



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE VE NORVEÇ'TE ÜRETİLEN SOMON  
BALIKLARINDAKİ ASTAKSANTİN MİKTARININ TAYİNİ**

TOLGAHAN AYDIN  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi GÜLBİN ERDOĞAN

2020-İSTANBUL

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlamasından yazımına kadar bütün çalışmalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri etik ve akademik kurallarla elde ettiğimi, bu tez çalışması sonrasında elde edilmeyen bütün bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynak listesine aldığımı, yine bu tezin çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici herhangi bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tolgahan AYDIN

İmza

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezimin danışmanlığını üstlenen ve her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr.Öğr.Üyesi Gülbin ERDOĞAN' a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım..

Güler yüzleriyle sağlıklı bir çalışma ortamı sunan Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Aldığım her kararda beni destekleyen eşim ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tolgahan AYDIN

# İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÇİZELGELER.....	vi
RESİM LİSTESİ.....	vii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. Somon Balığının Tarihçesi.....	4
4.2. Astaksantin.....	7
4.3. Astaksantin hakkında yapılan çalışmalar.....	13
4.4. UV-Visible Spektrofotometre.....	18
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
5.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri.....	24
5.2. Balık örneklerinin temin edilmesi ve saklanması.....	24
5.3. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması ve kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi.....	25
5.3.1. Astaksantin çözücü olarak asetonun kullanıldığı kalibrasyon eğrisinin oluşturulması.....	25
5.3.2. Astaksantin çözücü olarak n-hekzanın kullanıldığı kalibrasyon eğrisinin oluşturulması.....	26
5.3.3. Astaksantin çözücü olarak kloroformun kullanıldığı kalibrasyon eğrisinin oluşturulması.....	27
5.4. Analiz Yöntemi.....	28
5.4.1. Numunelerin hazırlanması ve ekstraksiyon.....	28

5.4.2. UV-VISSpektrofotometre Cihazı ile Analizin Yapılması	29
<b>6. BULGULAR</b>	<b>33</b>
<b>7. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>39</b>
<b>8. KAYNAKLAR</b>	<b>41</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>44</b>
<b>10. EK-1 Tez Çalışmasından Üretilen Kongre Bildirimi</b>	<b>46</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER

**A:** Absorbans

**UV-VIS:** Ultraviyole Visible Spektroskopisi

**GK:** Geri kazanım

**CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:** Aseton

**CHCl<sub>3</sub>:** Kloroform

**C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:** n-Hekzan

**LC-APCI-MS:** Sıvı kromatografi-atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon-kütle spektrometresi

**IgA:** Bağırsaklar içerisinde üretilen antikor türüdür

**LDL:** Kötü kolesterol

**HDL:** İyi kolesterol

**VHDL:** Yüksek yoğunluklu kolesterol

**VLDL:** Düşük yoğunluklu kolesterol

**NWL:** Doğal somon

**IECL:** Ekolojik kültürlenmiş somon balığı

**NECR:** Ekolojik kültürlü gökkuşuğu alabalığı

**NCR:** Geleneksel kültürlü gökkuşuğu alabalığında

**BSA:** Konjugat antijeni

**Gly-BSA:** Glisin konjugat antijeni

**HSI:** b-Hepatosomatik indeksi

**GSI:** Gonadosomatik indeksi

**LPO:** Lipid peroksidasyonu, yağların yükseltgenmesi sonucu bozulması

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.2.1. Astaksantin molekül formülü.....	8
Şekil 4.2.2. Çeşitli antioksidanların etkinliklerinin kıyaslanması.....	12
Şekil 4.4.1. Spektrofotometrelerin temel yapısı.....	20
Şekil 4.4.2. Geçirgenlik.....	22
Şekil 5.3.1.1. Aseton çözücüsü kalibrasyon grafiği.....	26
Şekil 5.3.2.1. Hekzan çözücüsü kalibrasyon grafiği.....	27
Şekil 5.3.3.1. Kloroform çözücüsü kalibrasyon grafiği.....	28
Şekil 5.4.1.1. Astaksantin ekstraksiyonu akış şeması.....	29
Şekil 5.3.2.1. Çözücü olarak asetonun kullanıldığı astaksantine ait kalibrasyon eğrisinin oluşturulması.....	30
Şekil 5.3.2.2. Çözücü olarak kloroformun kullanıldığı astaksantine ait kalibrasyon eğrisinin oluşturulması.....	31
Şekil 5.3.2.3. Çözücü olarak n-hekzanın kullanıldığı astaksantine ait kalibrasyon eğrisinin oluşturulması.....	32

## ÇİZELGELER

Çizelge 5.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar .....	24
Çizelge 5.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasal ve sarf malzemeleri .....	24
Çizelge 6.1. Aseton çözücüsü için deney sonuç verileri .....	33
Çizelge 6.2. Kloroform çözücüsü için deney sonuç verileri .....	34
Çizelge 6.3. n-Hekzan çözücüsü için deney sonuç verileri .....	35

## RESİMLER

Resim 4.1.1. Norveç somon balığı fotoğrafı.....	4
Resim 4.1.2. Yerli somon balığı fotoğrafı.....	4
Resim 4.4.1. UV-VIS Spektrofotometre cihazı.....	21
Resim 5.4.2.1. UV-VIS Spektrofotometre kuvvetlerinde mevcut olan kloroform ve Norveç somonu ekstraktı.....	30

# **Türkiye'de ve Norveç'te Üretilen Somon Balıklarındaki Astaksantin Miktarının Tayini**

**Öğrencinin Adı:** Tolgahan AYDIN

**Danışman:** Dr. Öğr. Üyesi Gülbin Erdoğan

**Anabilim Dalı:** Analitik Kimya Anabilim Dalı

## **1. ÖZET**

**Amaç:** Astaksantin, ticari olarak büyük önem taşıyan mikroalglerden üretilen antioksidan özelliği güçlü, bu nedenle insan sağlığı üzerinde olumlu etkiler yapan karotenoid türüdür. Karotenoidler hayvanlar tarafından sentezlenemediği için, besin aracılığı ile alınmaları gerekmektedir. Astaksantin besin takviyesi ve antioksidan olarak kullanılan kırmızımsı renkli olup, alglerde ve yosunlarda bulunan pigmenttir. Birtakım alglerde ve yosunlarda doğal olarak bulunmaktadır. Astaksantin' in birçok hastalığın tedavi ve önlenmesinde etkili olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda yeterli miktarda karotenoid alımı ile kardiyovasküler hastalıklar, katarakt, makuler dejenerasyon, bazı kanser türlerine karşı azaltıcı ve önleyici özelliği belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında somon beslenmesinde kullanılan astaksantin Türki ve ithal somon balık etlerindeki miktarlarının belirlenerek karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Piyasadan temin edilen somon balıklarından örnek alma ve hazırlama yöntemlerine göre örnekler alınarak tüplere konuldu. Üzerlerine  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  eklenerek homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 3 farklı çözücü ilavesi ile (aseton, n-hekzan ve kloroform) örnekler vortex'de 5 dakika karıştırıldı. Astaksantin çözücüye geçmesi için tüpler alüminyum folyo ile sarılarak 48 saat  $+4^\circ\text{C}$  de bekletildi. Daha sonra örnekler süzülerek, astaksantin miktarları UV-VIS spektrofotometre kullanılarak tayin edildi.

**Bulgular:** Analiz edilen Norveç Somonundaki astaksantin miktarı literatürlerde verilen değerler ile kıyaslandığında, yeterli miktarda astaksantin içerdiği belirlenmiş olup Türk Somonunda ise daha az astaksantin bulunduğu belirlenmiştir.

**Sonuç:** Sonuç olarak, somon balığının astaksantin içeriği bakımından zengin olması, beslenmede antioksidan özelliği olan astaksantin içeren somonunun tercih edilmesi, sentetik ürünlerden uzak durulması önerilmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Astaksantin, Norveç ve Türk Somonu, UV-VIS Spektrofotometre, Antioksidan.

## **Determination of the Amount of Astaxanthin Salmon produced in Turkey and Norway**

**Student:** Tolgahan AYDIN

**Supervisor:** Assist. Prof.Dr. Gülbin Erdoğan

**Department:** Analytical Chemistry Department

### **2. ABSTRACT**

**Aim:** Astaxanthin is a carotenoid type which is produced from commercially important microalgae with strong antioxidant properties and therefore positively affects human health. Since carotenoids cannot be synthesized by animals, they must be taken through food. Astaxanthin is a reddish pigment that has been widely used in salmon feeds, preserving the colors of trout, lobster, shrimp, tropical ornamental fish, coloring egg yolks, and as a nutritional supplement and antioxidant in recent years. It occurs naturally in some algae and mosses. Astaxanthin has been found to be effective in the treatment and prevention of many diseases. As a result of the studies, it has been determined that with sufficient amount of carotenoid intake, its reducing and preventive properties against cardiovascular diseases, cataracts, macular degeneration, some types of cancer. In this thesis, it was aimed to compare and compare the amount of astaxanthin used in salmon feeding in Turkish and imported salmon fish meat.

**Materials and Methods:** Samples were taken from commercially available salmon according to the sampling and preparation methods and placed in tubes. They were homogenized by adding Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After homogenization, the samples were mixed in vortex for 5 minutes with the addition of 3 different solvents (acetone, n-hexane and chloroform). Tubes were wrapped with aluminum foil and kept at + 4°C for 48 hours in order for astaxanthin to pass into the solvent. Then the samples were filtered and the amount of astaxanthin was determined using UV-Visible spectrophotometer.

**Results:** When the amount of astaxanthin in analyzed Norwegian Salmon was compared with the values given in the literature, it was determined that it contained sufficient amount of astaxanthin, and less astaxanthin was found in Turkish Salmon.

**Conclusion:** It is recommended that salmon be rich in astaxanthin, prefer salmon containing astaxanthin, which has antioxidant properties, and avoid synthetic products.

**Keywords:** Astaxanthin, Norwegian and Turkish Salmon, UV-VIS Spectrophotometer, Antioxidant.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Astaksantin ilk defa, 1942'de Richard Kuhn tarafından ıstakozdan saptanmış ve izole edilmiştir. Astaksantin bilinen en eski karotenoidlerden biridir. Astaksantin hayvan sağlığını ve canlılığını arttırdığı tespit edildiğinde, daha fazla bilimsel çalışmalar ortaya çıkmıştır. Astaksantin, karotenoidler olarak bilinen yapı sınıfına ait kırmızımsı bir pigmenttir ve besin olarak kullanılan bir karotenoid türevidir. Özellikle de bitkilerin (mikroalg ve yosunların) güneş ışığından aldıkları enerjiyi pigment haline dönüştürmeleri sonucu oluşmaktadır. Besin zinciri sonucu hayvanlara geçmektedir.

Astaksantin pigmentinin içeriği, somon balıklarının kendilerine has olan rengini (turuncu-kırmızı) sağlamaktadır (Tejera ve ark., 2008). Bu pigmentasyon, doğada yaşan hayvanların beslenmelerinde doğal olarak bulunan karotenoidlerden kaynaklanırken, kültürlenmiş balıklarda, tatmin edici taze renklenme sağlamak için (turuncu-kırmızımsı renk somon balıklarının tazeliklerini belirlemede önemli bir yer tutmaktadır) beslenme planlamalarına pigmentler eklenmelidir (Bent ve Ewen, 2001). Astaksantin doğada yetişmeyen, kültüre edilmiş balıkların beslenmesinde endüstriyel bir gıda kaynağı olarak kullanıldığı gibi birçok tıbbi çalışmada ve güçlü antioksidan etkisi sebebi ile gıda takviyesi olarak da kullanılmaktadır. Antioksidan özelliğinin C ve E vitamininden daha fazla olduğu, kansere karşı olumlu yönde etki gösterdiği belirlenmiştir (Cross ve ark., 1987).

Bu çalışmada ithal edilen somon balıklarındaki astaksantin miktarı ile Türkiye'de yetiştirilen somon balıklarının astaksantin içeriğinin kıyaslanması amaçlanmıştır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1 Somon Balığının Tarihçesi

Somon balığı ya da diğer bir tanımla som balığı ülkemiz denizlerinde doğal olarak yetişmeyen, Atlantik ve Pasifik kıyılarında soğuk ülke denizlerinde bulunan besin değeri oldukça yüksek bir balıktır. Somon tatlı sularda (akarsu ve nehirlerde) yumurtlayan ve ardından büyümek için denizlere göç eden bir balıktır.



Resim 4.1.1 Norveç Somon Balığı fotoğrafı



Resim 4.1.2 Yerli Somon Balığı fotoğrafı

Somon yüzyıllardır Avrupalıların beslenmelerinin temel bir parçası olmuştur. Bunun nedeni, Atlantik Somonunun habitatının Avrupa kıyılarının çoğunda, İspanya'nın en

güneyine yayılmasından kaynaklanmaktadır. Paleolitik zamanlardan beri bu alanlarda avlanmıştır. Bu balığın önemi, MS 1030'dan beri somon stoklarını korumaya yönelik düzenlemelerin mevcut olmasıyla anlaşılabilir. Somon popülasyonlarındaki genel düşüş ilk olarak MS 1215'te, nehirler arasındaki ağların (özellikle Thames nehri) Somonun doğal yumurtlama alanlarına dönmesini durdurduğunda fark edilmiştir. Bu, yumurtlama somonu sayısının önemli ölçüde azalmasına neden olmuştur. Sanayileşme ve modern balıkçılık teknolojisinin gelişmesiyle Somon türleri azalmaya devam etmiştir. Konserve ve buzlanma şeklinde et koruma yöntemlerinin kullanılması, somon talebini dünya çapında arttırmış ve Atlantik popülasyonlarını aşağı çekmiştir. Bu düşüş, Avrupa Atlantik Somonu stoklarının çoğunun aşırı tüketim ve çeşitli diğer faktörler nedeniyle çöktüğü 1960'lara kadar hızla azalmıştır. Atlantik Somonun daha önceleri Kuzey Amerika'daki nehirlerin %84'ünde bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu dik düşüş eğilimleri akabinde Kuzey Amerika Kıtası için değil, aynı zamanda Avrupa'da da önemli ölçüde somon popülasyonları düşmüştür.

Atlantik Somon popülasyonları 1970'lerden beri önemli ölçüde azalmıştır. Bu özellikle izinsiz avlanmanın olduğu, %50'nin üzerinde azaldığı Kuzey Atlantik (Baltık Denizi) popülasyonları için geçerlidir. Bu sebeplerle tehlikeli boyuta ulaşmasa da Atlantik somonunun genel nüfusu önemli ölçüde azalmıştır.

Pasifik somonu *Oncorhynchus* ailesindedir. Bu ailede 5'i Kuzey Amerika'da bulunan 7 somon türü vardır. Kuzey Amerika'daki Pasifik Somon balıkçılığı muhtemelen 9000 yıl önce başlamıştır. İlk balıkçılık yöntemleri normalde dip ağları kullanarak, denizden yumurtlamak için dönen somon balıklarını yakalamaktı. İlk başta somon, Kuzey Amerika yerlilerinin beslenmelerinde çok önemli değildi. Ancak zaman geçtikçe, birçok topluluk temel gıda kaynağı olarak somon balığına bağımlı hale geldi. Bazı toplulukların gıda kalıntılarının %90'ından fazlasının somondan oluştuğu ve bazı alanlarda aşırı önem taşıdığı belgelenmiştir (Lichatowich, 2001).

Somon Amerika Birleşik Devletleri'nin batı kesiminde kültür ve ekonomilerin gelişmesinde önemli bir rol oynamıştır. Somon kurutulmuş veya içilerek, yıl boyunca stabil bir protein kaynağı elde edilebilmektedir. Bu kararlı protein kaynağı gıda için kullanılmıştır. Bu ekonomilerin çeşitlendirilmesine ve kültürel gelişmeye yol açmıştır. Somon, uzun yıllardır batı kıyısında yaşayan yerli halk tarafından kapsamlı bir şekilde

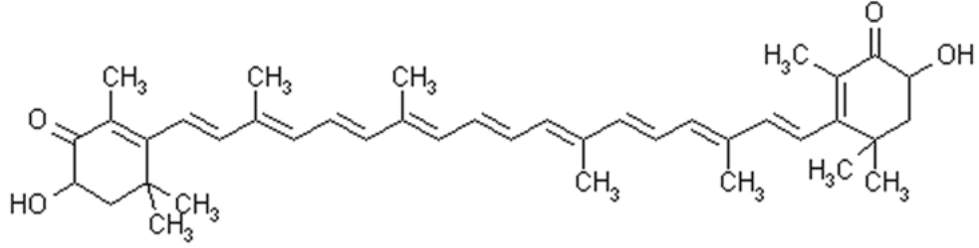
avlanmıştır, ancak sanayileşmenin ve batıya doğru göç etkisiyle balıkçılık işletmeleri çok daha hedefli ve verimli hale gelmiştir. 1860'larda konserve işletmeleri Kuzey Amerika Kıtasının batı kıyılarında üretime başlamışlardır. Bu şirketler Pasifik somonunun daha fazla sevk edilmesini ve daha fazla insan tarafından tüketilmesini sağlayarak talebi arttırmıştır. 1890'ların sonlarında, günde 20.000 kilo somon alabilen oldukça etkili balıkçılık yöntemleri bulunmuştur. Somonu kolay avlayabilmek için büyük teknelerle, okyanuslara açılan nehirlerin ağızlarına yakın yerlere geniş naylon ağlar döşeyerek balıkları bu yolla yakalayarak somon endüstrisine katkı sağlamak için uğraşmışlardır. Naylon ağlar solungaçların arkasına kayarak somonu ağa dolaştırıp kolaylıkla avlanmasını sağlamış oldu. Sürekli büyümeye dayalı bir ekonomik sistem altında açık erişimli bir balıkçılık piyasası göz önüne alındığında, bu balıkçılık teknikleri hasadı en üst düzeye çıkarmak için kullanılmıştır ve yabancı somon balığının azalışını sürdürmeye neden olmuştur. Bugün, Kuzeybatı Pasifik'teki Somon popülasyonlarının sadece %16'sının kararlı olduğu düşünülmektedir (Stefano ve ark., 2014).

Somon balığı günümüzde birçok tehditle karşı karşıyadır. Bunlardan en acil olanları genetik varyasyon kaybı ve habitat bozulmasıdır. Somon büyümek, yumurtlamak ve geri dönebilmek için el değmemiş ortamlara güvenmektedir. Okyanuslarda zaman geçirdikten sonra, doğmak için orijinal akışlarına geri dönebilmeleri zorunludur. Eğer bataklık veya habitat yıkımı nedeniyle geri dönemezlerse yumurtlamayacaklar ve gelecek nesillere katkıda bulunmadan ölmektedir. Hem Atlantik hem de Pasifik bölgelerinde yapılan barajlar bu konu özelinde büyük sorunlara neden olmuştur. Columbia nehir havzası, dünyanın en ağır baraj havzalarından biridir ve tahmini somon yaşam alanının 1/3'ü tamamen engellenmiştir. Bununla birlikte ormanlardan tomruk elde etme çabaları, iklim değişikliği ve genel yaşam alanı bozulması dünya çapındaki somon ortamlarının kalitesini büyük ölçüde azaltmıştır. Çeşitli balıkların yakalanması sırasında mevcut günlük kriterler, suyun temizliği ve sıcaklığı, rüzgar, hava sıcaklığı, tarih ve saat, yem türü somonun kalitesini belirleyen önemli parametreler olarak kayıtlara girmiştir. Ticari olarak güncel kayıtların alınması başladığından beri balık popülasyonunun negatif etkileri takip edilmiştir. 19. yüzyılın başlarından ortalarına kadar, bataklık ve güncel kayıt tutma sonucu olarak, New England bölgesindeki somon popülasyonlarının azalmasına habitat bozulmasının

önemli ölçüde etki ettiği belirlenmiştir. Doğrudan yaşam alanı bozulması tehdidinde ek olarak, iklim değişikliği doğal ortamda yetişen somonlar için de endişe vericidir. Düşük kar seviyeleri, ilkbahar ve sonbaharda yumurtlamaya geri dönen somon için suda daha düşük akışkanlıklar olup yumurtlama ve kuluçka yavruları için daha az yumurtlama habitatının mevcut olduğu anlamına gelmektedir. İklim değişikliğinin bir sonucu olarak artan su sıcaklığı da önemli bir konudur ve önemli miktarda yumurtlama bölgelerinin azalmasına neden olmaktadır. Kuzeybatı Pasifik'te, vahşi somon stoklarından daha çok kuluçkahanede yetiştirilmiş kültür somonları bulunmaktadır (Stefano ve ark., 2014). Kültür balıkları ilk olarak vahşi stokların kaybına ek olarak önlem amacıyla denizlere bırakılmışlardır. Kültür somonu, birçok farklı faktöre karşı dirençli olmalarını sağlayan somonun genetik varyasyonundan ziyade hastalık ve çevresel tehditler dahil olmak üzere, aynı zamanda vahşi balık ölüm oranını artıran sorunlarına da neden olmaktadır. Yabani balık ölümlerindeki artışlar, aynı zamanlarda salınan çok sayıda kültür balığından kaynaklanır ve bu da okyanuslara büyük bir nüfus akışına neden olmaktadır. Bu kadar yüksek stok yoğunluğuna sahip kaynaklardaki sınırlamalardan dolayı okyanus kaynaklı ölüm oranları artmaktadır (Lichatowich, 2001). Günümüzde artan ve dünya çapında oluşan somon taleplerini karşılamak adına birçok bölgede somon üretim çiftlikleri kurulmuştur. Türkiye'de başta Karadeniz bölgesi olmak üzere 1990'lı yılların başlarından itibaren somon üretimi gerçekleştiren birçok işletme bulunmaktadır. Bu işletmeler vasıtası ile somon balığı ihtiyacının bir kısmı karşılanmış olup, yurt dışından ithal edilen somon balıklarına da alternatif bir gıda temin edilmiştir.

## 4.2 Astaksantin

Astaksantin,  $C_{5}H_8$  molekülünden oluşturulan (Şekil 4.2.1 de gösterildiği gibi molekül formülü:  $C_{40}H_{52}O_4$ ) tetraterpenoidler olarak bilinen fitokimyasal sınıfına ait bir karotenoiddir. Bu karotenoidi oluşturan temel yapı taşları olarak izopentenil difosfat (veya IPP) ve dimetilalil difosfat (veya DMAPP) bulunmaktadır. Birçok karotenoid gibi, astaksantin renkli, yağda çözünen bir pigmenttir. Renk, bileşiğin merkezindeki genişletilmiş konjuge (alternatif çift ve tek) çift bağ zincirinden kaynaklanmaktadır (Dalei ve Sahoo 2015).



Şekil 4.2.1 Astaksantin molekül formülü

Kan kırmızısı gibi renge sahip bir pigment olan astaksantin, doğal bir şekilde yağmur suyunda bulunan mikroalglerde; “Xanthophyllomyces Dendrorhous” “Haematococcus Pluvialis” ve maya mantarı olarak bilinen “Phaffia” da bulunmaktadır. Astaksantin oluşumunda, sudaki tuz oranının artışı, güneş ışınlarının fazlalığı ve yetersiz beslenme gibi bir veya birden daha fazla etkenin bir araya gelerek alglerin üzerinde basınç etkisi göstermesine neden olur. Basınç içeren bu tatlı su mikroalgleri ile beslenen; kırmızı alabalık, somon, kızıl çipura, flamingo, kerevit, ayrıca karides, ıstakoz ve yengeç gibi kabuklu türlerin görünümünde turuncu-kırmızı renklerinde pigment oluşumuna neden olmaktadır. Astaksantin besin olarak kullanımı yetişkin kişilerde günlük 40 mg/gün olarak verilmiştir (<http://www.vitaminler.com>, Erişim tarihi: 19 Eylül 2019).

Karotenoidler, sadece fitoplankton, algler, bitkiler ve sınırlı sayıda mantar ve bakteri tarafından üretilen 700'den fazla doğal lipitte çözünen pigmentten oluşan bir ailedir. Karotenoidler, doğada sağladıkları çok çeşitli renklerden sorumludur, en önemlisi meyve, sebze ve yaprakların parlak sarı ve kırmızı renklerin oluşumudur. Bitkilerde ve alglerde, karotenoidler, klorofil ve diğer pigmentleriyle birlikte fotosentetik işlemde hayati bir katılımcıdır. Bazı hayvanlar karotenoidleri diğer formlara dönüştürebilirken, yine de onları diyetlerinden almalıdırlar. Pembe Flamingo, örneğin, Spirulina veya diğer algleri su kütlelerinden filtreler ve sarı karotenoidleri, beta-karoten ve zeaksantin, pembemsi-kırmızı karotenoidlere, astaksantin ve kantaksantine dönüştürür. Bu kırmızı karotenoidler daha sonra tüylerde etkisini gösterir ve kuşun çarpıcı rengini ortaya çıkarır. Karotenoidler ve özellikle astaksantin, tekli oksijen ve serbest radikaller olarak bilinen kimyasal olarak reaktif oksijen türleriyle etkileşime

girme kapasiteleri ile ayırt edilebilmektedir. İlginç bir şekilde, karotenoidlerin güçlü antioksidan özelliklerinin hayvanlar üzerinde faydaları çok fazladır. Bilinen bir örnek, diyetlerinden astaksantin biriktirerek ve lipit dokularını zararlı bir oksidasyon olan peroksidasyondan korumak için astaksantini ete bırakan soğuk su balıklarında görülmektedir. Bu da somon ve alabalık etinde sağlıklı pembemsi-kırmızı parlak bir renk olarak ortaya çıkarmaktadır. Bilimsel literatürler, astaksantin, beta-karoten, zeaksantin, kantaksantin, C vitamini ve E vitamininin antioksidan faydalarını aştığına dair önemli kanıtlar ortaya koymaktadır. Yaşa bağlı makula dejenerasyonunu iyileştirir, kimyasal kaynaklı kanserlere karşı korur, yüksek yoğunluklu lipoproteinleri artırır ve bağışıklık sistemini güçlendirir (Cross ve ark., 1987).

İnsan vücudunda her hücresine oksijen bakımından zengin kan vermek ve düzenlemek için gelişmiş arter, damar ve kılcal sistemler mevcuttur. Oksijen molekülü, hücelere ciddi zorluklar yaratan diğer formlara da dönüşebilmektedir. Tekli oksijen, süperoksit, peroksil ve hidroksil radikalleri gibi zararlı reaktif oksijen türleri genellikle fotooksidasyon, fizyolojik stres ve normal bağışıklık sistemi fonksiyonlarının bir sonucu olarak oluşmaktadır. Örneğin tekli oksijen, normal biyolojik reaksiyonlar sonucu oluşan aktif bir oksijen şeklidir. Oldukça reaktiftir ve nispeten uzun ömürlüdür ve oksijenin temel durumuna dönmek için aldığı fazla enerjiyi başka bir moleküle aktarmalıdır. Astaksantin, tekli oksijenden fazla enerjiyi emme, onu ısı olarak serbest bırakma ve oksijeni ve kendisini 2 yer durumuna geri döndürme eğilimi özellikle yüksektir. Tekli oksijenin bu nötralizasyonu 'söndürme' olarak bilinmektedir (Ji, 1995).

Serbest radikaller, kararlı bir moleküler yapıyı yerine getirmek için gerekli olan eşlenmemiş veya eksik elektronları olan yüksek derecede reaktif ve kararsız moleküllerden oluşan başka bir ailedir. Bu onları yetersiz elektronlarını elde etmek için diğer hayati hücrel moleküllerden elektronları almaya itmektedir. Bu, serbest radikalleri stabilize eder ve daha fazla elektron arayan serbest radikal haline dönüştürmektedir. Bu elektron alma olayları çoğu zaman en kritik hücrel bileşenleri içerir ve protein bozulması, oksitlenmiş lipitler ve DNA hasarı gibi hücrel yaralanmalara yol açabilmektedir. Ne yazık ki serbest radikaller, hücre zarlarının temel bileşeni olan elektronca zengin doymamış yağ asitlerine saldırmak için aşırı bir afiniteye sahiptir. Bu peroksidize yağ asitleri daha sonra bir antioksidan veya başka

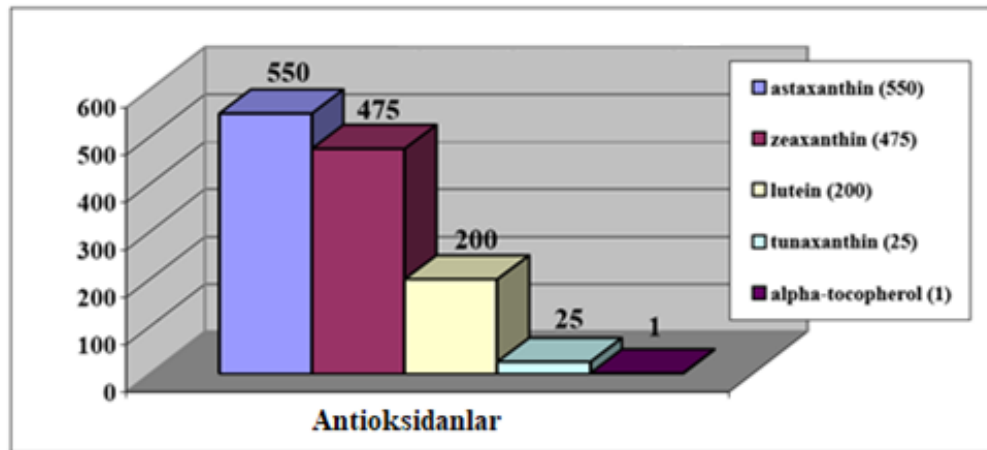
bir uyumlu molekül "düşen domino" etkisini kesene ve durdurana kadar zincir reaksiyonunda daha fazla yağ asidi radikali oluşturmaktadır. Bazı teoriler, üzgün bir oksidatif dengenin romatoid artrit, kalp hastalığı, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, kanser ve inme gibi durumlarda katkıda bulunan bir faktör olabileceğini ortaya koymaktadır. Normalde, serbest radikaller dengesi ve bunlara karşı koymak için süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz enzimleri gibi bir antioksidan cephanemiz bulunmaktadır. Bununla birlikte zayıf beslenme, stres, hava kirliliği, sigara içme, ultraviyole ışık veya hastalık gibi bir dizi koşul bu dengeyi bozabilmektedir. Zorlu fiziksel egzersiz bile oksidatif strese ve hücrelere serbest radikal hasarına neden olan reaktif oksijen ve azot türlerinde bir artışa yol açabilmektedir. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler, dokuların egzersiz sırasında aşırı oksidatif hasardan korunmasında hayati bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, antioksidan sistemlerin tükenmesi, dokuların savunmasının aşırı reaktif oksijen türleri tarafından boğulduğu ve daha sonra hasara karşı savunmasız olduğu bir duruma neden olabilmektedir. Yorucu egzersiz sırasında oluşan reaktif oksijen ve azot türleri, iskelet kası hasarı, iltihaplanma ve lipit peroksidasyonunun araçları olabilir ve ayrıca yorucu egzersiz sonrası hücrelerdeki kalsiyum homeostazının kaybına katkıda bulunan bir faktör olabilmektedir. Oksidatif egzersiz stresi tarafından üretilen serbest radikallerin de bağışıklık fonksiyonunu bozduğu ve enflamatuvar bir yanıtı yol açtığı gösterilmiştir. Bağışıklık sisteminin birçok bileşeni, uzun süreli, yoğun efordan sonra olumsuz değişiklik göstermektedir. Bağışıklık ölçüsüne bağlı olarak, zayıflamış bir bağışıklık süresi 3 ile 72 saat sürebilmektedir. Aşırı egzersizin bir sonucu olarak uzun süreli stres, salgı-IgA'nın doğal öldürücü hücre sitotoksitesisi gibi bağışıklık sistemi fonksiyonunun bazı yönlerinde azalmaya yol açabilmektedir. Araştırmacılar, egzersiz sırasında oluşan oksidatif maddelere karşı koymak için diyet antioksidanlarının kullanılmasını önermektedir. Yapılan çalışmalar, karotenoidler ve E ve C vitaminleri gibi antioksidan vitaminlerle diyet takviyesinin, egzersiz sonrası lipit peroksidasyonu üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Sıçan mitokondrisinde lipit peroksidasyonunu önlemede astaksantin E vitaminden 100-500 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Ateroskleroz, kan damarlarında yağ asidi ve kolesterol plaklarının birikmesinden gelişir ve kan damarlarının daralmasına ve sertleşmesine yol açmaktadır. Sonuçta bu hastalık koroner kalp hastalığı, kalp krizi veya felce yol

açmaktadır. Yağ asitleri ve kolesterolün lipoprotein taşıyıcıları genellikle LDL (kötü kolesterol), HDL (iyi kolesterol), VHDL ve VLDL olarak sınıflandırmaktadır. LDL lipoproteinlerin (kötü kolesterol) oksidasyonu, gelişiminde temel bir faktör olarak gösterilmiştir. Bununla birlikte, klinik kanıtlar diyet karotenoidlerinin LDL oksidasyonunu azaltabildiğini ve bu nedenle bu tip kardiyovasküler hastalıklara karşı savunmaya yardımcı olabileceğini göstermektedir. Astaksantin, HDL'de biraz daha düşük bir konsantrasyona sahip, esas olarak kan plazması LDL ve VLDL lipoproteinlerinde biriktiği ve böylece oksidasyona karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Østerlie ve ark., 1999).

Karotenoidlerin antioksidan potansiyelinin, vücudun sağlıklı bir halini korumasına yardımcı olmak için serbest radikalleri ve oksidatif yükü önemli ölçüde azaltabileceği görülmüştür. Karotenoidler ve özellikle astaksantin, 1) tekli oksijeni söndürmek ve enerjiyi ısı olarak dağıtmak ve 2) zincir reaksiyonlarını önlemek ve sonlandırmak için serbest radikalleri atmak suretiyle hücreleri oksidasyona karşı korumaktadır. Özel moleküler yapısı nedeniyle, astaksantin son derece güçlü bir antioksidan görevi görür. Tekli oksijene karşı çok etkili bir söndürme etkisine sahiptir, lipit ve serbest radikaller için güçlü bir temizleme kabiliyetine sahiptir ve peroksit zincir reaksiyonlarını etkili bir şekilde kırmaktadır (Kurashige ve ark., 1990).

Araştırmacılar, karotenoidlerin antioksidan kapasitesini ölçmek için çeşitli yöntemler geliştirdiler. Bu tahlillerin bazıları test tüplerinde (*in vitro*) daha iyi kontrol koşullarına veya hücrelerin kendilerine (*in vivo*) yapılır. Tipik olarak, serbest radikaller veya peroksitler üreten bir kimyasal, kolayca oksitlenebilen bir yağ asidi gibi bir substrat ile karıştırılmaktadır. Reaksiyon hızı belirlendiğinde, yağ asidinin peroksidasyon hızını nasıl söndürdüğünü veya yavaşlattığını belirlemek için karotenoidler veya diğer antioksidanlar ilave edilebilmektedir (Haila ve ark., 1997). Astaksantin güçlü radikal süpürücü ve tekli oksijen söndürme özelliklerini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Astaksantin serbest radikalleri nötralize etmede beta-karoten' den önemli ölçüde daha etkili olduğu ve doymamış yağ asidi metil esterlerinin kantaksantin, beta-karoten veya zeaksantin' den daha iyi peroksidasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. Aslında, Astaksantin antioksidan aktivitelerinin, zeaksantin, lutein, cantaksantin ve beta-karoten gibi diğer karotenoidlerden yaklaşık 10 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Astaksantin diğer karotenoidlere kıyasla üstün singlet

oksijen söndürme yeteneğini ifade etmek için bir kemilüminesan teknik kullanılmıştır. Ayrıca, Astaksantin etkinliğinin ve gücünün, normal olarak *in vitro* koşullarla kullanılan daha yüksek oksijen konsantrasyonlarının aksine, dokularda bulunan düşük oksijen konsantrasyonlarında daha iyi ifade edildiği sonucuna vardı. Araştırmacılar farklı test sistemleri kullansa da astaksantin, zeaksantin, lutein, beta-karoten ve kantaksantin gibi diğer karotenoidlerin antioksidan aktivitesini aştığı gösterilmiştir. Şekil 4.2.2’de gösterildiği gibi, astaksantin, E vitamini olarak da bilinen alfatokoferolden 500 kat daha fazla bir tekli oksijen söndürme aktivitesine sahiptir. E Vitamini (tokoferol), vücut için lipitte çözünen bir başka antioksidandır. İlginç bir şekilde, E vitamini eksikliği olan sıçanlarda, Astaksantin eksikliğin geri kazanılmasına ve lipit peroksidasyonunun neden olduğu hasara karşı korumaya yardımcı olabilmektedir. Sıçan mitokondrilerinin homojenatını kullanarak, astaksantin, lipit peroksidasyonunu inhibe etmek için E vitaminden 100 kat daha büyük bir aktiviteye sahiptir. Başka hiçbir bileşik bu kadar güçlü bir aktivite göstermedi. Yazarlar, hücrel lipidlerin *in vivo* peroksidasyona karşı korunmasında “süper E vitamini” olarak astaksantin rolünü önermektedirler (Kurashige ve ark., 1990).



Şekil 4.2.2 Çeşitli Antioksidanların etkinliklerinin kıyaslanması (Kurashige ve ark., 1990).

Hücre kültürü çalışmalarında, benzer sonuçlar Astaksantin bir antioksidan olarak peroksil radikallerine karşı etkinliğini göstermektedir. Membran fosfolipidlerinin peroksidasyondan korunmasında astaksantin beta-karoten, zeaksantin veya kantaksantinden daha etkili olduğu gösterilmiştir. Başka bir raporda, tavuk embriyo fibroblastlarının (CEF) birincil kültürleri, herbisit, parakuat, radikal üretici olarak

maruz bırakılarak oksidatif olarak vurgulanırken, antioksidan etkiyi belirlemek için çeşitli astaksantin seviyeleri ilave edilmiştir. Antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidazın aktiviteleri, oksidatif stres endeksleri olarak ölçülmüştür. Astaksantin olmadan, paraquat SOD ve katalazın aktivitelerini iki kattan fazla arttırmış ve glutatyon peroksidaz aktivitesini %50'den fazla azalttı ve yüksek oksidatif stres göstermiştir. Test edilen tüm astaksantin seviyelerinde paraquat ile indüklenen oksidatif strese karşı koruma gözlemlendi ve bu modelde beta-karoten veya E vitaminden önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Lawlor ve O' Brien., 1995). Diğer çalışmalar, astaksantin radikalle başlatılan lipid peroksidasyonuna uğrayan sıçan karaciğer mikrozomlarına beta-karoten veya E vitamininden daha fazla koruma sağladığını göstermektedir.

#### **4.3. Astaksantin hakkında yapılan çalışmalar**

Dhankhar ve ark., 2017, tarafından yapılan çalışmada astaksantin en önemli aktiviteleri ile ilgili mevcut literatür gözden geçirilip, karotenoidlerin kimyasal yapısı, astaksantin farklı kimyasal formları, astaksantin bioyararlılığı ve güvenliği, astaksantin sağlık açısından faydaları (antioksidan özellikler ve oksidatif stres, bir fotoğraf koruyucu olarak astaksantin, astaksantin ve göz sağlığı, astaksantin ve antidiyabetik aktivite, astaksantin ve cilt sağlığı, astaksantin ve iltihap, astaksantin ve hücre sağlığı astaksantin anti-kanser özellikleri, detoksifikasyon ve karaciğer fonksiyonunda astaksantin, astaksantin ve nörodejeneratif hastalıklar) ile ilgili detaylı bir bilgi sunulmuştur. Çalışma sonucunda astaksantin faydaları vurgulanmış olup astaksantin içeren kabuklu deniz canlıları ve somon balıklarının tüketilmesi ya da gıda takviyesi olarak kullanılması önerilmiştir.

Tejera ve ark., 2008, tarafından yapılan çalışmada astaksantin Pagrus balığının (Sparidae ailesine bağlı bir balık türüdür.) rengine etkisi araştırılmıştır. Kıyaslama ve maliyet analizi yapabilmek adına, 2 farklı astaksantin içeren yem kullanılarak 3 kez 6 diyet tedavisi ile beslenen balıkların renkleri gözlemlenmiş ve HPLC cihazı ile analiz edilmiştir. Kullanılan yem çeşitleri sırasıyla; karidesten elde edilen (yaklaşık astaksantin içeriği: 33 mg/kg), yeşil alglerden (*Haematococcus pluvialis*) elde edilen

(yaklaşık astaksantin içeriği: 25-50 mg/kg) yemlerdir. HPLC analizi, astaksantin diesterlerinin pembe balıkların derisindeki ana karotenoidler olduğunu göstermiştir. Maliyeti düşürmek adına daha düşük astaksantin içeren yemler kullanılmış olup sonucunda renk değişimi olsa da istenilen rengin elde edilmediği gözlemlenmiştir.

Nakano ve ark., 1999, tarafından Astaksantin bakımından zengin kırmızı mayanın (*Phaffia rhodozyma*) gökkuşağı alabalıklarında oksidatif stres üzerine etkisi araştırılmıştır. Astarsantin bakımından zengin olan kırmızı mayasının antioksidan biyolojik etkisi, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde incelenmiştir. Özellikle kırmızı mayayı besleyen balığın serum trigliserit düzeyi kontrolünki kadar düşük olduğu görülmüştür. Kırmızı maya ile beslenen balıklar ile kontrol arasında kas LPO düzeylerinde anlamlı bir fark olmadığı da gözlenmiştir. Mevcut sonuçlar, ilk kez diyet kırmızı mayasının LPO doku oluşumunu etkili bir şekilde baskıladığını ve alabalık kas pigmentasyonunu geliştirmenin yanı sıra karaciğer fonksiyonunu normalleştirdiğini göstermektedir. Bu nedenle, kırmızı maya, balıklarda okside olmuş yağ kaynaklı oksidatif stres üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Tolasa ve ark., 2005, tarafından gerçekleştirilen çalışmada, toplam karotenoid (astaksantin, kantaksantin) içeriği, geleneksel olarak kültürlenmiş somonda (ICL, N1CL, N2CL), doğal somonda (NWL), ekolojik kültürlenmiş somonda (IECL), ekolojik kültürlü gökkuşağı alabalığında (NECR) (*Oncorhynchus mykiss*), geleneksel kültürlü gökkuşağı alabalığında (NCR) (*O. mykiss*) incelenmiştir. Nicel ve nitel karotenoid tayini sırasıyla spektrofotometrik yöntem ve ince tabaka kromatografi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pigmentasyon için astaksantin en önemli karotenoid olarak belirlenmiştir. Geleneksel kültürlü somondaki karotenoid konsantrasyonu, doğal somon ve ekolojik kültürlü somondaki karotenoid konsantrasyonundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. En düşük karotenoid konsantrasyonu ekolojik kültürlü gökkuşağı alabalığında (*O. mykiss*) belirlenmiştir.

Lu ve ark., 2010, tarafından astaksantin ve karotenoid öncüllerinin kırmızı mayadan (*Phaffia rhodozyma* ya da *Xanthophyllomyces dendrorhous*) yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analizi çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada, Maya Mantarındaki astaksantin ve karotenoid öncüllerinin eşzamanlı analizi için bir HPLC yöntemi kullanılmıştır. Astaksantin, 480 nm 'de tespit edilerek ölçülmüş olup karotenoid öncülleri LC-APCI-MS ve UV-VIS absorpsiyon spektrumları ile tanımlanmıştır.

Régnier ve ark., 2015, tarafından yapılan çalışmada, bir mikroalg'den (*Haematococcus pluvialis*) elde edilen astaksantin antioksidan aktivitesini sentetik astaksantin ile karşılaştırmışlardır. Doğal ekstraktlar çözücü veya süperkritik ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilmiştir. Her iki doğal ekstraktın UV, HPLC-DAD ve (HPLC- (atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon ((APCI) + iyon tuzağı-MS) cihazları kullanılmıştır. Bu doğal ekstraktların karakterizasyonları, benzer karotenoid bileşimleri fakat serbest astaksantin ve ester türevlerinde farklı yüzdelerde olduğu bulunmuştur. Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) tayininde, ester içeren doğal ekstraktların serbest astaksantinden daha güçlü antioksidan aktiviteler sergilediğini göstermiştir. Doğal ekstraktlardaki hücre içi antioksidan aktivite sentetik astaksantinden (5 µM) yaklaşık 90 kat daha yüksektir. Çalışma sonucunda, toksisite olmadan kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi veya tedavisinde kullanılması önerilmiştir.

Moretti ve ark., 2006, tarafından gerçekleştirilen çalışma, gökkuşuğu alabalığı pigmentasyonu için kullanılan sentetik ve doğal kaynaklardan astaksantin optik izomerlerinin oranlarını araştırmak için yapılmıştır. Kırmızı maya (*Phaffia rhodozyma*), yosun (*Haematococcus pluvialis*), Antarktika krili unu, krill yağı ve karides unu gibi farklı bileşenler analiz edilmiştir. Daha sonra, farklı karotenoid kaynakları ile beslenen balık etlerindeki astaksantin izomer oranlarını araştırmak amacıyla, 60 gün boyunca 60 mg.kg<sup>-1</sup> astaksantin sentetik kaynaktan, yosun ve kırmızı maya içeren diyetler ile beslenmiştir. Kuzey İtalya'nın farklı su ürünleri yetiştiriciliğinde yetiştirilen farklı pigmentli gökkuşuğu alabalığı örnekleri de yerel perakendecilerden satın alınıp analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda görülmüştür ki sentetik astaksantin ile beslenen balıklara nazaran kırmızı maya ve yosundan imal edilen yemlerle beslenen balıklardaki astaksantin varlığı 4-5 kat fazla olmaktadır.

Dong ve ark., 2014, tarafından astaksantin Yeşil Alg 'den (*Haematococcus pluvialis*) çıkarılmak için dört farklı yöntem çalışması yapılmıştır. Sırasıyla HCl-ACE ekstraksiyonu ve HCl-ACE yöntemiyle astaksantin ekstraksiyonu, HEX-IPA ikili çözücüler ekstraksiyonu ve EX-IPA ikili çözücüler çıkarma yöntemi (10 mg örnek, 2 mg hekzan/izopropanol (6/4 v/v) ikili organik çözücülere 20 dakika boyunca buzlu su banyosunda ultrasonik olarak ekstrakte edildi) astaksantin ekstraksiyonu, MET-ACE 2 Adımlı Ekstraksiyon ve (bu prosedürde, on miligram örnek 15 mL'lik cam şişeye tartıldı ve sırayla 5 dakika boyunca 1 mL metanol ve aseton ile buzlu su banyosunda ultrasonik olarak ekstrakte edildi) astaksantin ekstraksiyonu, MET-ACE 2 Adımlı Ekstraksiyon ve (bu prosedürde, on miligram örnek 15 mL'lik bir cam şişeye tartıldı ve sırayla 5 dakika boyunca 1 mL metanol ve aseton ile buzlu su banyosunda ultrasonik olarak ekstrakte edildi) astaksantin ekstraksiyonu yöntemleri kullanılmıştır. Dört farklı metodun uygulanması sonucunda en verimli metodun HCl-ACE yöntemiyle astaksantin ekstraksiyonu metodu olduğu belirlenmiştir.

Bjerkeng ve ark., 1992, tarafından gerçekleştirilen çalışmada balıkların başlangıç evrelerinden cinsel olgunlaşma evrelerine kadarki zaman zarfında astaksantin ile beslenme sonucundaki renk ve Astaksantin miktarlarının tayini çalışmaları yapılmıştır. Gökkuşığı alabalığına 100 mg astaksantin ve kantaksantin /kg içeriğe sahip diyetler verilmiştir. Karotenoidler ile beslenen olgunlaşmamış alabalıkların etindeki karotenoid konsantrasyonu, 20 mg/kg nihai seviyesine ulaşmıştır. Olgunlaşmamış alabalıklarda karotenoid ile besleme yöntemi sonucunda derisindeki karotenoid konsantrasyonu ilk 49 hafta boyunca artmış ve daha sonra azalmıştır. Astaksantin ile beslenen alabalık derisindeki karotenoid konsantrasyonu, kantaksantin ile beslenen balıklardan daha yüksek olma eğilimindeyken, karaciğer için tersi bulunmuştur. Cinsel olarak olgunlaşmış dişi ve erkeklerin toplam karotenoid içeriği, olgunlaşmamış balıklardakinin sırasıyla %73-79'u ve %18-19 olarak görülmüştür. Dişi balıklardaki karotenoid içeriği cinsel olgunlaşma ile orta derecede artmıştır ve erkeklerin derisindeki karotenoid içeriği güçlü bir şekilde artmıştır.

Dissing ve ark., 2011, tarafından somonlarda astaksantin konsantrasyonunun belirlenmesinde multispektral görüntüleme çalışması yapılmıştır. Deney için 2 yaşına kadar astaksantin içeren yem ile beslenmiş balıklar fileto haline getirilerek orta kısımlardan alınan numuneler multispektral görüntüleme cihazında analize tabi tutulmuştur. Görüntü yakalamadan hemen sonra her numune kıyılmış ve daha sonra da dondurulmuştur. 14 günlük depolamadan sonra astaksantin konsantrasyonlarını belirlemek amacı ile klorofrm ile ekstrakte edilip HPLC de analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar multispektral metot ile edilen görüntülemeyle uyumuştur.

Nur ve ark., 2019, tarafından astaksantin antioksidan aktivitesinin, lipid peroksidasyonuna karşı E vitamininden 100 kat daha fazla olduğu ve tekli oksijen söndürmede E vitamininden yaklaşık 550 kat daha güçlü olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, UV-VIS spektroskopisi kullanılarak glikasyona tabi tutulmuş BSA'dan UV absorbansını azaltmak için en iyi astaksantin konsantrasyonunu bulmaktır. Astaksantin, farklı konsantrasyonlarda ( $1 \times 10^{-9}$  –  $1 \times 10^{-10}$  mol/L) metanol ile çözülüp ardından BSA glikozatlı 100 mM ve 500 mM'ye eklendi ve ardından UV-VIS spektroskopisi ile gözlemlendi. 284 nm dalga boylarındaki UV-VIS spektroskopi gözlemlerinden, astaksantin konsantrasyonu için en iyi sonuçlar  $0.2 \times 10^{-9}$  ve  $1 \times 10^{-10}$  mol/L olduğu belirlenmiştir.

Tizkar ve ark., 2016, tarafından gerçekleştirilen bu çalışma, Japon balığının (*Carassius auratus*) hepatosomatik indeksi (HSI) ve gonadosomatik indeksi (GSI) üzerinde iki kaynak karotenoidin etkilerini araştırmıştır. Bu deney için, 50, 100 ve 150 mg karotenoid  $\text{kg}^{-1}$  içeren diyetler ile sentetik astaksantin ve  $\beta$ -karoten konsantrasyonları, temel bir sazan diyetine ilave edilirken, bir grup balık, bir kontrol diyeti ile beslenmiştir (karotenoid eklenmemiş). Hepatosomatik (HSI) ve gonadosomatik (GSI) indeksleri, dişi Japon balığı anaçlarının yumurtalıklarında ve karaciğerlerindeki toplam karotenoid seviyeleriyle birlikte aylık olarak incelenmiştir. Hem karaciğer hem de yumurtalık dokularındaki toplam karotenoidler ile GSI arasında deneyin 90 ve 120. günlerinden sonra anlamlı bir pozitif korelasyon gözlemlendi.

HSI, karotenoidle zenginleştirilmiş diyetlerden etkilenmemiştir. Bununla birlikte, karotenoidle zenginleştirilmiş diyetler, gonadlarda daha fazla karotenoid birikmesine neden oldu.  $\beta$ -karotenle zenginleştirilmiş diyetler (B150), 90 gün sonra karaciğerde daha fazla karotenoid birikimine yol açtı. Son olarak, daha yüksek seviyelerde astaksantin içeren diyetlerin ve  $\beta$ -karoten, Japon balığı anaçlarında GSI'yi iyileştirdiği belirlenmiştir.

#### **4.4 UV-VIS Spektrofotometre**

Spektrofotometre, bir ışık demeti numune çözeltisinden geçerken ışığın yoğunluğunu ölçerek kimyasal bir maddenin ışığı ne kadar emdiğini ölçen bir yöntemdir. Temel ilke, her bileşiğin ışığı belirli bir dalga boyu aralığında emmesi veya iletmesidir. Bu ölçüm aynı zamanda bilinen bir kimyasal maddenin miktarını ölçmek için de kullanılabilir.

Spektrofotometre kimya, fizik, biyokimya, malzeme ve kimya mühendisliği ve klinik uygulamalar gibi çeşitli alanlarda kantitatif analizin en kullanışlı yöntemlerinden biridir.

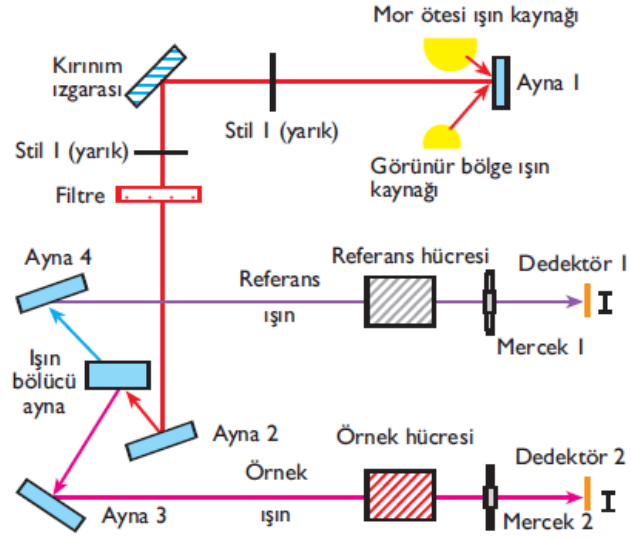
Her kimyasal bileşik, ışığı (elektromanyetik radyasyon) belirli bir dalga boyu aralığında emer iletir veya yansıtır. Spektrofotometre, bir kimyasal maddenin ne kadar emdiğini veya iletmediğini bir ölçümdür. Spektrofotometre çeşitli alanlarda (örn. Kimya, fizik, biyoloji, biyokimya, malzeme ve kimya mühendisliği, klinik uygulamalar, endüstriyel uygulamalar, vb.) kantitatif analiz için yaygın olarak kullanılır. Kimyasal maddeler veya malzemelerle ilgili herhangi bir uygulama bu tekniği kullanabilir. Örneğin biyokimyada, enzimle katalize edilen reaksiyonları belirlemek için kullanılır. Klinik uygulamalarda, klinik tanı için kan veya dokuları incelemek için kullanılmaktadır (Werner ve Deniz, 2017). Atomik absorpsiyon spektrofotometresi ve atomik emisyon spektrofotometresi gibi spektrofotometrenin çeşitli varyasyonları da vardır.

Spektrofotometre, numune çözeltilisinden geçtikten sonra emilen fotonların (ışık yoğunluğu) miktarını ölçen bir araçtır. Spektrofotometre ile bilinen bir kimyasal maddenin miktarı (konsantrasyonlar) tespit edilen ışığın yoğunluğu ölçülerek de belirlenebilir. Işık kaynağının dalga boyu aralığına bağlı olarak, iki farklı tipte sınıflandırılabilir:

- **UV-görülebilir spektrofotometre:** ultraviyole aralığı (185-400 nm) ve görünür aralığı (400-700 nm) elektromanyetik radyasyon spektrumu üzerinde ışık kullanır.
- **IR spektrofotometre:** elektromanyetik radyasyon spektrumunun kızılötesi aralığında (700-15000 nm) ışık kullanır.

Görünür spektrofotometrede, belirli bir maddenin emilimi veya iletimi gözlenen renkle belirlenebilir. Örneğin, tüm görünür aralıklardaki ışığı emen bir çözelti örneği (yani, görünür dalga boylarının hiçbirini iletmez) teoride siyah görünür. Öte yandan, tüm görünür dalga boyları iletilirse (yani hiçbir şey emmezse), çözelti örneği beyaz görünür. Bir çözelti örneği kırmızı ışığı (~ 700 nm) emerse, yeşil görünür, çünkü yeşil, kırmızının tamamlayıcı rengidir. Görünür spektrofotometreler, pratikte, belirli ışık huzmesini (diğer dalga boylarını filtrelemek için) daraltmak için bir prizma kullanır, böylece belirli ışık demeti bir çözelti örneğinden geçirilmektedir (<https://www.chem.libretexts.org>, Erişim tarihi: 2 Ocak 2020).

Şekil 4.4.1’de, spektrofotometrelerin temel yapısı gösterilmektedir. Bir ışık kaynağı, bir kolimatör, bir monokromatör, bir dalga boyu seçici, numune çözeltisi için bir küvet, bir fotoelektrik dedektör ve bir dijital ekran veya bir sayaçtan oluşmaktadır. Ayrıntılı mekanizma aşağıda açıklanmaktadır.



Şekil 4.4.1 Spektrofotometrelerin temel yapısı

Bir spektrofotometre, genel olarak, iki cihazdan oluşur; bir spektrometre ve bir fotometre. Spektrometre ışığı üreten, tipik olarak dağıtan ve ölçen bir cihazdır. Bir fotometre ışığın yoğunluğunu ölçen fotoelektrik dedektörü gösterir.

Spektrometre: Madde renginin yoğunluğunun ölçülmesiyle madde miktarının veya konsantrasyonunun bulunmasını sağlayan cihazlardır.

Fotometre: İstenen dalga boyu aralığında fotonlar, kuvvet içindeki bir numunenin çözeltisinden geçtikten sonra, fotometre emilen foton miktarını tespit eder ve daha sonra bir galvanometreye veya dijital ekrana bir sinyal gönderir.



Resim 4.4.1 UV-VIS Spektrofotometre cihazı

Farklı dalga boyları üretmek için bir spektrometreye (ışık cihazdaki monokromatör sayesinde istenilen dalga boyların ayrılır) ihtiyacımız vardır çünkü farklı bileşikler farklı dalga boylarında en iyi emilir. Resim 4.4.1’de UV-VIS Spektrofotometre cihazı örneği gösterilmiştir. Örneğin, p-nitrofenol (asit formu), yaklaşık 320 nm’de maksimum absorbansa sahiptir ve p-nitrofenolat (temel form), 400 nm ’de emer.

Absorbans ve dalga boyunu ölçen grafiğe bakıldığında izobestik bir nokta da görülebilir. İzobestik bir nokta, iki veya daha fazla türün absorbansının aynı olduğu dalga boyudur.

Şekil 4.4.1 'e bakıldığında, küvetten ve dedektöre geçen fotonların miktarı küvetin uzunluğuna ve numunenin konsantrasyonuna bağlıdır.

Küvetten geçirilip ışığın yoğunluğu öğrenildikten sonra, Geçirgenlik (T) ile ilişkilendirebilir. Geçirgenlik, numuneden geçen ışığın fraksiyonudur. Bu denklem kullanılarak hesaplanabilir:

$$\text{Geçirgenlik (T)} = I_t/I_0$$

$I_0$  ışık demeti küvetten geçtikten sonraki ışık yoğunluğunu ifade eder.  $I_0$  ise ışık demeti küvetten geçmeden önceki ışık yoğunluğudur. Geçirgenlik, ışığın emilimi ile ilgilidir:

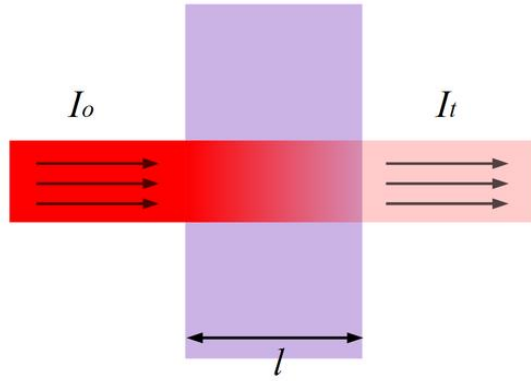
$$\text{Absorbans (A)} = -\log(T) = -\log(I_t/I_0)$$

Absorbans emilen foton miktarını ifade eder. Yukarıdaki denklemden bulunabilen absorbans miktarı ile, Lambert-Beer Yasası'nı kullanarak numunenin bilinmeyen konsantrasyonunu belirlenebilmektedir.

### Lambert-Beer Kanunu

Lambert- Beer Yasası (Beer Yasası olarak da bilinir), bir numunenin absorbansı ve konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki olduğunu belirtir. Bu nedenle, Beer Yasası yalnızca doğrusal bir ilişki olduğunda uygulanabilir. Şekil 4.4.2'de bir örnek içinden ışığın geçirgenliğini gösterir.

I Uzunluk aşağıda açıklanan Lambert-Beer Yasası için kullanılır.



Şekil 4.4.2 Geçirgenlik

Beer Kanununa göre:

$$T = I/I_0$$

$$A = -\log T = \log I_0 / I = \log 100 / \%T$$

$$A = \log 100 - \log \%T$$

$$A = 2 - \log \%T$$

$$A = \log(I_0/I) \rightarrow A = \epsilon lc \text{ şeklinde ifade edilir}$$

- A absorbans ölçüsüdür (birim yok),
- $\epsilon$  molar sönme katsayısı veya molar emicilik (veya emilim katsayısı),
- l numune uzunluğu ve
- c konsantrasyon.

Molar sönme katsayısı ( $\epsilon$ ) sabit olarak verilir ve her molekül için değişir. Absorbans herhangi bir birim taşımaz. Uzunluk ve konsantrasyon birimleri ( $L - cm^{-1}$ ) birbirlerini götürerek hesaplanan konsantrasyonun birimi mol cinsinden olur. Yol uzunluğu santimetre cinsinden ölçülür ve standart bir spektrometre 1 cm genişliğinde bir küvet kullandığından, uzunluğun (l) daima 1 cm olduğu varsayılır. Molar sönme katsayısı ( $\epsilon$ ) sabit olduğundan absorbans ölçüldüğünde söz konusu denklem vasıtası ile konsantrasyon (c) hesaplanabilmektedir (<https://www.chem.libretexts.org>, Erişim tarihi: 2 Ocak 2020).

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

### 5.1 Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri

Çizelge 5.1.1 Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka
Elektronik terazi	Scaltec SBA 31
UV-VIS Spektrofotometre Cihazı	Shimadzu
Mixer & Vorteks	
Su Sistemi	Millipore, Milli-Q Rg, ABD
Çeşitli boyda pipetler, balon jojeler, tüpler	
Santrifüj Cihazı	

Çizelge 5.1.2 Çalışmada kullanılan kimyasal ve sarf malzemeleri

Cihaz	Marka
Kloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Merck
Sodyum Sülfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck
Aseton (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O)	Merck
n-Hekzan (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> )	Merck
Süzgeç Kağıdı	
Astaksantin (C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub> )	AstaReal Oil L10

### 5.2. Balık örneklerinin temin edilmesi ve saklanması

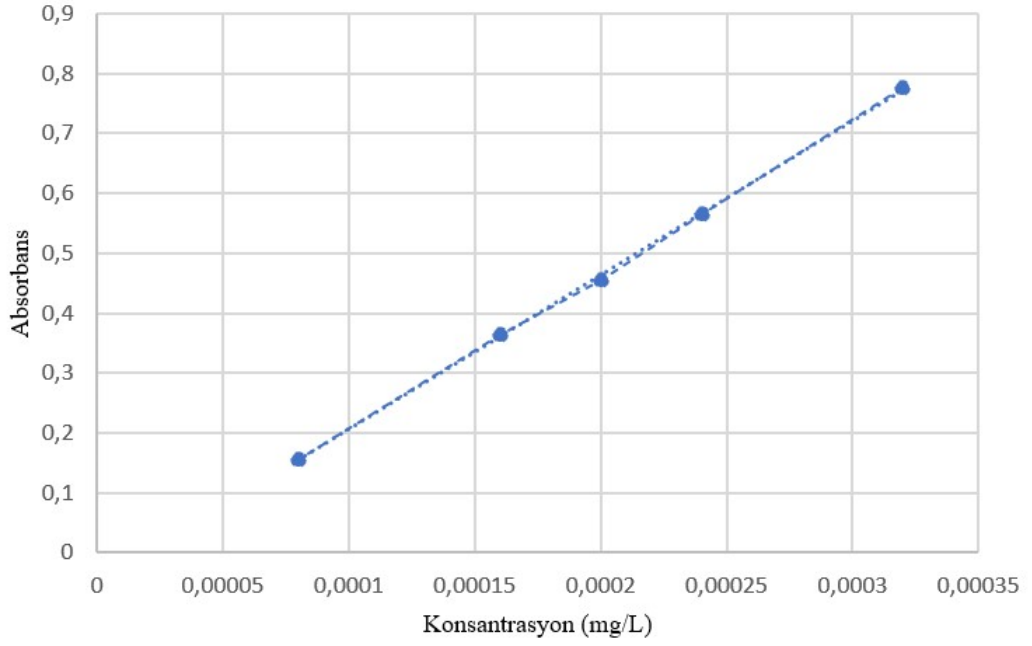
Yapılan çalışmada balık örnekleri İstanbul'da balıkçılar çarşısından ve balık satan marketlerden bizzat üretim yerleri ve cinsleri sorularak, etiketlerine bakılarak temin edilmiştir. Alınan örnekler analize kadar +4°C de saklanmıştır.

### **5.3 Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması ve kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi**

Piyasadan temin edilen %10'luk astaksantin yağının üç ayrı çözücüde çözülerek için (aseton, n-hekzan, kloroform) ön denemeleri yapılarak konsantrasyon aralıkları belirlenmiştir. Balıklardaki astaksantin konsantrasyonunun aynı şekilde tahmini olarak bulunabileceği aralığın tespiti için balık örnekleri de çözücülerle muamele edilerek ön denemelere tabii tutulmuştur. Denemelerden elde edilen sonuçlara bakılarak tespit edilen konsantrasyon aralıklarında hazırlanan standart astaksantin çözeltilerinin absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.

#### **5.3.1. Çözücü olarak asetonun kullanıldığı astaksantine ait kalibrasyon eğrisinin oluşturulması**

Astaksantin 0.08 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.20 mg/mL, 0.24 mg/mL ve 0.32 mg/mL olarak 5 farklı konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan çözeltilerinin 4 tekrarlı olacak şekilde 476 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans ölçümleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisine ait veriler ve doğru denklemi aşağıda Şekil 5.3.1 de vermiştir.

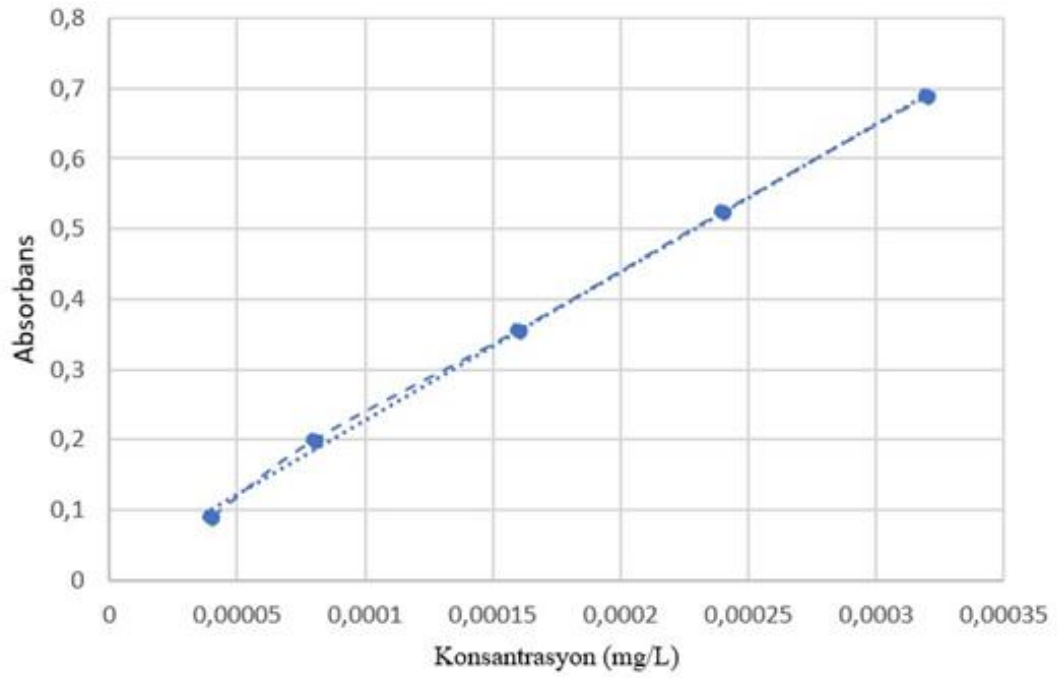


Şekil 5.3.1.1 Aseton çözücüsü kalibrasyon grafiği

Doğrusal Kalibrasyon Denklemi	R <sup>2</sup>	Geri Kazanım, %
$y = 2577,5x - 0,0525$	0,9996	99,0

### 5.3.2. Çözücü olarak n-hekzanın kullanıldığı astaksantine ait kalibrasyon eğrisinin oluşturulması

Astaksantin 0.08 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.20 mg/mL, 0.24 mg/mL ve 0.32 mg/L olarak 5 farklı konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan astaksantin çözeltilerinin 4 tekrarlı olacak şekilde 468 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans ölçümleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisine ait veriler ve doğru denklemi aşağıda Şekil 5.3.2 de vermiştir.

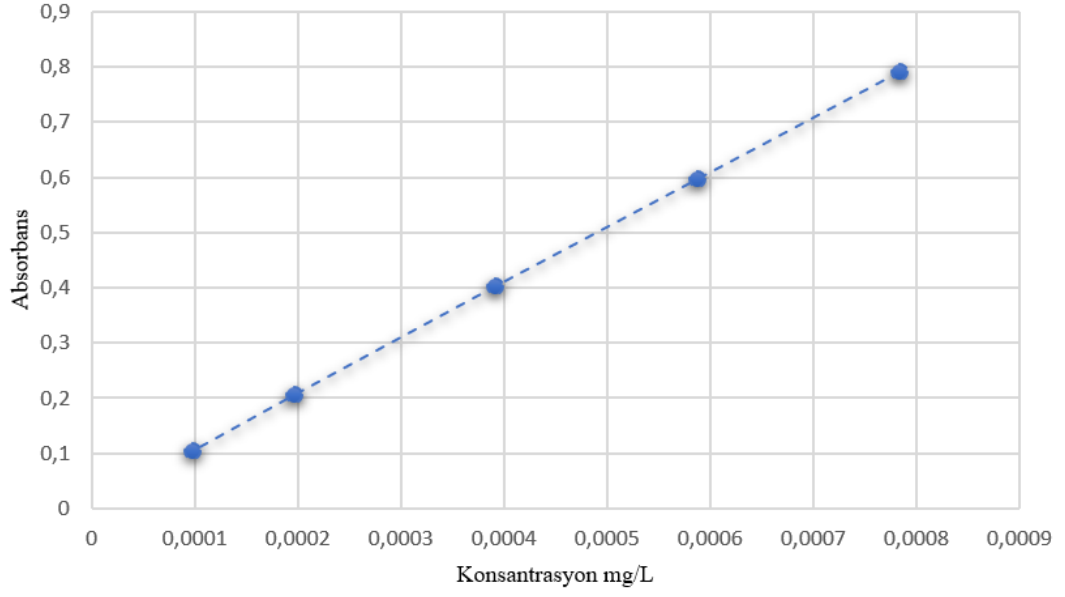


Şekil 5.3.2.1 Hekzan çözücüsü kalibrasyon grafiği

Doğrusal Kalibrasyon Denklemi	R <sup>2</sup>	Geri Kazanım, %
$y = 2111,1x + 0,0171$	0,9986	97,00

### 5.3.3. Çözücü olarak kloroformun kullanıldığı astaksantine ait kalibrasyon eğrisinin oluşturulması

Astaksantin 0.08 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.20 mg/mL, 0.24 mg/mL ve 0.32 mg/L olarak 5 farklı konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan astaksantin çözeltilerinin 4 tekrarlı olacak şekilde 476 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans ölçümleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisine ait veriler ve doğru denklemi aşağıda Şekil 5.3.1 de vermiştir.



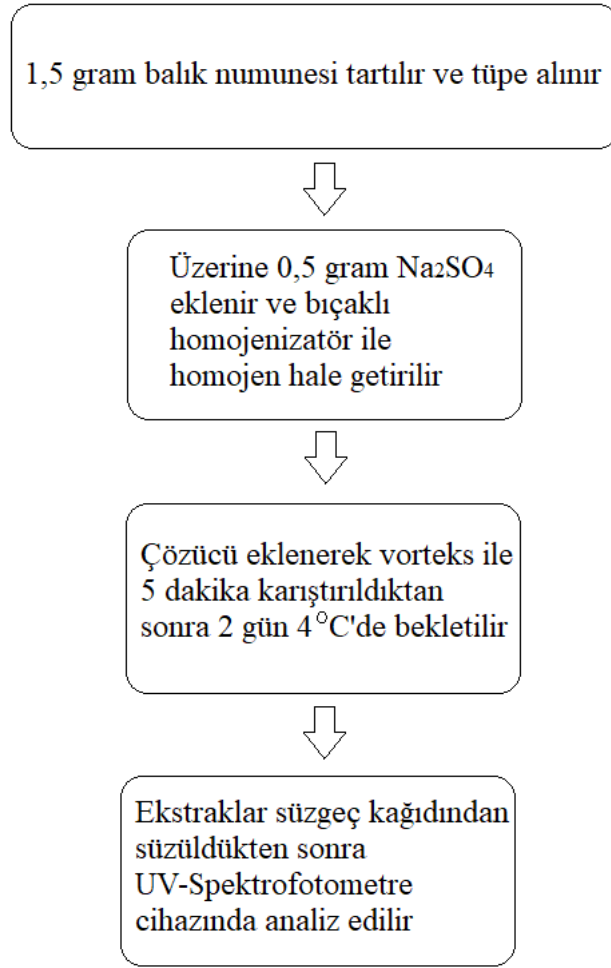
Şekil 5.3.3.1 Kloroform çözücüsü kalibrasyon grafiği

Doğrusal Kalibrasyon Denklemi	R <sup>2</sup>	Geri Kazanım, %
$y = 1007,3x + 0,0078$	0,9999	97,0

## 5.4 Analiz Yöntemi

### 5.4.1 Numunelerin hazırlanması ve ekstraksiyon

Norveç somonu ve yerli somondan alınan (fileto haline getirilerek) 1,5 gram balık numuneleri tüpe alındı. Üzerine 0,5 gram Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sodyum sülfat) eklenerek, bıçaklı homojenizatör ile homojen hale getirildi. Daha sonra üzerine 7,5 ml CHCl<sub>3</sub> (kloroform) eklenerek ağzı kapatıldı. Aynı işlemler tüm örnekler için çözücü olarak ayrı ayrı 7,5 ml CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (aseton) ve C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (n-hekzan) eklenerek tekrarlandı. Deney 5 dakika boyunca vorteksleildi. Daha sonra tüpler tamamen karanlık ortam olması için alüminyum folyo ile kaplanıp 2 gün buzdolabında bekletildi.

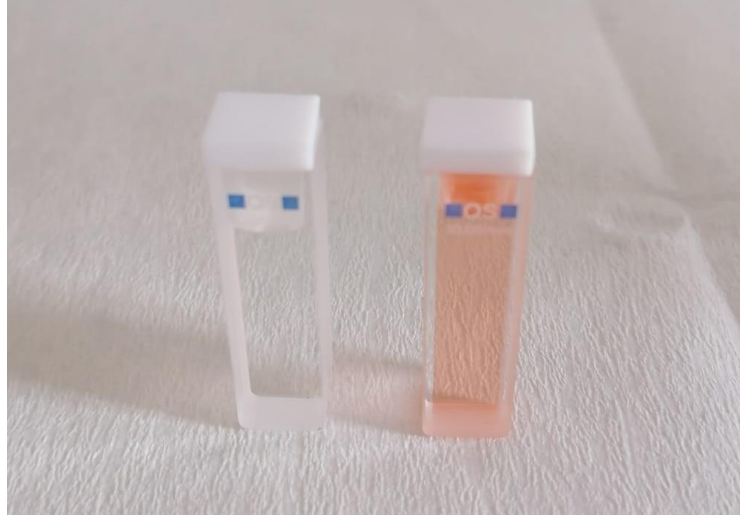


Şekil 5.4.1.1 Astaksantin ekstraksiyonu akış şeması

Deney çalışmasında Norveç (3 farklı numune) ve Türk somunu (5 farklı numune) için 3'er adet tekrar numunesi hazırlanmış olup kloroform, hekzan ve aseton olmak üzere 3 farklı çözücü ile toplam 72 adet ekstraksiyon yapılarak numuneler analiz edilmiştir.

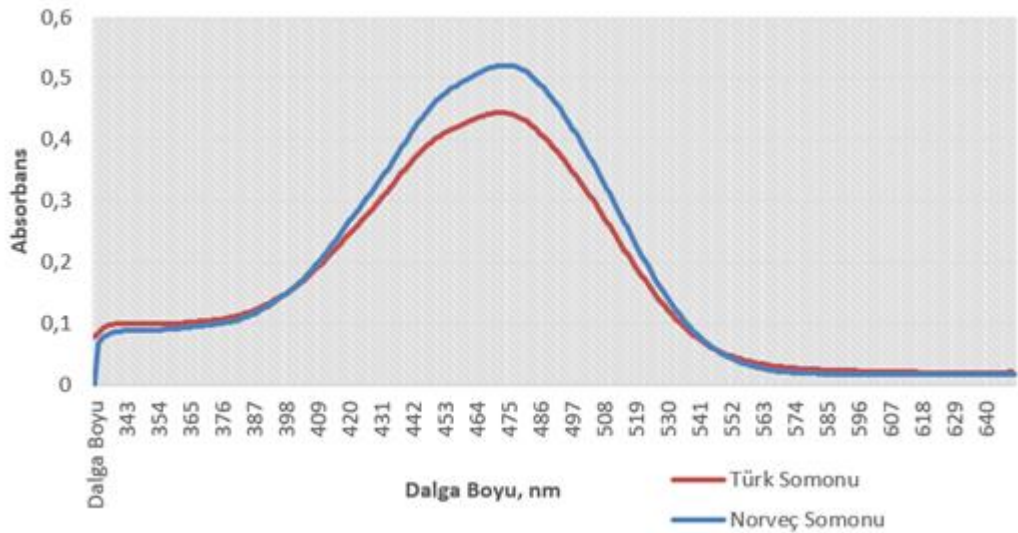
#### 5.4.2 UV-VIS Spektrofotometre Cihazı ile Analizin Yapılması

Aseton, hekzan ve kloroform çözücüleri kullanılarak hazırlanan ekstraktlar buzdolabında +4 °C karanlıkta 2 gün bekletildikten sonra astaksantin rengi olan somon rengini almış olup Resim 5.3.2.1'de görüldüğü gibi daha sonra süzülerek spektrofometrede analiz edilmişlerdir.



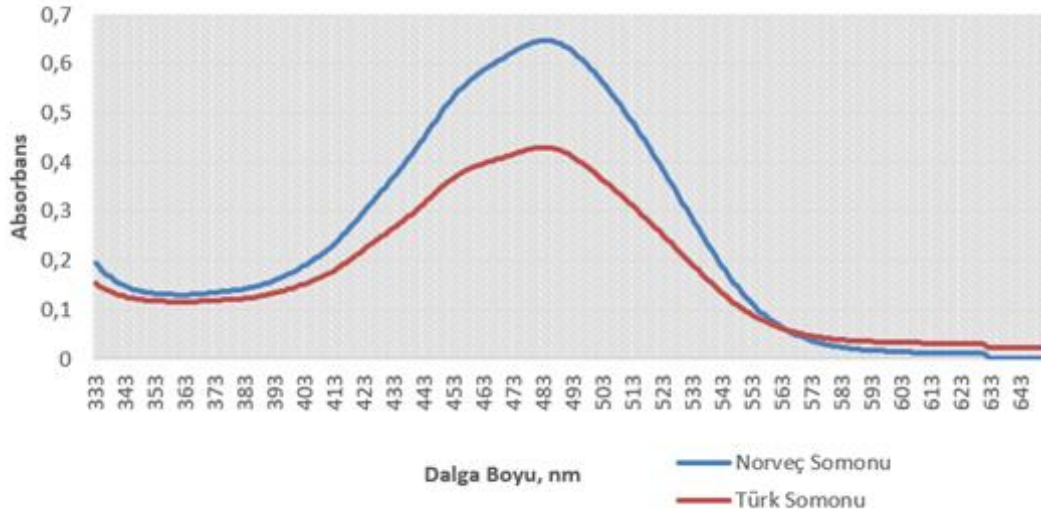
Resim 5.4.2.1 UV-Spektrofotometre cihazı numune kaplarında mevcut olan kloroform ve Norveç somonu ekstraktı

Çözücü olarak aseton kullanılan Norveç somonu ve Türk somonu numunesinin UV-VIS spektrumu Şekil 5.4.2.1 de verilmiş olup grafik verileri her bir örnek için alınan 3 absorban ölçümünün ortalama değerleri alınarak hazırlandı. Grafikte görüleceği üzere aseton çözücüsünde maksimum absorban değeri 476 nm de alındı.



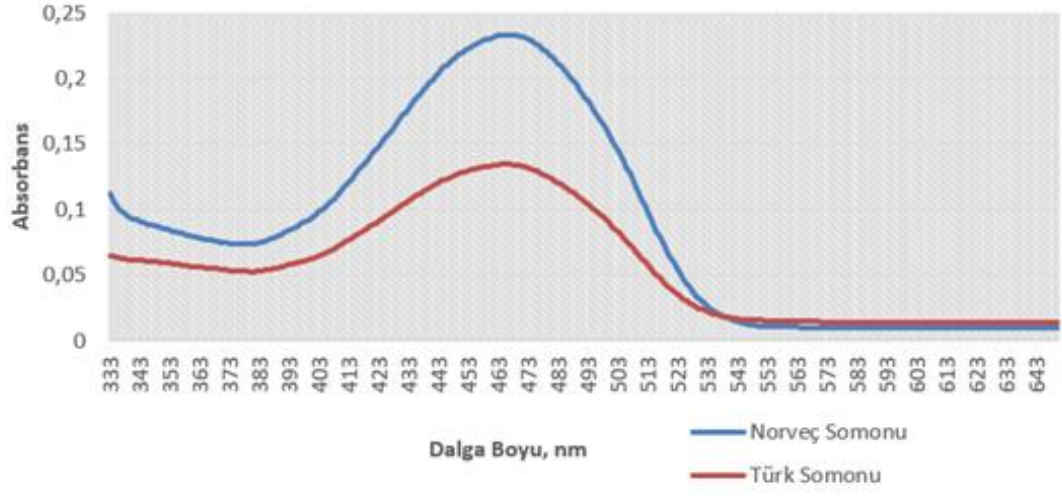
Şekil 5.3.2.1 Çözücü olarak aseton kullanılan Norveç somonu ve Türk somonu için astaksantin spektrumu

Çözücü olarak kloroform kullanılan Norveç somonu ve Türk somonu numunesinin UV-VIS spektrumu Şekil 5.3.2.2 de verilmiş olup grafik verileri her bir örnek için alınan 3 absorbans ölçümünün ortalama değerleri alınarak hazırlandı. Grafikte görüleceği üzere aseton çözücüsünde maksimum absorbans değeri 484 nm de alındı.



Şekil 5.3.2.2 Çözücü olarak kloroform kullanılan Norveç Somonu ve Türk Somonu Astaksantin Spektrumu

Çözücü olarak n-hekzan kullanılan Norveç somonu ve Türk somonu numunesinin UV-VIS spektrumu Şekil 5.3.2.3 de verilmiş olup grafik verileri her bir örnek için alınan 3 absorbans ölçümünün ortalama değerleri alınarak hazırlandı. Grafikte görüleceği üzere aseton çözücüsünde maksimum absorbans değeri 466 nm de alındı.



Şekil 5.3.2.3 Çözücü olarak n-hekzan kullanılan Norveç somonu ve Türk somonu astaksantin spektrumu

## 6. BULGULAR

Yapılan deneysel çalışmalar 3 tekrarlı olarak yapılmış, elde edilen verilerin ortalamaları alınarak, yapılan hesaplamalar sonucu balık numunelerinin içerdiği astaksantin miktarları bulunmuştur. Somon balığı numunelerinin içerdiği astaksantin miktarları Çizelge 6.1, Çizelge 6.2 ve Çizelge 6.3 de verilmiştir.

Çizelge 6.1 Aseton çözücüsü için deney sonuç verileri

Numune Adı	Konsantrasyon, mg/mL ekstrakt	Numunedeki astaksantin Miktarı, mg (7,5 ml çözücüdeki)	Porsiyonda bulunan (150 g) astaksantin miktarı, mg
N <sub>1</sub>	2,27x10 <sup>-4</sup>	0,00171±0,000096	1,70x10 <sup>-2</sup>
N <sub>2</sub>	2,05x10 <sup>-4</sup>	0,00154±0,000096	1,54x10 <sup>-2</sup>
N <sub>3</sub>	2,36x10 <sup>-4</sup>	0,00177±0,000096	1,77x10 <sup>-2</sup>
T <sub>1</sub>	1,76x10 <sup>-4</sup>	0,00132±0,000068	1,32x10 <sup>-2</sup>
T <sub>2</sub>	1,80x10 <sup>-4</sup>	0,00135±0,000068	1,35x10 <sup>-2</sup>
T <sub>3</sub>	1,93x10 <sup>-4</sup>	0,00145±0,000068	1,45x10 <sup>-2</sup>
T <sub>4</sub>	1,91x10 <sup>-4</sup>	0,00143±0,000079	1,43x10 <sup>-2</sup>
T <sub>5</sub>	2,1x10 <sup>-4</sup>	0,00158±0,000079	1,58x10 <sup>-2</sup>
T <sub>6</sub>	2,07x10 <sup>-4</sup>	0,00155±0,000079	1,55x10 <sup>-2</sup>
T <sub>7</sub>	1,79x10 <sup>-4</sup>	0,00135±0,000114	1,35x10 <sup>-2</sup>
T <sub>8</sub>	1,83x10 <sup>-4</sup>	0,00138±0,000114	1,38x10 <sup>-2</sup>
T <sub>9</sub>	2,07x10 <sup>-4</sup>	0,00156±0,000114	1,56x10 <sup>-2</sup>

Çizelge 6.2 Kloroform çözücüsü için deney sonuç verileri

Numune Adı	Konsantrasyon, mg/mL ekstrakt	Numunedeki astaksantin miktarı, mg (7,5 ml çözücüdeki)	Porsiyonda bulunan (150 g) astaksantin miktarı, mg
N <sub>1</sub>	6,33x10 <sup>-4</sup>	0,00474±0,000115	4,74x10 <sup>-2</sup>
N <sub>2</sub>	6,09x10 <sup>-4</sup>	0,00457±0,000115	4,57x10 <sup>-2</sup>
N <sub>3</sub>	6,03x10 <sup>-3</sup>	0,00452±0,000115	4,52x10 <sup>-2</sup>
T <sub>1</sub>	4,15x10 <sup>-4</sup>	0,00311±0,000052	3,11x10 <sup>-2</sup>
T <sub>2</sub>	4,14x10 <sup>-4</sup>	0,00311±0,000052	3,11x10 <sup>-2</sup>
T <sub>3</sub>	4,26x10 <sup>-4</sup>	0,00320±0,000052	3,20x10 <sup>-2</sup>
T <sub>4</sub>	4,09x10 <sup>-4</sup>	0,00307±0,000036	3,07x10 <sup>-2</sup>
T <sub>5</sub>	4,19x10 <sup>-4</sup>	0,00314±0,000036	3,14x10 <sup>-2</sup>
T <sub>6</sub>	4,16x10 <sup>-4</sup>	0,00312±0,000036	3,12x10 <sup>-2</sup>
T <sub>7</sub>	4,18x10 <sup>-4</sup>	0,00314±0,000032	3,14x10 <sup>-2</sup>
T <sub>8</sub>	4,10x10 <sup>-4</sup>	0,00308±0,000032	3,08x10 <sup>-2</sup>
T <sub>9</sub>	4,12x10 <sup>-4</sup>	0,00309±0,000032	3,09x10 <sup>-2</sup>

Çizelge 6.3 n-Hekzan çözücüsü için deney sonuç verileri

Numune Adı	Konsantrasyon, mg/mL ekstrakt	Numunedeki astaksantin miktarı, mg (7,5 ml çözücüdeki)	Porsiyonda bulunan (150 g) astaksantin miktarı, mg
N <sub>1</sub>	9,85x10 <sup>-5</sup>	0,000739±0,000052	7,39x10 <sup>-3</sup>
N <sub>2</sub>	1,04x10 <sup>-4</sup>	0,000781±0,000052	7,81x10 <sup>-3</sup>
N <sub>3</sub>	1,12x10 <sup>-4</sup>	0,000842±0,000052	8,42x10 <sup>-3</sup>
T <sub>1</sub>	5,54x10 <sup>-5</sup>	0,000415±0,000009	4,15x10 <sup>-3</sup>
T <sub>2</sub>	5,63x10 <sup>-5</sup>	0,000422±0,000009	4,22x10 <sup>-3</sup>
T <sub>3</sub>	5,40x10 <sup>-5</sup>	0,000405±0,000009	4,05x10 <sup>-3</sup>
T <sub>4</sub>	5,44x10 <sup>-5</sup>	0,000408±0,000007	4,08x10 <sup>-3</sup>
T <sub>5</sub>	5,63x10 <sup>-5</sup>	0,000422±0,000007	4,22x10 <sup>-3</sup>
T <sub>6</sub>	5,54x10 <sup>-5</sup>	0,000415±0,000007	4,15x10 <sup>-3</sup>
T <sub>7</sub>	5,49x10 <sup>-5</sup>	0,000412±0,000006	4,12x10 <sup>-3</sup>
T <sub>8</sub>	5,63x10 <sup>-5</sup>	0,000422±0,000006	4,22x10 <sup>-3</sup>
T <sub>9</sub>	5,63x10 <sup>-5</sup>	0,000422±0,000006	4,22x10 <sup>-3</sup>

Bent ve Ewen 2001, tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada gökkuşuğu alabalığındaki astaksantin miktarının tayinini UV-VIS spektrofotometre ile yapmışlardır. Çalışmada kullanılan balıklar 2-3 yaş aralığında olup doğumlarından itibaren astaksantin içeren yem ile beslenmiştir. Bu yemler standartlara (Ecolife 18, Biomar A/S, Brande, Denmark) uygun olarak 75-80 mg/kg astaksantin şeklinde balıklara verilmiştir. Balıklar fileto haline getirilip örnekler alındıktan sonra, numuneler 105oC'de 20-24 saat kurutulmuştur. Yağ ve karotenoidler kloroform ve metanol kullanılarak ekstrakte edilip saf suyla karıştırmışlardır. Daha sonra numune bir soğutuculu santrifüjde santrifüj edildikten sonra, metanol fazı, protein katmanı, yağ ve karotenoidleri içeren kloroform fazları ayrılmıştır. Yapılan ölçümlerde karotenoidlerin geri kazanım yüzdesi ekstraksiyondan önce gökkuşuğu alabalığı örneklerine 2 mL astaksantin standart çözeltisi (40 mg/L) eklenerek belirlenmiştir. Ayrıca yağın kendisi absorbansa etkide bulunabileceğinden numunelerinde kloroform/metanol ekstraksiyonu yapılmıştır. Kloroform içerisinde iki astaksantin spektrumu 492 nm 'de maksimum absorbans göstermiştir. Ayrıca, numunelerdeki toplam karotenoid içeriği astaksantin-eşdeğerleri (mg astaksantin-eşdeğer.kg-1) olarak ifade edilmiştir. Yapılan çalışmalar ışığında yöntem diğer metotlarla karşılaştırıldığında veriminin son derece yüksek olduğu ve kullanılabilir olduğu görülmüştür.

Çoban ve Keleştemur 2011, tarafından yapılan bir çalışmada alabalık yetiştirilirken diyetlerine yapılan etkiler sonucunda balıkların yetiştirme safhalarına göre sınıflandırılıp, toplam karotenoid ve lipid peroksidasyon miktarları UV-VIS spektrofotometresi ve HPLC ile elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada toplam 189 adet gökkuşuğu alabalığı kullanılmıştır. Başlangıçtaki karotenoid miktarlarını belirlemek adına her gruptan 3'er adet balık tesadüfi olarak alınıp fileto haline getirildikten sonra β-karoten analizini yapılmıştır. Balık filetosunda karotenoid ölçümü için alınan örnekler deney tüplerinde mikserle kıyılarak örneğin üzerine susuz NaOH (sodyum hidroksit) ve aseton ilave edilerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve 4°C'de 2 gün bekletilmiştir. Tüpler ışıktan etkilenmemesi için etrafı alüminyum folyo kullanılarak sarılmıştır. Daha sonra tüpler 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilip spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Numunelerin spektrofotometrede okunmasında, kontrol çözeltisi olarak aseton kullanılmış olup 475 nm de absorbans ölçümleri

yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda balıkların yetiştirilme safhasında kullanılan, 70 mg / kg  $\beta$ -karoten takviyesi balık derisi üzerinde renk değişimi ve astaksantin miktarında büyük ölçüde artış sağlamıştır.

Tokarz ve ark., 2014, tarafından yapılan çalışmada yeşil alg de (*Haematococcus pluvialis*) bulunan astaksantin içeriğinin polarizasyon bağımlı harmonik mikroskop ile tayini amaçlanmıştır. Bu metodun kullanılabilir olduğunu denetlemek amacıyla örnekler uygun çözücülerle ekstrakte edilip UV-VIS. spektrofotometre ile analiz edilerek astaksantin içeriği belirlenmiştir. Endüktif (endüktif etki, bir kimyasal bağın bir molekül içindeki bitişik bağlar üzerindeki yönelimi üzerindeki etkisidir) ve endüktif olmayan koşullar altında yeşil alg ve kırmızı aplanosporlar aynı odak hacminden üçüncü harmonik (THG) ve çok tonlu uyarma floresansı (MPF) veya ikinci harmoniğin (SHG) eşzamanlı tespiti mikroskopi aletleri ile görüntülenmiştir. Kullanılan cihazlar vasıtası ile alglerin farklı özelliklerini belirlenerek, kloroplastlarda klorofil ve karotenoidlerin varlığı ve astaksantin miktarı belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda ölçümler kıyaslandığında uygulanan metodun yapılabilirliğinin olumlu olduğu görülmüştür.

Amiri ve ark., 2017, tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada (*Haematococcus pluvialis*) yosun ile beslenen gökkuşağı alabalıkların (*Oncorhynchus mykiss*) et rengi üzerine etkisi araştırılması amaçlanmıştır. Deney için 450 gökkuşağı alabalığı yetiştirilmiş olup yetiştirilmeleri sırasında astaksantin içeren yosundan elde edilmiş yem verilmiştir (balıklar 3 farklı havuzda farklı yoğunlukta astaksantin içerikli yemlerle beslenmiştir). 3 farklı havuzdan rastgele seçilen 3 er balık uygun şekilde eksilerek fleto haline getirildikten sonra renkleri ölçüldü ve daha sonra örnekler, homojen hale getirilerek 50 ml metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , Merck) ilave edildikten sonra numune, 30 saniye boyunca bir santrifüj 2200 rpm kullanılarak karıştırılmıştır. Daha sonra 25 ml kloroform ( $\text{CHCl}_3$ , Merck) eklenerek ekstraksiyon işlemi iki kez tekrarlanmıştır. Ekstraksiyon işlemi sonrasında astaksantin içeren kloroform ekstraktı UV-VIS Spektrofotometre cihazı ile analiz edilerek astaksantin miktarları gözlemlenmiştir. Analiz sonucunda yemdeki oranın artışı ile balıklardaki astaksantin

miktarlarının da arttığı gözlemlenmiş olup bu farkın balıkların renklerinde gözle görülür bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

Lee ve ark., 1999, tarafından gerçekleştirilen çalışmada proteolitik enzimler kullanarak karideslerden astaksantin pigmentinin ekstraksiyonu amaçlanmıştır. Bu çalışma, astaksantin karides atıklarından fonksiyonel bir gıda katkı maddesi olarak kullanılması için etkin ekstraksiyon koşullarını araştırmaktır. Pigmentlerin stabilitesini arttırmak için, karoteinoprotein olarak astaksantin ekstraktına proteolitik enzimler uygulanmıştır. Ayrıca, ekstraksiyon işlemini optimize etmek için örneklerin, EDTA çözeltisi kullanılarak ve çeşitli enzimlerin eklenmesi gibi çeşitli koşullara maruz bırakılmıştır. Ekstraksiyondan sonra, tüm ekstraktlar ayrı bir huniye bölünmüş ve her bir astaksantin içeriği UV-VIS spektrofotometresi kullanılarak analiz edilmiştir. Karotenoprotein, EDTA ortamı ve bir proteolitik enzim kullanılarak asitli olmayan silajlı karides atıklarından etkili bir şekilde ekstrakte edilmiştir. Bu durumda, kırmızımsı (astaksantin içeren ekstrakt kısmı) üst tabaka %91,9 geri dönüşüm göstermiş ve siyahımsı alt tabaka (astaksantin harici maddeler) %2,3 ve ayırma oranı yaklaşık 0.2 (v/v) idi; bu nedenle kırmızımsı üst tabakanın konsantrasyonu ve saflaştırılması bütün ekstrakttan daha verimli olmuştur. İşlemin geri kazanım oranı dikkate alındığında başarılı olduğu ve kullanılabilir olduğu bulunmuştur.

Literatür araştırmasının ışığında yapılan deneyler sonucunda Norveç somonundan elde edilen astaksantin varlığı kabul edilen sınırlarda olup, Türk somonundaki analiz sonucunda astaksantin varlığı da Norveç somonundaki kadar olmasa da doğal ve faydalı beslenme diyetlerinde Yerli Somon balığının da tercih edilebileceği anlaşılmaktadır.

## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde sentetik pigment kullanımının doğal pigment kullanımına tercih edilmesi kolay elde edilebilir olması nedeniyle üreticiye kolaylık sağlamaktadır. Sentetik olarak üretilen pigmentlerden astaksantin balık beslenmesinde kullanılan yemlere katkı maddesi olarak, yumurtalarda renk verici ve süs balıklarının renklendirilmelerinde ticari olarak kullanılmaktadır. Sentetik olan her şeyin canlılara zararı olduğu düşünüldüğünde üreticilerin öncelikli tercihi doğal kaynaklar olmalıdır. Son yıllarda sağlıkla ilgili ortaya çıkan hastalıklar ve kanser gibi tedavisi zor olan türlerin alternatif tedavi olarak antioksidan maddeleri içeren doğal kaynaklarla tedaviye de yönlendirmelerine yol açmıştır. Bundan dolayı sentetik renklendiricilerin yerine doğal renklendiricilerin araştırılarak yeni ürünlerin bulunması, bunların balıkların ve yumurtaların renklendirilmesinde, beslenmede önemli bir yere sahip bu gıda maddelerinin antioksidan özelliklerinin artırılmasında faydalı olacağı göz ardı edilmemelidir.

Yapılan çalışmalar esnasında balık numunelerinin ekstraksiyon işlemlerinden sonra UV ışık etkisinde kalmamasına son derece önem verilmiş olup ışık alması engellenmiştir. Çünkü yapılmış çalışmalarda balıkların astaksantin depolamaları ve gelişimlerinde dahi UV ışıklarının olumsuz etkisi olduğu belirlenmiştir (Tejera ve ark., 2008). Kullanılan çözücüler arasında ( $\text{CHCl}_3$ -kloroform,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  -aseton,  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ -n-hekzan) en yüksek etkiyi gösteren ve en yüksek absorbans değerini aldığımız çözücünün kloroform olduğu belirlenmiştir. Metodun güvenilirliği yapılan geri kazanım çalışmalarına göre yüksek geri kazanımla güvenilir sınırla içinde bulunmuştur. Balık içerisinden astaksantin elde edilmesinde yaklaşık olarak asetona göre 2,8 kat, n-hekzana göre 5,8 kat daha iyi verim alınmıştır. Astaksantin içeriği bakımından Norveç somonu Türk somonlarına göre kıyaslandığında ise %47 daha fazla astaksantin içerdiği belirlenmiştir. Türk somonunun astaksantin içeriğinin ithal somona göre daha az olmasına karşın ortalama bir porsiyon tüketimde (yaklaşık 150 gram fileto olarak) alınan astaksantin miktarı (ortalama 0,0312 mg astaksantin) yeterli olmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken önemli bir konuda piyasada satılan yerli somonların oluşan bilgi kirliliğinden sıkça Karadeniz Alası ile karşılaştırılmasıdır. Karadeniz Alasının astaksantin içeriği eser miktardadır, renk ve dış görünümünden kolayca ayırt edilebilir.

Sonuç olarak sağlıklı yaşamın birinci şartı dengeli ve sağlıklı beslenmedir. Balıklar içeriğindeki vitaminler ve mineraller göz önüne alındığında besin değeri yüksek olan bir sağlıklı gıdadır. Özellikle somon balığı diğer balık türlerine göre söz konusu vitamin ve minerallerin yanında içeriğindeki karotenoid türevi olan astaksantinden dolayı antioksidan özellik gösteren protein açısından da zengin bir balıktır. Bu nedenle çalışmamızın sonucuna göre tüketimde somon balığının tercih edilmesi ve özellikle astaksantin içeriğinin yüksek olması nedeniyle Norveç somonun diğer balıklara göre tercih edilmesi önerilmektedir. Ayrıca beslenme için aldığımız ürünlerin, özellikle renklendirilmesinde doğal renklendiricilerin yani doğal pigmentlerin kullanılmasının tercih edilmesi gerektiği önem arz etmektedir.

## 8. KAYNAKLAR

Tizkar B, Soudagar M, Bahmani M, Hosseini S, Chamani M, Seidavi A, Sühnel S, Jesus P, Jesus P. Effects of dietary astaxanthin and  $\beta$ -carotene on gonadosomatic and hepatosomatic indices, gonad and liver composition in goldfish *Carassius auratus* broodstocks. *Lat AmJ Aquat Res*. 2016; 44(2); 363-370.

Bent R, Ewen M. Determination of Total Carotenoid Content in Rainbow Trout Muscle by Multivariate Calibration of VIS Reflectance Spectra. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2001; 14(4); 345 -357.

Bjerkeng B, Storebakken T, Jensena S, Jensena L. Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation Norway. *Aquaculture*. 1992; 108(3-4); 333-346.

Dissing B, Nielsen M, Ersbøll B , Frosch S. Multispectral Imaging for Determination of Astaxanthin Concentration in Salmonids Institute of Marine Research. *Plos One*. 2011; 6(5); 1-8.

Cross C, Halliwell B, Borish E, Pryor W, Ames B, Saul R, McCord J, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*. 1987; 107(4); 526-545.

Tokarz D, Cisek R, El-Ansari O, Espie G, Fekl U, Barzda V. Organization of Astaxanthin within Oil Bodies of *Haematococcus pluvialis* Studied with Polarization-Dependent Harmonic Generation Microscopy. *Plos One*. 2014; 10(3); e0121773.

Haila K, Nielsen B, Heininen M, Skibsted L. Carotenoid reaction with free radicals in acetone and toluene at different oxygen partial pressures. An ESR spin-trapping study of structure-activity relationships. *Zeit Fuer Leben Unters Forsch*. 1997; 204; 81-87.

Dhankhar J, Sumita S, Sharma S, Sharma A. Astaxanthin: A potential Carotenoid. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017; 4; 1246-1259.

Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, Utsumi K. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 1990; 22(1); 27-38.

- Ji L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Rad Biol Med*. 1995; 18(6); 1079-1086.
- Lawlor S, O' Brien N. Astaxanthin: Antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts. *Nutrition Research*. 1995; 15; 1695-1740.
- Lichatowich S. *Without Rivers. A History Of The Pacific Salmon Crisis*. Amerika. Island Press. 2001.
- Nur M, Widayarti S, Sumitro S. The Study of Uv Spectrum in Interaction Astaxanthin and Glycated Bovine Serum Albumin (Gly-BSA). 2019; 6(1); 23-29.
- Lu M, Zhang Y, Zhao C, Zhou P, Yu L. Analysis and Identification of Astaxanthin and its Carotenoid Precursors from *Xanthophyllomyces dendrorhous* by High-Performance Liquid Chromatography. *College of Life Science and Technology. Huazhong University of Science and Technology*. 2010; 65 (7-8); 489- 494.
- Amiri M, Emadi H, Emtiazjoo M. The Effect of Diets with *Haematococcus pluvialis* Algae on the Flesh Color of *Oncorhynchus mykiss*. *Advances in Bioresearch*. 2017;8(2); 109-114
- Nakano T, Kanmuri T, Sato M, Takeuchi M. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1426(1); 119-25
- Tejera N, Cejas J, Rodríguez C, Jerez S, Bolaños A, Lorenzo A. Effect of Astaxanthin Supplemented Feeds on Pigmentation and Carotenoid Composition of *Pagrus Pagrus* Skin. 2008 Poster Presentation The 15th International Symposium on Carotenoids . Spain. Okinawa: Japan. 2008; 18(12); 1990-1996
- Østerlie M, Bjerkeng B, Jensen L, Jensen S. Plasma appearance and distribution of astaxanthin E/Z and R/S isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. Sevilla: Spain. In Mosquera. Galán J, Méndez J. *Pigments in Food Technology, Proceedings of the 1st International Congress on Pigments in Food Technology*. 1999; 11; 482–490.
- Çoban E, Keleştemur G. Farklı Oranlardaki Sentetik  $\beta$ -Karotenin Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*, W. 1792) Filetolarında Kas Karotenoid Stabilitesi ve Lipid

Peroksidasyon Düzeyine Etkileri. Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi. 2011; 25(1); 17-21.

Régnier P, Bastias J, Rodriguez-Ruiz V, Caballero-Casero N, Caballo C, Sicilia D, Fuentes A, Maire M, Crepin M, Letourneur D, Gueguen V, Rubio S, Pavon-Djavid G. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Prevents Oxidative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity. *Marine Drugs*. 2015; 13(5); 2857-2874.

Dalei J, Sahoo D. Extraction and Characterization of Astaxanthin from the Crustacean. Dalei and Sahoo. 2015; 6(6); 2532-2537.

Tolasa S, Çaklı Ş, Ostermeyer U. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. *European Food Research and Technology*. 2005; 221; 787-791.

Lee S, Roh S, Koo R, Park K, Yoon K, Yoon R. Effective Extraction of Astaxanthin Pigment from Shrimp Using Proteolytic Enzymes. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 1999; 4; 199 – 204.

Dong S, Huang Y, Zhang R, Wang S, Liu Y. Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. Beijing: China. Beijing University of Chemical Technology. 2014; 89(11).

Stefano B, Longo C, Brett C. Capitalism and the Commodification of Salmon. 2014; 66(7); 35.

Moretti V, Mentasti T, Bellagamba F, Luzzana U, Caprino F, Turchini G, Giani I, Valfrè F. Determination of astaxanthin stereoisomers and colour attributes in flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to distinguish dietary pigmentation source. *Food Additives and Contaminants*. 2006; 23(11); 1056-1063

Werner M, Deniz E. UV–VIS absorption spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*; 2017;173; 965-968

## 9. ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	TOLGAHAN	<b>Soyadı</b>	AYDIN
<b>Doğum Yeri</b>	FATİH/İSTANBUL	<b>Doğum Tarihi</b>	20.10.1991
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>Tel</b>	0542 464 20 16
<b>E-mail</b>	tolgahan.08@hotmail.com		

<b>Eğitim Düzeyi</b>	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>	Marmara Üniversitesi/Sağ. Bil. Ens. Analitik Kimya	Öğrenci
<b>Lisans</b>	Hitit Üniversitesi/Kimya Mühendisliği	2015
<b>Lise</b>	Barbaros Lisesi	2010

<b>İş Deneyimi</b>		
<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl - Yıl)</b>
SATIŞ MÜHENDİSİ	DIKEY MÜHENDİSLİK	2015-2016
PROJE MÜHENDİSİ	ERA A.Ş.	2016-2018
SATIŞ MÜHENDİSİ	ERTEK POMPA	2018-2019
SATIŞ MÜHENDİSİ	MAXTRANS END. POMPA	2019-

Yabancı Dilleri		Okuduğunu Anlama*		Konuşma*		Yazma*		
İngilizce		Orta		Orta		Orta		
Gürcüce		Kötü		Orta		Kötü		
Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>	<b>62,32</b>	<b>61,75</b>	<b>65,86</b>
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	Çok iyi
AutoCad	İyi
Matlab	Orta
Statistica	İyi

## **10. EKLER**

### **EK 1. Tez Çalışmasından Üretilen Kongre Bildirimi**

Tolgahan Aydın, Gulbin Erdogan, Determination of the Amount of Astaxanthin in Salmon Fishes p-167, “7th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress” 19-21 December 2019 Istanbul/TURKEY