toplam antioksidan kapasite
TEAC : Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi
TR : Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetra methilkhroman-2-karboksilik asit)
TRAP : Toplam peroksil radikal tutma antoksidan parametresi

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Endojenik Antioksidanlar **5**
Çizelge 2.2 : Eksojenik antioksidanlar ve Örnekleri **6**
Çizelge 3.1 : İstasyonlara Göre Tespit Edilen Makroalg Genuslar ve Ait Oldukları Gruplar **21**
Çizelge 4.1 : Fiber Optik Yansıma Spektroskopisine (FORS)* göre Antioksidan Bileşenlerin Doğrusal Kalibrasyon Denklemleri, Doğrusal Konsantrasyon Aralıkları, Tespit Sınırı (LOD), Miktar Tayini Sınırı (LOQ) ve Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) Katsayıları **35**
Çizelge 4.2 : Fiber Optik Yansıma Spektroskopisine (FORS)* göre Antioksidan Bileşenlerin TEAC değerlerinin Spektrofotmetrik Fe(III)-Ferrozin , Fe(III)-Ferrozin ve CUPRAC metodu sonuçları ile karşılaştırılması. **36**
Çizelge 4.3 : Fiber Optik Refraktans Spektroskopisi (FORS) tabanlı Ferrik-Ferrozin Testinin hassasiyeti ve geri kazanımı. **37**
Çizelge 4.4 : Makroalg örneklerinde Fe(III)-Ferrozin (FZ) temelli FORS Yöntemi, Ferrozin yöntemi ve CUPRAC yöntem sonuçlarının karşılaştırılması. **38**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Antioksidanların sınıflandırılması **4**
Şekil 2.2: ORAC yönteminin şematik gösterimi.. .....**10**
Şekil 2.3:ABTS ile persülfat reaksiyonu sonucunda oluşan ABTS radikalinin antioksidan bileşik ile etkileşimi. **11**
Şekil 2.4: DPPH radikalinin antioksidan ile etki mekanizması **12**
Şekil 2.5: Bakır(II)-neokuproinin antioksidan ile reaksiyonu sonucu Bakır(I)-neokuproine dönüşmesi.....**13**
Şekil 2.6: Fe(III)-Ferrozin yöntemi şeması **14**
Şekil 2.7: Fiber Optik Reflektans Spektorofotometre cihazı.....**15**
Şekil 3.1: Örnekleme istasyonları **20**
Şekil 3.2: Makrolag örneklerinin toplanması, laboratuvar ortamında temizlenmesi ve türlerine göre ayrılması.....**20**
Şekil 3.3: Sarıyer ve Florya sahil kıyısında tespit edilen baskın makroalg türleri **20**
Şekil 4.1: $4.0x10^{-5}$ M – $8,0x10^{-4}$ M arasında değişen Fe(III) çözeltilerinin konsantrasyonun optimizasyonu.....**27**
Şekil 4.2: $2.0x10^{-5}$ M – $3,2x10^{-4}$ M arasında değişen ferrozin çözeltilerinin konsantrasyonun optimizasyonu.....**28**
Şekil 4.3: Maksimum absorbansın elde edildiği reaksiyon koşullarına pH etkisi.**29**
Şekil 4.4: $4.0x10^{-5}$ M – $6,4x10^{-4}$ M arasında değişen Fe(III) çözeltilerinin konsantrasyonun optimizasyonu.....**30**
Şekil 4.5: $4.0x10^{-5}$ M – $3,2x10^{-4}$ M arasında değişen ferrozin çözeltilerinin konsantrasyonun optimizasyonu.....**31**
Şekil 4.6: Maksimum yansımanın sağlandığı reaksiyon koşullarına pH etkisi **31**
Şekil 4.7: Fe(II)-Ferrozin kompleksinin reçine ile adsorpsiyon süresine bağlı olarak maksimum absorbansındaki değişim.....**32**
Şekil 4.8: Fe(II)-Ferrozin kompleksinin reçine ile adsorpsiyon süresine bağlı olarak maksimum yansımasındaki değişim.....**33**
Şekil 4.9: FORS cihazı, örnek kabı ve spekturum.....**33**
Şekil 4.10: Troloks çözeltisinin reflektans spekturumu **34**

DENİZ ÜRÜNLERİNİN TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN SPEKTROSKOPİK ANALİZİ

ÖZET

Antioksidanlar, hücrelerde oksidatif strese neden olan serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltan veya tamamen engelleyen maddelerdir. Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında doğal olarak oluşan veya çevresel faktörler (örneğin, kirlilik, sigara dumanı, radyasyon) sonucu vücuda giren kararsız moleküllerdir. Bu moleküller, diğer hücre bileşenleriyle (DNA, proteinler, lipitler) reaksiyona girerek hücre hasarına, yaşlanmaya ve çeşitli hastalıklara yol açabilirler. Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek veya onların etkisini nötralize ederek serbest radikallerin kimyasal yapılarını kararlı hale getirir.

Antioksidan tayini, sağlık, gıda, farmasötik ve çevresel bilimler gibi birçok alanda kritik öneme sahiptir. Bu tayinler, hastalıkların önlenmesi ve tedavisinden, gıda kalitesinin artırılmasına, çevre koruma çalışmalarından kozmetik ürün geliştirilmesine kadar geniş bir yelpazede uygulanır. Bu nedenle, antioksidan kapasitenin doğru ve güvenilir bir şekilde belirlenmesi, hem bilimsel araştırmalar hem de endüstriyel uygulamalar açısından büyük değer taşır.

Toplam antioksidan kapasitenin (TAC) doğrudan analiz etme yöntemlerinin geliştirilmesi, günümüzdeki araştırmalarda büyük önem taşımaktadır. TAC, karmaşık bir örnekte bulunan tüm antioksidanların toplam kapasitesini temsil eden bir birleşik parametredir.

Bu çalışmanın amacı, antioksidan açısından zengin olduğu bilinen makroalglerin toplam antioksidan kapasitelerinin tayin edilmesi için basit, hızlı, ucuz, ön deriştirme işlemleri gerektirmeden fiber optik reflektans spektrofotometre (FORS) cihazı ve kullanılarak yeni bir yöntem geliştirilmesidir.

Bu çalışmanın Fe(III)-FZ kompleksinin antioksidan bileşikleri ile reaksiyona girdiği ideal deney koşullarının belirlenmesi ve belirlenen bu koşullarda bir Fe(III)-FZ yönteminin geliştirilmesidir. İkinci hedef ise gıdaların TAC'lerini belirlemek için spektrofotometrik yöntemlere kıyasla daha hızlı ve daha basit bir yöntem olan reflektometrik yeni bir yöntem geliştirmektir.

562 nm'de maksimum absorbans veren mor/magenta renkli demir(II)-ferrozine (Fe(II)-FZ) kompleksi, genellikle demir bağlama kapasitesinin belirlenmesinde kullanılmasına rağmen, antioksidan tayin yöntemi olarak kullanılmamıştır. Ferrozin, demirin düşük oksidasyon basamağını son derece kararlı hale getirir ve bu özellik, demir(III) iyonlarının ferrozin varlığında antioksidanları kolayca okside etmesine ve kendisinin yüksek molar absorptiviteye sahip Fe(II)-FZ'ye indirgenmesine neden olur. Bu sayede birçok antioksidanın daha hassas bir şekilde tayin edilmesi mümkün hale

gelir. Geliştirilen yöntemde antioksidan çözeltileri ile hazırlanan Fe(III)-Ferrozin reaktifi bir reçine üzerine immobilize edilmiş ve renkli Fe(II)-Ferrozin oluşumuyla ilişkili yansıma değişimi 562 nm'de ölçülmüştür.

Sonuçlar, CUPRAC (Cu(II) İndirgenme Antioksidan Kapasitesi) ve Fe (III)-FZ yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Yöntem makroalg ekstraktlarına uygulanarak, troloks eşdeğeri cinsinden toplam antioksidan kapasite değeri hesaplanmıştır.

Yöntem sonucunda Fe(III)-FZ yöntemi ile antioksidan kapasitesi ölçülemeyen Fisetin, Glutatyon, Morin ve α-tokoferol gibi antioksidanların toplam antioksidan kapasitesinin ölçüldüğü görülmüştür.

SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF SEAFOOD PRODUCTS

SUMMARY

Oxygenated respiration is the breakdown of food molecules in the presence of oxygen to obtain energy. Humans, animals, bacteria and fungi with high energy needs perform oxygenated respiration. The chemical reaction seen in living organisms that respire with oxygen is called oxidation. Radicals with one or more unpaired electrons formed as a result of oxidation are called free radicals. Antioxidants are substances that reduce or completely neutralize the harmful effects of free radicals, which cause oxidative stress in cells. Free radicals are unstable molecules that are naturally formed during cell metabolism or enter the body as a result of environmental factors (e.g., pollution, cigarette smoke, radiation). These molecules react with other cell components (DNA, proteins, lipids) causing cell damage, aging, and various diseases. Antioxidants react with free radicals or neutralize their effects by stabilizing their chemical structures.

The determination of antioxidants is of critical importance in many fields such as health, food, pharmaceutical, and environmental sciences. These determinations are applied in a wide range of areas, from disease prevention and treatment to improving food quality, environmental protection, and the development of cosmetic products. Therefore, the accurate and reliable determination of antioxidant capacity holds significant value both for scientific research and industrial applications.

Antioxidant capacity is the amount of substances that protect a cell or body from free radicals. It is possible to use various biochemical and chemical assays to determine total antioxidant capacity. These methods may vary according to the purpose of the analysis and the conditions of the study. Total Antioxidant Capacity indicates the capacity of each antioxidant in a complex sample. It is divided into two groups as hydrogen atom transfer (HAT) and electron transfer (ET) total antioxidant capacity methods. Oxygen Radical Absorbance Capacity Method is based on hydrogen atom transfer and CUPRAC method is based on electron transfer. The ABTS-TEAC method is a method based on both bases. The development of methods for the direct analysis of total antioxidant capacity (TAC) is of great importance in current research. TAC is an integrated parameter that represents the total capacity of all antioxidants present in a complex sample.

The Fe(III)-ferrozine method is based on the formation of a complex of Fe(III) with ferrozine and the reduction of this complex to Fe(II)-ferrozine complex by reaction with antioxidants and measurement of the absorbance of the complex at 562 nm. In 2010, Işıl Berker Çetin et al. Iron(III)-ferrozine method was applied to herbal teas. In 2017, Işıl Berker Çetin et al. absorbed samples with low antioxidant value on resin to measure their antioxidant capacity and the method was developed.

Algae are the primary producers of aquatic ecosystems and make up 10% of the plant kingdom. They are known as eukaryotic or prokaryotic plant organisms. Microalgae

and macroalgae are two types of algae. Macroalgae are ecologically, biologically and economically beneficial. Ecologically, they provide nutrition, reproduction and shelter for other living things, while economically they provide many benefits in human life, such as waste treatment, use as animal feed and fertilizer, and use as food. Macroalgae can be divided into three categories. There are red, green and brown algae. The antioxidant activity of marine macroalgae is a result of pigments such as chlorophyll and ß-carotene, as well as vitamins such as niacin, α-tocopherol and phenol compounds.

Fiber optic reflectance spectroscopy involves performing analysis using a spectrophotometer, optical fibers and light. With the help of optical fibers, light is transmitted from the instrument to the target and from the target to the instrument. On-site measurements are possible without the need for sampling. FORS provides useful information for the identification of pigments in works of art and for the analysis of color and its variations in paintings.

Fiber optic reflectance spectrophotometers are used to measure light intensity in the visible, near infrared and infrared regions. It is a simple, portable and low-cost device used in many fields, from the causes of discoloration of plastics to the study of tissue biochemistry, from cancer identification to the identification of textile fibers. The instrument consists of a halogen lamp as light source, a micrometer, a reflection probe and a detector. A specially designed sample measuring apparatus was used in the study to ensure that the sample quantity was the same for each measurement.

The aim of this study is to develop a new method by combining Fe(III)-Ferrozine method, which is one of the antioxidant capacity determination methods, with Fiber Optic Reflectance Spectroscopy method, which is useful in measuring low antioxidant capacity values as shown by the studies and to apply this method on macroalgae. This method should be simple, fast, and cost-effective.

Within the scope of this study, first, the optimal experimental conditions under which the Fe(III)-FZ complex reacts exclusively with antioxidant compounds were determined, and under these conditions, the Fe(III)-Ferrozin method was developed. Secondly, a new reflectometric method was developed as a rapid and simple alternative to spectrophotometric methods for determining the TACs of foods.

The magenta-colored iron(II)-ferrozine (Fe(II)-FZ) complex, which shows maximum absorbance at 562 nm, is commonly used to determine iron binding capacity but has not been used as an antioxidant assay method. Ferrozin stabilizes the lower oxidation state of iron so well that iron(III) ions in the presence of ferrozin readily oxidize antioxidants and reduce themselves to Fe(II)-FZ with high molar absorptivity. This allows for a more sensitive determination of many antioxidants. In the developed method, Fe(III)-Ferrozin reagent prepared with antioxidant solutions was immobilized on a resin, and the reflectance change associated with the formation of the colored Fe(II)-Ferrozin was measured at 562 nm.

The method was applied to macroalgae extracts, and the total antioxidant capacity value was calculated in terms of trolox equivalents and compared with the results from CUPRAC (Cu(II) Reducing Antioxidant Capacity) and Fe(III)-FZ methods.

As a result of the method, it was observed that the total antioxidant capacity of antioxidants such as fisetin, glutathione, morin, and α-tocopherol, which could not be measured with the Fe(III)-FZ method, was determined.

In our study, iron(III)ferrozine reagent was attached to a resin and the reflectance change of the colored iron(II)ferrozine complex formed by the reaction with antioxidants was measured at 562 nm. The developed method appears to be simple, rapid and applicable for the determination of antioxidant capacity in standard antioxidant compounds and macroalgae samples.

When TEAC coefficients of standard antioxidants were calculated, quercetin was found to have the highest capacity.

The antioxidant capacity in macroalgae samples was tested with spectrophotometric Fe(III)-Ferrozine and the accuracy of our method was proven as a result of the close results.

In addition, it was observed that some antioxidants whose antioxidant capacity could not be measured by Fe(III)-Ferrozine method could be measured by the method we developed.

1. GİRİŞ

Günümüzde sağlığın korunması ve yaşam kalitesinin artırılması, beslenme alışkanlıklarının önemli bir parçası olarak öne çıkmaktadır. Besin maddelerinin içerdikleri biyoaktif bileşenler aracılığıyla insan sağlığı üzerindeki etkileri, giderek artan bir ilgi konusu haline gelmiştir. Antioksidanlar bu konuda önemli bir role sahiptir.

Oksijenli solunum yapan canlılarda görülen yavaş yanma olarak da adlandırılan kimyasal reaksiyon oksidasyon olarak bilinir. Oksidasyon sonucu oluşan serbest radikallerin insan vücuduna yaşlanma, kanser veya siroz gibi etkileri bulunmaktadır. Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük derişimde bile substratın reaksiyonunu önemli ölçüde engelleyerek hastalıkları önler. (Halliwell, 1999).

2012 yılında yapılan bir çalışmada yumurtacı tavukların diyetlerinde kullanılan antioksidan besinler ile yumurta kabuklarının kırılma dirençlerinin yükseldiğini ve hasarlı yumurta miktarının azaldığını gözlemlenmiştir Sonuç olarak, antioksidanların sadece insan vücudunda değil, hayvanlarda ve hayvansal besinlerde de etkili olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. (Kaya vd., 2012).

Antioksidanların karmaşık kimyasal yapıya sahip olmaları nedeniyle miktar tayinleri zordur. Bu nedenle toplam antioksidan kapasitenin doğrudan tayin edilebildiği yöntemler günümüzde birçok çalışmaya konu olmuştur. Karmaşık bir örnekteki her antioksidanın antioksidan kapasitesi, TAC olarak bilinen bir parametreyle gösterilir. Her bir bileşenin antioksidan gücünü ölçmez (MacDonald vd,, 2006). Toplam antioksidan kapasiteyi (reaksiyon termodinamiğine veya dönüşüm verimliliğine dayalı) veya antioksidan aktiviteyi (reaksiyon kinetiğine dayalı) belirlemek için çok sayıda analiz yöntemi vardır (Huang vd., 2005). Toplam antioksidan kapasite yöntemleri reaksiyon mekanizmalarına göre hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT) ve elektron transferine dayanan reaksiyonlar (ET) ve ET/HAT temelli olmak üzere üç gruba ayrılır.

Makroalgler, su ekosisteminde önemli bir yeri bulunan çok hücreli ökaryotik canlılardır. Fotosentez yaparak karbondioksit ve inorganik maddeleri organik maddeye çevirmesi ile su altı dünyasında diğer canlıların beslenmesine yardımcı olurlar. Bu sayede sucul ortamda besin dengesi ve çözünmüş oksijen oranını arttırarak besin zincirinin ilk basamağını oluştururlar (Özvarol, Y., 2009.). Makroalgler; gıda, kimya ve kozmetikte kullanılırlar ve biyolojik indikatör olarak kirlilik tespitinde ve su ortamında besin kaynağı olarak önemli bir yer alırlar (Cheon-Xın vd., 2006; Piazzi vd., 2002). Deniz makroalglerinin antioksidan aktivitesi, oksidasyonun baskılanmasına ya da engellenmesine direkt ya da dolaylı olarak katkıda bulunan klorofil ve ß-karoten gibi pigmentlerden, α-tokoferol, tiamin ve askorbik asit gibi vitaminlerden, polifenolik ve flavonoidler gibi fenol bileşenlerinden, fosfolipidler, peptidler ve diğer antioksidatif bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Deniz alglerinin antioksidan özellikleri, fenollerden kaynaklanmaktadır (Duan vd., 2006).

Bu çalışmanın amacı Marmara denizinde mevcut makroalglerin toplam antioksidan kapasitelerinin tayin edilmesi için basit, hızlı, ucuz, ön deriştirme işlemleri gerektirmeden fiber optik reflektans spektrofotometre (FORS) cihazı kullanılarak yeni bir yöntem geliştirilmesidir. Geliştirilen optik sensör ile antioksidan içeriği düşük bitkilerin ön deriştirme işlemlerine gerek olmadan reçine üzerinde toplanan renkli çözeltinin doğrudan renginin spektrofotometre ile ölçümü temeline ve fiber optik reflektans spektrofotometre cihazı ölçümüne dayanan yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

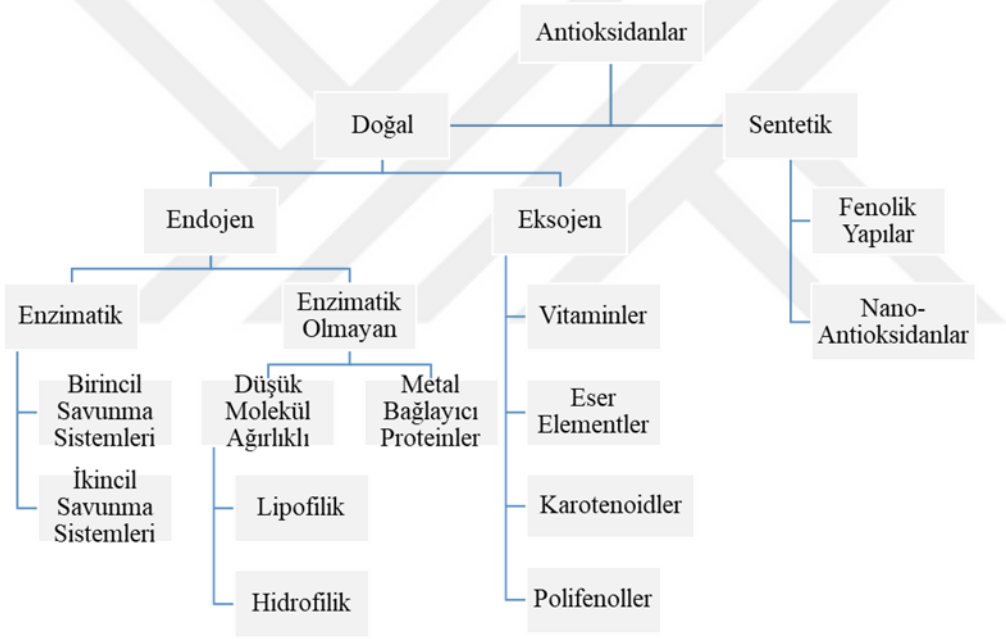
Dış yörüngelerinde bir ve birden daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip moleküller "Serbest radikaller" olarak tanımlanır. Bu radikaller genellikle kararsız, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü ve çok reaktiftirler (Ivanisova vd., 2013). Serbest radikaller elektriksel olarak nötral, pozitif yüklü (katyon) veya negatif yüklü (anyon) olabilirler (Thomas MJ., 1995).

Serbest radikaller, hücresel metabolizma süreçlerinin bir yan ürünü olarak oluşurlar. Normalde vücudun savunma sistemleri tarafından kontrol altında tutulurken, aşırı üretilmeleri veya vücutta birikmeleri durumunda hücrelere zarar verebilirler. Serbest radikallerin organizmada fazla üretimi oksidatif strese neden olabilir. (Ivanisova vd., 2013) Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere antioksidan denir. Oksidatif stres ise DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıları oksidatif hasara uğratır (Elliot, 1999). Antioksidanlar, radikallerle çok hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon ve peroksidasyonun gelişmesini önler (Dündar vd., 1999). Antioksidanlar, serbest radikallerin gereğinden fazla oluşumunu azaltmak, hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden korumak ve hastalıkları önlemede yardımcı olmak gibi görevleri yerine getirir (Pham-Huy vd., 2008).

Antioksidanlar, genellikle vitaminler (örneğin C vitamini ve E vitamini), mineraller (örneğin selenyum), fenolik bileşikler (örneğin flavonoidler ve polifenoller), karotenoidler (örneğin beta-karoten), bazı enzimler ve gıdalarda doğal olarak bulunurlar (Hallivel vd.,1991).

2.2 Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar elektron verebilecek kadar kararlı moleküllerdir ve böylece serbest radikalleri nötralize ederek hasar verme kapasitelerini azaltırlar (Halliwell B., 1995). Antioksidanlar genellikle enzimatik ve nonenzimatik olarak sınıflandırılır. Bunlar arasında, farklı etki şekillerine ve yerlerine ve farklı nihai etkilere sahip çeşitli bileşikler vardır. Antioksidanları doğal ve sentetik antioksidanlar olarak iki grup altında toplayabiliriz (Şekil 2.1). Doğal antioksidanlar endojen ve eksojen antioksidanlar olarak iki gruba ayrılır. Enzimatik antioksidanlara Süperoksit dismutaz (SOD), Glutation peroksidaz (GPx), Katalaz (CAT) ve Glutatyon redüktaz (GR) örnek gösterilebilirken, enzimatik olmayan antioksidanlara mineraller, Karotenoidler, Vitaminler, Polifenoller örnek gösterilebilir (Sies H., 1997).



Şekil 2.1 : Antioksidanların sınıflandırılması.

2.2.1 Endojenik Antioksidanlar

Serbest radikallerin aşırı üretimini dengelemek için canlı metabolizmasında mevcut moleküllerdir (Çizelge 2.1).

Süperoksit Dismutaz

Endojen olarak üretilen ve organizmayı oluşturan hücrelerin her biri için oldukça önemli bir enzimdir. Biyolojik sistemlerdeki süperoksit anyonunu (O_2•–) hidrojen peroksit(H_2O_2) ve oksijenin(O_2) dismutazyonunu katalizleyerek süperoksit iyonunun toksik etkilerinden hücreleri koruduğu bilinmektedir (Köse, 2012).

Çizelge 2.1 : Endojenik antioksidanlar.

Endojenik Antioksidanlar	Örnekler
Enzimler	Süperoksit dismutaz, Katalaz, Peroksiredoksinler
GSH enzim bağlantılı sistemler	Glutatyon peroksidaz, Glutatyon S-transferaz
Enzim olmayanlar	Glutatyon, Sistein, Tiredoksin
Metal Bağlayıcı Proteinler	Ferritin,Metalotiyonin, Seruloplazmin

Glutatyon

Bir enzim olmayan hücre içi redoks homeostaz düzenleyicisi γglutamil sisteinil glisin veya GSH, tüm hücre tiplerinde milimolar konsantrasyonlarda bulunur (Meister vd., 1983). Bu sistein içeren tripeptit aynı zamanda glutatyon disülfit olarak da bilinir ve indirgenmiş (GSH) ve oksitlenmiş (GSSG) formlarda bulunur (Kalyanaraman vd., 1996). Glutatyon, serbest radikalleri doğrudan absorbe etme veya hidrojen peroksitin detoksifikasyonu sırasında bir substrat olarak hizmet etme yeteneğine sahiptir (Aw, 2003).

2.2.2 Eksojenik Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar, gıda, meyve, sebze, bitki, makro ve mikroalglerde mevcut doğal bileşiklerdir (Halliwell, 1999) (Çizelge 2.2). Diyetle alınan antioksidanlar, antioksidan sistemimizi güçlendirmek ve fazla oksijen metabolitlerini uzaklaştırmak için önemlidir. Antioksidasyon, oksidasyon, eksojen ve endojen antioksidanlar arasındaki dengeyi korumak için etkileşimli ve genellikle sinerjik bir şekilde birlikte çalışırlar (Valko vd., 2007).

Çizelge 2.2 : Eksojenik antioksidanlar ve örnekleri.

Eksojen Antioksidanlar	
Vitamin C	Askorbat/Askorbik Asit
Vitamin E	Tokofenoller,Tokotrienoller
Karotenoidler	α-karoten, β-karoten, likopen
Polifenoller	Flavanoller, Antosiyaninler, İsoflavinler, Fenolik Asit
Eser Elementler	Selenyum, Bakır, Mangan, Çinko

C vitamini (Askorbik Asit)

Askorbik asit diğer adıyla C Vitamini organizmanın en çok gereksinim duyduğu, suda çözünebilen altı karbonlu lakton yapısına sahip bir antioksidandır. Çilek, kivi ve narenciyeler ile domates, karnabahar gibi sebzelerde bol miktarda bulunmaktadır (Wheeler vd., 1998; Cadenas vd., 2002).

C vitamini, diğer substratları oksidatif hasardan korur çünkü reaktif oksijen (singlet oksijen, superoksit, peroksil radikalleri, ozon) ve azot (peroksinitrit, azot dioksit) ve klor (hipoklorik asit) türlerini kolayca süpürür (Keskin vd., 1987).

E Vitamini

E vitamini sekiz stereoizomeri bulunan, antioksidan özelliği yüksek, yağda çözünen bir vitamindir. Plazmada en çok bulunan formu ise α-tokoferoldür (Pham-Huy, 2008).

E vitamini vücudun büyümesini, üremesini ve doku bütünlüğünü korumasını sağlar (Baldi, 2005). E vitamini, zararlı lipit serbest radikallerini azaltarak dokuları serbest radikallerden korur (Chew, 1996).

Ispanak, marul gibi yeşil sebzeler, tahıllar, Ayçiçek yağı ve patates yüksek e vitamini içeren gıdalardandır. Günlük E vitamini ihtiyacı, bebeklerde 5–6 mg arası, 4–11 yaş arasındaki çocuklarda 7 mg ve 12 yaşından büyükler kişilerde ise 8-10 mg arasındadır (Gültekin, 2022).

A Vitamini (Karotenoidler)

Yüksek derecede doymamış izoprenidler karotenidlerdir. Konjuge yapıya sahip çift bağların renkleri güçlüdür. Beta karoten, A vitaminin öncül maddesidir ve açık sarı veya turuncu bir renktedir. Bağırsak epitel hücrelerinde beta karoten A vitamini olarak dönüştürülür. Ardından karaciğerde palmitat esteri olarak depolanır. Havuç ve yeşil

yapraklı bitkilerin çoğu, kimyasal olarak karotenoidler ve terpenoidler içerisinde bulunan beta karoten içerir (Telefoncu, 1995; Goodwin, 1980; Miura vd., 1998).

Flavonoidler

Flavonoidlerin büyük çoğunluğu; üç fenolik halka ile birlikte hidroksil ile metil grubuna göre farklılaşan 2-fenilkromonun türevleridir. Kimyasal yapıları iskelet yapısında olup flavon çekirdeği, bir piran halkası ile bağlanmış iki aromatik halkadan oluşur (Madhavi vd., 1995; Shahidi vd., 1997)

Doğal olarak ortaya çıkan flavonoidler, kimyasal yapılarına göre altı farklı sınıfa ayrılabilirler. Bu yapılar Şekil 1.8' de gösterildiği gibi flavanon, flavonlar, izoflavonoidler, flavonoller, flavanlar (flavanoller) ve antosiyaninler olarak sınıflandırılırlar (Peterson vd., 1998).

Fenolik Asitler

Bitkilerde yaygın olarak bulunan hidroksi-sinnamik ve hidroksi benzoik asitler, fenolik asitler olarak bilinir. P-kumarik asit, klorojenik asit, kafeik asit ve ferulik asit hidroksi-sinnamik asitler olarak bilinir. Yapılarındaki -CH=CH-COOH grupları nedeniyle daha fazla hidrojen atomu verebilirler. Resorcilik asit, vanilik asit, şiringik asit ve gallik asit hidroksi-benzoik asitler olarak bilinir (Heim vd., 2002).

2.3 Antioksidan Kapasite ve Tayin Yöntemleri

Antioksidan kapasite, vücutta veya bir materyalde oksidatif stresin neden olduğu serbest radikallerin etkilerine karşı koruma sağlayan maddelerin miktarını veya yeteneğini ifade eder. Oksidatif stres, serbest radikallerin normal hücresel işlevleri bozarak zarar verdiği bir süreçtir. Serbest radikaller, oksidasyon (oksijenle reaksiyona girmeleri) sonucu oluşan reaktif moleküllerdir ve hücre zararına yol açabilirler. Antioksidanlar, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek veya onları dengeleyerek hücresel hasarı azaltabilirler.

Antioksidan kapasitenin tayini, bir materyalin veya besinin ne kadar oksidatif stresi azaltabileceğini veya engelleyebileceğini anlamamıza yardımcı olur. Bu nedenle, antioksidan kapasitesini değerlendirmek, sağlıkla ilgili araştırmalarda, gıda endüstrisinde ve beslenme planlarının oluşturulmasında önemli bir rol oynar. Ayrıca,

antioksidan kapasite üzerine yapılan araştırmalar, insanların sağlıklı yaşam tarzlarını benimsemelerine yardımcı olabilir.

Toplam antioksidan kapasite ölçme yöntemleri, çeşitli biyokimyasal ve kimyasal analizlerle yapılabilir ve araştırma amacına, materyale ve laboratuvar koşullarına bağlı olarak farklılık gösterebilir. Antioksidanların karmaşık etki mekanizmaları nedeniyle antioksidatif potansiyelinin belirlenmesi zordur. Bazı antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin oluşumunu önleyerek bazıları ise serbest oksijen oluşumunu engelleyerek etki ederler. Bu nedenle antioksidan kapasiteyi ölçmek için doğrudan metodlar bulunmamaktadır (Poljsak B., 2010; Argüelles vd., 2007).

Ayrıca antioksidanların kimyasal yapılarının farklı olması, miktarlarının tayinini zorlaştırmaktadır. Karmaşık bir örnekteki her antioksidanın antioksidan kapasitesi, TAC olarak bilinen bir parametreyle gösterilir. Her bir bileşenin antioksidan gücünü ölçmez (MacDonald vd., 2006).

Toplam antioksidan kapasiteyi (reaksiyon termodinamiğine veya dönüşüm verimliliğine dayalı) veya antioksidan aktiviteyi (reaksiyon kinetiğine dayalı) belirlemek için çok sayıda analiz yöntemi vardır (Huang vd., 2005).

Antioksidan kapasite ve antioksidan aktivite birbiriyle karıştırılan terimlerdir.

Antioksidan aktivite, bir antioksidan ve bir oksidan arasındaki reaksiyonun ne kadar hızlı olduğunu ifade eder. Antioksidan kapasite, serbest radikallerin süpürülmesi gibi belirli bir miktarı ölçer. TAC ölçümleri, örnek içerisindeki heterojen antioksidan karışımlarının serbest radikalleri temizleme kapasitesini ölçer. Literatürdeki antioksidan kapasite yöntemlerinde kullanılan çeşitli oksidan bileşikler ve farklı ideal koşullar nedeniyle aynı örnek için farklı antioksidan kapasite değerleri elde edilmektedir (Ghiselli vd., 2000). TAC yöntemleri, hidrojen atom transferine (HAT) ve elektron transferine (ET) dayalı olarak iki ana kimyasal reaksiyon kategorisine ayrılır (Huang vd., 2005; MacDonald vd., 2006; Prior vd., 2005).

2.3.1 Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT)

HAT mekanizması, yarışmalı reaksiyon kinetiğini izler ve kantitasyon kinetik eğrilerini kullanır. HAT'a dayanan metotlar genellikle bir antioksidan bileşik, yükseltgenebilir moleküler prob ve sentetik bir radikal üreticiden oluşur. TRAP gibi HAT temelli tekniklerde ORAC, peroksil radikali (ROO) üretmek için bir radikal

başlatıcı kullanır. Ek antioksidan radikaller için ortamdaki substratla rekabet eder. ROO— öncelikli olarak bir antioksidandan hidrojen atomu alır. ROO· ve hedef molekül arasındaki reaksiyon bu nedenle durdurulur veya gecikir (Huang vd., 2001).

Antioksidanların radikal zincir kırma kapasitesi, oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) deneyi ile ölçülür. Bu deney, peroksil radikallerin oksidasyonu durdurmasını izleyerek yürütülür. Peroksil radikalleri, fizyolojik koşullar altında gıdalarda ve biyolojik sistemlerde lipid oksidasyonunda bulunan baskın serbest radikallerdir. Bu nedenle, ORAC değerleri bazıları tarafından antioksidan etkinliği için bir referans olarak biyolojik uygunluk olarak kabul edilir.

Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC)

ORAC yöntemi tayin edilmek istenen antioksidan bileşiğinin serbest radikaller bulunan bir ortama aktarılması sonucu ortamda bulunan serbest radikallerin azalmasına dayanır.

Bu yöntem, peroksil radikali floresans özelliklerine sahip bir moleküle (prob) reaksiyona girerek floresans olmayan bir ürün üretir (Şekil 2.2).

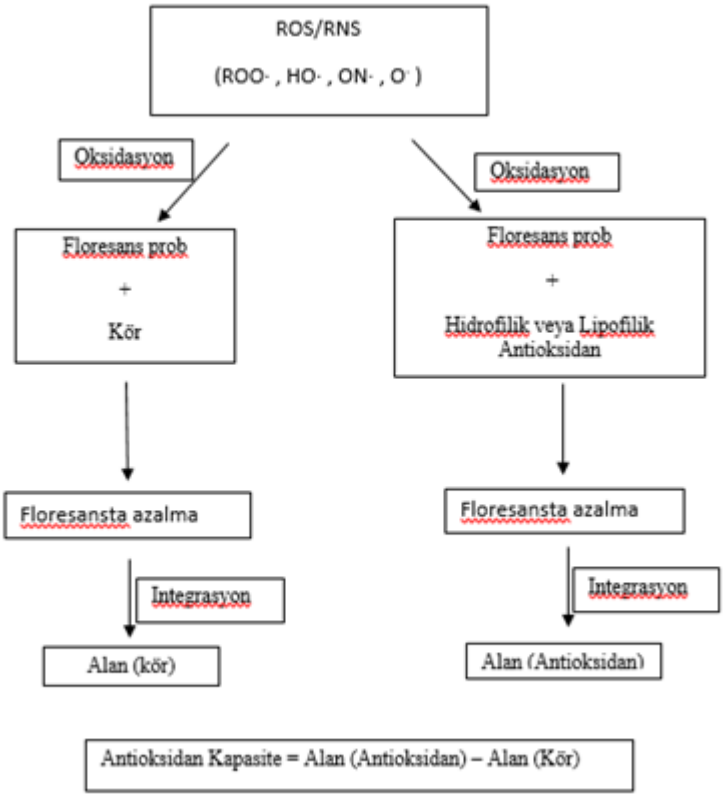
$$\text{“R-N=N-R} \rightarrow N_2 + 2\text{ROO•”} \qquad (2.1.)$$

“ROO• + prob (Floresan madde) → ROOH + okside olmuş prob” (floresansta azalma)

“ROO• + AH→ ROOH + A• ROO• + A• → ROOA”

“AH: H donor (serbest radikalleri hidrojen vererek gideren antioksidan)”

Eğri altında kalan net alan, antioksidan miktarını hesaplamak için kullanılır. ORAC değerleri için troloks eşdeğerleri kullanılır ve farklı derişimlerde kalibrasyon eğrisi elde edilir (Huang vd., 2002; Cao vd.,1999).



Şekil 2.2 : ORAC yönteminin şematik gösterimi.

Toplam radikal yakalayıcısı parametre yöntemi (TRAP)

Toplam radikal yakalayıcısı parametre yöntemi (TRAP) serum ve plazmalarda antioksidan kapasitesi ölçümünde kullanılmaktadır. TRAP analizinde 2,2'- azobis (2-aminopropan) diklorit (APPH)'den peroksi radikali üretilir. Oksidasyon süreci reaksiyondaki oksijen miktarının azalması ile ölçülebilir.

Başlatma (İndüksiyon) süresince, oksidasyon plazmadaki antioksidanlar tarafından yavaşlatılır. Başlama periyodunun uzunluğu (duraklama fazı) Trolox (6-hidroksil-, 5, 7,8,tetramethilikroman-2-karboksilik asit) ile karşılaştırılarak plazmadaki antioksidan kapasiteyle miktarsal olarak ilişkilidir (Ali vd., 2008).

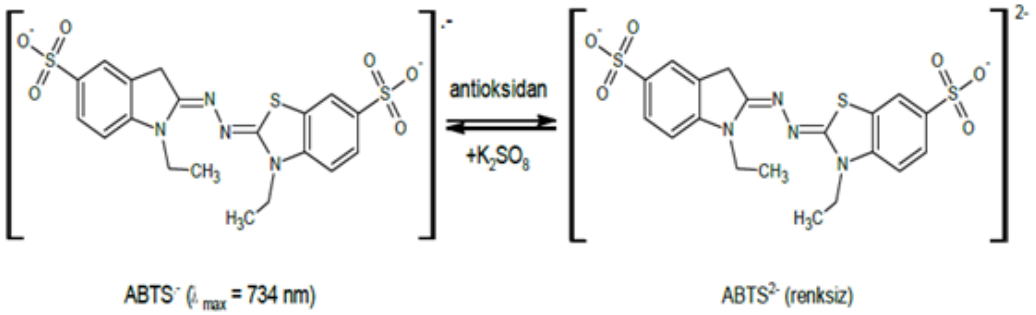
2.3.2 Elektron transferine dayalı yöntemler

Elektron transferine dayalı yöntemler antioksidan ve oksidan arasındaki ilişkiye dayanır. Oksidan antioksidan bileşiğinden bir elektron alır ve bunun sonucunda antioksidan derişimine bağlı olarak oksidanda renk değişimi meydana gelir.

"Oksidan + e-(antioksidan) → indirgenmiş oksidan + yükseltgenmiş antioksidan" (2.2)

Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Yöntemi (TEAC)

TEAC Yönteminde radikal türlerinin ABTS ile etkileşerek ABTS+ katyonunun 645 nm, 734 nm ve 815 nm dalga boylarında vermiş olduğu maksimum absorbansın antioksidanlar tarafından renginin kaybettirilerek absorbansının azalması temeline dayanır (Şekil 2.3). Katyonun absorbansındaki bu azalımdan faydalanılarak antioksidan kapasitesi troloks eşdeğeri olarak hesaplanılır (Miller vd., 2003).

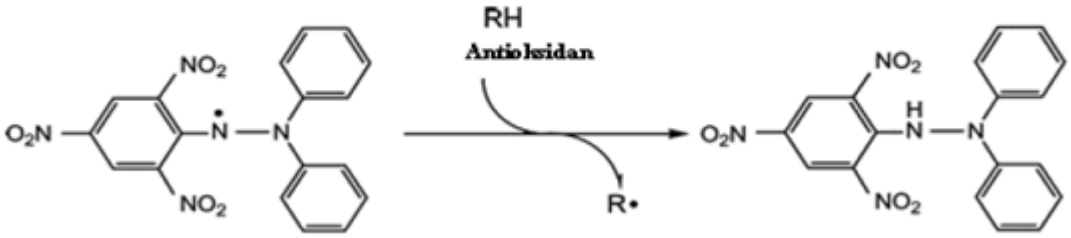


Şekil 2.3 : ABTS ile persülfat reaksiyonu sonucunda oluşan ABTS radikalinin antioksidan bileşik ile etkileşimi.

ABTS radikalinin kullanıldığı toplam antioksidan kapasite ölçümlerinde farklı modifikasyonlar ortama bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmesine neden olmaktadır. Ek olarak TEAC yönteminin diğer bir dezavantajı da yavaş reaksiyona giren antioksidanlarda reaksiyon tamamlanmadan okumalar yapılmasından kaynaklı olarak düşük TEAC değerlerinin çıkmasıdır (Prior vd., 2005).

DPPH Metodu

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari yollar ile elde edilebilen organik nitrojen radikalidir (Huang vd., 2005). Yöntem, antioksidanın DPPH radikaline elektron transferi sonucu absorbansındaki düşüş temeline dayanmaktadır (Şekil 2.4). Süreç, absorbans sabitlenen kadar takip edilir (Albayrak, 2010). DPPH metodu basit, hızlı ve farklı çözünürlüklere elverişli bir yöntem olmasının yanı sıra ışık, oksijen ve kirliliğe karşı olan hassasiyeti nedeniyle sınırlı bir kullanımı oluşmaktadır (Mot vd., 2011).



Şekil 2.4 : DPPH radikalinin antioksidan ile etki mekanizması.

CUPRAC Metodu

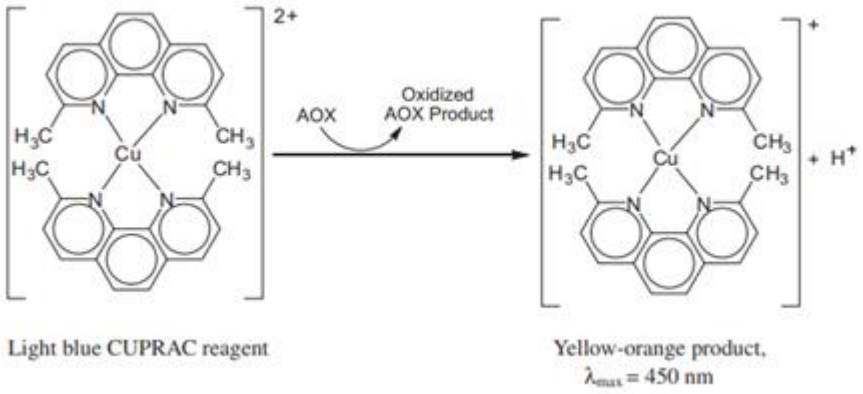
Cuprac metodu Cu(II)-Nc (bakır-II-neokuprein) reaktifinin antioksidanlar tarafından Cu(I)-Nc kelatına indirgenmesi ve bu kelatın 450 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanan bir yöntemdir (Apak vd., 2004) (Şekil 2.5). Cuprac yöntemi hidrofilik ve lipofilik antioksidanların miktar tayinlerine uygun, kolay, ucuz ve pH seviyesi kolay ayarlanabilir bir yöntemdir (Özyürek vd., 2011).

Cuprac yöntemi kullanılarak, antioksidanlar için çözücü etkileri araştırılmış ve sadece CUPRAC ve FRAP (persülfat) yöntemlerinin lipofilik antioksidanlar üzerinde hidrofobik ortamda toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenebildiği ve fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerinin yapısal özelliğe bağlı olarak farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. (Çelik vd., 2010).

Cuprac yöntemi aşağıdaki reaksiyon mekanizması ile çalışır:

"n $Cu(Nc)_2^{2+}$ + n-elektron indirgeyici (Antioksidan) → n $Cu(Nc)_2^{+}$ + n-yükseltgenmiş ürün + n H^+" (2.3)

Bu reaksiyonda indirgenen $Cu(Nc)^{2+}$ şelatı 450 nm'de maksimum ışık emilimi gösterir ve oldukça renklidir (Tutem vd.,1991).



Şekil 2.5 : Bakır(II)-neokuproinin antioksidan ile reaksiyonu sonucu bakır(I)-neokuproine dönüşmesi (Özyürek vd., 2011).

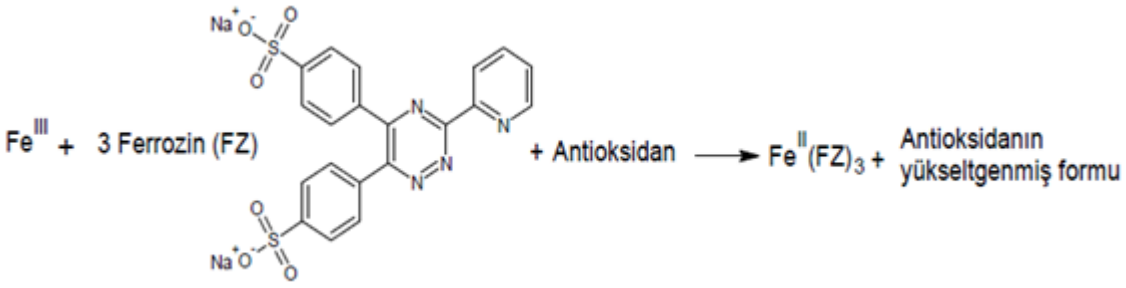
Cuprac yöntemi; bitki çaylarında (Apak vd., 2006), polifenolik bileşiklerin belirlenmesinde (Apak vd., 2008), flavonoidler varlığında tek başına askorbik asit tayininde (Özyürek vd., 2007a) gibi bir çok tayin ve prosedürlerde yaygın olarak kullanılmıştır.

CERAC Yöntemi

Cerac yöntemi Ce(IV) ile antioksidanların arasındaki redoks reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Ce(IV) 320 nm'de maksimum absorbans değerini vermektedir fakat bu değer antioksidanlar ile reaksiyona girmesi sonucunda azalır. Toplam antioksidan miktarı Ce(IV)'ün absorbansındaki bu azalma sonucunda hesaplanmaktadır (Özyurt vd., 2007). Glikoz bağlı antioksidanların aktiviteleri Cerac yöntemi ile diğer yöntemlere göre daha yüksek bulunmuştur. CERAC yöntemi; Türkiye'de yetişen soğanların TAC belirlenmesinde (Özyurt vd., 2013), kuşburnu bitkisinde spektrofotometrik yöntemle askorbik asit tayininde (Karasakal A., 2007) kullanılmıştır.

Fe(III)-Ferrozin Yöntemi

Fe(III)-Ferrozin yöntemi Fe(III)'ün ferrozin ile kompleks oluşturması ve bu oluşan kompeklisin antioksidanlar ile reaksiyona girmesi sonucunda Fe(II)-ferrozin kompleksine indirgenmesi temeline dayanır (Şekil 2.6). İndirgenmiş Fe(II)-ferrozin kompleksi magenta rengi verir ve bu kompleksin 562 nm dalga boyunda absorbansı ile toplam antioksidan kapasite ölçülür (Berker vd., 2010b).



Şekil 2.6 : Demir(III)-Ferrozin yöntemi şeması.

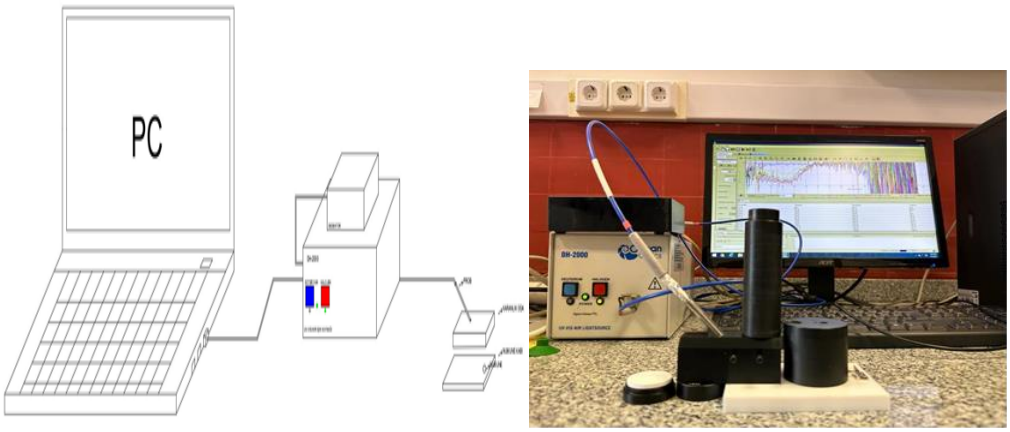
Bu yöntem Berker ve diğerleri (2010) tarafından geliştirilmiş ve bitki çaylarındaki toplam antioksidan kapasite değeri ölçülmüştür.

2.4 Fiber Optik Reflektans Spektroskopisi (FORS) ve Çalışma Prensibi

Optik fiber teknolojisi elektromanyetik ışını numune ile doğrudan temas etmeye yarayan bir algılama bölgesine sahiptir ve ışını bu bölgeden iletir (Filik vd., 2008).

Reflektans; optik fiberler aracılığıyla iletilen ışığın yansıma prensibine dayanan bir ölçümdür. FORS; UV-VIS-NIR ve IR-bölgede ışık yoğunluğunu ölçmek için kullanılan ve plastiklerin renk solmalarının nedenlerinden, doku biyokimyası incelemeye, kanser tanımlamadan tekstil elyaflarının tanımlanmasına kadar birçok alanda kullanılan basit, taşınabilir ve düşük maliyetli bir cihazdır.

Fiber optik reflektans spektrofotmetresi yansıtma spektrumlarını ve ölçümlerini kaydetmek amacıyla kullanılmıştır. Cihaz ışık kaynağı olarak halojen lamba, mikrometre bir yansıtma probu ve bir dedektörden oluşmaktadır. Optik ölçümler için 45°lik prob ve numune miktarının her ölçümde aynı olabilmesi için özel olarak tasarlanan bir numune ölçüm aparatı kullanılmıştır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 : Fiber optik reflektans spektorofotometre cihazı.

Antioksidan bileşiklerinin ve makroalg çözeltilerinin antioksidan kapasiteleri Fiber Optik Reflektans Spektrofotmetresi ve UV-Visible Spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Kullanılan fiber optik tabanlı spektrometre, pratik ve ucuz antioksidan analizine olanak sağlamaktadır. Reçine üzerindeki yansıma ölçümü, bilinmeyen bir antioksidan numunesinin Toplam Antioksidan Kapasitesini ölçmek için olanak sağlamaktadır.

Kubelka-Munk remisyon fonksiyonu, F(R), şu şekilde tanımlanır (Ghauch vd., 2000);

$$F(R) = (1 - R)^2/(2R) \quad (2.4.)$$

Burada; R standart beyaz bir yüzeye göre ölçülen yansıtma yüzdesidir. F (R) analit konsantrasyonu ile;

$$F(R) = 2.303\varepsilon C/s \quad (2.5)$$

Denklemine göre ilişkilendirilebilir.

ε= Absorptivite katsayısı

C= Analit konsantrasyonu

S = Örnek yüzeyinin saçılma katsayısıdır (Gazda vd., 2004).

2.5 Algler ve Kullanım Alanları

Su ekosistemi, dünyanın yaklaşık %70'ini kaplayan ve bir çok organizma için geniş habitatlar oluşturan bir ekosistemdir (Ioannou vd., 2010; Ebada vd., 2011).

Algler sucul ekosistemin birincil üreticileri olmanın yanı sıra bitkiler aleminin %10'ununu temsil etmektedir (Lane vd., 2010; Ioannou and Roussis, 2009). Algler, fotosentetik renklere sahip, karmaşık üreme sistemleri olmayan prokaryotik ya da ökaryotik ilkel bitkisel organizmalar olarak bilinir. Mikroskobik tek hücreli canlılardan karmaşık çok hücreli canlılara kadar çeşitli türler vardır (Sze, 1998).

Algler fotosentez yaparak karbondioksit ve inorganik maddeleri organik maddeye çevirmesi ile su altı dünyasında diğer canlıların beslenmesine yardımcı olurlar (Özvarol, 2009). Biyolojik yapılarına göre mikroalg ve makroalgler olarak iki grupta incelenirler.

Mikroalgler için 50.000'den fazla tür olduğu tahmin edilse de, yaklaşık 30.000'e yakın tür tanımlanmıştır (Mata vd., 2010). Mikroalglerin çoğu çeşitli bileşenlerden oluşur: lipidler (%4-55), karbonhidratlar (%6-57) ve proteinler (%10-63). Bazı mikroalg türlerinin de (kuru ağırlık bazında) %70'den fazla yağ içerdiği bildirilmiştir. (Becker vd., 2007; Miao vd., 2004; Hariskos vd., 2014; Yeh vd., 2010; Suali vd., 2012; Bahadar vd., 2013).

Makroalgler, protein, lipit, doymamış yağ asitleri, vitaminler ve çeşitli biyoaktif maddeler açısından en zengin besinlerden biridir. Ayrıca çok sayıda mineral içerir. Karasal bitkilere kıyasla, deniz suyu ile sürekli temasta olmaları ve mineralleri doğrudan almaları nedeniyle mineral içerikleri daha yüksektir. Hindistan kıyılarından toplanan 18 makroalg türünün toplam mineral içeriği % 20 ila % 50 arasında değişmektedir (Barot vd., 2019). Kuzeydoğu Akdeniz kıyılarından toplanan kırmızı alg, Jania rubens'in toplam mineral içeriğinin kuru maddede % 51.63'e kadar yükselebildiği gösterilmiştir (Polat vd., 2013).

Makroalgler ekolojik, biyolojik ve ekonomik olarak fayda sağlayan canlılardır. Ekolojik olarak diğer canlılar için beslenme, üreme ve barınma ortamı oluştururlarken, ekonomik olarak ise insan hayatında atık arıtılması, hayvan yemi & gübre olarak kullanımı ve gıda maddesi olarak kullanımı gibi bir çok fayda sağlamaktadırlar (Wahbeh, 1997; Foster vd., 1998; Fleurence, 1999; Lindsey vd., 1999; Wilson, 2001; McClanahan vd., 2002).

Makroalgler kırmızı algler (Rhodophyta), yeşil algler (Chlorophyta) ve kahverengi algler (Phaeophyceae) olarak üç grupta incelenebilir (Barsanti vd., 2006). A, B ve diğer çeşitli karotenoidler, yeşil alglerin klorofil yapısında bulunur. Çok fazla protein, mineral ve vitamin içerdikleri için gıda olarak tüketilirler (Ötük vd., 1980). Kırmızı algler, klorofil a ve beta-karoten ile lutein içerirler. Kırmızı alglerin, denizlerin daha derinlerinde bulunması kırmızı algleri diğer alglerden farklı kılar (Orhon, 2009). Çoğunlukla agar agar ve karogen üretiminde kullanılar (Pal vd., 1998). Kahverengi makroalgler ise fukoksantin (klorofil a, c ve ksantofil) ve yeşil rengi kaplayan karoten ve ksantofili içerir. Canlıların vücutlarındaki radyoaktif maddeleri tutarak dışarı atabilen tek madde tüm kahverengi alglerde bulunan alginattır (Soeder, 1976). Kahverengi algler, ilaç ve kozmetik sektörlerinde kullanılırlar (Taşkın, 1999).

Deniz makroalglerinin antioksidan aktivitesi, oksidasyonun baskılanmasına ya da engellenmesine direkt ya da dolaylı olarak katkıda bulunan klorofil ve ß-karoten gibi pigmentlerden, α-tokoferol, niasin, tiamin ve askorbik asit gibi vitaminlerden, polifenolik ve flavonoid gibi fenol bileşenlerinden, fosfolipidler, terponoidler, peptidler ve diğer antioksidatif bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Deniz alglerinin antioksidan özellikleri, fenollerden kaynaklanmaktadır (Duan vd., 2006).

2.6 FORS Cihazı ve Deniz Makroalgleri ile Yapılan Literatür Çalışmaları

Revilla ve arkadaşları 2016 yılında 16 farklı süt karışımı kullanılan 224 peynir çeşidinde antioksidan kapasitesi tayini gerçekleştirmişlerdir. Oluşturulan model, farklı bileşimlerdeki ve olgunlaşma zamanlarındaki peynirlerde olgunlaşma zamanının ve mevsimin peynir antioksidan aktivitesi üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur (Revilla vd., 2016).

2020 yılında O.Magali ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmada Güneybatı Atlantik (Ajantin) kıyılarından 28 tür makroalg toplamıştır. Bu çalışmada makroalglerin, FORS ile reflektans spektrumları tanımlanmış ve doku ve derinlik aralıkları da göz önünde bulundurulmuştur. Çalışma sonucunda 22 yeni tür ilk kez spektral kütüphaneye dahil edilmiştir (Magalí vd., 2020)

Malezya bölgesinden toplanan yenilebilir deniz alglerinde Ling ve arkadaşları antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerikleri konusunda çalışmışlardır. Bu çalışmada toplam antioksidan kapasiteyi DPPH, ABTS ve FRAP yöntemlerini

kullanarak tayin etmişlerdir. Çalışmada beyaz deniz yosunu olarak bahsedilen türün diğer türlere göre daha yüksek toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriğine sahip olduğu bulunmuştur (Ling vd., 2013).

Chopra ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı çalışmada, bir mikroalg türü olan Chorella vulgaris ile Spirulina ekstraktları arasındaki antioksidan aktivite karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada Spirulina'nın toplam fenolik içeriğinin 5 kat daha fazla olduğu ve antioksidan aktivitesinin Chorella vulgaris'ten daha fazla olduğu bulunmuştur (Chopra vd., 2008).

Japonya'da Yumiko ve arkadaşlarının HPLC kullanarak 27 ayrı deniz yosunu üzerine yaptığı çalışmada rutin, kuersetrin, morin, kafeik asit ve kateşol bileşikleri tespit edilmiştir. Morinin tüm deniz alglerinde bulunmasının yanı sıra kateşol sadece kırmızı ve yeşil alglerde tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda kırmızı deniz alglerinde kahverengi ve yeşil alglere oranla daha fazla bileşen bulunmuştur (Yoshie-stark vd., 2003).

De Quiros ve arkadaşları Galiçya Atlantik kıyı bölgesinden topladıkları kırmızı ve kahverengi makroalgler üzerinde polifenol analizi yapmışlardır. Analizde ters HPLC yöntemi kullanmış ve en uygun ekstraksiyon yöntemini belirleyebilmek adına farklı sıcaklık, süre ve hacimlerde denemeler gerçekleştirmişlerdir. Denemeler sonucunda analiz edilen alg örneklerinde bulunan Epikateşingallat sadece kahverengi alglerde tespit edilmiştir (Rodríguez-Bernaldo de Quirós vd., 2010).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Cihazlar

Deneylerimizde Ocean Optics markalı DH-2000 UV-VIS-NIR Işık Kaynaklı Fiber Optik Reflektans Spektrofotometresi (FORS), Varian marka UV-VIS Spektrofotmetre, GEC-Avery marka Hassas Terazi, Knick marka pH metre, Hermle Santrifüj Cihazı, Millipore Direct-Q 3 Ultra Saf Su Sistemi, Heildolph marka vortex cihazı kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kullanılan kimyasal maadeleri; Amonyum Demir (III) Sülfat [$NH_4Fe(SO_4)_2.12\ H_2O$], Ferrozin [(2,4,6-Tris(2-pyridyl)- 1,3,5-triazine], Hidroklorik Asit (HCl), Kuersetin dihidrat (QR), L-sisteine, troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit), rutin (RA), kafeik asit (CF), gallik asit (GA), α-tokoferol (E Vitamini), rosmarinik asit, fisetin, kateşin (CA), askorbik asit (C Vitamini), morin, glutatyon, asetik asit (CH_3COOH) olarak sıralayabiliriz. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

3.3 Kullanılan Örnekler

Marmara Denizi Bakırköy (Florya) ve Sarıyer istasyonlarından (Şekil 3.1) 2022 yılı Temmuz ve Kasım aylarında toplanan mevcut makroalg örnekleri İstanbul Üniversitesi, Su Bilimleri Fakültesi, Limnoloji Laboratuvarına getirilmiştir (Şekil 3.2). Örnekler öncelikle saf suda yıkandıktan sonra türlerine göre ayrılmış ve yaş analizi yapılacak örnekler -80°C de derin dondurucuda saklanmıştır. Kuru analizi yapılacak örnekler ise liyofilizatörde 48 saat boyunca -50 °C de kurumaya bırakıldı ve kuru örnekler oda şartlarında karanlıkta saklandı.

İstasyonlar da tespit edilen genuslar ve ait olduğu gruplar Çizelge 3.1'de belirtilmiştir. Örneklemede *Chlorophyta* (yeşil alg), *Rhodopyta* (kırmızı alg) *ve 2'si Phaeophyta*

(kahverengi alg) gruplarına ait toplam 4 farklı tür tespit edilmiştir (Şekil 3.3). *Ulva lactuca ve Ceramium sp.* her iki istasyonda tespit edilen ortak genusdur. *Cystoceira sp*. ve *Dictyota sp* türleri ise sadece Sarıyer istasyonunda tespit edilmiştir.

Şekil 3.1 : Örnekleme istasyonları.

Şekil 3.2 : Makrolag örneklerinin toplanması, laboratuvar ortamında temizlenmesi ve türlerine göre ayrılması.

Şekil 3.3 : Sarıyer ve Florya sahil kıyısında tespit edilen baskın makroalg türleri.

Çizelge 3.1 : İstasyonlara göre tespit edile makroalg genuslar ve ait olduğu gruplar.

Makroalg Toplama Periyotları	İstasyon	Grup	Genuslar
Temmuz 2022	İstasyon 1. (Florya)	Chlorophyta	*Ulva lactuca*
		Rhodophyta	*Ceramium sp.*
	İstasyon 2. (Sarıyer)	Chlorophyta	*Ulva lactuca*
		Pheophyta	*Cystoseira sp.*
			Dictyota sp
Kasım 2022	İstasyon 1. (Florya)	Chlorophyta	*Ulva lactuca*
	İstasyon 2. (Sarıyer)	Chlorophyta	*Ulva lactuca*
		Rhodophyta	*Ceramium sp.*
		Pheophyta	*Cystoseira sp*

3.4 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1 Kullanılan antioksidan çözeltilerinin hazırlanması

Kullanılan antioksidan çözeltileri 25 mL $1x10^{-3}$ M olacak şekilde tartılıp etil alkol ile hazırlanmıştır. Askorbik asit, glutatyon ve sistein standart çözeltileri ise 25 mL $1x10^{-3}$ M olacak şekilde saf su ile hazırlanmıştır.

3.4.2 pH çözeltilerinin hazırlanması

pH 3 Tamponu; 246 mL 0,1 M Asetik Asit ve 5 mL 0,1 M Sodyum Asetat çözeltileri ile hazırlanmıştır.

pH 4 Tamponu; 212 mL 0,1 M Asetik Asit ve 38 mL 0,1 M Sodyum Asetat çözeltileri ile hazırlanmıştır.

pH 5 Tamponu; 87,5 mL 0,1 M Asetik Asit ve 162,5 mL 0,1 M Sodyum Asetat çözeltileri ile hazırlanmıştır.

pH 6 Tamponu; 13 mL 0,1 M Asetik Asit ve 237 mL 0,1 M Sodyum Asetat çözeltileri ile hazırlanmıştır.

pH 7 Tamponu; 1 M 250 mL Amonyum Asetat çözeltisi ile hazırlanmıştır.

pH 8 Tamponu; 1,7 g Potasyum dihidrojen fosfat, 117 mL 0,1 M Sodyum Hidroksit (NaOH) içerisinde çözdürülmüş ve 250 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

pH 9 Tamponu; 1,2 g Sodyum Tetraborat (Boraks), 12 mL 0,1 M Hidroklorik Asit (HCl) içerisinde çözdürülmüş ve saf su ile 250 mL olarak hazırlanmıştır.

pH 10 Tamponu; 1,2 g Sodyum Tetraborat (Boraks), 46 mL 0,1 M Sodyum Hidroksit (NaOH) içerisinde çözdürülmüş ve saf su ile 250 mL olarak hazırlanmıştır.

pH 11 Tamponu; 0,6 g Sodyum bikarbonat ve 57 mL 0,1 M Sodyum Hidroksit (NaOH) çözeltisi ile hazırlanmıştır.

3.4.3 Fe(III)-Ferrozin yöntemi çözeltilerinin hazırlanması

$2x10^{-3}$ M Fe(III) çözeltisi; 0,0241 g $NH_4Fe(SO_4)_2.12\ H_2O$ tartılmış ve 1 mL 1 M HCl eklenerek saf su ile balon jojede 25 mL'ye tamamlanmıştır.

$1x10^{-3}$ M Ferrozin çözeltisi; 0,0127 g Ferrozin ($C_{20}H_{13}N_4NaO_6S_2.\ H_2O$) tartılarak saf su ile balon jojede 25 mL'ye tamamlanmıştır.

pH 5 Tamponu; 87,5 mL 0,1 M Asetik Asit ve 162,5 mL 0,1 M Sodyum Asetat çözeltileri ile hazırlanmıştır.

3.4.4 CUPRAC yöntemi çözeltilerinin hazırlanması

1×10^{-2} M $Cu(II)Cl_2$ çözeltisi; 0,4262 g $CuCl_2.2H_2O$ katısı tartılır ultra saf su ile 250 mL ye balon joje de tamamlanır.

$7,5\times10^{-3}$M Neokuprain çözeltisi; 0,156 g neocuprain katısı tartılır %97 (v/v) etil alkol çözeltisi ile 100 mL ye balon joje de tamamlanır.

1M Amonyum asetat (NH_4Ac) çözeltisi (pH 7 tamponu); 19,27 g NH_4Ac katısı tartılır ultra saf su ile 250 mL ye balon jojede tamamlanır.

3.4.5 Makroalg ekstraktlarının hazırlanması

Temmuz 2022 yaz örneklerinden istasyon 1'den bol miktarda temin edilen yeşil makroalg türlerinden *Ulva lactuca* ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çözücü

olarak ultra saf su ve belli yüzdelerde (%20, %40, %80, %100) hazırlanan etanol- su çözücüleri ile geleneksel ekstraksiyon yöntemi kullanılarak toplam antioksidan kapasitenin en yüksek olduğu çözücü ortamı belirlendi.

1 g kuru makroalg 25 mL çözücüde magnetik karıştırıcıda 1 saat boyunca karıştırıldıktan sonra süzüntü Whatman siyah bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Kalıntıya 15 mL çözücü ilave edilip manyetik karıştırıcıda 45 dakika boyunca tekrar karıştırıldıktan sonra süzüntü yine Whatman siyah bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Aynı işlem 10 mL çözücü ile 15 dakika boyunca tekrar yapıldı ve herbir ekstraksiyon işlemi sonundaki süzüntüler toplanarak toplam hacim 50 mL'ye çözücü ile tamamlandı. Ekstraktlar analize kadar -18°C'de saklanmıştır.

3.5 Kullanılan Yöntemler

3.5.1 CUPRAC yöntemi

CUPRAC yönteminde oluşan mavi renkli Cu(II)-Nc kompleksi antioksidanlarla reaksyona girip sarı renkli Cu(I)-NC kompleksine indirgenmektedir (Apak vd., 2004). Numunelerin toplam antioksidan kapasiteleri (TAC) bu prensipten yola çıkılarak hesaplanmaktadır.

1,0 mL 1,0 × 10^{-2} M $CuCl_2$, 1,0 mL 7,5 × 10^{-3}M neocuprein (Nc), 1,0 mL 1,0 M NH4Ac, x mL antioksidan çözeltisi, (1,1-x) mL H_2O ile son hacim 4,1 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Kör çözeltiye karşı absorbansları 450 nm de ölçüldü ve çözeltiler otuz dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örneklerin toplam antioksidan kapasitesi (TAC) değerleri (3.1) formülü ile mmol trolox/g eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{“TAC (mmol Troloks/g)} : (A/\varepsilon_{troloks}) \times V_s / V_{ö} \times SF \times V_E / m\text{”} \qquad (3.1.)$$

“A : Ölçülen absorbans (450 nm)”

“ε_{trolox} : Troloks molar absorpsiyon katsayısı (mol^{-1} L cm^{-1})”

“V_s : Absorbansın ölçüldüğü son hacim (mL)”

“$V_{ö}$: Örnek hacmi (mL)”

“SF : Seyreltme faktörü”

“V_E : Ekstraktların veya infüzyonların hazırlandığı son hacim (mL)”

“m : Örnek ağırlığı (g)”

3.5.2 Ferrozin yöntemi

Ferrozin yönteminde oluşan Fe(III)-FZ kompleksi antioksidanlar tarafından indirgenerek mor/magenta renkli Fe(II)-FZ kompleksine dönüşmektedir (Berker vd., 2010). Literatürde mevcut olan bu yöntem çalışma ortamımızda tekrardan optimize edilmiştir.

1 mL 2,0× 10^{-3} M Fe(III) çözeltisi + x mL antioksidan çözeltisi + (3-x) mL 0,1 M pH= 5,0 NaAc/HAc tamponu + 1 mL 1,0× 10^{-3} M Ferrozin ile son hacim 5 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilen örneklerin 562 nm de köre karşı absorbansları ölçüldü.

$$\text{TAC (mmol Troloks/g)} : (A/\varepsilon_{troloks}) \times V_s / V_{ö} \times SF \times V_E / m \quad (3.2)$$

A : Ölçülen absorbans (562 nm)

ε_{trolox} : Troloks molar absorpsiyon katsayısı (mol^{-1} L cm^{-1})

V_s : Absorbansın ölçüldüğü son hacim (mL)

$V_{ö}$: Örnek hacmi (mL)

SF : Seyreltme faktörü

V_E : Ekstraktların veya infüzyonların hazırlandığı son hacim (mL)

m : Örnek ağırlığı (g)

3.5.3 Fe(III)-Ferrozin (FZ) temelli FORS Yöntemi

Araştırma grubumuzca geliştirilen Katı-Faz Ekstraksiyon destekli Fe(III)-Ferrozin yönteminde; Fe(III)-Ferrozin kelatının antioksidanlar ile reaksiyonu sonucunda indirgenmesine bağlı oluşan anyonik mor renkli demir(II)-ferrozin (Fe(II)-FZ) kompleksi, şeffaf Sephadex QAE A-25 reçinesi üzerinde kantitatif olarak tutturulur. Fe(II)-FZ kompleksinin 567 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin ölçümününe dayanmaktadır (Berker vd., 2017). Geliştirilen yöntemde ise spektrofotometre cihazı yerine FORS cihazı kullanılarak antioksidan kapasitesi düşük ve örneklerin herhangi bir ön ekstraksiyon işlemine tabi tutulmadan analizleri yapılmıştır.

0,5 mL 2,0× 10^{-3} M Fe(III) çözeltisi + x mL antioksidan çözeltisi + (4-x) mL 0,1 M pH= 5,0 NaAc/HAc tamponu + 0,5 mL 1,0× 10^{-3} M Ferrozin ile son hacim 5 mL olacak

şekilde çözeltiler hazırlandı. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilen çözeltiler 0,25 g Sephadex QAE A-25 reçine üzerine ilave edildi, karışım 5 dakika boyunca adsorpsiyon için çalkalandı. Çözelti ve reçinenin kolaylıkla dekante edilebilmesi için 3 dakika 4000 rpm de santrifüjlendi. Reçine FORS cihazı için tasarlanan örnek probuna yerleştirilerek 45°'lik açı ile FORS cihazında 562 nm de reflektans ölçümleri alındı.

4. SONUÇLAR VE BULGULAR

4.1 UV-VIS Spektrofotometre ile Ferrozin Yöntem Optimizasyonu

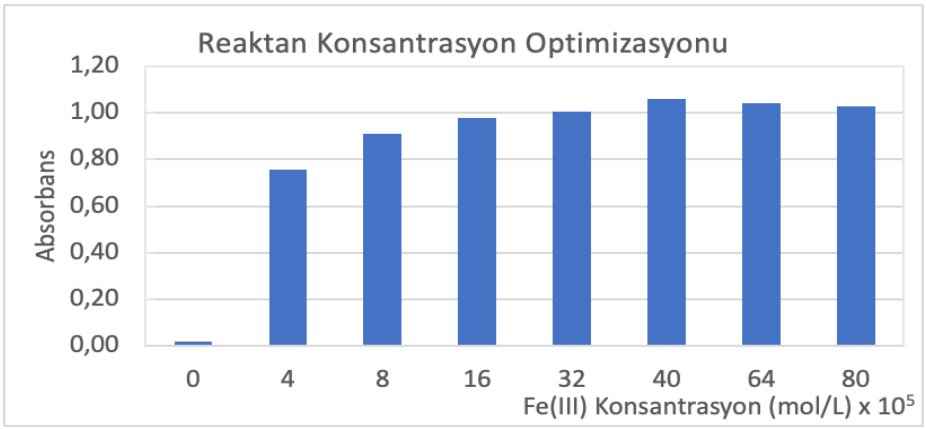
Berker ve arkadaşları 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada Fe(III)-Ferrozin (FZ) temelli toplam antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirmişlerdir. Bu tez kapsamında ise bu yöntem prosedürü tekrardan optimize edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda Fe(III) ve Ferrozin konsantarsyonu ve pH'ın etkisi optimize edilmiştir.

4.1.1 Reaktif Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Fe(III) Reaktifinin Konsantrasyonu

Prosedür;

X mL **2,0 x 10^{-3} M Fe(III) çözeltisi** + 0,1 mL 1.10^{-3} M Troloks çözeltisi + 1 mL 1,0 x 10^{-2} M Ferrozin + (3,9-x) mL pH 5,5 tamponu ilave edilerek toplam hacim 5 mL olacak şekilde tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 562 nm'de kör çözeltiye göre absorbans ölçümleri alındı. Sonuçlar Şekil 4.1'de gösterildi. Maksimum absorbansın sağlandığı **Fe(III) konsantrasyonu 4,0 x10^{-4} M** olarak belirlendi.



Şekil 4.1 : 4.0 x10^{-5} M – 8,0 x10^{-4} M arasında değişen Fe(III) çözeltilerinin konsantrasyonun optimizasyonu.

Ferrozin Reaktifinin Konsantrasyonu

Prosedür;

1 mL 2,0 x 10^{-3} M Fe (III) çözeltisi + 0,1 mL 1.10^{-3} M Troloks çözeltisi + x mL **1,0 x 10^{-3} M Ferrozin çözeltisi** + (3,9-x) mL pH 5,5 tamponu ilave edilerek toplam hacim 5 mL olacak şekilde tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 562 nm de kör çözeltiye karşı absorbansları ölçüldü. Sonuçlar Şekil 4.2 de gösterildi. Maksimum absorbansın sağlandığı **Ferrozin konsantrasyonu 2,0 x10^{-4} M** olarak belirlendi.

Şekil 4.2 : 2.0 x10^{-5} M – 3,2 x10^{-4} M arasında değişen Ferrozin çözeltilerinin konsantrasyonun optimizasyonu.

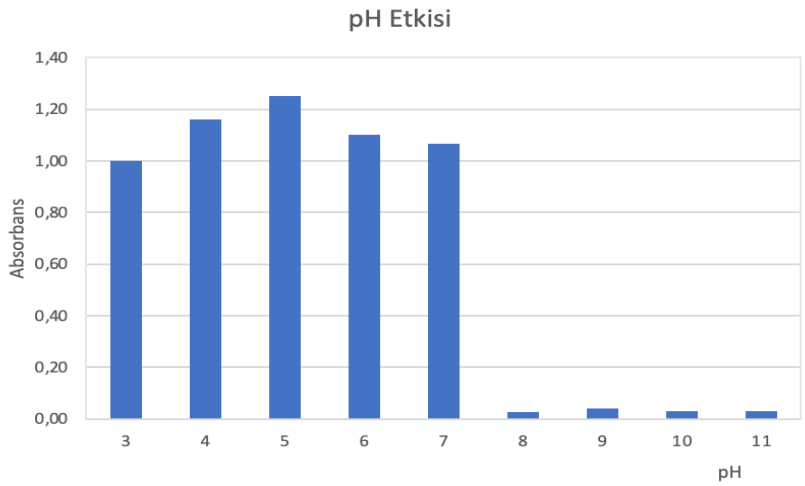
4.1.2 pH Etkisi

Yöntem optimizasyonunda reaksiyonun etkin bir şekilde gerçekleşmesi için reaksiyon ortamının pH'nın belirlenmesi Fe(II)-Ferrozin arasındaki kompleksin daha etkin oluşumuna neden olmaktadır. pH etkisini belirlemek için pH 3.0 ile pH 11.0 aralığında çalışıldı. Uygun tampon çözeltilerinin ilavesi ile pH ayarlandı.

Prosedür;

1 mL 2,0 x 10^{-3} M Fe (III) çözeltisi + 0,1 mL 1.10^{-3} M Troloks çözeltisi + 1 mL 1,0 x 10^{-3} M Ferrozin çözeltisi + **2,9 mL pH tamponu ilave** edilerek toplam hacim 5 mL olacak şekilde tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 562 nm de kör çözeltiye karşı absorbansları ölçüldü.

Sonuçlar Şekil 4.3 de gösterildi. Maksimum absorbansın sağlandığı pH tamponu 5 olarak belirlendi.



Şekil 4.3 : Maksimum absorbansın elde edildiği reaksiyon koşullarına pH etkisi.

4.2 Fe(III)-Ferrozin (FZ) temelli FORS Yöntem Optimizasyonu

Bu tez kapsamında geliştirilen Fe(III)-Ferrozin (FZ) temelli FORS yönteminde; Fe(III)-Ferrozin kelatının antioksidanlar ile reaksiyonu sonucunda indirgenmesine bağlı oluşan anyonik mor renkli demir(II)-ferrozin (Fe(II)-FZ) kompleksi, şeffaf Sephadex QAE A-25 reçinesi üzerinde kantitatif olarak tutturulur. Fe(II)-FZ kompleksinin 562 nm dalga boyundaki maksimum yansıma yüzdeleri okunarak toplanan makroalg örneklerinin toplam antioksidan kapasiteleri tayin edilecektir. Bu amaç doğrultusunda Fe(III) ve Ferrozin konsantarsyonu, pH'ın etkisi, reçine kapasitesi, reçine çalkalama süresi optimize edilmiştir.

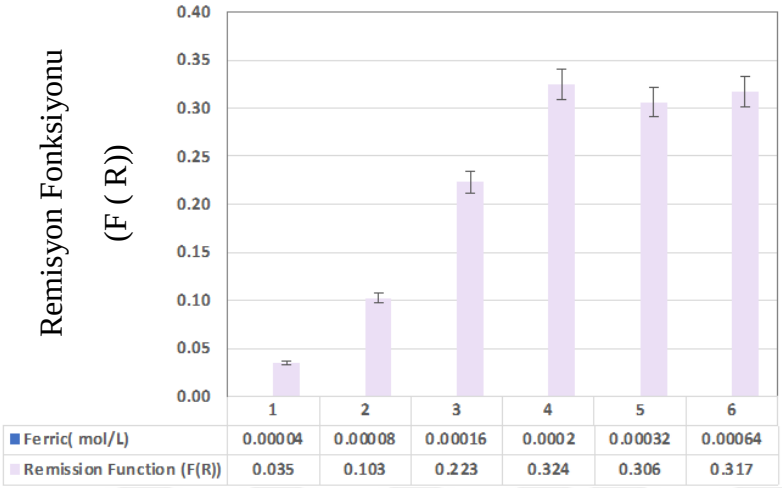
4.2.1 Reaktif Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Fe(III) Reaktifinin Konsantrasyonu

Prosedür;

× mL **2,0 x 10^{-3} M Fe(III) çözeltisi** + 0,1 mL 1.10^{-3} M Troloks çözeltisi + 1 mL 1,0 x 10^{-2} M Ferrozin çözeltisi + (2,9-x) mL pH 5 tamponu ilave edilerek toplam hacim 5 mL olacak şekilde tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 0.25 gr Sephadex Q-25 A reçinesi üzerine ilave edildi. Karışım

çalkalıyıcıda 10 dakika çalkalandıktan sonra 3 dakika 4000 rpm de santrifüjlendi. Reçine üzerine adsorplanan Fe(II)-Ferrozin kompleksinin 562 nm de reflektans ölçümleri alındı. Sonuçlar Şekil 4.4 de gösterildi. Maksimum yansımanın (remisyon fonksiyonun) sağlandığı **Fe(III) konsantrasyonu 2,0 x10^{-4} M** olarak belirlendi.

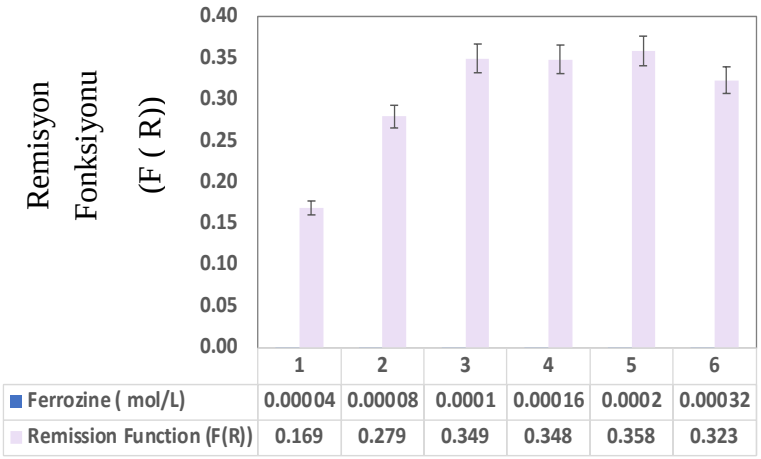


Şekil 4.4 : 4.0 x10^{-5} M – 6,4 x10^{-4} M arasında değişen Fe(III) çözeltilerinin konsantrasyonun optimizasyonu.

Ferrozin Reaktifinin Konsantrasyonu

Prosedür;

1 mL 2,0 x 10^{-3} M Fe (III) çözeltisi + 0,1 mL 1.10^{-3} M Troloks çözeltisi + x mL **1,0 x 10^{-3} M Ferrozin çözeltisi** + (2,9-x) mL pH 5 tamponu ilave edilerek toplam hacim 5 mL olacak şekilde tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 0.25 gr Sephadex Q-25 A reçinesi üzerine ilave edildi. Karışım çalkalıyıcıda 10 dakika çalkalandıktan sonra 3 dakika 4000 rpm de santrifüjlendi. Reçine üzerine adsorplanan Fe(II)-Ferrozin kompleksinin 562 nm de reflektans ölçümleri alındı. Sonuçlar Şekil 4.5 de gösterildi Maksimum yansımanın (remisyon fonksiyonun) sağlandığı **Ferrozin konsantrasyonu 2,0 x10^{-4} M** olarak belirlendi.

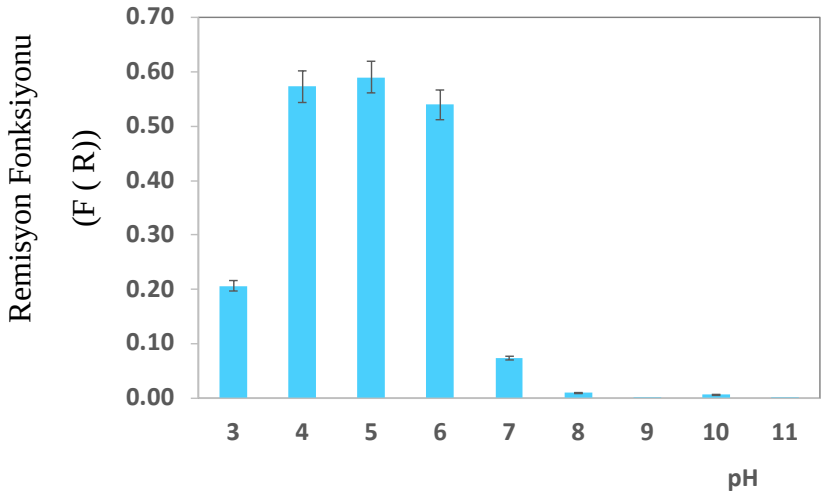


Şekil 4.5 : 4.0 x10^{-5} M – 3,2 x10^{-4} M arasında değişen Ferrozin çözeltilerinin konsantrasyonun optimizasyonu.

4.2.2 pH etkisi

Prosedür;

1 mL 2,0 x 10^{-3} M Fe (III) çözeltisi + 0,1 mL 1.10^{-3} M Troloks çözeltisi + 1 mL 1,0 x 10^{-3} M Ferrozin çözeltisi + **2,9 mL pH tamponu ilave** edilerek toplam hacim 5 mL olacak şekilde tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 0.25 gr Sephadex Q-25 A reçinesi üzerine ilave edildi. Karışım çalkalıyıcıda 10 dakika çalkalandıktan sonra 3 dakika 4000 rpm de santrifüjlendi. Reçine üzerine adsorplanan Fe(II)-Ferrozin kompleksinin 562 nm de reflektans ölçümleri alındı. Sonuçlar Şekil 4.6 de gösterildi Maksimum yansımanın (remisyon fonksiyonun) sağlandığı **pH tamponu 5** olarak belirlendi.



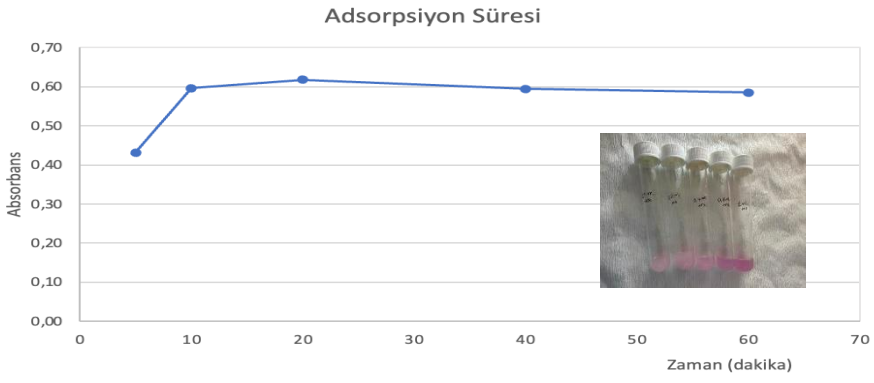
Şekil 4.6 : Maksimum yansımanın sağlandığı reaksiyon koşullarına pH etkisi.

4.2.3 Adsorpsiyon Süresi

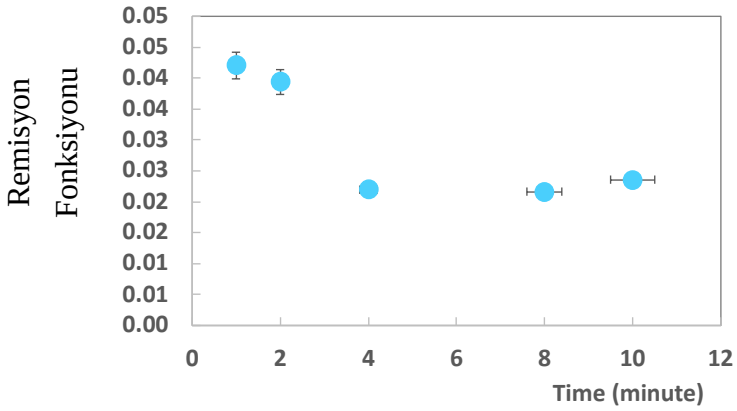
Reçine üzerinde algılayıcı ligandın (Fe(II)-Ferrozin kompleksinin) adsorpsiyon süresi çok önemlidir, çünkü reçinenin cevap süresini ve dinamik aralığını etkiler. Reçine (0,25 gram), (Fe(III) + antioksidan + Ferrozin) çözeltisi ile karıştırılmış ve çalkalayıcıda 5 ila 40 dakika aralıklarla çalkalanarak adsorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Çalışma boyunca bu reçineden 0.25 gram tartım alındı. Spektrofotometrik ve FORS cihazları bu optimizasyon için kullanıldı (Şekil 4.7-Şekil 4.8).

Prosedür;

1 mL 2,0 x 10^{-3} M Fe (III) çözeltisi + 0,1 mL 1.10^{-3} M Troloks çözeltisi + 1 mL 1,0 x 10^{-3} M Ferrozin çözeltisi + 2,9 mL pH 5 tamponu ilave edilerek toplam hacim 5 mL olacak şekilde tamamlandı. . Hazırlanan çözeltiler 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 0.25 gr Sephadex Q-25 A reçinesi üzerine ilave edildi. Spektrofotometrik ölçümler için karışım çalkalıyıcı da 5-60 dakika çalkalandıktan sonra 3 dakika 4000 rpm de santrifüjlendi. Sonuçlar Şekil 4.7 de gösterildi. Maksimum absorbansın sağlandığı **çalkalama süresi 10 dakika** olarak belirlendi. Bu analiz sonucu dikkate alınarak FORS cihazı ile yapılan optimizasyonda karışım çalkalıyıcı da 0-20 dakika çalkalandıktan sonra 3 dakika 4000 rpm de santrifüjlendi. Sonuçlar Şekil 4.8 de gösterildi. Maksimum yansımanın sağlandığı **çalkalama süresi 5 dakika** olarak belirlendi.



Şekil 4.7 : Fe(II)-Ferrozin kompleksinin reçine ile adsorpsiyon süresine bağlı olarak maksimum absorbansındaki değişim.

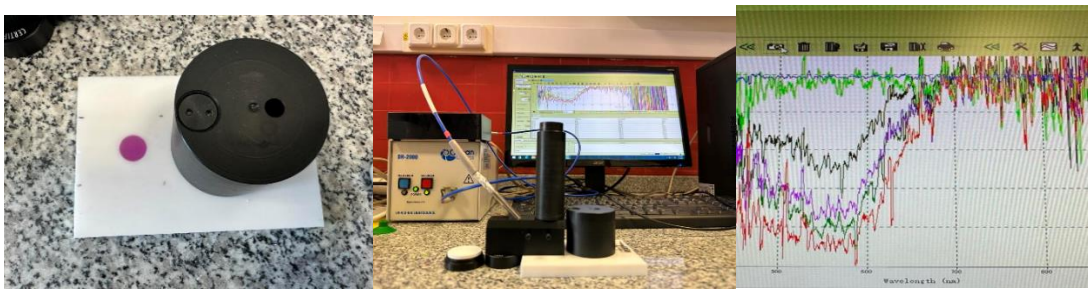


Şekil 4.8 : Fe(II)-Ferrozin kompleksinin reçine ile adsorpsiyon süresine bağlı olarak maksimum yansımasındaki değişim.

4.3 Fe(III)-Ferrozin (FZ) temelli FORS Yöntemi ile Antioksidanların Analizi

Taşıyıcı katı faz üzerine immobilize edilmiş duyarlı indikatör boyanın analit varlığında renk değiştirmesi veya optik özelliklerinin değişmesi, fiber optik kimyasal sensörler (FOCs) için bilinen klasik yöntemler olan absorbans, floresans, kemilüminesans ve reflektans ile ölçülebilir. Çalışma kapsamında ölçüm yöntemi, Fiber Optik Reflektans (Yansıma) Spektrofotometre cihazı kullanılarak geliştirildi (Şekil 4.9.).

Kimyasal sensör olarak kullanılacak reçine yüzeyinin metalik yüzeyler gibi tam yansıtma yapmamasından dolayı fiber probun 45°C'lik açı ile analiz yapılacak yüzeye yansıtılması gerekmektedir (Şekil 4.10.).



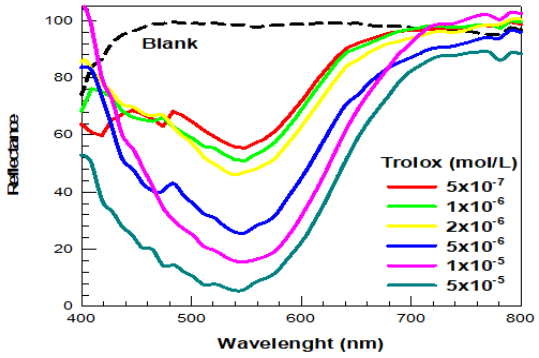
Şekil 4.9 : FORS cihazı, örnek kabı ve spekturum.

Yöntem optimizasyonu sonucunda, aşağıdaki prosedür Troloks (TR), Askorbik Asit (AA), Kafeik Asit (CFA), Kateşin (CT), Fisetin (FS), Gallik Asit (GA), Glutatyon (GSH), Morin (MR), Kuersetin (QR), Rosmarinik Asit (RA), Rutin (RT) ve α-

Tokoferol (TOC) standart antioksidan çözeltilerine uygulanmış ve lineer kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Kalibrasyon grafiklerinden her bir antioksidan için çalışma aralığı, tespit sınırı (LOD), miktar tayini sınırı (LOQ) ve Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) katsayıları hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge 4.1 de verilmiştir.

Prosedür;

0,5 mL 2,0× 10^{-3} M Fe(III) çözeltisi + x mL Troloks çözeltisi + (4-x) mL 0,1 M pH= 5,0 NaAc/HAc tamponu + 0,5 mL 1,0× 10^{-3} M Ferrozin ile son hacim 5 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilen çözeltiler 0,25 g Sephadex QAE A-25 reçine üzerine ilave edildi, karışım 5 dakika boyunca adsorpsiyon için çalkalandı. Çözelti ve reçinenin kolaylıkla dekante edilebilmesi için 3 dakika 4000 rpm de santrifüjlendi. Reçine FORS cihazı için tasarlanan örnek probuna yerleştirilerek 45°'lik açı ile FORS cihazında 562 nm de reflektans ölçümleri alındı (Şekil 4.11).



Şekil 4.10 : Troloks çözeltisinin reflektans spekturumu.

Çizelge 4.1 : Fiber optik yansıma spektroskopisine (FORS)* göre antioksidan bileşenlerin doğrusal kalibrasyon denklemleri, doğrusal konsantrasyon aralıkları, tespit sınırı (LOD), miktar tayini sınırı (LOQ) ve troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) katsayıları.

Antioksidan Bileşikler	Lineer Kalibrasyon Denklemi ve Regrasyon Katsayısı	Lineer Çalışma Aralığı	LOD (μM)	LOQ (μM)	TEAC (FORS)
Askorbik Asit (AA)	$Rf= 8.22x10^{3}$ C + 0.08 (r=0.9933)	0.50 - 16.0	0.105	0.350	0.39
Kafeik Asit (CFA)	$Rf=1.92x10^{4}$ C - 0.005 (r=0.9923)	0.25 - 10.0	0.045	0.150	0.92
Kateşin (CT)	$Rf= 2.51x10^{4}$ C + 0.001(r=0.9823)	0.50 - 10.0	0.034	0.114	1.20
Fisetin (FS)	$Rf= 5.27x\ 10^{4}$ C - 0.011(r=0.9924)	0.25-20.0	0.016	0.054	2.53
Gallik Asit (GA)	$Rf= 2.27x\ 10^{4}$ C + 0.099 (r= 0.9902)	2.0 - 20.0	0.038	0.126	1.03
Glutatyon (GSH)	$Rf=2.51x\ 10^{3}$ C - 0.083(r=0.9999)	1.0 - 20.0	0.343	1.14	0.12
Morin (MR)	$Rf= 2.30x10^{4}$ C - 0.003(r= 0.9958)	0.25 - 4.0	0.037	0.125	1.10
Kuersetin (QR)	$Rf= 9.77x10^{4}$ C - 0.021(r=0.9987)	0.1 - 10.0	0.009	0.029	4.67
Rosmarinik Asit (RA)	$Rf= 4.53x10^{4}$ C - 0.001(r=0.9999)	0.1 - 2.5	0.019	0.063	2.17
Rutin (RT)	$Rf= 1.51x10^{4}$ C - 0.006(r=0.9915)	0.2 - 40.0	0.057	0.190	0.72
Alfa Tokoferol (TOC)	$Rf= 1.11\ x10^{4}$ C - 0.009(r=0.9935)	0.4 - 20.0	0.078	0.259	0.53
Troloks (TR)	$Rf= 2.08x10^{4}$ C - 0.018(r= 0.9942)	0.16 - 16.0	0.041	0.137	1.00

Fe(III)-Ferrozin (FZ) temelli FORS Yöntemi ile bulunan TEAC değerleri Spektrofotometrik Demir(III)-Ferrozin metodu, Demir(III)-Ferrozin metodu ve literatürdeki reflektometrik CUPRAC yöntemi ile Çizelge 4.2.'de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.2 : Fiber optik yansıma spektroskopisine (FORS)* göre antioksidan bileşenlerin TEAC değerlerinin spektrofotmetrik Fe(III)-Ferrozin , Fe(III)-Ferrozin ve CUPRAC metodu sonuçları ile karşılaştırılması.

Antioksidan Bileşikler	TEAC (FORS)	TEAC* (SP-Fe(III)-Ferrozin)	TEAC** (Fe(III)-Ferrozin	TEAC*** (Reflektometrik CUPRAC)
Askorbik Asit (AA)	0.39	0.96	1.01	0.42
Kafeik Asit (CFA)	0.92	1.09	1.23	2.46
Kateşin (CT)	1.20	2.98	1.32	1.16
Fisetin (FS)	2.53	-	-	2.70
Gallik Asit (GA)	1.03	1.84	2.63	1.76
Glutatyon (GSH)	0.12	_	0.24	0.56
Morin (MR)	1.10	-	-	2.38
Kuersetin (QR)	4.67	3.14	3.64	3.79
Rosmarinik Asit (RA)	2.17	2.92	2.65	2.86
Rutin (RT)	0.72	1.75	1.50	2.14
α - Tokoferol (TOC)	0.53	-	-	0.94
Troloks (TR)	1.00	1.00	1.00	1.00

**Katı-Faz Ekstraksiyon destekli Fe(III)-Ferrozin yöntemi (Berker vd., 2017)
**Fe(III)-Ferrozin Spektrofotometrik (Berker vd.,2010)
***Reflektometrik CUPRAC (Bener vd., 2013)

4.4 Geliştirilen FORS Yönteminin Tekrarlanabilirliği Ve Geri Kazanımın Belirlenmesi

FORS yönteminin tekrarlanabilirliği (%RSD) ve geri kazanımın belirlenmesi için makroalg ekstraktlarına Rosmarinik asit, tokoferol ve kuersetin katkısı yapılmıştır. Deney tüplerine 500 µL makroalg ekstraktı ve 50 µL 1,0 × 10^{-4} M Rosmarinik asit, tokoferol ve kuersetin çözeltilerinden ilave edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir. Yöntemin geri kazanımı %92.7 - %116 arasında değişmektedir.

Çizelge 4.3 : Fiber optik refraktans spektroskopisi (FORS) tabanlı Ferrik-Ferrozin testinin hassasiyeti ve geri kazanımı.

Makroalg ekstraktına Rosmarinik Asit İlavesi	eklenen konsantrasyon(µM)	1.00
	miktar(µM)	1.15
	Standart Sapma	0.044
	%RSD	3.79
	%REC	116
Makroalg ekstraktına α-Tokoferol İlavesi	eklenen konsantrasyon(µM)	1.00
	miktar(µM)	0.927
	Standart Sapma	0.045
	%RSD	4.87
	%REC	92.7
Makroalg ekstraktına Kuersetin İlavesi	eklenen konsantrasyon(µM)	0.500
	miktar(µM)	0.482
	Standart Sapma	0.012
	%RSD	2.612
	%REC	93.4

4.5 Fiber Optik Reflektometrik Sensörünün Makroalg Örneklerine Uygulanması

Fiber optik reflektometrik sensörü toplanan makroalg örneklerine uygulanmış ve Fe(III)-Ferrozin ve CUPRAC yöntemlerinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.4). Kullanılan yöntem sonuçları karşılaştırıldığında, Fiber Optik Reflektans sensörü kullanılarak yapılan Fe(III)-Ferrozin yönteminin diğer yöntemlere yakın sonuçlar verdiği görülmüştür.

Çizelge 4.4 : Makroalg örneklerinde Fe(III)-Ferrozin (FZ) temelli FORS yöntemi, Ferrozin yöntemi ve CUPRAC yöntem sonuçlarının karşılaştırılması.

Makroalg Toplama Dönemi	Makroalgea Türleri	Demir(III) - Ferrozin FORS (mmol troloks/g kuru örnek)	Demir(III) - Ferrozin (mmol troloks/g kuru örnek)	CUPRAC (mmol troloks/g kuru örnek)
Yaz Örnekleri (Temmuz 2022)	*Ulva lactuca*	0.0052(∓0.0016)	0.0064(∓0.0006)	0.0077(∓0.0006)
	Ceramium	0.0086(∓0.0012)	0.0071(∓0.0018)	0.0064(∓0.0028)
	Cystoseira	0.0264(∓0.0015)	0.0250(∓0.0010)	0.0234(∓0.0012)
	Dictyota	0.0156 (∓ 0.010)	0.0177 (∓ 0.009)	0.0168 (∓ 0.012)
Sonbahar Örnekleri (Kasım 2022)	*Ulva lactuca*	0.0104(∓0.0015)	0.0095(∓0,0013)	0.0115(∓0.0010)
	Ceramium	0.0058(∓0.0008)	0.0065(∓0.0010)	0.0050(∓0.0005)
	Cystoseira	0.0600(∓0,0014)	0.0583(∓0,0014)	0.0651(∓0.0014)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Fe(III)-Ferrozin reaktifi bir reçine üzerine immobilize edilmiş ve renkli Fe(II)-Ferrozin oluşumuyla ilişkili yansıma değişimi antioksidanlarla reaksiyon sonucu oluşan şelat 562 nm'de ölçülmüştür. Geliştirilen yöntem ile standart antioksidan bileşiklerine ve makroalglerde TAC tayini için hızlı, makul derecede hassas ve seçici bir fiber optik reflektometrik sensörü ile analizleri yapılmıştır. Antioksidanların TEAC katsayıları kıyaslandığında aşağıdaki bulunmuştur.

Kuersetin (QR) > Fisetin (FS) > Rosmarinik Asit (RA) >Kateşin (CT) > Morin (MR) > Gallik Asit (GA) > Troloks (TR) > Kafeik Asit (CFA) > Rutin (RT) > α-Tokoferol (TOC) > Askorbik Asit (AA) > Glutatyon (GSH)

Reflektometrik sensör, makroalg ekstraktları gibi kompleks matrislerin toplam antioksidan kapasitesinin trolox eşdeğer birimlerinde kantitatif olarak değerlendirilmesi için kullanılabilir. Geliştirien yöntem doğrusallık, hassasiyet ve geri kazanım ile doğrulanarak güvenilirliği ve sağlamlığı kanıtlanmıştır (Çizelge 4.1).

Demir (III)-Ferrozin ve reflektometrik sensör yöntemleriyle ölçülen bazı antioksidanların TEAC değerlerindeki farklılıklara rağmen, test edilen antioksidan ve makroalg ekstrelerinde iki analizle ölçülen TEAC değerleri neredeyse birbirine benzemektedir (Çizelge 4.2).

Bu çalışmanın sonucunda TAC ölçümü için önerilen reflektometrik sensörün pratik, çok yönlü ve düşük maliyetli olduğu görülmüştür. Bazı antioksidanların antioksidan gücü reflektometrik sensör yönteminde azalmış olmasına rağmen Fisetin, Glutatyon, Morin ve α-tokoferol gibi Fe(III)-Ferrozin yöntemi ile antioksidan kapasitesi ölçülemeyen antioksidanların, bu yöntem ile kapasitelerinin ölçüldüğü görülmüştür.

KAYNAKLAR

Albayrak, S., **Sağdıç, O. & Aksoy, A.** (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *26*(4), 401-409.

Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, *41*, 1-15.

Argüelles, S., Gómez, A., Machado, A., & Ayala, A. (2007). A preliminary analysis of within-subject variation in human serum oxidative stress parameters as a function of time. *Rejuvenation Research*, *10*, 621–636.

Aw, T. Y. (2003). Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiology Science*, *18*, 201-204.

Bahadar, A., & Khan, B. M. (2013). Progress in energy from microalgae: a review. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 27, 128-148.

Baldi, A. (2005). Vitamin E in dairy cows. *Livestock Production Science*, *98*, 117-122.

Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor & Francis Group, New York.

Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, *25*(2), 207-210.

Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., Demirata, B., & Apak, R. (2010a). Total antioxidant capacity assay using optimized Ferricyanide/Prussian blue method. *Food Analytical Methods*, 3, 154–168.

Berker, K. I., Güçlü, K., Demirata, B., & Apak, R. (2010b). A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods*, *2*, 1770-1778.

Berker, K. I., Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2017). Solid-phase extraction spectrophotometric determination of total antioxidant capacity in antioxidant-poor samples by using the ferric-ferrozine method. *Analytical Sciences*, *33(6)*, 683-689.

Cadenas, E., & Packer, L. (Eds.). (2002). *Handbook of Antioxidants*. Marcel Dekker.

Cao, G., & Prior, R. L. (1999). Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. In *Methods in Enzymology*, *299*, 50-62.

Celik, S. E., Ozyurek, M., Guclu, K., & Apak, R. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta, 81*(5), 1300-1306.

Chopra, K., & Bisnoi, M. (2008). Antioxidant profile of Spirulina: A blue-green microalga. In M. E. Gershwin & A. Belay (Eds.), *Spirulina in Human Nutrition and Health* (pp. 101-114). CRC Press.

Chew, B. P. (1996). Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. *Animal Feed Science and Technology*, *59*, 103-114.

Dündar, Y., & Aslan, R. (1999). Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller, antioksidanlar. *İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi*, 134-142.

Ebada, S., & Proksch, P. (2011). Marine organisms and their prospective use in therapy of human diseases. In H. Mehlhorn (Ed.), *Nature Helps*, 153-189. Springer Berlin Heidelberg.

Elliot, J. G. (1999). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technology, 53(2),* 46-48.

Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*, *10*, 25-28.

Foster, G. G., & Hodgson, A. N. (1998). Consumption and apparent dry matter digestibility of six intertidal macroalgae by *Turbo sarmaticus* (Mollusca: Vetigastropoda: Turbinidae). *Aquaculture*, *167*, 211-227.

Gazda, D. B., Fritz, J., & Porter, S. M. D. (2004). Determination of nickel(II) as the nickel dimethylglyoxime complex using colorimetric solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, *508*, 53−55.

Ghauch, A., Turnar, C., Fachinger, C., Rima, J., Charef, A., Suptil, J., & Martin-Bouyer, M. (2000). Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water. *Chemosphere*, *40*, 1327−1333.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., & Saccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status. *Free Radical Biology and Medicine,* 29, 1106-1114.

Goodwin, T. W. (1980). *The Biochemistry of Carotenoids, Plants*. Chapman and Hall.

Gültekin, S. (2022). *Gebelik süresince ve doğum sonrasında uygulanan akrilamidin, sıçan yavrularının testis fonksiyonları üzerindeki toksik etkilerinin incelenmesi ve E vitamininin koruyucu rolünün araştırılması* (Yüksek lisan tezi). İnönü Üniversitesi.

Halliwell, B., & Aruoma, O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species: Mechanisms and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters, 281,* 9-19.

Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: An update. *Biochemical Society Symposia*, *61,* 73-101.

Hariskos, I., & Posten, C. (2014). Biorefinery of microalgae: Opportunities and constraints for different production scenarios. *Journal of Biotechnology*, *9(6)*, 739-752.

Heim, K. E., Tagliaferro, R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*, 572-584.

Huang, D. J., Ou, B. X., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1841-1856.

Huang, D. J., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 4437-4444.

Ioannou, E., & Roussis, V. (2009). Natural products from seaweeds. In A. E. Osbourn & V. Lanzotti (Eds.), *Plant-derived Natural Products* 51-81. Springer-Verlag.

Ioannou, E., Vagias, C., & Roussis, V. (2010). Bioactive metabolites from marine algae. *Biological Environment*, *26*, 68-72.

Ivanisova, E., Tokar, M., Mocko, K., Bojnanska, T., Marecek, J., & Mendelova, A. (2013). Antioxidant activity of selected plant products. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *2*, 1692-1703.

Kalyanaraman, B. H., Karoui, R. J., & Singh, C. C. (1996). Felix detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols: A high resolution ESR spin-trapping study at Q-band. *Analytical Biochemistry*, *241*, 75-81.

Karasakal, A. (2007). *Kuşburnu bitkisinde spektrofotometrik yöntemle askorbik asit tayini.* İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

Keskin, E & Erkmen, G. (1987). Besin Kimyası, Güryay Matbaacılık, Beşinci Basım, İstanbul.

Kösem, E. (2012). *Manganese Complexes As Catalase And Superoxide Dismutase Mimics; Structure And Reactıvity Relatıonships* (Doktora Tezi), Department of Chemistry, Loughborough University, Leicestershire, UK.

Lane, A. L., Mular, L., Drenkard, E. J., Shearer, T. L., Engel, S., Fredericq, S., Fairchild, C. R., Prudhomme, J., Le Roch, K., Hay, M. E., Aalbersberg, W., & Kubanek, J. (2010). Ecological leads for natural product discovery: Novel sesquiterpene hydroquinones from the red macroalga *Peyssonnelia* sp. *Tetrahedron, 66*(2), 455-461.

Lindsey, Zemke-White, W., & Clementes, K. D. (1999). Chlorophyte and rhodophyte starches as factors in diet choice by marine herbivorous fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 240*(1), 137-149.

Ling, A. L. M., Yasir, S. M., Matanjun, P., & Bakar, M. F. A. (2013). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of selected commercial seaweeds of Sabah, Malaysia. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, *3*(3), 234-238.

MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(13), 2046-2056..

Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., & Salunkhe, D. K. (1995). *Food antioxidants: Technological, toxicological and health perspectives.* CRC Press.

McClanahan, T. R., Cokos, B. A., & Sala, E. (2002). Algal growth and species composition under experimental control of herbivory, phosphorus, and coral abundance in Glovers Reef, Belize. *Marine Pollution Bulletin, 44*(5), 441-451.

Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry, 52*, 711-760.

Miao, X., & Wu, Q. (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, *110*(1), 85-93.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science, 84*(4), 407-412.

Miura, Y., Kondo, K., Saito, T., Shimada, H., Fraser, P., & Misawa, N. (1998). Production of the carotenoids lycopene, β-carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *Applied and Environmental Microbiology, 64*(4), 1226-1229.

Magalí, O., Olmedo-Masat, Rao, P., Rodríguez-Pérez, D., Arijón, M., & Sánchez-Carnero, N. (2020). How far can we classify macroalgae remotely? An example using a new spectral library of species from the South West Atlantic (Argentine Patagonia). *Remote Sensing*, *12*(4), 123-135.

Orhon, O. (2009). Çeşme Yarımadası Bazı Denizel Alg Türlerinin Kimyasal İçerikleri ve Besin Değerleri. (Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hidrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa).

Ötük, & Johansson, C. (1980). Alglerden tek hücre proteini eldesi. *Sempozyum 3, Kükem.*

Özvarol, Y. (2009). Kuzeydoğu Akdeniz Kıyıları (Gazipaşa-İskenderun)'nın Makrobentik Deniz Florasının Belirlenmesi. (Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta).

Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry, 30*(4), 652-664.

Pal, D., Parakash, D., & Amla, D. V. (1998). Chemical composition of green seaweeds of Saurashtra coast. *Botanica Marina, 20*(6), 359-362.

Peterson, J., & Dwyer, J. (1998). Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research, 18*(12), 1995-2018.

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science, 4*(2), 89-96.

Poljsak, B. & Jamik, P. (2010). Methodology for oxidative state detection in biological systems. In Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects; Cell Biology Research Progress Series; Kozyrev, D., Slutsky, V., Eds.; *Nova Science:* New York, NY, USA.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(10), 4290-4302.

Shahidi, F. (1997). Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications, *The American Oil Chemists Society*, *2*(10).

Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology, 82*(2), 291-295.

Soeder, C. J. (1976). Zur verwendung von mikroalgen fur ernahrungszwocke. *Naturwissenschaften, 63*(3), 131-138.

Suali, E., & Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16*(6), 4316-4342.

Taşkın, E. (1999). *İskenderun Körfezi (Hatay Sahili) Makroalgleri*, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.

Telefoncu, A. (1995). Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir Fermentation and Bioengineering, *84*, 330–332.

Thomas, M. J. (1995). The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35*(1), 21-29.

Tutem, E., **Apak R. & F. Baykut,** (1991), Spectrophotometric determination of trace amounts of copper (I) and reducing agents with neocuproine in the presence of copper (II). Analyst (Cambridge, UK), 116-89.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39*(1), 44-84.

Yeh, K. L., Chang, J. S., & Chen, W. M. (2010). Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Engineering in Life Sciences, 10*(3), 201-208.

Yoshie-Stark, Y., Hsieh, Y. P., & Suzuki, T. (2003). Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *Journal of Tokyo University of Fisheries, 89*(1), 1-6.

Wahbeh, M. I. (1997). Amino acid and fatty acid profiles of four species of macroalgae from Aqaba and their suitability for use in fish diets. *Aquaculture, 159*(2), 101-109.

Wheeler, G. L., Jones, M. A., & Smirnoff, N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature, 393*(6683), 365-369.

Wilson, S. (2001). Multiscale habitat associations of detrivorous blennies (Blenniidae: Salariini). *Coral Reefs, 20*(3), 245-251.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elenur İMERT

ÖĞRENİM DURUMU :

- **Lisans** : 2020, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Ozyurt D., İmert E., Öztürk B. D., Demo L. K., Cam A. O., Ozbayram E. G., Cetin K. I .B., Albay R. A., Albay M.** 2023. Development of a new method for determination of total antioxidant capacity of the macroalgae using fiber optic reflectance spectrophotometer. *Euroanalysis XXI*, August 27-31, 2023 Geneva, Switzerland.