



T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Gracilaria dura MAKROALGİNDEN PROTEİNLERİN ENZİM
DESTEKLİ EKSTRAKSİYONU, BİYOAKTİF VE
TEKNOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI
VE SODYUM DODESİLSÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL
ELEKTROFOREZ İLE TANIMLAMA ÇALIŞMALARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül BOZDEMİR

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Aysun YÜCETEPE

AKSARAY, 2022

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 202324012 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Ayşegül BOZDEMİR tarafından hazırlanan “(*Gracilaria dura* **MAKROALGİNDEN PROTEİNLERİN ENZİM DESTEKLİ EKSTRAKSİYONU, BİYOAKTİF VE TEKNOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE SODYUM DODESİLSÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZ İLE TANIMLAMA ÇALIŞMALARI**)” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aysun YÜCETEPE

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Müge İŞLETEN-HOŞOĞLU

Gebze Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç Dr. Mehtap GÜRSOY

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 01/04/2022

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Doç. Dr. Mehmet Ali HİNİS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Ayşegül BOZDEMİR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, bu süreçte ortaya çıkan problem ve aksaklıklarda, sorunların çözülmesinde bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, bizleri sorgulama, düşünce geliştirme ve araştırma konusunda teşvik eden, bilime olan saygısı ile kendime örnek aldığım çok kıymetli hocam Dr. Öğretim Üyesi Aysun YÜCETEPE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aksaray Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Ebru KOÇAK ve Öğretim Görevlisi Tolga BAHADIR'a bazı analizlerimizin gerçekleştirilmesinde sağladıkları ekipman desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisansım ve tezim süresince manevi desteklerini esirgemeyen, fedakârlıklar yapan ve beni motive eden, bana inanan anneme, eşime ve uzun laboratuvar çalışmalarında beni sabırla bekleyen kızım Başak'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 119O149 numaralı ve “Türkiye Denizlerinden Toplanan Bazı Makroalg Örneklerinin Alternatif Protein Kaynağı Olarak Değerlendirilmesi: Biyoaktif Peptit Eldesi, Biyoaktif ve Teknofonksiyonel Özelliklerinin Araştırılması, Enkapsulasyonu ve Stabilitate Çalışmaları” başlıklı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 3501 projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, tezimin gerçekleşmesindeki katkılarından dolayı TÜBİTAK'a çok teşekkür ederim.

Ayşegül BOZDEMİR
AKSARAY, 2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 <i>Gracilaria</i> spp.'nin Kimyasal Kompozisyonu	5
2.2 Algal Proteinler	6
2.2.1 Protein ekstraksiyonu	8
2.2.1.1 Proteinlerin enzimatik ekstraksiyonu	8
2.2.1.2 Ultrases destekli ekstraksiyon	9
2.3 Makroalglerin Antioksidan Aktivitesi	10
2.3.1 Antioksidan aktivite etki mekanizması	11
2.3.2 Antioksidan aktivite tayin yöntemleri	12
2.4 Algal Proteinlerin Teknofonksiyonel Özellikleri	13
2.4.1 Protein çözünürlüğü	14
2.4.2 Su ve yağ tutma kapasitesi	15
2.4.3 Emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi	15
2.4.4 Köpürme kapasitesi ve stabilitesi	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1 Kimyasal Kompozisyonun Belirlenmesi	19
3.2 Protein Çözünürlüğü ve Zeta (ζ) Potansiyel Ölçümü	20
3.3 Proteinlerin Enzim Destekli Ultrases Ekstraksiyonu	20
3.4 Protein Ekstraktlarının Protein İçeriğinin ve Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi	21
3.5 Protein Eksraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi	21
3.6 Protein Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi	22
3.6.1 2,2-difenil-1 pikrilhidrazil radikal yakalama (DPPH) metodu	22
3.6.2 Bakır (II) iyonu indirgenme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) metodu	22
3.7 Protein Ekstraktının Teknofonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi	22
3.7.1 Su tutma kapasitesi	23
3.7.2 Yağ tutma kapasitesi	23
3.7.3 Emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi	23
3.7.4 Köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi	24
3.8 Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorez (SDS-PAGE) ile Tanımlama Çalışmaları	25
3.9 Deney Tasarımı ve İstatistiksel Analiz	25
3.10 Modelin Yeterliliği	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	27
4.1 Kimyasal Kompozisyonu	27
4.2 Protein Çözünürlüğü ve Zeta (ζ) Potansiyeli	28
4.3 Modelin Yeterliliği	31
4.4 Ekstraktların Protein İçeriği	33
4.5 Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite	38
4.6 Optimizasyon ve Doğrulama	43

4.7 Optimum Noktada Elde Edilen Ekstraktların Protein İçeriği ve Ekstraksiyon Verimi	43
4.8 Optimum Noktada Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarı.....	44
4.9 Optimum Noktada Elde Edilen Ekstraktların Antioksidan Aktivitesi	46
4.10 Optimum Noktada Elde Edilen Ekstraktların Teknofonksiyonel Özellikleri.....	46
4.10.1 Yağ tutma ve su tutma kapasitesi.....	47
4.10.2 Emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi.....	48
4.10.3 Köpürme aktivitesi ve köpürme stabilitesi	49
4.11 SDS-PAGE Elektroforez ile Tanımlama Çalışması	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	66



YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Gracilaria dura* MAKROALGİNDEN PROTEİNLERİN ENZİM DESTEKLİ EKSTRAKSİYONU, BİYOAKTİF VE TEKNOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE SODYUM DODESİLSÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZ İLE TANIMLAMA ÇALIŞMALARI**

Ayşegül BOZDEMİR

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aysun YÜCETEPE

ÖZET

Sunulan tez çalışması kapsamında, kırmızı bir makroalg olan *Gracilaria dura*'dan proteinlerin ekstraksiyonu için ekstraksiyon koşulları yanıt yüzey metodolojisi (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. Ekstraksiyon süresi, enzim/substrat oranı (E/S) ve ultrases uygulama süresinin ekstraktların protein içeriği, toplam fenolik madde miktarı (TFMM) ve antioksidan aktivite (AOA) üzerine etkileri araştırılmıştır. *G. dura*'nın kimyasal kompozisyonu belirlendikten sonra, % protein çözünürlüğü ve zeta potansiyel değeri üzerine pH'nın etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, optimum noktada elde edilen protein ekstraktlarının sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile tanımlama çalışmaları ve teknofonksiyonel özellikleri (su tutma kapasitesi (STK), yağ tutma kapasitesi (YTK), emülsiyon stabilitesi (ES) ve emülsiyon aktivitesi (EA), köpürme kapasitesi (KK) ve köpürme stabilitesi (KS)) araştırılmıştır.

Çalışmanın sonuçlarına göre, *G. dura*'nın kuru ağırlıkta %11,97±0,05 protein, %0,32±0,06 yağ, %24,30 karbonhidrat, %45,50±0,73 kül ve %17,93±1,06 ham lif içerdiği tespit edilmiştir. Protein çözünürlüğü analizine göre, pH 13'de protein çözünürlüğünün (~%58) en yüksek olduğu görülmüştür. Optimum koşullarda (ultrases uygulama süresi: 257,57 saniye, E/S: 2,5 (g/g) ve ekstraksiyon süresi: 22,62 saat) elde edilen protein ekstraktlarının protein içeriği kuru ağırlıkta 188,71 mg/g, TFMM 64,33 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g ve CUPRAC yöntemi ile AOA 54,24 mg Trolox eşdeğeri (TE)/g olarak bulunmuştur. Ayrıca, protein ekstraktlarının STK %195, YTK %568, EA %44, ES %75 ve KK %12,5 olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, örneklerin KS sergilemediği tespit edilmiştir. Ayrıca, SDS-PAGE analiz sonuçlarına göre, *G. dura* protein ekstraktlarının 11 ve 25 kDa molekül ağırlığına sahip protein fraksiyonlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, *G. dura*'nın iyi düzeyde YTK nedeni ile yağ bazlı gıda formülasyonlarına uygulanabilme potansiyeline sahip olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: *Gracilaria dura*, protein, enzimatik ekstraksiyon, optimizasyon, ultrases, biyoaktivite.

Nisan, 2022; 66 sayfa

M.Sc. THESIS

ENZYME-ASSISTED EXTRACTION OF PROTEINS FROM MACROALGAE *Gracilaria dura*, INVESTIGATION OF BIOACTIVE AND TECHNOFUNCTIONAL PROPERTIES AND IDENTIFICATION OF PROTEINS BY SODIUM DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

Ayşegül BOZDEMİR

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Aysun YÜCETEPE

ABSTRACT

In the present thesis, process conditions of ultrasound-assisted enzymatic extraction of proteins from red macroalgae *Gracilaria dura* were optimized using response surface methodology (RSM). The effects of extraction time, enzyme/substrate ratio (E/S) and ultrasonic applying time were investigated on protein content, total phenolic content (TPC) and antioxidant activity (AOA) of the extracts. The chemical composition of *G. dura* was determined. Then, effect of pH was investigated on % protein solubility and zeta potential value. In addition, identification studies of protein extracts obtained under optimum extraction conditions were carried out using sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technique. Furthermore, technofunctional properties (water holding capacity (WHC), oil holding capacity (OHC), emulsion stability (ES) were investigated.

According to the results of the study, *G. dura* contained 11.97±0.05% protein, 0.32±0.06% fat, 24.30% carbohydrate, 45.50±0.73% ash and crude fiber 17.93±1.06% in dry weight (dw). Protein solubility (~58%) of *G. dura* was highest at pH 13. Protein content, TPC and AOA of the protein extracts obtained under optimum conditions (ultrasonic applying time: 257.57 seconds, E/S: 2.5 (g/g) and extraction time: 22.62 hours) were 188.71 mg/g dw, 64.33 mg gallic acid equivalent (GAE)/g dw and 54.24 mg Trolox equivalent (TE)/g dw, respectively. In addition, WHC, OHC, EA, ES and FC values of the protein extracts were 195%, 568%, 44%, 75% and 12.5%, respectively. On the other hand, the protein extracts did not exhibit FS. Furthermore, the protein extracts from *G. dura* had protein fractions with molecular weights of 11 and 25 kDa. In conclusion, it can be said that *G. dura* may has a potential to be applied to oil-based food formulations due to its good level of OHC.

Key words: *Gracilaria dura*, protein, enzymatic extraction, optimization, ultrasound, bioactivity.

April, 2022; 66 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Peptit bağlarıyla birbirine bağlanmış protein molekülü	7
Şekil 3.1. Materyal toplama çalışmalarından görüntüler.	19
Şekil 3.2. Kurutulmuş <i>Gracilaria dura</i> (A) ve <500 µm partikül çapındaki öğütülmüş <i>Gracilaria dura</i> (B).	19
Şekil 4.1. <i>Gracilaria dura</i> 'nın pH 2,0'den 13,0'e değişen pH değerlerinde % protein çözünürlüğü ve zeta potansiyel (mV) değerleri.	29
Şekil 4.2. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği	34
Şekil 4.3. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği	35
Şekil 4.4. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit E/S oranı (1,5), ekstraksiyon zamanı ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği.	36
Şekil 4.5. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit E/S oranı (1,5), ekstraksiyon zamanı ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği.	36
Şekil 4.6. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit ultrases zamanı (165 saniye), ekstraksiyon zamanı ve E/S oranı arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği	37
Şekil 4.7. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit ultrases zamanı (165 saniye), ekstraksiyon zamanı ve E/S oranı arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği.	38
Şekil 4.8. Örneklerin TFMM üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği.	39
Şekil 4.9. Örneklerin TFMM üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği.	39
Şekil 4.10. Örneklerin TFMM üzerine sabit ultrases uygulama süresinde (165 saniye), E/S ve ekstraksiyon süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği.	40
Şekil 4.11. Örneklerin TFMM üzerine sabit ultrases uygulama süresinde (165 saniye), E/S ve ekstraksiyon süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği.	41
Şekil 4.12. Örneklerin antioksidan aktivitesi (CUPRAC) üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği.	42
Şekil 4.13. Örneklerin antioksidan aktivitesi (CUPRAC) üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği.	42
Şekil 4.14. <i>Gracilaria dura</i> makroalginden elde edilen protein bantları.	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Makroalglerden biyoaktif bileşik eldesinde kullanılan enzimler ve ekstraksiyon koşulları	9
Çizelge 3.1. Box-Behnken tasarım için gerçek ve kodlanmış seviyeler.....	26
Çizelge 4.1. İkinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).....	32
Çizelge 4.2. Doğal ve kodlanmış ekstraksiyon koşulları ile Box–Behnken deney tasarımı ve deneysel olarak elde edilen yanıtların değerleri	34
Çizelge 4.3. Araştırılan yanıtların hedef ve öngörülen değerleri ile optimize edilmiş ekstraksiyon koşulları.	43
Çizelge 4.4. Optimum noktada elde edilen ekstraktların teknofonksiyonel özelliklerini gösteren çizelge	47



SİMGELER VE KISALTMALAR

AOA	Antioksidan aktivite
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BBD	Box-Behnken Dizayn
-COOH	Karboksil
CUPRAC	Kuprik iyon indirgeme antioksidan kapasite
DHA	Dokosaheksaenoik asit
DPPH	2,2-difenil-1 pikrilhidrazil
EA	Emülsiyon aktivitesi
EPA	Eikosapentaenoik asit
ES	Emülsiyon stabilitesi
ET	Elektron transferi
FAO	Gıda ve Tarım Organizasyonu
FC	Köpürme kapasitesi
FS	Köpürme stabilitesi
GAE	Gallik asit eşdeğeri
HAT	Hidrojen atom transferi
KA	Köpürme aktivitesi
kDa	Kilodalton
KS	Köpürme stabilitesi
NH ₂	Amin grup
OHC	Oil holding capacity
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RSM	Response surface methodology
R ²	Belirleme katsayısı
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforez
STK	Su tutma kapasitesi
TE	Trolox eşdeğeri
TFMM	Toplam fenolik madde miktarı
TPC	Total phenolic compound
WHC	Water holding capacity
YTK	Yağ tutma kapasitesi
ζ	Zeta potansiyeli

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun 1950 yılından 2000 yılına gelindiğinde 2,7 milyardan 6 milyara ulaştığı bilinmektedir. 2050’de ise bu rakamın yaklaşık 9,6 milyar insan olacağı tahmin edilmektedir. İnsan sayısındaki bu artışın, gıda talebinde %70’lik bir artışa karşılık geleceği düşünülmektedir (Boland vd., 2013; Caparros-Megido vd., 2014; FAO, 2009; Gerland vd., 2014). Artan nüfusun gıda ihtiyacını mevcut kaynakların karşılayamaması, tarım alanlarının ve su kaynaklarının azalması, küresel ısınmaya bağlı iklim koşullarının değişmesi, enerji kaynaklarının tükenmesi gibi nedenlerden dolayı geleneksel gıda kaynaklarına alternatif yeni gıda kaynaklarının araştırılması gerekmektedir. Bu durum, okyanusların ve denizlerin cezbedici alternatif ekim ve üretim alanları olarak düşünülmesini sağlamaktadır (Fresco, 2009; Hubert vd., 2010; Kazir vd., 2019). Ayrıca, son elli yıldır gelecekteki beslenme sorunlarına, özellikle yetersiz protein alımına yönelik yoğun çalışmalar yapılmakta ve alternatif protein kaynakları araştırılmaktadır. Son yıllarda, deniz yosunları olarak da bilinen makroalglerin, ucuz, sürdürülebilir ve alternatif bir protein kaynağı olarak değerlendirilmesi konusunda yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Becker, 2007).

Makroalgler kök, gövde ve yaprak farklılaşması olmaksızın klorofil içeren tek veya çok hücreli canlıların oluşturduğu yeryüzünün hemen her yerinde bulunabilen fotosentetik canlı grubu olarak tanımlanmaktadır (Field vd., 1998). Geleneksel bir gıda kaynağı olarak Asya ülkelerinde yüzyıllardır tüketilmekte olan makroalglerin kullanımı, son yıllarda batı ülkelerinde de giderek yaygınlaşmaktadır. Makroalgler kara bitkilerine alternatif olabilecek sürdürülebilir gıda kaynakları olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra, büyüme hızlarının yüksek olması, tuzlu suda gelişebilmeleri, karasal ekim alanlarını işgal etmemeleri ve çevre dostu olmaları sebebiyle oldukça önemli avantajlara sahiptir (Kazir vd., 2019; Øverland vd., 2019).

Makroalgler sahip oldukları pigmentlere göre yeşil (Chlorophyceae), kırmızı (Rhodophyceae) ve kahverengi (Phaeophyceae) olarak 3’e ayrılırlar (Alves vd., 2013; Garson, 1989). Genel olarak renk pigmentasyonundaki farklılıklara göre yapılan bu sınıflandırmada, ana pigmentlerin yanı sıra hücre duvarı tipi ve klorofil tipinde de farklılıklar olabilmektedir. Örneğin kahverengi ve kırmızı makroalglerin hücre duvarı çift katmanlı iken, yeşil makroalglerin tek katmanlıdır. Bunun yanı sıra,

kahverengi algler klorofil a ve c içerirken, yeşil algler klorofil a ve b, kırmızı algler ise klorofil a içermektedir. Kırmızı algler, diğer iki alg sınıfından farklı olarak kırmızı renginden sorumlu fikobiliproteinleri içermektedir (Øverland vd., 2019).

Protein içeriği türlere göre farklılık göstermekte olup, genel olarak kahverengi alglerin protein içeriğinin (kuru ağırlıkta %3-15), kırmızı ya da yeşil alglerle (kuru ağırlıkta %10-47) kıyaslandığında daha düşük olduğu görülmektedir (Mabeau ve Fleurence, 1993). Kahverengi makroalgler aljinat, sülfatlanmış fukoidanlar ve laminarin; yeşil makroalgler, ksilan ve sülfatlanmış galaktan (ulvan) içerirken, kırmızı makroalgler, agar, karragenan, ksilan, sülfatlanmış galaktanları içermektedir. Kahverengi alglerin çözünür diyet lif içeriği, kırmızı ve yeşil alglere göre genellikle daha yüksektir (Øverland vd., 2019). Genel olarak makroalgler düşük yağ (%1-3) içeriğine sahiptir (Mabeau ve Fleurence, 1993). Alglerin yağ içerikleri düşük olmasına rağmen çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriklerinin kara bitkilerinden daha üstün olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, kırmızı algler, omega-3 ve omega-6 gibi çoklu doymamış yağ asitleri bakımından da zengindir (Kumari vd., 2010).

Gracilaria dura kırmızı bir makroalg olup, Rhodophyta şubesi, Gracilariaceae ailesi Gracilariales grubu, Florideophyceae sınıfına aittir. Bu tür 1830'da Greville tarafından tanımlanmıştır. *Gracilaria* spp. kırmızı makroalgi, tropikal sularda yetişmekte olup, hemen hemen yılın tüm mevsiminde gelişme göstermektedir. Genellikle 0,5-10 metre derinliklerde bulunmakta olup, 54 metreye varan derinliklerde yaşayabilen türleri de mevcuttur. *Gracilaria* türleri çeşitli deniz habitatları, koylar, resifler ve çamurluklar gibi korunaklı alanlarda bulunurlar. Geniş bir çevresel tolerans yeteneği bulunmakta olup 0,5-40 ppt tuzluluk aralığında yaşayan, düşük ve yüksek tuzluluk derecelerine dirençli türleri vardır (Torres vd., 2019).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO)'na göre, dünyada agar üretiminin %80'ninden fazlası *Gracilaria* türlerinden elde edilmektedir. Yüksek karbonhidrat içeriğinin yanı sıra *Gracilaria* türleri iyi bir protein kaynağıdır (Kazir vd., 2019; Torres vd., 2019). Bunun yanında çoklu doymamış yağ asitleri, amino asitler, antioksidatif pigmentler, diyet lif ve çeşitli mineral ve vitaminleri içermektedir. Kimyasal kompozisyonu türe, yetiştigi bölgeye, mevsimsel ve çevresel şartlara bağlı olarak değişebilmektedir (Kumar vd., 2008; Mohamed vd., 2012).

Gracilaria türlerinin sekonder metabolitlerinin sağlık üzerinde olumlu etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Özellikle *Gracilaria* türlerinden elde edilen biyoaktif peptitler ve fenolik bileşiklerin antioksidan, antibakteriyel, antihipertansif aktivite gibi birçok biyoaktif özellik gösterdiği bildirilmiştir. Sahip olduğu bu biyoaktif özelliklerin, yüksek kolesterol, kanser, obezite gibi bazı hastalıkların tedavisi ve önlenmesinde iyileştirici özellik sergilediği ifade edilmiştir (Cunha vd., 2021; Torres vd., 2019).

Makroalglerden proteinler gibi değerli bileşenlerin ekstraksiyonunda yüksek ekstraksiyon verimi elde etmek önemli bir konudur. Ekstraksiyon, biyoaktif bileşiklerin bitkisel bir kaynaktan elde edilebildiği ana işlem olarak tanımlanmaktadır. Ekstraksiyon işleminin amacı, hedef bileşiği en yüksek miktar ve biyolojik aktivitede elde etmektir (Truong vd., 2019). Bu nedenle makroalglerin ekstraksiyonu sırasında protein kazanımını artırmak için protein molekülüne erişilebilirliği sağlamak gerekmektedir. Makroalglerin, hücre duvarındaki yüksek viskoziteli polisakkaritlerin, diğer makro ve mikro elementlerle olan iyonik etkileşimi proteinlerin ekstraksiyonunu engelleyebilmektedir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ile proteinlerin kolayca ekstrakte edilememesi, ekstraksiyon veriminin düşük olmasına neden olmaktadır. Son zamanlarda yoğun şekilde çalışılan enzim destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrases destekli ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyon, basınçlı sıvı ekstraksiyon ve yüksek hidrostatik basınç ile ekstraksiyon gibi yeni teknikler ile yüksek ekstraksiyon verimi elde edilebilmiştir (Gordalina vd., 2021; Kadam vd., 2013). Bu çevreye dost yeni ekstraksiyon tekniklerinden biri olan ultrases destekli ekstraksiyonda, ultrases uygulaması ile oluşan mikron ebatındaki oyukcuklar hücre duvarında bozunmaya ve parçacık boyutlarında küçülmeye neden olmaktadır. Böylece hücre içindeki bileşiklerin solvente geçişi kolaylaşmaktadır. Bu yöntem aynı zamanda ısıya duyarlı bileşiklerin üzerinde ısının oluşturduğu olumsuz etkinin azaltılması, ekstraksiyon veriminin artırılması, ekstraksiyonun kısa sürede sonuçlandırılması ve solvent tüketiminin daha az olması gibi bazı avantajlara sahiptir (Arslan vd., 2021; Gordalina vd., 2021; Hu vd., 2013; Kadam vd., 2013).

Yeni tekniklerden bir diğeri ise enzim destekli ekstraksiyondur. Alg hücre duvarının büyük oranda polisakkaritlerden oluşması nedeniyle hücre duvarı polimerlerinin

enzimatik yıkımlanmasında karbonhidraz enzimleri kullanılmaktadır. Bu enzimler, biyoaktif bileşiklerin açığa çıkarılmasını kolaylaştırmakta ve ekstraksiyon verimini artırmaktadır (Wang vd., 2010). Enzimatik yıkımlanma prosesi, mekanik ve kimyasal proseslere iyi bir alternatif olmasının yanı sıra çevre dostudur. Bu yöntem, çözücü miktarının azaltılması, ekstraksiyon süresinin kısaltılması, daha yüksek ekstraksiyon verimi ve üretim maliyetinin düşürülmesi gibi pek çok avantaja sahiptir (Kadam vd., 2013; Wijesinghe ve Jeon, 2012).

Ekstraksiyon verimi biyokütle/çözücü oranı, hücre duvarının yıkımlanması için uygulanan ön işlem, kullanılan çözücü ve ekstraksiyon zamanı gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Bu koşulların alg yapıdan proteinlerin ekstraksiyonu üzerine etkisini araştırmak için oldukça yoğun çalışma yapmak gerekebilir. Bu nedenle yanıt yüzey metodolojisi (Response Surface Methodology, RSM), en az düzeyde zaman ve kaynak tüketimi ile deneysel koşulların optimize edilmesini sağlayan istatistiksel bir araç olarak kullanılabilir. Yanıt yüzey metodolojisi, basit deneysel modellerin kullanılarak sistemin modellenmesini, sistem yanıtını etkileyen çok sayıda değişkenin bir arada ve eşzamanlı olarak incelenebilmesini ve prosesin işlem parametrelerinde değişime verdiği yanıtın en az sayıda deneme yapılarak en iyi şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2010).

Bu tez çalışmasının amaçları;

- (i) *Gracilaria dura*'nın kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi,
- (ii) *G. dura*'nın protein çözünürlüğü ve zeta potansiyeli üzerine pH'nın etkisinin araştırılması,
- (iii) *G. dura*'dan proteinlerin ultrases destekli enzimatik ekstraksiyonunda ekstraksiyon koşullarının yanıt yüzey metodolojisi ile optimizasyonunun gerçekleştirilmesi,
- (iv) Ekstraksiyon koşullarının protein içeriği, toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite üzerine etkisinin araştırılması,
- (v) Optimum noktada elde edilen protein ekstraktlarının su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi, emülsiyon stabilitesi, emülsiyon aktivitesi, köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi gibi teknofonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve
- (vi) Proteinlerin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile tanımlama çalışmalarının gerçekleştirilmesidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yaklaşık 9.800 türü mevcut olan makroalgler, sığ kıyı suları dışında 180 metre derinliğe kadar derin deniz alanlarında yetişebilmektedir (Mayakrishnan vd., 2013; Mouritsen, 2013). Biyolojik aktiviteye sahip ikincil metabolitlerin büyük bir çeşidini üretme yeteneğine sahip olan makroalgler, biyoaktif bileşenlerin ana kaynaklarından biri olarak tanımlanmaktadır (Gümüş ve Ünlüsayın, 2016). Bu biyoaktif bileşenler sırasıyla, polisakkarit (agaran, karragenan, aljinat, fukoidan, laminarin, ulvan, selüloz), protein, lipit, vitamin, mineral, fenolik bileşikler (florotaninler ve bromfenoller), pigmentler (klorofil, karotenoid ve fikobiliprotein), nitrojen bileşikleri (alkaloidler) ve terpenoidlerdir (diterpenler) (Holdt ve Kraan, 2011; MacArtain vd., 2007; Matanjun, vd., 2009; Torres vd., 2019; Sudhakar vd., 2019). Makroalgler kalsiyum, magnezyum, sodyum, fosfor, potasyum, çinko ve iyot, gibi birçok mineral bakımından da zengindir (Lordan vd., 2011).

Makroalgler pigmentasyon yapılarına göre yeşil (Chlorophyceae), kırmızı (Rhodophyceae) ve kahverengi (Phaeophyceae) olarak 3'e ayrılmaktadır (Alves vd., 2013; Garson, 1989). Makroalgler arasında kırmızı algler yaklaşık 6.000 türe sahiptir ve çoğunlukla çok hücreli makroalglerden oluşan büyük bir grubu temsil etmektedir (Kumar, 2008). Kırmızı renklerinden sorumlu fikobilinlerin varlığı ile karakterize olurlar (Bleakley ve Hayes, 2017). Tallusları ipliksi, silindirik, yapraksı ya da disk şeklinde yassı olabilmektedir. Genel olarak tropikal ve ılık sularda yayılış gösteren bu canlıların alglerin en gelişmiş grubu olduğu bilinmektedir (Cirik ve Cirik, 2011).

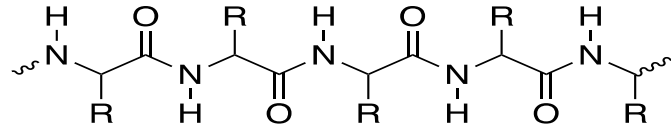
2.1 *Gracilaria* spp.'nin Kimyasal Kompozisyonu

Gracilaria spp. protein, karbonhidrat, çoklu doymamış yağ asitleri, mineral ve vitaminlerin (B2, C, E) yanı sıra fenolik asitler, diterpen, bromfenol, sulfonik, asit, oksilipin, steroid, karotenoid, ksantofil, klorofil, fikobilinler ve mikosporin benzeri amino asitler içermektedir. Karbonhidrat içeriği yüksek olan *Gracilaria* türlerinin ticari agar üretiminde önemli bir paya sahip olduğu bilinmektedir. Hücre duvarında çözünür ve çözünmez formda kompleks karbonhidratlar diyet lif olarak bulunmaktadır. Bazı türlerin mineral içeriğinin (Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Ni, I, P) %40'a kadar çıktığı bilinmektedir. *Gracilaria* türlerinin protein içeriği genel olarak (%5,6-24) arasında değişmektedir (Chan ve Matanjun, 2017; Francavilla vd.,

2013; Gressler vd., 2010; Wen vd., 2006). Ayrıca *Gracilaria* türlerinde serbest formda bulunan aspartik asit, alanin, glutamik asit, glutamin, glisin, prolin, serin ve treonin gibi amino asitler bulunmaktadır. Bu bileşikler stres koşullarında birikmekte ve algin tipik aromasını oluşturmaktadır. Bunların yanı sıra kırmızı alglere özgü fikobiliproteinler, fotosenteze yardımcı pigmentler olarak işlev gören proteinlerdir. Fikobiliproteinler, fikoeritrin, fikosiyenin ve allofikosiyenin olarak gruplandırılabilirler. Genel olarak *Gracilaria* spp.'nin morfoloji, anatomi, büyüme, üreme gibi fizyolojisindeki değişiklikler ve kimyasal bileşimi, suyun sıcaklığı ve tuzluluğu, substrat türü, ışık yoğunluğu, besin elementleri ve biyotik faktörlere bağlı olarak değişim gösterebilmektedir (Burtin, 2003; Torres vd., 2019). Chan ve Matanjun (2017), *Gracilaria changii* makroalginin kimyasal kompozisyonunu ve fizikokimyasal özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında, toplam diyet lif %64,74±0,82 ve mineral içeriğini %40,30±0,81 oldukça yüksek oranlarda belirlemiş olup, protein içeriğini ise %12,57±1,31 olarak rapor etmişlerdir. Buna karşın yağ içeriğinin %0,30±0,02 diğer bileşenlere göre oldukça düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Rasyid vd. (2019) *Gracilaria gracilis* makroalginin kimyasal kompozisyonunu; %63,13 karbonhidrat, %27,48 diyet lif, %10,86 protein, %6,78 kül ve %0,18 yağ olarak belirlemişlerdir. Benjama ve Masniyom (2012) ise *Gracilaria tenuistipitata*'nın kuru ağırlıkta %21,6 ve *Gracilaria fisheri*'nin kuru ağırlıkta %11,6 protein içeriğine sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Diğer taraftan Kazir vd. (2019), *Gracilaria dura* alginden elde edilen proteinlerin esansiyel amino asitler içermesinden dolayı insan beslenmesinde önemli olabileceğini belirtmişlerdir.

2.2 Algal Proteinler

"Protein" kelimesi proteinlerin yaşamı sürdürmedeki temel rolleri nedeniyle "ilk" veya "birincil" anlamına gelen Yunanca bir kelimedenden türetilmiştir (Branden ve Tooze, 1999). Proteinler karbon, hidrojen, oksijen, nitrojen ve genellikle kükürt içeren, peptit bağları ile birbirine bağlanmış amino asit kombinasyonlarından oluşan karmaşık organik bileşiklerdir. Ana zincir atomu bir karbon atomudur ve NH grubu ile karbonil grubu C=O, karbon atomuna bağlıdır (Branden ve Tooze, 1999; Boye ve Barbana, 2012). Proteinlerin çoğu, amino (-NH₂) ve hidroksil (-COOH) gruplarının peptit (amid) bağlarıyla bağlanmasıyla oluşmaktadır (Şekil 2.1), (Branden ve Tooze, 1999).



Şekil 2.1. Peptit bağlarıyla birbirine bağlanmış protein molekülü

Proteinler, peptit zincirlerinin konformasyonuna göre birincil, ikincil, üçüncül ve kuaterner yapı olarak sınıflandırılmaktadır. Amino asitlerin doğrusal dizileri, birincil yapı olarak ifade edilir. Doğrusal amino asit dizileri bir polipeptit etrafını sararak α -heliks, 3_{10} -heliks, β yaprağı ya da rastgele katlanarak ikincil yapıları oluşturur. İkincil yapılar, hidrojen bağları ile kararlı hale gelmiştir. Proteinler, termodinamik kararlılığı sağlamak için ikincil yapıları, Wan der Valls bağları, hidrojen bağı ve disülfid çapraz bağlarıyla ve elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler ile üçüncül yapı olarak yeniden düzenlerler. Sonuncusu olan kuaterner yapı iki veya daha fazla alt birimin kovalent olmayan bağlar tarafından kararlı hale getirilmesiyle oluşturulan dördü yapılarıdır (Boye ve Barbana, 2012; Damodaran, 2017).

Amino asitler, asidik, bazik, sülfür içeren, hidroksilik, hidrofobik, alifatik ya da amidik olarak sınıflandırılabilir. Belirli bir proteindeki amino asit sayısı ve tipi farklı pH değerlerinde proteinin boyutunu ve net yükünü belirlemektedir. Proteinlerin molekül ağırlığı, içerdiği amino asitlerin sayısına bağlı olarak 10.000 ile 1 milyon dalton arasında değişmektedir. Solüsyondaki tuz varlığı ve pH değeri gibi çevresel şartlara göre proteinin net yükü değişebilmektedir. Proteinlerin izoelektrik noktaları net yükün sıfır olduğu pH değeri olarak tanımlanmaktadır. Proteinlerin bu iki özelliği, ekstraksiyonda kullanılan işleme koşullarında kritik rol oynamaktadır (Boye ve Barbana, 2012).

Proteinlerin bir diğer özelliği de çözünürlükleridir. Çözünürlüklerine göre proteinler, suda çözünen (albümin), tuzlu suda çözünen (globülin), alkolde çözünen (prolamin), asit ve alkali koşullarda çözünen protein (gluten) olarak sınıflandırılmaktadır (Boye ve Barbana, 2012).

2.2.1 Protein ekstraksiyonu

2.2.1.1 Proteinlerin enzimatik ekstraksiyonu

Kırmızı alglerin hücre duvarı büyük oranda selüloz, hemiselüloz karragenan ve agardan oluşmaktadır (El Gamal., 2010; Wijesinghe ve Jeon, 2012). Selüloz bitkisel dokularda en fazla bulunan karbonhidrat polimeridir ve yıkımlanması oldukça zordur. Hücre duvarında bulunan bu kompleks karbonhidratların yıkımlanmasındaki zorluklar biyolojik matrise erişimi zorlaştırmakta ve ekstraksiyon etkisini azaltabilmektedir. Bu noktada enzimatik ekstraksiyon mekanik ve kimyasal ekstraksiyon prosedürleri için önemli bir alternatif olabilmektedir. Alg hücre duvarında bulunan polisakkarit yapıya en uygun enzim ile muamele etmenin enzimatik ekstraksiyon etkisini artırabileceği ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra enzimatik ekstraksiyon verimini etkileyen diğer önemli parametreler sırasıyla seçilen ekstraksiyon solventi, partikül boyutu, sıcaklık, zaman, pH, enzimin substrata oranı, solventin örnek miktarına oranı ve ekstraksiyon süresidir (Wijesinghe ve Jeon, 2012). Enzim destekli ekstraksiyon uygulamalarında kullanılan karbonhidraz ve proteaz enzimleri proteinler ve şekerler ile fenolik bileşikler arasındaki kompleks bağları koparmaya yardım etmektedir. Böylece ekstraksiyonda enzimlerin kullanılması ekstraksiyon veriminin artırmasının yanı sıra, ekstraktlarda bulunan polifenol içeriğini, antioksidan aktiviteyi ve protein sindirilebilirliğini de arttırmaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2013; Kadam 2013; Suwal vd., 2019; Wang vd., 2010; Wijesinghe ve Jeon, 2012). Örneğin, Suwal vd. (2019), *Palmaria palmata* ve *Solieria chordalis* kırmızı makroalglerinden elde edilen antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu üzerine polisakkaridaz enzimlerinin etkisini araştırdıkları çalışmalarında, hemiselülaz ve selülaz enzimlerinin protein ekstraksiyonunu artırdığını belirlemişlerdir. Aynı çalışmada selülaz ve hemiselülaz enzimlerinin birlikte uygulandığı örneklerde, enzimsiz uygulamalara göre fenolik madde miktarını %36-58 oranında artırdığı sonucuna varılmıştır. Enzimatik ekstraksiyon uygulamalarında yaygın olarak kullanılan enzimlerden bazıları selülaz, β -karragenaz, agaraz, ksilinaz, β -glukanazdır (Bleakley ve Hayes, 2017; Harnedy ve FitzGerald, 2013; Kadam vd., 2013). Makroalglerden biyoaktif bileşiklerin eldesinde kullanılan bazı enzimler ve ekstraksiyon koşulları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Makroalglerden biyoaktif bileşiklerin eldesinde kullanılan enzimler ve ekstraksiyon koşulları (Kadam vd., 2015; Sutay-Kocabaş, 2021; Suwal vd., 2019).

Enzim	Sıcaklık, °C	pH	Enzim kompozisyonu
Viskozim	50	4,5	Arabanaz, selüloz, β -glukanaz, β -hemiselüloz ve ksilanaz
Selüloz	50	4,5	Selüloz, sellebioz ve daha yüksek glikoz polimerleri
Termamil	60	6	Isıya stabil α -amilaz
Ultraflo	60	7	Isıya stabil multiaktif β -glukanaz
Hemiselüloz	37	4,5	Ksilanaz ve endoglukanaz

Enzim destekli ekstraksiyon, çözücü miktarının azaltılması, ekstraksiyon süresinin kısaltılması, daha yüksek ekstraksiyon verimi ve üretim maliyetinin düşürülmesi, sıcaklık aralığının düşük olması, enzimlerin toksik olmayan yapıya sahip olması gibi pek çok avantaja sahiptir (Bleakley ve Hayes, 2017; Wijesinghe ve Jeon, 2012).

2.2.1.2 Ultrases destekli ekstraksiyon

Ultrases mekanik dalgaları, elektromanyetik dalgaların aksine, katı, gaz ve sıvı ortamlardan geçebilmekte, sıkıştırma ve gevşemelerle yayılabilmektedir. Yöntemin prensibi temel olarak, sıvı içerisine gönderilen ses dalgalarının molekülleri titreştirmesi ve bu titreşimin komşu moleküle aktarılması esasına dayanmaktadır. Sıkıştırma ile birbirine yaklaşan moleküller gevşeme ile uzaklaşmakta ve uzaklaşan moleküller arası çekim sonucu hava kabarcıkları meydana gelmektedir. Bu gaz kabarcıklarının birbirine yaklaşması ile ani patlaması kavitasyon bölgesinde yüksek bir kesme etkisine ve türbülansın oluşmasına neden olmaktadır. Ultrases uygulaması, düşük yoğunluklu-yüksek frekanslı (100 kHz-1 MHz) ve yüksek yoğunluklu-düşük frekanslı (20-100 kHz arasında) ultrases olmak üzere iki farklı kategoriye ayrılabilir. Diğer taraftan yüksek yoğunluklu-düşük frekanslı (20-100 kHz arasında) ultrases uygulaması, hücre duvarı ve zarının bozulması için uygulanan frekans aralığıdır. Ultrases, basınç elektriği ile (piezoelektrik) ya da yüksek enerji titreşimleri oluşturan manyetik sıkıştırmalı dönüştürücülerle (transdüser) üretilmektedir. Manyetik sıkıştırmalı dönüştürücülerde başlangıç olarak elektrik enerjisi, voltaj ve akım halinde transdüsera uygulanmakta, transdüserde bu enerji mekanik enerjiye dönüştürülmekte, transdüser tarafından yayılan ses dalgaları bir akustik enerji

oluşturmakta ve son olarak da sıcaklık ve basınç şartlarıyla oluşan kavitasyon baloncuklarının oluşturduğu kavitasyon enerjisi ortama yayılmaktadır. Bu etki, girdap ve iç difüzyon mekanizmalarıyla kütle transferini artırarak ekstraksiyon verimliliğini artırmakta ve biyolojik matristen biyoaktif maddelerin salınımını kolaylaştırmaktadır (Gordalina vd., 2021; Yüksel, 2013). Ultrases destekli ekstraksiyon, yüksek ekstraksiyon verimi, proses zamanının daha kısa olması, solvent tüketiminin az olması ve solvent penetrasyonunun yüksek olması gibi avantajlarının yanında daha düşük sıcaklıklarda uygulanabilir olması ısıya dayanaksız bileşiklerin ekstraksiyonunda uygulanabilmesini sağlamaktadır (Dang vd., 2017; Gordalina vd., 2021; Kadam vd., 2013).

2.3 Makroalglerin Antioksidan Aktivitesi

Antioksidanlar, oksidatif stres altındaki organizmaların oksidasyonunu durdurucu ya da erteleyici bileşiklerdir (Özcan vd., 2015). Makroalgler serbest radikal oluşumuna neden olan (ışık ve yüksek oksijen konsantrasyonları gibi) sert çevre koşullarına maruz kalmalarına rağmen önemli bir fotodinamik hasar göstermezler. Araştırmalar makroalglerin, UV radyasyonu gibi stres koşullarının geliştiği durumlarda hücre hasarına karşı koruyucu biyoaktif bileşikler ürettiğini ve bu bileşiklerin antioksidatif etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Biyoaktif proteinler antioksidan yeteneği olan amino asit kalıntıları nedeniyle antioksidatif özellik sergilemekte ve hücre hasarına karşı koruyucu rol oynamaktadır. Protein peptitlerinin antioksidatif özelliklerinin, amino asit kompozisyonu, yapısı ve hidrofobikliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Öte yandan, alg proteinlerinin ekstraksiyonu sırasında, değerli fitokimyasallar proteinler ile birlikte ekstrakte olabilmektedir. Örneğin, antioksidatif etkisinin olduğu bilinen polifenollerin proteinlere karşı yüksek affinitesi (eğilimi) birlikte ekstrakte edilmelerini kolaylaştırmakta ve protein ekstraktlarının insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerini artırmaktadır (Elias vd., 2008; Harnedy ve FitzGerald, 2011; Kadam vd., 2013; Kazir vd., 2019; Sarmadi ve Ismail, 2010).

Makroalglerin antioksidan aktivitesi klorofil, β -karoten, tokoferol gibi pigmentlerden, α -tokoferol, niasin, tiamin ve askorbik asit gibi vitaminlerden, polifenolik ve flavonoid gibi fenolik bileşiklerden, fosfolipidler, terpenoidler, peptidler ve diğer antioksidatif bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Bunların arasında fenolik bileşiklerin, alglerinin antioksidan potansiyellerinden sorumlu olan temel

aktif bileşenler olduğu ve fenolik bileşenler ile antioksidan kapasite arasında pozitif bir ilişki olduğu bilinmektedir (Balboa vd., 2013; Dinh vd., 2018; Duan vd., 2006).

Fenolik bileşikler, OH grubu ile bir ya da daha fazla aromatik halka içeren hidrokarbonlardır (Kadam vd., 2013; Paredes-López vd., 2010). Bu bileşikler bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitler olup, kuraklık, radyasyon, patojen ve çeşitli hastalıklar gibi stres koşulları altında üretilen ve bitki adaptasyonunda önemli olan bileşiklerdir (Dietrich ve Nikfardjam, 2009; Szajdek ve Borowska, 2008). Fenolik bileşikler, antioksidatif, antiproliferatif, antibiyotik, antidiyabetik, antialerjik ve antiinflamatuvar, antikanser gibi biyoaktif özelliklere sahiptir (Dang vd., 2017; El Gamal, 2010; Gupta ve Abu-Ghannam, 2011; Mohamed, 2012).

Makroalglerden elde edilen özütlerin antioksidan bileşenlerin zengin bir kaynağı olduğu rapor edilmiştir (Gümüş vd., 2019). Örneğin Narasimhan vd. (2013), *Enteromorpha antenna*, *Enteromorpha linza* ve *Gracilaria corticata* ekstraktlarının, antioksidan aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, sırasıyla toplam fenolik madde içeriğini, $1,82 \pm 0,05$ GAE mg/g, $0,91 \pm 0,03$ GAE mg/g, $1,51 \pm 0,02$ GAE mg/g olarak belirlemiş ve antioksidan aktivite ile fenolik madde içeriği arasında korelasyon olduğunu ifade etmişlerdir.

2.3.1 Antioksidan aktivite etki mekanizması

Antioksidan aktivite, lipid kompozisyonu, antioksidan konsantrasyonu, sıcaklık, oksijen basıncı ve diğer antioksidan maddelerin varlığı gibi değişkenlere bağlı olabilmektedir (Pokorny vd., 2001).

Antioksidan etki mekanizması basitçe aşağıda gösterildiği gibidir:

Başlama aşaması: $ROO\cdot + AH \rightarrow ROOH + A\cdot$

Gelişme aşaması: $ROO\cdot + A\cdot \rightarrow ROOA$

Sonlanma aşaması: $A\cdot + A\cdot \rightarrow A-A$

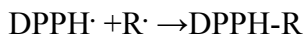
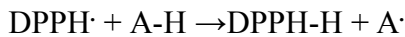
Antioksidanlar, birincil veya zincir kırıcı antioksidanlar ve ikincil veya önleyici antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar lipid radikali ile reaksiyona girerek onları daha stabil ürünlere dönüştürür. İkincil

antioksidanlar ise çeşitli mekanizmalar ile zincir başlatıcı reaksiyonları ertelerler. Bu mekanizmalar, metal iyonlarını bağlama, oksijen yakalama, hidroperoksitlerin radikal olmayan türlere ayrışması, UV absorblama ve singlet oksijeni inaktif hale getirme şeklindedir. Antioksidanların etkili olabilmesi, genellikle metal iyonları, askorbik asit gibi indirgeyici ajanlar tokoferoller veya diğer fenolikler gibi ikincil bir komponentin varlığına bağlı olabilmektedir (Gordon, 1990).

2.3.2 Antioksidan aktivite tayin yöntemleri

Genellikle reaksiyon hızı veya birim başına süpürme yüzdesi olarak ifade edilen antioksidan aktivite, reaktif türlerin söndürülmesinde antioksidan etkinin kinetiği ile ilgilidir. Antioksidan kapasite ise antioksidanlarla reaktif türlerin termodinamik dönüşüm etkinliğidir. Antioksidan aktivite ölçümleri, ölçülen antioksidanın tipine göre lipofilik, hidrofilik, enzimatik olan ve enzimatik olmayan; deney ortamının karakterine göre, sulu veya organik çözücülü, direkt veya indirekt, hücre içi ya da hücre dışı; reaktifin tipine göre, radikalik ya da radikalik olmayan; etki mekanizmasına göre, hidrojen atom transfer (HAT) ya da elektron transfer (ET) gibi farklı yaklaşımlarla sınıflandırılabilir.

Oksidasyonu engelleyen antioksidanların mekanizmalarından birisi de serbest radikal süpürme etkisi olan 2,2-difenil-1 pikrilhidrazil (DPPH) yöntemidir (Apak vd., 2004). Bu yöntemde, kararlı ve sentetik bir radikal olan DPPH kullanılarak antioksidanın serbest radikali yakalama yeteneği ölçülerek antioksidan aktivite tanımlanmaktadır (Pokorny vd., 2001). Antioksidan-DPPH radikali reaksiyon mekanizması aşağıda olduğu gibidir (Gordon, 1990):



DPPH yönteminin basit ve hızlı olması, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi gibi avantajları vardır. Buna karşın, DPPH sadece alkol gibi organik ortamda çözünürken suda çözünmemesi, hidrofilik antioksidanların yorumlanmasında önemli bir sınırlamaya neden olmaktadır (Büyüktuncel, 2013).

Bir diğerk antioksidan aktivite tayin yöntemi ise araştırma grubunun “Kuprik İyon İndirgeme Antioksidan Kapasite Tayini” olarak adlandırdığı CUPRAC yöntemidir (Apak vd., 2004). Bu yöntem, elektron transferine dayalı tüm antioksidan türlerinin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Elektron transferine dayalı spektrofotometrik analizler, oksidanın antioksidandan bir elektron almasıyla oksidantta görülen renk değişimi esasına dayanmaktadır. Renk değişiminin derecesi, belirli bir dalga boyunda absorbansın artmasına ya da azalmasına bağlı olarak örnekteki antioksidan konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir. CUPRAC yöntemi, fenolik asitler, hidroksisinamik asitler, flavonoidler, polifenoller, karotenoidler, antosiyaninler, tiyoller, C ve E vitaminleri ayrıca sentetik antioksidanların ölçümünü yapabilen basit ve çok yönlü bir antioksidan kapasite metodudur. Bu yöntem, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin veya Nc)’in Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)-neokuproin kompleksinin (Cu (II)-Nc), 450 nm’de maksimum absorbans veren bakır(I) neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmasına dayanmaktadır (Apak vd., 2004; Büyüktuncel, 2013). CUPRAC yönteminin, kullanılan reaktifin seçici olması, basit şekerler ve sitrik asit ile okside olmaması, tiyol tipi antioksidanları okside etmek için hızlı olması, sisteinin indirgenme reaksiyonunun, Cu (II) katalizörlüğünde hızlanması, reaktifin kararlı ve kolay temin edilebilir olması gibi avantajları vardır (Büyüktuncel, 2013).

2.4 Algal Proteinlerin Teknofonksiyonel Özellikleri

Proteinlerin fonksiyonel özelliklerini, aminoasit kompozisyonları, protein hidrofobikliği, hidrofobiklik/hidrofiliklik oranı, ekstraksiyon ve kurutma gibi işlemlerde kullanılan yöntemler ve parametreler etkileyebilmektedir (Yavuz ve Özçelik, 2016). Proteinler su bağlama, jelleşme, çökme, köpük oluşturma ve emülsifiye etme gibi özellikleri nedeniyle gıda uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar.

2.4.1 Protein çözünürlüğü

Protein çözünürlüğü, iyonik güç, solvent tipi, sıcaklık, solventin pH değeri, partikül boyutu ve prosesleme koşulları gibi dış faktörlerden etkilendiği gibi, proteinin molekül ağırlığı, amino asit dizilimi ve amino asitlerin nonpolar ve polar grupları içermesi, amino asit içeriğinin hidrofobik ve hidrofilik özellikte olmasından da etkilenebilmektedir (Zayas, 1997). Protein çözünürlüğü protein-protein (hidrofobik) ve protein-çözücü (hidrofilik) etkileşimleri arasındaki denge olarak da tanımlanmaktadır (Lam vd., 2016). Moleküller arasındaki elektrostatik itme gücü, hidrofobik etkileşimlerden daha fazla ise çözünürlük artmaktadır. İzoelektrik noktadan daha yüksek ya da daha düşük pH değerlerinde de protein-su etkileşimi artmaktadır. Protein molekülü izoelektrik noktada en düşük çözünürlüğü sergilemektedirler. Her bir protein fraksiyonunun kendine has izoelektrik noktası vardır, bu değerler fraksiyon çeşidine ve yapısına göre pH 4-9 aralığında değişmektedir (Zayas, 1997; Yavuz ve Özçelik, 2016). İzoelektrik noktada toplam net yük sıfır olduğundan, itme kuvveti çok düşüktür. Genel olarak pH 6'nın altındaki değerlerde alglerin protein çözünürlüğü azalmaktadır. Proteinlerin, yüksek çözünürlük ve iyi tekno fonksiyonel özellikleriyle geri kazanılması için ılımlı ekstraksiyon teknikleri gerekmektedir (Schwenzfeier vd., 2011).

Protein izolatlarının, fonksiyonel özelliklerinin gıdalarda başarılı bir şekilde uygulanabilmesi için, içeceklerde, köpüklerde, emülsiyonlarda proteinin çözünür olması gerekmektedir. Bitkisel proteinler farklı çözünürlük ve molekül ağırlığına sahip albümin, globülin, prolamin ve glutelinler gibi farklı protein fraksiyonlarından oluşmaktadır (Schwenzfeier vd., 2011; Yavuz ve Özçelik, 2016). Protein-protein, protein-çözücü etkileşimleri sonucu oluşan çözünürlük, proteinlerin bir sıvı içerisinde homojen dağılım gösterebilmesi bakımından önem taşımakta olup, proteinlerin yüksek çözünürlük değeri, emülsiyon, köpürme, jelleşme ve çırpılma gibi fonksiyonel özelliklerinde iyileşme sağlaması nedeniyle önemlidir (Özcan ve Delikanlı, 2011; Zayas, 1997).

Proteinlerin çözünürlüğü alkali ortamda arttığından bitki kaynaklarından protein ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan etkili ve uygulanabilir bir diğer yöntem alkali çözündürmedir. Bitki hücrelerindeki proteinler, hidrofobik yapıları ve protein molekülleri arasındaki disülfid bağları nedeniyle suda neredeyse hiç çözünmezler.

Yüksek alkali konsantrasyonunun, hidrojen bağlarını parçalamaya ve hidrojeni, karbolik ve sülfat gruplarından ayırmaya yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında indirgeyici ajanların dahil edilmesi makroalgal hücre duvarına bağlı proteinlerin disülfid bağlarının azalmasına bağlı olarak, alkalide çözünür proteinlerin verimliliğini artırdığı belirtilmiştir (Harnedy ve FitzGerald, 2013; Shen vd., 2008).

2.4.2 Su ve yağ tutma kapasitesi

Şişme özelliği olarak da bilinen hidrasyon, 1 gram kuru proteinin bağladığı suyun gram olarak miktarı şeklinde tanımlanmaktadır (Özcan ve Delikanlı, 2011). Proteinler, yüksek su ve yağ absorplama özellikleri nedeniyle, nem kayıplarını azaltmakta ve tekstürü geliştirerek gıda ürünlerinin raf ömrünü ve kalitesini arttırmaktadırlar (Benelhadj vd., 2016). Proteinin su ve yağ bağlama yeteneği, sızıntı ve pişirme kaybını önlemede de önemlidir (Kiosseoglou ve Paraskevopoulou, 2011).

Zayas (1997), protein konformasyonunun ve amino asit kompozisyonunun, protein yüzeyinde bulunan hidrofilik ve hidrofobik grupların bulunmasının, hidrofobik yan zincirleri ile yağlar arasındaki hidrofobik etkileşimlerin, bu yan zincirlerle su etkileşimlerinin olabileceğini, bu durumların yağ tutma ve su tutma kapasitesini etkileyeceğini ifade etmiştir.

2.4.3 Emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi

Emülsifikasyon iki ya da daha fazla birbiri içinde çözünmeyen ve sürekli fazın içinde damlacık halinde dağılmış fazdan oluşan sistemdir. Emülsiyonlar, genellikle su içinde yağ, ya da yağ içinde su emülsiyonları olarak gruplandırılmaktadır. Emülsiyonlar termodinamik olarak stabil olmadığından zamanla damlacıkların bütünlüğü bozulur ve sıvı tabaka ile yağ birbirinden ayrılır. Proteinler, yağ damlacıklarının etrafını viskoelastik bir filmle şekillendirerek su/yağ ara yüzünü adsorbe eder ve emülsifiyer olarak rol oynarlar. Bununla beraber proteinlerin hem hidrofilik hem de hidrofobik yapıları bulundurması, yağ fazı ve sulu faz arasındaki arayüzü stabilize etmesi sebebiyle gıda uygulamalarında, emülsifiye edici ajanlar, doku değiştiriciler ve/veya su/yağ absorpsiyonunu arttırıcılar olarak kullanılabilirler (Karaca vd., 2011; Kiosseoglou ve Paraskevopoulou, 2011; Schwenzfeier vd., 2013b; Singhal vd., 2016).

Yağ moleküllerinin proteinle olan etkileşimi yağ ile protein arasında oluşan hidrofobik etkileşime dayanmaktadır. Emülsiyonların ısı ile muamalesi protein agregatlarının kümelenmesini artırır ve bu durumda protein-protein etkileşimi daha fazla olur. Kümelenmeyle birlikte protein ağının büzülmesi sonucu bir miktar yağ dışarı atılır. Yağ damlacıklarını stabilize etmek için parçacıklar arası çekim ve elektrostatik yükün azaltılması, hidrofobik etkileşimlerin değiştirilmesi, flokulasyonun azaltılması gibi çeşitli yollarla emülsiyon stabilitesi sağlanabilir (Joshi vd., 2012; Zayas, 1997; Wu vd., 2017).

Proteinlerin emülsiyon özelliklerini tanımlamak için emülsiyon kapasitesi, stabilitesi ve aktivitesi ifadeleri kullanılmaktadır. Emülsiyon kapasitesi, protein çözeltisinin yağı emülsifiye edebilme kabiliyetidir ve 1 gram proteinin spesifik koşullarda oluşturduğu yağ miktarı ile gösterilmektedir. Emülsiyon stabilitesi, emülsiyon damlacıklarının bulanıklık oluşturmada çözünür kalma kapasitesi olarak tanımlanırken, emülsiyon aktivitesi proteinin emülsiyon oluşturma yeteneği olarak bilinmektedir (Özcan ve Delikanlı, 2011). Emülsiyon stabilitesinde, proteinler ve polisakkaritler arasındaki etkileşim hem hidrofobik hem de hidrofilik yapılar oluşturabileceğinden emülsiyon stabilitesini arttırabilir. Proteinler ve polisakkaritler arasındaki bu karmaşık etkileşim, her bir molekülün esneklik, konformasyon yapısı, yük yoğunluğu, ortamın pH değeri, sıcaklık ve iyonik güç gibi fizikokimyasal şartlardan etkilenebilmektedir. Emülsiyon stabilitesinde önemli olan bir diğer faktör parçacık boyutudur. Daha küçük damlacıklar sistemde daha stabildir (Albano ve Nicoletti, 2018). Algal proteinlerin emülsiyon özelliklerinin araştırıldığı çalışmalardan biri olan Teuling vd. (2019) çalışmalarında alg proteinlerinin soya proteini, peynir altı suyu protein izolatlarından benzer ya da daha yüksek emülsiyon oluşturma kapasitesine sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

2.4.4 Köpürme kapasitesi ve stabilitesi

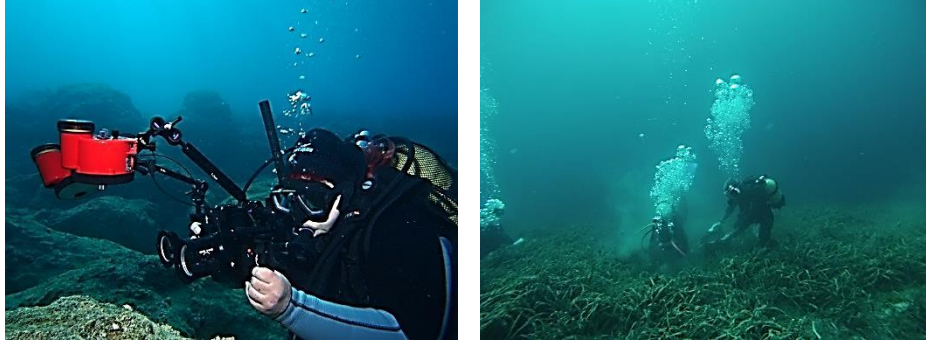
Köpük, sıvı veya katıdan meydana gelen bir sürekli fazın havayı (gaz fazını) çevrelemesi ile oluşan yapıya verilen isimdir. Köpük oluşurken proteinler, hava kabarcıkları ile sıvı faz ara yüzeyine yerleşir, bu ara-yüzeydeki protein fraksiyonları birbiri üzerine katlanır ve apolar kısımları hava yüzeyinde kalacak şekilde yönelir. Proteinlerin hava kabarcığı yüzeyine tutunmasıyla kısmi denatüre olmuş proteinler bir tabaka oluşturur ve hava kabarcıklarını enkapsüle ederler. Bu durum hava

kabarcıklarının bir araya gelmesini engellenerek köpük yapısını korur. Proteinlerin köpük oluşturma özellikleri incelenirken köpüğün kabarması, köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi en fazla kullanılan ifadelerdir (Yavuz ve Özçelik, 2016). Köpürme kapasitesi ile protein çözünürlüğü arasında pozitif bir ilişki olduğu ifade edilmiştir (Chen vd., 2019). Schwenzfeier vd. (2013a), alg çözünür protein izolatlarının köpürme özelliklerini inceledikleri çalışmalarında, izolatlarda polisakkaritlerin olmasının proteinopolisakkarit kompleksleri oluşturması nedeniyle ara yüzey özellikleri ve köpük kararlılıklarının saf proteinler gibi veya daha iyi olduğunu belirtmişlerdir.

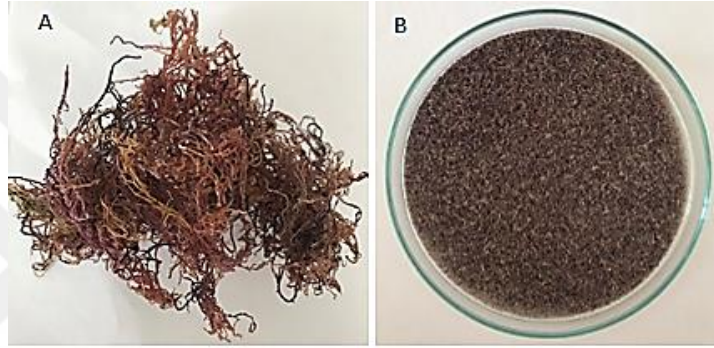


3. MATERYAL VE YÖNTEM

Gracilaria dura makroalginin toplanması, 119O149 numaralı ve "Türkiye Denizlerinden Toplanan Bazı Makroalg Örneklerinin Alternatif Protein Kaynağı Olarak Değerlendirilmesi: Biyoaktif Peptit Eldesi, Biyoaktif ve Teknofonksiyonel Özelliklerinin Araştırılması, Enkapsulasyonu ve Stabilité Çalışmaları" başlıklı 3501 TÜBİTAK projesi kapsamında T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü ve TC. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden alınan izinler çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Kırmızı makroalg *Gracilaria dura*, 28.06.2019 tarihinde proje ekibinde bulunan Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi öğretim üyelerinden Dr. Emine Şükran OKUDAN tarafından Çanakkale kıyılarında 0-1 metre derinliklerinde dalış yapılarak toplanıp tanımlanmıştır. Toplanan alglerin bir kısmı, tayin ve tanımlanmaları daha sonra laboratuvarda yapılmak üzere, deniz suyu ile hazırlanmış %4-6'lık nötralize formaldehit çözeltisinde kavanozlarda tespit edilmiştir. Alglerin tanımlama çalışmaları Olympus marka SZ×16 model stereo zoom ve B×51 model binoküler ışık mikroskopları ile gerçekleştirilmiştir. Toplanan algler sualtında plankton bezlerinden yapılmış (70×50 cm) ağzı büzgülü torbalar içine konulmuştur. Toplanan alg örnekleri analiz edilmeden önce epifitlerinden, içlerinde bulunabilecek kaya, kum ve çamurlardan arındırılmak amacıyla ayıklanıp tatlı su ile yıkanmıştır. Ayıklanan alg örnekleri, doğrudan güneşe tabi tutulmadan gölgelik bir alanda, yaklaşık 30 °C sıcaklıkta kurutulmuştur. Kurutulan algler bir laboratuvar tipi öğütücü (Waring 8011 Eb Blender, Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, ABD) kullanılarak öğütüldükten sonra, 500 µm mesh elek kullanılarak elenip elek altında kalan partikül çapı <500 µm olan toz partiküller güneş ışığı ve oksijen almayacak şekilde uygun olarak ambalajlanarak analizlere kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Rouxel vd., 2001). Şekil 3.1'de Dr. Emine Şükran Okudan tarafından alg örneklerinin toplanması sırasında çekilen fotoğraflar görülmektedir. Analizler için eleme işlemi sonucu elde edilen <500 µm çapındaki alg örnekleri kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. *Gracilaria dura*'nın toplama çalışmalarından görüntüler.



Şekil 3.2. Kurutulmuş *Gracilaria dura* (A) ve <500 µm partikül çapındaki öğütülmüş *Gracilaria dura* (B).

3.1 Kimyasal Kompozisyonun Belirlenmesi

Gracilaria dura'nın kimyasal kompozisyonu ilgili AOAC (Association of Official Analytical Chemists) metotları kullanılarak belirlenmiştir. Nem miktarı, 1 gram alg örneğinin 105 °C sıcaklıktaki etüvde 3 saat bekletildikten sonra yaş ve kuru ağırlıklar arasındaki farkın % nem olarak hesaplanması ile belirlenmiştir (AOAC 925.10, 1990). *G. dura*'nın % kül değeri, yakma fırınında 550 °C'de 8 saat süreyle yakılması sonucu elde edilen külün yakma öncesi örnek miktarına oranlanması ile hesaplanmıştır (AOAC (925.03, 1990). Yağ içeriği, Soxhlet ekstraksiyon metodu (AOAC 954.02, 1990) ve ham lif miktarı AOAC 978.10 metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Protein miktarı, Kjeldahl metodu (AOAC 950.48, 1990) kullanılarak, toplam azot miktarının 6,25 çevirme faktörü ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Karbonhidrat miktarı ise protein, yağ, kül, ham lif ve nem miktarının toplamının 100'den çıkarılması ile hesaplanmıştır. Bütün ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2 Protein Çözünürlüğü ve Zeta (ζ) Potansiyel Ölçümü

Gracilaria dura makroalginin protein çözünürlüğü deneyi Morr vd.'nin (1985) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Özetle 1 g alg örneği ile 50 ml 0,1 N NaCl çözeltisi karıştırılmıştır ve 0,1 N HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak pH 2'den 13'e 1'er artan pH değerlerine ayarlanmıştır. Çözeltiler 4.100 rpm'de 15 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen üst fazın protein içeriği Lowry yöntemi (Lowry vd. 1951) ile belirlenmiştir. Alg örneğinin her bir pH değerinde değişen % protein içeriği aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.1):

$$\% \text{ Protein çözünürlüğü} = \frac{\text{Supernatantın protein konsantrasyonu (mg/ml)} \times 50}{\text{Örneğin ağırlığı (mg)} \times \frac{\text{Örneğin protein miktarı (\%)}}{100}} \times 100 \quad (3.1)$$

Alg örneğinin pH 2'den 13'e kadar hazırlanan çözeltilerinin zeta potansiyel ölçümü zeta potansiyel ölçer cihaz (Zetasizer NanoZS90, Malvern Instruments, UK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3 Proteinlerin Enzim Destekli Ultrases Ekstraksiyonu

Gracilaria dura'dan proteinlerin ekstraksiyonunda ultrases uygulaması ile hemiselülaz enzim (Koninklijke DSM N.V, Heerlen, Hollanda) ilavesinin kombinasyonu uygulanmıştır. Öncelikle 0,5 g alg örneği ile 50 ml sitrat tampon çözeltisi (0,1 M, pH 4,5) ile karıştırılmıştır. Örnekler ultrases cihazı (Sonopuls HD 2200 ultrasonic homogeniser, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Almanya) kullanılarak %65 şiddette, 53 kHz frekansta ses dalgalarına deney tasarımıdaki süreler boyunca maruz bırakılmıştır. Ultrases sırasında örneklerin ısınmasını engellemek amacıyla, örneğin konulduğu falkon tüp, içinde su-buz karışımı bulunan bir beher içine konulmuştur. Ultrases uygulamasından sonra örneklerle, deney tasarımıdaki enzim/substrat oranını (E/S) sağlayacak şekilde, hemiselülaz enzim ilavesi gerçekleştirilmiştir. Ultrases uygulanmış ve enzim ilavesi gerçekleştirilmiş örneklerle, 35 °C'deki bir çalkalamalı su banyosunda (N-Biotek-303, Biotek Co., Ltd. Korea) 75 rpm'de deney tasarımıdaki süreler boyunca ekstraksiyon prosesi uygulanmıştır. Süre bitiminde enzim inaktivasyonunu gerçekleştirmek amacıyla 85 °C'deki bir su banyosunda 10 dakika boyunca tutulmuştur. Enzim inaktivasyonundan sonra örnekler 4.100 rpm'de 4 °C sıcaklıkta

20 dakika boyunca santrifüj cihazı kullanılarak (NF800R, Nüve, Ankara, Türkiye) santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra elde edilen üst faz ayrılarak, kalan çökelti kısma 50 ml saf su ilave edilmiş ve karışımın pH'sı 12'ye ayarlanmıştır. Belirli bir süre ve sıcaklık uygulamasında çalkalamalı su banyosunda tutulduktan sonra 4.100 rpm'de 4 °C'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve üst faz alınıp, diğer üst faz ile birleştirilerek karanlıkta -20 °C'de analizlere kadar muhafaza edilmiştir.

3.4 Protein Ekstraktlarının Protein İçeriğinin ve Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi

Ekstraksiyondan sonra elde edilen ekstraktların protein içeriğini belirlemek amacıyla Barbarino ve Lourenço (2005) tarafından uygulanan modifiye edilmiş Lowry yöntemi uygulanmıştır. Özetle 1 ml protein ekstraktı ile 3 ml %25'lik trikloroasetik asit (TCA) çözelti karıştırılarak 75 rpm'de çalkalamalı su banyosunda 4 °C'de 30 dakika boyunca tutulmuştur. Sonrasında 4.100 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen çökeltinin üzerine %10'luk TCA çözeltisi eklenmiş ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edildikten sonra üst faz uzaklaştırılmıştır. Kalan protein çökeltisi üzerine %5'lik TCA çözeltisinden 5 ml eklenip, aynı koşullarda tekrar santrifüj edildikten sonra, kalan çökeltinin üzerinde 0,1 N NaOH çözeltisinden 2 ml eklenmiş ve ekstraktların spektrofotometrik olarak protein miktarını belirlemek amacıyla, standart protein olarak sığır serum albüminin kullanıldığı Lowry yöntemi uygulanmıştır. Ekstraktların protein miktarı kuru ağırlıkta mg/g örnek olarak ifade edilmiştir.

Ekstraksiyon veriminin hesaplanması amacıyla Yücepe vd. (2018)'nin kullandığı aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (Eşitlik 3.2):

$$\text{Ekstraksiyon verimi, \%} = \frac{\text{Ekstraksiyondan sonra ekstraktın protein miktarı} \times \text{ekstraksiyondan sonra ekstraktın miktarı}}{\text{Ekstraksiyondan önce makroalgin protein miktarı} \times \text{Ekstraksiyondan önce makroalg miktarı}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.5 Protein Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Örneklerin toplam fenolik madde miktarı (TFMM) Toor ve Savage (2006)'ın metoduna göre belirlenmiştir. Özetle, 200 µl örnek ekstraktı, 1,5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi:H₂O (1:10) ve 1,2 ml %7,5'lik Na₂CO₃ çözeltisi ile karıştırılarak 90 dakikalık inkübasyon süresi sonunda bir UV-VIS spektrofotometre (Scilogex Sci-UV1000

Spectrophotometer, Scilogex, ABD) kullanılarak, 765 nm’de absorbansı köre karşı okunmuştur. Sonuçlar kuru ağırlıkta mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g örnek olarak ifade edilmiştir (Toor ve Savage, 2006).

3.6 Protein Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Örneklerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, DPPH ve CUPRAC yöntemleri uygulanmıştır.

3.6.1 2,2-difenil-1 pikrilhidrazil radikal yakalama (DPPH) metodu

Örneklerin antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla Kumaran vd. (2006) uyguladığı DPPH yöntemi uygulanmıştır. Özetle, 100 µl örnek alınarak üzerine 2 ml 0,1 mM DPPH (metanolde) çözeltisi ilave edilmiştir. On saniye çalkalama işleminden sonra oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika bekletilerek bir UV-VIS spektrofotometre kullanılarak, 517 nm’de absorbans okuması gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, kuru ağırlıkta Trolox eşdeğeri (TE)/g cinsinden ifade edilmiştir (Kumaran vd., 2006).

3.6.2 Bakır (II) iyonu indirgenme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) metodu

Örneklerin antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla, CUPRAC yöntemi uygulanmıştır (Apak vd., 2004). Özetle 100 µl örnek alınarak üzerine sırasıyla 1’er ml bakır (II) klorit, neokuprin ve amonyum asetat tampon çözeltileri, ardından 1 ml saf su eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra bir UV-VIS spektrofotometre kullanılarak, 450 nm’de absorbans okuması gerçekleştirilmiş ve sonuçlar mg TE/g kuru madde cinsinden ifade edilmiştir.

3.7 Protein Ekstraktının Teknofonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

Optimum ekstraksiyon koşullarında üretilen protein ekstraktlarının su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi, emülsiyon stabilitesi ve emülsiyon aktivitesi, köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi araştırılmıştır.

3.7.1 Su tutma kapasitesi

Örneklerin su tutma kapasitesi (g H₂O/g protein ekstraktı veya %) Kumar vd. (2014)'nin uyguladığı yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Özetle 0,1 g protein ekstraktı, 10 ml distile su ile karıştırılmıştır. Karışım 30 saniye boyunca, yüksek hızda vortekslenmiştir. Bu karışım 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4.100 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Üst faz uzaklaştırılmış ve çökeltiyi içeren tüp tartılmıştır. Örneklerin su tutma kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.3):

$$\text{Su Tutma Kapasitesi} = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \quad (3.3)$$

Burada; W₀: protein ekstraktının ağırlığı, W₁: protein ekstraktı ve tüpün ağırlığının toplamı, W₂: çökelti ve tüpün ağırlığının toplamı.

3.7.2 Yağ tutma kapasitesi

Örneklerin yağ tutma kapasitesi (g yağ/g protein ekstraktı veya %) Kumar vd. (2014)'nin uyguladığı yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Özetle, 1 g protein ekstraktı 5 ml ayçiçek yağı ile karıştırılmıştır. Karışım 4.100 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra, üst faz uzaklaştırılmış ve çökeltiyi içeren tüp tartılmıştır. Örneklerin yağ tutma kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.4):

$$\text{Yağ Tutma Kapasitesi} = \frac{O_2 - O_1}{O_0} \quad (3.4)$$

Burada; O₀: protein ekstraktının ağırlığı, O₁: protein ekstraktı ve tüpün ağırlığının toplamı, O₂: çökelti ve tüpün ağırlığının toplamı.

3.7.3 Emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi

Protein ekstraktlarının emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi Tan vd. (2014)'nin uyguladığı yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Özetle bir beher içinde 0,1 g protein ekstraktı ile 10 ml distile su karıştırılmıştır. Daha sonra bir yüksek performanslı homojenizatör kullanılarak 2 dakika boyunca karıştırılmıştır. Homojenizasyon işleminden sonra, karışıma 10 ml ayçiçek yağı ilave edilmiştir ve tekrar 2 dakika

boyunca yüksek performanslı homojenizatör ile homojenize edilmiştir. Karışım bir falkon tüpe alınarak 2.000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Emülsiyon tabakanın yüksekliği kaydedilmiş ve emülsiyon aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.5):

$$\text{Emülsiyon aktivitesi (\%)} = \frac{\text{Emülsiyon olmuş tabakanın yüksekliği}}{\text{Tüp içeriğinin yüksekliği}} \times 100 \quad (3.5)$$

Emülsiyon stabilitesini belirlemek için, örnekler 80 °C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika boyunca tutulmuştur. Daha sonra 2.000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Emülsiyon stabilitesi değeri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.6):

$$\text{Emülsiyon stabilitesi (\%)} = \frac{\text{Kalan emülsiyon olmuş tabakanın yüksekliği}}{\text{Orijinal emülsiyon olmuş tabakanın yüksekliği}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.7.4 Köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi

Protein ekstraktlarının köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi Jarpa-parra vd. (2014)’nin uyguladığı yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Özetle 0,02 mg protein ekstraktı 20 ml distile su ile karıştırılmıştır ve homojenizasyondan önce karışımın hacmi kaydedilmiştir. Daha sonra yüksek performanslı homojenizatör kullanılarak 2 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan sonra karışımın hacmi kaydedilmiştir. Köpürme kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 3.7):

$$\text{Köpürme kapasitesi (\%)} = \frac{\text{Çırpma işleminden sonra hacim (ml)} - \text{Çırpma işleminden önce hacim (ml)}}{\text{Çırpma işleminden önce hacim (ml)}} \times 100 \quad (3.7)$$

Homojenizasyon adımından sonra, karışım oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir ve daha sonra karışımın hacmi kaydedilmiştir. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak köpürme stabilitesi hesaplanmıştır (Eşitlik 3.8):

$$\text{Köpürme stabilitesi (\%)} = \frac{\text{Bekletme işleminden sonra hacim (ml)} - \text{Çırpma işleminden önce hacim (ml)}}{\text{Çırpma işleminden önce hacim (ml)}} \times 100 \quad (3.8)$$

3.8 Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) ile Tanımlama Çalışmaları

Optimum noktada ekstrakte edilen protein ekstraktlarının sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforez (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) kullanılarak, proteinlerin tanımlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 10-250 kDa arasında molekül ağırlığına sahip protein markerları kullanılmıştır. Optimum noktada ekstrakte edilen protein ekstraktlarının, Mini Protean Tetra Hücreli elektroforez ünitesi ile (Biorad, Hercules, CA, ABD) %12'lik ayırma jeli ve %5'lik istifleme jeli (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0,18 M glisin ve %0,1 SDS) kullanılarak, tanımlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayırma işlemi 2 saat boyunca 60 mA'de gerçekleştirilmiştir. Moleküler ağırlık markerı olarak kullanılan polipeptitler sırasıyla şunlardır: 245 kDa, 180 kDa, 135 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 63 kDa, 48 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 17 kDa ve 11 kDa. Yer değiştirmeden sonra, alg protein ekstraktlarının protein bantları coomassie boyası ile tespit edilmiştir.

3.9 Deney Tasarımı ve İstatistiksel Analiz

Ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için Yanıt Yüzey Metodolojisi kullanılmıştır. Optimizasyon için 3 bağımsız değişkenin (ultrases uygulama süresi, enzim/substrat oranı ve ekstraksiyon süresi) 3 seviyede (ultrases uygulama süresi 30-300 saniye, E/S için 0,5-2,5 (g/g) ve ekstraksiyon süresi için 20-28 saat) etkisi bir Box-Behnken Dizayn (BBD) kullanılarak araştırılmıştır. Deney tasarımı 12 faktöriyel nokta ve 5 merkezi nokta olmak üzere toplam 17 denemeden oluşmaktadır. Ekstraksiyon parametreleri kodlanmış değişkenler olarak normalize edilmiştir (Çizelge 3.1). Yanıt fonksiyonları (Y) kuru ağırlıkta ekstraktlarda bulunan protein miktarı (mg protein/g örnek), toplam fenolik madde (mg GAE/g örnek) ve antioksidan aktivitedir (mg TE/g örnek). Yanıtlar ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi gösteren ikinci dereceden polinomsal model aşağıdaki eşitlikte gösterilmiştir (Eşitlik 3.9):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \epsilon \quad (3.9)$$

İkinci dereceden polinomsal modelin regresyon katsayıları olan; β_0 sabit terim, β_i lineer etki, β_{ii} kuadratik etki, β_{ij} interaksiyon etki olarak tanımlanmaktadır. Modelin

uyumu, regresyon katsayıları ve istatistiksel önem varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Yanıtlar ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi görselleştirmek için polinomsal regresyon eşitliklerinin yüzey yanıtları ve kontur plotları ve hedef yanıtlar için optimum koşullar Design Expert 7.1 yazılımının (Stat-Ease, Inc., MN, ABD) deneme versiyonu kullanılarak elde edilmiştir. Sonuçlar $p=0,05$ istatistiksel önem seviyesinde istatistiksel olarak test edilmiştir. Modelin uyumu, model analizi, belirleme katsayısı (R^2) ve modelin zayıflığı kullanılarak belirlenmiştir. Araştırılan her bir yanıt üzerinde tek bir parametrenin ve/veya çoklu parametrelerin interaksiyon etkilerini tanımlamak amacıyla matematiksel modeller elde edilmiştir.

3.10 Modelin Yeterliliği

Her bir yanıt (protein miktarı, toplam fenolik madde miktarı ve CUPRAC ile antioksidan aktivite) doğrusal, kuadratik ve interaksiyonu bağımsız değişkenler olan ultrases uygulama süresi, enzim/substrat oranı ve ekstraksiyon süresi açısından değerlendirilmiştir ve sonuçlar Çizelge 3.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Box-Behnken tasarım için gerçek ve kodlanmış seviyeler.

Bağımsız değişkenlerin birim, sembol ve kod seviyeleri					
Bağımsız değişkenler	Birimler	Değişkenlerin sembolleri	Kod seviyeleri		
			-1	0	1
Ultrases uygulama süresi	Saniye	A	30	165	300
Enzim/substrat oranı	-	B	0,5	1,5	2,5
Ekstraksiyon süresi	Saat	C	20	24	28

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Kimyasal Kompozisyon

Gracilaria dura'nın Kjeldahl yöntemi ile belirlenen protein içeriği kuru ağırlıkta $11,97 \pm 0,05$, yağ içeriği $0,32 \pm 0,06$, toplam karbonhidrat içeriği $24,30$, ham lif içeriği $17,93 \pm 1,06$ ve kül içeriği $45,50 \pm 0,73$ olarak elde edilmiştir. Sunulan tez çalışması kapsamında belirlediğimiz protein içeriğine yakın olarak, kırmızı alglerden *Gracilaria* türlerinin $5,6-24$ protein içeriğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Gressler vd., 2010). Çalışmamızda elde ettiğimiz değere yakın olarak, *Gracilaria cornea*'nın $11,0$ (Valente vd. 2006), *G. fisheri*'nin $11,6$ (Benjama ve Masniyom 2012), *Gracilaria changii*'nin $12,57$ (Chan ve Matanjun 2017) protein içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan, çalışmada belirlenen *G. dura*'nın protein içeriğinin *Gracilaria domingensis*'nin $6,2$ ve *Gracilaria birdiae* $7,1$ (Gressler vd. 2010) olan protein içeriğinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca *Gracilaria* sp. $23,6$ (Neto vd. 2018), *Gracilaria bursa pastoris* $30,2$ (Valente vd. 2006), *Gracilaria corticata* ve *Gracilaria edulis* $22,84$ ve $25,29$ (Rosemary vd. 2019), *Gracilaria dura* $24,8$ (Kazir vd. 2019), *Aglaothamnion uruguayense* $23,1$ (Lourenço vd. 2002) ve *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* $25,55$ (Aziz vd. 2021) olan protein içeriğinden daha düşüktür. Bu değişikliklerin alg türüne, mevsim ve çevresel koşullara göre değişebildiği bilinmektedir. (Benjama ve Masniyom, 2012; Bilgin ve Ertan, 2002). Genel olarak, kırmızı alglerin (Rhodophyta) ise en fazla 47 oranında protein içeriğine sahip olduğu bilinmektedir (Fleurence vd., 2018).

Çalışmamızın sonularına göre *Gracilaria dura*'nın karbonhidrat içeriği kuru ağırlıkta $24,30$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer, *Gracilaria* sp. için $46,9$ (Neto vd. 2018), *Gracilaria changii* için $41,52$ (Chan ve Matanjun 2017), *Palmaria palmata* için $61,5$ (Wang vd. 2010) olarak hesaplanan değerlerden daha düşüktür. Neto vd. (2018) tarafından, *Gracilaria* türlerinin karbonhidrat içeriğinin $15-63$ arasında değiştiği rapor edilmiştir.

Sunulan tez çalışması kapsamında *Gracilaria dura*'nın ham lif içeriği kuru ağırlıkta $17,93 \pm 1,06$ 'dır. Bu değer, Chan ve Matanjun (2017)'nin *Gracilaria changii* için elde ettikleri ham lif içeriğine göre (kuru ağırlıkta $29,44 \pm 0,30$)

düşük, Aziz vd. (2021)'nin *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* için elde ettikleri ham lif içeriğine göre ise (kuru ağırlıkta %5,65±0,13) yüksektir.

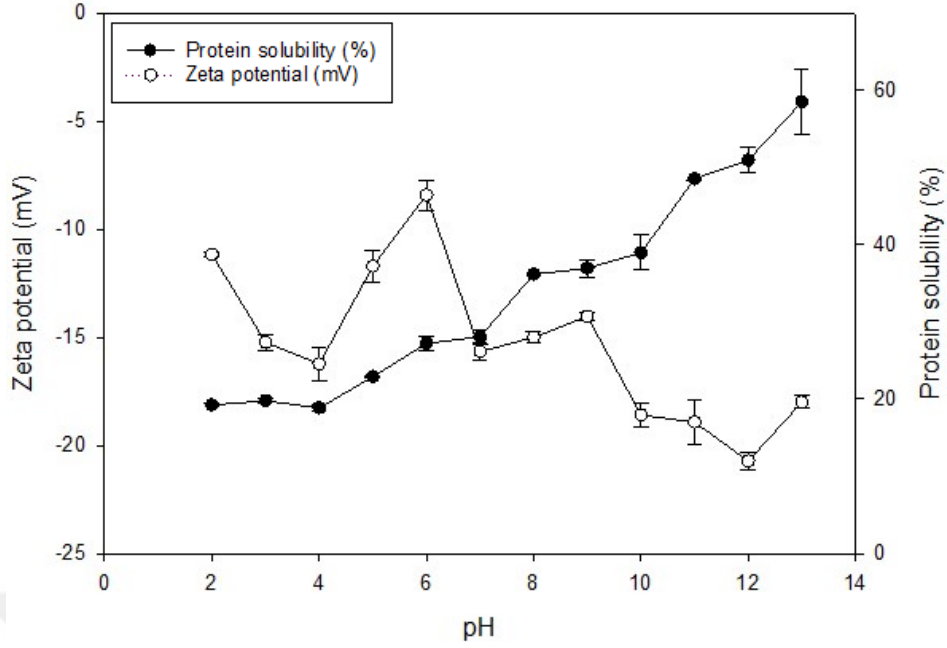
Çalışmamızın sonuçlarına göre *Gracilaria dura*'nın yağ içeriği %0,32±0,06 olarak bulunmuştur. Bu değer, Chan ve Matanjun (2017) tarafından *Gracilaria changii* için elde ettikleri değere (kuru ağırlıkta %0,30±0,02) yakındır. Mabeau ve Fleurence (1993), deniz alglerinin genellikle düşük yağ içeriğine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Wen vd. (2006), *Gracilaria lemaneiformis bory*'nin yağ içeriğini %0,87 olarak belirlerken, Francavilla vd. (2013), *Gracilaria gracilis*'nin yağ içeriğini %1,98 olarak rapor etmişlerdir ve mevsimlere göre yağ içeriğinin değişkenlik gösterebildiğini araştırma sonuçlarıyla doğrulamışlardır.

Elde ettiğimiz kül içeriği değeri ise kuru ağırlıkta %45,50±0,73 olup, bu değer Chan ve Matanjun (2017)'nin *Gracilaria changii* için elde ettiği değere kuru (ağırlıkta %40,30±0,8) yakındır. Diğer taraftan, Aziz vd. (2021)'nin *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* için %10,61±0,69 olarak belirlediği değerden oldukça yüksektir. Bocanegra vd. (2009), yüksek mineral içeriğinin hücre yüzeyindeki polisakkaritlerle ilgili olabileceğini belirtmişlerdir.

4.2 Protein Çözünürlüğü ve Zeta (ζ) Potansiyeli

Çözünürlük, emülsiyon oluşturma ve köpük oluşturma gibi gıdaların fonksiyonel özelliklerini belirleyen en önemli parametredir. Protein konsantratlarının, içecekler, kahve beyazlatıcıları, krem şanti, şekerleme gibi ürünlerde fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılabilmesi için yüksek nitrojen çözünürlüğü gerekmektedir.

Gracilaria dura'nın farklı pH değerlerinde hazırlanan çözeltilerde, pH ile değişen yüzey yüklerinin değerlerinin belirlenmesi amacıyla zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilmiştir. *Gracilaria dura*'nın pH 2,0'den 13,0'e değişen pH değerlerinde % protein çözünürlüğü ve zeta potansiyel (mV) değerleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Gracilaria dura*'nın pH 2,0'den 13,0'e değişen pH değerlerinde % protein çözünürlüğü ve zeta potansiyel (mV) değerleri.

Sunulan tez çalışması kapsamında, *Gracilaria dura* proteinlerinin en düşük (~%18) ve en yüksek (~%58) protein çözünürlüğüne sahip olduğu pH değerlerinin sırasıyla 4 ve 13 olduğu belirlenmiştir. Sunulan tez çalışmasında kullanılan *Gracilaria dura* makroalginin protein çözünürlüğünün en düşük ve en yüksek olduğu pH değerleri literatürle benzerlik göstermektedir. Örneğin Guil-Guerrero vd. (2004), *Phaeodactylum tricornutum* için en yüksek nitrojen çözünürlüğünü pH 12'de ~%75 olarak elde ederken, *Phaeodactylum cruentum* için pH 4'de ~%8,2 olarak belirlemiştir. Felix vd. (2021) *Porphyra dioica* alginin protein konsantratlarının köpürme özelliklerini inceledikleri çalışmalarında, pH 5'in altındaki değerlerde protein çözünürlüğünün %5'in altında olduğunu belirtmişlerdir. Bu pH'nın üzerindeki değerlerde çözünürlüğün önemli ölçüde arttığını (%43,3±3,3) ve pH 7, 8 ve 9 değerleri arasında önemli farklılıklar olmadığını belirtmişlerdir. Benzer olarak, García-Vaquero vd. (2017)'nin çalışmasında, *Himanthalia elongata* kahverengi alginin pH 4'de minimum çözünürlük (%22,5±1,1) gösterdiği, buna karşılık pH 12'de en yüksek çözünürlük değerlerine (%96,15±0,15) ulaşıldığı ifade edilmiştir. Harnedy ve FitzGerald (2013) makroalg proteinlerinin alkali koşullarda protein çözünürlüğünün arttığını belirtmiştir.

Guil-Guerrero vd. (2004), *P. cruentum* hücre duvar yapısından ve hücre duvarının yıkılmasından dolayı alg

biyokütlesinden proteinlerin salınımını zorlaştırabildiğini ve bu nedenle protein çözünürlüğünün düşük olabileceğini belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada *Nannochloropsis* spp. için elde ettikleri düşük nitrojen/protein çözünürlüğünün, güçlü hücre duvarının iyi protein çözünürlüğü sergilemesini engelleyebileceği belirtilmiştir. *G.dura* kırmızı bir makroalg türü olup çift katmanlı hücre duvarına ve morfolojik olarak talluslu sert bir yapıya sahiptir (Cirik ve Cirik, 2011; Øverland vd., 2019). Bu nedenle protein çözünürlüğünün daha düşük olabileceği tahmin edilmektedir.

Protein çözünürlüğü, solüsyondaki partiküllerin net yükünü gösteren zeta potansiyeli ile doğrudan ilişkilidir. Proteinler izoelektrik noktanın altında ve üstünde negatif ya da pozitif yüklenebilirler. İzoelektrik nokta, protein çözünürlüğünün en az olduğu protonlanmış ve protondan arındırılmış yan zincirlerin her birinin dengede olduğu ve net yükün sıfır olduğu değerdir (Böcker vd., 2021). Alg proteinlerinin izoelektrik noktası diğer biyokütlelerden genellikle daha düşüktür. *Scenedesmus acutus* için pH 3,5 (Venkataraman ve Shivashankar, 1979), *Spirulina platensis* için pH 3,0 (Yüce tepe vd. 2017), *Tetraselmis* sp. protein izolatları için pH 3,0 ve altı (Schwenzfeier vd. 2013a) değerlerinde izoelektrik noktanın olduğu rapor edilmiştir. Zeta potansiyeli pH'nın bir fonksiyonudur (Wu vd., 2012). pH değerlerindeki değişiklik algal hücredeki yüklü parçacıkların zeta değerini pozitif ya da negatif olarak etkileyebilir (Liu vd., 2013; Vandamme vd., 2012). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre en düşük protein çözünürlüğünün olduğu pH değeri 4'tür. Ayrıca tüm pH değerlerinde zeta potansiyeli değerleri negatiftir. Böcker vd. (2021), *Arthrospira platensis*'in nitrojen çözünürlüğünün minimum olduğu noktayı, pH 3,5 olarak rapor ederken, zeta potansiyelinin sıfır olduğu noktayı pH 2,6 olarak rapor etmiş ve bu uyumsuzluğun proteinlere bağlı polisakkaritlerin negatif yüklenmesinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, Cheng vd. (2011), dört farklı *Chlorella* türünde kitosan flokleşması üzerine hücre duvarı karbonhidratlarının etkisini araştırdıkları çalışmalarında, pH 5,5-8,5 arasındaki farklı pH değerlerinde tüm zeta potansiyeli değerlerini negatif olarak belirlemişlerdir. Kırmızı algler hücre duvarı lipid ve proteinlerin oluşturduğu çift katmanlı yapıdadır. Hücre membranının büyük çoğunluğunun fosfolipit yapıda olmasının ve fosfat gruplarının deniz suyunda negatif olarak yüklenebilmesinin sonucu olarak, elektrostatik etkileşimlerin yüzey yüklerini etkileyebileceği ifade edilmektedir (Rosenhahn vd., 2009).

4.3 Modelin Yeterliliği

İkinci dereceden polinomiyal modelin varyans analizi ve belirleme katsayısı (R^2) değeri Çizelge 4.1 'de sunulmuştur. Her bir yanıt için elde edilen modelin R^2 değeri protein miktarı, TFMM ve CUPRAC ile antioksidan aktivite tayini için sırasıyla 0,93, 0,60, 0,61 olarak bulunmuştur. Jouki vd. (2014), yanıt modelinin uygunluğu için R^2 değerinin en az 0,80 olması gerektiğini açıklamışlardır. Çalışmamızda, protein miktarı için yüksek R^2 (0,93) değeri elde edilmiştir. İstatistiksel analizin sonucu olarak, CUPRAC ile antioksidan aktivite ve TFMM dışında, protein miktarı için polinom modelleri değişkenler arasındaki gerçek ilişkileri temsil etmeye uygun olduğu görülmektedir. Varyasyon katsayısı (CV) protein miktarı, TFMM ve CUPRAC ile antioksidan aktivite için sırasıyla %28,04, %49,19 ve %52,01'dir. Modelin zayıflığının (lack of fit) p değerleri protein miktarı için 0,0550, TFMM için 0,8630 ve CUPRAC için 0,1161'dir. Modelin zayıflığının tüm değerler için önemli olmadığı ($p>0,05$) görülmektedir. Sonuç olarak, bu çalışmada protein miktarı için elde edilen modelin ($p=0,0028$), *Gracilaria dura*'dan protein ekstraksiyonunda kullanılan ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için kullanılabileceği görülmektedir.

Çizelge 4.1. İkinci dereceden polinomiyal modelin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Karelerin toplamı	DF	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri	Kaynak	Karelerin toplamı	DF	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri	Kaynak	Karelerin toplamı	DF	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri
Protein miktarı						Toplam fenolik madde miktarı(TFMM)						Antioksidan aktivite (CUPRAC)					
Model	55070,80	9	6118,98	10,36	0.0028*	Model	5708,21	9	634,25	1,18	0,4212	Model	6101,17	9	677,91	1,24	0,3985
Doğrusal						Doğrusal						Doğrusal					
β ₁	21,66	1	21,66	0,037	0.8535	β ₁	0,19	1	0,19	3,56	0,9855	β ₁	198,32	1	198,32	0,36	0,5665
β ₂	48761,86	1	48761,86	82,59	<0,0001*	β ₂	5166,68	1	5166,68	39,65	0,0172	β ₂	4240,62	1	4240,62	7,74	0,0272
β ₃	262,60	1	262,60	0,44	0,5262	β ₃	32,25	1	32,25	0,060	0,8132	β ₃	29,77	1	29,77	0,054	0,8224
Kuadratik						Kuadratik						Kuadratik					
β ₁₁	303,94	1	303,94	0,51	0.4963	β ₁₁	12,25	1	12,25	0,02	0,8841	β ₁₁	110,87	1	110,87	0,20	0,6665
β ₂₂	49,96	1	49,96	0,085	0.7796	β ₂₂	111,93	1	111,93	30,21	0,6614	β ₂₂	5,48	1	5,48	9,997E-003	0,9232
β ₃₃	3743,94	1	3743,94	6,34	0.0399*	β ₃₃	64,74	1	64,74	0,12	0,7383	β ₃₃	12,86	1	12,86	0,023	0,8826
İnteraksiyon						İnteraksiyon						İnteraksiyon					
β ₁₂	745,80	1	745,80	1,26	0.2981	β ₁₂	185,25	1	185,25	0,35	0,5749	β ₁₂	1276,09	1	1276,09	2,33	0,1709
β ₁₃	4,71	1	4,71	7,975E-003	0.9313	β ₁₃	110,26	1	110,26	0,21	0,6638	β ₁₃	209,80	1	209,80	0,38	0,5557
β ₂₃	970,88	1	970,88	1,64	0.2406	β ₂₃	6,75	1	6,75	0,013	0,9138	β ₂₃	16,07	1	16,07	0,029	0,8689
Artan	4133,08	7	590,44	-	-	Artan	3749,35	7	535,62	-	-	Artan	3836,85	7	548,12	-	-
Modelin uyumsuzluğu	3402,82	3	1134,27	6,21	0.0550	Modelin uyumsuzluğu	576,90	3	192,30	0,24	0,8630	Modelin uyumsuzluğu	2834,79	3	944,93	3,77	0,1161
Saf hata	730,26	4	182,56	-	-	Saf hata	3172,46	4	793,11	-	-	Saf hata	1002,06	4	250,52	-	-
Toplam	59203,88	16	-	-	-	Toplam	9457,56	16	-	-	-	Toplam	9938,02	16	-	-	-
R ² =0.93; C.V.(%)=28,04						R ² =0,60; C.V.(%)= 49,19						R ² =0.61; C.V.(%)=52,01					

4.4 Ekstraktların Protein İçeriği

Bağımsız değişkenlerin (E/S, ekstraksiyon süresi ve ultrases uygulama süresi) protein miktarı, toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivite ve ekstraksiyon verimine etkisi RSM ile Box-Behnken tasarımı ile incelenmiştir. Çizelge 4.2'e göre, alglerin protein içeriği uygulanan ekstraksiyon koşullarında, 0,51-212,57 mg protein/g ekstrakt arasındadır. Ekstraksiyon zamanının sabit (24 saat) olduğu E/S ve ultrases uygulama süresinin interaksiyon etkisi Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Buna göre; ultrases süresinin yaklaşık ~98 saniyenin üstünde olduğu ve E/S'nin ~2,20 olduğu E/S oranlarında en yüksek protein miktarı elde edilmiştir. Ekstraktlar, E/S oranının ~0,5 ile ~1,0 arasında olduğu tüm ultrases uygulama sürelerinde en düşük protein içeriğine sahip olmuştur. Çizelge 4.1'e göre E/S'nin doğrusal etkisi önemlidir ($p<0,05$). Yu vd. (2012) ultrases destekli ekstraksiyon yönteminin diğer yeni tekniklerle birlikte uygulanabildiğini ve ekstraksiyon verimini artırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca ultrasesin kavitasyonel etkisinin enzim destekli hidrolitik prosesleri desteklediği ifade edilmiştir. Suwal vd. (2019), *Palmaria palmata* kırmızı algine yüksek basınç uygulaması ve enzimatik muamelenin ekstraksiyon verimi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, hemiselülaz ve selülaz enzim çiftinin ekstraksiyon verimini %9'dan %37'ye çıkardığını rapor etmişlerdir.

Çizelge 4.2. Doğal ve kodlanmış ekstraksiyon koşulları ile Box–Behnken deney tasarımı ve deneysel olarak elde edilen yanıtların değerleri.

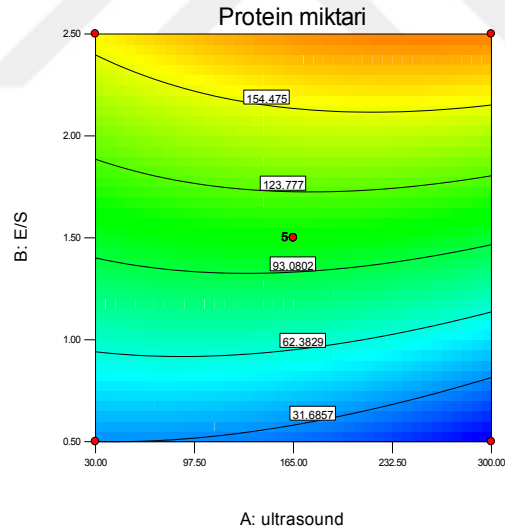
Deneme	Bağımsız değişkenler						Yanıtlar		
	A:Ultras ses uygulama süresi, saniye	Kod	B:Enzim/ Substrat oranı	Kod	C: Ekstraksiyon süresi, saat	Kod	Protein miktarı (mg protein/g)	TFMM (mg GAE/g)	CUPRAC (mg TE/g)
1	30	-1	0,5	-1	24	0	3,456	19,24	19,43
2	30	-1	1,5	0	20	-1	84,835	41,06	34,52
3	165	0	2,5	1	20	-1	163,540	63,70	59,43
4	300	1	2,5	1	24	0	212,574	57,96	37,45
5	300	1	1,5	0	28	1	53,307	62,72	49,38
6	165	0	2,5	1	28	1	110,058	69,45	56,70
7	165	0	1,5	0	24	0	107,718	40,21	29,35
8	165	0	1,5	0	24	0	102,157	41,24	31,62
9	300	1	0,5	-1	24	0	0,512	16,69	11,38
10	30	-1	1,5	0	28	1	82,072	35,44	40,01
11	300	1	1,5	0	20	-1	51,730	47,34	72,86
12	165	0	1,5	0	24	0	101,202	102,57	50,00
13	165	0	0,5	-1	20	-1	4,858	19,53	25,12
14	165	0	1,5	0	24	0	128,304	37,10	33,97
15	30	-1	2,5	1	24	0	160,912	87,73	116,94
16	165	0	1,5	0	24	0	92,126	40,20	66,62
17	165	0	0,5	-1	28	1	13,694	20,08	30,41

Design-Expert® Software

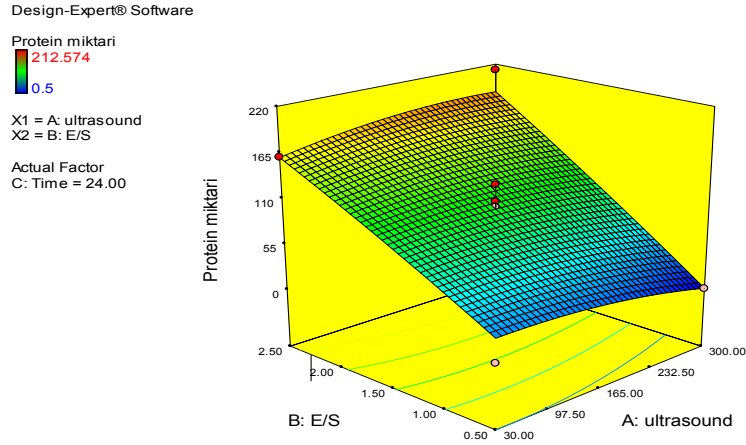
Protein miktarı
 ● Design Points
 212.574
 0.5

X1 = A: ultrasound
 X2 = B: E/S

Actual Factor
 C: Time = 24.00

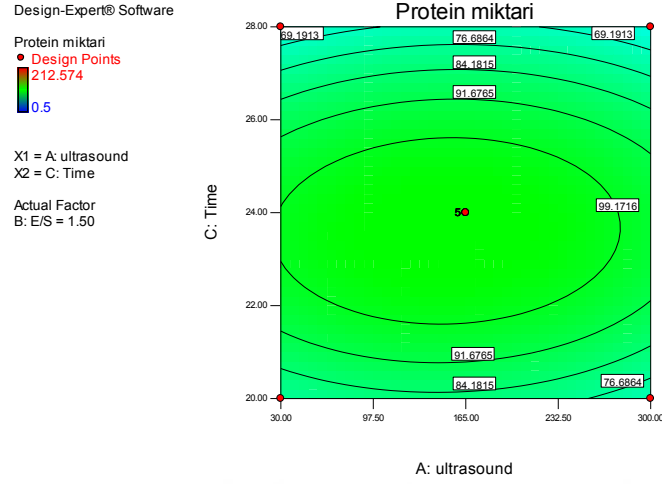


Şekil 4.2. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultras ses uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği.

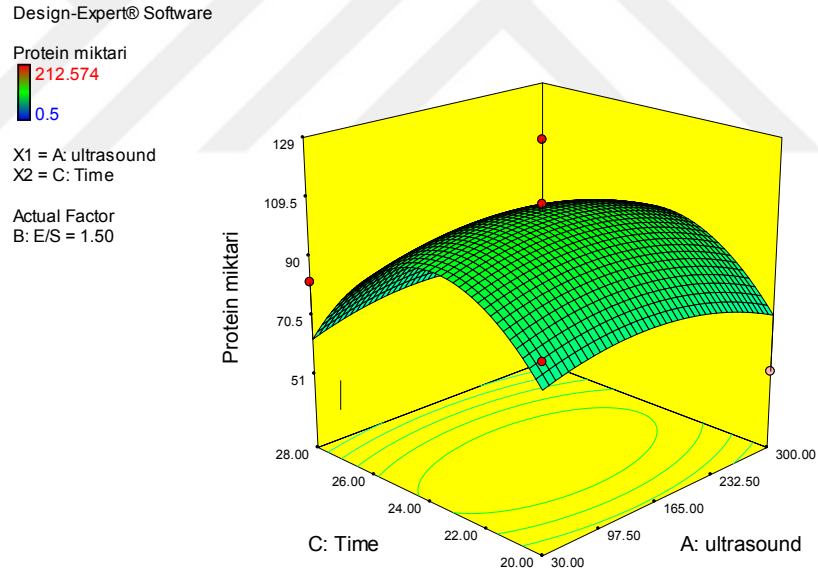


Şekil 4.3. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği.

E/S oranının sabit (~1,5) olduğu ekstraksiyon zamanı ve ultrases uygulama süresinin interaksiyon etkisi Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Şekil 4.4 ve Şekil 4,5 incelendiğinde, iki bağımsız değişkenin orta seviye uygulamalarında ekstraktların protein miktarı diğer koşullara göre daha yüksek bulunmuştur. Çizelge 4.2’e göre ekstraksiyon süresinin quadratik etkisi önemlidir ($p<0,05$). Hildebrand vd. (2020) tarafından, *Chlorella vulgaris* mikroalgine, 0,4 M NaOH çözeltisinde 10 dak ultrases destekli ekstraksiyon uygulandığında, ekstraksiyon veriminin arttığı (%76,6) belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, ekstraksiyon süresinin 2 saatten 18 saate çıkarıldığı örneklerde benzer sonuçlar ($\%73,6\pm1,2$) elde edilmiş, ekstraksiyon süresinin artmasının ekstraksiyon verimini artırdığı ifade edilmiştir. Aynı koşulların su ve HCl ile uygulanması durumunda, daha düşük sonuçların elde edildiği, alkali ortamın protein çözünürlüğünün artırmasının yanı sıra hemiselüloz bağlarını bozarak hücre duvarı yapısını da zayıflatabildiği belirtilmiştir.



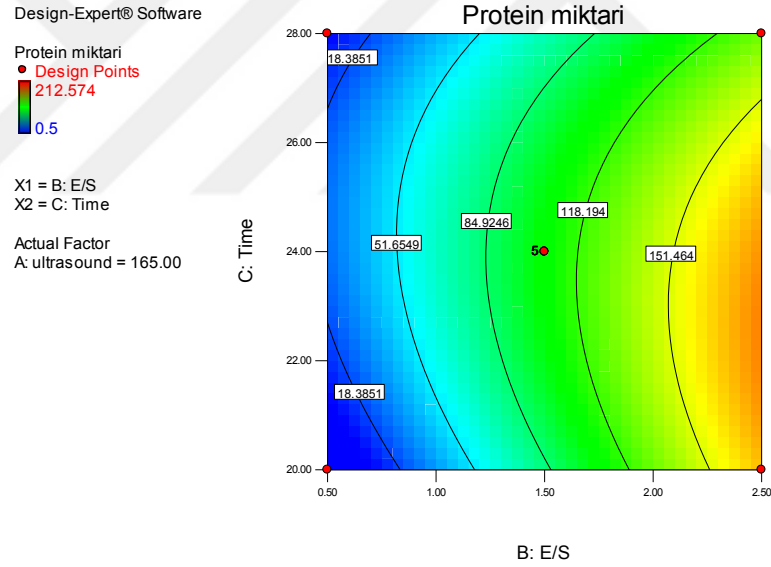
Şekil 4.4. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit E/S oranı (1,5), ekstraksiyon zamanı ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği.



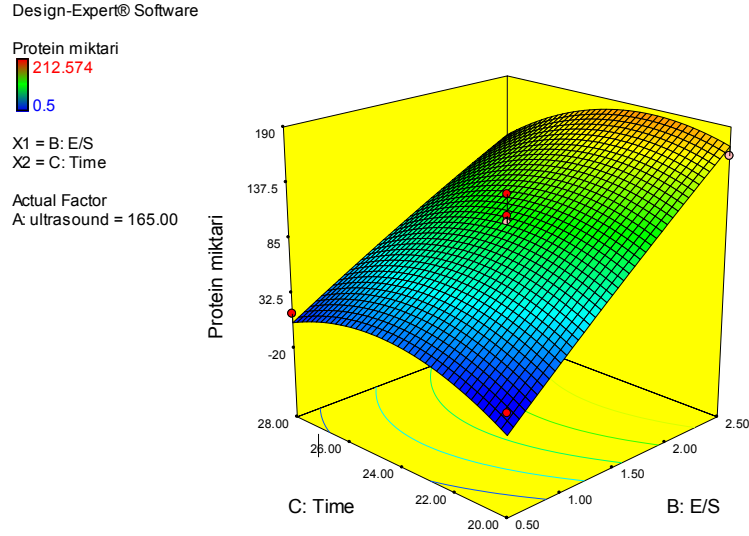
Şekil 4.5. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit E/S oranı (1,5), ekstraksiyon zamanı ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği.

Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de ultrases uygulama süresinin (165 saniye) sabit tutularak E/S oranı ve ekstraksiyon süresinin etkisi gösterilmiştir. Buna göre, E/S’nin 0,5-1,0 arasında olduğu, tüm ekstraksiyon zamanlarında en düşük protein içeriği elde edilmişken, 20-26 saat ekstraksiyon zamanı ve E/S oranının ~2,3 ve üzerinde olduğu değerlerde en yüksek protein içeriği elde edilmiştir. Benzer olarak, Barbarino ve

Lourenço (2005), morfolojik olarak dallı yapıdaki kahverengi alglerden *Sargassum vulgare*'nin protein ekstraksiyonu için suda 12 saat inkübasyonun ekstraksiyon verimini arttırdığını rapor etmişlerdir. Fleurence vd. (1995), protein ekstraksiyonu üzerine polisakkaridazların etkisini araştırdıkları çalışmalarında, *Chondrus crispus* için karragenaz ve selüloz, *Gracilaria verrucosa* için agaraz ve selüloz enzim çiftlerini uyguladıkları örneklerde, enzim ile muamele edilmemiş örneklere göre ekstraksiyon veriminin *Chondrus crispus* için 10 kat, *Gracilaria verrucosa* için 3 kat arttığını rapor etmişlerdir. Yine aynı çalışmada *Palmaria palmata* için ksilinaz ve selüloz enzim çiftinin ekstraksiyon verimini önemli ölçüde etkilemediğini ve protein verimi üzerine en iyi sonucun ksilinaz enzimi ile 14 saat inkübasyon süresi olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmanın yazarları belirli kırmızı algler için uygulanan enzim karışımlarının proteinlerin ekstrakte edilebilirliğini geliştirdiğini ifade etmişlerdir.



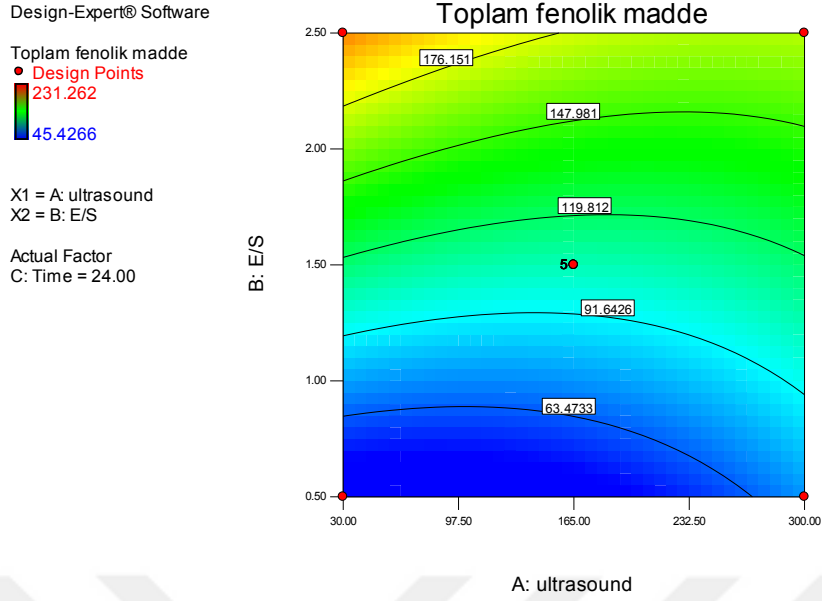
Şekil 4.6. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit ultrases zamanı (165 saniye), ekstraksiyon zamanı ve E/S oran arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği.



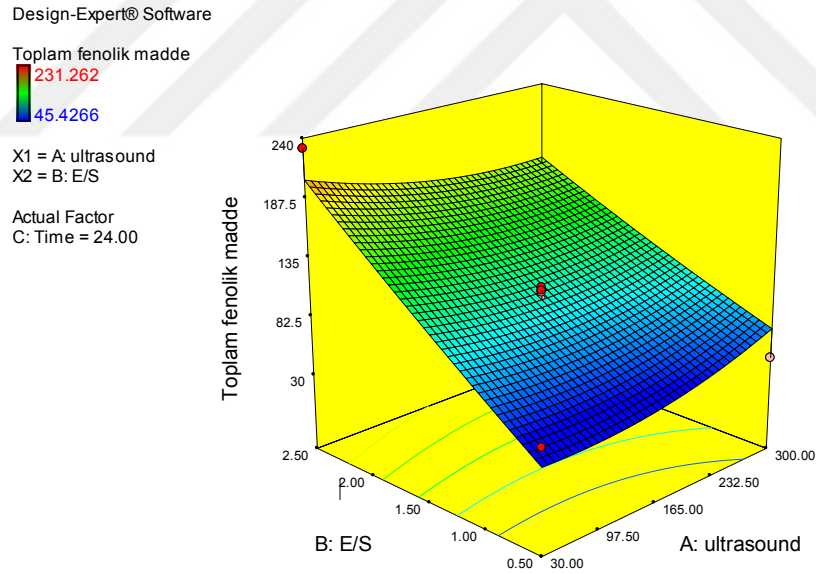
Şekil 4.7. Örneklerin protein içeriği üzerine sabit ultrases zamanı (165 saniye), ekstraksiyon zamanı ve E/S oranı arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği.

4.5 Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi, alglerin TFMM, uygulanan ekstraksiyon koşullarında, 16,69-102,57 mg GAE/g ekstrakt arasındadır. Örneklerin TFMM üzerine E/S oranının doğrusal etkisi önemlidir ($p < 0,05$, Çizelge 4.1). Ekstraksiyon zamanının sabit (24 saat) olduğu E/S ve ultrases uygulama süresinin interaksiyon etkisi Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’de gösterilmiştir. Buna göre, ultrases süresinin ~35-40 saniye olduğu ve E/S’nin ~2,30 ve üzeri olduğu E/S oranlarında en yüksek fenolik madde miktarı elde edilmiştir. Wijesinghe ve Jeon (2012), hücre duvarı polisakkaritlerinin enzim destekli degradasyonunun fenolik bileşiklerin salınımını artırdığını ifade etmişlerdir. Dang vd. (2017), *Hormosira banksii* algi için uygulanan ultrasonik sıcaklık ve ultrases uygulama süresinin TFMM üzerine etkisinin önemli olduğunu belirtmiştir. Kadam vd. (2015), ultrases destekli ekstraksiyonun yüksek molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu artırdığını ve biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Buna karşın, Kumar vd. (2020), *Gracilaria edulis* için ultrases uygulama süresinin ve ekstraksiyon yönteminin fenolik madde içeriği üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, 120 dakika geleneksel ekstraksiyon yöntemi uygulanan örneklerin ekstraksiyon veriminin 120 dakika ultrases uygulanan örneklere göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.



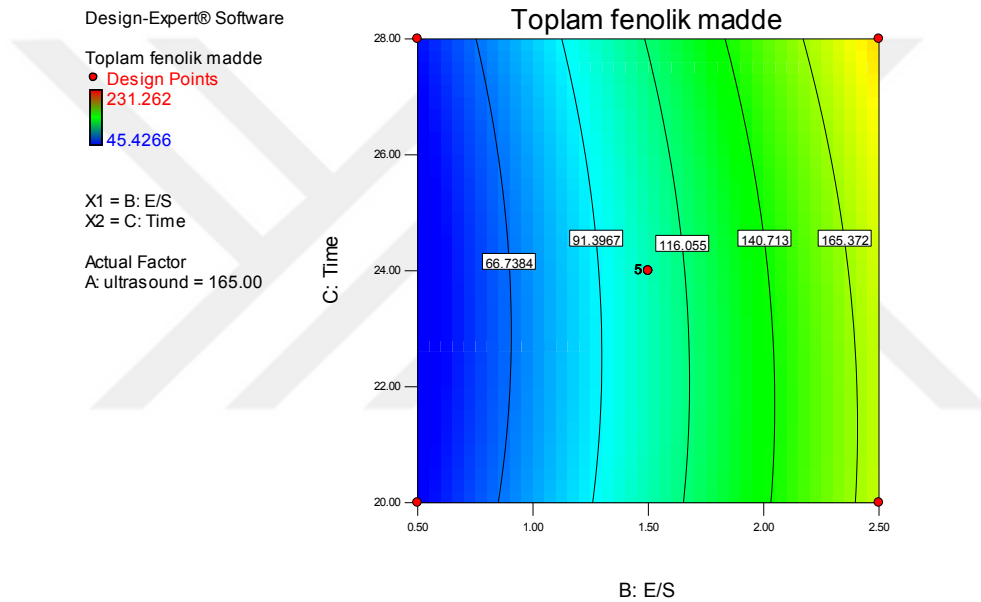
Şekil 4.8. Örneklerin TFMM üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği.



Şekil 4.9. Örneklerin TFMM üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği.

Şekil 4.10 ve Şekil 4.11' de ultrases zamanının (165 saniye) sabit tutularak E/S ve ekstraksiyon zamanı arasındaki etkileşim gösterilmiştir. Buna göre, E/S'nin 0,5-1,0 arasında olduğu tüm ekstraksiyon zamanlarında en düşük fenolik madde miktarı elde edilmişken, ekstraksiyon zamanının ~26 saat ve üzeri olduğu ve E/S oranının ~2,4 ve

üzerinde olduğu değerlerde en yüksek fenolik madde miktarı elde edilmiştir. Adalbjörnsson ve Jónsdóttir (2015) *Palmaria palmata* alginden fenolik madde ekstraksiyonu için kullanılan enzimlerin ekstraksiyon verimini, su ekstraksiyonuna göre önemli ölçüde artırdığını ifade etmişlerdir. Topuz vd. (2016), *Laurencia obtuse* kırmızı alginin fenolik madde ekstraksiyonu üzerine ekstraksiyon koşullarının etkisini araştırdıkları çalışmalarında, solvent miktarının daha fazla ve solvent sıcaklığının daha yüksek olduğu örneklerde fenolik madde miktarının daha yüksek, ekstraksiyon süresinin ve solvent miktarının daha az olduğu örneklerin ise en az fenolik madde içerdiğini rapor etmişlerdir.



Şekil 4.10. Örneklerin TFMM üzerine sabit ultrases uygulama süresinde (165 saniye), E/S ve ekstraksiyon süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği.

Design-Expert® Software

Toplam fenolik madde

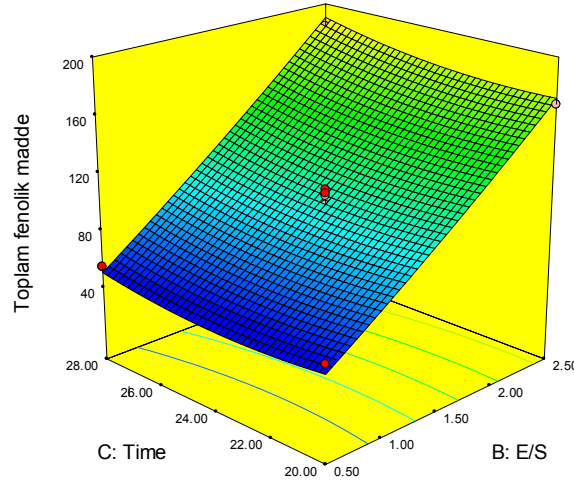
231.262
45.4266

X1 = B: E/S

X2 = C: Time

Actual Factor

A: ultrasound = 165.00



Şekil 4.11. Örneklerin TFMM üzerine sabit ultrases uygulama süresinde (165 saniye), E/S ve ekstraksiyon süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği.

Çizelge 4.2'e göre, alglerin CUPRAC (mg TE/g) değeri, uygulanan ekstraksiyon koşullarında, 11,38-116,94 (mg TE/g) ekstrakt arasındadır. Örneklerin CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktivitesi üzerine E/S oranının doğrusal etkisi önemlidir ($p < 0,05$, Çizelge 4.1). Ekstraksiyon zamanının sabit (24 saat) olduğu E/S ve ultrases uygulama süresinin interaksiyon etkisi Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Buna göre; ultrases süresinin ~30-40 saniye olduğu ve E/S oranının ~2,30 ve üzerinde olduğu değerlerde en yüksek antioksidan aktivite elde edilmiştir. Ekstraktlar, E/S oranının ~0,5 ile 1,0 arsında olduğu tüm ultrases uygulama sürelerinde en düşük antioksidan aktiviteye sahiptir. Benzer olarak, Suwal vd. (2019), kırmızı bir alg olan *Palmaria palmata* ve *Solieria chordalis*'in enzim ve yüksek basınç uygulamalarının antioksidan aktivite üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında antioksidan aktiviteyi, en fazla artıran koşulun yüksek basınç uygulanmayan enzimatik hidroliz olduğunu ifade etmişlerdir. Siriwardhana vd. (2008), *Hizikia fusiformis*'in farklı pH değerlerinin antioksidan aktivite üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, pH 8'den 12'ye doğru antioksidan aktivitenin arttığını, 12 ile 24 saat inkübasyon süresi arasında önemli farklılık olmadığını rapor etmişlerdir.

Design-Expert® Software

CUPRAC

● Design Points

102.478

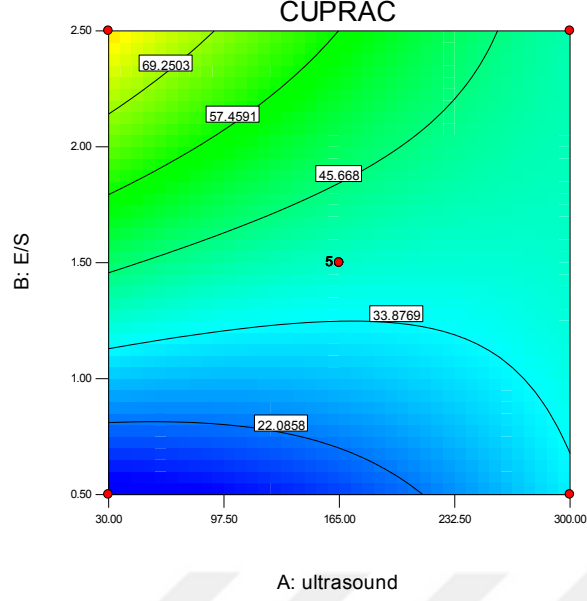
11.1494

X1 = A: ultrasound

X2 = B: E/S

Actual Factor

C: Time = 24.00



Şekil 4.12. Örneklerin antioksidan aktivitesi (CUPRAC) üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 2D kontur plot grafiği.

Design-Expert® Software

CUPRAC

102.478

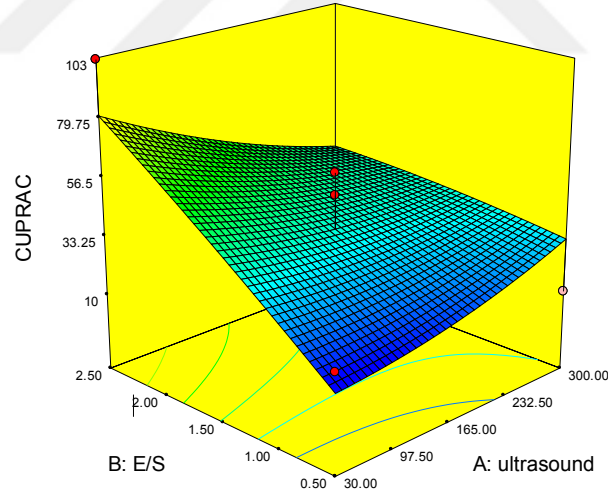
11.1494

X1 = A: ultrasound

X2 = B: E/S

Actual Factor

C: Time = 24.00



Şekil 4.13. Örneklerin antioksidan aktivitesi (CUPRAC) üzerine sabit ekstraksiyon süresinde (24 sa), E/S ve ultrases uygulama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren 3D kontur plot grafiği.

4.6 Optimizasyon ve Doğrulama

Optimum yanıt değerlerini tahmin etmek için modelin yeterliliği, RSM kullanılarak belirlenen *Gracilaria dura*'dan protein ekstraksiyonu için optimize edilmiş koşullar kullanılarak test edilmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimini elde etmek için oluşturulan RSM dizaynı, protein miktarının en yüksek olduğu, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitenin orta değerde olduğu koşullarda belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Optimum koşullar, ultrases uygulama süresi için 257,57 s, E/S için 2,5 ve ekstraksiyon süresi için 22,61 saat olarak belirlenmiştir. Matematiksel eşitliklerle öngörülen ve deneysel verilerle elde edilmiş değerlerin ortalaması, protein miktarı için 188,71 mg/g ve 189,59 mg/g, TFMM için, 64,33 mg GAE/g ve 60,52 mg GAE/g ve antioksidan aktivite 54,24 mg TE/g ve 55,66 mg TE/g'dır. Deneysel veriler ile eşitlikler kullanılarak elde edilen öngörülen değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli değildir ($p>0,05$). En yüksek protein miktarı kuru ağırlıkta 188,71 mg/g, fenolik madde miktarı 64,33 mg GAE/g ve antioksidan aktivite 54,24 mg TE/g 'dir ("desirability" 0,887).

Çizelge 4.3. Araştırılan yanıtların hedef ve öngörülen değerleri ile optimize edilmiş ekstraksiyon koşulları.

İsim	Hedef	En düşük	En yüksek	Öngörülen
Ultrases zamanı, saniye	Aralıkta	30	300	257,57
Enzim/substrat oranı	Aralıkta	0,5	2,5	2,5
Ekstraksiyon zamanı, saat	Aralıkta	20	28	22,61
Protein miktarı, mg protein/g örnek	En yüksek	0,50	212,57	188,71
Toplam fenolik madde miktarı, mg GAE/g örnek	Aralıkta	16,69	102,57	64,33
Antioksidan aktivite, g TE/g örnek	Aralıkta	11,38	116,94	54,24

4.7 Optimum Noktada Elde Edilen Ekstraktların Protein İçeriği ve Ekstraksiyon Verimi

Çalışmanın sonuçlarına göre, optimum noktada üretilen protein ekstraktları için ekstraksiyon verimi $95\pm4,95$ ve en yüksek protein miktarı kuru ağırlıkta 188,71 mg/g olarak hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular (ekstraksiyon verimi ve protein içeriği) literatürde karşılaştığımız sonuçlardan oldukça yüksektir. Örneğin, Harnedy ve FitzGerald (2013), *Palmaria palmata* için polisakkaridaz enzimi ile alkali çözündürme koşullarının birlikte uygulandığı örneklerin protein içeriğini, $115,7\pm0,08$

mg/ g kuru ağırlık olarak elde etmişler ve protein ekstraksiyon verimini ~%67 olarak belirlemişlerdir. Gajaria vd. (2017), *Ulva lactuca* algine uyguladıkları çoklu ekstraksiyonda, ulvan ekstraksiyonundan sonra, alkali muamele uygulayarak elde ettikleri protein ekstraktlarının protein içeriğini $110 \pm 2,12$ mg/g kuru ağırlık ve ekstraksiyon verimini $68,75 \pm 4,01$ olarak belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada, Wang vd. (2010) *Palmaria palmata* kırmızı makroalgi için selüloz enzimi kullanarak elde ettikleri ekstraktların ekstraksiyon verimini $66,6 \pm 2,2$ olarak belirlerken, Suwal vd. (2019), *Palmaria palmata* ve *Solieria chordalis* kırmızı makroalglerine hemiselüloz ve yüksek basınç uygulamalarıyla elde edilen ekstraktların toplam ekstraksiyon verimini, sırasıyla %13 ve %17 olarak belirlemişlerdir.

Barbarino ve Lourenço (2005), morfolojik olarak dallı yapıdaki kahverengi alglerden *Sargassum vulgare*'nin protein ekstraksiyonu için suda 12 saat inkübasyonun ekstraksiyon verimi için önemli olduğunu, bunun yanı sıra ekstraksiyon verimliliğinde, türlerin kimyasal bileşiminin, morfolojik ve yapısal özelliklerinin doğrudan etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Benzer olarak Harnedy ve FitzGerald (2013), protein kalitesi, protein olmayan polisakkaritler ve polifenollerle olan bağların protein ekstraksiyonu üzerinde etkili olabileceğini ifade etmişlerdir. Barbarino ve Lourenço (2005), aynı çalışmalarında kurutulmuş mikroalg örneklerinin öğütülmesinin ekstraksiyon prosedürü boyunca solvante daha iyi maruz kaldığını, makroalg örneklerinin ise toz haline getirilmesinin daha etkili bir ekstraksiyon prosedürü olabileceğini bildirmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında, mekanik, kimyasal, enzimatik ve ultrases uygulamaları gibi yöntemlerin birkaçı birarada uygulanarak ekstraksiyon veriminin artırılması amaçlanmıştır. Ekstraksiyon süresinin ve E/S oranının daha yüksek, ultrases uygulama süresinin daha düşük olduğu örneklerin protein miktarının (kuru ağırlıkta $188,71$ mg/g), ekstraksiyon süresinin ve E/S oranının daha düşük, ultrases uygulama süresinin daha yüksek olduğu önceki denemelerimizde elde ettiğimiz protein miktarına göre (kuru ağırlıkta $53,6$ mg/g) oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

4.8 Optimum Nuktada Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarı

Çalışma sonuçlarımıza göre, optimum noktada üretilen protein ekstraktları için TFMM kuru ağırlıkta $64,33$ mg GAE/g olarak hesaplanmıştır. *Gracilaria bursa-*

pastoris için 0,35 mg GAE/g (Yıldız vd. 2011), *Gracilaria bursa-pastoris*'in 40 °C'de etanolik ve su ekstraktları için 142,26 ± 0,8 mg GAE/g ve 79,43 mg GAE/g (Ramdani vd. 2017) olarak belirlenmiştir. Ramdani vd. (2017) çalışmalar arasındaki farklılığın alg orijininin kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Literatürde karşılaşılan diğer sonuçlar, sırasıyla *Laurencia sp.*, *Gelidium latifolium*, *Gracilaria salicornia* için 24,97 mg GAE/g, 24,38 mg GAE/g ve 23,37 mg GAE/g (Nursid vd. 2020), *Gracilaria sp.*, 62,10±4,03 mg GAE/g, *Gracilaria cearensis* için 107,64±9,21 mg GAE/g, *Gracilaria cervicornis* için 20,18±1,18 mg GAE/g, *Gracilaria domingensis* için 49,90±2,00 mg GAE/g ve kırmızı bir alg olan *Osmundaria obtusiloba* için 569,33±36,10 mg GAE/g (Martins vd. 2013), *Gracilaria changii* metanolik ekstraktları için 5,0 mg GAE/g (Sreenivasan vd. 2007), *Hormosira banksii* için 23,12 mg GAE/g (Dang vd. 2017), *Stypocaulon scoparium* algi için 3,28 mg GAE/g (López vd. 2011), *Laurencia obtuse* için 26,23 mg GAE/g (Topuz vd. 2016), *Hizikia fusiformis* için 49,6-96,3 mg GAE/g (Siriwardhana vd. 2008), *Palmaria palmata* için 2 mg GAE/g, *Solieria chordalis* için ~1 mg GAE/g (Suwal vd. 2019), *Palmaria palmata* için 2,5-15,5 mg GAE/g (Wang vd. 2010) olarak rapor edilmiştir. Kahverengi alglerin fenolik madde miktarının kırmızı alglerle göre daha yüksek olduğu bilinmekte olup, Sánchez-Camargo vd. (2015), ekstraksiyon sıcaklığının artmasının ekstraksiyon verimini arttırdığını ifade ederek sıcaklığın 160 °C, ekstraksiyon solventinin %95 etanol olduğu koşullarda *Sargassum muticum*'dan 94,0 mg GAE /g fenolik madde ekstrakte etmişlerdir.

Çalışmamızda kullandığımız makroalgin TFMM ve antioksidan aktivitesini nar gibi önemli bir antioksidan kaynağı olan meyve ile karşılaştırdığımızda, Ardekani vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, nar kabuğunun toplam fenolik madde içeriği 98,24-226,56 mg GAE/g arasında bulurken, Derakhshan vd. (2018)'nin çalışmasında, en yüksek 413 mg GAE/g olarak elde edilmiştir. Bu çalışmalarda, toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan aktivite arasında pozitif bir ilişki olduğu ifade edilmiştir.

Çalışma kapsamında *G. dura*'dan elde ettiğimiz toplam fenolik madde içeriği, *Sargassum muticum*, *Osmundaria obtusiloba*, *Hizikia fusiformis* ve *Gracilaria cearensis*, *Gracilaria bursa-pastoris* alglerine (Ramdani vd. 2017) ve nar kabuğunun toplam fenolik madde içeriğinden daha düşük bulunurken, yukarıda bahsedilen diğer

alglerin TFMM'larından yüksektir. Uygulanan ekstraksiyon prosedürleri, algin türü, hasat zamanı, ekstraksiyon solventi gibi parametreler bu değişikliklere sebep olabilmektedir. Öte yandan, Siriwardhana vd. (2008), algal hücre duvarının yıkımlanmasıyla polifenollerle kompleks oluşturmaya eğilimli proteinlerin salınmasının kümeleşme ve nihai çökmeye yol açabileceğinden, proteinlere hidrojen bağı, π bağı, iyonik ve kovalent bağlarla hidrofobik etkileşimlerin toplam fenolik miktarını düşürebileceğini ifade etmişlerdir. Bunun yanında proteazla muamele edilen örneklerin peptit ve amino asit fraksiyonlarının ortaya çıkmasıyla, fenolik bileşiklerin ekstrakte edilebilirliği artarken, karbohidrazların hücre duvarı polisakkaritlerinin yıkımı ile oligasakkaritleri ve basit şekerleri açığa çıkarması sonucu ekstraktaki fenolik madde seviyesini azaltabileceği belirtilmiştir.

4.9 Optimum Noktada Elde Edilen Ekstraktların Antioksidan Aktivitesi

Optimum noktada elde edilen ekstraktların CUPRAC yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivitesi kuru ağırlıkta 54,24 mg TE/g'dır. Örneklerin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi örneklerin DPPH radikaline yanıt vermemesi nedeni ile tespit edilememiştir. Ayrıca, DPPH radikalinin sadece alkol gibi organik ortamda çözünürken suda çözünmediği, bu durumun hidrofilik antioksidanların yorumlanmasında önemli bir sınırlamaya neden olduğu belirtilmektedir (Büyüktuncel, 2013).

Elde ettiğimiz değer, Yücepe vd. (2018)'nin *Spirulina platensis* mikroalgi için CUPRAC yöntemiyle belirlediği antioksidan aktivite değeri kuru ağırlıkta 2,30-13,30 mg TE/g ve Fariman vd. (2016) *Nizamuddinia zanardinii* için CUPRAC yöntemiyle belirlediği antioksidan aktivite değerinden $0,92 \pm 0,03$ mg/g oldukça yüksektir.

4.10 Optimum Noktada Elde Edilen Ekstraktların Teknofonksiyonel Özellikleri

Proteinler, emülsifiye edici ajan olmaları, yağ ve su tutma yetenekleri, tekstür değiştirici olmaları ve köpürme özellikleri nedeniyle gıda ürünlerinin teknofonksiyonel özelliklerine katkıda bulunabilmektedirler. Bir protein ekstraktının fonksiyonel özellikleri, molekül ağırlığı, amino asitlerin net yükü, bileşimi ve yüzey hidrofobikliğiyle ilgili olabilmektedir. Bunların yanında ekstraktın elde edilme koşulları ve ekstraksiyon tekniği, teknofonksiyonel özelliklerini etkileyebilmektedir

(García-Vaquero vd., 2017). *G.dura* makroalginden elde ettiğimiz ekstraktların çeşitli teknofonksiyonel özellikleri Çizelge 4.4’ te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Optimum noktada elde edilen ekstraktların teknofonksiyonel özelliklerini gösteren çizelge.

Su tutma	Yağ tutma	Emülsiyon aktivitesi	Emulsiyon stabilitesi	Köpürme aktivitesi	Köpürme stabilitesi
1,95±0,08g/g	5,68±0,004g/g	%44±0	%75±2,50	%12,5±0	%0±0

4.10.1 Yağ tutma ve su tutma kapasitesi

Çalışmamızda, *Gracilaria dura* makroalginden elde ettiğimiz ekstraktların su tutma kapasitesi Çizelge 4.4’ te görüldüğü üzere, 1,95 g su/g protein (ya da %195) ve yağ tutma kapasitesi 5,68 g yağ/g protein (ya da %568) ‘dir. Neto vd. (2018), *Gracilaria spp.*’nin su tutma ve yağ tutma kapasitesini inceledikleri çalışmalarında, yağ tutma kapasitesini kuru ağırlıkta 0,82 g/g olarak bulurken, su tutma kapasitesini ~8 g/g olarak rapor etmişlerdir. Chan ve Matanjun (2017), *Gracilaria changii* makroalginin su tutma kapasitesini, 24 °C’de 6,15±0,06 g/g olarak bulurken, Benjama ve Masniyom (2012), *Gracilaria fisheri* makroalginin su tutma kapasitesini 5,53±0,02 g/g ve yağ tutma kapasitesini 1,79±0,07 g/g, *Gracilaria tenuistipitata*’nın ise sırasıyla 8,97±1,73 g/g ve 2,23±0,15 g/g olduğunu bildirmiştir. Yüce-tepe (2019), *Spirulina platensis* mikroalginin su ve yağ tutma kapasitesini araştırdıkları çalışmalarında sırasıyla 4,41 g su/g protein ve 10,13 g yağ/g protein olarak belirtirken, Bashir vd. (2016), *Spirulina platensis*’den elde ettikleri protein izolatlarının su tutma ve yağ tutma kapasitesini sırasıyla 2,96±0,17 ml/g ve 0,59±0,16 ml/g olarak rapor etmişlerdir. Bashir vd. (2016), yine aynı çalışmalarında, *Spirulina*’dan elde edilen protein izolatlarının su tutma kapasitenin *Spirulina*’ya göre daha yüksek olduğunu ve bunun protein-su arayüzünün birincil kısımlarındaki polar amino asitlerin daha fazla olmasından kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Bleakley ve Hayes (2021), *Spirulina platensis* ve *Isochrysis galbana* mikroalglerinden elde ettikleri protein ekstraktlarının biyoaktif ve fonksiyonel özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında, su tutma kapasitesini sırasıyla, 2,25 g su/g protein ekstrakt ve 0,47 g su/g protein ekstrakt olarak belirlemişlerdir.

Yaich vd. (2011), *Ulva lactuca*'nın su tutma ve yağ tutma kapasitesini 25 °C ve 80 °C'de sırasıyla 6,66-7 g/g, 1,68-1,46 g/g olarak rapor etmiş ve sıcaklığın artmasıyla yağ tutma kapasitesinin azaldığını belirtmiştir. Rosemary vd. (2019) *Gracilaria corticata* ve *Gracilaria edulis*'in su tutma kapasitelerini, 4,03±0,39 g/g ve 4,09±0,28 g/g, yağ tutma kapasitesini ise ~2g/g olduğunu rapor etmişlerdir. García-Vaquero vd. (2017), *Himanthalia elongata* alginin protein ekstraktlarının fonksiyonel özelliklerini inceledikleri çalışmalarında, su tutma ve yağ tutma kapasitesini sırasıyla, 10,27±0,09 g/g ve 8,1±0,07 g/g olarak belirlemişlerdir. Guil-Guerrero vd. (2004), *Phaeodactylum tricornutum* ve *Nannochloropsis spp.* ile soya proteininin yağ tutma kapasitelerini kıyasladıkları çalışmalarında *P. tricornutum* ve *Nannochloropsis spp.*'in yağ tutma kapasitesinin soya proteininden daha yüksek olduğunu ve bu duruma nonpolar ve hidrofobik amino asitlerin yüksek seviyelerde olmasının etkili olabileceği şeklinde yorumlamışlardır. Benzer şekilde, Voutsinas ve Nakai (1983), proteinlerin hidrofobisitesinin yağ absorpsiyonunda önemli rol oynadığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda *G. dura*'dan elde ettiğimiz protein ekstraktlarının, yağ tutma kapasitesi yukarıda bahsedilen literatür araştırmalarına göre genel olarak yüksek bulunurken (*Himanthalia elongata* ve *Spirulina plantensis* hariç) su tutma kapasitesi literatüre göre genel olarak düşüktür. Yağ tutma kapasitesinin yüksek olması, yüksek hidrofobik proteinlerin varlığı nedeniyle lipidlerin hidrokarbon zincirlerine üstün bağlanma yeteneği sergilemesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Turan vd., 2015). Ayrıca, farklılıkların uygulanan ekstraksiyon koşul ve yöntemlerinin farklılığından kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Yücepe vd., 2019). Diğer taraftan, makroalgin türü, kimyasal kompozisyonu, iklim ve büyüme koşulları, anatomi ve lifli yapıları da fonksiyonel özelliklerini etkileyebilmektedir (Benjama ve Masniyom, 2012).

4.10.2 Emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi

RSM dizaynına göre optimum noktada elde ettiğimiz ekstraktların emülsiyon aktivitesi %44±0,00 emülsiyon stabilitesi ise %75±2,50 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Emülsiyon stabilitesinin ise 80 °C'de 30. dakikadan sonra bozulduğu görülmüştür. González- Pérez (2007), şiddetli ekstraksiyon prosedürlerinin protein denatürasyonuna sebep olabileceğini ve protein fonksiyonelliğinde değişiklik

oluşturabileceğini, bunun yanı sıra proteinlerin fenolik bileşiklerle olan etkileşiminin fonksiyonel özelliklerini etkileyebileceğini belirtmişlerdir. Yüce tepe vd. (2019), *Spirulina platensis* mikrolaginden ultrases destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde ettikleri protein ekstraktlarının, emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesini sırasıyla, %42,99 ve %92,50 olarak bulurken, Ursu vd. (2014), *Chlorella vulgaris* protein ekstraktlarının emülsiyon stabilitesini pH 7 ve pH 12 değerleri için sırasıyla %72±1 ve %79±1 olarak rapor etmişlerdir. Ursu vd. (2014), pH 12’de elde edilen protein ekstraktlarının, pH 7’den daha düşük fonksiyonellik gösterdiğini belirtirken, González- Pérez (2007) farklı olarak ayçiçeği proteinlerinin nötral ve alkali pH değerlerinde stabil emülsiyon oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Bashir vd. (2016), *Spirulina platensis* mikroalginin protein izolatlarının emülsiyon aktivitesini ve emülsiyon stabilitesini sırasıyla %51,54±2,12 ve %65,20±2,17 olarak belirlemişlerdir. Ursu vd. (2014), bu farklılıkların sadece proteinlerin yapısal ve yüzey özellikleri ile ilgili olmadığını, aynı zamanda alkali ekstraksiyon esnasında hücre zarından salınan diğer bileşikler ile proteinler, lipitler, klorofiller arasındaki etkileşimden de kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. García-Vaquero vd. (2017), *Himanthalia elongata* kahverengi alginden elde ettikleri protein konsantratlarının emülsiyon aktivitesini %90,7-100 olarak belirlemişlerdir. Emülsiyon stabilitesi, pH, damlacık boyutu, net yük, ara yüzey gerilimi ve protein yapısından etkilenebilmektedir (Hung ve Zayas, 1991). Elde ettiğimiz sonuçlara göre emülsiyon stabilitesi literatür ile benzer ya da daha iyi emülsiyon aktivitesi ise literatürden daha düşüktür.

4.10.3 Köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi

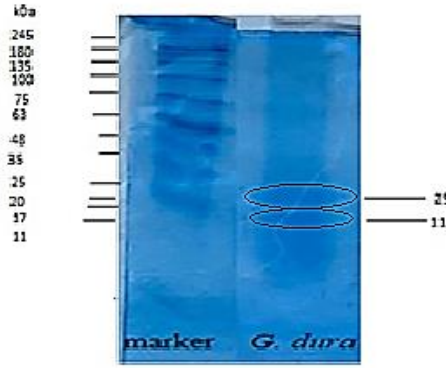
Köpürme kapasitesi, proteinin hava-su yüzeyine difüze olmasına bağlıyken, köpürme stabilitesi hava baloncukları etrafında kalın yapışkan bir tabaka oluşmasına bağlıdır (Bashir vd., 2016). RSM dizaynına göre optimum noktada elde ettiğimiz ekstraktların köpürme aktivitesi %12,5±0 ve köpürme stabilitesinin olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.4). Bir proteinin köpük oluşturma ve stabilize etme yeteneği, protein türü, denatürasyon derecesi, kalsiyum iyonlarının varlığı veya yokluğu, pH ve çırpma yöntemleri gibi çeşitli parametrelere bağlıdır (Towsend ve Nakai, 1983).

Bashir vd. (2016), *Spirulina platensis* mikroalginin protein izolatlarının köpük oluşturma kapasitesini 12,53±0,16 ml ve köpük stabilitesini 32,40±4,53 dakika

olarak rapor etmişlerdir. Felix vd. (2021), *Porphyra dioica* alginden elde edilen protein konsantratlarının köpürme özelliklerini inceledikleri çalışmalarında, köpürme kapasitesini $18,3 \pm 2,6$ olarak belirlerken, García-Vaquero vd. (2017), *Himanthalia elongata* kahverengi algi için pH 2’de en düşük köpük oluşturma kapasitesi gösterdiğini, pH 6, 8 ve 10 değerleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar olmadığını, en yüksek köpük oluşturma kapasitesinin pH 10’da $71,52 \pm 4,81$ olduğunu belirlemişlerdir. García-Vaquero vd. (2017), *Himanthalia elongata* proteinlerinin pH 6, 8 ve 10’daki daha yüksek köpürme kapasitesinin, hidrofobik etkileşimleri zayıflatan proteinler üzerindeki artan net yüklerden dolayı olabileceğini, bu şekilde proteinin esnekliğinin de arttığını belirtmişlerdir. Bu durumda, proteinler hava-su arayüzüne daha hızlı yayılmakta ve hava parçacıklarını kapsülleyerek köpük oluşumunun artırmasına izin vermektedir. García-Vaquero vd. (2017), aynı çalışmalarında, köpük stabilitesinin zamanla önemli şekilde azaldığını zaman ile pH’nın interaksiyon etkisinin önemli olduğunu rapor etmişler, köpürme stabilitesinin pH 10’da diğer pH değerlerine göre daha kararlı yapıda olduğunu, 120. dk’da $\sim 50\%$ ’ye düştüğünü belirlemişlerdir. Kumar vd. (2014) ise *Kapaphycus alvarezii* alginin köpürme kapasitesini, en yüksek pH 4’te $53,33 \pm 2,31$, en düşük ise pH 6’da 38 ± 2 olarak elde ederken, Benelhadj vd. (2016), *Arthrospira (Spirulina) platensis*’ten ekstrakte edilen protein izolatının pH 3’te en az ve pH 10’da en yüksek köpürme özelliği gösterdiğini belirlemişlerdir. pH 10’da hidrofobik etkileşim daha zayıf olmasına rağmen, protein esnekliğinin daha yüksek olmasının, daha yüksek köpürme özelliği ile sonuçlandığı belirtilmiştir. Farklı gıdalardan elde edilen proteinlerin köpük oluşturma aktivitesi ile kıyasladığımızda, Jambrak vd. (2008), ultrases uygulaması ile peynir altı suyundan elde edilen protein izolatlarının ve protein konsantratlarının köpürme kapasitesini, 20 kHz şiddetinde 15 dk ultrases uygulandığında peynir altı suyu protein izolatları için $132-235$, 40 kHz’lik 15 dk su banyosu uygulandığında ise 220 ve peynir altı suyu konsantratları için bu değerlerin sırasıyla $124-221$ ve 209 olduğunu belirlemişlerdir. En yüksek köpük stabilitesi değeri, 20 kHz ultrases uygulaması yapılan peynir altı suyu protein izolatlarında $68,3-98,4$ dk arasında ve peynir altı suyu konsantraları için $55,6-89,5$ dk olarak elde edilmiştir. Köpürme yeteneği, proteinin dağılma yeteneğine önemli ölçüde bağlıyken, köpük stabilitesi proteinlerin denatürasyon derecesinden etkilenmektedir. Elde edilen değerler bizim değerlerimize göre oldukça yüksektir.

4.11 SDS-PAGE Elektroforez ile Tanımlama Çalışması

SDS-PAGE ile tanımlama çalışması sonuçlarına göre toplamda 10 bant görülmüş olup, bantlarda yoğun bir belirginlik olmamakla birlikte, 8. banttan sonra yoğunlaşma olduğu ve 25 kDa ile 11 kDa molekül ağırlığında 2 bantın nispeten belirgin olduğu görülmüştür. Elde edilen protein bantları Şekil 4.14'de görülmektedir.



Şekil 4.14. *Gracilaria dura* makroalginden elde edilen protein bantları.

Literatürde alg proteinlerin SDS-PAGE analizi sonuçlarına bakıldığında, Chakraborty vd. (2010), *Polysiphonia* kırmızı alginin proteinlerinin SDS-PAGE analizinde 4 bant bulmuşlardır. Bunlardan iki önemli banttan birincisi, 205 kDa ve 97,4 kDa arasında diğeri ise 97,4 kDa ve 66 kDa arasında bulunmuştur. Bir diğeri bant 20,1 kDa ve 29 kDa arasında ve en belirgin bant, 6,5 kDa ve 3 kDa arasında bulunmuştur. Rouxel vd. (2001), *Gracilaria verrusca* için bantların 14,8 kDa ve 62,1 kDa aralığında olduğunu, moleküler ağırlığı 46 kDa ve 49 kDa olan iki bantta yoğunlaşma olduğunu belirtmişlerdir. Rouxel vd. (2001), yine aynı çalışmada *Palmaria palmata* için 6 bant elde etmişler bunlardan 15,2 kDa, 20,3 kDa ve 48,3 kDa molekül ağırlığına sahip olan bantların daha belirgin olduğunu ifade etmişlerdir.

Harnedy ve FitzGerald (2013), *Palmaria palmata* için 16 ve 18 kDa molekül ağırlığında alkalide çözünür protein bantlarının en belirgin olduğunu ifade etmişlerdir. Fleurence (2003), bu bölgenin fikoeritrinin (240 kDa) alt üniteleri ya da fikosiyanın gibi diğeri fikobiliproteinlere ait olabileceğini ifade etmişlerdir. Fikoeritrinin α , β ve γ alt ünitelerinin sırasıyla 20, 21 ve 31 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu belirtilmiştir (Fleurence, 2003).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Türkiye’de Çanakkale ilinin kıyılarından toplanan *Gracilaria dura* makroalgi için kimyasal kompozisyon analizi, *G.dura*’nın protein çözünürlüğü ve zeta potansiyeli ölçümünün yanı sıra, enzim ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların, yanıt yüzey metodolojisi ile protein miktarı, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivite analizleri ve optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Kimyasal kompozisyon bakımından elde ettiğimiz sonuçlar, literatürdeki farklı alg türleri ve yakın alg türleri ile kıyaslanmış ve literatürle benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Elde ettiğimiz ekstraksiyon verimi ve protein miktarı literatürle kıyaslandığında oldukça yüksektir. *G. dura*’dan protein ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesini diğer alglerin fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesi ile karşılaştırdığımızda genel olarak oldukça iyi düzeyde olduğu görülmüştür.

G. dura’dan elde edilen protein ekstraktlarının yağ tutma kapasitesinin literatürle kıyaslandığında pek çok alg türü proteinlerinin yağ tutma kapasitesinden yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle, *G.dura* makroalginden elde edilen protein ekstraktlarının yağ içeren gıda formülasyonlarına uygulanabilme potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Elde ettiğimiz ekstraktların emülsiyon stabilitesi oldukça iyi olmasına rağmen, emülsiyon aktivitesi, köpürme kapasitesi ve stabilitesinin ise düşük olduğu tespit edilmiştir.

Gıda formülasyonlarına dahil edilen proteinler su tutma, yağ tutma, köpük oluşturma ve emülsiyon oluşturma gibi çeşitli fonksiyonel özellikleri ve gıda ürünlerinin üretiminde ve depolama süresince kalitelerinin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Gelecek çalışmalarda, geleneksel protein kaynaklarına alternatif bir protein kaynağı olarak, *G.dura*’nın farklı gıda ürünlerine katılması ve ürünün fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra duyuşal özelliklerine etkisi araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Adalbjörnsson, B.V. ve Jónsdóttir, R., 2015. Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from algae, pp.145-150, in: Stengel, D. ve Connan, S. (Editor), Natural Products From Marine Algae, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1308, Humana Press, New York, USA.
- Albano, K. M. ve Nicoletti, V. R., 2018. Ultrasound impact on whey protein concentrate-pectin complexes and in the O/W emulsions with low oil soybean content stabilization, Ultrasonics Sonochemistry, 41, 562-571.
- Alves, A., Sousa, R. A. ve Reis, R. L., 2013. A practical perspective on ulvan extracted from green algae, Journal of Applied Phycology, 25, 2, 407-424.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, Fifteenth Edition, Methods, 925.10, 925.03, 954.02, 978.10, 950.48, The Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 26, 7970-7981.
- Ardekani, M. R. S., Hajimahmoodi, M., Oveisi, M. R., Sadeghi, N., Jannat, B., Ranjbar, A. M., Gholam N. ve Moridi, T., 2011. Comparative antioxidant activity and total flavonoid content of Persian pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 10, 3, 519-524.
- Arslan, D., Aydın, M. ve Türker, S., 2021. Extraction methods of medicinal and aromatic plants, its use in foods and evaluation in food supplement field, Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 9, 5, 926-936.
- Aziz, A., Hassan, A., Roy, S. K., Haque, M. Z., Saha, B. K., Ahmed, S., Rahman, M., Mohanta, L.C. ve Mashuk, O. F., 2021. Potential of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* grown in Nuniachara, Cox's Bazar, Bangladesh, Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 56,1, 39-46.
- Balboa, E. M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E. ve Domínguez, H., 2013. *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae, Food Chemistry, 138, 2-3, 1764-1785.
- Boland, M.J., Rae, A.N., Vereijken, J.M., Meuwissen, M.P.M, Fischer, A.R.H., van Boekel, M.A.J.S., Rutherford, M.S., Gruppen, H., Moughan, J.P. ve Hendriks, W.H., 2013. The future supply of animal-derived protein for human consumption, Trends in Food Science & Technology, 29,1, 62-73.

- Boye, J.I. ve Barbana, C., 2012. Protein processing in food and bioproduct manufacturing and techniques for analysis, pp.86-113, in: Turgut N. (Editor) Food and industrial bioproducts and bioprocessing, John Wiley & Sons, Inc., Dunford, England.
- Barbarino, E. ve Lourenço, S. O., 2005. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 17,5, 447-460.
- Bashir, S., Sharif, M. K., Butt, M. S., ve Shahid, M., 2016. Functional properties and amino acid profile of *Spirulina platensis* protein isolates, *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B: Biological Sciences*, 59, 1, 12-19.
- Becker, E. W., 2007. Micro-algae as a source of protein, *Biotechnology Advances*, 25, 2, 207-210.
- Benelhadj, S., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Attia, H. ve Ghorbel, D., 2016. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate, *Food Chemistry*, 194, 1056-1063.
- Benjama, O. ve Masniyom, P., 2012. Biochemical composition and physicochemical properties of two red seaweeds (*Gracilaria fisheri* and *G. tenuistipitata*) from the Pattani Bay in Southern Thailand, *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*, 34,2, 223-230.
- Bilgin, Ş. ve Ertan, Ö. O., 2002. Selected chemical constituents and their seasonal variations in *Flabellia petiolata* (Turra) nizam. and *Halimeda tuna* (Ellis & Sol.) JV Lamour. in the gulf of Antalya (North-eastern Mediterranean), *Turkish Journal of Botany*, 26,2, 87-90.
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Ródenas, S. ve Sánchez-Muniz, F. J., 2009. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds, *Journal of Medicinal Food*, 12, 2, 236–258.
- Böcker, L., Bertsch, P., Wenner, D., Teixeira, S., Bergfreund, J., Eder, S., Fischer, P. ve Mathys, A., 2021. Effect of *Arthrospira platensis* microalgae protein purification on emulsification mechanism and efficiency, *Journal of Colloid and Interface Science*, 584, 344-353.
- Bleakley, S. ve Hayes, M., 2017. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production, *Foods*, 6, 33.
- Bleakley, S., ve Hayes, M., 2021. Functional and bioactive properties of protein extracts generated from *Spirulina platensis* and *Isochrysis galbana* T-Iso, *Applied Sciences*, 11,9, 3964.
- Branden C.I. ve Tooze J., 1999. Introduction to protein structure, Second edition, Taylor&Francis Group Garland Science, Newyork, USA.

- Burtin P., 2003. Nutritional value of seaweeds, *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2, 4, 498-503.
- Büyüktuncel, E., 2013. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17,2, 93-103.
- Caparros-Megido, R., Sablon, L., Geuens, M., Brostaux, Y., Alabi, T., Blecker, C., Drugmand D., Haubruge E. ve Francis, F., 2014. Edible insects acceptance by Belgian consumers: promising attitude for entomophagy development, *Journal of Sensory Studies*, 29,1, 14-20.
- Chakraborty, S., Santra S.C. ve Bhattacharya T., 2010. Comparative study of protein profile of eight benthic marine macroalgae by SDS PAGE, *Biohelica, A Scientific Journal of Biological Sciences*, 1, 1- 4.
- Chan, P. T. ve Matanjun, P., 2017. Chemical composition and physicochemical properties of tropical red seaweed, *Gracilaria changii*. *Food Chemistry*, 221, 302-310.
- Chen, Y., Chen, J., Chang, C., Chen, J., Cao F., Zhao, J., Zheng, Y. ve Zhu, J., 2019. Physicochemical and functional properties of proteins extracted from three microalgal species, *Food Hydrocolloids* 96, 510–517.
- Cheng, Y. S., Zheng, Yi., Labavitch, J. M. ve VanderGheynst, J. S., 2011. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*, *Process Biochemistry*, 46, 10, 1927-1933.
- Cirik Ş. ve Cirik S., 2011. Su bitkileri (Deniz bitkilerinin biyolojisi, ekolojisi ve yetiştirme teknikleri), Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Cunha, S.A., Nova, P., Salsinha, A.S., Gomes, A. ve Pintado, M., 2021. *In vitro* gastrointestinal digestion impact on the antioxidant activity of extracts produced from the macroalgae *Gracilaria gracilis* and *Ulva rigida*, in: Moreno-Fernandez, D. (Editor), *The 2nd International Electronic Conference on Foods, Future Foods and Food Technologies for a Sustainable World*, Portugal, online.
- Damodaran, S., 2017. Food proteins:an overview, pp.1-24. in: Damodaran, S. ve Paraf, A., (Editor), *Food Proteins and Their Applications*, CRC Press, Newyork, ABD.
- Dang, T. T., Vuong, V.Q., Schreider, M. J., Bowyer, M. C., Van Altena, I. A. ve Scarlett, C. J., 2017. Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hormosira banksii* using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology*, 29,6, 3161-3173.
- Derakhshan, Z., Ferrante, M., Tadi, M., Ansari, F., Heydari, A., Hosseini, M. S., Conti G.O. ve Sadrabad, E. K., 2018. Antioxidant activity and total phenolic

content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds, Food and Chemical Toxicology, 114, 108-111.

Dietrich, H. ve Pour-Nikfardjam, M. S., 2009. Influence of phenolic compounds and tannins on wine-related microorganisms, pp.307-335, in:König, H., Unden, G. ve Fröhlich, J., (Editor), Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine, Springer Nature, Berlin, Heidelberg, Germany.

Dinh, T. V., Saravana, P. S., Woo, H. C., ve Chun, B. S., 2018. Ionic liquid-assisted subcritical water enhances the extraction of phenolics from brown seaweed and its antioxidant activity, Separation and Purification Technology, 196, 287-299.

Duan, X-J., Zhang, W-W., Li, X-M., ve Wang, B-G., 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*, Food Chemistry, 95,1, 37-43.

El Gamal, A. A., 2010. Biological importance of marine algae, Saudi Pharmaceutical Journal, 18,1, 1-25.

Elias, R. J., Kellerby, S. S. ve Decker, E. A., 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48, 5, 430-441

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009. How to feed the World in 2050.

Fariman, G. A., Shastan, S. J. ve Zahedi, M. M., 2016. Seasonal variation of total lipid, fatty acids, fucoxanthin content, and antioxidant properties of two tropical brown algae (*Nizamuddinina zanardinii* and *Cystoseira indica*) from Iran, Journal of Applied Phycology, 28, 2, 1323-1331.

Felix, M., Puerta, E., Bengoechea, C. ve Carrera-Sánchez, C., 2021. Relationship between interfacial and foaming properties of a *Porphyra dioica* seaweed protein concentrate, Journal of Food Engineering, 291, 110238.

Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. ve Falkowski, P., 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components, Science, 281, 5374, 237-240.

Fleurence, J., Massiani, L., Guyader, O. ve Mabeau, S., 1995. Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*, Journal of Applied Phycology, 7,4, 393-397.

Fleurence, J. (2003). R-phycoerythrin from red macroalgae: strategies for extraction and potential application in biotechnology. Applied Biotechnology, Food Science and Policy, 1, 63-68

Fleurence, J., Morancais, M., ve Dumay, J., 2018. Seaweed proteins, pp. 245-262, in:Yada,Y.R., (Editor), Proteins in Food Processing, Woodhead Publishing, USA.

- Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M. ve Caroppo, C., 2013. The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source, *Marine Drugs*, 11, 10, 3754-3776.
- Fresco, L. O., 2009. Challenges for food system adaptation today and tomorrow, *Environmental Science ve Policy*, 12, 4, 378-385.
- Garson, M. J., 1989. Biosynthetic studies on marine natural products, *Natural Product Reports*, 6, 2, 143-170.
- García-Vaquero, M., López-Alonso, M. ve Hayes, M., 2017. Assessment of the functional properties of protein extracted from the brown seaweed *Himanthalia elongata* (Linnaeus) SF Gray, *Food Research International*, 99, 3, 971-978.
- Gajaria, T. K., Suthar, P., Baghel, R. S., Balar, N. B., Sharnagat, P., Mantri, V. A. ve Reddy, C. R. K., 2017. Integration of protein extraction with a stream of byproducts from marine macroalgae: a model forms the basis for marine bioeconomy, *Bioresource Technology*, 243, 867-873.
- Gerland, P., Raftery, A. E., Ševčíková, H., Li, N., Gu, D., Spoorenberg, T., Alkema, L., Fosdick B.K., Chunn, J., Lalic N., Bay, G., Buettner, T., Heilig, G.K. ve Wilmoth, J., 2014. World population stabilization unlikely this century, *Science*, 346, 6206, 234-237.
- González- Pérez, S. ve Vereijken, J. M., 2007. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 12, 2173-2191.
- Gordalina, M., Pinheiro, H. M., Mateus, M., da Fonseca, M. M. R., ve Cesário, M. T., 2021. Macroalgae as Protein Sources- A Review on Protein Bioactivity, Extraction, Purification and Characterization, *Applied Sciences*, 11,17, 7969.
- Gordon, M. H., 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*, pp. 1-18. in: Hudson, B.J.F. (Editor), *Food antioxidants*, Springer Dordrecht, Holland.
- Gressler, V., Yokoya, N. S., Fujii, M. T., Colepicolo, P., Mancini F. J., Torres, R. P. ve Pinto, E., 2010. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species, *Food Chemistry*, 120,2, 585-590.
- Guil-Guerrero, J. L., Navarro-Juárez, R., López-Martinez, J. C., Campra-Madrid, P., ve Reboloso-Fuentes, M., 2004. Functional properties of the biomass of three microalgal species, *Journal of Food Engineering*, 65,4, 511-517.
- Gupta, S., ve Abu-Ghannam, N., 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22,6, 315-326.
- Gümüş, B., Ünlüsayın, M. ve Gümüş, E., 2019. Gıdalarda deniz kaynaklı makroalg özütü kullanımı ve lipit oksidasyonunu önlemede antioksidan etkisi, *Akademik Gıda*, 17,3, 389-400

- Gümüş, B., ve Ünlüsayın, M., 2016. Tüketilebilir iki makroalg ekstraktının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, *Su Ürünleri Dergisi*, 33,4, 389-395.
- Harnedy, P.A. ve FitzGerald, R. J., 2011. Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae, *Journal of Phycology*, 47,2, 218-232.
- Harnedy, P. A. ve FitzGerald, R. J., 2013. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*, *LWT-Food Science and Technology*, 51, 1, 375-382.
- Hildebrand, G., Poojary, M. M., O'Donnell, C., Lund, M. N., Garcia-Vaquero, M. ve Tiwari, B. K., 2020. Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction, *Journal of Applied Phycology*, 32, 3, 1709-1718.
- Holdt, S. L. ve Kraan, S., 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation, *Journal of Applied Phycology*, 23, 3, 543-597.
- Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E.C.Y., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., Fan, G., Wang, L. Huang, X. ve Pan, S., 2013. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions, *Food Hydrocolloids*, 30, 2, 647-655.
- Hung, S. C., ve Zayas, J. F., 1991. Emulsifying capacity and emulsion stability of milk proteins and corn germ protein flour, *Journal of Food Science*, 56, 5, 1216-1218.
- Hubert, B., Rosegrant, M., Van Boekel, M.A.J.S, ve Ortiz, R., 2010. The future of food: scenarios for 2050, *Crop Science*, 50, 33-50.
- Jambrak A. R., Mason T. J., Lelas V., Herceg Z., ve Herceg I. L., 2008. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions, *Journal of Food Engineering* 86, 2, 281-287.
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han, J., Chen, L., 2014. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality, *LWT Food Sci Technol* 57, 2, 461-469.
- Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S., ve Barrow, C. J., 2012. Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate, *Food Chemistry*, 134, 3, 1343-1353.
- Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., ve Koocheki, A., 2014. Optimization of extraction, antioxidant activity and functional properties of quince seed mucilage by RSM, *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 113-124.
- Karaca, A. C., Low, N., ve Nickerson, M., 2011. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction, *Food Research International*, 44, 9, 2742-2750.

- Kadam, S. U., Tiwari, B. K. ve O'Donnell, C. P., 2013. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 20, 4667-4675.
- Kadam, S. U., Álvarez, C., Tiwari, B. K. ve O'Donnell, C. P., 2015. Extraction of biomolecules from seaweeds, pp. 243-269, in: Tiwari, B. K. ve Troy, D.J., (Editor), *Seaweed sustainability food and non-food applications*, Academic Press, Newyork, USA.
- Kazir, M., Abuhassira, Y., Robin, A., Nahor, O., Luo, J., Israel, A., Golberg, A. ve Livney, Y. D., 2019. Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva* sp. and *Gracilaria* sp., for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates, *Food Hydrocolloids*, 87, 194-203.
- Kiosseoglou, V., Paraskevopoulou, A. ve Poojary, M. M., 2011. Functional and physicochemical properties of pulse proteins, pp.58-85, in: Tiwari, B.K., Gowen, A. ve McKenna, B., (Editor), *Pulse Foods: Processing, Quality and Nutraceutical Applications*, Academic Press, Amsterdam.
- Koç, B. ve Kaymak-Ertekin, F., 2010. Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları, *Gıda*, 35, 1, 1-8.
- Kumar, C. S., Ganesan, P., Suresh, P. V. ve Bhaskar, N., 2008. Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds-a review, *Journal of Food Science and Technology*, 45,1, 1-13.
- Kumar, K. S., Ganesan, K., Selvaraj, K. ve Rao, P.V.S., 2014. Studies on the functional properties of protein concentrate of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty-An edible seaweed, *Food Chemistry*, 153, 353-360.
- Kumar, Y., Singhal, S., Tarafdar, A., Pharande, A., Ganesan, M. ve Badgujar, P. C., 2020. Ultrasound assisted extraction of selected edible macroalgae: Effect on antioxidant activity and quantitative assessment of polyphenols by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), *Algal Research*, 52, 102-114.
- Kumaran, A., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*, *Food Chemistry*, 97,1, 109-114.
- Kumari, P., Kumar, M., Gupta, V., Reddy, C. R. K., ve Jha, B., 2010. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs, *Food Chemistry*, 120, 3, 749-757.
- Lam, A.C.Y., Can Karaca, A., Tyler, R.T., ve Nickerson, M.T., 2018. Pea protein isolates: structure, extraction and functionality, *Food Reviews International*, 34, 2, 126-147.

- Liu, J., Zhu, Y., Tao, Y., Zhang, Y., Li, A., Li, T., Sang, M. ve Zhang, C., 2013. Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease, *Biotechnology for Biofuels*, 6, 98, 1-11.
- López, A., Rico, M., Rivero, A. ve Tangil, M. S., 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts, *Food Chemistry*, 125,3, 1104-1109.
- Lordan, S., Ross, R. P. ve Stanton, C., 2011. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases, *Marine Drugs*, 9, 6, 1056-1100.
- Lourenço, S. O., Barbarino, E., De- Paula, J. C., Pereira, L. O. D. S. ve Marquez, U. M. L., 2002. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen- to- protein conversion factors for 19 tropical seaweeds, *Phycological Research*, 50, 3, 233-241.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 1, 265-275.
- Mabeau, S. ve Fleurence, J., 1993. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects, *Trends in Food Science & Technology*, 4 ,4, 103-107.
- MacArtain, P., Gill, C. I. R., Brooks, M., Campbell, R., ve Rowland, I. R., 2007. Nutritional value of edible seaweeds, *Nutrition Reviews*, 65, 12, 535-543.
- Martins, C. D. L., Ramlov, F., Carneiro, N. P. N., Gustinari, L. M., dos Santos, B. F., Bento, L. M., Lhullier, C., Gouvea, L., Bastos, E., Horta, P.A. ve Soares, A. R., 2013. Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast., *Journal of Applied Phycology*, 25, 4, 1179-1187.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N. M. ve Muhammad, K., 2009. Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Eucheuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*, *Journal of Applied Phycology*, 21,1, 75-80.
- Mayakrishnan, V., Kannappan, P., Abdullah, N. ve Ahmed, A. B. A., 2013. Cardioprotective activity of polysaccharides derived from marine algae: An overview, *Trends in Food Science & Technology*, 30, 2, 98-104.
- Mohamed, S., Hashim, S. N. ve Rahman, H. A., 2012. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy, *Trends in Food Science & Technology*, 23, 2, 83-96.
- Morr, C. V., German, B., Kinsella, J. E., Regenstein, J. M., Buren, J. P., Kilara, A., Lewis, B.A. ve Mangino, M. E., 1985. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure, *Journal of Food Science*, 50, 6, 1715-1718.

- Mouritsen, O. G., 2013. The science of seaweeds: marine macroalgae benefit people culturally, industrially, nutritionally, and ecologically, *American Scientist*, 101, 6, 458-466.
- Narasimhan, M. K., Pavithra, S. K., Krishnan, V. ve Chandrasekaran, M., 2013. *In vitro* analysis of antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activity of *Enteromorpha antenna*, *Enteromorpha linza* and *Gracilaria corticata* extracts. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 8, 4, 151-159.
- Neto, R. T., Marçal, C., Queirós, A. S., Abreu, H., Silva, A.M.S, ve Cardoso, S. M., 2018. Screening of *Ulva rigida*, *Gracilaria* sp., *Fucus vesiculosus* and *Saccharina latissima* as Functional Ingredients, *International Journal of Molecular Sciences*, 19,10, 2987.
- Nursid, M., Khatulistiani, T. S., Noviendri, D., Hapsari, F. D. ve Hardiyati, T., 2020. Total phenolic content, antioxidant activity and tyrosinase inhibitor from marine red algae extract collected from Kupang, East Nusa Tenggara, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 493, 1, 012013
- Øverland M., Mydland T.L, ve Skrede A., 2019. Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1, 13–24.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z., 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6,3, 331-336.
- Özcan, T. ve Delikanlı, B., 2011. Gıdaların tekstürel özelliklerinin geliştirilmesinde peynir altı suyu protein katkılarının fonksiyonel etkileri, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25, 2, 77-88.
- Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Pérez, M., ve Hernández-Pérez, T., 2010. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life-a review, *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 3, 299-308.
- Pokorny, J., 2001. The development of oxidative rancidity in foods, pp.1-21, in: Pokorny, J., Yanishlieva, N., ve Gordon, M.H. (Editor), *Antioxidants in food: practical applications*, CRC press, Newyork, USA.
- Ramdani, M., Elasri, O., Saidi, N., Elkhiti, N., Taybi, F. A., Mostareh, M., Zaraali, O., Haloui, B. ve Ramdani, M., 2017. Evaluation of antioxidant activity and total phenol content of *Gracilaria bursa-pastoris* harvested in Nador lagoon for an enhanced economic valorization, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4,28, 1-7.
- Rasyid, A., Ardiansyah, A. ve Pangestuti, R., 2019. Nutrient composition of dried seaweed *Gracilaria gracilis*, *Indonesian Journal of Marine Sciences*, 24,1, 1-6.

- Rouxel, C., Daniel, A., Jérôme, M., Etienne, M. ve Fleurence, J., 2001. Species identification by SDS-PAGE of red algae used as seafood or a food ingredient, *Food Chemistry*, 74,3, 349-353.
- Rosemary, T., Arulkumar, A., Paramasivam, S., Mondragon-Portocarrero, A. ve Miranda, J. M., 2019. Biochemical, micronutrient and physicochemical properties of the dried red seaweeds *Gracilaria edulis* and *Gracilaria corticata*, *Molecules*, 24,12, 2225.
- Rosenhahn, A., Finlay, J. A., Pettit, M. E., Ward, A., Wirges, W., Gerhard, R., ve Callow, M.E., Grunze, M., Callow, J.A., 2009. Zeta potential of motile spores of the green alga *Ulva linza* and the influence of electrostatic interactions on spore settlement and adhesion strength, *Biointerphases*, 4, 1, 7-11.
- Sarmadi, B.H. ve Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review, *Peptides*, 10, 1949–1956.
- Sánchez-Camargo, A., Montero, L., Stiger-Pouvreau, V., Tanniou, A., Cifuentes, A., Herrero, M., ve Ibáñez, E., 2016. Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae, *Food Chemistry*, 192, 67-74.
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P. A. ve Gruppen, H., 2011. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis sp.*, *Bioresource Technology*, 102, 19, 9121-9127.
- Schwenzfeier, A., Lech, F., Wierenga, P. A., Eppink, M. H.M. ve Gruppen, H., 2013a. Foam properties of algae soluble protein isolate: Effect of pH and ionic strength, *Food Hydrocolloids*, 33,1, 111-117.
- Schwenzfeier, A., Helbig, A., Wierenga, P. A. ve Gruppen, H., 2013b. Emulsion properties of algae soluble protein isolate from *Tetraselmis sp.*, *Food Hydrocolloids*, 30,1, 258-263.
- Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y. ve Chen, J., 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods, *Food Chemistry* 107, 2, 929–938
- Siriwardhana, N., Kim, K-N, Lee, K.W., Kim, S.H., Ha, J.H., Song, C.B., Lee, J.B., ve Jeon, Y.J., 2008. Optimisation of hydrophilic antioxidant extraction from *Hizikia fusiformis* by integrating treatments of enzymes, heat and pH control, *Food Science Technology*, 43, 4, 587-596.
- Singhal, A., Karaca, A. C., Tyler, R., ve Nickerson, M., 2016. Pulse proteins: from processing to structure-function relationships, pp.55-78, in: Goyal, A. K., Grain legumes, E-Book, ISBN, 978-953-51-5456-3
- Sreenivasan, S., Ibrahim, D., Mohd, J., Kassim, N.M., 2007. Free radical Scavenging Activity and Total Phenolic Compounds of *Gracilaria changii*. *International Journal of Natural & Engineering Sciences*, 1, 3, 115-117.

- Sudhakar, M. P., Kumar, B. R., Mathimani, T. ve Arunkumar, K., 2019. A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective, *Journal of Cleaner Production*, 228, 1320-1333.
- Suwal, S., Perreault, V., Marciniak, A., Tamigneaux, É., Deslandes, É., Bazinet, L., Jacques, H., Beaulieu, L. ve Doyen, A., 2019. Effects of high hydrostatic pressure and polysaccharidases on the extraction of antioxidant compounds from red macroalgae, *Palmaria palmata* and *Solieria chordalis*, *Journal of Food Engineering*, 252, 53-59.
- Sutay-Kocabaş D., 2021. Gıda endüstrisinde enzimlerin rolü ve ilgili yasal düzenlemeler, pp.29-38, in:Ögel Z.B., (Editor), *Gıda Biyoteknolojisi*, 1. Baskı, Türkiye Klinikleri, Ankara.
- Szajdek, A. ve Borowska, E. J., 2008. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review, *Plant Foods for Human Nutrition*, 63,4, 147-156.
- Tan, E-S., Ying-Yuan, N. ve Gan, C-Y., 2014. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation, *Food Chemistry*, 152, 447-455.
- Teuling, E., Schrama, J. W., Gruppen, H. ve Wierenga, P. A., 2019. Characterizing emulsion properties of microalgal and cyanobacterial protein isolates, *Algal Research*, 39, 101471.
- Topuz, O. K., Gokoglu, N., Yerlikaya, P., Ucak, İ. ve Gümüş, B., 2016. Optimization of antioxidant activity and phenolic compound extraction conditions from red seaweed (*Laurencia obtuse*), *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25, 3, 414-422.
- Toor, R. K. ve Savage, G. P., 2006. Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chemistry*, 99, 4, 724-727.
- Torres, P., Santos, J. P., Chow, F. ve dos Santos, D.Y.A.C., 2019. A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta), *Algal Research*, 37, 288-306.
- Towsend A. ve Nakai S., 1983. Relationship between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins, *Journal of Food Science*, 48, 2, 588-594.
- Truong, D. H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H. ve Nguyen, H. C., 2019. Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*, *Journal of Food Quality*, 1-9.
- Turan, D., Capanoglu, E. ve Altay, F., 2015. Investigating the effect of roasting on functional properties of defatted hazelnut flour by response surface methodology (RSM), *LWT-Food Science and Technology*, 63, 1, 758-765.

- Ursu, A-V., Marcati, A., Sayd, T., Lhoutellier, V-S., Djelveh, G. ve Michaud, P., 2014. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*, *Bioresource Technology*, 157, 134-139.
- Valente, L. M. P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E. F. ve Pinto, I. S., 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles, *Aquaculture*, 252,1, 85-91.
- Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I. ve Muylaert, K., 2012. Influence of organic matter generated by *Chlorella vulgaris* on five different modes of flocculation, *Bioresource Technology*, 124, 508-511.
- Venkataraman, L. V. ve Shivashankar, S., 1979. Studies on the extractability of proteins from the alga *Scenedesmus acutus*, *Algological Studies, Archiv für Hydrobiologie*, 22, 114-126.
- Voutsinas, L. P., ve Nakai, S., 1983. A simple turbidimetric method for determining the fat binding capacity of proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 1, 58-63.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Gudmundur, O.H., Jónsson, J.O., Thorkelsson, G. ve Ólafsdóttir, G., 2010. Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*, *LWT-Food Science and Technology* 43, 9, 1387-1393.
- Wen, X., Peng, C., Zhou, H., Lin, Z., Lin, G., Chen, S. ve Li, P., 2006. Nutritional composition and assessment of *Gracilaria lemaneiformis* Bory, *Journal of Integrative Plant Biology*, 48, 9, 1047-1053.
- Wijesinghe, W. A. J. P. ve Jeon, Y. J., 2012. Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review, *Fitoterapia*, 83, 1, 6-12.
- Wu, Y., Zeng, X., Ren, T., Vries, E. ve Heide, E., 2017. The emulsifying and tribological properties of modified graphene oxide in oil-in-water emulsion, *Tribology International*, 105, 304-316.
- Wu, Z., Zhu, Y., Huang, W., Zhang, C., Li, T., Zhang, Y. ve Li, A., 2012. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium, *Bioresource Technology*, 110, 496-502.
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C., ve Attia, H., 2011. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia, *Food Chemistry*, 128,4, 895-901.
- Yavuz, M. ve Özçelik, B., 2016. Bitkisel protein izolatlarının fonksiyonel özellikleri, *Akademik Gıda*, 14, 4, 424-430.

- Yıldız, G., Vatan, Ö., Çelikler, S. ve Dere, Ş., 2011. Determination of the phenolic compounds and antioxidative capacity in red algae *Gracilaria bursa-pastoris*, International Journal of Food Properties 14, 3, 496-502.
- Yüce-tepe, A., 2017. *Spirulina platensis* proteins: functional and physicochemical properties, angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity, bioavailability and encapsulation studies, Doktora Tezi, İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Yüce-tepe, A., Saroglu, O., Bildik, F., Ozcelik, B. ve Daskaya-Dikmen, C., 2018. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of protein from *Spirulina platensis* using RSM, Czech Journal of Food Sciences, 36, 1, 98-108.
- Yüce-tepe, A., Saroğlu, Ö. ve Özçelik, B., 2019. Response surface optimization of ultrasound-assisted protein extraction from *Spirulina platensis*: investigation of the effect of extraction conditions on techno-functional properties of protein concentrates, Journal of Food Science and Technology, 56, 7, 3282-3292.
- Yüksel, F., 2013. Gıda teknolojisinde ultrases uygulamaları, Gıda Teknolojileri Dergisi, 8, 2, 29-38.
- Yu, L., Sun, J., Liu, S., Bi, J., Zhang, C. ve Yang, Q., 2012. Ultrasonic-assisted enzymolysis to improve the antioxidant activities of peanut (*Arachin conarachin* L.) antioxidant hydrolysate, International Journal of Molecular Sciences, 13,7, 9051-9068
- Zayas, F.J., 1997. Solubility of Proteins, pp.6-7, in Functionality of Proteins in Food, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ayşegül BOZDEMİR

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Atatürk Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2005-2009

Yüksek Lisans: Aksaray Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Anabilim Dalı,
2020- 2022

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Beypiliç Entegre Tesisleri/Yaz Stajı(2007)
2. Catering Sorumlu Yöneticilik (2009-2011)
3. Ziraat Bankası Bireysel Portföy Yöneticisi (2011-2015)
4. Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu Aksaray İl Koordinatörlüğü
(2015-

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. Sözlü / V. Uluslararası Avrasya Tarım ve Doğa Bilimleri Kongresi, Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction of Proteins from Red Macroalgae *Gracilaria dura*: A Preliminary Study