

**İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIK YAĞI OKSİDASYONUNDA ANTIOKSİDAN ETKİLİ FUNGUS  
EKSTRAKTLARININ KULLANIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hilal ÇALIK**

**Su Ürünleri Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. T. Tansel TANRIKUL**

**NİSAN 2017**

**İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIK YAĞI OKSİDASYONUNDA ANTIOKSİDAN ETKİLİ FUNGUS  
EKSTRAKTLARININ KULLANIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hilal ÇALIK  
(Y120107040)**

**Su Ürünleri Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. T. Tansel TANRIKUL**

**NİSAN 2017**

İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün Y120107040 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Hilal ÇALIK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “BALIK YAĞI OKSİDASYONUNDA ANTİOKSİDAN ETKİLİ FUNGUS EKSTRAKTLARININ KULLANIMI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Prof. Dr. T. Tansel TANRIKUL**      .....

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**      **Doç. Dr. Ramazan SEREZLİ**      .....

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

**Doç. Dr. Aysun KOP**      .....

Ege Üniversitesi

**Teslim Tarihi**      :    **17.04.2017**

**Savunma Tarihi**    :    **30.03 2017**

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında bilimsel anlamda yardımlarını esirgemeyen tüm hocalarıma ve danışman hocam **Prof. Dr. T. Tansel TANRIKUL**'a,

Hayatım boyunca her zaman arkamda duran, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen **Aileme**,

Her zaman yanımda olan, beni cesaretlendiren ve destekleyen Su Ürünleri Mühendisi **M. Sina ATALAR**'a, laboratuvardaki çalışma arkadaşlarım Su Ürünleri Mühendisi **Dilara ÇAM** ve Su Ürünleri Yük. Mühendisi **Ömer KOCA**'ya,

Ayrıca bu çalışma **114O104** nolu “**Denizel Fungusların Antioksidan Potansiyellerinin Taranması**” başlıklı proje kapsamında desteklenmiş olup bana burs sağlayan **TUBİTAK**'a

Teşekkürlerimi sunarım.

Nisan 2017

Hilal ÇALIK

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
KISALTMALAR .....	vi
SEMBOLLER .....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ .....	viii
ŞEKİL LİSTESİ .....	ix
ÖZET .....	x
SUMMARY .....	xi
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ .....</b>	<b>5</b>
2.1 Denizel Süngerlerin Genel Özellikleri ve Biyolojisi .....	5
2.2 Süngerlerde Beslenme, Davranış ve Diğer Canlılarla İlişkileri .....	5
2.3 Denizel Funguslar ve Sekonder Metabolitler .....	6
2.4 Balık Yağı Oksidasyonu ve Doğal Antioksidan Kullanımı .....	8
<b>3. MATERYAL ve METOT .....</b>	<b>11</b>
3.1 Denizel Süngerlerin Toplanması .....	11
3.2 Süngerlerden Fungus İzolasyonu .....	11
3.3 Fungusların Fermantasyonu .....	12
3.4 Üretim Ortamlarının Özütlenmesi .....	12
3.5 Biyoaktivite Taraması .....	12
3.5.1 Kalitatif antioksidan aktivite ölçümü .....	13
3.5.2 Kantitatif antioksidan aktivite ölçümü .....	13
3.6 DNA İzolasyonu ve Fungus Türlerinin Tanımlanması .....	13
3.7 Balık Yağının Elde Edilmesi .....	14
3.8 Balık Yağı Oksidasyonunun Ölçümü .....	14
3.8.1 Ferrik tiyosiyanat metodu .....	15
3.8.2 Fe+3 standart (kalibrasyon) eğrisi .....	16
3.8.3 AOCS-Method Cd-18-90 standart metodu .....	17
3.9 İstatistiksel Analizler .....	18
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>19</b>
4.1 Süngerler .....	19
4.2 İnce Tabaka Kromatografi Sonuçları .....	20
4.3 İzole Edilen Fungal Suşlar ve Çalışılan Türler .....	22
4.4 DPPH Radikal Temizleme Kapasitesi .....	22
4.5 Peroksit Değerleri (PV) .....	27
4.5.1 Birinci deneme 60°C'de 7 günlük depolama .....	27
4.5.2 İkinci deneme 60°C'de 19 günlük depolama .....	29
4.5.3 25°C'de 50 günlük depolama denemesi .....	30
4.6 P-Anisidin Değerleri (PaV) .....	32
4.6.1 Birinci deneme 60°C'de 7 günlük depolama .....	32
4.6.2 İkinci deneme 60°C'de 19 günlük depolama .....	34
4.6.3 25°C'de 50 günlük depolama denemesi .....	35
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>38</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>46</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>47</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>55</b>

## KISALTMALAR

<b>FAO</b>	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
<b>PUFA</b>	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (Polyunsaturated Fatty Acids)
<b>Ω - 3</b>	: Omega 3
<b>İTK</b>	: İnce Tabaka Kromatografisi
<b>DPPH</b>	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>BHT</b>	: Bütil Hidroksi Toluen
<b>PV</b>	: Peroksit Değeri
<b>PAV</b>	: Para Anisidin Değeri
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>16 S rDNA</b>	: 16 S Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
<b>PDA</b>	: Potato Dextrose Agar
<b>CDA</b>	: Czapek Dox Agar
<b>PDB</b>	: Potato Dextrose Broth
<b>MEA</b>	: Malt Ekstrakt Agar
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>ITS</b>	: İnternal Ara Bölgeler (Internal transcribed spacer)
<b>pH</b>	: Hidrojenin Gücü (Power of Hydrogen)
<b>ABS</b>	: Absorbans
<b>LOOH</b>	: Lipid Hidroperoksit
<b>Fe</b>	: Demir
<b>IC 50</b>	: Maksimum İnhibasyon Konsantrasyonunun Yüzde Ellisi
<b>TBHQ</b>	: <i>tert</i> -Butylhydroquinone
<b>%RTK</b>	: Yüzde Radikal Temizleme Kapasitesi

## SEMBOLLER

<b>%</b>	: Yüzde
<b>g</b>	: Gram
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>m</b>	: Metre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>ug mL<sup>-1</sup></b>	: Mikrogram/ mililitre
<b>mg mL<sup>-1</sup></b>	: Miligram/ mililitre
<b>mg/L</b>	: Miligram/ litre
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>Lt</b>	: Litre
<b>Lt gün<sup>-1</sup></b>	: Litre/ gün
<b>ppm</b>	: Milyonda bir (parts per million)
<b>rpm</b>	: Dönüş hızı (Revolutions per minute)
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>°C</b>	: Santigrat Derece
<b>sn</b>	: Saniye
<b>M</b>	: Molarite
<b>Eq</b>	: Bir mol elektron ile birleşebilen element miktarı (equivalent)
<b>mEq</b>	: Bir ekivalan ağırlığın binde biri
<b>mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup></b>	: Peroksit değeri (milliequivalents of oxygen/ kilogram)
<b>%w/w</b>	: Ağırlıkça yüzde

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Çizelge 3.8.2.1</b> : Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında kullanılan Fe <sup>+3</sup> konsantrasyonları .....	16
<b>Çizelge 3.8.2.2</b> : Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması sonucu elde edilen absorbands değerleri .....	16
<b>Çizelge 4.1.1</b> : Projede kullanılan sünger örnekleri ve lokasyonları .....	19
<b>Çizelge 4.3.1</b> : Potansiyel olarak antioksidan aktivite gösteren fungal suşlar ve izole edildikleri süngerler .....	22
<b>Çizelge 4.4.1</b> : İTK görüntülerine göre seçilen fungal suşların DPPH radikal temizleme aktivitesi .....	23
<b>Çizelge 4.5.1.1</b> : Yüksek sıcaklıktaki balık yağlarının 7 günlük depolama süresince peroksit değerlerinde olan değişim (mEq O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> ) .....	28
<b>Çizelge 4.5.2.1</b> : Balık yağlarının yüksek sıcaklık etkisi altında ve 19 günlük depolama süresince oksidasyon düzeylerinde olan değişim (mEq O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> ) .....	29
<b>Çizelge 4.5.3.1</b> : Farklı konsantrasyonlarda ekstre eklenen balık yağlarının 25°C’de depolanması süresince gözlenen peroksit değerleri (mEq O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> ) .....	31
<b>Çizelge 4.6.1.1</b> : Balık yağlarının yüksek sıcaklık etkisi altında ve 7 günlük depolama süresince anisidin değerlerinde olan değişimler (mEq O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> ) .....	33
<b>Çizelge 4.6.2.1</b> : Fungus ekstreleri (%0,2) ilave edilmiş balık yağlarının yüksek sıcaklık etkisi altında ve 19 günlük depolama süresince anisidin değerlerinde olan değişim (mEq O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> ) .....	34
<b>Çizelge 4.6.3.1</b> : Balık yağlarının 25°C’de 50 günlük depolanması süresince anisidin seviyelerinde olan değişim (mEq O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> ) .....	36



## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 2.3.1:</b> 2010 yılı ortalarına kadar denizel funguslardan izole edilen yeni bileşiklerin fungal suşların kaynağına göre dağılımı (Ebel ve Rateb, 2010) .....	7
<b>Şekil 3.8.2.1:</b> Fe <sup>+3</sup> kalibrasyon grafiği .....	17
<b>Şekil 4.2.1:</b> Seçilen izolatlar antioksidan aktivitelerinin taranması A) DPPH eklemeyen önce B) DPPH ekledikten sonra .....	20
<b>Şekil 4.2.2:</b> Antioksidan aktivite taraması sonunda seçilen suşların antioksidan aktivitelerinin A) DPPH eklemeyen önce B) DPPH ekledikten sonra .....	21
<b>Şekil 4.2.3:</b> Seçilen izolatlardan elde edilen ham özütlerin İTK profilleri 254 nm’de B) 365 nm (Mobil faz: 90:10- Kloroform: Metanol ) .....	21
<b>Şekil 4.4.1:</b> Sentetik Antioksidan BHT’nin farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikal süpürme aktivitesi .....	23
<b>Şekil 4.4.2:</b> Farklı konsantrasyonlardaki <i>P. atrovenetum</i> (1.1.2a) fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi .....	24
<b>Şekil 4.4.3:</b> Farklı konsantrasyonlardaki <i>P. commune</i> (4.4.2.) fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi .....	23
<b>Şekil 4.4.4:</b> Farklı konsantrasyonlardaki <i>Cladosporium sp.</i> (4.1.7.) fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi .....	25
<b>Şekil 4.4.5:</b> Farklı konsantrasyonlardaki <i>P. restrictum</i> (1.16.1a) fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi .....	25
<b>Şekil 4.4.6:</b> Farklı konsantrasyonlardaki 1.10.1 fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi .....	26
<b>Şekil 4.4.7:</b> Farklı konsantrasyonlardaki 1.7.3 fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi .....	26
<b>Şekil 4.4.8:</b> Farklı konsantrasyonlardaki 1.7.1 fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi .....	27
<b>Şekil 4.5.1.1:</b> (A): %0,05 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstratlar, B): %0,1 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstratlar .....	29
<b>Şekil 4.5.2.1:</b> 60°C’de depolama sırasında peroksit değerlerindeki değişim grafiği (Balık yağı+ %0,2 w/w fungal ekstrat) .....	30
<b>Şekil 4.5.3.1:</b> (A): %0,05 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstratlar, (B): %0,1 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstratlar .....	32
<b>Şekil 4.6.1.1:</b> %0,05 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstratlar, (B): %0,1 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstratlar .....	34
<b>Şekil 4.6.2.1:</b> 60°C’de 19 günlük depolama süresince ikincil oksidasyon ürünlerinin değişim grafiği (Balık yağı + %0,2 w/w fungal ekstratlar) .....	35
<b>Şekil 4.6.3.1:</b> 25°C’de 50 günlük depolama süresince p-anisidin değişimleri (A): %0,05 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstratlar, (B): %0,1 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstratlar .....	37

## BALIK YAĞI OKSİDASYONUNDA ANTIOKSİDAN ETKİLİ FUNGUS EKSTRAKTLARININ KULLANIMI

### ÖZET

Sürdürülebilir su ürünleri yetiştiriciliğini etkileyen en önemli faktörlerden birisi kullanılan yem ve yem hammaddeleridir. Yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asiti (PUFA) içeren balık unu ve balık yağı, yemlerin temel bileşenlerindedir. Lipid oksidasyonu, balık ununun kalitesini ve balık yağının raf ömrünü etkileyen en kritik faktördür. Bu durum yem kalitesini etkileyerek balıklarda büyüme oranını yavaşlatmaktadır. Bu sorunu önlemek için antioksidan katkı maddeleri olarak kimyasal antioksidan bileşikler veya doğal özütler kullanılmaktadır. Yürütülen bu tez çalışması ile balık yağı oksidasyonunda antioksidan katkı maddesi olarak kullanılabilen fungal metabolitler araştırılmıştır.

Araştırmada elde edilen süngerler Ege Denizi kıyılarından toplanmıştır. Bu süngerlerden morfolojik olarak seçilen ve ayrılan 104 adet fungal suş izole edilmiştir. Etil asetat özütleri antioksidan aktivitelerinin tespitinde kullanılmıştır. Pasajlanarak elde edilen saf fungal suşlar katı pirinç ortamı kullanılarak fermente edilmiş ve kültür ortamları özütlenmiştir. Fungal özütlerin antioksidan aktiviteleri kalitatif (ince tabaka kromatografisi) ve kantitatif (DPPH radikal temizleme kapasitesi) olarak incelenmiştir. Kalitatif antioksidan aktiviteye göre seçilen suşların zengin ürün profillerine sahip olduğu bulunmuştur. Kantitatif antioksidan aktivite çalışmasında ise; DPPH radikal temizleme kapasitesi  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  için %92,8–94,7 arası değişen dört adet fungal suş diğer örneklerle göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu sebeple bu suşlar balık yağı denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiştir. DPPH analizine göre BHT ile karşılaştırıldığında *Penicillium commune* (4.4.2; %94,7) ve *Penicillium restrictum* (1.16.1a; %94,6) fungal suşları aktivite bakımından ilk sırada yer almışlardır. Balık yağı oksidasyon çalışmaları yüksek ve düşük sıcaklıklarda ( $60^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ) ve farklı konsantrasyonlarda (%0,05, %0,1, %0,2 w/w) yapılmıştır. Denemeler sıcaklıklara göre sırasıyla 7, 19 ve 50. günlerde tamamlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre,  $60^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 7 günlük deneme süresince balık yağında diğer suşlara göre en iyi antioksidan özelliği gösteren %0,1'lik konsantrasyondaki *P. commune* (4.4.2) fungal suşu olmuştur. 19 günlük stoklama sonucunda en düşük peroksit değeri balık yağına %0,2 oranında katılan *P. restrictum* (1.16.1a) özütü ile elde edilmiştir. Yine aynı özütün oluşan para-anisidin değeri ( $16,15 \text{ mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$ ) incelendiğinde yüksek sıcaklıkta BHT'ye ( $9,05 \text{ mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$ ) en yakın antioksidan özellik gösteren fungus olduğu tespit edilmiştir.  $25^{\circ}\text{C}$ 'de 50 gün yapılan balık yağı denemesinde ise *Aplysina aerophoba* süngerinden elde edilen 1.10.1 fungal özütünün eklendiği örneğin  $16,34 \text{ mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$  peroksit değeri ile BHT'ye ( $13,9 \text{ mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$ ) benzer aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *Cladosporium sp.* (4.1.7), *P. commune* (4.4.2) ve yüksek konsantrasyonda *P. restrictum* (1.16.1a) özütleri eklenen balık yağlarında BHT ( $2,65 \text{ mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$ ) ile karşılaştırıldığında benzer p-anisidin değerleri bulunmuştur.

# USE OF ANTIOXIDANT EFFECTIVE FUNGI EXTRACTS ON FISH OIL OXIDATION

## SUMMARY

The major factors are feed and feed components in sustainable aquaculture. Fish oil and fish meal contain high levels of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and they are essential for fish feeds. Lipid oxidation affects the quality of fish meal and shelf-life of fish oil and it is an important factor in undesired feed quality which retards fish growth. In addition, lipid oxidation is a primary problem in the storage of foodstuffs. Therefore synthetic chemical compounds or natural extracts have been used to prevent the lipid oxidation and extend or control the shelf-life. In this thesis the potential use of marine fungi as an antioxidant additive for fish oil oxidation was investigated.

Marine sponges in the research were collected from the coast of Aegean Sea. A total of 104 fungal strains were selected and separated morphologically. They were isolated from the sponges and their ethyl acetate extracts were tested for their antioxidant activity. Pure fungal strains obtained by passaging and cultured separately in small scale rice mediums. The mediums were extracted with ethylacetate. Antioxidant activities of the fungal extracts was performed through qualitative method (using TLC) and quantitative method (DPPH assay). It has been found that strains which were selected by qualitative antioxidant activity have rich product profiles. In the quantitative antioxidant activity study; four fungal strains gave better results than the other samples on their % scavenging capacity ranged from 92.8 to 94.7% for 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sample. For this reason, these strains were selected for use in fish oil experiments. The result of total antioxidant by DPPH assay show that the fungal isolates *P. commune* (4.4.2; 94.7%) ve *P. restrictum* (1.16.1a; 94.6%) came first in terms of activity comparing with BHT (79%). Fish oil oxidation studies were carried out at high and low temperatures (60°C, 60°C, 25°C) and at different concentrations (0.05%, 0.1%, 0.2% w/w). The experiments were completed on days 7, 19 and 50, respectively, based on temperatures. According to the results, *P. commune* (4.4.2) fungal strain at 0.1% concentration showed the best antioxidant properties compared to other strains in fish oil during the 7 days tested at 60°C. At the end of 19 days of storage, the lowest peroxide value was obtained with an extract of *P. restrictum* (1.16.1a) added to fish oil at 0.2%. When the p-anisidine value (16.15 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) of the same extract was examined, it was determined that the antioxidant fungus has the closest antioxidant activity to BHT (9.05 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) at high temperature. Fungal strain 1.10.1 from *Aplysina aerophoba* sponge (anisidine value; 16.34 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) performed similar lower secondary oxidation products as commercial antioxidant BHT (13.9 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) for 50 days at 25°C. Besides, the similar p-anisidine values were observed from *Cladosporium sp.* (4.1.7), *P. commune* (4.4.2) and higher concentration of *P. restrictum* (1.16.1a) as BHT (2.65 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>).

## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artmasıyla beraber kaliteli ve güvenli gıda ihtiyacı da gün geçtikçe hızlı bir şekilde artmaktadır. İnsan beslenmesindeki esansiyel amino asitlerin ve yağ asitlerinin kaynağını, balık ve balıktan üretilen temel gıda ve gıda takviyesi ürünler oluşturmaktadır. Yüksek yapıli organizmalarca üretilmeyen, insan beslenmesinde yer alan ve vücut için son derece önemli yağ asitleri Omega-3 ( $\omega-3$ ) yağ asitleri olup gıdalardan elde edilirler (Gordon ve Ratliff, 1992). Linoleik asit ve  $\alpha$ -linolenik asit  $\omega-3$  yağ asiti türevidirler ve balıklarda bol miktarda bulunmaktadır. Bu yağ asitleri hayvansal organizmalarda hormon benzeri etki gösteren prostaglandin ve türevlerinin biyosentezinde öncül molekül olarak kullanılır. Prostaglandinler başta bağışıklık olmak üzere enfeksiyonlarda denetleyici rol oynamaktadırlar. Bununla beraber kan değerleri ve kalp sağlığı konusunda pek çok biyolojik süreçte yer almaktadırlar (Komoto ve ark. 2004).

İnsan sağlığı açısından da önemli bir gıda olan balık ve balık yağı, hayvancılıkta ve özellikle su ürünlerinin beslenmesinde en değerli yem hammaddesidir. Su ürünleri sektörünün hem sürdürülebilir gelişmesi hem de elde edilecek ürünün kalitesinin artırılması beslemede kullanılan yemlerin sağlıklı ve kaliteli olmasına bağlıdır. Balığın büyümesi, üremesi ve et kalitesi yemlerin kalitesi ile doğru orantılıdır. Ancak, balık unu ve yağının yüksek oranda doymamış yağ asitleri içermesinden dolayı çok hızlı bir şekilde okside olması uzun süreli depolamalarda besin kalitesini düşürmekte ve sağlık yönünden ciddi sorunlara neden olmaktadır (Waissbluth ve ark., 1971). Yoğun üretimin yapıldığı kültür koşullarında balık yağının okside olmasından kaynaklanan yetersiz beslenme ile birlikte balık hastalıklarının oluştuğu bilinmektedir. E vitamini bakımından yetersiz ve okside olmuş yemlerle beslenen balıklarda, yemden yararlanmanın düşük olması, büyümede yavaşlama, durgunluk, renkte koyulaşma, öncelikle karaciğerde çoğu kez de dalak ve böbrek gibi hemapoetik dokularda ceroidin birikiminin olduğu, uzun süreli beslemelerde ise acılaşmış yeme bağlı balık ölümlerinin görüldüğü bildirilmiştir (Fowler ve Banks, 1969; Roberts ve ark., 1979; Smith, 1979; Moccia ve ark., 1984; Tacon, 1992).

Ayrıca okside olmuş yemle beslenen balıkların kan parametrelerinden bazılarının olumsuz yönde etkilendiği, hemoglobin ve hematokrit değerlerinde bir azalmanın olduğu, besleme süresine bağlı olarak mikrotik aneminin gözleendiği saptanmıştır (Smith, 1979; Moccia ve ark., 1984; Tacon, 1992). Bu sebeplerden dolayı farklı bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen un ve yağlar balık yemi formülasyonlarında kullanılmış ancak balık unu ve yağdan elde edilen verime ulaşamamıştır (Laohabanjong ve ark., 2009; Turchini ve ark., 2013; Wulff ve ark., 2012).

Bunun yanında, günümüz koşullarında başta akuakültür olmak üzere yem sektöründe kullanılan en önemli hammadde olan balık unu ve balık yağının sınırlı üretimi ve bu sebeple pahalı oluşu bu hammaddeye ulaşmayı her geçen gün daha çok zorlaştırmaktadır. Özellikle balık unu ve yağının ana kaynağı olan denizlerdeki balık stoklarının azalması ve avcılığın maksimum sınırlara dayanması gelecekteki ihtiyacın karşılanması ve sektörün devamlılığının risk altında olduğunun göstergesidir. Bununla beraber avcılığa bağlı olarak azalan balık stokları ve artan nüfus balık yetiştiriciliğine olan talebi arttırmış ve son yıllarda en hızlı büyüyen hayvansal üretim sektörü su ürünleri sektörü olmuştur (FAO, 2012). Artan dünya nüfusu da dikkate alındığında tüm bu gelişmeler gelecekteki talebi aynı zamanda sürdürülebilirliği sağlamak için zararlı çevresel etkilerin azaltılmasına ve mevcut kaynakların optimum kullanımına daha fazla önem verilmesi gerektiğini göstermektedir.

Tüm bunların sonucunda çevre ve insan sağlığına zarar vermeden, mevcut durumu iyileştirmenin unsurlarından biri, balık unu ve balık yağının ve bunları içeren yemlerin uzun süre okside olmadan korunmasıdır (Cabello, 2006; Gutteridge ve Halliwell, 2006; Wulff ve ark., 2012). Günümüzde oksidasyonu önlemek için balık unu, balık yağı ve balık yemlerinde antioksidan olarak ya karasal kaynaklı organizmalardan (bitkisel makro-organizmalar veya karasal mikroorganizmalar) ekstrakte edilen sitrinin, protokatechuic asit gibi ürünler ya da kimyasal olarak sentezlenen Bütillendirilmiş hidroksianisol E320, Bütillendirilmiş hidroksitoluen E321, Etoksikuin E324 bileşikleri kullanılmaktadır (Yen ve Lee, 1996). Bunların yanı sıra antioksidan katkı maddesi olarak gıda işleme proseslerinin yan ürünleri de denenmektedir. Buna rağmen bozulan çevre koşulları ve giderek artan stok yoğunlukları yeni ve daha etkili antioksidan ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca

artan kimyasal kullanımının çevre üzerine olan baskısı ve oluşan çevre bilinciyle özellikle katkı maddelerinin çevreyle dost olmasını zorunlu hale getirmektedir. Genel olarak balık yemlerinde kullanılacak, çok düşük konsantrasyonlarda dahi etkili ve doğaya en az zararı veren, yeni kimyasal yapılara sahip ve olabildiğince az kimyasal değişime uğratılan, sitotoksitesi düşük ve çeşitli biyoaktivitelere sahip doğal ürünlerin eldesine yönelik araştırmaların yapılması oldukça önem kazanmıştır (Demain ve Zhang, 2005). Tüm bunlar besin değeri yüksek ve sınırlı bir kaynağa sahip olan balık yağının okside olmasını önleyecek yeni ve doğal bileşiklerin eldesini zorunlu hale getirmiştir. Su ürünleri sektöründeki bu alanda yapılmış çalışmalar incelendiğinde; balık yağı oksidasyonunu önlemek amaçlı bitkisel ve alg kaynaklı antioksidan maddeler veya özütlerin kullanıldığı görülmektedir (Hwang ve ark., 2014; Kindleysides ve ark., 2012). Ancak balık yağındaki oksidasyonu önlemede denizel funguslardan özütlenen antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin kullanımına yönelik çalışmaya rastlanmamıştır.

Funguslarla yapılan üretimlerde bitkilerde olduğu gibi mevsimsel büyüme, hasat zamanı, çevresel koşullara bağlılık ve benzeri faktörlere bağlı kalınması gerekmemektedir. Ayrıca, karasal bitki ve alg gibi üretimler için gerekli olan büyük alanlara da ihtiyaç duyulmamaktadır. Çünkü fungal suşlardan antioksidan madde üretimi istenilen hacimlerde ve belirli koşullarda ara verilmeden birbirini takip eden süreçlerde yapılabilmektedir. Bundan dolayı fungal suşlardan yapılan üretim; alg ve bitkiye göre daha etkili ve sürdürülebilir potansiyele sahiptir.

Biyoteknoloji sektöründe en çok üzerinde durulan alanlardan biri doğal ürün araştırmalarıdır (Querellou, 2010). Doğal ürün araştırmacıları da başta sağlık sorunları olmak üzere günümüzdeki pek çok sorunun çözümüne yönelik denizel organizmalardan elde edilen ürünleri araştırmaktadır. Çünkü denizler bünyesinde barındırdığı canlılara çeşitli biyoaktivitelere sahip molekülleri sentezlemeleri için önemli fiziksel, kimyasal ve biyolojik şartlar sunmaktadır. Bu durum canlılarda yeni bileşiklerin sentezini desteklemektedir (DeLong, 2007; Lozupone ve Knight, 2007). Bugüne kadar denizlerdeki mikrobiyal çeşitliliğin yaklaşık olarak %0.01 kadarını aydınlatabildiğimiz varsayılmakta (Simon ve Daniel, 2010) ve özellikle denizel mikrobiyal canlıların küçük doğal molekül üretim potansiyelleri sınırsız görünmektedir (Newman ve Cragg, 2007). Süngerlerle birlikte yaşayan mikroorganizmalardan amino asit türevleri, nükleotit türevleri, porifirinler,

terpenoidler ve steroit türevleri gibi pek çok farklı aktiviteye sahip bileşik elde edilmektedir (Piel ve ark., 2005). Bu mikroorganizmalarca üretilen bileşikler gıdadan sağlığa çok farklı biyoteknolojik alanda kullanılmaktadır (Proksch ve ark., 2002; 2003, Thakur ve Müller, 2004). İspanya'nın Akdeniz kıyısı olan Moraira kıyılarından toplanan alglerden izole edilen *Acremonium sp.* fungal suşundan izole edilen 7-isopropenylbicyclo [4.2.0] octa-1,3,5-triene-2,5-diol molekülünün önemli antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Abdel-Lateff ve ark., 2002). Benzer şekilde Kore'nin Gagu-do kıyılarından çıkarılan Choristida sınıfı süngerden izole edilen *Acremonium strictum* fungal suşundan elde edilen acremostriktin molekülünün hem antimikrobiyal hem de antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Julianti ve ark., 2011).

Yapılan bu çalışmada, doğal ürünlerin potansiyel üreticileri olan denizel funguslardan balık yağındaki oksidasyonu önleyecek ve sürdürülebilirliği destekleyecek antioksidan maddelerin eldesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, Ege Denizi'nin farklı lokasyonlarından toplanan süngerlerden çeşitli yöntemlerle fungus suşları izole edilmiş, antioksidan aktivitelerinin kalitatif ve kantitatif olarak taranmış ve iyi antioksidan aktivite gösteren suşların balık yağının oksidasyonunu önlemede kullanım potansiyeli belirlenmiştir. Ayrıca 16S rDNA analizi yapılarak seçilen izolatların türleri belirlenmiştir.

## 2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

### 2.1 Denizel Süngerlerin Genel Özellikleri ve Biyolojisi

Metazoa'nın en ilkel grubunu oluşturan ve 19. yüzyılın başlarında, bitki benzeri hayvanlar olan zoophyta grubunda incelenen süngerler 1858 yılında Linne tarafından *Coelenterata* grubu içinde incelenmiş ve bugünkü yerini alarak *Porifera* filumunda incelenmeye başlanmıştır. Süngerler *Calcarea* (5 order, 24 aile), *Demospongiae* (15 order, 92 aile) ve *Hexactinellida* (6 order, 20 aile) olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadırlar. Büyük bir bölümü denizlerde yaşamaktadır. Bununla birlikte tatlı sularda yaşayan türleri de mevcuttur. Denizlerde yaşayan süngerler kumlu ve çakıllı alanlarda, kendilerini taş, kaya, resif, ve kabuklu canlılar üzerine sabitleyerek yaşamaktadır. Çok değişken dış görünüşe sahip olan süngerler vazo, kadeh, tüpsü, kütleli parmaklı, yapraklı, örtü şeklinde ve kabartılı şekillerde bulunabilirler (Hooper ve Van Soest, 2002). Sindirimleri tamamen hücre içinde gerçekleşir. Büyüklükleri 1 mm'den 1 m'ye kadar değişiklik gösterebilir, beyaz, sarı, kavuniçi, kırmızı, yeşil, siyah ve menekşe gibi oldukça farklı renklere sahip olabilirler (Geldiay ve Kocataş, 2012).

### 2.2 Süngerlerde Beslenme, Davranış ve Diğer Canlılarla İlişkileri

Süngerlerde bulunan kamçılı koanosit hücreleri sayesinde 0,1 µm–50 µm arasındaki tüm mikroskobik ve organik organizmalar suyla beraber vücut yüzeyindeki porlardan içeriye alınır ve suyun içindeki organizmalar filtre edildikten (ortalama 22 L gün<sup>-1</sup>) sonra oskulumdan dışarıya atılır. Ayrıca vücutlarında bulunan cyanobakterilerin yeterli ışık varlığında fotosentez yapması sonucunda ekstra besin de sağlayabilmektedirler. Süngerler hücre solunumu yapmaktadırlar. Spiküllü yapıları ve kötü kokuları nedeniyle diğer organizmalar tarafından besin olarak tercih edilmezler. Kas ve sinir sistemine sahip olmadıkları için davranışları kısıtlıdır. Kendilerini bir yere sabitleyerek, koloniler halinde ya da soliter şekilde yer değiştirmeden yaşarlar. Bazıları ise diğer hayvanlar üzerinde epizoon (oxyrhynchyn yengeçlerde ve paguruslar'da) olarak buldukları için bu hayvanın hareketi ile yer değiştirebilirler (Geldiay ve Kocataş, 2012). Delikli yapılarından dolayı genellikle poliket ve crustacea türlerine ev sahipliği yaparlar. İyi bir konakçı olan süngerlerin kütlelerinin %50-60'ı mikroorganizmalardan oluşmaktadır (Wang, 2006). Bu çeşitlilik



besinsel ihtiyaçların karşılanması gibi birçok yaşamsal formları da içermektedir (Kennedy ve ark., 2009). Denizel omurgasız canlılar arasında en yüksek doğal ürün sayısı ve yeni biyoaktif metabolit potansiyeline sahip olan canlılardır (Thakur ve ark., 2004; Park ve ark., 2006). Yapılan moleküler çalışmalarla, süngerlerin *Proteobacteria*, *Nitrospira*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Poribacteria* ve *Verrucomicrobia* cinslerine ait birçok bakteri türünü barındırdığı rapor edilmiştir (Thomas ve ark., 2010). Ayrıca süngerlerle birlikte yaşayan diğer mikroorganizmalar da funguslar ve alglerdir. Bu konakçı mikroorganizmalar besinsel ihtiyaçlarını süngerlerden karşılarken, öte yandan süngerlerin iskeletlerinin sabit kalmasını, metabolik atıklarının sindirimini ve koruyucu metabolitlerin üretimini sağlayarak (Hentschel ve ark., 2002) simbiyotik bir ilişki içerisinde bulunmaktadırlar.

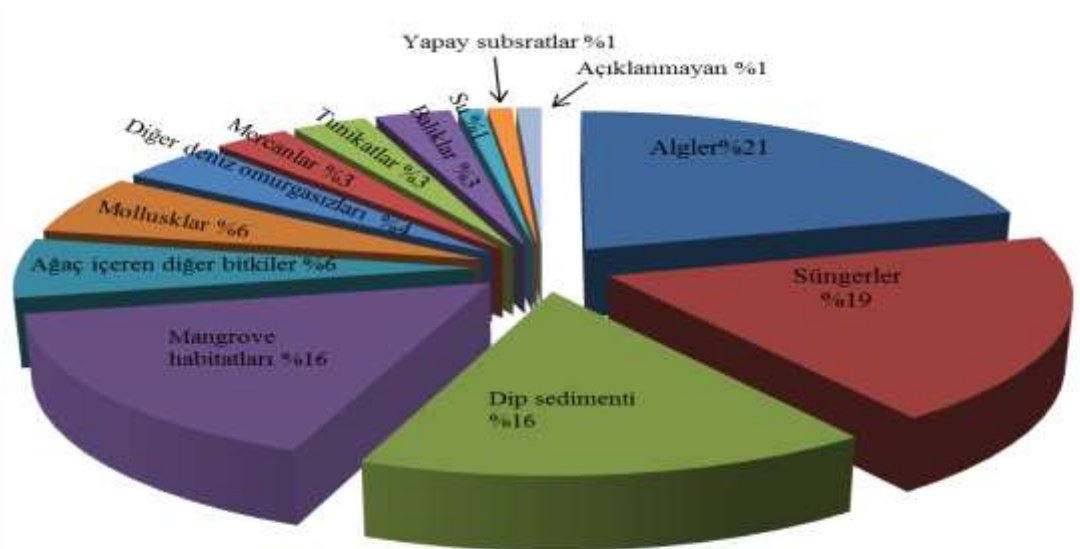
### **2.3 Denizel Funguslar ve Sekonder Metabolitler**

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tıp ve tarım alanında hastalıklara karşı korumada doğadaki benzersiz karbon yapıları ile yol gösterici yapılar olarak denizel kaynaklı funguslardan elde edilen biyoaktif sekonder metabolitler ilgi çekmektedir. Yakın zamana kadar biyokimyagerler ve farmakologlar yoğun olarak karasal funguslarla ilgilenmişlerdir. Ancak biyolojik açıdan aktif sekonder metabolitlerin zengin kaynağı olarak anılan ve tanımlanan karasal funguslar birçok defa yeniden çalışıldığından ortaya çıkan ekonomik kayıplar göze çarpmaya başlamıştır. Bu sebeple araştırmacılar okyanuslar gibi çok az araştırılan habitatlara ve ekolojik nişlere yönelmişlerdir. Okyanuslar yeryüzünün yaklaşık dörtte n kapsamaktadır. Bünyesinde; derin hidrotermal delikler, süngerler, algler ve mangrove ormanları gibi ekolojik nişleri bulundurması sebebiyle belirli mikroorganizmaların izolasyonuna olanak veren farklı habitatlar sağlamaktadır.

Farmakolojik olarak önemli aktif metabolitlerin kaynağı olarak dikkat çeken bu denizel organizmalar arasında bakteri, siyanobakteri, mikroalgler ve funguslar bulunmaktadır. Biyoaktif bileşiklerce zengin yapıya sahip denizel funguslardan elde edilen sekonder metabolitlerin kimyasal çeşitliliği ve biyoaktif doğal ürün kaynaklarının araştırılması yeni keşifler için umut vaat etmektedir (Parvatkar ve ark., 2009; Prachyawarakorn ve ark., 2008; Trisuwan ve ark., 2008). Denizel funguslar ile yapılan çalışmalarda farklı karbon yapılarına sahip ve çeşitli bileşikler içeren

330'dan fazla yeni metabolit genel olarak 2002-2006 yılları arasında rapor edilmiştir (Kjer ve ark., 2010). Özellikle antibakteriyal ve antikanser aktivitesi daha önce rapor edilmeyen karasal fungus hatlarının (Hiort ve ark., 2004) süngerlerle ilişkili denizel formlarından, potansiyel antibakteriyel ve antikanser aktiviteleri olan değişik metabolitler elde edilmiştir (Jensen, 2000). Bugni ve ark. (2003)'ün yaptıkları bir çalışmada denizel kaynaklı fungusların izole edildikleri yerler incelenmiş ve yeni bileşiklerin keşfinde ilk sırayı %28'lik oranla süngerlerle ilişkili olanların aldığı görülmüştür. Süngerlerin kütlelerinin %50-60'ını mikroorganizmaların oluşturması nedeniyle süngerler iyi birer konakçı olup, mikroorganizmalar ile olan ilişkileri ürün çeşitliliğini artırmaktadır (Wang, 2006).

Denizel süngerlerle ilişkili funguslardan elde edilen metabolitlerin birçok farklı alanda denemeleri yapılmıştır. Akdeniz'den toplanan *Ircinia fasciculata* süngerinden izole edilen *Penicillium chrysogenum* suşunun ürettiği sorbicillactone A lösemi hücrelerine karşı umut vadeci aktivite göstermiştir (Bringmann ve ark., 2005). Abrell ve ark. (1996), Endonezya'ya özgü sünger *Spirastrella vagabunda*'dan izole edilen ve henüz tanımlanmamış bir fungusun *Bacillus subtilis* türüne karşı tetrasikline göre daha hafif antibiyotik etki gösteren 14,15-Secocurvularin bileşiğini elde etmişlerdir.



**Şekil 2.3.1.** 2010 yılı ortalarına kadar denizel funguslardan izole edilen yeni bileşiklerin fungal suşların kaynağına göre dağılımı (Ebel ve Rateb, 2010).

Kore kıyılarındaki tanımlanmamış *Choristida* süngerinden elde edilmiş olan *Acremonium strictum* fungusundan izole edilen yeni doğal ürün olan acremostictinin orta derecede antioksidan aktivite ve düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Julianti ve ark. 2011). Süngerler ile ilişkili *Eurotium cristatum* fungusunun ham ekstraktlarının in vitro olarak antikanser aktiviteleri incelenmiş olup, etil asetat ile özütlenen bu denizel fungusdan hücre büyümesini engelleyici etkili bir bileşik (Bileşik 1) elde edilmiştir (Almeida ve ark, 2013). Ishikawa ve ark. (1996)'nın yaptığı çalışmada; *Penicillium herquei* türü fungustan üretilen atrovenetin pigmentinin gıdalara sarı renk vermesinin yanında antioksidan özellik de göstermiştir. Böylece fungusların farklı alanlarda çözüm üretebilecek biyoaktivitelere sahip oldukları rapor edilmiştir.

#### **2.4 Balık Yağı Oksidasyonu ve Doğal Antioksidan Kullanımı**

Balık yağı, başta karaciğer ve deri olmak üzere balığın tamamından, kaynatma veya buharla pişirme gibi fiziksel yöntemlerle ya da kimyasal yöntemlerle elde edilmektedir.

Kaliteli bir balık yağı; homojen, tortusuz, akıcı kıvamda, berrak sarı renkli, balığa has kokusu olmalı ve tadı acı olmamalıdır. Yapısında demir, bakır, fosfor, kükürt gibi mineraller içermektedir. Balık yemlerindeki birincil enerji kaynağı olan balık yağının yağ asit değerleri avlama sezonundan, avlama alanından, işleme tekniklerinden, balık türünden ve suyun sıcaklığından etkilenecek çok geniş aralıkta değişim göstermektedir. Balık yağı doymamış yağ asidi içeriği yüksek olduğundan, ısı, ışık ve bazı ağır metallerin katalitik etkisinin atmosferik oksijenle birleşmesiyle kolayca oksitlenmekte ve bozulmaktadır (Çakmak, 2003). Oksidasyon sonucu oluşan hidroperoksitler lizin ile tepkimeye girerek aminoasit kullanımını azaltmakta ve yağda çözünen vitaminlerin yararlanılabilirliğini düşürmektedir (Korkut ve ark., 2007). Oksitlenme sonucu bozulan yağların tadı acılaştır, yemde renk, tat ve aroma bozukları meydana gelir. Günümüzde balık unu, balık yağı ve balık yemlerindeki oksidasyonu önlemek için antioksidan olarak karasal kaynaklı organizmalardan (bitkisel, mikrobiyal kaynaklı) elde edilen sitrinin, protokatechuic asit gibi veya kimyasal olarak sentezlenen (Bütillendirilmiş hidroksianisol E320, Bütillendirilmiş hidroksitoluen E321, Etoksikuin E324) bileşikler kullanılmaktadır (Yen ve Lee,

1996). Bunun yanında gıda işleme proseslerinin yan ürünleri de antioksidan katkı maddesi olarak denenmiştir (Kalogerakis ve ark. 2013).

Su ürünleri sektörüne yönelik olarak bu alanda yapılmış çalışmalar incelendiğinde balık yağı oksidasyonunu önlemek amaçlı bitkisel ve alg kaynaklı antioksidan maddeler veya özütler kullanılmıştır (Hwang ve ark., 2014; Kindleysides ve ark., 2012). *Peumus boldus* bitkisinden elde edilen Boldin'in, balık yağının metal kaynaklı oksidasyonuna karşı antioksidan etkisine bakılmış ve tüm denemelerde Boldin'in  $\alpha$  tocopherol ve sentetik antioksidanlara oranla iyi bir antioksidan etkisi olduğu bulunmuştur (Valenzuela ve ark., 1991). Kurutulmuş yabani mercanköşkünün uskumru yağının oksidasyonunu önlemedeki etkinliği araştırılmış ve %1'lik mercanköşkü özütünün 200 ppm'lik TBHQ ile aynı etkiyi gösterdiği rapor edilmiştir (Tsimidou ve ark., 1995).

Farmakolojide kullanımı ile doğal ürünler sınıfında yer alan *Phaeophyceae*'lerde bilinen phlorotannins (kahverengi alg polifenoller) üzerine yapılan çalışmada; *Sargassum kjellmanianum*'dan elde edilen phlorotannin'in %0,02 BHT'den (tertbutyl-4-hydroxytoluene) yaklaşık 2,6 kat daha fazla antioksidan aktiviteyle balık yağı oksidasyonunu önlediği bildirilmiştir (Xiaojun ve ark., 1996). İran'da bulunan *Rosa damascena* türünün kimyasal kompozisyonu ve antioksidan aktivitesi çalışılmış ve taze güllerden elde edilen hidro-alkolik ekstraktın serbest radikal temizleme kapasitesinin ve E vitamini ve bütillenmiş hidroksitoluene (BHT) karşı da antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Yassa ve ark., 2009). DPPH metodu ile bazı gül türlerinin (*Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* ve *Rosa brunonii*) antioksidan ve fenolik bileşikleri araştırılmış ve sonuçlara göre *R. brunonii* en yüksek (%64) serbest radikal temizleme etkisi gösterirken *R. bourbonia* (%51) ve *R. damascena* (%43) istatistiki olarak daha az serbest radikal temizleme etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (Kumar ve ark., 2009).

Hamsi balığının (*Engraulis encrasicolus*) buzdolabında depolanması süresince kimyasal, fiziksel ve duyuşal parametrelerinde meydana gelen değişimleri incelemek üzere karides (*Aristaeomorpha foliacea*) kabuklarından elde edilen ekstrakt kullanılmış ve bu çalışma ile balıkların depolanması esnasında sentetik antioksidanların (BHT) yanı sıra kabuklulardan elde edilen doğal ekstrakt kullanımının da uygun olacağı belirlenmiştir (Küçükgülmez, 2011). Yeni Zelanda'da alg ekstrelerinin balık yağı oksidasyonundaki antioksidan potansiyelleri incelenmiş

ve kahverengi alg ekstralarının kırmızı alg ekstralarına göre daha iyi bir performans gösterdiği tespit edilmiş ve en iyi sonucu veren türün *Ecklonia radiata* kahverengi alginin olduğu bulunmuştur (Kindleysides ve ark., 2012). Patates kabuğunun farklı organik solventlerle hazırlanan ekstraktının ve sentetik antioksidan olan BHA'nın gümüş sazan balığı yağındaki oksidatif stabilitesi incelenmiş, patates kabuğunun doğal antioksidan olarak gümüş sazan balığı yağında kullanılabileceği görülmüştür (Hassane Hamadou ve ark., 2013). Denizel materyallerden elde edilen deneysel balık yemlerinde farklı doğal antioksidanların etkileri araştırılmış ve bu yemdeki en etkili antioksidanların askorbik asit ve biberiye ekstraktı olduğu bulunmuştur. Tocopherol karışımının eklenmesiyle askorbik asitin etkisi de arttırılmıştır (Hamre ve ark., 2010).

### **3. MATERYAL ve METOT**

#### **3.1 Denizel Süngerlerin Toplanması**

Endemik özelliği olan süngerler fungus çeşitliliğini artırmak için Ege Denizi'nin farklı bölgelerinden İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi dalış ekibi tarafından yapılan scuba dalışlar ile 0-40 m derinlikten toplanmıştır. Dalış mevkileri Çakmaklı, Sığacık ve Kömür olarak gerçekleşmiştir. Toplanan sünger örnekleri soğuk muhafaza şartlarında ve deniz suyu içerisinde laboratuvara getirilerek kullanım zamanına kadar +4°C'de stoklanmıştır.

#### **3.2 Süngerlerden Fungus İzolasyonu**

+4°C sıcaklıktaki deniz suyu içerisinde muhafaza edilerek laboratuvara getirilen sünger örnekleri, örnek yüzeyine yapışmış debrisinden arındırılmak üzere 3 defa steril deniz suyu ile yıkanmıştır. Örnekler yüzeylerinin steril hale gelmesi için %70'lik etanol (EMPARTA ®ACS, Almanya) içerisinde 1-2 dakika bekletilmiş ve sonrasında steril su ile yıkanarak etanol ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlem ile bakteriler ve istenmeyen mikroorganizmalar sünger örneklerinin yüzeyinden ayrılmıştır. Bu işlemden sonra sünger örnekleri biyolojik kabin içerisinde 1x1 cm boyutlarında steril bıçak yardımıyla kesilerek, izolasyon için önceden hazırlanan ve antibiyotik içeren (nalidixic asit, nistatin; Sigma Aldrich, Almanya) malt ekstrakt agar (MEA; Merck, Almanya), patato dextrose agar (PDA; Merck, Almanya) ve czapek dox agarlı (CDA; Merck, Almanya) petrilere yerleştirilmiştir. İzolasyon besiyerleri hazırlanırken granül besiyeri karışımlarından gerekli miktarlarda tartılıp, deniz suyunda çözündürülerek, pH ayarlaması yapıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilizasyon işlemine tutulmuştur. Ardından 20 mL olacak şekilde steril petri kutularına döküldükten sonra kullanılmıştır (Kjer ve ark., 2010).

İçerisine sünger örnekleri konulan petrilere etrafı parafilmle sarılarak yaklaşık iki hafta boyunca oda koşullarında inkübasyon için bekletilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca fungus üremeleri takip edilerek büyüme gösteren fungal izolatlar taze besiyerlerine aktararak pasajlanmıştır. Bu aşamada fungusların seçimi morfolojik farklılıklarına bakılarak yapılmıştır. Makroskobik olarak kontrol edilen fungusların yeni ortamlarındaki saflıkları mikroskobik olarak da kontrol edilmiştir.

Pasajlanarak saflaştırılan fungal suşların kısa ve uzun süreli stoklama işlemlerinin yapılması amacıyla temel olarak yarı yatık MEA besiyeri bulunan deney tüpleri kullanılmıştır. Yarı yatık besiyeri içerisinde kısa süreli stoklama için, MEA bulunan tüpler otoklavlandıktan sonra 45° yan yatırılarak dondurulmuştur. Uzun süreli saklamada kullanılan yarı yatık besiyeri için ise; içerisinde MEA, Yeast extract ve gliserol bulunan tüpler otoklavlandıktan sonra 45° yan yatırılarak dondurulmuştur.

### **3.3 Fungusların Fermantasyonu**

Fermantasyon işlemi; farklı substrat ortamları denenerek (buğday, PDB) metabolit üretiminde en iyi sonucu veren El-Neketi ve arkadaşlarının (2013) uyguladıkları yöntemine göre katı substrat olan pirinç ortamı üzerinde başlanmıştır (1 L'lik erlenlere 100 gr pirinç). Üretim için, petrideki besiyeri üzerinde büyüyen saf haldeki funguslardan steril koşullarda bir parça alınıp hazırlanan pirinç ortamı üzerine eklenerek fermantasyon işlemi başlatılmıştır. 30 gün boyunca inkübe edildikten sonra özütlenme aşamasına geçilmiştir.

### **3.4 Üretim Ortamlarının Özütlenmesi**

Katı hal fermantasyonundan sonra erlenlere organik çözücü olarak etil asetat (EMPARTA ®ACS, Almanya) eklenerek 1 gece +4°C'de bekletilmiştir. Eklenen solventin her yere nüfuz etmesi için örnekler homojenizatörle parçalanmış ve sonrasında 45-46 mm çapında kaba filtre kâğıdı kullanılarak balon joje içerisine süzümüştür. 40°C'de evaporatörde kurutulan süzüntüden elde edilen özüt, gerektiğinde kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir (Kasetrathat ve ark., 2008).

### **3.5 Biyoaktivite Taraması**

Antioksidan aktivite Murray ve ark. (2004) tarafından uygulanan yöntemler modifiye edilerek benzer şekilde hem kalitatif hem de kantitatif olarak incelenmiştir.

### 3.5.1 Kalitatif antioksidan aktivite ölçümü

Kalitatif tarama ince tabaka kromatografi (İTK) plağı üzerinde yapılmıştır. Silika jel ince tabaka kromatografi plaklarının üzerine elde edilen özütlerden 5 µL konulup kurutulduktan sonra üzerine 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH; Sigma Aldrich, Almanya) solüsyonu damlatılmıştır. Karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra mor renkli DPPH spotlarının renginin sarıya dönmesi takip edilerek renk dönüşünün gözlemlendiği özütlerin potansiyel olarak antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

### 3.5.2 Kantitatif antioksidan aktivite ölçümü

Daha önce Blois (1958) ve Amarowicz ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemler modifiye edilerek fungal ekstraktların DPPH radikal temizleme kapasitesi tespit edilmiştir. Funguslardan elde edilen özütlerden 20-2000 µg mL<sup>-1</sup> (20, 40, 60, 80, 100, 500, 1000 ve 2000 µg mL<sup>-1</sup>) arasında değişen konsantrasyonlar oluşturulmuştur. Oluşturulan konsantrasyonlar 1 mL %0.004'lük DPPH solüsyonu ile tamamlanarak karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda absorbanslar 517 nm dalga boyunda ölçülmüş ve elde edilen absorbanslar BHT standardına karşı yüzdelik olarak değerlendirilmiştir. Azalan absorbans, geriye kalan DPPH miktarını serbest radikal temizleme aktivitesi olarak vermiştir. Her bir konsantrasyon 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmış ve sonuçlar tekrarların ortalaması hesaplanarak verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

$$\% \text{Radikal Temizleme Kapasitesi} = [( \text{KontrolABS} - \text{ÖrnekABS} ) / \text{KontrolABS}] \times 100$$

ABS = Absorbans

### 3.6 DNA İzolasyonu ve Fungus Türlerinin Tanımlanması

En yüksek antioksidan aktiveye sahip olduğu belirlenen *Cladosporium sp.* (4.1.7), *P. commune* (4.4.2), *P. restrictum* (1.16.1a) fungal izolatlarının Fermantes GeneJet Genomic DNA isolation kiti kullanılarak DNA'ları izole edilmiştir. Fungal DNA'lar ITS1 ve ITS4 primeleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılıp, ITS1 primeri kullanılarak gen dizileri sekanslanmıştır (Kjer ve ark., 2010). Elde



edilen sekans verilerine göre diğerlerine göre daha iyi antioksidan üreticisi olarak belirlenen izolatların tür tanımlamaları biyoinformatik kullanılarak yapılmıştır.

### **3.7 Balık Yağının Elde Edilmesi**

Çalışmada çipura balıklarının (*Sparus aurata*) karaciğeri ve derisinden elde edilen balık yağı kullanılmıştır. Balıklardan alınan karaciğer ve deri parçalarının üzerine hekzan eklenip 10 dakika bekletilerek homojenizatörle parçalama işlemi yapılmıştır. Karışım 6000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra elde edilen üst faz alınarak, yağın solventten ayrılması için evaporatörde 20°C'de solvent uçurulma işlemi yapılmıştır. Elde edilen saf yağ, denemelerde taze olarak kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir (Kindleysides ve ark., 2012).

### **3.8 Balık Yağı Oksidasyonunun Ölçümü**

Birinci denemede; antioksidan aktivite tarama sonucuna göre seçilen ekstreler ve sentetik antioksidan olan bütil hidroksitolüenin (BHT; Sigma Aldrich, Almanya) balık yağındaki derişimleri düşük (%0,05 w/w) ve yüksek (%0,1 w/w) olmak üzere iki farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır (Kindleysides ve ark., 2012). Hazırlanan karışımlar 20 dakika oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra her bir karışımdan 10'ar mL alınıp kahverengi viallere konularak yüksek sıcaklıktaki (60°C) inkübasyon ortamına bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan örneklerden 0, 3 ve 7. günlerde örnek alınarak birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin değerleri incelenmiştir. İkinci yüksek sıcaklık deneme grubunda fungal ekstreler tek konsantrasyon (%0,2 w/w) olarak ayarlanmıştır. Karışımlar birinci denemeye benzer şekilde vialler içinde 60°C sıcaklığa ayarlı etüvde inkübasyona bırakılmış ve örneklemeler 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17 ve 19. günlerde yapılmıştır. Üçüncü denemede ise fungal ekstreler diğer denemelerden farklı olarak düşük sıcaklıkta (25°C) stoklama için balık yağına yüksek (%0,1 w/w) ve düşük (%0,05 w/w) olmak üzere iki farklı konsantrasyonda eklenmiştir. Örneklemeler 0, 13, 23, 37 ve 50. günlerde yapılmıştır. Tüm denemeler üç tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır. Ferrik tiyosiyanat metodu (Ueda ve ark., 1986) ile birincil oksidasyon ürünleri, AOCS-Method Cd-18-90 standart metodu ile ise ikincil oksidasyon ürünleri tespit edilmiştir.

### 3.8.1 Ferrik tiyosiyanat metodu

Ferrik tiyosiyanat metodunda, oluşan peroksitlerin (LOOH)  $Fe^{+2}$  iyonları  $Fe^{+3}$ 'e yükseltgenir ve ortama eklenen tiyosiyanat ile oluşan reaksiyon sonunda  $Fe^{+3}$  amonyum tiyosiyanat ile pembe renkli ferrik tiyosiyanat kompleksini oluşturur. Yöntem bu kompleksin spektrofotometrik olarak tayinine dayanmakta ve oluşan kompleksin absorbanısı lipid peroksitleri ile orantılıdır (Norveel Semb, 2012).

Yöntemde; azottan geçirilerek havası alınmış etanol (5 mL), 100  $\mu$ L distile su, 200  $\mu$ L %4'lük etanolik BHT solüsyonu, 200  $\mu$ L Reagent solüsyonu karıştırılarak öncelikle kör oluşturulmuştur. Reagent solüsyonunun eklenmesinin ardından 10 dakika beklendikten sonra 500 nm dalga boyunda etanole karşı absorbanısı okunmuştur.

Örnek ölçümünde ise; 100  $\mu$ L distile su yerine, izo-hekzan ile çözdürülerek (20 mg  $mL^{-1}$  konsantrasyonda) hazırlanan yağ örneğinden 100  $\mu$ L konularak 500 nm'de absorbanısı okunmuştur.

Elde edilen ölçümlerin değerlendirilmesinde 0,1 mg  $ml^{-1}$   $Fe^{+3}$  standart çalışma solüsyonuna göre oluşturulan standart grafik ve aşağıda verilen eşitlik kullanılmıştır.

$$PV \text{ (meq } O_2 \text{ kg}^{-1} \text{ )} = (A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör}}) \times V \times S / 55,845 \times 0,1 \times G \times 0,5$$

Eşitlikte;

$A_{\text{örnek}}$ : Örneğin absorbanı değeri

$A_{\text{kör}}$ : Körün absorbanı değeri

V: Örneklenen yağı çözmek için kullanılan hekzan miktarı (mL)

S: Standart grafiğin eğimi

55,845: demir molar ağırlığı ( $g \text{ mol}^{-1}$ )

G: Örnek alınan ve hekzan ile çözdürülen yağ miktarı (g)

0,1: Hekzan ile hazırlanan yağ solüsyonundan alınan örnek miktarı (mL)

0,5: Düzeltme faktörü

### 3.8.2 Fe<sup>+3</sup> standart (kalibrasyon) eğrisi

Standart grafik 0,1 mg mL<sup>-1</sup> Fe<sup>+3</sup> standart çalışma solüsyonuna göre oluşturulmuştur. Grafik hazırlanırken azottan geçirilerek havası alınmış etanol (5 mL), Çizelge 3.8.2.1'deki konsantrasyonlara göre hazırlanan 100 µL örnek, 200 µL %4'lük etanolik BHT solüsyonu, Amonyum tiyosiyanat (Merck, Almanya) ve Fe<sup>+2</sup> sülfat heptahidrat (Merck, Almanya) ile eşit hacimlerde hazırlanan Reagent solüsyonundan 200 µL eklenerek karışım oluşturulmuştur. Ardından Reagent solüsyonu eklenip 10 dakika beklendikten sonra etanole karşı absorbands 500 nm dalga boyunda okunmuştur. Her bir dilüsyon üç tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Çizelge 3.8.2.1 ve 3.8.2.2'de kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında kullanılan Fe<sup>+3</sup> dilüsyonları ve elde edilen absorbands değerleri verilmektedir. Fe<sup>+3</sup> için kalibrasyon grafiği, Fe<sup>+3</sup> konsantrasyonuna karşı ortalama absorbands değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilmiştir (Şekil 3.2.7.2.1).

**Çizelge 3.8.2.1.** Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında kullanılan Fe<sup>+3</sup> konsantrasyonları.

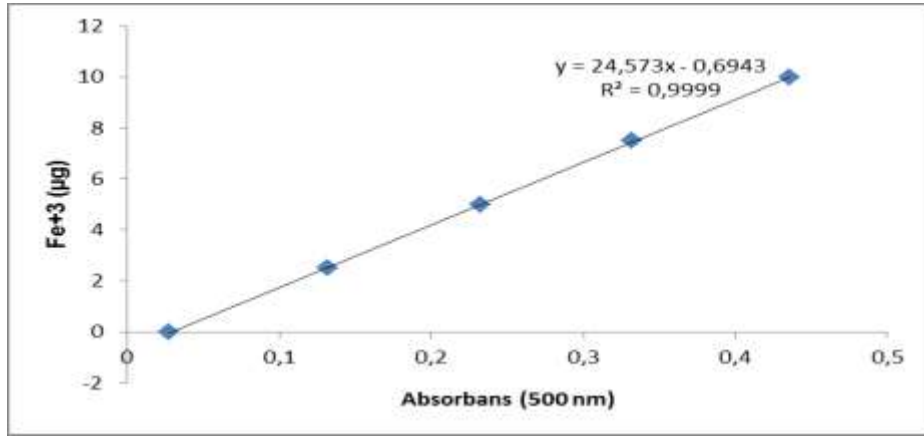
µL Fe <sup>+3</sup>	0	25	50	75	100
µL 0,2 M havası alınmış HCl	100	75	50	25	0
m Fe <sup>+3</sup> (µg)	0	2,5	5	7,5	10

**Çizelge 3.8.2.2.** Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması sonucu elde edilen absorbands değerleri.

m Fe <sup>+3</sup> (µg)	Absorbans değerleri
0	0,027
2,5	0,132
5	0,232
7,5	0,332
10	0,435

Şekil 3.8.2.1'de Fe<sup>+3</sup> standart çalışma solüsyonuna karşı absorbands eğrisi verilmiştir. Aşağıdaki denklemlerle ise Fe<sup>+3</sup> standart çalışma solüsyonuna karşı absorbands eğrisi hesaplanmıştır:

$$y = 24.573x - 0.6943 \quad (R^2 = 0,9999)$$



Şekil 3.8.2.1 Fe<sup>+3</sup> kalibrasyon grafiği.

### 3.8.3 AOCS-Method Cd-18-90 standart metodu

Metot; oksitlenen yağdaki peroksitlerin ileri safhalardaki karbonil ile dekompoze olmuş ikincil türevi olan para-anisidini ölçmek için kullanılmıştır. Örnekler hazırlanırken öncelikle 0,1 g yağ tartılıp, 10 mL hacmindeki kahverengi vialerle konularak iso-octane ile 5 mL'ye tamamlanmış ve spektrofotometrede değeri iso-octane'a karşı 350 nm'de okunmuştur (Ab). Daha sonra ölçümü yapılan karışımın üzerine 1 mL para-anisidin çözeltisi (0,25 g 100 mL<sup>-1</sup> glasiyel asetik asit; Sigma Aldrich, Almanya) eklenip 10 dakika bekletildikten sonra 350 nm'de asetik asit ve iso-octane karışımına karşı absorbansı tekrar okunmuş olup (As) aşağıdaki formül ile karışımların para-anisidin değerleri belirlenmiştir.

$$PA = 5 \times 1,2 (As - Ab) / m$$

PA: P-anisidine değeri

As: P-anisidine çözeltisi ile reaksiyondan sonra yağ solüsyonunun absorbansı

Ab: Yağ solüsyonunun absorbansı, m: Kullanılan yağın kütlesi

1,2: Asetik asitte çözdürülen 1 mL anisidin reaktifi ve örnek çözeltinin seyreltilmesi için gerekli düzeltme faktörü

5: Yağ örneğini çözmek için gerekli iso-octane hacmi

### **3.9 İstatistiksel Analizler**

Hesaplanan değerlerin istatistiki analizlerinde SPSS (SPSS 16 for Windows) paket programı kullanılmıştır. Varyans eşitliği testi (Levene) sonucunda grupların homojen olarak dağıldığı görülmüştür. Verilerin gruplar içi ve gruplar arası farklılıklara iki yönlü ANOVA testi (Duncan testi) uygulanmış olup, SPSS altında %95 güven aralığında General Linear Model (Univariate) analizi yapılarak karşılaştırılmış ve istatistiki olarak değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Süngerler

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Balık Hastalıkları ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülen bu çalışmada 43 adet sünger yılın farklı dönemlerinde scuba dalışları ile Kömür, Çakmaklı ve Sığacık lokasyonlarından toplanmıştır. Süngerler morfolojik özelliklerine göre incelenmiş ve en çok rastlanan türler olarak *Spirastrella cunctatrix*, *Axinella verrucosa*, *Aplysina aerophoba*, *Cacospongia sp.*, *Dysidea avara*, *Sycon raphanus*, *Axinella damircornis*, *Petrosia ficiformis*, *Agelas oroides*, *Chondrilla nucula*, *Haliclona sp.* olarak tanımlanmışlardır (Çizelge 4.1.1).

**Çizelge 4.1.1.** Projede kullanılan sünger örnekleri ve lokasyonları.

Örnek Kodu	Sünger Türü	Alındığı Lokasyon
1.1	<i>Spirastrella cunctatrix</i>	Kömür istasyonu
1.7	<i>Axinella verrucosa</i>	Kömür istasyonu
1.7	<i>Axinella verrucosa</i>	Kömür istasyonu
1.10	<i>Aplysina aerophoba</i>	Kömür istasyonu
1.16	<i>Cacospongia sp.</i>	Kömür istasyonu
1.17	<i>Dysidea avara</i>	Kömür istasyonu
4.1	<i>Axinella verrucosa</i>	Sığacık istasyonu
4.4	<i>Petrosia ficiformis</i>	Sığacık istasyonu
4.15	<i>Spirastrella cunctatrix</i>	Sığacık istasyonu
4.14	<i>Agelas oroides</i>	Sığacık istasyonu
5.1	<i>Chondrilla nucula</i>	Çakmaklı istasyonu
5.4	<i>Axinella verrucosa</i>	Çakmaklı istasyonu
5.6	<i>Axinella cannabina</i>	Çakmaklı istasyonu
5.4	<i>Axinella verrucosa</i>	Çakmaklı istasyonu
5.7	<i>Petrosia ficiformis</i>	Çakmaklı istasyonu
5.7	<i>Petrosia ficiformis</i>	Çakmaklı istasyonu

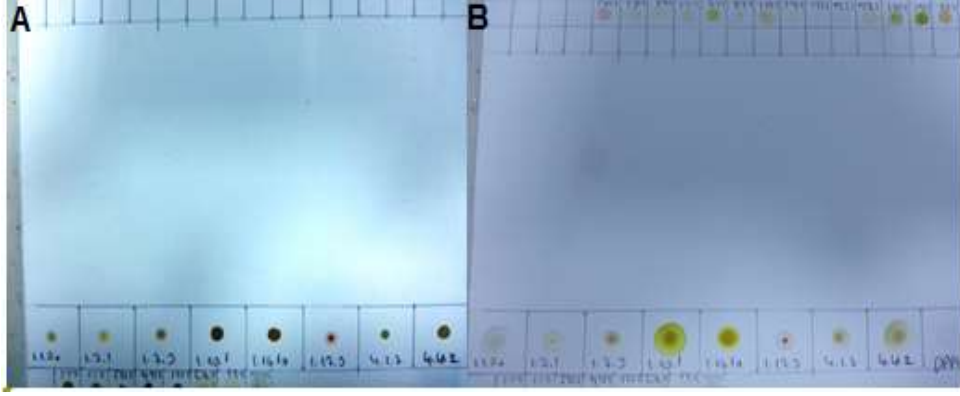
## 4.2 İnce Tabaka Kromatografi Sonuçları

Süngerlerden fungal suçların izolasyonundan sonra yapılan çalışmalarda, ilk olarak izolatların olası antioksidan aktiviteleri bölüm 3.5.1’de anlatıldığı gibi kalitatif olarak taranmıştır. Denemeler sonucunda sırasıyla *P. atrovenetum* (1.1.2a), *Axinella verrucosa* süngerinden izole edilen 1.7.1 izolatu, *Axinella verrucosa* süngerinden izole edilen 1.7.3 izolatu, *Aplysina aerophoba* süngerinden izole edilen 1.10.1 izolatu, *P. restrictum* (1.16.1a), *Dysidea avara* süngerinden izole edilen 1.17.3 izolatu, *Cladosporium sp.* (4.1.7), *P. commune* (4.4.2) izolatları DPPH reaktifini mor renkten sarıya dönüştürme etkinliklerine göre seçilmiştir (Şekil 4.2.1 ve Şekil 4.2.2). Seçilen izolatların sekonder metabolit ürün profilleri ise İnce Tabaka Kromatografi yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 4.2.3). Sonuç olarak seçilen suçların zengin ürün profillerine sahip olduğu ve ilerleyen çalışmalarda yapılması planlanan çalışmalar için de önemli bir materyal oluşturduğu belirlenmiştir.



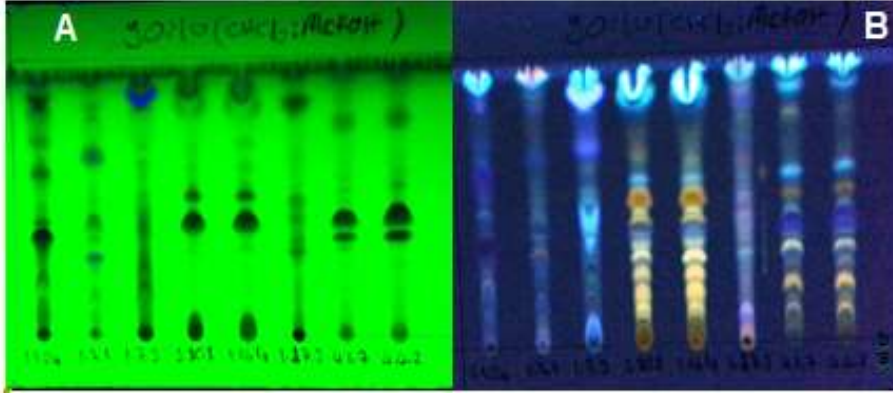
Şekil 4.2.1. Seçilen izolatların kantitatif antioksidan aktivitelerinin taranması.

A) DPPH eklenmeden önce B) DPPH eklendikten sonra



**Şekil 1.2.2.** Antioksidan aktivite taraması sonunda seçilen suşların antioksidan aktiviteleri.

A) DPPH eklemeyen önce B) DPPH ekledikten sonra



**Şekil 4.2.3.** Seçilen izolatlardan elde edilen ham özütlerin İTK profilleri.

A) 254 nm'de B) 365 nm (Mobil faz: 90:10- Kloroform: Metanol)



### 4.3 İzole Edilen Fungal Suşlar ve Çalışılan Türler

**Çizelge 1.3.1.** Potansiyel olarak antioksidan aktivite gösteren fungal suşlar ve izole edildikleri süngerler.

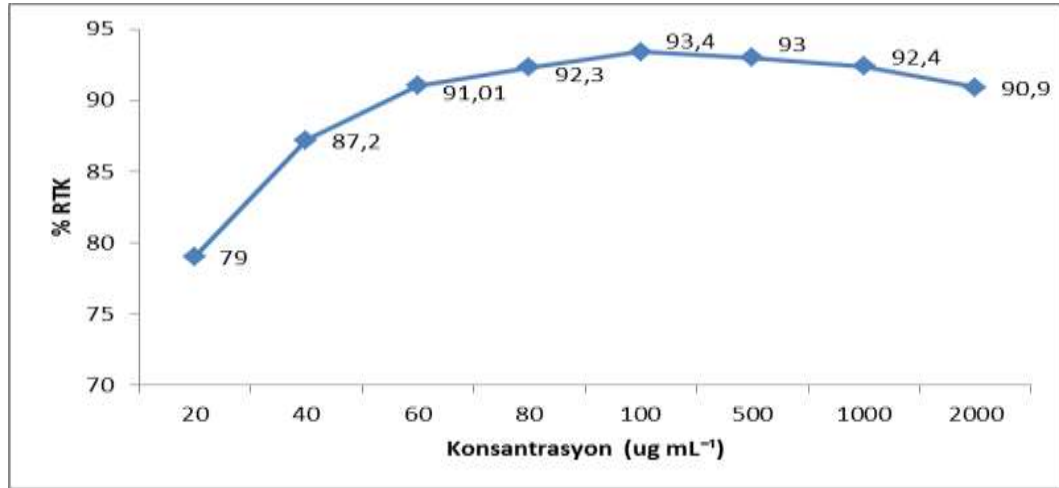
Örnek Kodu	Sünger Türü	İzole Edilen Fungus
1.1	<i>Spirastrella cunctatrix</i>	<i>P. atrovenetum</i> (1.1.2a)
1.7	<i>Axinella verrucosa</i>	1.7.1
1.7	<i>Axinella verrucosa</i>	1.7.3
1.10	<i>Aplysina aerophoba</i>	1.10.1
1.16	<i>Cacospongia sp</i>	<i>P. restrictum</i> (1.16.1a)
1.17	<i>Dysidea avara</i>	1.17.3
4.1	<i>Axinella verrucosa</i>	<i>Cladosporium sp.</i> (4.1.7)
4.4	<i>Petrosia ficiformis</i>	<i>P. commune</i> (4.4.2)
5.1	<i>Chondrilla nucula</i>	5.1.2.c
5.4	<i>Axinella verrucosa</i>	5.4.5.c
5.6	<i>Axinella cannabina</i>	5.6.1.b
5.4	<i>Axinella verrucosa</i>	5.4.5.b
5.7	<i>Petrosia ficiformis</i>	5.7.6.a
5.7	<i>Petrosia ficiformis</i>	5.7.6.c
4.15	<i>Spirastrella cunctatrix</i>	<i>A. iizukae</i> (4.15.3a)
4.15	<i>Spirastrella cunctatrix</i>	<i>P. canescens</i> (4.15.6a)

### 4.4 DPPH Radikal Temizleme Kapasitesi

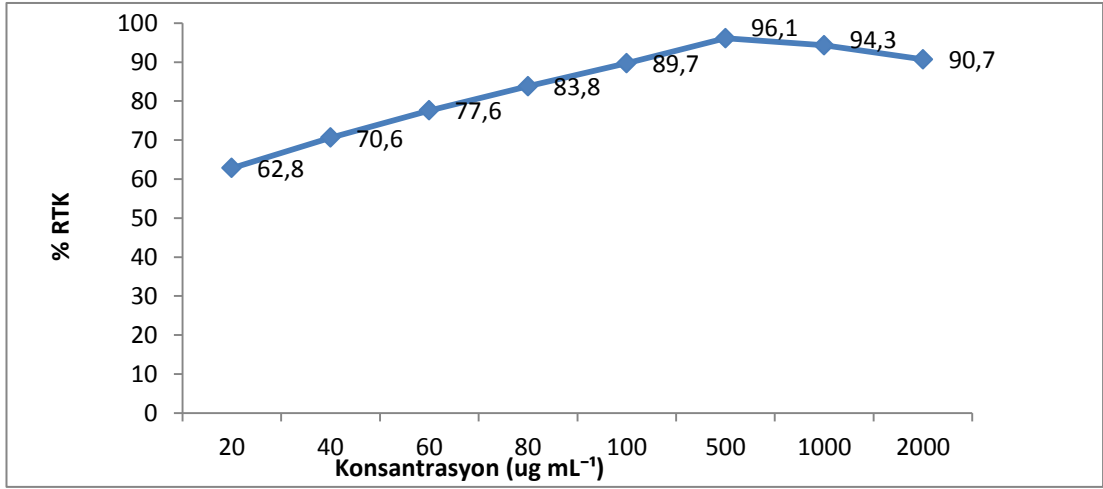
BHT ile karşılaştırılan farklı fungus ekstralarının antioksidan kapasite sonuçları DPPH analizi kullanılarak verilmiştir. 20-80 ug mL<sup>-1</sup> arasında değişen başlangıç konsantrasyonlarında 1.10.1 (%94) , *P. restrictum* (1.16.1a; %94,6), *P. commune* (4.4.2; %94,7) ve *Cladosporium sp.* (4.1.7; %92,8) özütlerinde BHT (%79) ile karşılaştırıldığında daha yüksek antioksidan potansiyel görülmektedir (p<0,05). Daha yüksek konsantrasyonlara çıkıldıkça antioksidan aktivite potansiyeli BHT'ye yakın olan fungal suşların sayısı da artış göstermiştir. Çizelge 4.4.1'de BHT ile karşılaştırmalı olarak farklı fungus ekstralarının antioksidan kapasite sonuçları verilmiştir. BHT ile karşılaştırıldığında, DPPH radikal temizleme kapasitesi %60 ve altında bulunan düşük konsantrasyonlardaki fungal izolatlar ise değerlendirilmemiştir.

**Çizelge 4.4.1.** İTK görüntülerine göre seçilen fungal suşların DPPH radikal temizleme aktivitesi.

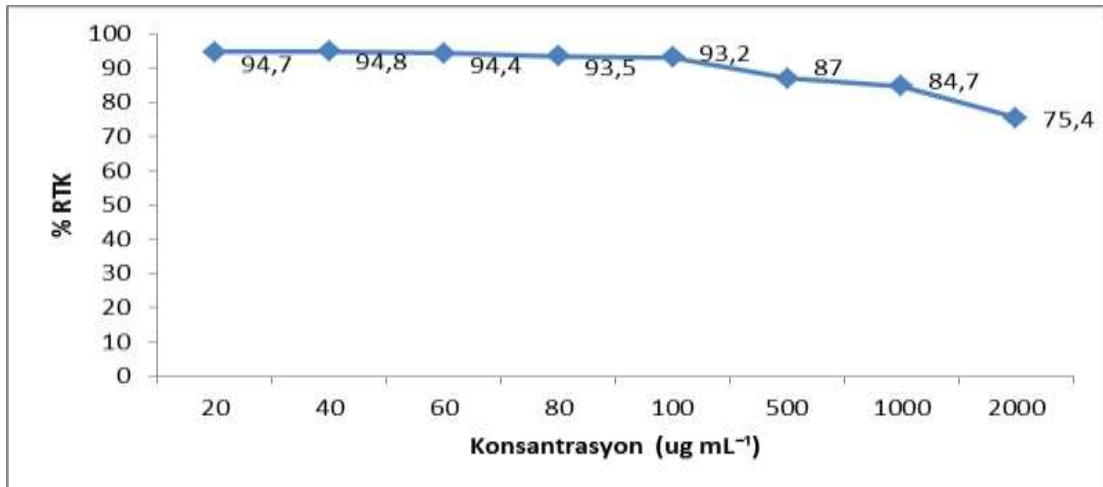
%Radikal Temizleme Kapasitesi (%RTK)								
Fungus izolatu	Konsantrasyonlar ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )							
	20	40	60	80	100	500	1000	2000
<i>P. atrovenetum</i> (1.1.2a)	62,8	70,6	77,6	83,8	89,7	96,1	94,3	90,7
1.7.1.	60,8	62,8	66,3	67,4	73,2	89,9	95,1	95,2
1.7.3.	69,4	83,5	91,2	94,8	96,6	94,5	91,1	84,1
1.10.1.	94	95	95,9	96	95	93,8	91,6	85
<i>P. restrictum</i> (1.16.1a)	94,6	95,8	96,5	96,4	96,5	95,5	93,6	90,4
<i>Cladosporium sp.</i> (4.1.7)	92,8	95,6	96,4	96,6	96,8	91,2	88,1	83,6
<i>P. commune</i> (4.4.2)	94,7	94,8	94,4	93,5	93,2	87	84,7	75,4
BHT	79	87,2	91,01	92,3	93,4	93	92,4	90,9
1.17.3.	53,5	BHT ve diğer suşlara göre daha düşük antioksidan potansiyeli göstermişlerdir						
4.15.3a	52,2							
4.14.6a	49,2							
5.1.2.c	52,2							
5.4.5.c	50,8							
5.6.1.b	56,4							
5.4.5b	51,2							
5.7.6a	55,9							
5.7.6c	50,4							



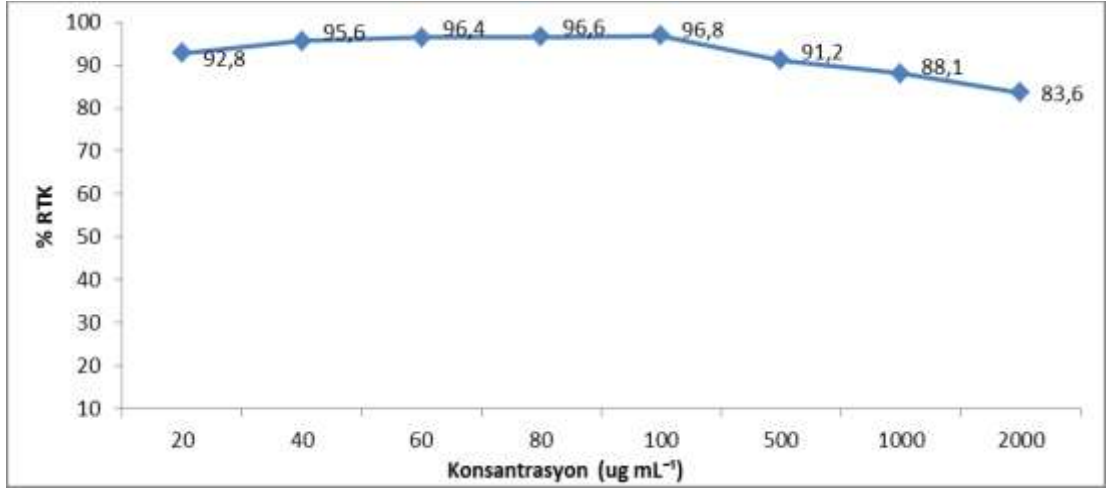
**Şekil 4.4.1.** Sentetik antioksidan BHT'nin farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikal süpürme aktivitesi.



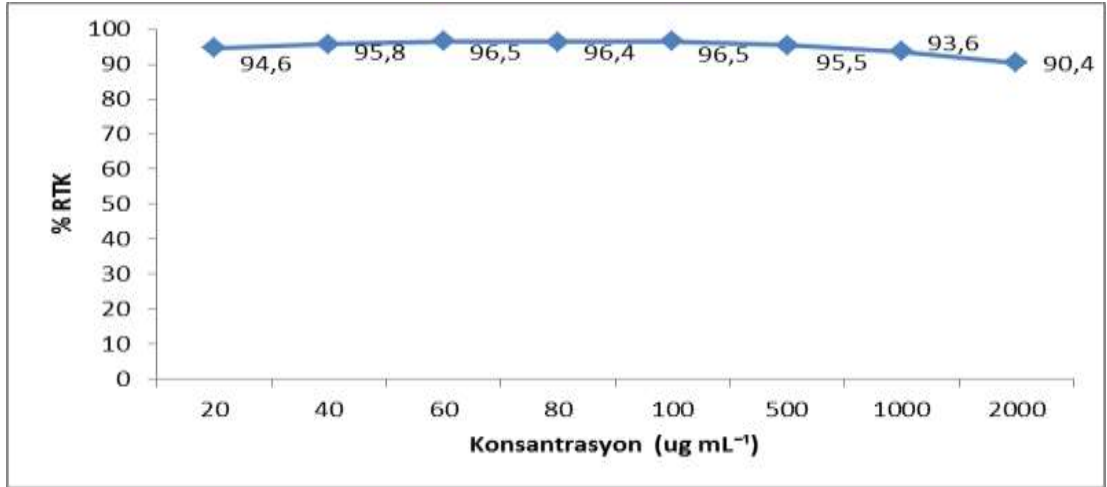
**Şekil 4.4.2.** Farklı konsantrasyonlardaki *P. atrovenetum* (1.1.2a) fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi.



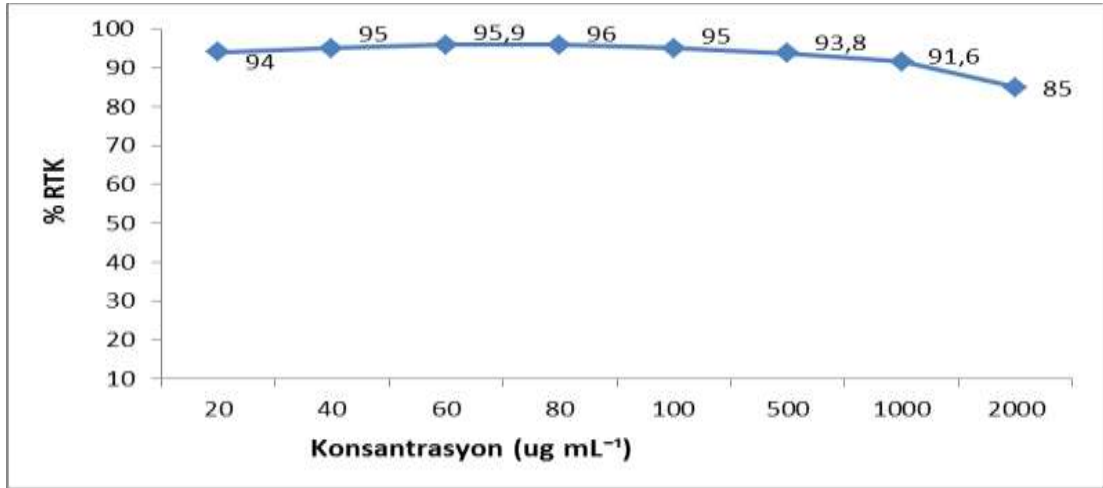
**Şekil 4.4.3.** Farklı konsantrasyonlardaki *P. commune* (4.4.2) fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi.



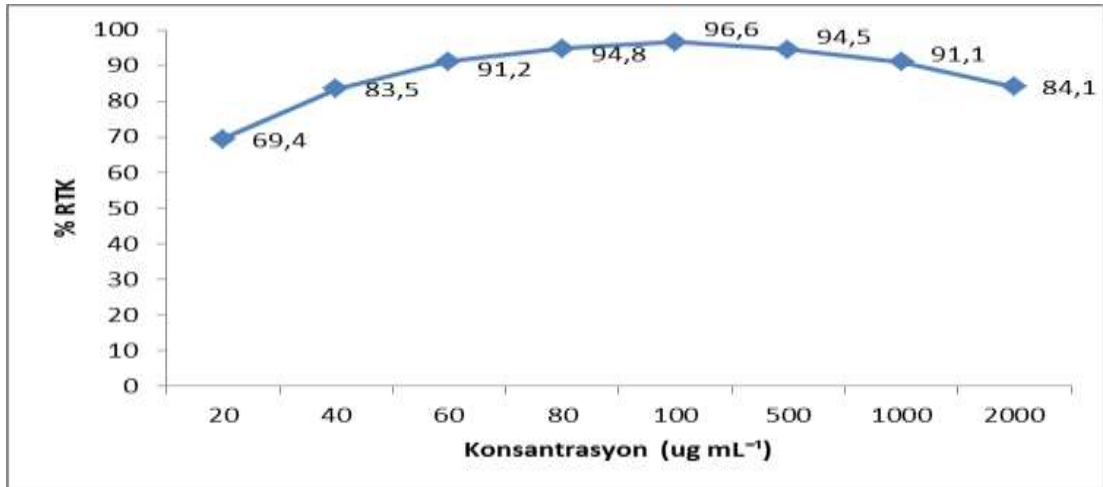
Şekil 4.4.4. Farklı konsantrasyonlardaki *Cladosporium sp.* (4.1.7) fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi.



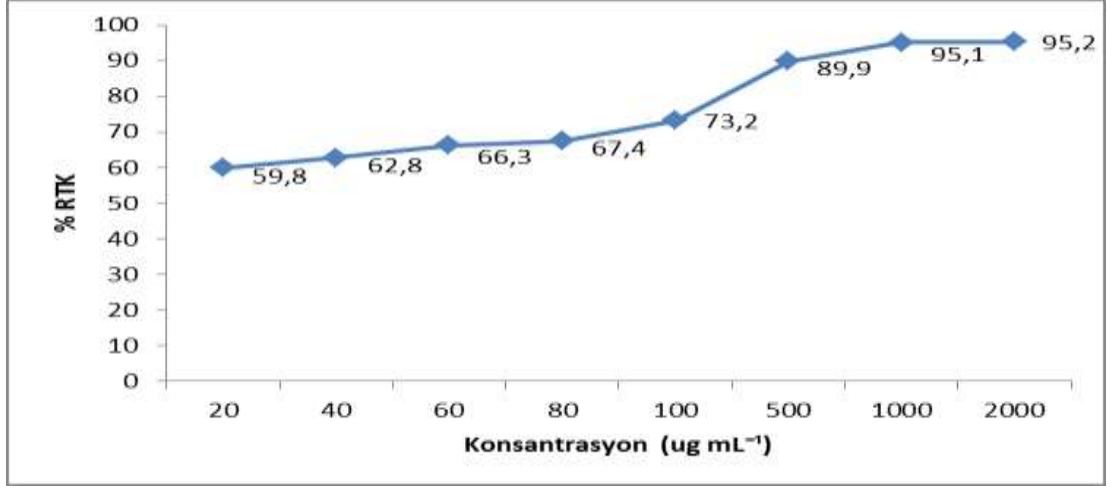
Şekil 4.4.5. Farklı konsantrasyonlardaki *P. restrictum* (1.16.1a) fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi.



**Şekil 4.4.6.** Farklı konsantrasyonlardaki 1.10.1 fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi.



**Şekil 4.4.7.** Farklı konsantrasyonlardaki 1.7.3 fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi.



**Şekil 4.4.8.** Farklı konsantrasyonlardaki 1.7.1 fungal suşunun DPPH radikal süpürme aktivitesi.

#### 4.5 Peroksit Değerleri (PV)

DPPH sonuçlarına göre seçilen dört adet fungal ekstrakt, BHT ve balık yağının (kontrol) 60°C’de 7 (Birinci Deneme) ve 19 (İkinci Deneme) günlük, 25°C’de ise 50 günlük deneme sürelerince gelişen birincil oksidasyon ürünleri Çizelge 4.5.1.1, Çizelge 4.5.2.1 ve Çizelge 4.5.3.1’de gösterilmiştir.

##### 4.5.1 Birinci deneme 60°C’de 7 günlük depolama

Çizelge 4.5.1.1’de birinci denemede yüksek sıcaklık etkisi altında farklı konsantrasyonlarda fungus ekstreleri ilave edilmiş balık yağlarının 7 günlük depolama süresince peroksit değerlerinde olan değişim verilmiştir.

**Çizelge 4.5.1.1.** Yüksek sıcaklıktaki (60°C) balık yağlarının 7 günlük depolama süresince peroksit değerlerinde olan değişim (mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>).

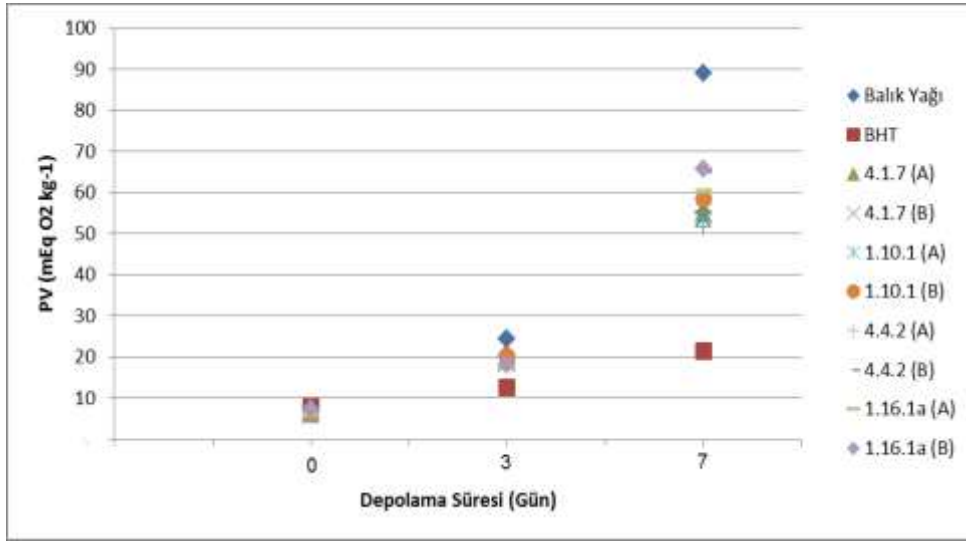
	GÜNLER		
	0	3	7*
Kontrol (Balık Yağı)	7,68	24,55	88,97(a)
BHT (%0,05 w/w)	8,13	12,62	21,43(b)
<i>Cladosporium sp.</i> (4.1.7) Düşük Konsantrasyon (%0,05 w/w)	6,52	22,45	56,74(c)
<i>Cladosporium sp.</i> (4.1.7) Yüksek Konsantrasyon (%0,1 w/w)	7,86	19,14	54,75(c)
1.10.1 Düşük Konsantrasyon (%0,05 w/w)	5,94	20,13	58,33(cd)
1.10.1 Yüksek Konsantrasyon (%0,1w/w)	5,69	18,31	53,49(c)
<i>P. commune</i> (4.4.2) Düşük Konsantrasyon (%0,05 w/w)	6,03	18,99	65,33(d)
<i>P. commune</i> (4.4.2) Yüksek Konsantrasyon (%0,1w/w)	5,89	17,92	51,69(ec)
<i>P. restrictum</i> (1.16.1a) Düşük Konsantrasyon (%0,05 w/w)	7,19	18,27	6573(d)
<i>P. restrictum</i> (1.16.1a) Yüksek Konsantrasyon (%0,1w/w)	5,97	17,48	60,47(d)

\*Farklı harfler satırlar arasındaki farkların istatistiki olarak önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05)

60°C sıcaklıkta yapılan 1. denemede bütün gruplarda peroksit değerlerinin artışı BHT de dahil olmak üzere önemli bulunmuştur (p<0,05). Birinci denemede 60°C'de 7 gün tutulan örneklerde peroksit değeri yüksek bir artışla kontrol balık yağında 88,9 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>'a ulaşırken, ekstreli örneklerde maksimum 65,7 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> peroksit değerlerine ulaşmaktadır. BHT eklenen yağ örneğinin ise 21,4 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> peroksit değeri ile oksidasyon oluşumunu kontrol ve ekstreli yağlara göre oldukça yavaşlattığı tespit edilmiştir (p<0,05).

Bu denemede; balık yağı ile karşılaştırıldığında deneme sonuna kadar tüm ekstrelerin peroksit değerlerini azaltan bir antioksidan özellik gösterdiği belirlenmiştir (p<0,05). 7 günün sonunda ekstre eklenen balık yağları peroksit oluşumunu kısmen sınırlasa da BHT'ye göre hepsi daha düşük etki göstermiştir (p<0,05). Bu denemede, diğer fungal ekstrele göre yüksek sıcaklıktaki balık yağında en iyi antioksidan özelliği gösteren %0.1'lik konsantrasyondaki *P. commune* (4.4.2) fungal suşudur. Bu suş ile *Cladosporium sp.* (4.1.7) ve 1.10.1 fungal suşları arasında oluşan fark istatistiki olarak önemsiz bulunurken (p>0,05), *P. restrictum* (1.16.1a) izolatıyla oluşan fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur (p<0,05).

Şekil 4.5.1.1'de yüksek sıcaklık etkisi altında farklı konsantrasyonlarda fungus ekstreleri ilave edilmiş balık yağlarının 7 günlük depolama süresince peroksit değerlerinde olan değişimin grafiği verilmiştir.



**Şekil 2.** (A): %0,05 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstrakter, B): %0,1 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstrakter.

#### 4.5.2. İkinci deneme 60°C’de 19 günlük depolama

Çizelge 4.5.2.1’de ikinci denemede yüksek sıcaklık etkisi altında (60°C) %0,2 konsantrasyonda fungus ekstrakteri ilave edilmiş balık yağlarının 19 günlük depolama süresince peroksit değerlerinde olan değişim verilmiştir.

**Çizelge 4.5.2.1.** Balık yağlarının yüksek sıcaklık etkisi altında (60°C) ve 19 günlük depolama süresince oksidasyon düzeylerinde olan değişim (mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>).

Örnek Kodu	GÜNLER				
	0	5	12	17	19*
Kontrol (Balık Yağı)	10,02	24,45	43,42	61,08	74,60(a)
BHT (%0,05 w/w)	9,08	9,92	11,90	11,44	15,61(b)
<i>Cladosporium sp.</i> (4.1.7)*	10,60	17,48	27,92	32,87	38,23(c)
1.10.1*	9,75	13,83	25,16	22,02	28,86(d)
<i>P. commune</i> (4.4.2)*	9,28	19,58	26,93	26,78	30,83(ed)
<i>P. restrictum</i> (1.16.1a)*	9,27	14,63	19,73	21,60	24,34(fd)

\*Yağdaki fungal özüt konsantrasyonu = %0,2 (w/w),

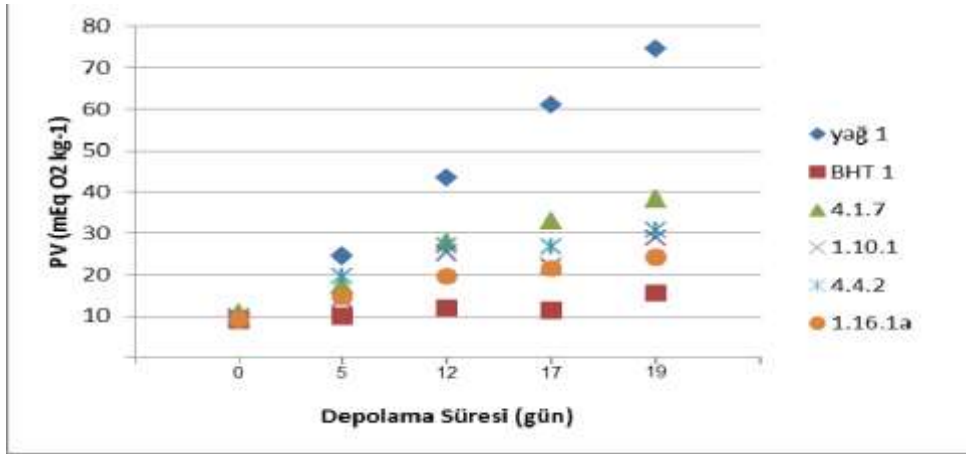
\*\*Farklı harfler satırlar arasındaki farkların istatistiki olarak önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05)

Yüksek sıcaklıkta yapılan 2. denemede 19 günün sonunda BHT de dahil olmak üzere bütün gruplarda peroksit değerleri önemli derecede artış göstermiştir (p<0,05). Bu deneme sonunda kontrol balık yağında peroksit değeri 74,6 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> ulaşmıştır.



38,2 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> sayısı ile en fazla peroksit değeri fungal ekstre ilave edilen yağ örneklerinden *Cladosporium sp.* (4.1.7) izolatında tespit edilmiştir (p<0,05). BHT eklenen yağ örneğinde ise ortalama peroksit değeri 15,6 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> olarak tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklıktaki bu denemede, diğer fungal ekstrele göre balık yağında en iyi antioksidan özelliği %0,2'lik konsantrasyondaki *P. restrictum* (1.16.1a) fungal suşu gösterirken (p<0,05), 1.10.1 fungal izolatı ile arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (p>0,05).

Şekil 4.5.2.1'de ikinci denemede yüksek sıcaklık (60°C) etkisi altında %0,2 oranında fungus ekstreleri ilave edilmiş olan balık yağlarının 19 günlük depolama süresince peroksit değerlerinde olan değişim görülmektedir.



Şekil 3. 60°C'de depolama sırasında peroksit değerlerindeki değişim grafiği.

(Balık yağı + %0,2 w/w Fungal ekstre)

Genel olarak ikinci deneme boyunca da tüm ekstreler balık yağı ile karşılaştırıldıklarında ortalama %60 oranında peroksit oluşumunu azaltıcı bir antioksidan özellik göstermiştir (p<0,05). 19 günün sonunda BHT kadar önleyici olmamakla beraber ekstrelerin balık yağında birincil oksidasyon ürünlerinden olan peroksit oluşumunu kısmen engelledikleri gözlenmiştir (p<0,05).

#### 4.5.3 25°C'de 50 günlük depolama denemesi

Farklı konsantrasyonlarda fungus ekstreleri ilave edilen balık yağlarının 25°C'deki depolanma süresi boyunca peroksit değerlerinde meydana gelen değişim Çizelge 4.5.3.1 ve Şekil 4.5.3.1'de gösterilmiştir. 25°C sıcaklıktaki depolama süresince kontrol balık yağındaki peroksit değerinin artışı önemli bulunmuştur (p<0,05). 50

gün boyunca tutulan örneklerde peroksit sayısı yüksek (60°C) sıcaklığa göre daha yavaş seyreden bir artış göstererek kontrol balık yağında 36,3 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>'a ulaşmıştır. Fungus ekstresi eklenen örneklerde bu değer maksimum 28,6 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> ulaşırken, BHT eklenen örnekte ise 13,9 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> peroksit değerine ulaşmıştır.

**Çizelge 4.5.3.1.** Farklı konsantrasyonlarda ekstre eklenen balık yağlarının 25°C'de depolanması süresince gözlenen peroksit değerleri (mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>).

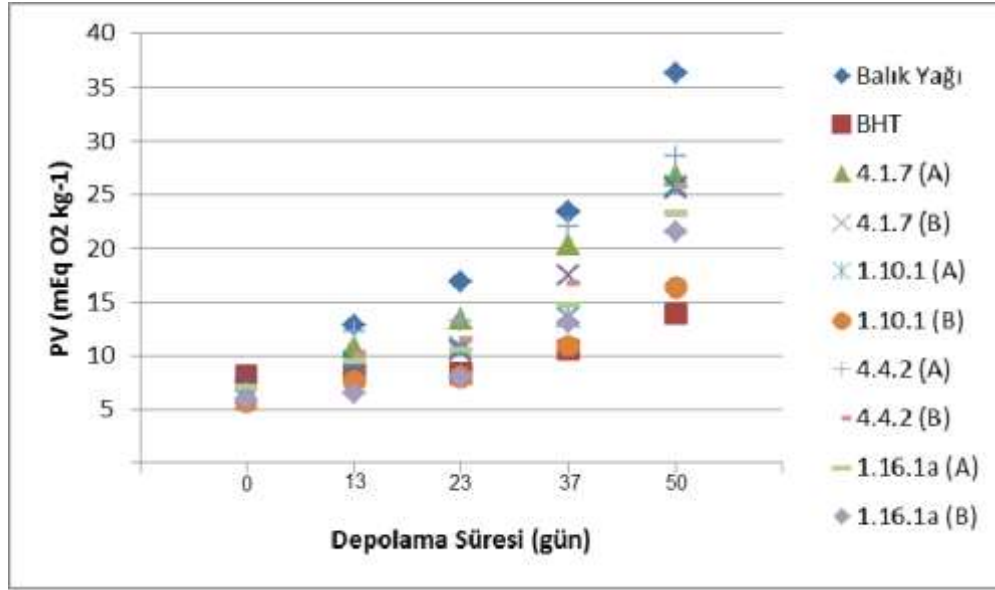
	GÜNLER				
	0	13	23	37	50**
Kontrol (Balık Yağı)	7,69	12,83	16,89	23,43	36,33(a)
BHT (%0,05 w/w)	8,13	8,53	8,34	10,56	13,90(b)
<i>Cladosporium sp.</i> (4.1.7)*					
%0,05, w/w	6,52	10,81	13,42	20,30	26,76(c)
%0,1, w/w	7,86	9,27	10,47	17,44	25,55(c)
İzolat 1.10.1*					
%0,05, w/w	5,94	9,51	10,84	13,54	25,76(c)
%0,1, w/w	5,69	7,58	8,04	10,93	16,34(b)
<i>P. commune</i> (4.4.2)*					
%0,05, w/w	6,03	12,23	13,25	22,03	28,61(dc)
%0,1, w/w	5,89	10,08	11,53	16,68	25,85(c)
<i>P. restrictum</i> (1.16.1a)*					
%0,05, w/w	7,19	9,42	10,60	14,74	23,31(ec)
%0,1, w/w	5,97	6,60	7,98	13,14	21,61(e)

\*Yağdaki düşük özüt konsantrasyonu=%0,05 (w/w), yüksek özüt konsantrasyonu=%0,1 (w/w)

\*\*Farklı harfler satırlar arasındaki farkların istatistiki olarak önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05)

25°C'lik depolama sıcaklığındaki 50 günün sonunda tüm ekstreler kontrol balık yağına göre peroksit oluşumunu yavaşlatıcı antioksidan etki göstermişlerdir (p<0,05). *P. restrictum* (1.16.1a), *Cladosporium sp.* (4.1.7) ve *P. commune* (4.4.2) fungal suşlarına ait ekstreler balık yağında birincil oksidasyon ürünlerinin oluşumunda BHT'ye göre daha az etkili bulunurken (p<0,05), %0,1 konsantrasyonda kullanılan 1.10.1 fungal suşuna ait ekstrelerin BHT ile benzer (p>0,05) etki gösterdiği belirlenmiştir. Genel olarak; düşük konsantrasyonlardaki ekstre kullanımında daha

yüksek peroksit oluşumu gözlenmiş olmakla beraber konsantrasyonlar arasında oluşan farklar istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.5.3.1.** (A): %0,05 w/w konsantrasyonda, (B): %0,1 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstraler.

#### 4.6 P-Anisidin Değerleri (PaV)

DPPH sonuçlarına göre seçilen dört adet fungal ekstrakt, BHT ve balık yağının (kontrol) 60°C’de 7 (Birinci Deneme) ve 19 (İkinci Deneme) günlük, 25°C’de ise 50 günlük deneme süresince gelişme gösteren ikincil oksidasyon ürünleri Çizelge 4.6.1.1, Çizelge 4.6.2.1 ve Çizelge 4.6.3.1’de gösterilmiştir. 60°C sıcaklıkta yapılan 1. ve 2. denemelerdeki bütün gruplarda BHT de dahil olmak üzere anisidin değerleri önemli bir artış göstermiştir.

##### 4.6.1. Birinci Deneme 60°C’de 7 günlük depolama

Çizelge 4.6.1.1’de ilk denemedeki yüksek sıcaklık (60°C) etkisi altında farklı konsantrasyonlarda fungus ekstraleri ilave edilmiş balık yağlarının 7 günlük depolama süresince anisidin değerlerinde olan değişimler verilmiştir. Buna göre 60°C’de 7 gün tutulan örneklerde anisidin sayısı keskin bir artışla kontrol balık yağında 42,2 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>’a ulaşırken, ekstre eklenen örneklerde maksimum 9,4 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> ve BHT için 3,8 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> anisidin değerlerine ulaşmıştır. Düşük konsantrasyonda kullanılan ekstraler için ise 22,2 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> ile 33,9 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> arasında değişen daha yüksek anisidin değerleri çıkmıştır. Birinci denemede, deneme

sonuna kadar tüm ekstreler kontrol balık yağına göre anisidin oluşumunu azaltıcı bir antioksidan özellik göstermiştir ( $p<0,05$ ). BHT'ye en yakın antioksidan etkiyi *P. restrictum* (1.16.1a; %0,1 w/w) fungal ekstresinin eklendiği yağ örnekleri göstermiş ancak aralarında fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Yüksek konsantrasyonlarda BHT'ye en yakın anisidin değerlerini sırasıyla *Cladosporium sp.* (4.1.7) ve *P. commune* (4.4.2) fungal ekstreleri göstermişlerdir.

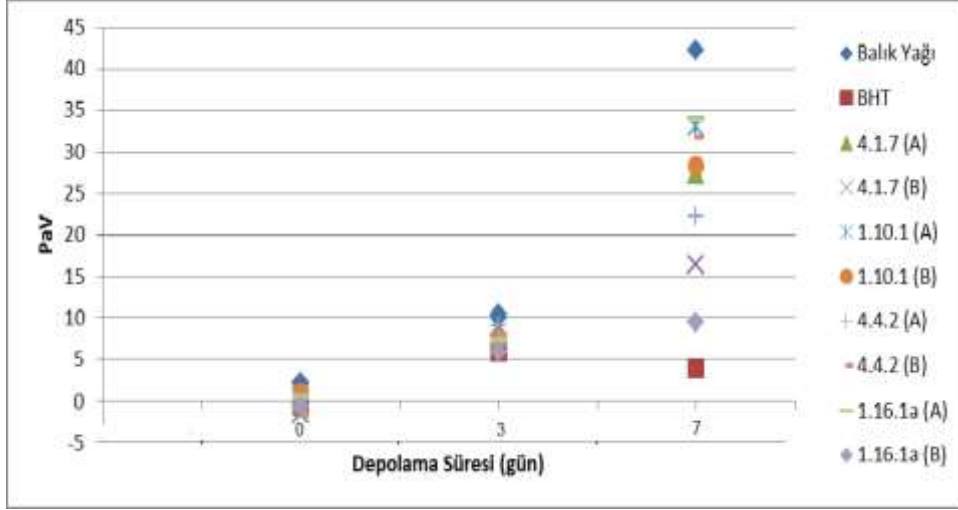
Şekil 4.6.1.1'de ise; ilk denemedeki yüksek sıcaklık etkisi altında farklı konsantrasyonlarda fungus ekstreleri ilave edilmiş balık yağlarının 7 günlük depolama süresince anisidin değerlerinde olan değişimler gösterilmiştir.

**Çizelge 4.6.1.1.** Balık yağlarının yüksek sıcaklık etkisi altında ve 7 günlük depolama süresince anisidin değerlerinde olan değişimler ( $\text{mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$ ).

Örnek Kodu	GÜNLER		
	0	3	7**
Kontrol (Balık Yağı)	0,08	10,40	42,23(a)
BHT (%0,05 w/w)	-0,54	5,89	3,79(b)
<i>Cladosporium sp.</i> (4.1.7)*			
%0,05, w/w	-0,27	7,61	27,39(c)
%0,1, w/w	-1,63	8,94	16,46(d)
İzolat 1.10.1*			
%0,05, w/w	0,54	8,80	33,10(e)
%0,1, w/w	1,02	7,61	28,45(c)
<i>P. commune</i> (4.4.2)*			
%0,05, w/w	-0,03	8,94	31,84(ce)
%0,1, w/w	-1,76	7,95	22,21(f)
<i>P. restrictum</i> (1.16.1a)*			
%0,05, w/w	0,57	7,21	33,92(e)
%0,1, w/w	-0,79	5,82	9,37(g)

\*Yağdaki düşük özüt konsantrasyonu=%0,05 (w/w), yüksek özüt konsantrasyonu=%0,1 (w/w)

\*\*Farklı harfler satırlar arasındaki farkların istatistiki olarak önemli olduğunu göstermektedir ( $p<0,05$ )



**Şekil 4.6.1.1.** (A) %0,05 w/w konsantrasyonda (B) %0,1 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstreler.

#### 4.6.2 İkinci deneme 60°C’de 19 günlük depolama

Çizelge 4.6.2.1’de ikinci denemedeki yüksek sıcaklık etkisi altında %0,2 oranında fungal ekstre ilave edilmiş balık yağlarının 19 depolama süresince anisidin değerlerinde olan değişim verilmiştir. Bu denemede, anisidin değerleri kontrol balık yağında 19. günde 52,6 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> ulaşırken, BHT için 9,04 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> ve ekstreler için maksimum 26,63 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> değerine ulaşmıştır.

**Çizelge 4.6.2.1.** Fungus ekstreleri (%0,2) ilave edilmiş balık yağlarının yüksek sıcaklık etkisi altında ve 19 günlük depolama süresince anisidin değerlerinde olan değişim (mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>).

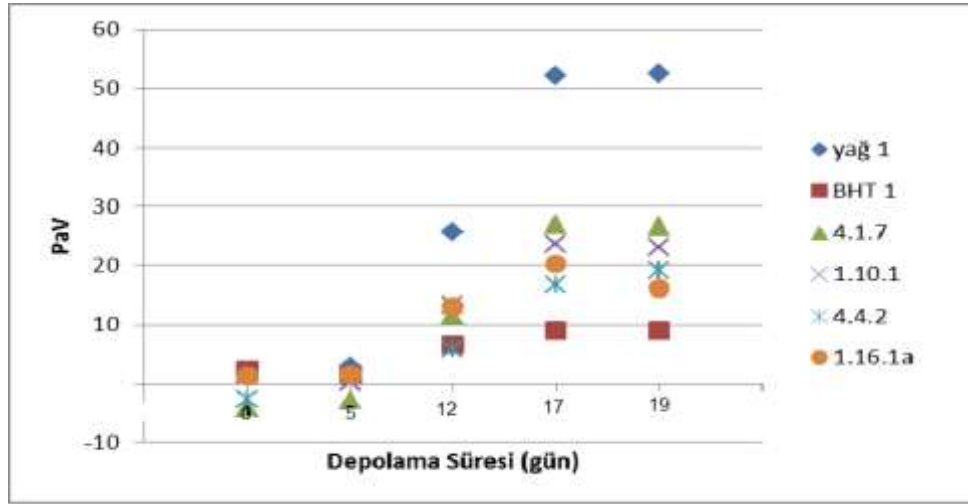
Örnek Kodu	GÜNLER				
	0	5	12	17	19**
Kontrol (Balık Yağı)	1,70	2,71	25,69	52,19	52,57(a)
BHT (%0,05 w/w)	2,18	1,475	6,57	8,94	9,05(b)
<i>Cladosporium sp.</i> (4.1.7)*	-4,23	-2,85	11,69	27,01	26,63(c)
İzolat 1.10.1*	1,38	0,29	13,38	23,55	23,16(dc)
<i>P. commune</i> (4.4.2)*	-2,60	1,50	5,86	16,62	19,22(dc)
<i>P. restrictum</i> (1.16.1a)*	1,34	1,37	13,05	20,23	16,15(bd)

\*Yağdaki fungal özüt konsantrasyonu = %0,2 (w/w),

\*\*Farklı harfler satırlar arasındaki farkların istatistiki olarak önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05)

19 günlük deneme sonunda tüm ekstralar kontrol balık yağında oluşan anisidin değerinden daha az bir artış göstermiştir ( $p<0,05$ ). BHT'ye en yakın anisidin oluşumunu önleme etkisini *P. restrictum* (1.16.1a) fungal suşu göstermiş ve aralarındaki farkta istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ). *P. commune* (4.4.2) fungal suşu ise bu fungusu en yakın etki gösteren suş olmuştur.

Şekil 4.6.2.1'de ikinci denemedeki yüksek sıcaklık etkisi altında %0,2 oranında fungus ekstraları ilave edilmiş olan balık yağlarının 19 günlük depolama süresince anisidin değerlerinde olan değişimler gösterilmiştir. Denemenin 17. gününe kadar değişim gösteren değerlerin 17. günden 19. güne kadar çok değişim göstermediği ve hatta *P. restrictum* (1.16.1a) fungal suşunda düşüş gerçekleştiği görülmüştür.



Şekil 4.6.2.1. 60°C'de 19 günlük depolama süresince ikincil oksidasyon ürünlerinin değişim grafiği (Balık yağı + %0,2 w/w fungal ekstralar).

#### 4.6.3 25°C'de 50 günlük depolama denemesi

Çizelge 4.6.3.1'de 25°C sıcaklıktaki farklı konsantrasyonlarda fungus ekstraları ilave edilmiş balık yağlarının 50 günlük depolanması süresince anisidin seviyelerinde olan değişim verilmiştir.

**Çizelge 4.6.3.1.** Balık yağlarının 25°C’de 50 günlük depolanması süresince anisidin seviyelerinde olan değişim (mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>).

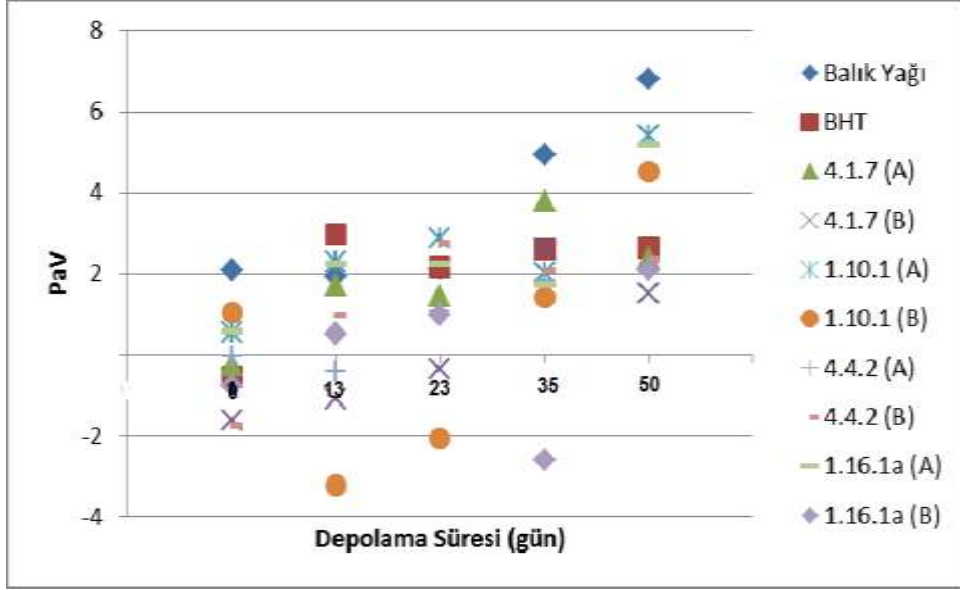
Örnek Kodu	GÜNLER				
	0	13	23	37	50**
Kontrol (Balık Yağı)	2,08	1,93	2,13	4,92	6,79(a)
BHT (%0,05 w/w)	-0,54	2,96	2,14	2,60	2,65(b)
<i>Cladosporium sp.</i> (4.1.7)*					
%0,05, w/w	-0,27	1,71	1,45	3,79	2,37(b)
%0,1, w/w	-1,63	-1,12	-0,37	2,61	1,51(b)
İzolat 1.10.1*					
%0,05, w/w	0,54	2,29	2,87	2,04	5,42(c)
%0,1, w/w	1,024	-3,24	-2,06	1,43	4,51(c)
<i>P. commune</i> (4.4.2)*					
%0,05, w/w	-0,03	-0,41	1,07	1,82	2,05(b)
%0,1, w/w	-1,76	0,96	2,72	2,10	2,36(c)
<i>P. restrictum</i> (1.16.1a)*					
%0,05, w/w	0,57	2,25	2,26	1,73	5,19(c)
%0,1, w/w	-0,79	0,51	0,96	-2,63	2,09(b)

\*Yağdaki düşük özüt konsantrasyonu=%0,05 (w/w), yüksek özüt konsantrasyonu=%0,1 (w/w)

\*\*Farklı harfler satırlar arasındaki farkların istatistiki olarak önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05)

25°C sıcaklıktaki 50 günlük depolama süresince anisidin değeri artışı kontrol balık yağında önemli bulunmuştur (p<0,05). 25°C’de 50 gün boyunca tutulan örneklerde anisidin sayısı yavaş seyreden bir artışla kontrol balık yağında 6,8 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>’a ulaşırken, BHT için 2,65 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> ve ekstreli örneklerde maksimum 2,04 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> anisidine değerine ulaşmıştır. 50 günün sonunda tüm ekstrelerde kontrol balık yağında oluşan anisidin seviyesinden daha az bir artış görülmektedir (p<0,05). BHT ile istatistiki olarak benzer anisidin sonuçlarını *Cladosporium sp.* (4.1.7) ve *P. commune* (4.4.2) fungal suşları verirken (p>0,05), 1.10.1 ve *P. atrovnetum* (1.1.2a) fungal suşları BHT’den daha kötü anisidin sonuçları vermişlerdir (p<0,05).

Şekil 4.6.3.1’de 25°C’de farklı konsantrasyonlarda fungus ekstreleri ilave edilmiş balık yağlarının 50 günlük depolama süresince anisidin seviyelerinde olan değişimin grafiği verilmiştir.



**Şekil 4.6.3.1.** 25°C’de 50 günlük depolama süresince p-anisidin değişimleri (A) %0,05 w/w konsantrasyonda, (B) %0,1 w/w konsantrasyonda eklenen fungal ekstreler.



## 5. TARTIŞMA

Denizler henüz keşfedilmemiş birçok canlıya ev sahipliği yapmaktadır. Bu canlıların ve metabolitlerinin tespiti ile insanoğlunun bazı sorunları çözülebilmektedir. Araştırılması gereken canlılardan biri de deniz süngerleri ile birlikte yaşayan bakteri ve funguslardır. Bakteri ve fungus gibi farklı mikroorganizmalarla birlikte yaşayabilmeleri ve biyoaktif metabolitler açısından zengin bir kaynak oluşturmalarından dolayı süngerler ve bunların barındırdığı mikrobiyolojik canlılar üzerine yapılan çalışmaların sayısı son yıllarda artmıştır (Bultel-Ponce ve ark., 1999, Wang, 2006, Taylor ve ark., 2007). Süngerlerle birlikte yaşayan fungusların etkili biyoaktif bileşikler içermesi nedeni ile önemli bir kaynak olması bu çalışmanın yapılmasına öncülük etmiştir.

Fungusların farklı metabolitlere sahip olması; bulunduğu yaşamsal çevreden, diğer canlılarla olan etkileşimlerinden ve yaşamsal birlikteliklerinden etkilenmektedir. Farklı bölgelerden izole edilen benzer fungal suşlar birbirinden çok farklı kimyasal ve biyolojik özelliklerde moleküller sentezleyebilmektedir (Imhoff, 2011). Bu sebeple bu çalışmada Ege Denizi'nin farklı 3 lokasyonundan sünger örnekleri alınarak, hem fungus hem de elde edilecek moleküllerin çeşitliliği artırılmış oldu.

Türkiye denizlerinde yapılan araştırmalar incelendiğinde, doğal ürün potansiyelleri açısından süngerlerden izole edilen bakterilerin değerlendirilebildiği görülmektedir (Aksoy ve ark., 2008; Özkaya ve ark., 2015). Funguslarla yapılan çalışmalar açısından ise büyük bir boşluk bulunması nedeniyle yapılan bu çalışma oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca Ege Denizi'nin uluslararası gemi ticaretine açık olması, son yıllardaki global ısınma, kirlilik seviyesinin artması ve Ege'nin bir iç deniz oluşundan kaynaklanan farklı stres koşulları, denizel canlılar için baskı koşulları oluşturmaktadır (Androulidakis ve ark., 2015; Kalkan ve Altuğ, 2015; Küçüksezgin ve ark; 2014; Koukousioura ve ark., 2011). Bundan dolayı yapılan bu çalışma ile denizlerimizde büyük ekolojik çöküntü ve kayıplar oluşmadan önce önemli bir adım atılması sağlanmıştır.

Daha önce izole edilmemiş ya da izole edilmesi zor olan türlerin izolasyonunda; ön işlem uygulaması, farklı örnek alma teknikleri ve çeşitli besiyeri kullanımı gibi metotlar kullanılmaktadır (Webster ve ark., 2001; Nithya ve Pandian, 2010; Osinga ve ark., 2001). Bu çalışmadaki izolasyon işlemleri Kjer ve ark. (2010)'nın yaptığı

çalışma dikkate alınarak yürütülmüş ve ön işlemler uygulanarak süngerin dış yüzeyindeki bakteriler ve istenmeyen mikroorganizmalar arındırılmıştır. Funguslara göre daha hızlı üreyerek fungal gelişimi ve izolasyonu engelleyen bakteriler 3 farklı besiyerine (MEA, PDA ve CDA) eklenen antibiyotiklerle inhibe edilmiştir. İzolasyon çalışmasında elde edilen fungusların tekrar elde edilmesinin mümkün olduğunca azaltılabilmesi için üreme sürekli kontrol edilerek morfolojik olarak farklı olan izolatlar pasajlanmıştır. Ancak süngerlerin sahip oldukları mikrobiyal etki, bu yöntem ile tam olarak ortaya çıkarılamamaktadır. Çünkü aynı ortam içinde binlerce farklı organizmanın olduğu düşünüldüğünde, hangi organizmanın ne tür şartlarda kendini gösterebileceği önceden tahmin edilememektedir. Bu sebeple, buna yönelik bir deney ortamı oluşturmak da oldukça zordur. Bu uygulamanın zorlukları moleküler tekniklere dayalı yöntemlerin kullanımını giderek önemli hale getirmiştir. Çevresel örneklerden organizmalara ait genlerin izole edilmesi ve klonlanarak dizilenmesiyle, mikroorganizmaların yaşadığı alandaki yaşamlarını sürdürmeleri ve besin gereksinimlerinin belirlenmesi açısından önemli bilgiler elde edilmektedir. Böylece, genetik olarak varlığı belirlenen organizmalar için yeni izolasyon yöntemlerinin oluşturulması sağlanabilir ve çevresel örneklerin barındırdığı mikrobiyal topluluğun yapısı ortaya çıkarılabilir (Osinga ve ark., 2001; Nithya ve Pandian, 2010; Webster, ve ark., 2001;). Ancak geliştirilen bu yöntemlerin kullanılması hem zor ve pahalı olduğundan hem de uygulama süresinin uzun olmasından dolayı bu çalışmada öncelikli olarak kültüre dayalı klasik izolasyon yöntemleri seçilmiştir. Kültüre dayalı izolasyon yöntemlerindeki tüm çalışmalarda ön işlemler benzerlik göstermektedir. Fakat izolasyon amaçlı kullanılan besiyerleri çeşitlilik göstermektedir. Çünkü çeşitli fungus türlerinin farklı besin gereksinimleri olduğu bilinmektedir (Adejoye ve ark., 2006; Turner ve ark., 2008). Bu sebeple çalışmada üç farklı besiyeri (MEA, PDA ve CDA) kullanılmış, böylece elde edilecek fungus türü ve sayısı artırmıştır. Yapılan çalışmalarda kültür ortamlarına yapılan karbon, yağ asitleri gibi ilavelerin ürün miktarları ve ürün profilleri üzerinde etkili olduğu ortaya konulmuştur (Kim ve ark., 2002; Hsieh ve ark., 2008; Silva ve ark., 2004; Duan ve ark., 2006). Çalışmada kullanılan besiyerlerinin farklı olması pH değerinin değişim göstermesine sebep olmuştur. Bu değişim ile fungusların hangi pH aralığında daha hızlı ürediğinin belirlenmesi çalışmayı olumlu yönde etkilemiştir. Çünkü kültür ortamlarının pH değeri kültürün gelişimini, metabolit üretimini ve aktivitesini etkilemektedir (Chen ve Johns., 1993; Li ve ark., 2008). Fungus türleri

için gelişimi etkileyen bir diğer önemli faktör ise çevresel sıcaklıktır. Çoğu fungus türü için sıcaklık aralığı 10-35°C olarak bildirilmiştir (Kerry, 1990). Çalışmanın oda sıcaklığında gerçekleşmesi nedeniyle üreme konusunda bir sorun yaşanmamıştır. Fakat kısa ve uzun süreli stoklama amacıyla +4°C ve -20°C’de inkübe edilen fungus örneklerinde üremenin durduğu gözlemlenmiştir.

Doğal ürün eldesine yönelik yapılan çalışmalarda uzun yıllardan beri bitkilerden ve alglerden elde edilen özütlerin antioksidan özellikleri incelenmiştir. Alamgir ve ark., (2014) *Bacopa monniera* ve *Coccinia grandis* bitki yapraklarının ekstraktlarıyla askorbik asite (%96,8) karşı yaptıkları DPPH ile antioksidan taramasında, 800 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda sırasıyla %75,8 ve %86’lık oranla düşük aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Kindleysides ve ark., (2012)’nin Yeni Zelanda kıyılarında yaptıkları çalışmada, *Ecklonia radiata* ve *Macrocystis pyrifera* kahverengi alglerinin DPPH ile antioksidan aktivite taramasında %97,2 ve %92,3’lük bir değerle BHT (%62,4)’den daha yüksek aktiviteye sahip olduğu ve *Champia sp.* (%64)’nin BHT’ye benzer aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur. *Porphyra sp.* ise %10 ile düşük aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada fungusların da algler gibi yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Kumaran ve Joel Karunakaran (2006)’nin DPPH ile yaptıkları antioksidan çalışmasında; *Coleus aromaticus* bitkisinin 500 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyondaki sucül ekstraktlarının %91,3 değeriyle 200 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonundaki BHT’ye (%95,3) yakın aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Aynı konsantrasyondaki çalışmamızla karşılaştırdığımızda *P. atrovenetum* (1.1.2a) %96,1; *P. restrictum* (1.16.1a) %95,5; *Axinella verrucosa* süngerinden elde edilen 1.7.3 izolatu %94,5; *Aplysina aerophoba* süngerinden elde edilen 1.10.1 izolatu ise %93,8 oranında antioksidan aktivite göstererek *Coleus aromaticus* bitkisinden daha iyi sonuçlar vermiştir. *Cladosporium sp.* (4.1.7) ise %91,2’lik bir oranla yapılan çalışmaya benzer antioksidan aktivite göstermiştir. Jean-Philippe (2002)’nin yaptığı çalışmada; DPPH metodu ile *Pleurotus* cinsine ait yenilebilir bazı mantarların antioksidan özelliklerine bakılmış ve sonuç olarak en yüksek aktivite %85,67 ile *A. bisporus*’un (198 µL mL<sup>-1</sup>) meyvesinde görülmüş, %71-75 aktiviteyle *P. dryinus* (198 µL mL<sup>-1</sup>)’un onu takip ettiği bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmaya baktığımızda ise çoğu fungus ekstraktımızın (*P. restrictum*; 1.16.1a; %94,6), *Cladosporium sp.* (4.1.7; %92,8), *P. commune* (4.4.2; %94,7) daha düşük konsantrasyonda bile (20 µg mL<sup>-1</sup>) çok daha iyi antioksidan aktivite gösterdiği

görülmüştür. Bir başka araştırmada; *E. jambolana* bitkisinden izole edilen 21 fungal suştan *Aspergillus* sp. ve *Chaetomium* sp. etilasetat özütlerinin 1000 µg mL<sup>-1</sup> derişimde %80 oranında radikalleri parçalayabilme etkinliğinin olduğu rapor edilmiştir (Yadav ve ark., 2014). Çalışmamızdaki fungus ekstraktlarının 1000 µg mL<sup>-1</sup> derişimdeki antioksidan aktivitelerine bakıldığında, tüm ekstraktların %90'ın üzerinde antioksidan aktivite gösterdiği, yapılan çalışmaya yakın olarak *P. commune* (4.4.2) fungusunun bile %84,7'lik bir değerle daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur. Elde edilen bu iyi sonuçlara rağmen denizel funguslarla yapılan çalışmalar incelendiğinde bitki ve alg çalışmalarına göre daha az sayıda kaldığı görülmektedir. Halbuki bitkilerden doğal antioksidan eldesinde birçok dezavantaj bulunmaktadır. Başta hasat mevsimi olmak üzere, yeterli miktarda özüt için çok geniş alanlara ve güneş ışığına ihtiyaç duyulmaktadır. Mikroorganizmaların üretimi ve metabolit eldesi ise kapalı ortamlarda suni koşullar altında istenildiği zaman ve istenilen miktarda yapılabilir. Bu sebeple dezavantaja sahip bitkiler yerine denizel funguslar kültür şartları ve ulaşılması açısından daha uygundur. Ancak mikroorganizmalar için belirtilen aynı özellikteki biyoaktivite üretiminin her zaman gerçekleşmeye ihtimali de önemli bir sınırlayıcı etken olabilmektedir (Lopes ve ark., 2013). Fakat günümüzde genetik modifikasyonlarla bu ihtimalleri de azaltmak ayrıca mümkündür (Piers ve ark., 1993).

Antioksidan ürünlerin eldesi konusunda denizel kaynaklı makroorganizmalar değerlendirildiğinde Abdullah ve ark. (2013)'nın yaptıkları çalışmada Pecaron Körfezi'nden topladıkları süngerlerin etanol ile elde edilen özütlerinin antioksidan aktiviteleri taranmış, tarama sonucunda IC<sub>50</sub> değerlerinin *Xestospongia* sp. 277,75 µg mL<sup>-1</sup>, *Fascaplysinopsis reticulata* 71,89 µg mL<sup>-1</sup>, *Acanthella* sp. 56,94 µg mL<sup>-1</sup>, *Callyspongia* sp. 181 µg mL<sup>-1</sup>, *Petrosia contignata* 89,59 µg mL<sup>-1</sup>, *Aptos suberitoides* 27,42 µg mL<sup>-1</sup>, *Xestospongia exigua* 89,17 µg mL<sup>-1</sup>, derişimlerinde Askorbik asit (0,67 µg mL<sup>-1</sup>) ile karşılaştırıldığında radikal parçalama özelliklerinin olduğu belirtilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada antioksidan aktivite açısından değerlendirilen fungusların ham özütlerinin yukarıda bahsedilen makroorganizmaların çoğundan daha iyi antioksidan özelliklere sahip oldukları ve ilerleyen aşamalarda yapılacak antioksidan bileşik izolasyonu için umut verici olduğu görülmektedir. Ayrıca funguslarla yapılacak üretimlerde hava koşullarına ve çevresel şartlara bağımlılığın az olması, büyük alanlara ihtiyaç duyulmaması, ucuz

kültür ortamlarında üretimlerinin yapılabilmesi ve kolaylıkla büyük ölçeklerde üretilibilmelerinin mümkün olmasından dolayı da bitki, alg ve süngerlere göre çok daha avantajlı olabilecek, önemli bir ekonomik potansiyeli elimizde tuttuğumuz göstergesidir (Lopes ve ark., 2013).

Denizel funguslardan elde edilen metabolitlerle ilgili çalışmalarını incelediğimizde, Abdel-Monem ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada; *Hippospongia communis* süngerinden elde edilen *Gymnascella dankaliensis* fungusunun etilasetat özütünün 6000 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda %59,28 oranında radikal parçalayabildiğini rapor etmişlerdir (6000 µg mL<sup>-1</sup> askorbik asitte %73,12). Bu çalışma bizim çalışmamız ile karşılaştırıldığında, daha yüksek konsantrasyonda daha düşük antioksidan aktivite elde edilmiştir. Daha düşük konsantrasyonla daha yüksek antioksidan aktivite sağlayan metabolitlere ihtiyaç olduğundan buldukları bu sonuç bizim çalışmamızdaki metabolitlerin değerini ortaya koymaktadır. Li ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada alglerden izole edilen *Aspergillus wentii* EN-48 suşundan saflaştırılan 8 metabolit için 5,2–99,4 µg mL<sup>-1</sup> aralığında (BHT, 36,9 µg mL<sup>-1</sup>) ve Zhang ve ark. (2015) kırmızı alg türü olan *Grateloupia turuturu*'dan izole edilen *Paecilomyces variotii* EN-291 kökenli 10 metabolit için 11,6 – 186,3 µg mL<sup>-1</sup> aralığında (BHT, 117,7 µg mL<sup>-1</sup>) %50 radikal parçalayabilme etkinliğinin olduğunu bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz antioksidan aktivite sonuçlarına göre; en düşük konsantrasyon olan 20 µg mL<sup>-1</sup>'de en az aktiviteyi *Axinella verrucosa* süngerinden elde edilen 1.7.1 izolatının göstermesine rağmen (%60,8), bu değer de yapılan çalışmadan daha yüksek olduğu görülmektedir. Arora ve Chandra'nın (2010) yaptığı çalışmada ise; *Aspergillus* PR78 (%82,77) ve *Aspergillus* PR66 (%68,26) fungusları iyi aktivite göstermiştir. BHT'ye karşı DPPH ile yaptığımız antioksidan denemesinde elde ettiğimiz sonuçlara göre 20 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda *P. commune* (4.4.2) örneği %94,7 değer ile yapılan çalışmalara oranla daha iyi antioksidan aktivite göstermiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda özellikle denizel kökenli fungusların izole edildikleri ortam şartlarından dolayı antioksidan aktivelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Su ürünleri sektörünün en önemli sorunlarından biri balık yemlerinin besinsel değerinin en önemli bileşeni olan balık yağının oksitlenmesidir. Balık yağının oksidasyonunu önlemek amaçlı yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, alglerden ve bitkilerden elde edilen özütlerin veya saf moleküllerin denendiği görülmüştür

(Hassane Hamadou ve ark., 2013; Kindleysides ve ark., 2012; Hamre ve ark., 2010; Kulas ve Ackman, 2001). Ancak, denizel funguslardan elde edilen antioksidan ürün profillerinin daha önce balık yağının oksidasyonuna yönelik yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum çalışma sonuçlarımızın başka çalışmalar ile karşılaştırılmasını nispeten kısıtlamaktadır.

Kindleysides ve ark., (2012) yaptıkları çalışmada; Hoki balığından (*Macruronus novaezelandiae*) elde edilen yağın oksidasyonunu önlemede; Yeni Zelanda kıyılarında yetişen iki kahverengi alg türü (*Ecklonia radiata*, *Macrocystis pyrifera*) ve iki adet kırmızı alg türünün (*Champia sp.* ve *Porphyra sp.*) n-hekzan özütlerini kullanmışlardır. Çalışmada %0,5 BHT ve ham özütlerle hazırlanan balık yağları 60°C'de 12 gün boyunca depolanmıştır. İki günde bir alınan ölçümlerde *E. radiata* özütünün balık yağının oksidasyonu önlemede daha etkili olduğu belirtilmiştir. Diğer bir çalışmada, Valenzuela ve ark. (1991) *Peumus boldus* bitkisinden elde ettikleri Boldin'in (0,8 g kg<sup>-1</sup>)  $\alpha$ -tekoferol, kuersitin (0,8 g kg<sup>-1</sup>) ve sentetik antioksidan olan BHT ve bütildihidroksianisole (0,8 g kg<sup>-1</sup>) göre balık yağının metal katalizli oksidasyonunu önlemede daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Tsimidou ve ark., (1995) kurutulmuş yabani mercanköşkü ile yaptıkları oksidasyonu önleme çalışmalarında % 1'lik mercanköşkü özütünün 200 ppm'lik TBHQ ile aynı etkiyi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Xiaojun ve ark. (1996)'nın yaptıkları çalışmada ise; *Sargassum kjellmanianum*'dan elde edilen phlorotannin'in (kahverengi alg polifenolleri) %0,02 BHT'den (tertbutyl-4-hidroksitoluen) yaklaşık 2,6 kat daha fazla antioksidan aktiviteyle balık yağı oksidasyonunu önlediği bildirilmişlerdir. Wang ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada; 30°C'de karnosik asit eklenen balık yağının oksidasyonuna baktıklarında 24. güne kadar tüm örneklerde 22 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> daha düşük PV değerleri elde edilmiştir. Fakat 66 günün sonunda kontrol grubuna karşılık (97,21 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) PV değerlerinin 48,89 ve 86,35 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> arasında değiştiğini gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmanın 4°C'deki depolanması süresinde ise 66. günün sonunda kontrol grubunda 58,466 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> elde etmelerine karşın örneklerde 40 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>'den aşağıda bir PV değeri elde etmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada ise; 25°C sıcaklıkta yapılan 50 günlük deneme sonunda kontrol grubuna karşı (36,33 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) ekstre kullanılan bütün gruplarda peroksit değerleri 16,34-28,61 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> arasında değişmiş ve balık yağı ile karşılaştırıldığında deneme sonuna kadar tüm ekstreler peroksit değerlerini

azaltıcı bir antioksidan özellik göstermiştir ( $p < 0,05$ ). Ayrıca, çalışmada kullanılan fungal ekstraktların tamamının, karnosik asit eklenen balık yağının 4°C'deki (Wang ve ark., 2011) tespit edilen sonucuna göre daha etkili bir antioksidan özelliğe sahip oldukları anlaşılmaktadır.

Genel olarak yüksek konsantrasyonlara çıkıldıkça tüm ekstreler için birincil oksidasyon ürünü olarak peroksit oluşumun daha da geciktirildiği gözlenmiştir. Elde edilen verilerin ham ekstrelerden gelmesi, denemeye alınan türlerin ürettikleri sekonder metabolit potansiyellerinin daha da yüksek olabileceğini göstermektedir. Çünkü ham ekstre içinde az miktarda bulunan etken antioksidan bileşiğin tek başına kullanıldığında çok daha düşük konsantrasyonlarda bile daha etkili sonuçlar vermesi muhtemeldir. Ancak bazı durumlarda fungal metabolitlerin fraksiyonlarının veya bileşiklerinin ham ekstrede olduğu gibi aynı etkiyi göstermediği bilinmektedir (Bansemir ve ark., 2006). Özellikle 25°C sıcaklıktaki yüksek ve düşük dozlardaki 50 günlük depolama süresince kontrol balık yağında peroksit değerleri önemli derecede artarken 1.10.1 fungal suşunun %0,1 konsantrasyonda BHT'ye yakın inhibisyon özelliği göstermesi ve diğer fungusların her iki konsantrasyon sonuçlarının birbirine yakın olarak 60°C'lik denemelerden daha iyi aktivite göstermeleri önemli bulunmuştur. Çünkü yüksek sıcaklığın (>40°) fungal metabolitlerdeki bileşiklerin sıcaklıkla birlikte aktivitelerinin bozulabileceğini akla getirmektedir (Kjer ve ark., 2010). Yüksek konsantrasyon kullanımı daha iyi inhibisyon etkisi sağlasa da, depolama sıcaklığının etkisi dikkate alınmalı ve gerekli durumlarda antioksidan potansiyelleri buna göre değerlendirilmelidir. Ayrıca, elde edilen fungal suşlar uygun koşullarda saklandığı takdirde, depolama süresini önemli ölçüde uzatabilecekleri denemeler sonunda gösterilmiştir.

İkincil oksidasyon ürünlerine bakıldığında, Kindleysides ve ark., (2012)'nin 60°C'deki Yeni Zelanda algleriyle ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) yaptıkları 12 günlük çalışmada, birincil oksidasyon ürünlerinin değerleri azalmaya başladığında (8 ve 10. gün) ikincil oksidasyon ürünleri artmaya başlamıştır. Çünkü oluşan birincil oksidasyon ürünleri zamanla oksitlenmeye devam ederek ikincil ürünleri oluşturmaya başlamışlardır. Tüm örnekler başlangıçta 0,04'ten 2,04'e çıkan düşük değerler göstermiştir. 4. günde örnekler arasında önemli değişiklikler olarak *M. pyrifera* ekstraktının kullanıldığı denemede pAV değeri 4. günde 10,88 çıkmış ve depolama denemesinin sonuna kadar bu seviyelerde kalmıştır. 10. ve 12. gündeki pAV değerlerinde ise, kontrol hoki

balığı yağında 14,59'dan 7,71'e ve BHT örneklerinde de 17,71'den 9,83'e (OD 350 nm g yağ<sup>-1</sup>) düşüş görülmektedir. Çünkü oluşan ikincil oksidasyon ürünleri kırılmaya başlamıştır. Bizim yaptığımız çalışmada ise; 60°C'de 19 günlük olan 2. denemede kontrol balık yağında keskin bir artış gözlenmiştir. 60°C'de 17. güne kadar bütün örneklerde PaV değerlerinde hızlı bir artış olurken, 17 ve 19. gün arasında oksidasyon hızında yavaşlama olmuştur. Çünkü bu zamandan sonra oluşan ikincil oksidasyon ürünleri parçalamaya başlamış ve yüksek sıcaklık ürünlerin parçalanmasını hızlandırmıştır. 12. günün örnekleri karşılaştırıldığında ise Kindleysides ve ark., (2012) alglerle bulduklarına yakın değerler bulunmuş olup izole edilen *P. commune* (4.4.2) suşunun 5,86 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> anisidin değeri ile çok daha iyi oksidasyon önleyici özellik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak bu zamandan sonra ikincil oksidasyon ürünlerinde önemli bir artış gözlenmiştir. Burada yüksek sıcaklığın fungal metabolitlerin yapılarını bozarak oksidasyonu önleme etkinliğinin azalmasına neden olduğu görülmüştür (Kjer ve ark., 2010). Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda özüt kullanıldığında funguslar tarafından az miktarda üretilen aktif moleküllerin miktarı da arttığından, özütlerin içeriğinde bulunan moleküllerin birbiri arasındaki sinerjik etkiyi arttırması ve düşük konsantrasyonlara göre yüksek aktivite göstermesi mümkündür (Bansemir ve ark., 2006). Denemelerden elde edilen veriler, belirlenen funguslardan ilerleyen zamanlarda yapılacak olan yeni çalışmalarla su ürünleri sektörünün kullanımına sunulabilecek başka ürünlerin eldesinin de mümkün olabileceğini göstermiştir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile Ege Denizi'nin barındırdığı biyoçeşitlilik ve su ürünleri alanındaki kullanım potansiyeli açıkça gösterilmiş ve önemli doğal ürün kaynakları olabilecek fungal suşlar izole edilmiştir. Türkiye'nin çevre denizlerinde de benzeri çalışmaların artırılması ile yeni ürünlerin keşfedilme olasılıkları artmış olacaktır.

Elde edilen veriler antioksidan özelliğe sahip yeni ve önemli doğal ürünlerin ülkemiz denizlerinden de sağlanabileceğini, bu alanda yatırımlar yapılması durumunda gıda ve hayvancılık sektöründe kullanılacak antioksidan katkı maddelerinin doğal kaynaklardan temin edilebileceğini göstermiştir. Bu çalışma mevcut sentetik antioksidanların yerine alternatif olarak etkili doğal antioksidanların sunulabileceği ortaya konulmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda alınan iyi sonuçlar ham özütler ile çalışıldığı için kullanılan madde miktarı açısından büyük sorun olarak görülmektedir. Molekül izolasyonlarının yapılmasıyla birlikte etken molekülün bulunması ve tek antioksidan bileşik olarak kullanılması mümkün olabilir. Ancak metabolitlerin etkileşimi böyle bir molekül varlığını şuan için garanti etmemektedir. Ayrıca ilerleyen çalışmalarda kullanılan ekstreler ile ilgili toksikasyon çalışmalarının yapılabilmesiyle canlılar üzerindeki etkileri de ortaya konulabilecektir.

Bu çalışma ile *P. restrictum* (1.16.1a), *Cladosporium sp.* (4.1.7) ve *P. commune* (4.4.2) gibi fungal suşların su ürünleri sektörünün önemli bir sorunu olan balık yağının bozulmasını önlemedeki etkinliğinin belirlenmesiyle akuakültür sektörünün sürdürülebilir gelişimine önemli ölçüde katkı sunulmuştur.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Abdel-Lateff, A., König, G.M., Fisch, K.M., Höller, U., Jones, P.G., Wrightt, A.D.** 2002. "New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium sp.*", *Journal of Natural Products*, 65, 1605-1611.
2. **Abdel-Monem, N., Azeem, A. M. A., El Ashry, E. S. H., Ghareeb, D. A., Nabil-Adam, A.** 2013. "Assessment of Secondary Metabolites from Marine-Derived Fungi as Antioxidant", *Open Journal of Medicinal Chemistry*, 3, 60-73.
3. **Abdillah, S., Nurhayati, A. P. D., Nurhatika, S., Setiawan, E., Heffen, W. L.** 2013. "Cytotoxic and antioxidant activities of marine sponge diversity Pecaron Bay Pasir Putih Situbondo East Java, Indonesia", *Journal of Pharmacy Research* 6, 685-689.
4. **Abrell, L. M., Borgeson, B. ve Crews, P.** 1996. "A new polyketide, secocurvularin, from the salt water culture of a sponge derived fungus", *Tetrahedron Letters*. Vol. 37, No.50, p.p. 8983-8984.
5. **Adejoye, O. D., Adebayo-Tayo, B. C., Ogunjobi, A. A., Olaoye, O. A., Fadahunsi, F. I.** 2006. "Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Pleurotus florida*, a Nigeria edible mushroom", *African Journal of Biotechnology* 5: 1355-1359.
6. **Aksoy, A., Albayrak, S., Sağdic. O.** 2008. "Türkiye' de yetişen endemik *Salvia halophila*' nın antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi", Türkiye 10. Gıda Kongresi
7. **Alamgir, A. N. M., Rahman, A. ve Rahman, M.** 2014. "Secondary metabolites and antioxidant activity of the crude leaf extract of *Bacopa monniera* (L.) Pennel. and *Coccinia grandis* (L.) J. Voigt", *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 3 (1): 226-230.
8. **Almeida, A. P., Dethoup, T., Singburadom, N., Lima, R., Vasconcelos, M. H., Pinto, M., Kijjoa, A.** 2013. "The in vitro anticancer activity of the crude extract of the sponge-associated fungus *Eurotium cristatum* and its secondary metabolites", *Journal of Natural Pharmaceuticals, Volume 1, Issue 1*.
9. **Amarowicz, R., Naczek M., Shahidi, F.** 2000. "Antioxidant Activity of Various Fractions of Non-Tannin Phenolics of Canola Hulls", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2755-2759.
10. **Androulidakis, Y. S., Kombiadou, K. D., Makris, C. V., Baltikas, V. N., Krestenitis, Y. N.** 2015. "Storm surges in the Mediterranean Sea: Variability and trends under future climatic conditions", *Dynamics of Atmospheres and Oceans*, 71, 56-82.
11. **Arora, D. S., Chandra, P.** 2010. "Assay of antioxidant potential of two *aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions", *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 765-777.
12. **Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., Lindequist. U.** 2006. "Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria", *Aquaculture*. 252, 79-84.

13. **Blois, M. S.** 1958. "Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical", *Nature*, 181, 1199-1200.
14. **Bringmann, G., Lang, G., Gulder, T. A. M., Tsuruta, H., Mühlbacher, J., Maksimenka, K., Steffens, S., Schaumann, K., Stöhr, R., Wiese, J., Imhoff, J. F., Perovic'-Ottstadt, S., Boreikod, O. ve Müller, W. E. G.** 2005. "The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain", *Tetrahedron* 61, 7252–7265.
15. **Bultel- Ponce, V., Berge, J. P., Debitus, C., Nicholas, J. L., Guyot, M.** 1999. "Metabolites from the sponge- associated bacterium *Pseudomonas* species" *Mar. Biotechnol.*, 1: 384- 390.
16. **Cabello, F. C.,** 2006. "Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment", *Environmental microbiology*, Vol. 8, Issue 7, pp. 1137–1144.
17. **Chen, M. H., Johns, M. R.** 1993. "Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*", *Appl Microbiol Biotechnol*, 40: 132-138.
18. **Çakmak, G., Togan, İ., Uğuz, C. ve Severcan, F.** 2003. "FT-IR Spectroscopic Analysis of Rainbow Trout Liver Exposed to Nonylphenol. Applied Spectroscopy", Vol. 57, Issue 7, pp. 835-841.
19. **DeLong, E.F.** 2007. "Modern microbial seascapes", *Nature Reviews Microbiology*, 5, 755–757.
20. **Demain, A.L., Zhang, L.** 2005. "Natural Products and Drug Discovery", *Natural Products Drug Discovery and Therapeutic*.
21. **Duan, X. J., Zhang, W. W., Li, X. M., Wang, B. G.** 2006. "Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*", *Food. Chem.* 95: 37-43.
22. **Ebel, R., Rateb, M. E.** 2010. "Secondary metabolites of fungi from marine habitats", *Nat. Prod. Rep.*, 28, 290.
23. **El-Neketi, M., Ebrahim, W., Lin, W., Gedara, S., Badria, F., Saad, H. E. A., Lai, D. ve Proksch, P.** 2013. "Alkaloids and Polyketides from *Penicillium citrinum*, an Endophyte Isolated from the Moroccan Plant *Ceratonia siliqua*", *Nat. Prod.*, 76 (6), pp 1099–1104.
24. **Food and Agriculture Organization of the UN (FAO),** 2012. "The State of World Fisheries and Aquaculture". <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>. 2012.
25. **Fowler, L.G., Banks, J.L.** 1969. "Test of Vitamin Supplements and Formule Changes in The Abernathy Salmon Diet", *Fish and Wildlife Service Technical Paper* 26, 19 pp.
26. **Geldiy, R., Kocataş, A.** 2012. "Denizlerde yaşayan canlıların sistematiği ve bazı örnekler", *Deniz Biyolojisine Giriş*, sayfa; 386-387.
27. **Gordon, D. T., Ratliff, V.** 1992. "The implications of omega-3fatty acids in human healty. Advances in Seafood Biochemistry Composition and Quality", *Ed. By George L. Flick*; 406 pp.

28. **Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B.** 2006. "Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136 – 147.
29. **Hamre, K., Kolås, K. ve Sandnes, K.** 2010. "Protection of fish feed, made directly from marine raw materials, with natural antioxidants", *Food Chemistry 119*: 270–278.
30. **Hassane Hamadou, A., Xia, W., Xu, Y., Jiang, Q.** 2013. "Oxidative stability of silver carp oil supplemented with potato peels extract compared to synthetic antioxidants during long term storage", *Annals. Food Science and Technology*.
31. **Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A. B., Wagner, M., Hacker, J. ve Moore, B. S.** 2002. "Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans", *Applied and environmental microbiology*, Vol. 68, No. 9, p. 4431–4440.
32. **Hiort, J., Maksimenka, K., Reichert, M., Perovic-Ottstadt, S., Lin, W.H., Wray, V., Steube, K., Schaumann, K., Weber, H., Proksch, P., Ebel, R., Müller, W.E.G. and Bringmann, G.** 2004. "New Natural products from the sponge-derived fungus *Aspergillus niger*", *Journal of Natural Products*, 67, 1532-1543pp.
33. **Hooper J. N. A., Van Soest RWM.** 2002. "Class Demospongiae Sollas, 1885. In: Hooper J. N. A., van Soest RWM (eds). *Systema Porifera: a guide to the classification of sponges*", *Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York*. pp. 15-18, vol. 1.
34. **Hsieh, C., Wang, H. L., Chen, C. C., Hsu, T. H., Tseng, M. H.** 2008. "Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa*", *Biochemical Engineering Journal*, 38, 198–205.
35. **Hwang, S.J., Yoon, W.B., Lee, O.H., Cha, S.J., Kim, J.D.** 2014. "Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea", *Food Chemistry*, 146, 71–77.
36. **Imhoff, J. F., Labes, A., Wiese, J.** 2011. "Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products", *Biotechnology Advances* 29, 468–482.
37. **Ireland, C. M. ve Bugni, T. S.** 2004. "Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms", *Nat. Prod. Rep.*, 21, 143-163.
38. **Ishikawa, A., Iwasaki, Y. ve Asahi, T.** 1996. "Molecular cloning and characterization of a cDNA for the fi subunit of a G protein from rice", *Plant CellPhysiol.* 37(2): 223-228.
39. **Jean-Philippe, S. R.** 2002. "Antioxidant properties of some edible fungi in the genus *University of Tennessee, Knoxville Trace: Tennessee Research and Creative Exchange*, sayfa 51.
40. **Jensen, P.R., Fenical, W.** 2000. "Marine microorganisms and drug discovery: current status and future potential in *Drugs from the Sea*", *Karger Publishers, Basel, Switzerland* 6–29.
41. **Julianti, E., Oh, H., Jang, K.H., Lee, J.K., Lee, S.K., Oh, D.C., Oh, K.B., Shin, J.** 2011. "Acremostictin, a highly oxygenated metabolite from the marine fungus *Acremonium strictum*", *Journal of Natural Products*, 74 (12), 2592–2594.

42. **Kalkan, S., Altuğ, G.** 2015. "Bio-indicator bacteria & environmental variables of the coastal zones: The example of the Güllük Bay, Aegean Sea, Turkey", *Marine Pollution Bulletin*, 95, 380–384.
43. **Kalogerakis, N., Politi, M., Foteinis, S., Chatzisyneon, E., Mantzavinos, D.** 2013. "Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: A viable solution that promotes their overall sustainable management", *Journal of Environmental Management* 128; 749-758.
44. **Kasetrathat, C., Ngamrojanavanich, N., Wiyakrutta, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Kittakoop, P.** 2008. "Cytotoxic and antiplasmodial substances from marine-derived fungi, *Nodulisporium* sp. and CRI247-01", *Phytochemistry*, 69(14), 2621-2626.
45. **Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P. D., Walsh, M., Mooij, M. J., Bourke, M. B., Rea, M. C., O'Connor, P. M., Ross, R. P., Hill, C., O'Gara, F., Marchesi, J. R. and Dobson, A. D. W.** 2009. "Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters", *Marine Biotechnology*, 11, 384–396pp.
46. **Kerry, B. R.** 1990. "An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes", *Supplement to the Journal of Nematology*, volume, 22, number 4s.
47. **Kim, S. K., Kim, Y. C.** 2002. "Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats", *Food Chem. Toxicol.*, 40 (4), pp. 545–549.
48. **Kindleysides, S., Quek, S-Y. ve Miller, M. R.** 2012. "Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts", *Food Chemistry* 133: 1624–1631.
49. **Kjer, J., Debbab, A., Aly, A. H. ve Proksch, P.** 2010. "Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products", *Nature Protocols* vol.5 No.3.
50. **Komoto, J., Yamada, T., Watanabe, K., ve Takusagawa, F.** 2004. "Crystal Structure of Human Prostaglandin F Synthase (AKR1C3)", *Biochemistry*, 43, 2188-2198.
51. **Korkut, A. Y., Kop, A., Demir, P.** 2007. "Balık Yemlerinde Kullanılan Balık Yağı ve Özellikleri", *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, Cilt/Volume 24, Sayı/Issue (1-2): 195–199.
52. **Koukousioura, O., Dimiza, M. D., Triantaphyllou, M. V., Hallock, P.** 2011. "Living benthic foraminifera as an environmental proxy in coastal ecosystems: A case study from the Aegean Sea (Greece, NE Mediterranean)", *Journal of Marine Systems* 88, 489– 501.
53. **Kulas, E. ve Ackman, R. G.** 2001. "Different tocopherols and the relationship between two methods for determination of primary oxidation products in fish oil", *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1724–1729.
54. **Kumar, N., Bhandari, P., Singh, B., Bari, S. S.** 2009. "Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*", *Food and Chemical Toxicology* 47, 361–367.

55. **Kumaran, A., Joel karunakaran, R.** 2006. "Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*", *Food Chemistry* 97, 109–114.
56. **Küçükgülmez, A.** 2011. "Kırmızı Dev Karides (*Aristaeomorpha foliacea*) Kabuklarından Elde Edilen Ekstraktın Buzdolabında Depolanan Hamsi (*Engraulis encrasicolus*)' nin Kimyasal Fiziksel Ve Duyusal Özelliklerine Etkileri".
57. **Küçüksezgin, F., Gönül, L. T., Taşel, D.** 2014. "Total and inorganic arsenic levels in some marine organisms from Izmir Bay (Eastern Aegean Sea): A risk assessment", *Chemosphere*, 112, 311–316.
58. **Laohabanjong, R., Tantikitti, C., Benjakul, S., Supamattaya, K., Boonyaratpalin, M.** 2009. "Lipid oxidation in fish meal stored under different conditions on growth, feed efficiency and hepatopancreatic cells of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)", *Aquaculture*, 286, 283 – 289.
59. **Li, X., Li, X. M., Xu, G. M., Li, C. S., Wang, B. G.** 2014. "Antioxidant metabolites from marine alga-derived fungus *Aspergillus wentii* EN-48", *Phytochemistry Letters*. 7, 120–123.
60. **Li, L. Y., Ding, Y., Groth, I., Menzel, K. D., Peschel, G., Voigt, K., Deng, Z.W., Sattler, I., Lin, W. H.** 2008. "Pyrrole and indole alkaloids from an endophytic *Fusarium incarnatum* (HKI00504) isolated from the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*", *J Asian Nat Prod Res*, 10 (7-8), 765-770.
61. **Lopes, F. C., Tichota, D. M., Pereira, J. Q., Segalin, J., Rios, A. O., Brandelli, A.** 2013. "Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial by products: an Eco- Friendly alternative", *Appl Biochem Biotechnol*, 171: 616– 625.
62. **Lozupone, C.A., Knight, R.** 2007. "Global patterns in bacterial diversity", *PNAS*, 104, 11436–11440.
63. **Moccia, R.O., Hung, S.S.O., Slinger, S.J., Ferguson, H.W.** 1984. "Effect of Oxidized Fish Oil, Vitamn E and Ethoxyquin on The Histopathology and Haematology of Rainbow Trout *Salmo gairdneri* Richardson", *Journal of Fish Disease*, 7: 269-282.
64. **Murray, A. P., Rodriguez, S., Frontera, M. A., Tomas, M. A. ve Mulet, M. C.** 2004. "Antioxidant Metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, *Z. Naturforsch*", 59c, 477-480.
65. **Newman, D.J., Cragg, G.M.** 2007. "Natural products as sources of new drugs over the last 25 years", *Journal of Natural Products*, 70, 461–477.
66. **Nithya, C. ve Pandian, S. K.** 2010. "The in vitro antibiofilm activity of selected marine bacterial culture supernatants against *Vibrio spp.*", *Archives of Microbiology*, Volume 192, Issue 10, pp 843-854.
67. **Norveel Semb, T.** 2012. "Analytical methods for determination of the oxidative status in oils", Norwegian University of Science and Technology, sayfa 76.
68. **Osinga, R., Armstrong, E., Burgess, J. G., Hoffman, F., Reitner, J., Schumann-Kindel, G.** 2001. "Sponge- microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering", *Hydrobiologia*, 461: 55- 62.
69. **Özkaya, F. C., Bedir E. ve Hameş, E. E.** 2015. "A new siderophore from sponge associated *Pseudomonas fluorescens* 4.9.3", *Rec. Nat. Prod.* 9:4, 509- 517.

70. **Park, Y. C., Gunasekera, S. P., Lopez, J. V., McCarthy, P. J. Ve Wright, A. E.** 2006. "Metabolites from the Marine-Derived Fungus *Chromocleista sp.* Isolated from a Deep-Water Sediment Sample Collected in the Gulf of Mexico", *J. Nat. Prod.*, 69 (4), pp 580–584.
71. **Parvatkar, R. R., D'Souza, C., Tripathi, A., Naik, C. G.** 2009. "Aspernolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*", *Phytochemistry, Volume 70, Issue 1*, Pages 128–132.
72. **Piel, J., Butzke, D., Fusetani, N., Hui, D., Platzner, M., Wen, G. and Matsunaga, S.** 2005. "Exploring the chemistry of uncultivated bacterial, symbionts: antitumor polyketides of the pederin family", *Journal of Natural Products*, 68,472–479pp.
73. **Piers, K. L., Brown, M. H., Hancock, R. E. W.** 1993. "Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria", *Volume 134, Issue 1*, 30 November, Pages 7-13.
74. **Prachyawarakorn, V., Mahidol, C., Sureram, S., Sangpetsiripan, S., Wiyakrutta, S., Ruchirawat, S. ve Kittakoop, P.** 2008. "Diketopiperazines and phthalides from a marine derived fungus of the order pleosporales", *Planta Med.*, 74, 69–72.
75. **Proksch, P., Edrada, R.A., Ebel, R.** 2002. "Drugs from the seas: current status and microbiological implications", *Applied Microbiology Biotechnology*, 59, 125–134pp.
76. **Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R.A., Wray, V., Steube, K.** 2003. "Bioactive natural products from marine invertebrates and associated fungi", *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 37,117-142.
77. **Querellou, J., Børresen, T., Boyen, C., Dobson, A., Höfle, M., Ianora, A., Jaspars, M., Kijjoo, A., Olafsen, J., Rigos, G., Wijffels, R. H.** 2010. "Marine biotechnology: a new vision and strategy for Europe", Wageningen University & Research Centre.
78. **Roberts, R. J., Richards, R. H., Bullock, A. M.** 1979. "Pansteatitis in Rainbow Trout *Salmo gairdneri* Richardson", *Journal of Fish Disease*, 2: 85-91.
79. **Silva, B. M., Andrade, P. M., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra R. M. ve Ferreira, M. A.** 2004. "Quince (*cydonia oblonga miller*) fruit (pulp, peel, and seed) and Jam: Antioxidant activity," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, No. 15, pp. 4705-4712.
80. **Simon, C., Daniel, R.** 2010. "Metagenomic analyses: past and future trends", *Applied Environmental Microbiology*, 77, 1153–11561.
81. **Smith, C. E.** 1979. "The Prevention of Liver Lipoid Degeneration (Ceroidosis) and Microcytic Anaemia in Rainbow Trout *Salmo gairdneri* Richardson Fed Rancid Diets: A Preliminary Report", *Journal of Fish Disease*, 2: 429-437.
82. **Tacon, A. G. J.** 1992. "Nutritional Fish Pathology. Oxidation of Dietary Lipids", FAO Fisheries Technical Paper 330.
83. **Taylor, M. W., Radax, R. ve Wagner, M.** 2007. "Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology and biotechnological potential", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 295–347pp.

84. **Thakur, N.L., Müller, W.E.G.** 2004. "Biotechnological potential of marine sponges", *Current Science*, 86, 1506–1512.
85. **Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P. ve LokaBharathi, P. A.** 2010. "Marine Drugs from Sponge-Microbe Association—A Review", *Mar. Drugs*, 8, 1417-1468.
86. **Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Preedanon, S., Phongpaichit, S., Rungjindamai, N. ve Sakayaroj, J.** 2008. "Epoxydons and a Pyrone from the Marine-Derived Fungus *Nigrospora*", PSU-F5. *J. Nat. Prod.*, 71 (8), pp 1323–1326.
87. **Tsimidou, M., Papavergou, E. ve Boskou, D.** 1995. "Evaluation of oregano antioxidant activity in mackerel oil", *Food Research International* vol. 28, 4 p.p, 431-433.
88. **Turchini, G.M., Moretti, V.M., Hermon, K., Caprino, F., Busetto, M.L., Bellagamba, F., Rankin, T., Keast, R.S.J., Francis, D.S.** 2013. "Monola oil versus canola oil as a fish oil replacer in rainbow trout feeds: Effects on growth, fatty acid metabolism and final eating quality", *Food Chemistry*, 141, 1335 – 1344.
89. **Turner, N. J., R. Gregory, C. Brooks, Failing, T. ve Satterfield, T.** 2008. "From invisibility to transparency: identifying the implications", *Ecology and Society* 13(2): 7.
90. **Ueda, S., Hayashi, T., Namiki, M.** 1986. "Effect of ascorbic acid on lipid autoxidation in a model food system", *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(1), 1-7.
91. **Valenzuela, A., Nieto, S., Calsels, B. K. ve Spelsky, H.** 1991. "Inhibitory Effect of Boldine on Fish Oil Oxidation", *JAOCS*, Vol. 68, No.12.
92. **Waissbluth, M.D., Guzman, L., Plachco, F.P.** 1971. "Oxidation of lipids in fish meal", *Journal of the American Oil Chemists Society*, 48(8), 420 – 424.
93. **Wang, G.** 2006. "Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 545-551.
94. **Wang, H., Liu, F., Yang, L., Zu, Y., Wang, H., Qu, S., Zhang, Y.** 2011. "Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage", *Food Chemistry* 128; 93–99.
95. **Webster, N. S., Wilson, K. J., Blackall, L. L. ve Hill, R. T.** 2001. "Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*" *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 434–444.
96. **Wulff, T., Petersen, J., Nørrelykke, M. R., Jessen, F., Nielsen, H. H.** 2012. "Proteome analysis of pyloric ceca: a methodology for fish feed development", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8457 – 8464.
97. **Xiaojun, Y., Xiancui, L., Chengxu, Z. ve Xiao, F.** 1996. "Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*", *Journal of Applied Phycology* 8: 201-203.
98. **Yadav, M., Yadav, A., Yadav, J. P.** 2014. "In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam.", *Asian Pac J Trop Med*; 7(Suppl 1): S256-S261.



99. **Yassa, N., Masoomi, F., Rankouhi, S. E. R., Hadjiakhoondi, A.** 2009. "Chemical composition and antioxidant activity of the extract and essential oil of *Rosa damascena* from Iran, population of Guilan", *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009. 17(3):175-180.
100. **Yen, G.C., Lee, C.A.** 1996. "Antioxidant activity of extracts from molds", *Journal of Food Protection*, 4, 1327-1330.
101. **Zhang, L. Demain, A. L.** New Jersey: Humana Press Inc. Medicine.
102. **Zhang, P., Li, X. M., Wang, J. N., Li, X., Wang, B. G.** 2015. "New butenolide derivatives from the marine-derived fungus *Paecilomyces variotii* with DPPH radical scavenging activity", *Phytochemistry Letters* 11, 85– 88.

## ÖZGEÇMİŞ



## HİLAL ÇALIK

**Adres:** Köyiçi Mahallesi 8072 sokak no:18/3 Çiğli-İZMİR  
**Telefon:** 0506 910 04 74  
**E-mail :** hilalcalik89@gmail.com

### Kişisel Bilgiler

**Doğum Yeri** : Kadıköy  
**Doğum Tarihi** : 20.04.1989  
**Medeni Durum** : Bekar  
**Ehliyet** : B sınıfı (2015)  
**Eğitim Durumu** : Yüksek Lisans (Halen devam ediyor)

### Eğitim Bilgisi

**2012-** :Balık Hastalıkları ve Biyoteknoloji Laboratuvarı (Yüksek Lisans)  
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği, Yetiştiricilik Anabilim Dalı  
**2012 - 2017** : İşletme  
Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi  
**2008 - 2012** : Su Ürünleri Mühendisliği ( Lisans- 3,21 /4 )  
Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği  
**2003 - 2007** : Medine Tayfur Sökmen Lisesi( Yabancı Dil Ağırlıklı, Fen Bilimleri)

### Bilgisayar Bilgisi

- Microsoft Office Uygulamaları (İyi)
- İnternet ve Sosyal Medya Kullanımı (İyi)

## Yabancı Dil ve Sınavlar

- **KPSS (2016) : 78 (KPSSP3)**
- **ALES (2013) : 69,04593 (Sayısal)**
- **KPDS (2012) : 43,75 (İngilizce)**

## İş Deneyimi ve Stajlar

**2016**

Tümay Balıkçılık Gıda Dış Tic. San. A.Ş.  
Kalite Kontrol Sorumlusu

**2011- 2012**

Nireus & Ilknak Su Ürünleri Ltd. Şti – Stajyer

- Kuluçkahane Ünitesi
  - ✓ Yemleme, sifon yapımı,
  - ✓ Deforme balık ayıklanması
  - ✓ Balık transferi sırasında sayım ve kontrol
- Ağ-Kafes Ünitesi
  - ✓ Deformasyona uğrayan ağların onarımı
  - ✓ Kafes sistemlerinin kontrolü
  - ✓ Kafes sisteminin yemlenmesi
  - ✓ Balık hasatı
- İşleme Ünitesi
  - ✓ Hasattan getirilen balıkların boylama ve paketleme işlemleri
- Aşı Birimi
  - ✓ Hastalığa karşı önlem amaçlı kafesteki balıkların uygun şartlarda aşılınması

## Projeler ve Yapılan Çalışmalar

- Denizel Metabolitlerin Antioksidan Potansiyellerinin Araştırılması- Bursiyer (TÜBİTAK)
  - ✓ Denizel süngerlerin toplanması,
  - ✓ Farklı besi ortamları kullanılarak fungus izolasyonlarının yapılması,
  - ✓ İzole edilen fungusların katı ortamda üretim çalışmaları,
  - ✓ Fermantasyon ortamlarının özütlenmesi ve elde edilecek özütlerin ileri aşamalar için sınıflandırılması,
  - ✓ Antioksidan aktivite tarama çalışmaları,
  - ✓ Balık yağı oksidasyonunun ölçümü,
  - ✓ Seçilen fungusların filogenetik ağaçlarının çıkarılması,
- Laboratuvarda yapılan diğer çalışmalar;
  - ✓ Bakteri gram boyama,
  - ✓ Kan boyama,
  - ✓ Laboratuvar bünyesinde yapılan çalışmalarda kullanılan balık patojeni bakteri, denizel fungus ve aktinomisetlere uygun besiyerlerinin hazırlanması,
  - ✓ Bu mikroorganizmaların uygun besiyerlerine inokulasyonu ve üremesinin kontrol edilmesi,
  - ✓ Laboratuvar bünyesinde çalışılan balık patojeni bakteri, denizel fungus ve aktinomisetlerin ZYMO Research İzolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonunun yapılması, agaroz jel ile elektroforez yöntemiyle bakılması, elde edilen bu DNA'ya uygun primerler kullanılarak uygun protokolde PCR ile DNA amplifikasyonunun gerçekleştirilmesi ve saflaştırma kiti kullanılarak DNA saflaştırma işleminin gerçekleştirilip -20°C'de saklanması,
  - ✓ Otoklav, evaporatör, saf su cihazı, spektrofotometre, hassas terazi, homojenizatör, biyolojik emniyet kabini, hot plate, vorteks kullanımı, temizlik ve kontrollerinin yapılması.

## Sertifika ve Seminerler

- Akuakültürde Son Gelişmeler Çalıştayı (Katılım)(2012)
- CMAS 1\* Tüplü Dalış Eğitimi - TSSF (Türkiye Sualtı Sporları Federasyonu) (2015)
- Ev ve Süs Hayvanları Satan İşyeri Sahiplerine Yönelik Düzenlenen Eğitim Programı (2015)

## Hobiler

Dalış yapmak, Seyahat etmek, Spor yapmak.