T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTARKTİKA'DAN İZOLE EDİLEN *AUXENOCHLORELLA PYRENOIDOSA* OZCİMEN.001 MİKROALGİNİN SARS-COV-2'YE KARŞI ANTİVİRAL ETKİNLİĞİ

Sena GÜLSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Haziran, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTARKTİKA'DAN İZOLE EDİLEN *AUXENOCHLORELLA PYRENOIDOSA* OZCİMEN.001 MİKROALGİNİN SARS-COV-2'YE KARŞI ANTİVİRAL ETKİNLİĞİ

Sena GÜLSOY tarafından hazırlanan tez çalışması 08.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Hanzade AÇMA, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Antarktika'dan İzole Edilen *Auxenochlorella Pyrenoidosa* Ozcimen.001 Mikroalginin SARS-CoV-2'ye Karşı Antiviral Etkinliği başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Sena GÜLSOY

İmza

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitim hayatım boyunca bilgi birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve her konuda destek olan değerli tez danışman hocam sayın Prof. Dr. Didem Özçimen'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda benden yardımlarını esirgemeyen sayın Dr. Benan İnan'a ve doktora öğrencisi Anıl Tevfik Koçer'e teşekkür ederim.

Bu süreçte moral ve motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayarak bana güç veren dostlarıma ve aileme teşekkür ederim.

Tez çalışmasındaki antiviral testlerin gerçekleştirilmesini sağlayan TÜBİTAK MAM araştırmacılarından Dr. Müge Serhatlı ve Fatih Karakaya'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

"Bu tez çalışmasında kullanılan kutup mikroalgi örneklerinin Antarktika'dan eldesi, T.C. Cumhurbaşkanlığı himayesinde, T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı uhdesinde ve TÜBİTAK MAM Kutup Araştırmaları Enstitüsü koordinasyonunca desteklenmiştir."

Sena GÜLSOY

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ vi
KISALTMA LİSTESİ vii
ŞEKİL LİSTESİ viii
TABLO LİSTESİ ix
ÖZET x
ABSTRACT xii
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti....1
1.2 Tezin Amacı....2
1.3 Orijinal Katkı....2
2 GENEL BİLGİLER 3
2.1 Antarktika Bölgesinin Genel Özellikleri....3
2.2 Kutup Algleri....4
2.2.1 Kutup Alglerinin Ekstrem Koşullara Adaptasyonları....4
2.3 Koronavirüslerin Genel Özellikleri....7
2.4 SARS-CoV-2 Taksonomisi....8
2.5 SARS-CoV-2 Viral Yaşam Döngüsü....9
2.6 SARS-CoV-2 Patogenezi....10
2.7 Alglerin Antiviral Etki Mekanizması....11
2.8 Viral Patagonez Boyunca Alglerin Antiviral Etkisi....14
2.8.1 Virüslerin Vücuda Girişinin Engellenmesi....14
2.8.2 Damar Sisteminden Viral Geçişin Engellenmesi....18
2.8.3 Viral Yaşam Döngüsünün İnhibe Edilmesi....18
2.8.4 İmmunomodulatör Bileşikler Üreten Algal Bileşikler....23
2.9 Algal Bileşenlerin SARS-CoV-2'ye Karşı Etkinliği....24
3 MATERYAL ve METOT 26
3.1 Hammaddeler ve Cihazlar....26
3.1.1 Mikroalgler....26
3.1.2 Kimyasal Maddeler....27
3.1.3 Kullanılan Cihazlar....27
3.2 Mikroalglerin Kültivasyonu....28
3.3 Mikroalglerin Hasatı ve Kurutulması....31

3.4 Mikroalglerden Yağ Ekstraksiyonu 32
3.5 Mikroalglerin Karakterizasyonu 32
3.6 Mikroalglerin Antiviral Aktivite Testi 41
4 SONUÇLAR ve TARTIŞMA **42**
4.1 Optik Yoğunluk Analizi ve Büyüme Kinetiği 42
4.2 Karakterizasyon Sonuçları 44
4.3 Mikroalglerin Antiviral Aktivitesi 53
5 SONUÇ VE ÖNERİLER **54**
KAYNAKÇA **57**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **66**

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
w/w	Ağırlıkça
β	Beta
dk	Dakika
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
g	Gram
t_d	İkilenme Zamanı
km	Kilometre
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
µ	Spesifik Büyüme Hızı
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ADE	Antikor Bağımlı Güçlendirme
ALV-J	Avian Leukosis Virüsü Altgrup J
ATP	Adenozin Trifosfat
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Tolüen
CoV	Koronavirüs
DENV	Dang Virüsü
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EBV	Epstein-Barr virüsü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EV71	Enterovirüs71
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Radyasyon
Gp	Glikoprotein
HBV	Hepatit B virüsü
HCV	Hepatit C virüsü
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HSV	Herpes Simpleks Virüsü
IAV	İnfluenza A Virüsü
MERS	Orta Doğu Solunum Sendromu
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Hidrojen
OD	Optik Yoğunluk
PF	Fotosistem
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asiti
RAS	Renin Anjiotensin Sistemi
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT	Ters Transkriptaz
SARS-CoV-2	Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu
TLR	Toll Benzeri Reseptör
UV	Ultraviyole
VSV	Respiratuar Sinsisyal Virüs

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Koronavirüsün şematik yapısı……....8

Şekil 3.1 *Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001* mikroalginin 100x mikroskop görüntüsü…….……26

Şekil 3.2 Petri kabında yetiştirilen mikroalg kültürleri……...29

Şekil 3.3 Çalkalamalı inkübatörde yetiştirilen mikroalg kültürleri…….....30

Şekil 3.4 Santrifüjden çıkarılan mikroalg kültürü ve kurutulmuş mikroalgler……...31

Şekil 3.5 Yağ ekstraksiyonunda kullanılan sıcak su banyosu…….....32

Şekil 3.6 UV-Vis-spektrofotometre cihazı ……..…33

Şekil 3.7 Karbonhidrat analizinde mikroalg örneklerinde gözlenen renk değişimi.....34

Şekil 3.8 Protein analizinde mikroalg örneklerinde gözlenen renk değişimi…….....36

Şekil 3.9 Soxhlet ekstraksiyonu……..37

Şekil 3.10 Rotary evaporatör ile etanolün uçurulması…….....38

Şekil 4.1 Farklı koşullarda yetiştirilen mikroalglerin zamana bağlı OD değişimi…....42

Şekil 4.2 Glikoz standart eğrisi……...45

Şekil 4.3 Mikroalglerin karbonhidrat miktarı……..45

Şekil 4.4 Protein standart eğrisi……...46

Şekil 4.5 Mikroalglerin protein miktarı……...46

Şekil 4.6 Mikroalglerin içerdiği yağ miktarı……...47

Şekil 4.7 Metanol/yağ molar oranı ve %1.5 KOH/yağ (wt.) koşullarında hazırlanan kutup mikroalgi yağının metil esterinin kromatogramı…….....48

Şekil 4.8 Metanol/yağ molar oranı ve %1.5 KOH/yağ (wt.) koşullarında hazırlanan nitrat stresli kutup mikroalgi yağının metil esterinin kromatogramı.....48

Şekil 4.9 Mikroalglerin klorofil-a ve β-karoten miktarı……..49

Şekil 4.10 *Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001* mikroalginin FTIR spektrumu.....50

Şekil 4.11 Mikroalglerin antioksidan aktivitesi.....51

Şekil 4.12 Kutup alglerinin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....53

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 SARS-CoV-2 taksonomik yapısı.....8
Tablo 2.2 Algal bileşenlerin antiviral etki mekanizması.....13
Tablo 2.3 Karragenanın SARS-CoV-2 antiviral etkisine yönelik klinik çalışmalar.....25
Tablo 3.1 *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalginin bilimsel sınıflandırılması.....27
Tablo 3.2 BG-11 besiyeri ortamı için kullanılan kimyasallar ve miktarları…….....28
Tablo 3.3 İz Elementi solüsyonu için kullanılan kimyasallar ve miktarları.....29
Tablo 3.4 Mikroalglere uygulanan stres koşulları.....31
Tablo 3.5 Standart glikoz konsantrasyon değerleri.....34
Tablo 3.6 Protein analizinde kullanılan reaktiflerin ve standartların miktarları.....35
Tablo 4.1 Mikroalglerin hesaplanan kinetik değerleri.....43
Tablo 4.5 *Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001* mikroalginin antibakteriyel analiz sonuçları.....51

ÖZET

Antarktika'dan İzole Edilen *Auxenochlorella Pyrenoidosa* Ozcimen.001 Mikroalginin SARS-CoV-2'ye Karşı Antiviral Etkinliği

Sena GÜLSOY

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Algler içerdikleri karbonhidrat, protein, pigment, yağ gibi değerli metabolitler sayesinde antiviral, antitümör, antibakteriyel gibi özelliklere sahip olan, tıp sektöründe önemli yer tutan sürdürebilir kaynaklardır. Farklı koşullarda yaşayabilen alglerin kutuplarda yaşayan türleri, sahip oldukları ektrem koşullara adaptasyon yetenekleri ile içerdikleri değerli metabolitlerin miktarını ve özelliklerini değiştirebilmektedirler.

Günümüzde viral hastalıkların tedavi yöntemlerinin sınırlı oluşu ve uygulanan tedavilere karşı zamanla direnç oluşması, yeni antiviral ajanların araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Yapılan çalışmalarda alglerden elde edilen karagenan, fukoidan, çeşitli yağ asitleri gibi birçok değerli bileşenin farklı virüslere karşı antiviral etkinliği kanıtlanmıştır.

Bu tez çalışmasında tüm Dünya'yı etkisi altına alan Covid-19 virüsüne karşı *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 kutup mikroalginin antiviral etkinliği incelenmiştir. Aynı zamanda kutup mikroalginin çeşitli stres koşullarında içerdiği değerli metabolitlerin miktarındaki farklılıklar araştırılmıştır.

Yapılan deneylerde kutup mikroalgi 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık olan ışık stresli ortamda, 500 mL besiyerinde 0.25 gram nitrat bulunan azot stresli ortamda ve stresin olmadığı normal koşullarda yetiştirilmiştir. Kimyasal içerik analizlerinin sonucunda kutup mikroalginin ışık stresli ortamda en yüksek karbonhidrat içeriğine, nitrat stresli ortamda ise en yüksek yağ içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Stres koşullarında kutup mikroalgi içerdiği karbonhidrat miktarını yaklaşık iki katına çıkarmıştır. Protein ve pigment miktarı ise yapılan nitrat ve ışık stresinde azalmıştır. Kutup mikroalginden elde edilecek olan ürüne yönelik uygun stres koşulu bulunduğunda, daha fazla miktarda ürün daha ekonomik koşullarda elde edilebilmektedir.

Yapılan antibakteriyel analizde kutup mikroalginin *E.coli* ve *S. aeurus* bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği ve XTT analizinde belirli bir konsantrasyona kadar L929 hücre hattına karşı sitotoksik etki göstermediği görülmüştür.

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 kutup mikroalginin ½ konsantrasyonda Covid-19 virüsüne karşı %100 antiviral etki gösterdiği ve Vero E6 hücrelerinde sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında incelenen kutup mikroalginin Covid-19 virüsüne karşı umut verici doğal bir antiviral kaynak olduğu bulunmuştur. Önemli sürdürülebilir kaynaklarımız olan kutup alglerinin antiviral etkinliğine yönelik ileri çalışmalar yapılarak hayat kurtaran antiviral ilaçların geliştirilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler : SARS-CoV-2, kutup algleri, mikroalg, antiviral, Covid-19

ABSTRACT

Antiviral Efficacy of *Auxenochlorella Pyrenoidosa* Ozcimen.001 Microalgae Isolated From Antarctica Against SARS-CoV-2

Sena GULSOY

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Didem OZCIMEN

Algae are sustainable resources that have antiviral, antitumor and antibacterial properties thanks to the valuable metabolites they contain such as carbohydrates, proteins, pigments and oils. Polar algae can change the amount and properties of their valuable metabolites with their adaptation abilities to extreme conditions.

Today, the limited treatment methods of viral diseases and the emergence of resistance to the treatments applied over time necessitate the search for new antiviral agents. In the studies, the antiviral effectiveness of many valuable components such as carrageenan, fucoidan, various fatty acids obtained from algae has been proven against different viruses.

In this thesis study, the antiviral effectiveness of *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 polar microalgae against the Covid-19 virus, which affects the whole world, was investigated. At the same time, differences in the amount of valuable metabolites contained in polar microalgae under various stress conditions were investigated.

In the experiments, polar microalgae were grown in a light-stressed environment under 16 hours of light / 8 hours of darkness, in a nitrogen-stressed environment with 0.25 grams

of nitrate in 500 mL of medium, and in temperate conditions without stress. As a result of chemical content analysis, it was seen that polar microalgae had the highest carbohydrate content in light-stressed environment and the highest oil content in nitrate-stressed environment. Under stress conditions, polar microalgae approximately doubled the amount of carbohydrate and lipid content. The amount of protein and pigment in the biomass decreased under nitrate and light stress. When the appropriate stress condition exists for the product to be obtained from polar microalgae, a larger amount of product can be obtained under more economical conditions.

In the antibacterial analysis, it was observed that the polar microalgae showed an antibacterial effect against *E.coli* and *S. aeurus* bacteria, and it did not show a cytotoxic effect up to a certain concentration against the L929 cell line in the XTT analysis.

It has been observed that *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 polar microalgae has 100% antiviral effect against Covid-19 virus and has no cytotoxic effect on Vero E6 cells. The polar microalgae examined in this thesis was found to be a promising natural antiviral resource against the Covid-19 virus. It is thought that life-saving antiviral drugs can be developed by conducting further studies on the antiviral effectiveness of polar algae which are important sustainable resources.

Keywords: SARS-CoV-2, polar algae, microalgae, antiviral, Covid-19

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Algler, hücre içerisinde birçok biyoaktif bileşene sahip olan doğadaki önemli sürdürülebilir kaynaklardan biridir. Karbonhidratlar, yağ asitleri, steroller, pigmentler, çeşitli vitamin ve proteinler gibi birçok bileşik algler tarafından üretilebilmektedir. Bu bileşiklerin sahip olduğu antitümör, antiviral, antibakteriyel, antioksidan gibi özellikler sayesinde algler tıp ve eczacılık sektöründe önemli bir yer tutmaktadır.

Dünya üzerinde aşırı çevresel koşulların hâkim olduğu kutup bölgelerinde yaşayan alglere kutup algleri denilmektedir. Kutup algleri yaşam ortamlarına uyum sağlarken biyokimyasal içeriklerinde bazı değişiklikler yapmaktadır. Örneğin düşük sıcaklık koşullarında kutup algleri membran akışkanlıklarını korumak ve hücre zarının donmasını engellemek için içerdikleri doymamış yağ asidi miktarını arttırmaktadırlar. Kutupların karanlık dönemlerinde fotosentez verimliliğini koruyabilmek için bazı kutup alglerinin pigment içeriğini arttırdığı da bilinmektedir. Bunlar ve benzeri adaptasyon stratejileri sayesinde kutup algleri biyokimyasal içeriklerini zenginleştirmektedir [1].

Virüsler vücuda genellikle bir epitel doku tabakası (solunum, beslenme, ürogenital) yoluyla veya ısırma, enjeksiyon gibi dermal lezyon yoluyla girmektedirler. Yapılan çalışmalarda bazı algal bileşenlerin topikal olarak uygulanmasının virüsün dermal tabakadan geçişini engellediği raporlanmıştır. Epitel doku tabakasından girebilen virüsler daha sonra damar sistemine geçmektedir. Bazı algal bileşikler virüsleri bozarak veya virüsleri hareketsiz tutarak damar sisteminde virüsün dolaşımını engelleyebilmektedir. Bazı algal bileşikler ise virüsün damar sisteminde taşınması esnasında bağışıklık sistemini güçlendirebilir ve artan makrofaj ve nötrofil aktivitesi ile antiviral etki gösterebilirler. Virüsler epitel dokulardan ve damar sisteminden geçtikten sonra hedef dokuya ulaşırlar ve hedef dokuda viral yaşam döngülerini başlatırlar. Bir virüsün yaşam döngüsü genel olarak adezyon, hücreye giriş, uncoating (kapsidin soyulması), replikasyon, biyosentez ve salınım aşamalarından oluşmaktadır. Alglerden elde edilen birçok bileşik viral yapışmayı önleyerek virüsün yaşam döngüsünü ilk adımdan bloke edebilmektedir. Alglerden elde edilen bileşenler hedef hücre reseptörüne bağlanmak için

virüs ile rekabet ederek veya kompleks virüs yüzeyine bağlanarak viral adezyon işlemini engelleyebilir. Bazı algal bileşenler ise proteinlerin konformasyonel değişikliklerine müdahale ederek viral adezyon için gerekli olan hücre sinyal yolaklarını bloke edebilirler. HIV başta olmak üzere bazı virüsler replikasyon için ters transkriptaz (RT) enzimini kullanırlar. RT enziminin inhibisyonu viral enfeksiyonu önlemenin en etkili yöntemlerinden biridir ve birçok algal bileşenin RT inhibisyonuna sahip olduğu bulunmuştur [2].

Alglerden elde edilen bileşenlerin birçok virüse karşı antiviral etkinlik gösterdiği in-vivo ve in-vitro çalışmalarla kanıtlanmıştır. SARS-CoV-2, temelde enfekte olan kişinin öksürmesi-hapşırması ile etrafa yayılan damlacıklar yoluyla bulaşan salgın bir viral hastalıktır. SAR-SOV-2 enfeksiyonuna karşı algal bileşenlerin antiviral etkinliği in silico çalışmalar ile araştırılmıştır. Yapılan in silico çalışmalarda bazı algal bileşenlerin Covid-19 spike proteini ile anahtar kilit uyumu göstererek başarılı bir şekilde bağlandığı raporlanmıştır. Bu çalışmalar ilgili algal bileşenlerin virüse bağlanarak, virüsün hücreye bağlanmasını bloke edebileceğini, dolayısıyla viral enfeksiyonu engelleyebileceğini düşündürmektedir [3].

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 kutup mikroalginin farklı ortam koşulları altında büyütülerek, içerdiği metabolitlerin değişiminin araştırılması ve bu kutup mikroalginin ekstraktlarının Covid-19 virüsü üzerindeki antiviral etkinliğinin araştırılmasıdır. Bu tez ile kutup alginin uygun stres koşulları ile biyokimyasal içeriğini arttırmak ve Covid-19 virüsü üzerindeki antiviral etkinliğini test etmek hedeflenmiştir.

1.3 Orijinal Katkı

Literatür verileri incelendiğinde alglerin antiviral etkinliğine yönelik çalışma bulunsa da kutup alglerinin antiviral etkinliğine yönelik çalışma yok denecek kadar azdır. Bu tez çalışmasında çalışılan *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 kutup alginin ise antiviral etkinliğine yönelik hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Aynı zamanda literatürde alglerin birçok virüse karşı in vivo ve in vitro olarak antiviral etkinliği incelenmiştir ancak Covid-19 virüsüne karşı in vitro çalışma yok denecek kadar azdır. Bu tez çalışması *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 kutup alginin Covid-19 üzerine etkinliğini değerlendiren ilk çalışmadır. Bu bağlamda bu tez çalışması ile elde edilen sonuçlar özgün bir değer taşımakta ve literatüre orijinal katkı sağlamaktadır.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Antarktika Bölgesinin Genel Özellikleri

Kutup bölgeleri aşırı çevresel koşulların görüldüğü, benzersiz ve oldukça üretken ekosistemlerdir. Dünya'nın kutup bölgeleri kuzeyde bulunan Arktik okyanusu çevresi ve güney kutbundaki Antarktika kıtasıdır. Arktik bölgesi ismini Kuzey kutbundaki Büyük Ayı takımyıldızı olan Arktos'tan almıştır. Güney kutbundaki Antarktika ise, Arktik bölgesinin karşısı anlamına gelmektedir. Antarktika kıtasının yaklaşık %98'i buzlarla kaplıdır. Bu nedenle Antarktika kıtasına bazen "donmuş" kıta denmektedir. Kıtada yazları 24 saat sürekli aydınlık, kışları ise 24 saat sürekli karanlık koşullar görülmektedir. Antarktika'da -89,2 °C kadar düşük sıcaklıklar ve 12 dakikada 36 °C 'ye varan ani sıcaklık değişimleri görülmektedir [4]. 13.209.000 km^2 yüz ölçümüne sahip olan Antarktika kıtası, büyüklük bakımından kıtalar arasında beşinci sıradadır. Doğu ve Batı Antarktika olarak iki bölgeden oluşmaktadır. Batı Antarktika dağlık adaları ve takımadalarını kapsayan bir buz tabakasından meydana gelmektedir. Doğu Antarktika ise büyük ölçüde yüksek buz kaplı bir platodan oluşmaktadır. Antarktika'nın bu iki bölgesi birbirinden 3.400 km uzunluğundaki Transantarktik dağlarıyla ayrılmaktadır [5].

Antarktika bölgesinde yaklaşık kalınlığı 1800 m olan buz kütlesi dünya buzunun ortalama %90'ını temsil etmektedir. Ekstrem koşulların görüldüğü kıtanın bazı bölgelerinde ise kullanılabilir suya erişim çok zordur ve bu bölgeler soğuk kuru çöl şeklindedir. Genel olarak bu kıta yeryüzünün en soğuk, en kurak ve en rüzgârlı bölgesidir [5].

Antarktika'ya giden ilk Türk bilim insanı Atok Karaali'dir. Atok Karaali'nin gittiği bölge 1968 yılında "Karaali Kayalıkları" olarak isimlendirilmiştir. Kıtaya giden bir diğer Türk bilim insanı Prof. Dr. Umran İnan'ın adı da gittiği bölgeye "İnan Tepesi" olarak verilmiştir. 2019 yılı itibariyle Türkiye'nin "Horseshoe" isimli yarımadada geçici bir üssü bulunmaktadır ve bilimsel çalışmalar hızla devam etmektedir [5].

Antarktika hem çok yoğun tuzlu ortamları hem de tuzsuz ortamları içerebilen, son derece karmaşık bir ekosisteme sahiptir. Bu ekosistem şartlarında yaşayabilen canlıların başında fok balıkları ve penguenler gelmektedir. Bitki türlerinden ise birçok liken, bazı yosun

türleri ve çiçek açan iki bitki türü yaşamaktadır. Bunların haricinde Antarktika bölgesinde birçok mikroorganizma yaşamaktadır ve bilinenler haricinde Antarktika'ya yapılan bilim seferlerinden getirilen örneklerden yeni mikroorganizmalar keşfedilmektedir [5].

2.2 Kutup Algleri

Dünya üzerinde aşırı çevresel koşulların hâkim olduğu kutup bölgelerinde birçok fotosentetik canlı yaşamaktadır. Antarktika bölgesindeki kutup algleri bölgenin en önemli fotosentetik birincil üreticilerindendir. Bu bölgede kutup algleri ilk kez 1950 ve 1960 yıllarında yapılan keşiflerle tanımlanmıştır. O zamandan günümüze kadar da araştırmalar devam etmiştir. Hem Arktik hem de Antarktik bölgesinde deniz buzu içinde en çok bulunan algler diatomlardır. Sadece Arktik bölgesinde 550'den fazla diatom türü tanımlanmıştır. *Fragilaria, Cylindrotheca* ve *Achnanthes* kutupların Arktik bölgesinde yaygın olan tek hücreli diatom cinsleridir. Güneyde bulunan Antarktika bölgesinde ise *Amphiprora, Pinnularia, Pleurosigma, Synedra* ve *Tropidoneis* türlerinin baskın olduğu bilinmektedir. Kutup algleri en çok birinci yıl buzunda, deniz buzunun içindeki boşluk katmanlarında, dip buzda ve buz boşluklarında görülmektedir [5], [9].

III. Ulusal Antarktik bilim seferi kapsamında kutuplardan alınan örneklerden yeni alg suşları izole edilmiş, isimlendirilmiş ve literatüre kazandırılmıştır. *Chlorella variabilis* strain YTU.ANTARCTIC.001 (Aksesyon numarası MN372092)[6], *Auxenochlorella pyrenoidosa* strain Ozcimen.001 (Aksesyon numarası MT951391)[7], *Chlorella sorokiniana strain* Egemen.001 (Aksesyon numarası MW147167.1)[8] suşları Antarktika'dan getirilen örneklerden izole edilmiş ve NCBI'a yüklenerek literatüre kazandırılmıştır.

2.2.1 Kutup Alglerinin Ekstrem Koşullara Adaptasyonları

Kutup bölgelerinde yaşayan algler, çoğu organizmanın yaşamsal faaliyetlerini durduran çevresel koşullarda metabolik aktivitelerini devam ettirebilmek için bazı adaptasyon stratejileri geliştirirler. Bu adaptasyon stratejileri genel olarak membran akışkanlığında, enzim kinetiğinde, hücresel uyumlu çözünenlerin ve hücre dışı bileşenlerin miktarında yaptıkları değişikliklerdir.

- **Membran Akışkanlığı**

Hücre zarları çeşitli besinler, hücresel atıklar gibi bileşenlerin hücrenin içine ve dışına hareketini kontrol eden seçici geçirgen yapılardır. Oldukça düşük sıcaklıkların görüldüğü

kutup bölgelerinde hücre zarlarının akışkanlığını korumak çok önemlidir. Hücre zarının donmasını engellemek için doymamış yağlar arttırılır. Böylece lipitlerin daha gevşek bir şekilde paketlenmesi sağlanır. Bu durum ise donma sıcaklığının düşmesini teşvik etmektedir. Polar diatomların, dinoflagellatların ve klorofitlerin çoklu doymamış yağ asitlerinin konsantrasyonlarını arttırarak soğuk bölgelere uyum sağladığı gösterilmiştir. Kutup algleri sadece hücre zarı fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asiti (PUFA) miktarında değişiklik yapmaz, aynı zamanda kloroplast zarına entegre olmuş galaktolipitlerde de değişiklik yapar [1].

- **Enzim Kinetiği**

Kutup algleri düşük sıcaklık koşullarına enzimlere bağlı çeşitli mekanizmalar kullanarak uyum sağlayabilmektedir. Buz diatomları ile yapılan çalışmalarda nitrat, amonyum ve karbon alımında görev alan enzimlerin çok düşük sıcaklıklarda optimum sıcaklık aralığına sahip olduğu tespit edilmiştir [10]. Kutup alglerinin enzime bağlı adaptasyonlarıyla ilgili bir başka örnek, *Fragilariopsis cylindrus'ta* pirofosfata bağlı fosfofruktokinaz miktarının yükselmesidir. Bu kutup alginde ayrıca rhodopsin'i kodlayan bir gen de bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada fototrofik karbon fiksasyonu için çok önemli olan ribuloz-1,6 bifosfat karboksilaz enzimi kutup alglerinde ılıman alglerde bulunan miktarın yaklaşık iki katı kadar olduğu gösterilmiştir [1].

- **Hücresel Uyumlu Çözünenler**

Hücresel uyumlu çözünenler genel olarak tuzluluğa uyum sağlamadaki görevleri ile tanınsalar da soğuk koşullara adaptasyonda da görevlidirler. Bu bileşikler enzim hidrasyon kürelerini koruyarak katalitik aktiviteyi stabilize ederler. Ayrıca hücre içi donma noktasını düşürürler. Polioller, şekerler, aminoasitler ve bunların betain, DMSP gibi türevleri hücresel uyumlu çözünenlere örnektir. Aminoasitlerden prolin, model diatom olarak bilinen *F. cylindrus* dahil olmak üzere birçok kutup alginde bulunan bir hücresel uyumlu çözünendir. Hücresel uyumlu çözünenlerden biri olan DMSP, soğuktan kaynaklanan denatürasyona karşı enzimleri stabilize etmektedir. Bu bileşen ılıman diatomlarında göreceli olarak düşük konsantrasyonda bulunurken, buz diatomlarında oldukça yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır [1].

- **Hücre Dışı Bileşenler**

Donma noktasının altında kutup alglerinin sulu bir dış ortamı sürdürebilmesi önemlidir. Bu amaçla kutup algleri tarafından buz bağlayıcı proteinler üretilir. Bu proteinler buz

büyümesini ve yeniden kristalleşmeyi engeller [11]. Bu proteinler, bilim insanları tarafından test edilen bütün buz alglerinde tespit edilmiştir ve ılıman koşullarda yaşayan alglerde olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum ise buz bağlayıcı proteinlerin kutup koşullarına adaptasyonda önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir [12].

- **Işık Birikimi**

Arktik ve Antarktik bölgelerde ışık yıl içinde oldukça değişkendir. Kutup algleri yüksek ışık seviyelerinde foto hasardan kaçınmalıdır, düşük ışık seviyelerinde ise fotosentez verimliliğini korumalıdır. Yapılan bir çalışmada 2 μE m^{-2} s^{-2} 'de büyütülen *F cylindrus* kültürlerinde 15 μE $m^{-2}s^{-2}$'de büyütülenlere göre tilakoid zar akışkanlığının ve akışı arttıran kloroplast PUFA'larının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum stres koşulunda pigment miktarının yaklaşık iki katına çıkması ve karbonhidrat miktarının yarı yarıya azalmasıyla ilişkilendirilmiştir [13]. Kutup bölgelerinde yaşayan *C. raudensis* düşük ışık seviyelerinde ışık hasatını maksimum düzeyde tutabilmek için oldukça yüksek PSII- PSI sitokiyometrisine sahiptir. *C. raudensis* yüksek ışık koşullarında ise fotoinhibisyon yapmaktan ziyade artan enerjiyi dağıtmak için büyüme oranını arttırmaktadır. Antarktika havuzundan izole edilen *Chlorella BI* türleri ise yüksek ışık seviyelerinde PSI ve PSII ışık absorpsiyonunu dengelemektedir ve böylece değişen ışık koşullarına karşı optimum fotosentetik aktiviteyi korumaktadır [1].

- **Antioksidanlar**

Düşük sıcaklık ve stres kaynaklı metabolik dengesizlikler ile oluşan reaktif oksijen türleri hücre içindeki oksik ortamı şiddetlendirir. Düşük sıcaklık koşullarında oksijenin artan çözünürlüğü ve deniz buzundaki sınırlı difüzyonla bu durum daha da artar. Bu sebeple düşük sıcaklıkların hâkim olduğu kutup bölgelerindeki alglerin reaktif oksijen türleriyle mücadele etmesi için güçlü antioksidanlara ihtiyaçları vardır. Kutup bölgesinde yaşayan diatom *Chaetoceros brevis* türü ile yapılan bir çalışmada, ksantofil döngüsüne ek olarak reaktif oksijen türlerine karşı savunma çok önemli olan yüksek süperoksit dismutaz enzim aktivitesi tespit edilmiştir [14]. Yapılan başka bir çalışmada kutup alglerinin antioksidan sistemler olarak askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz kullandığını göstermiştir. Prolin ve DMSP gibi bazı hücresel uyumlu çözünenlerin antioksidan olarak da görev yaptığı bilinmektedir. Bu bileşenlerin kutup alglerinde yüksek miktarda bulunması oksidatif hasardan korunmaya yardımcı olmaktadır. Kutup alglerinde oksidatif stresi tolere eden mekanizmaları anlamak için çok daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulsa da

günümüze kadar yapılan çalışmalar ROS hasarını önlemek için çeşitli mekanizmaların varlığını göstermektedir [1].

- **Karanlık Adaptasyon**

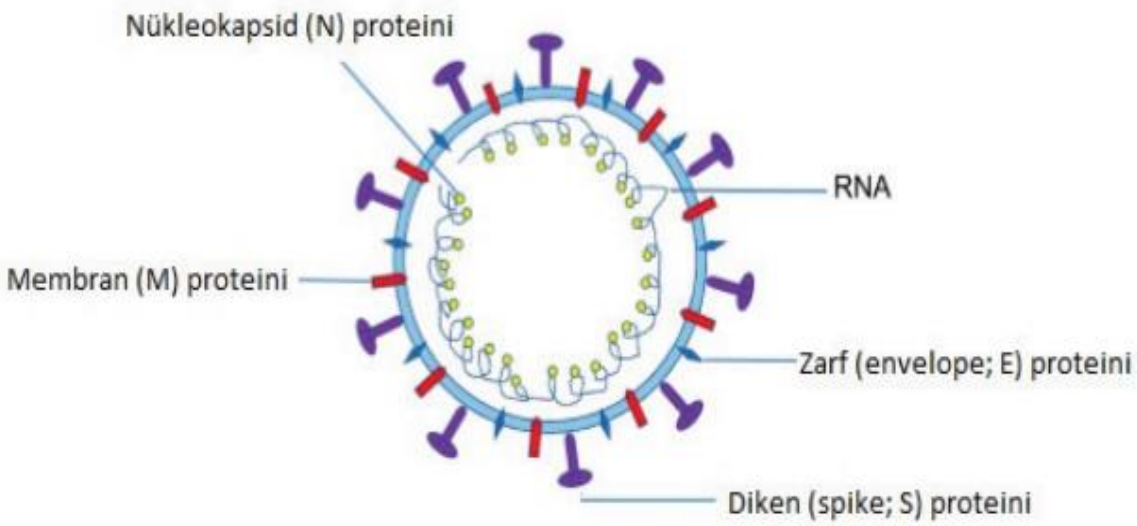
Kutup bölgelerinde yaşanan uzun süreli karanlık dönemlerde kutup algleri hayatta kalabilmektedir. Yapılan araştırmalar ılıman diatomların karanlık koşullarda 21-35 gün hayatta kalabildiği göstermektedir. Buna rağmen Antarktika bölgesindeki algler karanlık koşullarda 4-9 ay hayatta kalabilmektedir. Kutup algleri uzun süren karanlık koşullarda hayatta kalabilmek için glukan, nişasta gibi karbonhidrat depolama moleküllerini biriktirmektedir ve karanlık dönemlerde bu depolarını kullanmaktadırlar. Kutup bölgesindeki *C. subellipsoidea* ile ılıman koşullardaki muadilinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, kutup bölgesindeki türün amino asit taşıyıcılarında ve permeazlarda organik besinlerin daha fazla alınmasını sağlayan gen zenginleştirmeye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca *C. subellipsoidea'da* ılıman türlerinde homologları olmayan bazı karbonhidrat metabolizması gen aileleri tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada kar yosunu *Xantonema'nın* PSII'yi parçalara ayırdığı, ancak karanlık adaptasyon için LHC proteinlerini sağlam tuttuğu gösterilmiştir. Antarktika'daki daha geniş karanlık adaptasyon çalışmalarında *Koliella* türünde de benzer PS değişiklikleri raporlanmıştır [1].

2.3 Koronavirüslerin Genel Özellikleri

Koronavirüsler pozitif polariteli, tek zincirli, zarflı, ribonükleik asit (RNA) virüsleridir. Yüzeylerinde bulunan çubuksu uzantılar sebebiyle Latince'de "taç" anlamına gelen "corona" kelimesinden yola çıkılarak bu virüslere Koronavirüs adı verilmiştir. Yuvarlak ve çevresi çıkıntılarla kaplı olan virüsün çapı ortalama olarak 60-140 nm arasındadır. Koronavirüslerin genomu yaklaşık 30 kb' lık genetik materyale sahiptir ve RNA virüsleri arasında en büyük genoma sahip olan virüslerdir [15].

Koronavirüsler şekil 2.1'de görüldüğü gibi 4 yapısal proteinden oluşmaktadır. Bunlar spike (S) proteini, membran (M) proteini, zarf (E) proteini ve nükleokapsidin (N) proteinidir. Virüs yüzeyindeki çıkıntıları oluşturan S proteini S1 ve S2 olarak iki alt birimden oluşmaktadır. S1 alt birimi konak hücre reseptörüne bağlanmayı sağlar. S2 alt birimi ise viral ve hücresel zarların füzyonunu sağlamakla görevlidir. M proteini virüse şekil verir. E proteini virüsün toparlanmasında salınmasında etkilidir. N proteini ise

bağışıklık sistemine karşı virüsün bütünlüğünü korumasında ve viryon paketlenmesinde görevlidir [16].



Şekil 2.1 Koronavirüsün şematik yapısı **[17]**

2.4 SARS-CoV-2 Taksonomisi

Koronavirüsler; Coronaviridae ailesi, Orthocoronavirinae alt ailesi içinde yer almaktadırlar. Orthocoronavirinae alt ailesi Alfa, Beta, Gama ve Delta olarak 4 cins koronavirüs içermektedir. Bu 4 cins koronavirüs insan, domuz, yarasa, kedi, köpek, kanatlı ve kemirgenlerde bulunabilmektedir. Koronavirüslerin bazıları hafif soğuk algınlığı gibi hastalıklara sebep olurken bazıları çok daha ciddi hastalıklara sebep olmaktadır. 2002 yılında Çin'de görülen beta koronavirüs üyesi olan SARS ve 2012 yılında Suudi Arabistan'da görülen beta koronavirüs üyesi olan MERS birçok ölüme sebep olan koronavirüslerdendir [16].

Covid-19 pandemisine sebep olan SARS-CoV-2'nin taksonomisi Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 SARS-CoV-2 taksonomik yapısı [15]

Üst Alem	Riboviria
Alem	Orthornavirae
Şube	*Pisuviricota*

Tablo 2.1 SARS-CoV-2 taksonomik yapısı [15] (devamı)

Sınıf	*Pisoniviricetes*
Takım	*Nidovirales*
Alt Takım	*Cornidovirineae*
Aile	*Coronaviridae*
Alt Aile	*Orthocoronavirinae*
Cins	*Betacoronavirus*
Alt Cins	*Sarbecovirüs*

2.5 SARS-CoV-2 Viral Yaşam Döngüsü

Virüsün konak hücredeki yaşam döngüsü genel olarak 5 adımda gerçekleşmektedir.

- Bağlanma
- Hücreye Giriş
- Biyosentez
- Olgunlaşma
- Salınım

Virüsler konak hücreye bağlandıktan sonra ikinci adımda endositoz veya membran füzyonu (penetrasyon) ile hücre içerisine girerler. Konak hücrenin içinde viral içerik serbest bırakıldığında, virüsün RNA'sı replikasyon işlemi için konak hücre çekirdeğine girer. Viral mRNA ile biyosentez yapılır ve viral proteinler sentezlenir. Ardından yeni viral partiküller oluşarak olgunlaşır ve ekzositoz ile salınım gerçekleşir [16].

SARS-CoV-2 birçok farklı mekanizma ile hücre içine girebilmektedir. Bu mekanizmalardan en sık karşılaşılan anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE-2) reseptörleri ile gerçekleşen membran füzyonu olayıdır. Virüsün S-proteini konak hücrenin ACE-2 reseptörlerine bağlanır ve plazma membranı ile birleşir. Birleşme sonrası viral inklüzyon cisimcikleri hücreye giriş yapar. Hücre içinde viral RNA genomu serbest bırakılır ve transkripsiyon-translasyon süreçlerini yönlendirir. Bu mekanizmanın ilk

adımında rol oynayan ACE-2 reseptörleri kalp, akciğer, böbrek, bağırsak gibi birçok dokuda bulunmaktadır. Ayrıca endotel hücrelerinde de ACE-2 reseptörü bulunmaktadır. Virüsün hücreye girişi sırasında ACE-2 reseptörünün de hücreye alınması ve parçalanması renin-anjiotensin-aldosteron sistemini (RAS) etkilemektedir. Bu olayın sonucunda hücrede anjiotensin II artışı olmaktadır. RAS sistemindeki bozulma iskemiye, ödeme, hiperkoagülabiliteye ve birçok riskli duruma sebep olmaktadır. Hastalarda gözlemlenen inme, hipertansif kriz gibi durumların bu konuyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir [16].

SARS-CoV-2'nin konak hücreye girişinin bir başka yolu antikor bağımlı güçlendirme (ADE) yoludur. SARS-CoV-2, yüzeyinde CD32 reseptörü bulunan hücrelere anti-S antikorları varlığında, antikor ile kompleks oluşturarak girebilmektedir. Bu yolla monosit ve makrofaj hücrelerine girebilen virüsün sitokin ve kemokin salınımı yapmasının hücre apoptozuna etkili olabileceği düşünülmektedir. ADE yolu ile virüs hücreye girebilir ancak hücre içinde biyosentez yaptığına ve salındığına dair bir ispat bulunmamaktadır[16].

Koronavirüs enfeksiyonlarına karşı vücutta çeşitli mekanizmalarla bağışıklık yanıtı oluşabilmektedir. Doğal bağışıklık cevabının oluşabilmesi için en önemli etken virüste bulunan protein, nükleik asit ve lipit formundaki yapıların TLR denilen toll benzeri reseptörler tarafından tanınmasıdır. Koronavirüslerde bulunan S proteini TLR4 tarafından tanınabilmektedir. ssRNA TLR7/8 tarafından, replikasyon esnasında oluşan dsRNA ise TLR3 tarafından tanınabilmektedir. TLR3 ve TLR4, TRIF ve TRAM yoluyla IRF-3'ü indükler. IRF3 hücre çekirdeğine giderek interferon sentezini başlatmakla görevlidir. TLR7/8 ve TLR4 ise MYD88 yoluyla IRAK'ı indükler. IRAK NF-Kb yoluyla pro inflamatuvar sitokin ve kemokin sentezini başlatır. Kısaca, virüs hücre içine girdikten sonra hücre kendi içindeki yabancı olan molekülü tanır ve bu durumu düzeltmek için çeşitli sinyaller üreterek çevre hücrelere gönderir. Bu yolaklar sayesinde virüse karşı doğal immün yanıt oluşmaktadır [16].

2.6 SARS-CoV-2 Patogenezi

SARS-CoV-2, temelde enfekte olan kişinin öksürmesi-hapşırması ile etrafa yayılan damlacıklar yoluyla bulaşan ve virüsle temastan yaklaşık 5 gün sonra semptomları ortaya çıkan bir salgın bir viral hastalıktır. Hastalığın klinik seyri oldukça değişkendir. Bazı kişiler hastalığı asemptomatik atlatabilirken bazı kişilerde ciddi semptomatik etkiler

görülebilmektedir. Tipik bir SARS-CoV-2 hastasında en çok görülen semptomlar ateş, öksürük ve nefes darlığıdır. Çok sık olmasa da görülen diğer semptomlar aşağıda özetlenmiştir [16]:

Kulak burun boğaz semptomları: Nazal akıntı, burun tıkanıklığı, tat koku kaybı, hapşırma ve boğaz ağrısı [16].

Kas-İskelet sistemi semptomları: Eklem ağrısı, miyalji, halsizlik ve baş ağrısı [16].

Gastrointestinal sistem semptomları: Karın ağrısı, bulantı-kusma ve ishal [16].

Kardiyovasküler sistem semptomları: Kardiyovasküler sistemde en sık görülen semptom göğüs ağrısıdır. Kardiyovasküler semptomu olan hastalarda IL-6 , troponin T gibi biyobelirteçlerin miktarının fazlalaştığı görülür. Bu biyobelirteçlerdeki artış ile kardiyak aritmi, miyokardit, kalp yetmezliği gibi ölümle sonuçlanan durumlar ortaya çıkabilmektedir [16].

Dermatolojik semptomlar: Hastalarda dermatolojik bulgular genelde olgu fazında bildirilmiştir. Kaşıntı, morarma, döküntü, şişlik, kızarıklık gibi belirtiler görülebilmektedir [16].

Solunum Sistemi Semptomları: Covid-19'dan en çok etkilenen sistem solunum sistemidir. Akciğer patolojisinde yaygın alveoler hasarlar, hücresel fibromiksoid infiltratlar ve lenfosit baskınlığı ile interstisyel mononükleer inflamatuar infiltratlar saptanır [18], [19].

Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), pandemide ana ölüm nedenidir. ARDS'nin en önemli özelliği immün efektör hücrelerden salınan proinflamatuar sitokinler ve kemokinler sebebiyle oluşan kontrolsüz sistemik inflamatuar yanıt olan sitokin fırtınasıdır. SARS-CoV-2 ile tanı konan hastaların kan örneklerinde temel FGF2, GCSF, GMCSF, IFN-γ, IP10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, PDGFB, TNF-α, VEGFA, IL-1β, IL-1RA, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10'u kapsayan yüksek seviyede sitokin ve kemokin bulunmuştur. Ayrıca hastalarda yüksek düzeyde lökosit, anormal solunum hızı görülmektedir [20].

2.7 Alglerin Antiviral Etki Mekanizması

Virüslerin yaşam döngüsü genel olarak bağlanma-adsorpsiyon, penetrasyon, kapsidin açılması, biyosentez ve salınım aşamalarından oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde algal bileşenlerin viral yaşam döngüsü adımlarını inhibe edebileceği

görülmektedir. Alglerden türetilen değerli bileşenler çeşitli mekanizmalar yoluyla antiviral etki göstermektedir. Bu mekanizmalar aşağıda özetlenmiştir [21].

1. Virüsler konak hücreye girebilmek için gB, gC, gD, gH ve gL olmak üzere beş farklı glikoprotein alt birimini kullanırlar. gC alt birimi konak hücre zarının heparan sülfat alt birimiyle glikoz amino glikanlara bağlanır. Algal bileşenler gC'nin N-terminal bölgesine etkili bir şekilde bağlanabilir ve böylece virüsün heparan sülfata bağlanmasını bloke edebilir. Virüslerin gD alt birimi ise bir dizi TNF süper ailesine, immunoglobülinlere veya herpes virüs giriş aracıları olarak bilinen 3-O-sülfatlanmış heparan sülfat koreseptörlerine bağlanarak hücre içine girebilir. HIV için viral glikoprotein gp 120'nin V3 halkası, CD4 molekülleri ile etkileşime girer. Gp 120 ile CD4'ün etkileşimi sonucunda CCR5 ve CXCR4 kemokin reseptörleri aktive olur. Bu aktivasyon ise transmembran gp 41 proteininde konformasyonel değişikliklere sebep olur. Oluşan konformasyonel değişiklikler füzyon adımını başlatmaktadır. Polianyonik özelliğe sahip olan algal bileşenler, gp 120 V3 halkasının katyonik kısımlarını kolayca hedefleyebilir. Böylece algal bileşenler virüsün konakçı hücreye bağlanmasını engelleyen yapısal değişiklere sebep olabilmektedir. Ayrıca algal bileşenler gp 41 N-terminal kısmına seçici olarak bağlanarak da virüsün konak hücreye bağlanma mekanizmasını bloke edebilmektedir [21].
2. Viral adsorpsiyondan sonra virüsler hücre içi organellere girmektedir. Virüslerin hücre içine girmesi farklı mekanizmalar ile endositik alımla başlatılır. Yapılan çalışmalarda algal bileşenlerin viral kapsidi bağlayabildiği ve heparan sülfat etkileşimlerini bloke edebildiği bildirilmektedir. Bu sebeple algal bileşenler viral kapsidin açılmasını engelleyebilmektedir. Endozomlardaki düşük pH, kapsid E glikoproteininde (gE) konformasyonel değişikliğe sebep olarak viral kapsidin açılmasını sağlamaktadır. Algal bileşenler glikoprotein E'ye bağlanarak nükleokapsidin stabilize edilmesini sağlarlar. Böylece algal bileşenler viral kapsidin açılmasını engelleyebilirler [21].
3. Viral füzyon ve kapsidin açılmasının ardından gerçekleşen replikasyon sürecinde virüsler tek sarmallı RNA'dan çift zincirli DNA elde etmek için ters transkriptaz (RT) enzimini kullanırlar. Birçok algal bileşen, ters transkriptaz gibi replikasyon enzimlerini inhibe ederek veya konak hücrede mRNA'dan protein oluşumunu engelleyerek virüs transkripsiyonunu ve replikasyon sürecini bloke

edebilmektedir[22]. Alglerden elde edilen bazı bileşenlerin antiviral etki mekanizması Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2 Algal bileşenlerin antiviral etki mekanizması

Alg	Bileşen	Virüs	Etki mekanizması	Referans
Sargassum henslowianum	Fucoidan	HSV-1	Konak hücreye adsorpsiyonun bloke edilmesi	[23]
Kırmızı Alg	Neoagaroheksaoz	Norovirüs	TLR4 sinyalinin aktivasyonu yoluyla bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi	[24]
U. pertusa	Ulvan	VSV	Virüs replikasyonunun engellenmesi	[25]
Sargassum fusiforme	Polisakkarit	ALV-J	Konak hücreye adsorpsiyonun bloke edilmesi	[26]
Monostroma nitidum	Polisakkarit	EV71	Konakçı fosfoinositid 3-kinaz/protein kinaz B sinyal yolunu aşağı regüle ederek viral yaşam döngüsünün erken adımlarının bloke edilmesi	[27]
Ascophyllum nodosum	Asidik polisakkaritler	HIV-1, HBV, HCV	Viral enfeksiyonun erken aşamasında inhibisyon	[28]

Tablo 2.2 Algal bileşenlerin antiviral etki mekanizması (devamı)

Nizamuddinia zanardinii	Fukoidan	HSV-2	Virüs adsorpsiyonunun bloke edilmesi	[29]
Monostroma latissimum	Polisakkarit	EV71	Viral kapsid proteini VP1'in hedeflenerek viral replikasyonun inhibe edilmesi	[30]

2.8 Viral Patagonez Boyunca Alglerin Antiviral Etkisi

2.8.1 Virüslerin Vücuda Girişinin Engellenmesi

Virüslerin enfeksiyona neden olabilmesi için öncelikle insan vücuduna girmesi gerekir. Virüsler vücuda genellikle bir epitel doku tabakası (solunum, beslenme, ürogenital) yoluyla veya ısırma, enjeksiyon gibi dermal lezyon yoluyla girmektedirler. Alglerden elde edilen bazı değerli bileşenler virüslerin vücuda girişini engellemektedir [2].

- **Virüslerin Solunum Epitelinden Girişinin Engellenmesi**

Solunum virüsleri oldukça yaygın olan ve tüm çocuk ölümlerinin kabaca beşte birinden sorumlu olan virüslerdir. Bu virüsler doğrudan havadan soluma yoluyla veya virüs ile temas etmiş olan parmakların ağza veya burna teması ile bulaşmaktadır. Alglerden üretilen bazı bileşikler virüslerin solunum epiteline girmesini ve bu epiteli enfekte etmesini engelleyerek solunum yolu hastalıklarına karşı koruma sağlamaktadır [2].

Yapılan araştırmalarda alglerden elde edilen sülfatlanmış bir polisakkarit olan karragenan bileşiğinin CoV, IAV, parainfluenza, rhinozorus, metapnömoni ve solunum sinsityal virüsleri başta olmak üzere birçok virüsün vücuda solunum epitelinden girişini engellediği raporlanmıştır. Karragenan bileşiği viral glikoproteinlere bağlanarak virüslerin hedef hücreyi istila etmesini önleyen bir fiziksel bariyer görevi görmektedir. Karragenan bileşiği sayesinde epitel dokuya ulaşan virüs sayısı sınırlanmakta ve viral titre azalmaktadır. Bunun sonucunda hastalık semptomları hafif olmakta ve çok kısa sürede geçmektedir. Ayrıca yapılan araştırmalarda karagenan bileşiğinin kendisinin solunum

epitelinden geçmediği ve dolaşıma katılmadığı, dolayısıyla yan etkilere yol açma olasılığının düşük olduğu vurgulanmıştır. Farklı türdeki birçok virüsün vücuda solunum epitelinden geçişini engelleyen karagenan, ideal bir geniş spektrumlu önleyici ajandır. Karagenan bazlı birçok burun spreyi Avrupa ve Kanada'da pazarlanmaktadır [2].

Amerika Birleşik Devletleri'nde Iota Karragenan bazlı burun spreyinin Covid-19 hastaları ile yakından ilgilenen sağlık personeli üzerinde yapılan klinik araştırmasının raporu Ekim 2021'de yayınlanmıştır. Çalışma Arjantin'de aşılama planları henüz başlamamışken toplam on hastanede 400 katılımcı ile gerçekleştirilmiştir. Katılımcılar 1:1 oranında plasebo veya Iota karragenan koluna randomize edilmiştir. Burun spreyi günde 4 kez kullanılmıştır ve katılımcılar günlük olarak online anket doldurarak Covid-19 belirtisi gösterip göstermediklerini araştırma ekibine bildirmişlerdir. Anketlerde belirti gösterdiğini bildiren katılımcılara hemen PCR testi uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda katılımcılardan 12 kişinin Covid-19 olduğu bildirilmiştir. Bu kişilerden 10 tanesi plasebo grubundayken yalnızca 2 tanesinin Iota-Karragenan burun spreyi kullanan grupta olduğu raporlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, Iota Karragenan burun spreyinin Covid-19 hastalığını önlemek için güvenli ve etkili olduğunu göstermektedir [31].

Phaeophyceae sınıfındaki birçok algden elde edilebilen fukoidan, sülfatlanmış bir polisakkarittir. Wang vd. tarafından yapılan bir çalışmada *Kjellmaniella crassifolia*'dan elde edilen fukoidan bileşeninin İnfluenza A virüsüne (IAV) karşı etkinliği araştırılmıştır. Fukoidan, hücreye virüsün girişini engellemek için konakçıdan bağımsız bir şekilde IAV yüzey enzimi nöraminidaz ile etkileşime girmektedir. Ayrıca epidermal büyüme faktörü reseptörünün aktivasyonunu engellemek için viral zarf üzerindeki sialik asit kalıntıları ile etkileşime girmektedir. Böylece endositoz ile sonuçlanacak olan EGFR yolu bloke edilmiş olmaktadır. IAV tedavisinde kullanılan ticari ilaçlara göre fukoidan, dirençli viral suşlara yol açmamaktadır. Fare modellerinde fukoidanın burun boşluğuna uygulanmasıyla akciğerlerden daha düşük virüs titreleri elde edilmiş ve IAV enfeksiyonu önlenmiştir [32].

- **Virüslerin Beslenme Epitelinden Girişinin Engellenmesi**

Sindirim sistemi; mide asiti, mukuz, safra gibi bazı maddelerle korunmasına rağmen belirli virüslere karşı savunmasızdır. HSV, EBV ve CTMV gibi bazı virüsler ağız hücrelerini enfekte etmektedir. Reovirüsler, ADV'ler, ENTV'ler, Norwalk virüsü gibi

virüsler ise bağırsak yolunu enfekte etmektedir. Alglerden elde edilen bazı bileşenler oral olarak tüketildiğinde virüslerin sindirim epitelini enfekte etmesini engellemektedir [2].

Richard vd. tarafından 2020 yılında yapılan bir çalışmada *Undaria pinnatifida'*dan elde edilen fukoidanın oral yolla alımının IAV enfeksiyonuna etkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda fukoidanın oral alımının viryonların sindirim epiteli ile etkileşime girmesini engelleyerek IAV enfeksiyonu semptomlarını azalttığı raporlanmıştır. [33] Synytsya vd. tarafından yapılan ek bir araştırmada *Undaria pinnatifida'dan* üretilen fukoidanlar karakterize edilmiş ve antiviral etkinlikleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda oral olarak alınan fukoidanların iki IAV alt tipinin akciğer titrelerini yaklaşık %80 oranında azalttığı raporlanmıştır. Araştırmacılar bu azalmanın fukoidan ile viryonlar arasındaki doğrudan etkileşimden kaynaklandığını düşünmektedir. Ayrıca fukoidan ile tedaviden sonra dalaktaki B hücrelerinin çoğunluğunun büyük B hücreleri (plazma hücreleri) olduğu gözlenmiştir. B hücrelerinin büyümesi gibi farklılaşma durumları immünolojide antikor üretimini meydana getiren olaylardır. Bu durum fukoidanın, antikor üretimini arttırdığı anlamına gelmektedir [34].

- **Virüslerin Ürogenital Epitelden Girişinin Engellenmesi**

Ürogenital sistem üreme fonksiyonlarından, idrarın oluşumundan ve atılımından sorumludur. Ürogenital sistem HIV, HPV, HV ve HSV' den kaynaklanan enfeksiyona karşı oldukça hassastır. Alglerden üretilen bileşikler dişi ürogenital epiteline topikal olarak uygulandığında cinsel yolla bulaşan hastalıkların yayılmasını önlemede yardımcı olabilmektedir [2].

Birkaç klinik deneyde alglerden üretilen karagenan bazlı jellerin topikal olarak uygulanmasının cinsel yolla bulaşan virüsleri inhibe ettiği gösterilmiştir. Kadın gönüllüler ile yapılan bir klinik deneyde Karragenan bazlı Carraguard isimli jeli kullanan gönüllülerin %40 daha az HPV enfeksiyonuna yakalandığı raporlanmıştır. Araştırmacılar karragenanın HPV ile rekabet ettiğini ve ürogenital epitel hücre reseptörlerine bağlandığını böylece fiziksel bir bariyer görevi gördüğünü düşünmektedirler [35]. Yapılan bir başka çalışmada HPV enfeksiyonuna sahip olan 40 kadın dört ay boyunca karragenan bazlı jeli vajinal olarak kullanmıştır. Araştırmanın sonunda karagenan jelini kullanan kadınların %60'ı HPV negatif çıkarken, kontrol grubundan yalnızca %25'i negatif çıkmıştır [36].

Lektinler, hedef hücre ile virüslerin bağlanmasını engellemek için viral zarflar üzerindeki glikanlarla etkileşime girebilen karbonhidrat bağlayıcı proteinlerdir. Huskens vd. tarafından yapılan bir çalışmada *Nostoc ellipsosporum'dan* üretilen lektin siyanovirinin HIV enfeksiyonuna karşı etkinliği değerlendirilmiştir. Rhesus makakları kullanılarak yapılan araştırmanın sonucunda algal lektinlerin HIV enfeksiyonunu %63-85 oranlarında inhibe ettiği raporlanmıştır [37].

- **Virüslerin Dermal Lezyonlardan Girişinin Engellenmesi**

Virüsler deride aşınma, yırtılma, ısırma veya enjeksiyon ile oluşan açıklıklardan vücuda girebilmektedir. Topikal veya oral olarak alglerin kullanımı, virüslerin dermal lezyonlardan girişini engelleyebilmektedir [2].

Barros vd. tarafından yapılan bir çalışmada *Canistrocarpus Cervicornis'ten* üretilen diterpen bazlı topikal bir merhem kutanöz lezyon yoluyla HSV-1'in yayılmasını engellemek için test edilmiştir. Çalışmada kullanılan farelerin kimyasal tüy dökücü ile tüyleri alınmış ve cilt bölgesi çizilerek HSV-1 ile aşılanmıştır. Tedavi grubunda olan farelere aşılamadan 1 saat sonra başlanılarak 16 gün boyunca günde 3 kez tedavi uygulanmıştır. Enfeksiyon belirtileri aşılamanın 2. gününden itibaren başlamıştır. Araştırmanın 10. gününde diterpen içeren merhemle veya asiklovir ile tedavi edilen grupların tedavi edilmeyen gruplara göre daha az şiddetli lezyon gösterdiği raporlanmıştır. Ayrıca diterpen bazlı merhemin topikal olarak uygulanmasının karaciğer veya böbrek fonksiyonunda değişiklik gibi herhangi bir olumsuz etkisine rastlanmamıştır. Bu sonuçlar alglerden elde edilen diterpen bazlı merhemin düşük bir toksisiteye sahip olduğunu ve HSV-1 kutanöz lezyonların tedavisi için yararlı bir ajan olduğunu ortaya koymaktadır [38].

Castillo vd. tarafından 2020 yılında yapılan çalışmada kahverengi makro algler olan *Macrocystis pyrifera* ve *Durvillaea Antarktika*'dan elde edilen ekstrakların HSV'lere karşı antiviral etkinliği in vitro ve in vivo olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada HeLa hücre hattı ve HSV-1 deri enfeksiyonu olan fare modelinden elde edilen fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Kullanılan iki alg türünden de protein ekstraksiyonu yapılmıştır. Alglerden elde edilen özütlerin antiviral etkinliği denenmeden önce hücre kültürleri için sitotoksik olup olmadığı değerlendirilmiştir ve toksik olmayan maksimum doz belirlenmiştir. Antiviral aktivite testlerinin sonucunda her iki ekstre de asiklovire duyarlı ve asiklovire dirençli HSV-1 ve HSV-2'ye karşı antiviral aktivite göstermiştir. Alg

ekstraktlarının asiklovire dirençli HSV-1 ve HSV-2'ye karşı antiviral etkinlik göstermesi, antiviral mekanizmasının asiklovirden farklı olduğunu düşündürmektedir. İn vitro çalışmalardan başarılı sonuçlar alındıktan sonra in vivo denemeler yapılmıştır. Deri lezyonu oluşturulan farelere HSV-1 enfekte edilmiştir ve alg ekstraktları 8 saat arayla günde iki kez uygulanmıştır. Alg ekstraktları farmasötik bazlı hidrojel araç hidroksimetil selüloz içinde 5 mg/ml'de formüle edilmiştir. İn vivo çalışmaların sonucunda alg ekstraktlarının HSV-1 cilt lezyonlarına karşı asiklovirden daha iyi performans gösterdiği bulunmuştur. Dikkat çekici bir şekilde, *D. antarctica* özü, *M. pyrifera* özünden daha iyi antiviral etkinlik göstermiştir. Bu çalışmada bildirilen olumlu sonuçlar incelendiğinde, Herpes Simpleks virüsüne karşı özellikle Antarctica alg ekstraktlarının güçlü antiviral etkinliği olduğu anlaşılmaktadır [39].

2.8.2 Damar Sisteminden Viral Geçişin Engellenmesi

Alglerden elde edilen bileşikler damar sisteminde viral yayılmayı engelleyebilmektedir. Bazı algal bileşikler virüsleri bozarak veya virüsleri hareketsiz tutarak antiviral etki gösterirler. Bazı algal bileşikler ise virüsün damar sisteminde taşınması esnasında bağışıklık sistemini güçlendirebilir ve artan makrofaj ve nötrofil aktivitesi ile antiviral etki gösterebilirler. Yapılan çalışmaların sonucunda algal bileşenlerin damar sisteminden viral geçişi engellediği sonucu yorumlanarak elde edilmiş olsa da bu mekanizma tam olarak açıklanamamaktadır [2].

2.8.3 Viral Yaşam Döngüsünün İnhibe Edilmesi

Virüsler epitel dokulardan ve damar sisteminden geçtikten sonra hedef dokuya ulaşırlar ve hedef dokuda viral yaşam döngülerini başlatırlar. Bir virüsün yaşam döngüsü genel olarak adezyon, hücreye giriş, uncoating (kapsidin soyulması), replikasyon, biyosentez ve salınım aşamalarından oluşmaktadır.

- **Adezyon / Bağlanma**

Hedef hücre ile temas eden bir virüsün yüzey molekülleri, içselleşebilmek için hücrenin yüzey reseptörlerine bağlanır. Bazı virüsler hedef hücrede tek bir reseptöre bağlanabilirken, bazı virüsler hedef hücrede birden fazla reseptör ile bağlantı kurabilmektedir. Alglerden elde edilen birçok bileşik viral yapışmayı önleyerek virüsün yaşam döngüsünü ilk adımdan bloke edebilmektedir. Alglerden elde edilen bileşenler hedef hücre reseptörüne bağlanmak için virüs ile rekabet ederek veya kompleks virüs yüzeyine bağlanarak viral adezyon işlemini engelleyebilir. Bazı algal bileşenler ise

proteinlerin konformasyonel değişikliklerine müdahale ederek viral adezyon için gerekli olan hücre sinyal yolaklarını bloke edebilirler [2].

Lee vd. tarafından yapılan bir çalışmada kahverengi makro alg *Sargassum fusiforme'den* elde edilen palmitik asitin HIV-1 virüsüne karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Floresan spektroskopisi yapıldığında algal palmitik asitin CD4 reseptörüne bağlandığı, böylece HIV ile T hücrelerinin bağlanmasını engellendiği gözlenmiştir [40].

Mazumder vd. tarafından yapılan bir çalışmada kırmızı makro alg *Gracilaria corticata'dan* sülfatlanmış galaktan izole edilmiş ve anti HSV aktivitesi incelenmiştir. Ekleme zamanı deneylerinin sonucunda galaktanın yalnızca enfeksiyonun ilk aşamalarında antiviral etki gösterdiği bulunmuştur. Araştırmacılar algal galaktanın hücresel heperan sülfat ile viral glikoprotein arasındaki bağlantıyı bloke ettiğini düşünmektedir [41].

Shih vd. tarafından yapılan bir çalışmada *Arthrospira platensis'ten* allofikosiyanin pigmenti elde edilmiş ve EV71 enfeksiyonuna karşı etkinliği incelenmiştir. Alglerden elde edilen allofikosiyanin pigmenti viral aşılamadan önce hücre kültürüne eklendiğinde önemli bir antiviral etki göstermektedir. Ancak enfeksiyondan sonra allofikosiyanin ortama eklendiğinde oluşan antiviral etki azalmaktadır. Bu sonuç allofikosiyanin pigmentinin hedef hücrelere viral yapışmayı engellediğini göstermektedir [42].

- **Penetrasyon / Hücreye Giriş**

Virüsler hücreye iki temel mekanizma ile girmektedir. Zarflı ve zarfsız virüslerin her ikisi için de tipik olan birinci yöntem virüsün hücreye endositoz yoluyla girişidir. Bu yolda viryon hücre kompleksi hücre yüzey molekülü klatrin ile etkileşime girer ve hücre zarı tarafından istila edilir. İkinci mekanizmada ise hücre zarına yapışan bir virüs kendi yüzey zarfını hücre zarınınkiyle kaynaştırarak içeriğini hücre içine serbest bırakır. Alglerden elde edilen bileşenlerin viral yaşam döngüsünün hücreye giriş aşamasında antiviral etki gösterdiği düşünülmektedir ancak deneysel olarak algal bileşenin antiviral etkisinin adezyon aşamasında mı hücreye giriş aşamasında mı olduğunu belirlemek oldukça zordur. Ekleme zamanı deneyleri bu konuda detaylı bilgi verebilecek kadar hassas değildir [2].

Epidermal büyüme faktörü reseptörü yolunun aktivasyonu hücre büyümesinin yanı sıra bazı virüslerin hücreye girişini kolaylaştırıcı etki göstermektedir. Alglerden elde edilen

bazı bileşenler EGFR yolunu bloke ederek antiviral etki göstermektedir. Ancak EGFR yolunun inhibisyonu normal hücre fonksiyonunu da etkilediği için tehlikelidir [2].

Wang vd. tarafından yapılan çalışmada *Kjellmaniella crassifolia' dan* elde edilen fukoidanın IAV virüsünün hücreye girişini engellemek için, EGFR yolunu etkisiz hale getirdiği bulunmuştur [32]. Yapılan başka bir çalışmada *Monostroma latissimum'dan* üretilen sülfatlanmış rhamnan polisakkaritin, EV71'in hücre içine girişini engellemek için EGFR yolunu bloke ettiği gözlemlenmiştir [43].

- **Uncoating / Kapsidin Soyulması**

Alglerden elde edilen bazı bileşenler viral döngünün uncoating aşamasında enfeksiyonu bloke etmektedir. Yapılan bir çalışmada *Kladosifon okamuranus'dan* elde edilen fukoidan bileşeninin EGP ile etkileşime girerek anti DENV etkisi gösterdiği raporlanmıştır. EGP endositoz ve füzyona aracılık eden bir glikoproteindir. Fukoidanın bu glikoproteine müdahale etmesi sonucunda uncoating işlemi gerçekleşmemekte ve viral enfeksiyon inhibe olmaktadır [44].

- **Replikasyon**

Virüslerin hedef hücrelerde kopyalanma sürecini içeren replikasyon işlemi, virüsün çeşitine göre önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar antiviral ilaç geliştirmeyi zorlaştırsa da birçok farklı olası yol sağlamaktadır. Alglerden elde edilen değerli bileşenler viral replikasyonun belirli adımlarını inhibe ederek antiviral etki gösterebilmektedir. HIV başta olmak üzere bazı virüsler replikasyon için ters transkriptaz (RT) enzimini kullanırlar. RT enzimi konak hücreye dahil olabilen çift zincirli DNA provirüsünü sentezlemek için tek zincirli RNA şablonu kullanır. RT enziminin inhibisyonu viral enfeksiyonu önlemenin en etkili yöntemlerinden biridir ve birçok algal bileşenin RT inhibisyonuna sahip olduğu bulunmuştur [2].

Yapılan bir çalışmada *Dictyota menstruelis'ten* izole edilen diterpenlerin anti-HIV aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Antiviral mekanizma incelendiğinde algal diterpenlerin çift sarmallı DNA sentezini engellediğini görülmüştür. Yapılan başka çalışmalarda diterpenlerin RT enzimini inhibe ederek HIV virüsüne karşı antiviral etki gösterdiği desteklenmektedir [45] , [46].

HIV'in dünya genelinde yaygınlığı sebebiyle birçok algal ürünün anti-RT aracılı tedavisi araştırılmıştır. RT enzimini inhibe ederek anti-HIV etkisi gösteren algal bileşenlerin başında fukan, aljinat, λ-karagenan gelmektedir. Bazı çalışmalarda algal bileşenlerin RT

enzimini inhibe ederken ökaryotik polimerazları da inhibe ettiği ve sitotoksisiteye sebep olduğu gözlemlenmiştir. RT enzimleri DNA polimerazların bir türü olduğu için RT inhibitörleri bazen DNA polimerazları da inhibe edebilmektedir. Bu durum algal bileşenlerin anti-RT aracılı antiviral etkisini incelerken dikkat edilmesi gerekilen bir konudur. Temel hücresel fonksiyonları durdurmayan antiviral ajanlar geliştirmek hayati önem taşımaktadır [2].

RNA virüsleri genetik materyallerini kopyalamak için RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi (RDRP) kullanırlar. Birden fazla türü mevcut olan RDRP enzimi, bazı algal bileşenler tarafından inhibe edilebilmektedir. Wang vd. tarafından yapılan bir çalışmada algal karragenanın IAV mRNA ekspresyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Çalışma kapsamında yapılan ekleme zamanı deneyleri karragenanın virüsün hücreye girişinden sonra, salınımdan önce olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmada virüsün hücreye girişini engelleyemeyen karragenan bileşeni ticari Ribavirin'e benzer özellikler sergileyerek enfeksiyonu engellemiştir [47].

Literatürde birçok polifenolik bileşiğin RNA sentezini inhibe ettiğine yönelik çalışmalar mevcuttur. 2020 yılında yapılan bir çalışmada bitkisel kaynaklı polifenollerin SARS-CoV-2 RDRP enzimini inhibe ederek enfeksiyonu önlediği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan bitkisel kaynakların içinde algler yer almasa da birçok alg türünde benzer bileşenler mevcuttur. Alglerin antiviral etkinliğine yönelik daha fazla araştırma yapıldıkça SARS-CoV-2 için etkili enfeksiyon inhibitörleri bulunacağı düşünülmektedir [48].

- **Biyosentez**

Transkripsiyon işleminden sonra mRNA'lar proteinlere çevrilir. Bu işlem için konak hücrenin ribozom mekanizması kullanılır. Viral protein sentezini inhibe ederek antiviral özellik gösteren bileşenler normal hücre fonksiyonlarında görev almayan viral enzimlere etki etmektedirler.

HIV proteaz aktivitesi viral proteinlerin gelişimi için son derece önemlidir. Ayrıca HIV proteaz insan hücresel işlevlerinde hiçbir görev almaz, bu sebeple inhibisyonu istenmeyen etkilere yol açmaz. Ahn vd. tarafından yapılan bir çalışmada *E. cava'dan* elde edilen florotanninler HIV proteazı orta düzeyde inhibe etmiştir. Yapılan çalışmada algal florotaninlerin anti proteaz aktivitesinden daha yüksek düzeyde anti RT etkisi gösterdiği de bulunmuştur. Bu sonuç algal ürünlerden çok mekanizmalı antiviral ajanların gelişme

potansiyelini orta koymaktadır [49]. Proteaz inhibitörü olarak algal florotanninlerin kullanımı yapılan başka bir çalışmada detaylı olarak incelenmiştir. 80 tür siyanobakteri ve 500 tür ökaryotik algden izole edilen bileşenlerin proteaz aktivitesi incelenmiştir ve 39 türün proteaz aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Birçok farklı alg türünde görülen proteaz inhibisyonu etkisi, algal ürünlerin virüsün yaşam döngüsüne etki ederek enfeksiyonu önleyebileceğini ortaya koymaktadır [2].

- **Salınım**

Virüsler tomurcuklanarak veya hücre lizizi yoluyla hücreden dışarı salınabilmektedir. Tomurcuklanma, virüsün yüzey molekülleri ile hücrenin yüzey proteinleri arasında meydana gelen etkileşimler sonucunda gerçekleşmektedir. Algal bileşenler bu mekanizmaya etki ederek virüslerin etrafa yayılmasını, enfeksiyonun artmasını engelleyebilmektedir [2]. Nöraminidaz enzimi virüslerin çevreye salınımını kolaylaştıran bir influenza enzimidir. Wang vd. tarafından yapılan bir çalışmada *Kjellmaniella crassifolia' dan* izole edilen fukoidanın Nöraminidaz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada in vivo olarak fukoidan bileşeninin IAV enfeksiyonunu azalttığı, sağkalımı arttırdığı ortaya konmuştur [32].

Bazı virüsler enfekte oldukları hücreler ile komşu hücreleri kaynaştırarak, sinsitya yani çok çekirdekli hücre toplulukları oluşturmaya zorlarlar. Alg türevli bileşiklerin bazıları sinsitya oluşumunu engelleyerek antiviral etki gösterebilmektedir [2]. Yapılan bir çalışmada *Navicula directa*'dan sülfatlanmış bir polisakkarit olan naviculan izole edilmiş ve in vitro HIV füzyon testi yapılarak sinsityum oluşumunu engellediği bulunmuştur. Ayrıca yapılan ekleme zamanı deneylerinde naviculan bileşeninin adsorpsiyon aşamasında etkili olduğu görülmüştür. Bu yüzden algal naviculan çok mekanizmalı bir anti-HIV ajanıdır [50].

Xu vd. tarafından yapılan bir çalışmada kahverengi alg *Durvillaea Antarctica*'dan ekstrakte edilen polisakkaritlerin EV71'e karşı antiviral etkinliği incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda *D. Antarctica* polisakkaritlerinin EV71'in apoptozu indüklemek için kullandığı p53 sinyal yolunu aşağı regüle ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca bu polisakaritler, apoptozu başlatmak için sinyallemede yer alan inflamatuar sitokin üretimini de azaltmıştır. Bu çalışma, *Durvillaea Antarctica* alginden elde edilen polisakkaritlerin, EV71 virüs enfeksiyonuna karşı önemli bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir [51].

2.8.4 İmmunomodulatör Bileşikler Üreten Algal Bileşikler

Alglerden elde edilen bazı ürünler hücresel ve humoral bağışıklık yanıtını modüle edebilmektedir. Algal bileşikler IFN salınımını, sitokin/kemokin üretimini, inflamatuar yanıtı, antikor üretimini, nötrofil ve NK gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivasyonunu uyarıcı etki göstermektedir [2].

Kahverengi makroalg *Ascophyllum nodosum'dan* izole edilen bir polisakkarit Ascophyllan HS ile bağışıklık sistemi yanıtı arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Okimura vd. tarafından yapılan bir çalışmada Ascophyllan HS uygulanan farelerde histopatolojide azalma ve IL-12 seviyesinde artış görülmüştür. Yapılan ek araştırmalarda aynı bileşenin proinflamatuar sitokin üretimini arttırarak dendritik hücrelerin aktivasyonunu indüklediği gözlemlenmiştir. Ascophyllan HS interferon üreten hücre sayısını arttırarak, bağışıklık yanıtı için önemli olan Th1 ve Tc1 hücrelerinin sayısını arttırmıştır. Algal polisakkarit Ascophyllan HS ile yapılan bu çalışmalar, organizmanın belirli bir patojene karşı bağışıklık geliştirmesinde algal ürünlerin etkisini göstermektedir [52], [53]. Ancak Ascophyllan HS bileşenin viral enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtında etkisini netleştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

*Euglena gracilis'te*n elde edilen Paramylon bileşeni virüslere karşı immün sistem aktivasyonu yoluyla antiviral etkinliği incelenen bir polisakkarittir. Nakashima vd. tarafından yapılan bir çalışmada paramylon'un IAV enfeksiyonuna karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda algal polisakkarit olan Paramylon bileşeninin interlökinlerin, TNF'lerin ve IFN'lerin üretimini arttırarak farelerin hayatta kalma oranlarını yükselttiği raporlanmıştır [54].

Guo vd. tarafından *Coccomyxa gloeobotrydiformis'ten* elde edilen asidik polisakkarit AEX'in IBDV'ye karşı bağışıklık yanıtı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda AEX uygulamasının periferik kan mononükleer hücrelerinde nitrik oksit üretimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca algal bileşenin proinflamatuar ve T hücre farklılaşması sitokinlerini arttırdığı görülmüştür. Bu etkiler viral enfeksiyonla mücadele için bağışıklık sisteminin önemli olumlu tepkileridir [55].

Aynı bileşen ile yapılan diğer çalışmalar da incelendiğinde AEX'in immün sistemi uyarıcı bir aşı adjuvanı ve doğrudan antiviral ilaç olarak kullanım potansiyeli olduğu düşünülüyor. Ancak bağışıklık sistemi mekanizmaları son derece ayrıntılı olduğundan, AEX'in hangi yolakları baskıladığı hangi yolakları olumlu etkilediği detaylı bir şekilde

çalışılmalı, antiviral mekanizmasını netleştirmek için daha fazla araştırma yapılmalıdır[2].

2.9 Algal Bileşenlerin SARS-CoV-2'ye Karşı Etkinliği

Alglerden elde edilen bileşenlerin birçok virüse karşı antiviral etkinlik gösterdiği in-vivo ve in-vitro çalışmalarla kanıtlanmıştır. SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı ise algal bileşenlerin antiviral etkinliği in silico çalışmalar ile araştırılmıştır. Son yıllarda biyoinformatik alanı ve in silico çalışmalar yeni ilaç keşiflerinde son derece önemli bir yere sahiptir. Rauf vd. tarafından 2021 yılında yapılan bir çalışmada kahverengi alg türlerinden elde edilen 1018 bileşiğin, Covid-19 ana proteazıyla etkileşimi in silico metotlarla araştırılmıştır. Çalışmada 1018 bileşikten 7 tanesi daha detaylı incelenmiş ve aktif bölge ile yaptıkları etkileşimler görselleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda incelenen bütün bileşiklerin Covid-19 ana proteazı ile önemli bir bağlanmaya sahip olduğu gösterilmiştir. Detaylı olarak incelenen 7 bileşikten 4 tanesi karşılaştırma grubundan Lopinavir ve Remdesivir'den daha iyi bağlanma afinitesi göstermiştir. Bu çalışma Covid-19'a karşı ilaç keşfinde kahverengi alglerin kullanımı için temel verileri sağlamaktadır[56].

MubarakAli vd. tarafından 2021 yılında yapılan bir çalışmada siyanobakterilerden elde edilen peptitlerin Covid-19'a karşı etkinliği in silico olarak araştırılmıştır. Çalışmada *S. platensis, S. maxima* gibi *Spirulina* türlerinden elde edilen 13 peptit kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda 13 peptitten 5 tanesinin Covid-19 spike proteini ile anahtar kilit uyumu göstererek başarılı bir şekilde bağlandığı raporlanmıştır. Bu çalışma in vivo ve in vitro çalışmalar ile desteklendiğinde Spirulina türlerinin Covid-19 tedavisinde kullanımına yönelik önemli bir kaynaktır [3].

Antiviral etkinliği birçok çalışmayla kanıtlanmış olan algal karragenan bileşiğinin SARS-CoV-2 enfeksiyonuna etkinliğini değerlendiren klinik çalışmalar yapılmaktadır. Nazal burun spreyi olarak iota-karregenan'ın antiviral aktivitesi birkaç klinik araştırmada incelenirken, ivermektin ile kullanılması iki klinik çalışmada incelenmiştir ve Covid-19 hastaları için sonuçta iyileşme gösterdiği raporlanmıştır. Tablo 2.3 'de SARS-CoV-2 enfeksiyonu için karragenan içeren tedavilerin incelendiği bazı klinik çalışmalar gösterilmektedir [57].

Tablo 2.3 Karragenanın SARS-CoV-2 antiviral etkisine yönelik klinik çalışmalar[57]

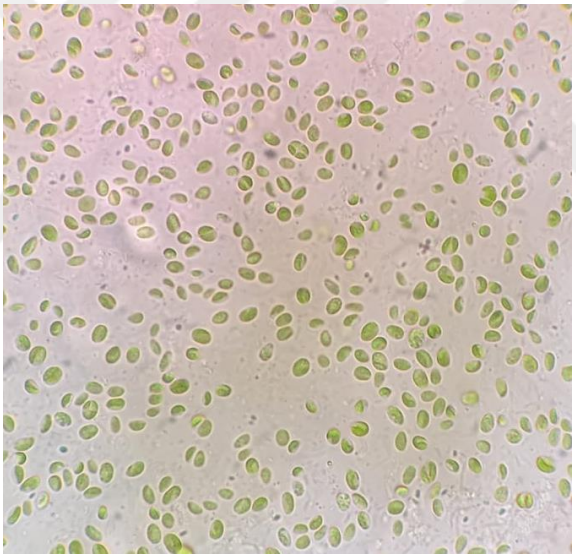
Çalışmanın Tanımlayıcı Numarası	Çalışmanın Başlığı	Doz / Uygulama Şekli	Konum
NCT04425850	Topic Ivermektin ve Karragenanın Covid19 Bulaşmasını Önlemede Faydası (IVERCAR)	Ivermektin burun spreyi ve Iota- Karragenan burun spreyi günde 5 kez bukkal damla olarak kullanılır.	Arjantin
NCT04701710	Ivermektin ve Iota-karragenan (Ivercar-Tuc) ile yoğun tedavi ile sağlık kurumlarında Covid19 Profilaksisi	Ivermektin 2 damla 6 mg, oral olarak 7 günde bir 12 mg'a eşittir ve 4 hafta boyunca günde 6 sprey iota-karragenan kullanılır.	Arjantin
NCT04681001	Sağlık çalışanlarında SARS-CoV-2, Covid-19 enfeksiyonunu önlemek için carragelose burun spreyi ile profilaktik tedavi	Coldamaris pro burun spreyi (1.2 mg/ml iota-karragenan içerir) burun deliklerine ve ağza günde 3 defa uygulanır.	Avusturya
NCT04590365	Covid-19 Profilaksisi için Karragenan Burun Spreyi	Coldamaris artı burun ve boğaz spreyi (%0,5 salin içinde Iota-karragenan %0,12)	UK

3
MATERYAL ve METOT

3.1 Hammaddeler ve Cihazlar

3.1.1 Mikroalgler

Bu tez çalışmasında III. Ulusal Antarktik bilim seferi kapsamında kutuplardan alınan örneklerden izole edilen ve literatüre kazandırılan *Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001* (Aksesyon numarası MT951391) alg suşu kullanılmıştır. Şekil 3.1'de *Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001* mikroalginin 100x mikroskop görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.1 *Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001* mikroalginin 100x mikroskop görüntüsü

Auxenochlorella pyrenoidosa zengin biyoaktif içeriğe sahip olan, ökaryot, tatlı su yeşil algidir. *Pyrenoidosa* tür adı, algin kloroplastında bulunan belirgin bir pirenoid yapısına işarettir [58]. *Auxenochlorella pyrenoidosa* mikroalginin bilimsel sınıflandırılması Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 *Auxenochlorella Pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalginin bilimsel sınıflandırılması

Alem	Protista
Bölüm	Chlorophyta
Sınıf	Trebouxiophyceae
Takım	Chlorellales
Aile	Chlorellaceae
Cins	Chlorella
Tür	*Auxenochlorella pyrenoidosa*

3.1.2 Kimyasal Maddeler

Yapılan deneysel işlemlerde mikroalglerin kültivasyonu için BG-11 ortamı kullanılmıştır. BG-11 besiyerini hazırlamak için $NaNO_3$, K_2HPO_4, $MgSO_47H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$, Sitrik Asit, Amonyum ferrik sitrat, Na_2EDTA ve Na_2CO_3 kimyasalları kullanılmıştır. BG-11 besiyeri ortamına ilave edilen iz elementi solüsyonu için ise H_3BO_3, $MnCl_2.4H_2O$, $ZnSO_47H_2O$, $Na_2MoO_4.2H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, $Co(NO_3)26H_2O$ kimyasal maddeleri kullanılmıştır.

Farklı koşullarda üretilen mikroalglerin karbonhidrat, protein, yağ ve pigment içeriklerini belirleme gibi analizler yapılırken etanol, fenol, glikoz, H_2SO_4, aseton, BSA, NaOH, Na_2CO_3, K-Na-tartarat, $CuSO_45H_2O$ kimyasalları kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmada kullanılan cihazlar :

- Analitik Terazi (Kern PFB)
- Çalkalamalı İnkübatör (WiseShake)
- Etüv (Binder)
- FTIR (Bruker Alpha)
- Gaz Kromatografisi (YL Instruments 6100)

- Optik Mikroskop (Olympus)
- Otoklav (Kerman)
- pH Ölçer (Kontrol 40)
- Santrifüj (Sigma 2-16 KL)
- Sıcak Su Banyosu (GFL)
- Ultrasonik Banyo (Alex Machine)
- Uv Spektrofotometre (PG 60 Instrument UV-Vis Spektrofotometre)
- Vorteks (Bıosan)

3.2 Mikroalglerin Kültivasyonu

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 mikroalginin yetiştirilmesi için besin ortamı olarak BG-11 besiyeri kullanılmıştır. BG-11 besiyeri ortamı için Tablo 3.2'de ve Tablo 3.3'te yazılan miktarlarda kimyasal maddeler hassas terazide tartılmış ve 829 ml saf suya ilave edilmiştir.

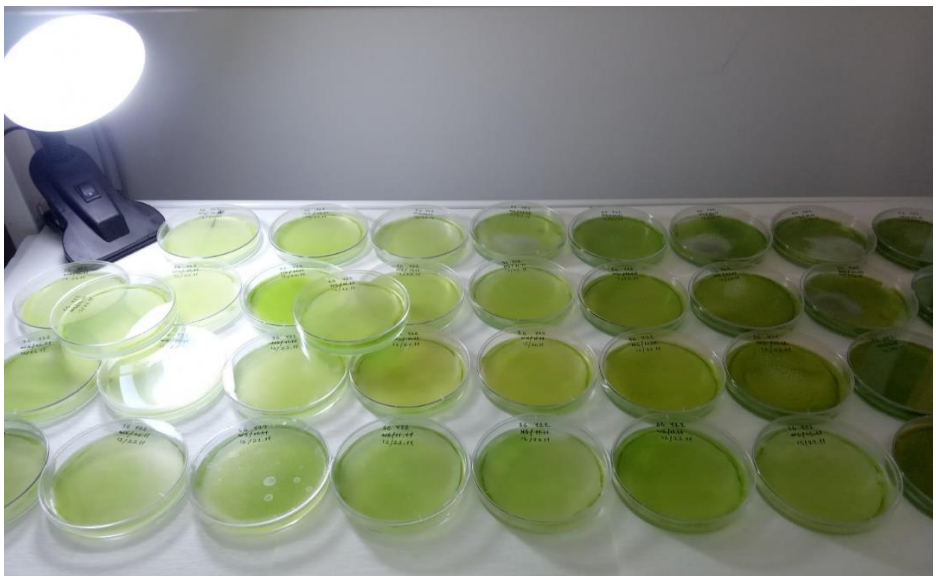
Tablo 3.2 BG-11 besiyeri ortamı için kullanılan kimyasallar ve miktarları

ml	Stok Solüsyonu	g/1000 ml H_2O
100	$NaNO_3$	15.0
10	K_2HPO_4	4.0
10	$MgSO_47H_2O$	7.5
10	$CaCl_2.2H_2O$	3.6
10	Sitrik Asit	0.6
10	Amonyum ferrik sitrat	0.6
10	Na_2EDTA	0.1
10	Na_2CO_3	2.0
1	İz Elementi Solüsyonu	-

Tablo 3.3 İz elementi solüsyonu için kullanılan kimyasallar ve miktarları

Bileşik	**Miktar (g)**
H_3BO_3	2.86
$MnCl_2.4H_2O$	1.81
$ZnSO_47H_2O$	0.222
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.39
$CuSO_4.5H_2O$	0.079
$Co(NO_3)26H_2O$	0.0494

Hazırlanan besiyerlerinin pH değeri NaOH ve HCl kullanılarak 7.1 değerine optimize edilmiştir. Katı besiyeri hazırlamak için ortama 15 g/l agar eklenmiştir. Hazırlanan katı veya sıvı besiyerleri 1 atm basınçta 121 ℃ sıcaklıkta 15 dk boyunca sterilizasyon işlemi için otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan katı ortam için olan besiyeri uygun miktarda petri kabına dökülmüştür. Besiyerinin petri kaplarında soğuması beklenmiş ardından ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan mikroalgler yaklaşık iki hafta boyunca uygun koşullar altında büyümeye bırakılmıştır. Şekil 3.2'de petri kabında yetiştirilen mikroalg kültürleri gösterilmektedir.



Şekil 3.1 Petri kabında yetiştirilen mikroalg kültürleri

Hazırlanan sıvı besiyeri ise soğuduktan sonra kullanıma hazır hale gelmiştir. Uygun bir erlenmeyer içerisine toplam hacmin yüzde 10'u kadar saf alg kültürü, yüzde 2'si kadar sıvı besiyeri, kalan hacim kadar da saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan erlenmeyerlerin ağzı pamuk ile kapatılarak çalkalamalı inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. Çalkalamalı inkübatör 150 rpm'de, 25±3 °C sıcaklıkta ve 18 watt'lık pembe renkli floresan lamba ile aydınlatma koşullarında çalışmaktadır. Şekil 3.3 'de çalkalamalı inkübatörde yetiştirilen alg kültürleri gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Çalkalamalı inkübatörde yetiştirilen mikroalg kültürleri

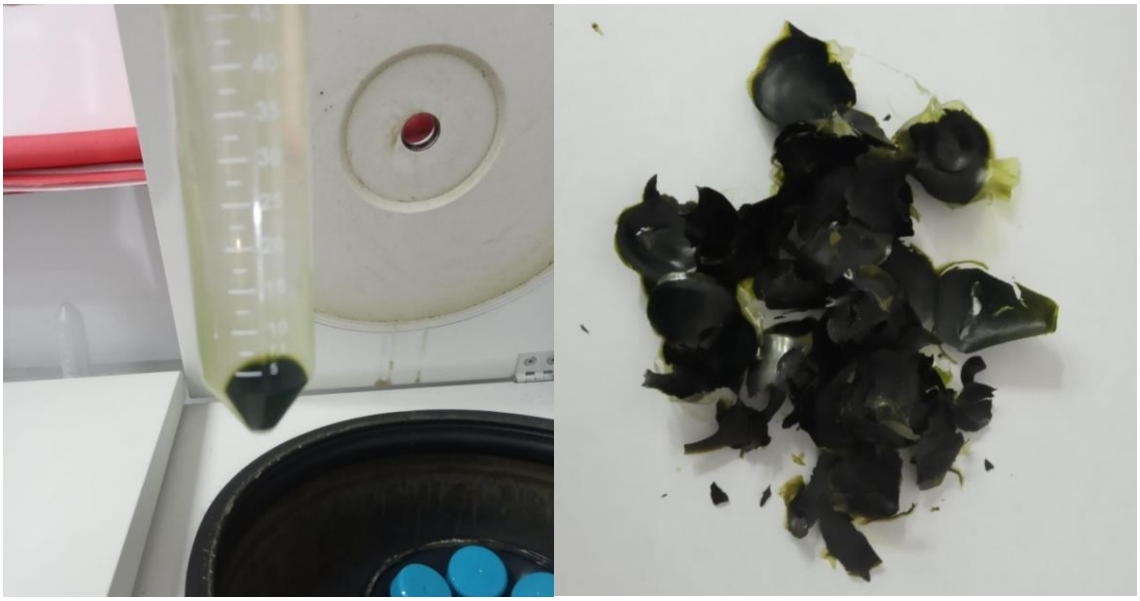
Mikroalglerin içerdikleri değerli metabolitlerin miktarını etkileyen birçok parametre vardır. Farklı büyüme koşullarında mikroalgler farklı içeriklere ve özelliklere sahip olabilmektedir. Bu tez çalışmasında mikroalglerin yağ içeriğini en çok etkileyen parametrelerden ışık ve nitrat stresi çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalgi 3 farklı koşulda yetiştirilmiştir. Tablo 3.4 'te mikroalglerin yetiştirildiği koşullar özetlenmiştir.

Tablo 3.4 Mikroalglere uygulanan stres koşulları

Değişkenler	Nitrat Miktarı (500 ml BG11)	Aydınlık/Karanlık Döngü
Kontrol Grubu	0.75 gram	24 / 0
Azot Stresi	0.25 gram	24 / 0
Işık Stresi	0.75 gram	16 / 8

3.3 Mikroalglerin Hasatı ve Kurutulması

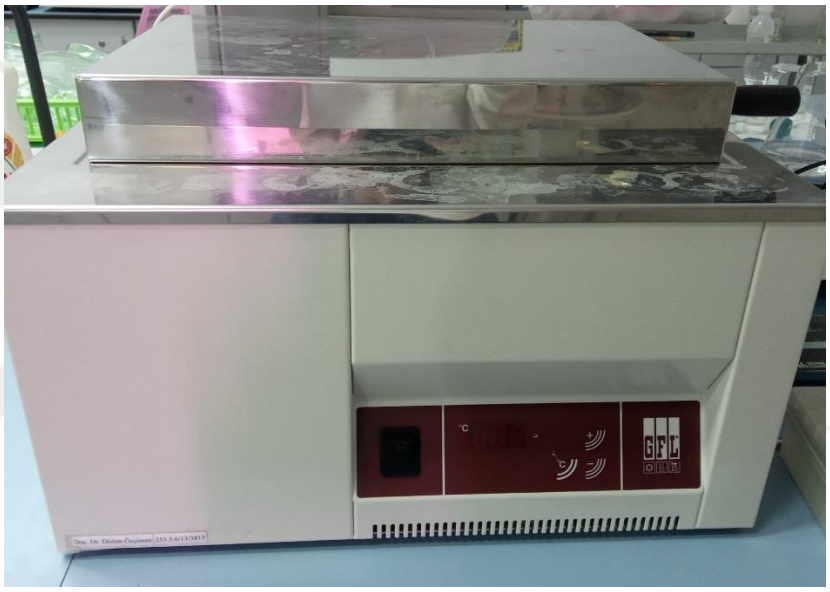
Mikroalg kültürlerinin hasat işlemi Sigma 2-16 KL markalı santrifüj cihazında yapılmıştır. Petri kaplarında büyümüş olan algler distile su ile yıkanarak 50 ml'lik santrifüj tüplerine doldurulmuştur. Santrifüj cihazına örnekler dengeli bir şekilde yerleştirilmiştir. 9000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası tüplerdeki mikroalgler kültür ortamındaki diğer bileşenlerden ayrılarak tüplerin altına çökmüştür. Tüplerin kapağı açılarak üst faz dökülmüştür ve ağzı açık tüpler kurutma işlemi için Binder marka etüv cihazına yerleştirilmiştir. Tüpler etüvde 60 °C sıcaklıkta 24 saat bekletilmiştir. Kuruyan mikroalgler tüplerden çıkartılmış ve ışık almayan ağzı kapalı kaplarda saklanmıştır. Şekil 3.4'te santrifüjden çıkarılan mikroalg kültürü ve kurutulmuş mikroalgler gösterilmektedir.



Şekil 3.4 Santrifüjden çıkarılan mikroalg kültürü ve kurutulmuş mikroalgler

3.4 Mikroalglerden Yağ Ekstraksiyonu

Mikroalglerden yağ ekstraksiyonu için 1 gram kurutulmuş mikroalg hassas terazi ile tartılmış ve bir şişeye alınmıştır. 1 gram kuru mikroalg üzerine 20 mL etanol ilave edilmiştir. Ağzı kapatılan şişe 78 ℃ sıcak su banyosunda 24 saat bekletilmiştir. Ardından karışımın sıvı kısmı süzülerek başka bir şişeye alınmıştır ve şişenin ağzı açık bir şekilde etanolü uçurmak için sıcak su banyosuna konulmuştur. Etanolün tamamı uçana kadar örnekler sıcak su banyosunda uygun koşullarda bekletilmiştir. Yağ ekstraksiyonu işleminde kullanılan GFL marka sıcak su banyosu şekil 3.5'te gösterilmektedir.



Şekil 3.5 Yağ ekstraksiyonunda kullanılan sıcak su banyosu

3.5 Mikroalglerin Karakterizasyonu

3.5.1 Optik Yoğunluk

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 mikroalginin gelişim süreci 680 nm'de yaklaşık bir ay boyunca spektrofotometrik ölçüm yapılarak takip edilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler Şekil 3.6'da gösterilen PG 60 Instrument UV-Vis-Spektrofotometre cihazı kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm için farklı koşullarda yetiştirilen alg örneklerinin her birinden pastör pipet ile yaklaşık 3 ml alınmıştır. Blank olarak distile su kullanılmıştır. Alınan örnekler küvete konularak sırayla ölçüm alınmış ve sonuçlar kaydedilmiştir.



Şekil 3.6 UV-Vis-spektrofotometre cihazı

Elde edilen ölçümlerle büyüme hızı 3.1 eşitliğiyle, ikiye katlanma zamanı ise 3.2 eşitliği ile hesaplanmıştır.

$$GR = (\ln OD_t - \ln OD_0) / t - t_o \quad (3.1)$$

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (3.2)$$

3.1 denkleminde verilen OD_t, t zamanında ölçülen optik yoğunluk değerini; OD_0, başlangıç zamanında ölçülen optik yoğunluk değerini göstermektedir. Denklem 2.2'de verilen μ ise spesifik büyüme hızını ifade etmektedir [59].

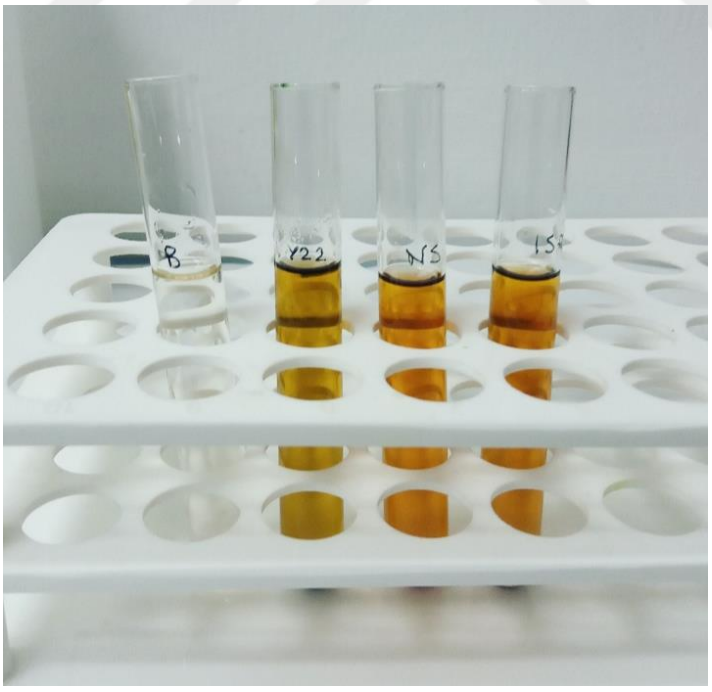
3.5.2 Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi

Mikroalg örneklerinin karbonhidrat içeriğini belirlemek için fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır. Deneysel çalışmada kullanılan fenol reaktifi 20 gram distile suya 80 gram fenol eklenerek %80 (w/w) olacak şekilde hazırlanmıştır. Fenol sülfürik asit metodunda standart olarak glikoz kullanılmıştır. 100 mg glikoz/L olacak şekilde glikoz stok solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan glikoz stok solüsyonu kullanılarak Tablo 3.5'te verilen değerler ile farklı konsantrasyonlarda glikoz çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra glikoz çözeltilerine 0.05 ml fenol reaktifi ilave edilmiştir. Ardından tüplere çeker ocak altında 5 ml sülfürik asit eklenmiştir. Asit ilavesinden sonra yaklaşık 10 dk tüplerin soğuması beklenmiştir. Ardından 490 nm'de absorbansları ölçülmüştür ve elde edilen değerler ile standart eğri grafiği oluşturulmuştur.

Farklı koşullarda yetiştirilen mikroalg kültürlerinden 2'şer ml alınarak ayrı ayrı tüplere konulmuştur. Blank olarak kullanılacak tüpe mikroalg örneği yerine 2 ml distile su konulmuştur. Tüplere 0.05 ml fenol reaktifi eklenmiştir ve ardından çeker ocakta 5 ml sülfürik asit ilave edilmiştir. Mikroalg örneklerinin olduğu tüplere fenol reaktifi eklendiğinde tüplerde reaksiyon gerçekleşerek Şekil 3.7'de verilen sarı-turuncu arasında renk değişimi gözlenmiştir. 10 dk oda sıcaklığına gelmesi beklenen tüplerden yeterli miktarda örnek alınarak UV spektrofotometrede 490 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen değerler glikoz kullanılarak oluşturulan standart eğri grafiğindeki formülde yerine yazılarak mikroalglerin karbonhidrat içeriği hesaplanmıştır [60].

Tablo 3.5 Standart glikoz konsantrasyon değerleri

Glikoz Stok Çözeltisi (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Distile Su(ml)	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0



Şekil 3.7 Karbonhidrat analizinde mikroalg örneklerinde gözlenen renk değişimi

3.5.3 Protein Miktarının Belirlenmesi

Farklı koşullarda üretilen *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalginin protein içeriğini belirlemek için Modifiye Lowry metotu kullanılmıştır. Tablo 3.6'da bu analizde kullanılan reaktiflerin ve standartların miktarları verilmiştir.

Modifiye Lowry metodunda kullanılan reaktif ve çözeltiler :

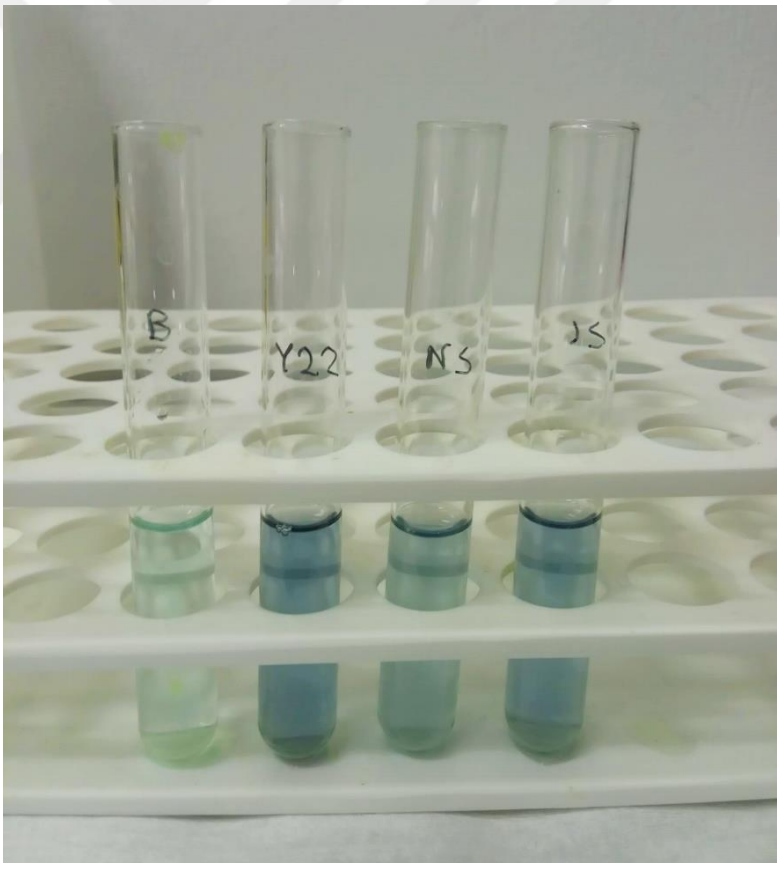
- Reaktif A: %5'lik Na_2CO_3
- Reaktif B: %1' lik K-Na-tartarat içerisindeki %0,5'lik $CuSO_45H_2O$
- Reaktif C: 50 ml Reaktif A+2 ml reaktif B
- Reaktif D: 1 N Folin-ciocalteau
- NaOH (1 N)
- BSA Standart Çözeltisi

Tablo 3.6 Protein analizinde kullanılan reaktiflerin ve sandartların miktarları

Birim : ml	Blank	St1	St2	St3	St4	St5	St6	Örnek
Standart BSA Çözeltisi	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	-
Distile su	0.5	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	0.2	-
1 N NaOH	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Örnek	-	-	-	-	-	-	-	0.5
Reaktif C	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Reaktif D	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Deneyin ilk adımında belirli miktarlarda BSA çözeltisi cam tüplere koyulmuştur. Ardından cam deney tüplerine distile su ve 1 N'lık NaOH çözeltisi eklenmiş ve 70-140 mg protein/L aralığında standartlar elde edilmiştir. Elde edilen verilerle protein standart eğrisi ve denklemi oluşturulmuştur.

Analizi yapılacak olan mikroalg kültürlerinden 0.5'er ml örnek alınarak ayrı tüplere konulmuştur. Tüplerin üzerine 0.5'er ml 1 N NaOH eklenmiştir ve 100 ℃ sıcaklıktaki su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüplerin soğuk su banyosunda soğuması sağlanmıştır. Ardından 2.5 ml reaktif C ve 0.5 ml reaktif D tüplere eklenmiştir ve tüpler vorteks ile karıştırılmıştır. Son olarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon yapılmıştır ve spektrofotometre ile 750 nm'de örneklerin absorbansları okunmuştur. Okunan absorbans değerleri standart protein denkleminde yerine yazılarak mikroalg örneklerinin protein içeriği hesaplanmıştır [61]. Şekil 3.8'de protein analizi sırasında mikroalg örneklerinde görülen renk değişimi gösterilmektedir.



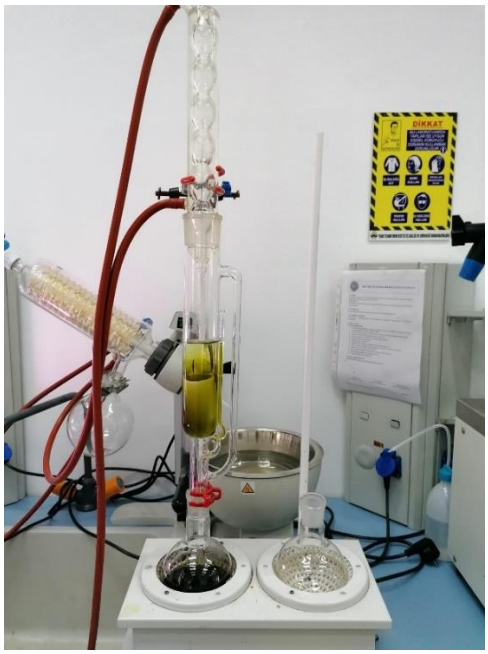
Şekil 3.8 Protein analizinde mikroalg örneklerinde gözlenen renk değişimi

3.5.4 Yağ Miktarının Belirlenmesi

Toplam lipitler, modifiye Bligh ve Dyer (1959) yöntemi kullanılarak mikroalgal biyokütleden ekstrakte edilmiştir. Lipitler öncelikle kloroform-metanol (2:1, v / v) ile ekstrakte edilmiş, daha sonra kloroform: metanol: su oranı 1:1: 0.9 olacak şekilde metanol ve su ilavesi yapılarak kloroform ve sulu metanol fazlarına ayrım sağlanmıştır. Kloroform tabakası, 20 ml % 5'lik NaCl çözeltisi ile yıkanıp, kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Daha sonra toplam lipitler gravimetrik olarak ölçülmüştür.

3.5.5 Yağ İçeriğinin Belirlenmesi

Mikroalglerin yağ içeriğinin belirlenmesi amacıyla ise önce Soxhlet metoduyla ekstraksiyon yapılmıştır, ardından gaz kromatografisi (GC) ile algal yağın içeriği belirlenmiştir. Soxhlet ekstraksiyonu için kurutulmuş ve ezilerek toz haline getirilmiş mikroalg örnekleri ile çözücü görevinde %100'lük etanol kullanılmıştır. 3 saat süren ekstraksiyon işlemi 3 kez tekrar edilmiştir. Ardından elde edilen örnekten, evaporatörde vakum altında 78 °C'de etanol buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Şekil 3.9'da Soxhlet ekstraksiyonu ve Şekil 3.10'da rotary evaporatörde etanolü uçurma aşaması gösterilmektedir.



Şekil 3.9 Soxhlet ekstraksiyonu



Şekil 3.10 Rotary evaporatör ile etanolün uçurulması

Elde edilen mikroalgal yağın içeriğinin belirlenmesi amacıyla YL Instruments 6100 GC gaz kromatografisi cihazı kullanılmıştır. Gaz kromatografisi cihazı alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm ZB-FFAP kolonu içermektedir. Kolon sıcaklık programı 50°C ile başlayıp, 25°C/dk hızla 180°C'ye, ardından 4°C/dk hızla 230°C'ye çıkmaktadır. Enjektör sıcaklığı 230°C olup, akış hızı 1.8 ml/dk olarak ayarlanmıştır. Dedektör sıcaklığı 280°C'de tutulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak hidrojen gazı kullanılmıştır. Metil heptadekonat (C17:0) iç standart olarak kullanılmış ve örnekler metil heptadekonat ve n-heptan ile karıştırılarak gaz kromatografisi için hazır hale getirilmiştir [62].

3.5.6 Pigment Miktarının Belirlenmesi

Mikroalglerin içerdiği önemli pigmentlerden olan klorofil-a ve beta karoten miktarları aşağıdaki adımlar takip edilerek ölçülmüştür.

- 3 farklı koşulda yetiştirilmiş olan mikroalg örneklerinin her birinden mikro pipet yardımıyla 5 ml örnek alınmış ve ayrı tüplere konulmuştur.
- Örnekler santrifüjde 9000 rpm'de 10 dakikada çöktürülmüştür.
- Santrifüjden çıkarılan örneklerin üst fazındaki su dökülmüştür.
- Örneklerin üzerine 5'er ml aseton eklenmiştir.
- Örnekler ultrasonik banyoda 5 dk homojenize edilmiştir.
- Homojenize örnekler 50-60 sıcak suda 5 dk bekletilmiştir.
- Örnekler 15 saniye vortekslenmiştir.
- Örnekler tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrası örneklerin üzerinde kalan sıvı pipet ile tabana değmeden dikkatlice alınmıştır ve spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.
- Spektrofotometrede klorofil-a için 666 nm'de beta karoten için 475 nm'de ölçüm alınmıştır ve aşağıdaki formüller ile mikroalg örneklerinin içerdiği klorofil-a ve beta karoten miktarları hesaplanmıştır [63].

$$\text{Klorofil-a } (\mu g/ml) = 13{,}9 \times A_{666} \quad (3.3)$$

$$\text{Beta-karoten } (\mu g/ml) = 4{,}5 \times A_{475} \quad (3.4)$$

Formüllerdeki A_{475} ifadesi 475 nm'de okunan absorbans değerini ve A_{666} ifadesi 666 nm'de okunan absorbans değerini ifade etmektedir.

3.5.7 FTIR Analizi

Uygun ortam koşullarında büyütülen mikroalglerin fonksiyonel içeriklerinin belirlenmesi için Thermoscientific Marka Nicolet 6700 model FTIR cihazı kullanılmıştır. Mikroalg örneklerinin 600-4000 cm^{-1} aralığında içerdikleri fonksiyonel grupların adsorbans değerleri okunmuştur.

3.5.8 Antioksidan Analizi

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 mikroalginin antioksidan özelliği 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikal giderme yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Deney Brand-Williams ve arkadaşlarının metoduna göre 1,1- difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) radikali kullanılarak yapılmıştır. Bu metotta incelenen örneğin radikalin mor rengini giderebilme yeteneği ile antioksidan özelliği belirlenmektedir. DPPH ile karıştırılan örneğin rengi 515 nm'de ölçülerek standart madde ile karşılaştırılmıştır. Reaksiyon sonucunda absorbansın düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesini göstermektedir. Deney sonucu aşağıdaki formül 3.5 ile hesaplanmıştır [64].

$$\text{DPPH Radikal Giderme Aktivitesi } (\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3.5)$$

A_0: Kontrolün absorbans değeri

A_1: Numunenin absorbans değeri

3.5.9 Antibakteriyel Analiz

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 mikroalginin antibakteriyel özelliği disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Uygulanan disk difüzyon yönteminde bakteri olarak *E.coli ve S. Aeurus* kullanılmıştır. Bakteri suşları nutrient agar besiyeri içerisinde 1 gece

boyunca 37 ℃ sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Bir gecelik inkübasyonun ardından bakteri suşlarından tek koloni alınarak 5 ml nutrient broth'a aşılanmıştır. 37 ℃ sıcaklıkta 18 saat boyunca inkübasyona bırakılan bakteri kültürleri mikroalglerin antibakteriyel etkisini incelemek üzere disk difüzyon yönteminde kullanılmıştır.

Mikroalglerden elde edilen yağ örneği 6 mm çapındaki disklerde bulunan disk kağıtlarına 5-30 µl/petri dozlarında pipet ile emdirilmiştir. Daha sonra algal yağ emdirilmiş diskler, nutrient agar besiyerine yayılmış olan bakteri süspansiyonlarına yerleştirilmiştir. 37 ℃ sıcaklıkta 24 saat boyunca inkübe edilmiştir ve ardından disklerde oluşan inhibisyon zonları incelenmiştir.

3.5.10 XTT Analizi

XTT analizi ile *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalginden elde edilen yağın farklı konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi incelenmiştir. Yapılan analizde L929 hücre hattı kullanılmıştır. Kullanılan hücre hattı saklandığı sıvı azot ortamından alınarak 37°C'de çözündürülmüş ve 5 ml DMEM-F12 besiyeri içeren tüpe koyulmuştur. Ardından 5 dk boyunca 1000 rpm'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Daha sonra tripan mavisi ile boyama işlemi yapılmış ve hemositometrik olarak sayım yapılmıştır. Ardından besiyeri ile süspanse edilmiş ve 25T hücre kültür flasklarına aktarılmıştır. Hazırlanan flasklar % 5 karbondioksit içeren etüvde 37 °C'de bekletilmiştir. Hücreler yaklaşık %80-90 konfluent hale geldiğinde pasajlama işlemi yapılmıştır.

25T hücre kültür flasklarına ekilen ve çoğalan hücrelerin tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden ayrılmasından sonra sayım yapılmış ve her bir kuyucuğa 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu pleytlere ekim yapılmıştır. Hücrelerin yüzeye yapışması ve çoğalması amacıyla 24 saat inkübasyon yapılmıştır. Ardından *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalginden elde edilen yağın farklı konsantrasyonları ortama eklenmiştir.

Algal yağ ortama eklenmeden önce 0,45 µm'lik filtreden süzülerek steril edilmiştir ve dilüsyonlar DMEM-F12 besiyeri içerisinde hazırlanmıştır. 37 ℃'de %5'lik karbondioksitli etüvde inkübasyon yapıldıktan sonra XTT testi uygulanmıştır. Kuyucuklardaki yağ içeren besiyerleri aspire edilerek, 100 µL 0.5 mg/mL 2,3-Bis- (2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilid (XTT) çözeltisi (7.5 µg/mL Fenazin metosülfat ile) kuyucuklara ilave edilmiştir. Pleytler, 37 ℃' de 4 saat daha

inkübe edilmiştir. Son olarak, çoklu plaka okuyucu ile 450 nm'de absorbans ölçümü yapılarak optik yoğunluk değerlendirilmiştir.

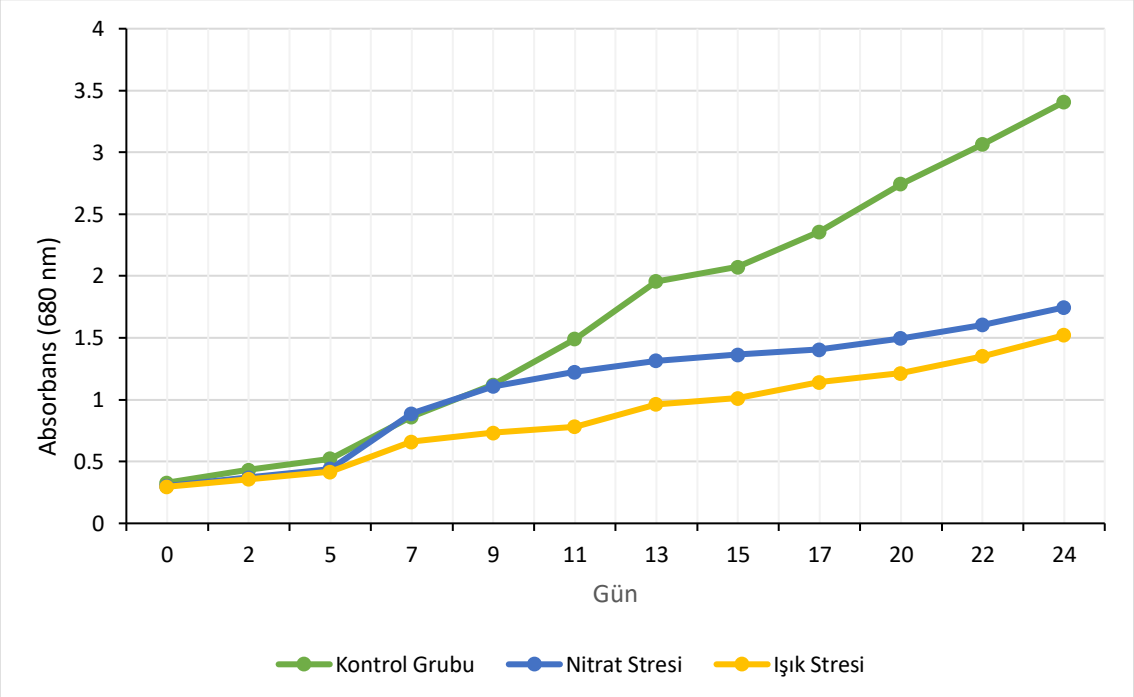
3.6 Mikroalglerin Antiviral Aktivite Testi

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 kutup mikroalginden elde edilen yağ örneğinin Covid-19'a karşı antiviral aktivitesi TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi tarafından incelenmiştir. Antiviral aktivite testi BSL3 alt yapısına sahip laboratuvarda, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle mikroalgal yağın 1/2 ile 1/2048 arasında 1/2 kat seri dilüsyonu hazırlanmıştır. Deneyde Covid-19 çalışmaları için sıklıkla kullanılan Afrika Yeşil maymun (Vero E6) hücre hattı kullanılmıştır. Mikroalgal yağ ve Covid-19 virüsü, Vero E6 hücreleri ile muamele edilmeden önce 1 saat inkübe edilmiştir. Genel olarak deney 160 saat boyunca hücrelerin izlenmesi esasına dayanmaktadır.

4
SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1 Optik Yoğunluk Analizi ve Büyüme Kinetiği

Bu tez çalışmasında mikroalgler nitrat stresi, ışık stresi ve kontrol grubu olmak üzere 3 farklı koşulda yetiştirilmiştir. Farklı stres şartları altında büyütülen alg kültürlerinin 24 gün boyunca optik yoğunlukları UV-vis spektrofotometre cihazı ile 680 nm'de ölçüm yapılarak takip edilmiştir. Okunan absorbans değerleri kaydedilmiş ve elde edilen değerlerle Şekil 4.1'de verilen grafik oluşturulmuştur. Mikroalglere ait kinetik hesaplamalar Monod eşitlikleri yardımıyla yapılmıştır. Formül 3.1'e göre spesifik büyüme hızı hesaplanmıştır. Hesaplanan spesifik büyüme hızı değeri kullanılarak ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Tablo 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1 Farklı koşullarda yetiştirilen mikroalglerin zamana bağlı OD değişimi

Tablo 4.1 Mikroalglerin hesaplanan kinetik değerleri

	Kontrol Grubu	Nitrat Stresi	Işık Stresi
Spesifik büyüme hızı (μ) ($gün^{-1}$)	0,097	0,073	0,068
İkilenme zamanı (t_d) (gün)	7,15	9,49	10,19

680 nm'de kültürlerin başlangıç optik yoğunlukları kontrol grubu, nitrat stresi ve ışık stresi için sırasıyla 0,329 , 0,302 ve 0,296 olarak ölçülmüştür. İlk iki gün boyunca mikroalglerin optik yoğunluk değerlerinde ciddi bir artış görülmemiştir. Bu süre mikroalglerin ortama adaptasyon süreleri olarak değerlendirilmiştir. Bu sürenin ardından mikroalg kültürlerinin optik yoğunlukları artmaya başlamıştır. Son ölçümün yapıldığı 24. günde kültürlerin optik yoğunlukları kontrol grubu için 3,407 , nitrat stresi için 1,746 ve ışık stresi için 1,521 olarak ölçülmüştür. Tablo 4.1'de gösterildiği gibi kontrol grubu en yüksek büyüme hızına ve en düşük ikilenme süresine sahiptir. Nitrat stresi uygulanan kültürlerin büyüme hızı kontrol grubuna göre düşmüştür ve ikilenme süreleri artmıştır. Işık stresi uygulanan kültür ise en düşük büyüme hızına ve en yüksek ikilenme süresine sahiptir. Deney sonuçlarına göre *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalgi en hızlı normal koşullar altında büyüme göstermiştir. Çalışılan mikroalgin nitrat ve ışık stresinde büyüme hızının yavaşladığı gözlemlenmiştir.

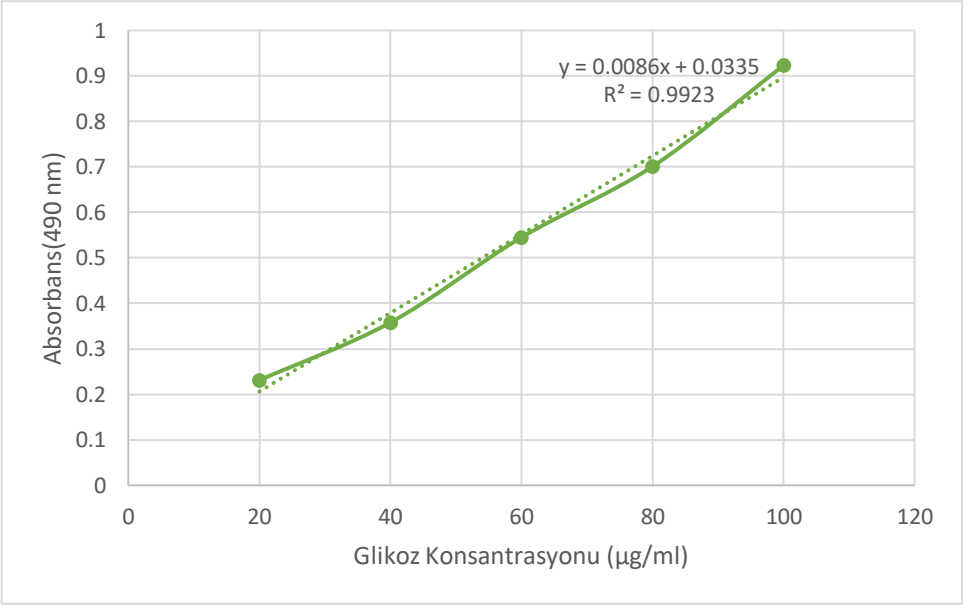
Mikroalglerin büyümesinde çevresel faktörler ve kültür ortamının besleyici elementlerinin miktarı son derece önemlidir. Besleyici elementlerden azot miktarının mikroalglerin büyümesi üzerine etkisinin incelendiği birçok araştırma yapılmıştır. Literatür verileri incelendiğinde *Dunaliella tertiolecta, B. Braunii, N. Oloeabundas, I. affinis galbana, D. salina, N. oculta, C. vulgaris, P. lutheri, P .tricornutum, Chaetoceros sp., I.galbana, N. atomus, Nannochloropsis sp, Tetraselmis sp., Gymnodinum sp, H. Pluvialis* ve *S.platensis* gibi birçok mikroalg türünde azot stresinin büyümeyi yavaşlattığı görülmektedir. [65] Mikroalglerde büyümeyi etkileyen faktörlerden biri de aydınlanma döngüsüdür. Aydınlanma zamanı uzadıkça, mikroalglerin büyüme oranı ve hücre sayıları artmaktadır. Literatür verilerinde 18:6 aydınlık-karanlık periyodu ile 12:12 aydınlık-karanlık periyodu arasında mikroalglerin büyümesi açısından büyük bir farklılığın olmadığı görülmektedir. Bu çalışmada 24 saat aydınlık ile 16:8 saat aydınlık-karanlık döngüsü denenmiştir ve aydınlanma süresi uzadıkça mikroalglerin büyüme hızının arttığı görülmüştür[66]. Sonuç olarak bu tez çalışmasında incelenen *Auxenochlorella*

pyrenoidosa Ozcimen.001 mikroalginin, literatürde incelenen diğer algler ile benzer şekilde azot eksikliğinde ve karanlık dönemde strese girip büyüme hızını yavaşlattığı gözlemlenmiştir.

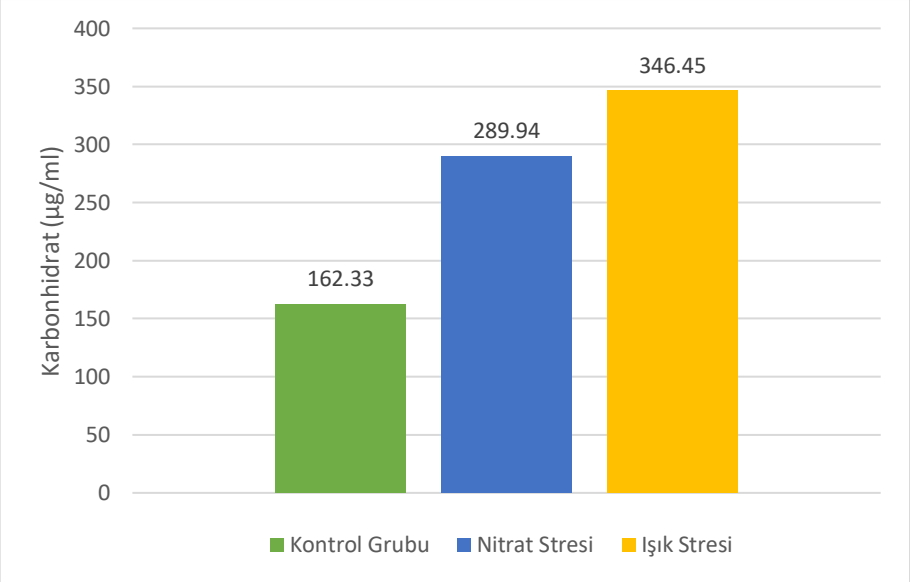
4.2 Karakterizasyon Sonuçları

4.2.1 Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi

Mikroalg örneklerinin karbonhidrat içeriğini belirlemek için fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır. Standart olarak kullanılan glikozun farklı konsantrasyonları ile alınan ölçümlerin sonucu Şekil 4.2'de verilmiştir. Grafikten elde edilen denklem kullanılarak mikroalg örneklerinin karbonhidrat içeriği hesaplanmıştır. Hesaplanan karbonhidrat miktarları Şekil 4.3'de verilmiştir. Kontrol grubunda üretilen mikroalgin karbonhidrat miktarı 162,33 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Nitrat stresinin uygulandığı kültürün karbonhidrat miktarı 289,94 µg/ml, ışık stresinin uygulandığı kültürün karbonhidrat miktarı ise 346,45 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Literatür verileri incelendiğinde, bu çalışma ile benzer şekilde alglerin azot ve ışık eksikliğinde içerdikleri karbonhidrat miktarını arttırdığı görülmektedir. Koçer vd. tarafından yapılan bir çalışmada *Chlorella minutissima, Chlorella sorokiniana* ve *Botryococcus braunii* alglerinin azot ve ışık stresinde içerdikleri ekzopolisakkarit miktarını arttırdığı raporlanmıştır [67]. Sonuç olarak *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalginin ışık ve nitrat stresine, sahip olduğu değerli metabolitlerden karbonhidrat miktarını arttırarak yanıt verdiği gözlenmiştir. Bu durumun sebebi mikroalglerin stres şartlarında fotosentez hızının yavaşlaması ve durumu tolere edebilmek için lipit ve karbonhidrat gibi farklı karbon kaynaklarını biriktirmeleridir.



Şekil 4.2 Glikoz standart eğrisi

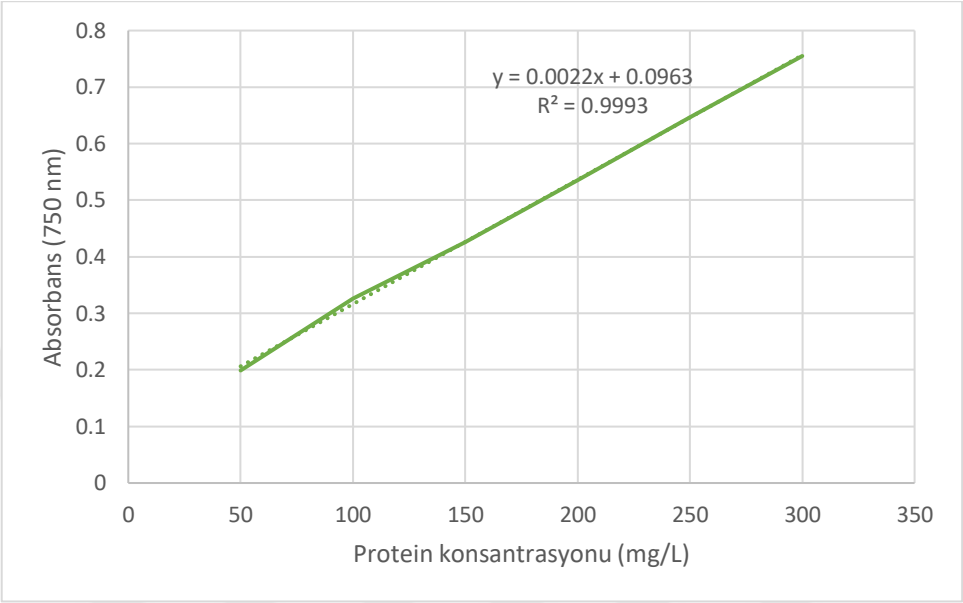


Şekil 4.3 Mikroalglerin karbonhidrat miktarı

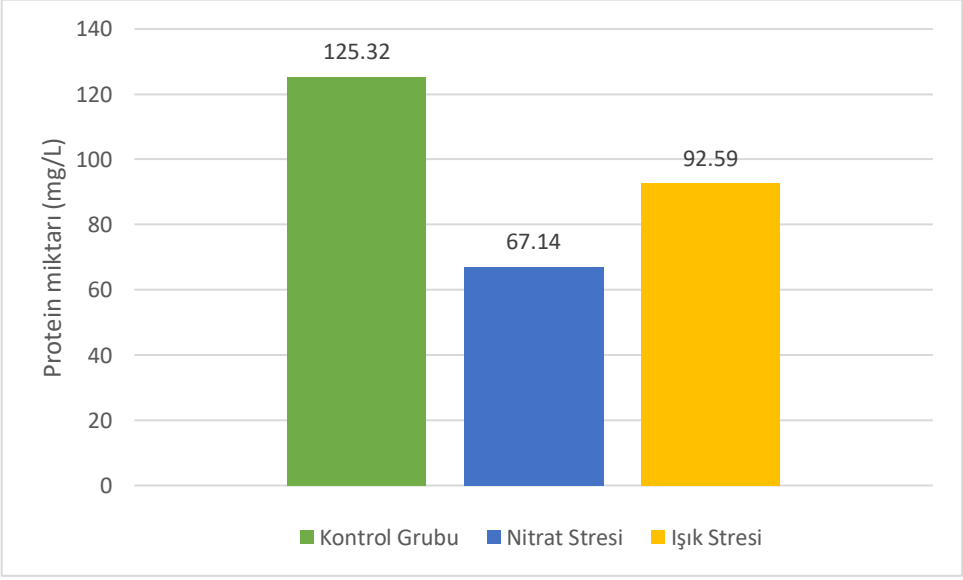
4.2.2 Protein Miktarının Belirlenmesi

Mikroalg örneklerinin protein içeriğini belirlemek için Lowry metotu kullanılmıştır. Standart olarak BSA çözeltisi kullanılmıştır ve Şekil 4.4 'de verilen protein standart grafiği çizilmiştir. Bu grafikten elde edilen denklem kullanılarak mikroalglerin protein içeriği hesaplanmıştır. Hesaplanan protein içerikleri Şekil 4.5'de verilen grafikte gösterilmektedir. Normal koşullarda üretilen mikroalg kültürünün protein içeriği 125,32 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Nitrat stresli kültürün protein miktarı 67,14 µg/ml hesaplanırken, ışık stresli kültürün protein miktarı 92,59 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Nitrat stresinin uygulandığı kültürde azot bakımından zengin olan proteinlerin miktarının en düşük olduğu görülmektedir. Azot eksikliğinde mikroalglerin büyümeye devam edebilmek için protein gibi hücre içi azotlu bileşikleri kullanmış olabileceği düşünülmektedir. Uygulanan iki stres koşulunda da mikroalgler protein içeriğini azaltmıştır.



Şekil 4.4 Protein standart eğrisi

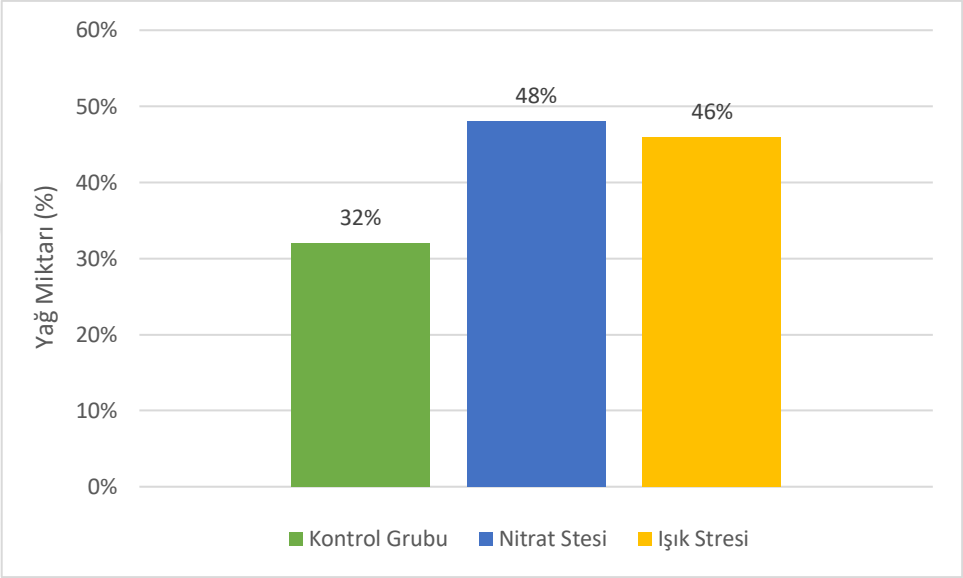


Şekil 4.5 Mikroalglerin protein miktarı

4.2.3 Yağ Miktarının Belirlenmesi

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 mikroalginin içerdiği yağ miktarı modifiye Bligh ve Dyer metoduna göre incelenmiştir. Yapılan deney sonucunda elde edilen veriler

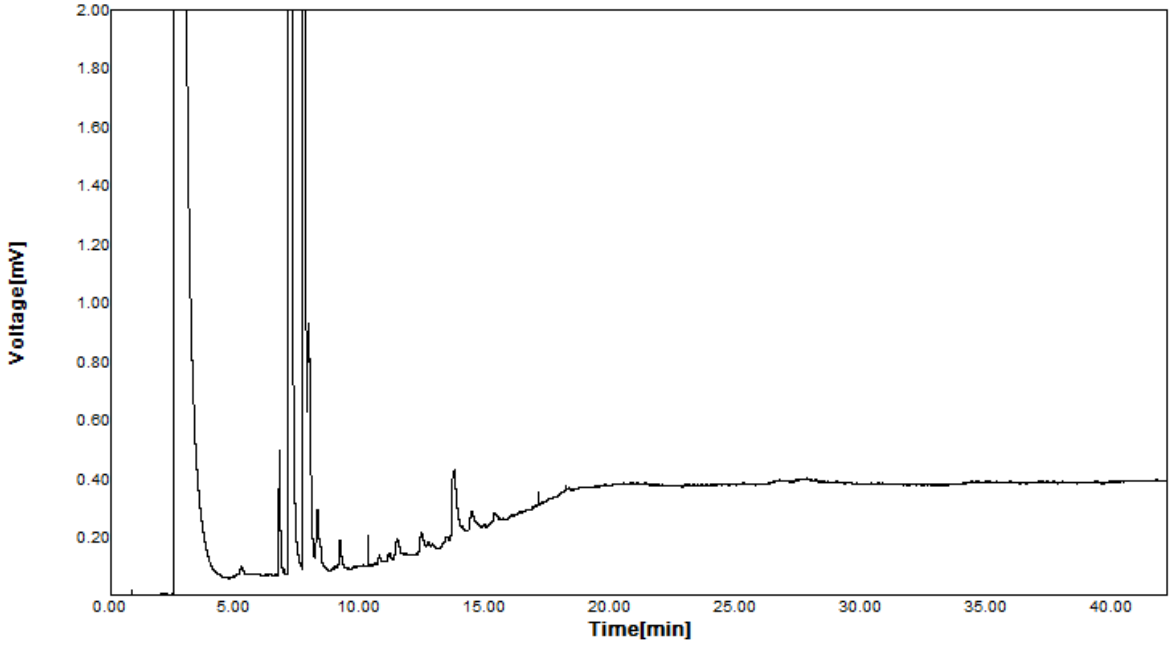
Şekil 4.6'da verilmiştir. Normal koşullarda üretilen kutup mikroalginin yağ miktarı %32 olarak bulunmuştur. Nitrat stresli kültürün yağ miktarı %48, ışık stresli kültürün yağ miktarı ise %46 olarak bulunmuştur. *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalgi nitrat ve ışık stresinde içerdiği yağ miktarını arttırmıştır. İki stres koşulu kıyaslandığında yağ miktarı olarak belirgin bir farklılık görülmemektedir ancak en yüksek yağ içeriğine nitrat stresli kültür sahiptir. Sonuç olarak literatür verilerine benzer şekilde uygulanan nitrat ve ışık stresinde incelenen kutup mikroalgi yağ içeriğini arttırmıştır.



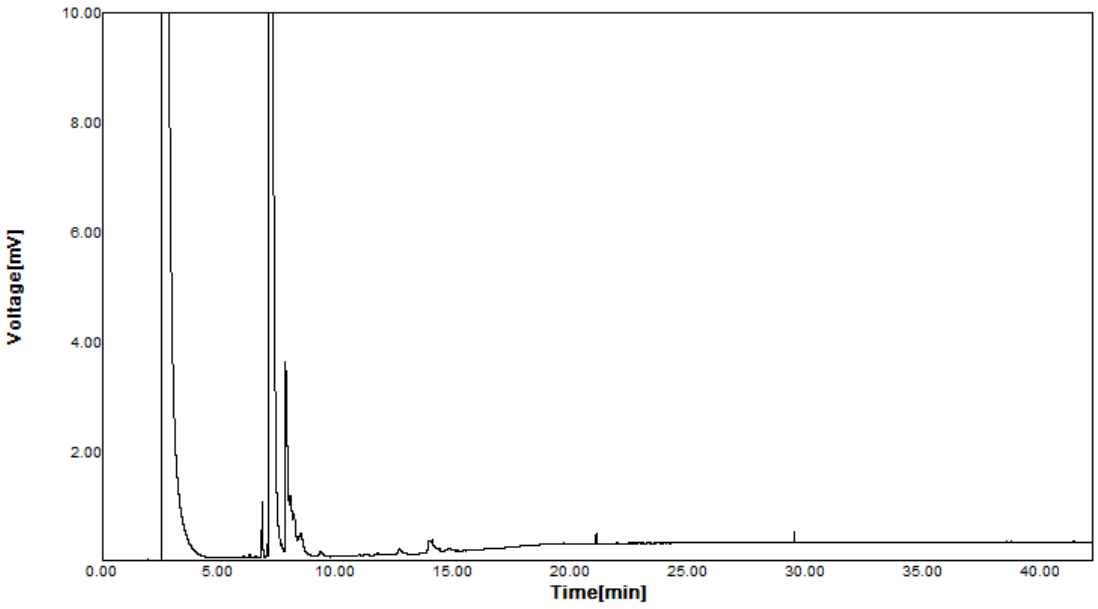
Şekil 4.6 Mikroalglerin içerdiği yağ miktarı

4.2.4 Yağ İçeriğinin Belirlenmesi

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 mikroalginin içerdiği yağ asitleri gaz kromatografisi ile incelenmiştir. Yapılan analiz sonucunda elde edilen kromatogram Şekil 4.7 ve 4.8'de verilmektedir. Kromatogram incelendiğinde *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalg yağının içeriğinde oleik (18:1), linoleik (18:2), linolenik (18:3), dihomo-γ-linolenik (C20:3), eikosapentanoik (20:5) asitlerin varlığı görülmektedir. Diğer yağ asitleri eser miktarlarda bulunduğundan sonuçlarda değerlendirilememiştir. Elde edilen kromatograma göre en yüksek yağ asidi içeriği linoleik asit olarak görülmüştür. Nitrat stresi altında büyütülmüş mikroalgin gaz kromatografisi incelendiğinde ise oleik (18:1), ve linoleik (18:2) asitlerin varlığı belirlenmiştir.



Şekil 4.7 Metanol/yağ molar oranı ve %1.5 KOH/yağ (wt.) koşullarında hazırlanan kutup mikroalgi yağının metil esterinin kromatogramı

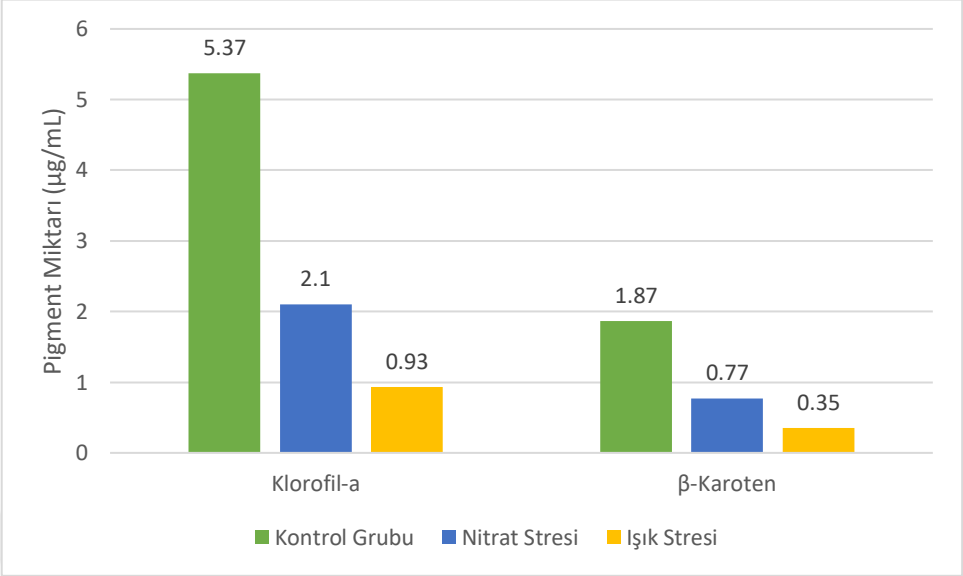


Şekil 4.8 Metanol/yağ molar oranı ve %1.5 KOH/yağ (wt.) koşullarında hazırlanan nitrat stresli kutup mikroalgi yağının metil esterinin kromatogramı

4.2.5 Pigment Miktarının Belirlenmesi

Mikroalg örneklerinin klorofil-a ve β-karoten miktarları spektrofotometrik ölçüm ile belirlenmiştir. Formül 3.3 ve 3.4 kullanılarak, okunan absorbans değerleri ile

mikroalglerin pigment içeriği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmektedir.

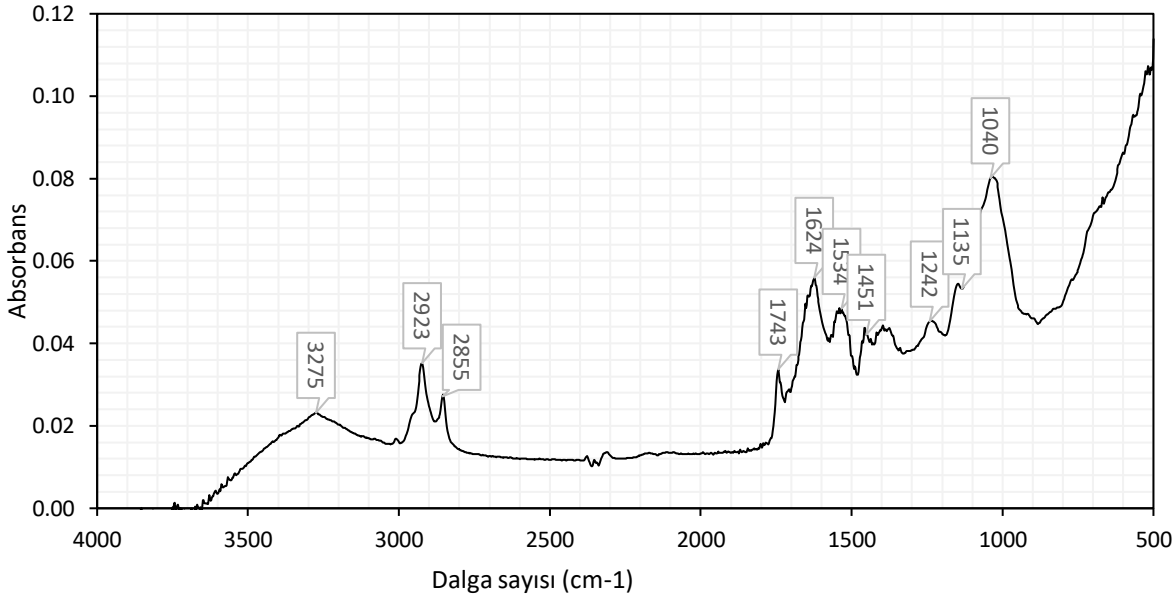


Şekil 4.9 Mikroalglerin klorofil-a ve β-karoten miktarı

Normal koşullarda üretilen mikroalg kültürünün klorofil-a miktarı 5,37 µg/ml ve β-karoten miktarı 1,87 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Nitrat stresi uygulanan kültürün hem klorofil-a hem de β-karoten miktarında düşüş gözlenmiştir. Işık stresi uygulanan kültür ise 0,93 µg/ml klorofil-a ve 0,35 µg/ml β-karoten miktarları ile incelenen kültürler arasında en düşük değerlere sahiptir. Uygulanan stres koşullarında klorofil sentezini sağlayan ATP ve NADPH gibi enerji moleküllerinin üretilememesi nedeniyle klorofil a miktarında azalma olduğu düşünülmektedir.

4.2.6 FTIR Analizi

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 mikroalginin FTIR analizi Bruker Marka FTIR cihazında 500-4000 cm^{-1} aralığında yapılmıştır. FTIR analizi sonucunda elde edilen spektrum Şekil 4.10'da gösterilmektedir. 1135 cm^{-1}'deki C-O-C gerilmeleri mikroalgin yapısındaki polisakkaritlerin gerilmelerini göstermektedir. 1743 cm^{-1} bandı (C=O) lipidler ve yağ asitlerinin varlığını göstermektedir ve ester grupları ile ilgilidir. 1743 cm^{-1}'deki ester karbonil grubun C=O gerilmesi ve 2923 cm^{-1}'deki CH gerilmesi lipid piklerini göstermektedir. 1534 cm^{-1}'de görülen pik ise türlerdeki protein varlığına işaret etmektedir.

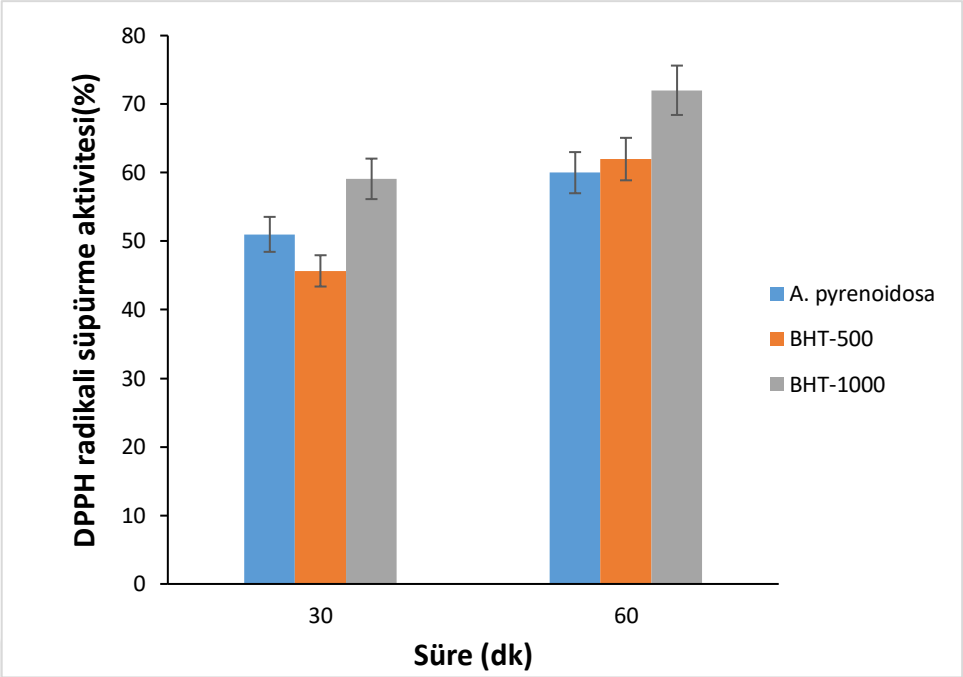


Şekil 4.10 *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalginin FTIR spektrumu

4.2.7 Antioksidan Analizi

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 mikroalginin antioksidan analizi 1, 1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme metodu kullanılarak yapılmıştır. DPPH metodunda standart olarak 500 µg/mL ve 1000 µg/mL BHT kullanılmıştır. Kullanılan standart ve kutup mikroalgi ekstraktları için 30 ve 60 dk ölçümleri alınmıştır. Yapılan antioksidan analizinin sonuçları Şekil 4.11'de verilmiştir. Şekilde ekstraktların DPPH radikali süpürme aktivitesine ait % inhibisyon- konsantrasyon grafiği çizilmiştir. Yüzde (%) inhibisyon değeri arttıkça antioksidan aktivite artmaktadır. Kullanılan standart BHT ile kıyaslandığında, incelenen kutup mikroalginin benzer miktarda antioksidan aktivite gösterdiği görülmektedir. Analiz başladıktan 30 ve 60 dk sonra alınan ölçümler kıyaslandığında, zamanla kutup mikroalginin antioksidan özelliğinin arttığı görülmektedir. 60. dakikada alınan ölçümde, kutup mikroalgi standart olarak kullanılan BHT (500 µg/mL) örneğine çok yakın antioksidan aktivite göstermiştir. Ölçüm alınan her iki sürede de *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalginin antioksidan aktivitesi %50'nin üzerindedir.

Antioksidan özellik gösteren maddeler katarakt, kanser, kalp-damar hastalıkları gibi oksidatif stres kaynaklı olduğu düşünülen birçok hastalığın tedavisi için umut vadetmektedir. Bu anlamda *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 kutup mikroalginin göstermiş olduğu antioksidan aktivite, ileri çalışmalar ile desteklendiğinde tıp sektörü için son derece önemli bir sonuçtur.



Şekil 4.11 Mikroalglerin antioksidan aktivitesi

4.2.8 Antibakteriyel Analiz

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 mikroalginin antibakteriyel analizi disk difüzyon yöntemi kullanılarak *E.coli* ve *S. Aeurus* türlerine karşı incelenmiştir. Disk difüzyon analizinin sonucunda oluşan inhibisyon zonları Tablo 4.5'te verilmiştir. *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalgi ekstraktlarının incelenen bakterilere karşı antibakteriyel özellik gösterdiği gözlemlenmiştir. Her iki bakteri için de en büyük inhibisyon zonu 30 µl ekstrakt kullanıldığında elde edilmiştir.

Tablo 4.5 *Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001* mikroalginin antibakteriyel analiz sonuçları

Ekstrakt Dozları (µl/petri)	***E.coli* (cm)**	***S. aeurus* (cm)**
Kontrol	0.85	1.05
5	0.4	0.65
10	1	1.1
20	1.6	1.75
30	2.45	2.3

Literatür verileri incelendiğinde birçok alg türünün antibakteriyel özelliğinin raporlandığı görülmektedir. Vehapi vd. tarafından yapılan çalışmada *Ulva lactuca, Chlorella vulgaris, Chlorella minutissima, Chlorella protothecoides* alg ekstraktlarının; *Mycobacterium smegmatis RUT, Morganella morganii ATCC 25830, ProteBCus 6624 ve Aeromonas hydrophila ATCC 7965* patojenlerine karşı antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda çalışılan tüm alg türlerinin patojenlere karşı antimikrobiyal etkileri olduğunu raporlanmıştır [68].

Mikroalglerin antibakteriyel aktivite göstermesinin içerdiği yağ asitleri, glikolipid ve fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir [69]. Algal fenolik bileşikler; mikrobiyal hücrenin geçirgenliğini değiştirerek, zar işlevini ve hücresel bütünlüğünü bozarak antibakteriyel etki göstermektedir. Algal yağ asitlerinin ise bakteri hücre zarında elektron taşıma sistemini ve normal oksidatif fosforilasyonu inhibe ettiği bilinmektedir [70].

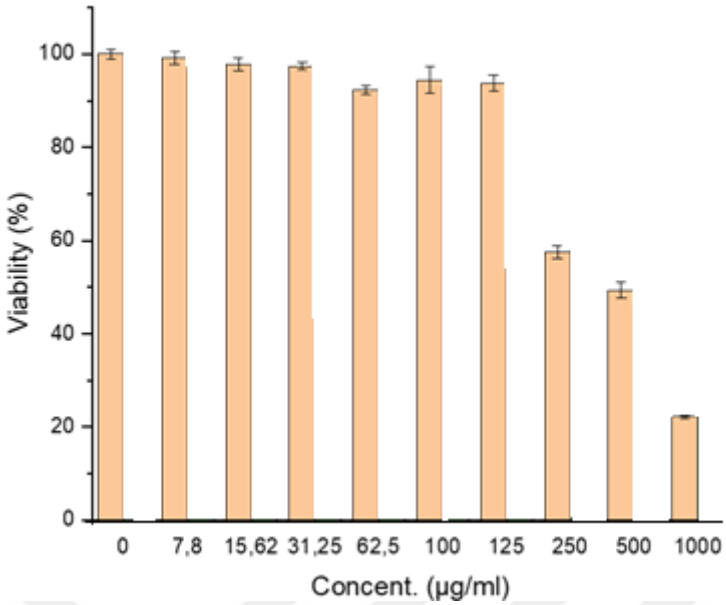
4.2.9 XTT Analizi

XTT analizi ile *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 alginden elde edilen yağın L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiştir. Şekil 4.12'de kutup alglerinin L929 hücre hattındaki sitotoksik etkisi grafikle gösterilmiştir. Grafikteki veriler incelendiğinde *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalginin düşük konsantrasyonlarda sitotoksik olmadığı görülmektedir. 500 g/ml'den yüksek konsantrasyonlarda, hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü görülmektedir.

Mosmann'ın çalışmasına göre, incelenecek numune ortama ilave edildikten sonraki hücre canlılığı oranına göre sitotoksik etki şu şekilde değerlendirilmektedir :

- %90 ve üzeri hücre canlılığı varlığı → sitotoksik değil
- %60-90 arası hücre canlılığı varlığı → hafif derecede sitotoksik
- %30-59 arası hücre canlılığı varlığı → orta derecede sitotoksik
- %30 ve altı hücre canlılığı varlığı → şiddetli derecede sitotoksik

Bu değerlendirme skalası ve Şekil 4.12'e göre *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 kutup mikroalgi 125 µg/ml'ye kadar sitotoksik değildir. 250 µg/ml'de hafif derecede sitotoksik, 500 µg/ml'de orta derecede sitotoksik, 1000 µg/ml'de ise şiddetli derecede sitotoksiktir. Sonuç olarak incelenen kutup alglerinin yüksek konsantrasyonlarda kullanılmadığı sürece L929 hücre hattında sitotoksik etkisi yoktur.



Şekil 4.12 Kutup alglerinin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

4.3 Mikroalglerin Antiviral Aktivitesi

Antiviral analiz TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Yaşam Bilimleri Başkan Yardımcılığı İlaç Teknolojileri grubu bünyesinde SARS-CoV-2 virüsüne karşı gerçek zamanlı hücre analizatörü kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analizin sonucunda *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 kutup mikroalginin 1/2 ile 1/2048 arasında çalışılan tüm konsantrasyonlarında, virüsün ilave edilmediği kontrol kuyularında Vero E6 hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermediği bulunmuştur. Virüsün bulunduğu ortamlarda, 1/2 kat dilüe edildiğinde %100 (Full) antiviral aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. 1/4 ile 1/2048 arasındaki daha yüksek dilüsyonlarında ise bu aktiviteyi kaybettiği gözlemlenmiştir. İlgili deney sonuçlarının detayları bu tez çalışmasından türetilecek olan makalede paylaşılacaktır.

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 kutup mikroalgi farklı koşullarda yetiştirilmiş ve büyüme kinetiği incelenmiştir. Kutup mikroalginin farklı stres koşullarında karbonhidrat, protein, pigment, yağ gibi biyokimyasal içerikleri hesaplanmış ve antioksidan, antibakteriyel, XTT analizleri yapılmıştır. *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 kutup mikroalginden uygun koşullarda elde edilen yağın Covid-19 virüsüne karşı antiviral etkinliği incelenmiştir. Yapılan deneyler ve literatür taraması sonucunda elde edilen sonuç ve öneriler şu şekilde özetlenebilir.

24 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen üretimlerin sonucunda hesaplanan spesifik büyüme hızı normal koşullarda yetiştirilen kültür için 0,097 $gün^{-1}$, nitrat stresli kültür için 0,073 $gün^{-1}$, ışık stresli kültür için 0,068 $gün^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. İkilenme zamanı ise normal koşullarda yetiştirilen kültür için 7,15 gün, nitrat stresli kültür için 9,49 gün ve ışık stresli kültür için 10,19 gün olarak hesaplanmıştır. İncelenen kutup mikroalgi türü literatürde incelenen diğer türlerle benzer özellik göstererek stres koşullarında büyüme hızını yavaşlatmıştır.

Yetiştirilen kutup mikroalglerinin karbonhidrat miktarı normal koşullardaki kültür için 162,33 µg/ml olarak, nitrat stresli kültür için 289,94 µg/ml, ışık stresli kültür için ise 346,45 µg/ml olarak hesaplanmıştır. İncelenen kutup mikroalgi literatür verilerine benzer şekilde nitrat ve ışık stresine karbonhidrat miktarını arttırarak yanıt vermiştir. *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 kutup mikroalginden yüksek miktarda karbonhidrat elde etmek için 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ışık periyodunda üretim yapılması önerilmektedir. Daha geniş bir biyoproses optimizasyonu için stres koşulunda alglerin karbonhidrat içeriğini arttırmasına rağmen büyüme hızını yavaşlatıyor olması aynı anda düşünülmelidir.

Lowry metotu ile elde edilen protein miktarlarına göre normal koşullarda yetiştirilen kutup mikroalgi 125,32 mg/L , nitrat stresli kültür 67,14 mg/L , ışık stresli kültür ise 92,59 mg/L proteine sahiptir. Uygulanan iki stres koşulunda da kutup mikroalgleri protein içeriğini azaltmıştır. Nitrat ve ışık stresi kıyaslandığında literatür verilerine benzer şekilde ışık stresli kültürün daha yüksek protein içeriğine sahip olduğu görülmüştür.

Modifiye Bligh ve Dyer metoduna göre elde edilen yağ miktarı sonuçlarına göre incelenen kutup mikroalgi normal koşullarda %32, nitrat stresi altında %48 ve ışık stresi altında %46 yağ içeriğine sahiptir. Bu sonuçlar *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 kutup mikroalginin literatürdeki diğer alg türleri gibi stres koşullarına yağ miktarını arttırarak yanıt verdiğini göstermektedir. İncelenen kutup mikroalginden en yüksek yağ içeriğini elde edebilmek için nitrat stresi tercih edilmelidir.

İncelenen kutup mikroalginden elde edilen yağın içeriğinde oleik (18:1), linoleik (18:2), linolenik (18:3), dihomo-γ-linolenik (C20:3), eikosapentanoik (20:5) asitlerin varlığı görülmüştür. En yüksek yağ asiti ise linoleik asit olarak belirlenmiştir.

Pigment miktarları incelendiğinde normal koşullarda üretilen kutup mikroalginin klorofil-a miktarı 5,37 μg/ml ve β-karoten miktarı 1,87 μg/ml olarak hesaplanmıştır. Nitrat ve ışık stresinde bu değerler düşmüştür ve ışık stresli kültür en düşük değerlere sahiptir.

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 kutup mikroalginin FTIR analizi incelendiğinde 1135 cm-1'deki C-O-C gerilmeleri mikroalgin yapısındaki polisakkaritlerin gerilmelerini göstermektedir. 1743 cm-1 bandı (C=O) lipidler ve yağ asitlerinin varlığını göstermektedir ve ester grupları ile ilgilidir. 1743 cm-1'deki ester karbonil grubun C=O gerilmesi ve 2923 cm-1'deki CH gerilmesi lipid piklerini göstermektedir. 1534 cm-1'de görülen pik ise türlerdeki protein varlığına işaret etmektedir.

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 kutup mikroalginin *E.coli* ve *S. Aeurus* bakterilerine karşı antibakteriyel özellik gösterdiği bulunmuştur. Yapılacak ileri antibakteriyel çalışmalar ile incelenen kutup mikroalginin tıp ve eczacılık sektöründe hastalıkların tedavisi için kullanılabileceği düşünülmektedir.

Yapılan XTT analizi sonucunda çalışılan kutup mikroalginin L929 hücresi üzerinde çok yüksek konsantrasyonlarda kullanılmadığı sürece sitotoksik etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuç incelenen kutup mikroalginin fibroblast hücrelerine zarar vermediğini, ilgili alanda güvenle kullanılabileceğini göstermektedir.

Auxenochlorella pyrenoidosa Ozcimen.001 mikroalginden elde edilen yağ örneklerinin antiviral aktivite testi TÜBİTAK tarafından yapılmıştır. Yapılan analizlerin sonucunda incelenen kutup mikroalginin ½ konsantrasyonda Covid-19 virüsüne karşı %100 antiviral

aktivite gösterdiği bulunmuştur. Analiz sonuçlarına ilişkin detaylar makalede paylaşılacaktır.

Pandemilerle mücadele edebilmek için hızlı bir şekilde uygulanabilecek antiviral bileşenler gereklidir. Yeni bir virüs ile karşılaşıldığında; üst düzey antiviral etkinliğe sahip olan, düşük maliyet ile üretilebilen ve doğada bol bulunan sürdürebilir kaynakların ek koruma veya tedavi amaçlı kullanımına ihtiyaç olmaktadır. Bolluğu ve çeşitliliği nedeniyle viral hastalıkların tedavisinde algler son derece önemlidir. Bu tez çalışmasında incelenen *Auxenochlorella pyrenoidosa* Ozcimen.001 mikroalgi Covid-19'a karşı üst düzey antiviral etkinlik göstermiştir. İleri çalışmalar ile bulunan antiviral etkinliğin mekanizması araştırılmalıdır.

Algler gibi doğal kaynaklardan tıbbi ürün elde etmeye yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların sınırlayıcı noktası, uzun uğraşlar sonucunda elde edilen ürün miktarının çok az, maliyetin yüksek olmasıdır. Mikroalglerden elde edilen değerli ürünlerin uygulanabilirliğini arttırmak için pazarın ilgisini çekecek düzeyde maliyeti azaltmak gerekmektedir. Kutup mikroalgleri zorlu yaşam koşullarına uyum sağlarken içerdikleri metabolitlerin miktarını arttırdığı için daha fazla ürün elde etmemizi sağlarlar. Bu yönüyle antiviral, antibakteriyel, antikanser vb. çalışmaların daha ileri seviyelere ulaşabilmesi, daha ekonomik koşullarda üretim yapılabilmesi açısından kutup alglerinin kullanımının yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

[1] B. Lyon ve T. Mock, "Polar Microalgae: New Approaches towards Understanding Adaptations to an Extreme and Changing Environment", Biology, c. 3, ss. 56-80, Mar. 2014, doi: 10.3390/biology3010056.

[2] D. Reynolds, M. Huesemann, S. Edmundson, A. Sims, B. Hurst, S. Cadya, N. Beirne, J. Freeman, A. Berger ve S. Gao, «Viral inhibitors derived from macroalgae, microalgae, and cyanobacteria: A review of antiviral potential throughout pathogenesis,» Algal Research, no. 57, 2021.

[3] D. Mubarak Ali, J. Mohamed Saalis, R. Sathya, N. Irfan, ve J.-W. Kim, "An evidence of microalgal peptides to target spike protein of COVID-19: In silico approach", Microbial Pathogenesis, c. 160, s. 105189, Kas. 2021, doi: 10.1016/j.micpath.2021.105189.

[4] A. Çelik, Isolation, Identification and Cultivation of Antarctic Microalgae, İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi, 2021.

[5] S. F. Kirkinci, S. Marakli, H. M. Aksoy, D. Özçimen, ve Y. Kaya, "Antarktika: Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Araştırmalarının Gözden Geçirilmesi", International Journal of Life Sciences and Biotechnology, c. 4, sy 1, Art. sy 1, Nis. 2021, doi: 10.38001/ijlsb.853472.

[6] D. Ozcimen, A.T. Kocer, B. Inan, A. Celik, M.F. Edbeib, H.M. Aksoy, Y. Kaya, "Isolation, characterization and identification of *Chlorella variabilis* isolated from Horseshoe Island, Skua Lake, Antarctica, YTU.ANTARCTIC.001, MN372092, NCBI GenBank." 27 Ağustos 2019.

[7] D. Özçimen, Y. Kaya, A. Çelik, A. T. Koçer, ve B. İnan, "Isolation, characterization and identification of *Auxenochlorella pyrenoidosa* strain Ozcimen.001 isolated from Horseshoe Island, Skua Lake, Antarctica, MT951391", 2020.

[8] D. Özçimen, Y. Kaya, A. Çelik, A. Koçer, ve B. İnan, "Isolation, characterization and identification of *Chlorella sorokiniana* strain Egemen.001 isolated from Horseshoe Island, Skua Lake, Antarctica, MW147167.1", 2020.

[9] K.R. Arrigo, "Sea Ice Ecosystems. Annual Review of Marine Science", sy 6(1), ss. 439-467, 2014.

[10] J. C. Priscu, A. C. Palmisano, L. R. Priscu, ve C. W. Sullivan, "Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake and assimilation in Antarctic sea-ice microalgae", Polar Biol, c. 9, sy 7, ss. 443-446, Tem. 1989, doi: 10.1007/BF00443231.

[11] J. Raymond, "Algal ice-binding proteins change the structure of sea ice", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, c. 108, s. E198, Haz. 2011, doi: 10.1073/pnas.1106288108.

[12] J. A. Raymond ve H. J. Kim, "Possible Role of Horizontal Gene Transfer in the Colonization of Sea Ice by Algae", PLoS One, c. 7, sy 5, s. e35968, May. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0035968.

[13] T. Mock ve B. M. A. Kroon, "Photosynthetic energy conversion under extreme conditions--II: the significance of lipids under light limited growth in Antarctic sea ice diatoms", Phytochemistry, c. 61, sy 1, ss. 53-60, Eyl. 2002, doi: 10.1016/s0031-9422(02)00215-7.

[14] P. J. Janknegt, W. H. van de Poll, R. J. W. Visser, J. W. Rijstenbil, ve A. G. J. Buma, "Oxidative stress responses in the marine antarctic diatom *Chaetoceros brevis (Bacillariophyceae)* during photoacclimation", Journal of Phycology, c. 44, sy 4, ss. 957-966, Ağu. 2008, doi: 10.1111/j.1529-8817.2008.00553.x.

[15] T. Karslıgil ve H. Akdoğan, "SARS-CoV-2, What We Know, What We Do Not Know", TMCD, 2021, doi: 10.5222/TMCD.2021.09825.

[16] A.Ç. İnkaya, A.G. Er, M.Ç. Sönmezer, (2021). Covıd-19 Pandemİ Raporu. Ankara: Hacettepe İç Hastalıkları Derneği.

[17] Y. Zhou, Y. Yang, J. Huang, S. Jiang, ve L. Du, "Advances in MERS-CoV Vaccines and Therapeutics Based on the Receptor-Binding Domain", Viruses, c. 11, sy 1, s. E60, Oca. 2019, doi: 10.3390/v11010060.

[18] S. Tian, W. Hu, L. Niu, H. Liu, H. Xu, ve S.-Y. Xiao, "Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer", J Thorac Oncol, c. 15, sy 5, ss. 700-704, May. 2020, doi: 10.1016/j.jtho.2020.02.010.

[19] P. P. Liu, A. Blet, D. Smyth, ve H. Li, "The Science Underlying COVID-19: Implications for the Cardiovascular System", Circulation, c. 142, sy 1, ss. 68-78, Tem. 2020, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047549.

[20] X. Li, M. Geng, Y. Peng, L. Meng, ve S. Lu, "Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19", Journal of Pharmaceutical Analysis, c. 10, sy 2, ss. 102-108, Nis. 2020, doi: 10.1016/j.jpha.2020.03.001.

[21] J. Liu, I. Obaidi, S. Nagar, G. Scalabrino, ve H. Sheridan, "The antiviral potential of algal-derived macromolecules", Current Research in Biotechnology, c. 3, ss. 120-134, Oca. 2021, doi: 10.1016/j.crbiot.2021.04.003.

[22] N. Hans, A. Malik, ve S. Naik, "Antiviral activity of sulfated polysaccharides from marine algae and its application in combating COVID-19: Mini review", Bioresource Technology Reports, c. 13, s. 100623, ubat 2021, doi: 10.1016/j.biteb.2020.100623.

[23] Q.-L.Sun, Y. Li, L.-Q. Ni, Y.-X. Li, Y.-S. Cui, S.-L. Jiang, E.-Y. Xie, J. Du, F. Deng, & C.-X. Dong (2020). Structural characterization and antiviral activity of two fucoidans from the brown algae *Sargassum henslowianum*. Carbohydrate Polymers, 229, 115487. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115487

[24] M. Kim, J.-E. Lee, H. Cho, H.-G. Jung, W. Lee, H.Y. Seo, S.-H. Lee, D.-G. Ahn, S.-J. Kim, J.-W. Yu, & J.-W. Oh (2020). Antiviral efficacy of orally delivered neoagarohexaose, a nonconventional TLR4 agonist, against norovirus infection in mice. Biomaterials, 263, 120391. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120391

[25] Y. Chi, M. Zhang, X. Wang, X. Fu, H. Guan, ve P. Wang, "Ulvan lyase assisted structural characterization of ulvan from *Ulva pertusa* and its antiviral activity against vesicular stomatitis virus", International Journal of Biological Macromolecules, c. 157, ss. 75-82, Ağu. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.187.

[26] Y. Sun, X. Chen, L. Zhang, H. Liu, S. Liu, H. Yu, X. Wang, Y. Qin, & P. Li (2019). The antiviral property of *Sargassum fusiforme* polysaccharide for avian leukosis virus subgroup J in vitro and in vivo. International Journal of Biological Macromolecules, 138, 70-78. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.073

[27] S. Wang, W. Wang, L. Hou, L. Qin, M. He, W. Li, & W. Mao (2020). A sulfated glucuronorhamnan from the green seaweed *Monostroma nitidum*: Characteristics of its structure and antiviral activity. Carbohydrate Polymers, 227, 115280. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115280

[28] M. Ueno, M. Nogawa, R. Siddiqui, K. Watashi, T. Wakita, N. Kato, M. Ikeda, T. Okimura, S. Isaka, T. Oda & Y. Ariumi (2019). Acidic polysaccharides isolated from marine algae inhibit the early step of viral infection. International Journal of Biological Macromolecules, 124, 282-290. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.152

[29] M. Alboofetileh, M. Rezaei, M. Tabarsa, M. Rittà, M. Donalisio, F. Mariatti, S. You, D. Lembo, & G. Cravotto (2019). Effect of different non-conventional extraction methods on the antibacterial and antiviral activity of fucoidans extracted from *Nizamuddinia zanardinii*. International Journal of Biological Macromolecules, 124, 131-137. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.201

[30] S. Wang, W. Wang, C. Hao, Y. Yunjia, L. Qin, M. He &W. Mao (2018). Antiviral activity against enterovirus 71 of sulfated rhamnan isolated from the green alga *Monostroma latissimum*. Carbohydrate Polymers, 200, 43-53. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.067

[31] A. Dogliotti, "Efficacy of a Nasal Spray Containing Iota-Carrageenan in the Prophylaxis of COVID-19 Disease in Health Personnel Dedicated to Patients Care With COVID-19. Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial (CARR-COV-02)", clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT04521322, Ağu. 2020. Erişim: 11 Kasım 2021. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04521322

[32] W. Wang, J. Wu, X. Zhang, C. Hao, X. Zhao, G. Jiao, X. Shan, W. Tai & G. Yu (2017). Inhibition of Influenza A Virus Infection by Fucoidan Targeting Viral Neuraminidase and Cellular EGFR Pathway. Scientific Reports, 7, 40760. https://doi.org/10.1038/srep40760

[33] C. Richards, N. Williams, J. Fitton, D. Stringer, S. Karpiniec, ve A. Park, "Oral Fucoidan Attenuates Lung Pathology and Clinical Signs in a Severe Influenza A Mouse Model", Marine Drugs, c. 18, s. 246, May. 2020, doi: 10.3390/md18050246.

[34] A. Synytsya, R. Bleha, A. Synytsya, R. Pohl, K. Hayashi, K. Yoshinaga, T. Nakano, & T. Hayashi (2014). Mekabu fucoidan: Structural complexity and defensive effects against avian influenza A viruses. Carbohydrate Polymers, 111, 633-644. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.032

[35] D. Marais, D. Gawarecki, B. Allan, K. Ahmed, L. Altini, N. Cassim, F. Gopolang, M. Hoffman, G. Ramjee, & A.-L. Williamson (2011). The effectiveness of Carraguard, a vaginal microbicide, in protecting women against high-risk human papillomavirus infection. Antiviral Therapy, 16(8), 1219-1226. https://doi.org/10.3851/IMP1890

[36] A. Perino, P. Consiglio, M. Maranto, P. De Franciscis, R. Marci, V. Restivo, M. Manzone, G. Capra, G. Cucinella, & G. Calagna (2019). Impact of a new carrageenan-based vaginal microbicide in a female population with genital HPV-infection: First experimental results. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 23(15), 6744-6752. https://doi.org/10.26355/eurrev_201908_18567

[37] D. Huskens ve D. Schols, "Algal lectins as potential HIV microbicide candidates", Mar Drugs, c. 10, sy 7, ss. 1476-1497, Tem. 2012, doi: 10.3390/md10071476.

[38] C. de Souza Barros, V. Garrido, V. Melchiades, R. Gomes, M.W. L. Gomes, V. L. Teixeira, & I.C.N. de Palmer Paixão (2017). Therapeutic efficacy in BALB/C mice of extract from marine alga *Canistrocarpus cervicornis (Phaeophyceae)* against herpes simplex virus type 1. Journal of Applied Phycology, 29(2), 769-773. https://doi.org/10.1007/s10811-016-0865-9

[39] E. Castillo, L. F. Duarte, N. Corrales, D. M. Álvarez, M. A. Farías, A. Henríquez, P. C. Smith, C. Agurto-Muñoz ve P. A. González, «Anti-herpetic Activity of *Macrocystis pyrifera* and *Durvillaea antarctica* Algae Extracts Against HSV-1 and HSV-2,» Front Microbiol, cilt 11;11, 2020 Sep.

[40] D. Y.-W. Lee, X. Lin, E.E. Paskaleva, Y. Liu, S.S. Puttamadappa, C. Thornber, J. R. Drake, M. Habulin, A. Shekhtman, & M. Canki (2009). Palmitic Acid Is a Novel

CD4 Fusion Inhibitor That Blocks HIV Entry and Infection. AIDS Research and Human Retroviruses, 25(12), 1231-1241. https://doi.org/10.1089/aid.2009.0019

[41] S. Mazumder, P. K. Ghosal, C. A. Pujol, M. J. Carlucci, E. B. Damonte, ve B. Ray, "Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from Gracilaria corticata (Gracilariaceae, Rhodophyta)", International Journal of Biological Macromolecules, c. 31, sy 1, ss. 87-95, Ara. 2002, doi: 10.1016/S0141-8130(02)00070-3.

[42] S.-R. Shih, K.-N. Tsai, Y.-S. Li, C.-C. Chueh, ve E.-C. Chan, "Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*", J Med Virol, c. 70, sy 1, ss. 119-125, May. 2003, doi: 10.1002/jmv.10363.

[43] S. Wang, W. Wang, L. Hou, L. Qin, M. He, W. Li, & W. Mao (2020). A sulfated glucuronorhamnan from the green seaweed *Monostroma nitidum*: Characteristics of its structure and antiviral activity. Carbohydrate Polymers, 227, 115280. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115280

[44] K. I. P. J. Hidari, N. Takahashi, M. Arihara, M. Nagaoka, K. Morita, ve T. Suzuki, "Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga", Biochemical and Biophysical Research Communications, c. 376, sy 1, ss. 91-95, Kas. 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.100.

[45] H.S. Pereira, L.R. Leão-Ferreira, N. Moussatché, V.L. Teixeira, D. N. Cavalcanti, L. J. Costa, R. Diaz, & I.C.P.P. Frugulhetti (2004). Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Antiviral Research, 64(1), 69-76. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.06.006

[46] L.A. Miceli, V.L. Teixeira, H.C. Castro, C.R. Rodrigues, J. F. R. Mello, M.G. Albuquerque, L. M. Cabral, M.A. De Brito & A. M. T. De Souza (2013). Molecular Docking Studies of Marine Diterpenes as Inhibitors of Wild-Type and Mutants HIV-1 Reverse Transcriptase. Marine Drugs, 11(11), 4127-4143. https://doi.org/10.3390/md11114127

[47] W. Wang, P. Zhang, C. Hao, X.-E. Zhang, Z.-Q. Cui, ve H.-S. Guan, "In vitro inhibitory effect of carrageenan oligosaccharide on influenza A H1N1 virus",

Antiviral Research, c. 92, sy 2, ss. 237-246, Kas. 2011, doi: 10.1016/j.antiviral.2011.08.010.

[48] S. Singh, M. F. Sk, A. Sonawane, P. Kar, ve S. Sadhukhan, "Plant-derived natural polyphenols as potential antiviral drugs against SARS-CoV-2 via RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibition: an in-silico analysis", Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, c. 39, sy 16, ss. 6249-6264, Kas. 2021, doi: 10.1080/07391102.2020.1796810.

[49] M.-J. Ahn, K.-D. Yoon, S.-Y. Min, J.S. Lee, J.H. Kim, T.G. Kim, S.H. Kim, N.-G. Kim, H. Huh, & J. Kim (2004). Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 27(4), 544-547. https://doi.org/10.1248/bpb.27.544

[50] J.-B. Lee, K. Hayashi, M. Hirata, E. Kuroda, E. Suzuki, Y. Kubo, & T. Hayashi (2006). Antiviral sulfated polysaccharide from *Navicula directa*, a diatom collected from deep-sea water in Toyama Bay. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 29(10), 2135-2139. https://doi.org/10.1248/bpb.29.2135

[51] T. Xu, Y. Li, H. Wu, H. Chen, H. Wu, M. Guo, M. Zhao, C. Wang, T. Lin, Z. Lin, D. Chen, W. Xiang, & B. Zhu (2020). The inhibition of enterovirus 71 induced apoptosis by *Durvillaea Antarctica* through P53 and STAT1 signaling pathway. Journal of Medical Virology, 93. https://doi.org/10.1002/jmv.26693

[52] T. Okimura, Z. Jiang, H. Komatsubara, K. Hirasaka, ve T. Oda, "Therapeutic effects of an orally administered edible seaweed-derived polysaccharide preparation, ascophyllan HS, on a *Streptococcus pneumoniae* infection mouse model", International Journal of Biological Macromolecules, c. 154, ss. 1116-1122, Tem. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.053.

[53] W. Zhang, J.-Y. Du, Z. Jiang, T. Okimura, T. Oda, Q. Yu, & J.-O Jin (2014). Ascophyllan Purified from *Ascophyllum nodosum* Induces Th1 and Tc1 Immune Responses by Promoting Dendritic Cell Maturation. Marine Drugs, 12(7), 4148-4164. https://doi.org/10.3390/md12074148

[54] A. Nakashima, K. Suzuki, Y. Asayama, M. Konno, K. Saito, N. Yamazaki, & H. Takimoto(2017). Oral administration of Euglena gracilis Z and its carbohydrate storage substance provides survival protection against influenza virus infection in

mice. Biochemical and Biophysical Research Communications, 494(1), 379-383. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.167

[55] Q. Guo, Q. Shao, W. Xu, L. Rui, R. Sumi, F. Eguchi, & Z. Li(2017). Immunomodulatory and Anti-IBDV Activities of the Polysaccharide AEX from *Coccomyxa gloeobotrydiformis*. Marine Drugs, 15(2), 36. https://doi.org/10.3390/md15020036

[56] A. Rauf, U. Rashid, A.A. Khalil, S.A. Khan, S. Anwar, A. Alafnan, A. Alamri, & K. R. Rengasamy(2021). Docking-based virtual screening and identification of potential COVID-19 main protease inhibitors from brown algae. South African Journal of Botany. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.06.033

[57] A. Frediansyah, "The antiviral activity of iota-, kappa-, and lambda-carrageenan against COVID-19: A critical review", Clinical Epidemiology and Global Health, c. 12, s. 100826, Eki. 2021, doi: 10.1016/j.cegh.2021.100826.

[58] "*Chlorella pyrenoidosa*", Wikipedia. 15 Kasım 2021. Erişim: 09 Mart 2022. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Chlorella_pyrenoidosa&oldid=1055282325

[59] L. Wang, M. Min, Y. Li, P. Chen, Y. Chen, Y. Liu, Y. Wang, & R. Ruan (2010). Cultivation of Green Algae *Chlorella sp*. In Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162(4), 1174-1186. https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7

[60] S. S. Nielsen, "Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates", içinde Food Analysis Laboratory Manual, S. S. Nielsen, Ed. Boston, MA: Springer US, 2010, ss. 47-53. doi: 10.1007/978-1-4419-1463-7_6.

[61] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, ve R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent", J Biol Chem, c. 193, sy 1, ss. 265-275, Kas. 1951.

[62] M. Ö. Gülyurt, D. Özçimen, ve B. İnan, "Biodiesel Production from *Chlorella protothecoides* Oil by Microwave-Assisted Transesterification", Int J Mol Sci, c. 17, sy 4, s. 579, Nis. 2016, doi: 10.3390/ijms17040579.

[63] M. D. Macías-Sánchez, C. Mantell, M. Rodríguez, E. Martínez de la Ossa, L. M. Lubián, ve O. Montero, "Supercritical fluid extraction of carotenoids and

chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*", Journal of Food Engineering, c. 66, sy 2, ss. 245-251, Oca. 2005, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.03.021.

[64] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, ve C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", LWT - Food Science and Technology, c. 28, sy 1, ss. 25-30, Oca. 1995, doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

[65] L. Uslu, O. Işık ve Y. Mutlu, «Besleyici Element Kompozisyonundaki Değişikliklerin Mikroalglerde Lipit İçeriğine Etkisi,» Journal of FisheriesSciences.com , cilt 6(3), pp. 176-187, 2012.

[66] S.H. Oh, J.G. Han, Y. Kim, J.H. Ha, S.S. Kim, M. H. Jeong, H. S. Jeong, N.Y. Kim, J. S. Cho, W. B.Yoon, S.Y. Lee, D. H. Kang, & H. Y. Lee (2009). Lipid production in Porphyridium cruentum grown under different culture conditions. Journal of Bioscience and Bioengineering, 108(5), 429-434. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.05.020

[67] A. T. Koçer, B. İnan, S. Kaptan Usul, D. Özçimen, M. T. Yılmaz, ve İ. Işıldak, "Exopolysaccharides from microalgae: production, characterization, optimization and techno-economic assessment", Braz J Microbiol, c. 52, sy 4, ss. 1779-1790, Ara. 2021, doi: 10.1007/s42770-021-00575-3.

[68] M. Vehapi, A. Yilmaz, ve D. Özcimen, "Investigation of antibacterial and antioxidant activities of various algae species", Journal of Biotechnology, c. 280, s. S80, 2018.

[69] G. Ozdemir, N. Ulku Karabay, M. C. Dalay, ve B. Pazarbasi, "Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*", Phytotherapy Research, c. 18, sy 9, ss. 754-757, 2004, doi: 10.1002/ptr.1541.

[70] E. Shannon ve N. Abu-Ghannam, "Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications", Marine Drugs, c. 14, sy 4, Nis. 2016, doi: 10.3390/md14040081.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

YAYINLARI

Bildiri

1. S. Gülsoy, İ. D. Ünlü ve D. Özçimen, 5. Ulusal Kutup Bilimleri Çalıştayı, Kutup Alglerinin Antiviral Etkinliği, İstanbul, 2021.