



T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDSİLİĞİ ANABİLİM DALI

SARGASSUM VULGARE PROTEİN EKSTRAKTLARININ VE
HİDROLİZATLARININ KARAKTERİZASYONU VE *İN VİTRO*
SİNDİRİLEBİLİRLİKLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice DİNÇ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Aysun YÜCETEPE

AKSARAY, 2024

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 212324010 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Hatice DİNÇ tarafından hazırlanan “***SARGASSUM VULGARE*** **PROTEİN EKSTRAKTLARININ VE HİDROLİZATLARININ KARAKTERİZASYONU VE *İN VİTRO* SİNDİRİLEBİLİRLİKLERİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Aysun YÜCETEPE

Aksaray Üniversitesi

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

Üye: Doç. Dr. Ayhan DURAN

Aksaray Üniversitesi

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

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Kadriye Nur KASAPOĞLU

İstanbul Teknik Üniversitesi

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

Tez Savunma Tarihi: 18/01/2024

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

Prof. Dr. Mehmet Ali HINIS

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 orijinalliğini 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.

Hatice DİNÇ



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında kıymetli bilgi ve birikimleri ile bana yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Aysun YÜCETEPE'ye göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her konuda destek olduğu gibi tez çalışmam sırasında da gösterdikleri sonsuz sevgi ve fedakârlıklarıyla bana güç veren sevgili ailem iyi ki varsınız. Her zaman yanımda olduğunu hissettiren canım annem, babam ve sevgili kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca beni destekleyen bana anlayış gösterip, manevi desteğini hiç esirgemeyen değerli şirket işleticim Mustafa MENEKŞE'ye teşekkür ederim.

Kromatografik analizlerim esnasında bilgilerini benimle paylaşan ve destek olan Öğr. Gör. Eda ŞENSU DEMİR'e 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.

Hatice DİNÇ
AKSARAY, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Makroalgler	3
2.1.1 Makroalglerin kimyasal kompozisyonu	3
2.1.2 Algal proteinler	4
2.1.3 Algal proteinlerin ekstraksiyonu	5
2.1.4 Algal protein hidrolizatları	6
2.1.5 <i>Sargassum vulgare</i> makroalgi	6
2.2 Oksidatif Stres ve Antioksidan Aktivite	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM	8
3.1 <i>Sargassum vulgare</i> 'nin Analizlere Hazırlanması	8
3.2 Protein Çözünürlüğü ve Zeta (ζ) Potansiyel Ölçümü	9
3.3 Proteinlerin Ultrases Destekli Enzimatik Ekstraksiyonu	9
3.4 Protein Hidrolizatlarının Hazırlanması	10
3.4.1 Tripsin ile enzimatik hidrolizde hidroliz koşullarının optimizasyonu	10
3.4.2 Pepsin ve tripsin enzimleri ile ardışık hidroliz	11
3.4.2.1 Hidrolizatların hidroliz derecesinin belirlenmesi	11
3.5 <i>In vitro</i> Mide-Bağırsak Sindirimi	11
3.5.1 <i>In vitro</i> protein sindirilebilirliği (%)	12
3.5.2 Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi	12
3.5.3 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi	13
3.5.3.1 DPPH metodu	13
3.5.3.2 CUPRAC metodu	13
3.5.3.3 ABTS metodu	13
3.6 Protein Ekstraktlarının Tekno-Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi	13
3.6.1 Su tutma kapasitesi	13
3.6.2 Yağ tutma kapasitesi	14
3.6.3 Emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi	14
3.6.4 Köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi	14
3.7 Protein Ekstraktlarını Karakterizasyonu	15
3.7.1 SDS-PAGE analizi	15
3.7.2 FT-IR analizi	15
3.7.3 DSC analizi	15
3.8 Amino Asit Kompozisyonun Belirlenmesi	16
3.9 Deney Tasarımı ve İstatistiksel Analiz	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	18
4.1 Protein Çözünürlüğü ve Zeta (ζ) Potansiyeli	18
4.2 <i>Sargassum vulgare</i> Proteinlerinin Ekstraksiyonu	19
4.2.1 Modelin uyumu	19
4.2.2 Protein miktarı	20
4.2.3 Toplam fenolik madde miktarı	22

4.2.4 Antioksidan aktivite.....	24
4.2.5 Optimizasyon ve doğrulama	26
4.2.6 Tekno-fonksiyonel özellikler.....	26
4.2.6.1 Su ve yağ tutma kapasitesi	26
4.2.6.2 Köpürme ve emülsifikasyon özellikleri	27
4.2.7 Protein ekstraktlarının karakterizasyonu	28
4.2.7.1 FT-IR analizi.....	28
4.2.7.2 SDS-PAGE analizi.....	29
4.2.7.3 DSC analizi	29
4.3 <i>Sargassum vulgare</i> Proteinlerinin Hidrolizi.....	30
4.3.1 Tripsin ile enzimatik hidroliz koşullarının optimizasyonu.....	30
4.3.1.1 Modelin uyumu	30
4.3.1.2 Hidroliz derecesi	31
4.3.1.3 Toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite.....	32
4.3.1.4 Optimizasyon ve doğrulama	35
4.3.2 Pepsin ve tripsin ile enzimatik hidroliz	35
4.3.3 Hidrolizatların amino asit kompozisyonu.....	36
4.4 <i>In vitro</i> Sindirim	37
4.4.1 Protein miktarı ve <i>in vitro</i> protein sindirilebilirliğindeki değişim.....	37
4.4.2 <i>In vitro</i> sindirim sırasında toplam fenolik madde miktarındaki değişim. 38	
4.4.3 <i>In vitro</i> sindirim sırasında antioksidan aktivitedeki değişim.....	39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ.....	53

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***SARGASSUM VULGARE* PROTEİN EKSTRAKTLARININ VE HİDROLİZATLARININ KARAKTERİZASYONU VE *İN VİTRO* SİNDİRİLEBİLİRLİKLERİ**

Hatice DİNÇ

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aysun YÜCETEPE

ÖZET

Sunulan çalışmada, öncelikle *Sargassum vulgare* makroalginden proteinlerin ultrases destekli enzimatik ekstraksiyonunda merkezi kompozit tasarım temelli yanıt yüzey metodolojisi (YYM) kullanılarak koşulların optimizasyonu amaçlanmıştır. Bağımsız değişkenlerin (ultrases uygulama süresi ve enzim/substrat (E/S) oranı), protein miktarı (PM), toplam fenolik madde miktarı (TFMM) ve antioksidan aktivite (AOA)’ye etkisi araştırılmıştır. Optimum koşullarda hazırlanan protein ekstraktlarının su tutma kapasitesi (STK), yağ tutma kapasitesi (YTK), emülsiyon stabilitesi (ES), emülsiyon aktivitesi (EA), köpürme kapasitesi (KK) ve köpürme stabilitesi (KS) gibi teknofonksiyonel özellikleri araştırılmış ve SDS-PAGE, FT-IR ve DSC analizleri ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, protein ekstraktlarının enzimatik hidrolizi gerçekleştirilerek E/S ve hidroliz süresinin etkisi YYM kullanılarak optimize edilmiştir ve hidrolizatların hidroliz derecesi (HD), TFMM ve AOA’si araştırılmıştır. Hem protein ekstraktlarının hem de protein hidrolizatlarının *in vitro* sindirim sırasında protein sindirilebilirliği (PS), TFMM ve AOA’si araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, optimum ekstraksiyon koşullarında (ultrases uygulama süresi: 2,50 dk ve E/S: 0,90), *S. vulgare* protein ekstraktları (SV-PE)’nin PM, TFMM, AOA_{CUPRAC} ve AOA_{ABTS} değerleri kuru ağırlıkta sırasıyla 247,29 mg/g, 39,41 mg GAE/g, 54,55 mg TE/g ve 18,82 mg TE/g olarak bulunmuştur. SV-PE’nin kuru ağırlıkta STK %89,0±0,63, YTK %317,0±30,0, KK %12,50±0,01, EA ve ES değerleri ise sırasıyla %53,36±0,84 ve %3,35±0,66 olarak belirlenmiştir. Optimum hidroliz koşullarında (hidroliz süresi: 300 dk ve E/S: 0,03), *S. vulgare* protein hidrolizatlarının (SV-PH); HD, TFMM ve AOA_{CUPRAC} değerleri sırasıyla %30,08, 10,98 mg GAE/g ve 2,72 mg TE/g’dir. SV-PH’nin kromatografik analizinde baskın amino asitler glutamik asit, glisin, trozin, lösin ve lizin olarak tespit edilmiştir. *In vitro* mide ve bağırsak sindirimde SV-PE’nin PS değeri %90,94±0,51 ve %88,36±0,95, protein hidrolizatlarının ise sırasıyla %96,46±1,36 ve %100±0,00 olarak tespit edilmiştir. *In vitro* mide-bağırsak sindiriminde SV-PE’nin TFMM ve AOA’si azalırken SV-PH’nin artmıştır (p<0,05).

Anahtar kelimeler: *Sargassum vulgare*, Makroalg, Protein, Hidrolizat, Amino Asit, Antioksidan Aktivite, *In vitro* Sindirim.

Aralık, 2023; 53 sayfa

M.Sc. THESIS

CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* DIGESTIBILITY FROM *SARGASSUM VULGARE* PROTEIN EXTRACTS AND HYDROLYSATES

Hatice DİNÇ

Aksaray University
Faculty of Engineering
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Aysun YÜCETEPE

ABSTRACT

In the present study, firstly, in ultrasound-assisted enzymatic extraction of proteins from *Sargassum vulgare* macroalgae, optimization of the extraction conditions was aimed by using response surface methodology (RSM) based on central composite design. The effects of ultrasound application time and enzyme/substrate (E/S) ratio on the protein content (PC), total phenolic content (TPC) and antioxidant activity (AOA) of were investigated. Techno-functional properties such as water absorption capacity (WAC), oil absorption capacity (OAC), emulsion stability (ES), emulsion activities (EA), foaming capacity (FC) and foaming stability (FS) of the extracts prepared under optimum conditions were determined and characterization studies were performed by SDS-PAGE, FT-IR and DSC analyses. Then, E/S and hydrolysis time were optimized during enzymatic hydrolysis of the extracts using RSM, and degree of hydrolysis (HD), TPC and AOA of hydrolysates were investigated. Protein digestibility (PD), TPC and AOA of both protein extracts and protein hydrolysates were investigated during *in vitro* digestion. According to the results of the study, under optimum extraction conditions (ultrasound application time: 2.50 min and E/S: 0.90), PM, TPC, AOACUPRAC and AOAAABTS of *S. vulgare* protein extracts (SV-PE) were 247.29 mg/g, 39.41 mg GAE/g, 54.55 mg TE/g and 18.82 mg TE/g in dry weight, respectively. The WAC, OAC, FC, EA and ES of SV-PE were 89.0±0.63%, 317.0±30.0%, 12.50±0.01%, 53.36±0.84% and 3.35±0.66%, respectively. At optimum hydrolysis conditions (hydrolysis time: 300 min and E/S: 0.03), HD, TPC and AOACUPRAC values of *S. vulgare* protein hydrolysates (SV-PH) were 30.08%, 10.98 mg GAE/g and 2.72 mg TE/g, respectively. In chromatographic analysis of SV-PH, dominant amino acids were glutamic acid, glycine, tyrosine, leucine and lysine. *In vitro* gastric and intestinal digestions, PD values of SV-PE were 90.94±0.51% and 88.36±0.95%, while those of protein hydrolysates were 96.46±1.36% and 100±0.00%, respectively. *In vitro* gastro-intestinal digestion, TPC and AOA of SV-PE decreased, while those of SV-PH increased (p<0.05).

Key words: *Sargassum vulgare*, Macroalgae, Protein, Hydrolysate, Amino Acid, Antioxidant Activity, *In vitro* Digestion.

December, 2023; 53 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Makroalg toplama çalışmalarından görüntüler.	8
Şekil 3.2. Partikül çapı <500 µm toz <i>Sargassum vulgare</i>	8
Şekil 4.1. Ekstraktların protein miktarı üzerine E/S ve ultrases uygulama süresinin etkisi.	22
Şekil 4.2. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı üzerine E/S ve ultrases uygulama süresinin etkisi.	23
Şekil 4.3. Ekstraktların antioksidan aktivitesi üzerine E/S ve ultrases uygulama süresinin etkisi.	25
Şekil 4.4. Ekstraktların antioksidan aktivitesi üzerine E/S ve ultrases uygulama süresinin etkisi.	26
Şekil 4.5. <i>Sargassum vulgare</i> protein ekstraktlarının FT-IR spektrumu.	28
Şekil 4.6. <i>Sargassum vulgare</i> protein ekstraktları (SV-PE)'nin SDS-PAGE görüntüsü.	29
Şekil 4.7. <i>Sargassum vulgare</i> protein ekstraktının DSC termogramı.	30
Şekil 4.8. <i>Sargassum vulgare</i> proteinlerinin enzimatik hidrolizinde hidroliz derecesi üzerine enzim/substrat oranı ve hidroliz süresinin etkisi.	32
Şekil 4.9. <i>Sargassum vulgare</i> protein hidrolizatlarının toplam fenolik madde miktarı üzerine enzim/substrat oranı ve hidroliz süresinin etkisi.	33
Şekil 4.10. <i>Sargassum vulgare</i> protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesi üzerine enzim/substrat oranı ve hidroliz süresinin etkisi.	34
Şekil 4.11. <i>Sargassum vulgare</i> 'den protein hidrolizatlarının HPLC'de belirlenen amino asit kompozisyonu.	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Protein ekstraksiyonunda ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için merkezi kompozit tasarım temelli deney tasarımında bağımsız değişkenlerin gerçek ve kodlanmış seviyeleri.	10
Çizelge 3.2. Protein hidrolizinde hidroliz koşullarının optimizasyonu için merkezi kompozit tasarım temelli deney tasarımında bağımsız değişkenlerin gerçek ve kodlanmış seviyeleri.	10
Çizelge 4.1. <i>Sargassum vulgare</i> 'nin farklı pH değerlerinde protein çözünürlüğü (%) ve ζ -potansiyel değeri (mV).....	19
Çizelge 4.2. Doğal ve kodlanmış ekstraksiyon şartlarıyla merkezi kompozit deney tasarımı ve deneysel olarak elde edilen yanıtların değerleri.	20
Çizelge 4.3. İkinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).	21
Çizelge 4.4. İkinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).	23
Çizelge 4.5. İkinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).	24
Çizelge 4.6. İkinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).	25
Çizelge 4.7. <i>Sargassum vulgare</i> protein ekstraktlarının hidrolizinde doğal ve kodlanmış ekstraksiyon koşulları ve yanıtların deneysel olarak elde edilen değerleri ile merkezi kompozit tasarım.	31
Çizelge 4.8. <i>Sargassum vulgare</i> protein ekstraktlarının hidrolizinde ikinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).	32
Çizelge 4.9. <i>Sargassum vulgare</i> protein ekstraktlarının hidrolizinde ikinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).	34
Çizelge 4.10. <i>Sargassum vulgare</i> protein ekstraktlarının hidrolizinde ikinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).	35
Çizelge 4.11. <i>Sargassum vulgare</i> protein hidrolizatlarının amino asit kompozisyonu.	36
Çizelge 4.12. Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının <i>in vitro</i> mide-bağırsak sindirimi sırasında protein miktarındaki değişimi ve <i>in vitro</i> %protein sindirilebilirliği.	38
Çizelge 4.13. Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının <i>in vitro</i> mide-bağırsak sindirimi sırasında toplam fenolik madde miktarındaki değişim.	39
Çizelge 4.14. Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının <i>in vitro</i> mide-bağırsak sindirimi sırasında antioksidan aktivitedeki değişim.	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS	2,2-Azinobis (3- etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit)
ANOVA	Varyans Analizi
AOA	Antioksidan Aktive
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
CCD	Merkezi Kompozit Dizayn
CO	Karbonmonoksit
CV	Varyans Katsayısı
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSC	Dinamik Stabilite Kontrolü
EA	Emülsiyon Aktivitesi
ES	Emülsiyon Stabilitesi
FT-IR	Kızılötesi Spektroskopisi
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
HD	Hidroliz derecesi
KK	Köpürme Kapasitesi
KS	Köpürme Stabilitesi
N-H	Nihonyum
O-H	Hidroksil Molekülü
PG	Propil Gallat
PM	Protein Miktarı
PS	Protein Sindirilebilirliği
SDS-PAGE	Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektforez
SV-PE	<i>S.vulgare</i> Protein Ekstraktları
SV-PH	<i>S.vulgare</i> Protein Hidrolizatları
TBHQ	Tertiaribütil Hidrokuinon
TE	Trolox Eşdeğeri
TFMM	Toplam Fenolik Madde Miktarı
UHSK	Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
UV-VIS	Ultraviyole ve Görünür Işık
YTK	Yağ Tutma Kapasitesi
YYM	Yanıt Yüzey Metodolojisi
ζ	Zeta Potansiyeli

1. GİRİŞ

Deniz yosunları ya da “deniz sebzeleri” olarak da adlandırılan makroalgler, suda yaşayan besin zincirindeki diğer canlılar için besin kaynağı olan, fotosentez yapan ve okyanuslardaki devasa ormanları oluşturan “thallus” adı verilen yapıları geliştiren ototrofik organizmalardır (Figueroa vd., 2021). Makroalglerin bilinen yaklaşık 10.500 türü bulunmaktadır ve bu türler arasında yaklaşık 500 tür yüzlerce yıldır insanlar tarafından ya bir gıda olarak doğrudan ya da agar ve karragenan gibi bazı bileşenlerin ekstrakte edilmesi yolu ile dolaylı olarak tüketilmektedir (Chopin ve Tacon 2021). Rhodophyta (kırmızı), Phaeophyta (kahverengi) ve Chlorophyta (yeşil) makroalgler olarak üç grup altında toplanan deniz yosunlarından 220’den fazla tür kültüre edilmekle birlikte, bunlardan sadece 20 tür Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO, 2016) FISHSTAT veri tabanında listelenmiştir. 2018 yılı verilerine göre 8 tür tüm kültüre edilmiş deniz yosunu üretiminin %96,8’ini oluşturmaktadır. Bu türler; *Saccharina japonica* (%35,3), *Eucheuma* spp. (%29), *Gracilaria* spp. (%10,7), *Porphyra* spp., *Pyropia* spp. (%8,9), *Undaria pinnatifida* (%7,2), *Kappaphycus* spp. (%4,9) ve *Sargassum* spp. (%0,8)’dir (FAO, 2020).

Yüksek besinsel içerikleri ve düşük kalori değerlerinden dolayı birçok makroalg türü Çin, Japonya ve Kore gibi pek çok Asya ülkesinde antik zamanlardan beri gıda olarak tüketilmektedir. Ayrıca önemli sağlık faydalarından dolayı Doğu tıbbında kullanım alanı bulunmaktadır. Batı ülkelerinde ise gıda endüstrisi için temel olarak karragenan, aljinat, fikokolloit agar gibi teknofonksiyonel polisakkaritlerin kaynağı olarak ve hayvan beslenmesi için gübre ve yem bileşeni olarak kullanılmaktadırlar. Makroalgler, insan sağlığını olumlu yönde etkileyen yüksek kalitede protein, diyet lif, polisakkaritler, çoklu doymamış yağ asitleri, mineraller, vitaminler, pigmentler (karotenoidler, klorofiller ve fikobiliproteinler) ve polifenoller gibi değerli bileşenleri içermektedir (Figueroa vd., 2021; Konda vd., 2015).

Makroalglerin protein oranının (bazı alg örnekleri için kuru ağırlıkta >%50), geleneksel protein kaynakları olan et, süt, yumurta ve soyadaki protein oranlarına yakın hatta bunlardan daha yüksek olabildiği ifade edilmektedir (Barka ve Blecker, 2016). Bu nedenle, önemli bir protein kaynağı olarak değerlendirilen alglerin, artan dünya nüfusuna paralel olarak artan protein ihtiyacının karşılanması konusunda geleneksel gıda kaynaklarının yerini alması beklenmektedir (Garcia-Vaquero ve

Hayes, 2016). Alglerin birim alan başına protein verimi geleneksel bitkisel gıdalar ile kıyaslandığında daha yüksektir. Diğer taraftan, algler taze suya ve ekilebilir ihtiyaç duymazlar (Bleakley ve Hayes, 2017). Tüm bu nedenler, gıda ürünlerinde algal proteinlerin kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla alglerden proteinlerin ekstraksiyonu, antioksidan aktivitesi ve bazı tekno-fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi alanındaki çalışmaları teşvik etmektedir.

Bu kapsamda sunulan tez çalışmasının amaçları;

- *Sargassum vulgare* kahverengi makroalginden proteinlerin ultrases destekli enzimatik ekstraksiyonunda ekstraksiyon koşullarının yanıt yüzey metodolojisi (YYM) ile optimizasyonu,
- Ekstraktların protein miktarı, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesinin araştırılması,
- Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen protein ekstraktlarının tekno-fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra DSC analizi ile ısıl stabilite, FT-IR analizi ile organik grupların tanımlanması ve SDS-PAGE analizi ile proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi,
- *Sargassum vulgare* makroalginden proteinlerin tripsin enzimi ile hidrolizinde hidroliz koşullarının YYM kullanılarak optimize edilmesi,
- Protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesinin araştırılması,
- Triptik protein hidrolizatlarının kromatografik olarak amino asit kompozisyonunun belirlenmesi ve
- Protein ekstraktlarının ve hidrolizatlarının *in vitro* sindirim sırasında *in vitro* protein sindirilebilirliği, toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Makroalgler

Rhodophyta (kırmızı), Ochrophyta (kahverengi) ve Chlorophyta (yeşil) makroalgler olarak üç grup altında toplanan deniz yosunları, insan sağlığını olumlu yönde etkileyen yüksek kalitede protein, diyet lif, polisakkaritler, çoklu doymamış yağ asitleri, mineraller, vitaminler, pigmentler ve polifenoller gibi değerli bileşenleri içermektedir ve kanser, hipertansiyon, allerji, dejeneratif hastalıklar, diyabet, sindirim sistemi rahatsızlıkları, kalp hastalıkları, obezite gibi sağlık problemlerine karşı etkili olan biyoaktif protein hidrolizatları ve peptitlerin önemli bir kaynağıdır. Çin, Japonya ve Kore gibi pek çok Asya ülkesinde antik zamanlardan beri yüksek besinsel içerikleri ve düşük kalori değerlerinden dolayı gıda olarak tüketilmektedir. Ayrıca, önemli sağlık faydalarından dolayı Doğu tıbbında kullanım alanı bulunmaktadır. Batı ülkelerinde ise gıda endüstrisi için temel olarak karregenana, aljinat, fikokolloit agar gibi teknofonksiyonel polisakkaritlerin kaynağı olarak ve hayvan beslenmesi için gübre ve yem bileşeni olarak kullanılırlar. Fakat son günlerde yenilebilir makroalglerin Avrupa ve Amerika'da yeni fonksiyonel gıda bileşeni olarak popülerliğinin gün geçtikçe arttığı bilinmektedir. Hatta, önemli besinsel özelliklere sahip algal peptitlerin, fonksiyonel gıda ürünlerinin geliştirilmesi konusunda kullanım potansiyellerinin bulunduğu bilinmektedir (Mohamed vd., 2012; Paiva vd., 2017; Tibbetts vd., 2016).

2.1.1 Makroalglerin kimyasal kompozisyonu

Makroalglerin biyokimyasal kompozisyonu, ışık yoğunluğu, pH, sıcaklık, deniz suyu tuzluluğu gibi çevresel faktörlere ve türler arasındaki genetik farklılıklara bağlı olarak değişmektedir (Mæhre vd., 2014, Øverland vd., 2019). Makroalgler kuru ağırlıkta %7-31 protein, %32-60 karbonhidrat ve %2-13 lipit içeriğine sahiptir (Kazir vd., 2019). Makroalgler A, C, E ve B vitaminlerini ve sodyum, magnezyum, fosfor, potasyum, iyot, demir ve çinko gibi mineral maddeleri içerirler (Circuncisão vd., 2018).

Makroalgler demir minerali açısından önemli bir kaynaktır. Alglerin demir içeriği, kıyı sularının metal içeriğine bağlı olarak mevsimsel ve lokasyona olarak değişmektedir (Cabrita vd., 2016). Diğer taraftan, makroalgler sodyum ve potasyum minerallerini yüksek oranda içermekle birlikte sodyum/potasyum oranının düşük olması kalp sağlığının korunması bakımından önemlidir. Makroalgler, sağlık açısından önemli bir

diğer mineral olan iyot elementini de bol miktarda içermektedir (Circuncis o vd., 2018).

Yetiştikleri zorlu çevresel koşullar nedeniyle karasal bitkilere kıyasla daha fazla oksidatif stres ve serbest radikale maruz kalmaları, alglerin pigment ve polifenol gibi bileşenleri daha yüksek oranda sentezleyerek hayatta kalabilmek için doğal koruma sistemleri geliştirmesine vesile olmuştur. Alglerin doğal koruma mekanizmaları sonucu ürettiği bu bileşenler önemli biyoaktif özelliklere sahiptir. Makroalgler içerdikleri bu biyoaktif bileşenler nedeniyle antioksidan, antikanser, antimikrobiyal aktivite gibi önemli biyoaktif özellikler sergilemektedirler (Bleakley ve Hayes, 2017; Fitzgerald vd., 2011).

2.1.2 Algal proteinler

Dünya nüfusunun 2050 yılında yaklaşık 8,3 milyar insan olacağı öngörülmektedir ve insan sayısındaki bu artış, gıda üretiminde %70'lik bir artışa karşılık gelmektedir (Boland vd., 2013; Caparros Megido vd., 2014). Ayrıca, özellikle gelişmekte olan ülkelerde ciddi sağlık problemlerine yol açan yetersiz beslenme olgusu, yetersiz protein ve mikro besin öğeleri alımı ile birlikte değerlendirilmektedir. Benzer şekilde, gelişmiş ülkelerde de modern beslenme alışkanlıklarından dolayı diyetteki düşük protein miktarı, yetersiz beslenme problemine neden olmaktadır (Grover ve Ee, 2009). Özellikle Batılı ülkelerde vejeteryan beslenmeden dolayı diyetle hayvansal olmayan protein tüketime yönelik artan bir eğilim söz konusudur. Tüm bu nedenlerle böcek, mantar, alg gibi yeni kaynaklardan proteinlerin elde edilmesi ile artan protein ihtiya ını karşılamının mümkün olabileceği bildirilmiştir (Belluco vd., 2017; Caparros Megido vd., 2014; Verbeke vd., 2015). Bu kaynakların arasında gösterilen makroalgler önemli protein kaynağı su ürünü canlıları olarak bilinirler. Bazı makroalg türleri et, yumurta, soya, süt gibi geleneksel protein kaynaklarına yakın protein içeriğine sahiptir. Dahası, bazı alglerin kuru ağırlıkta protein miktarlarının bazı bitkisel ve hayvansal protein kaynaklarından daha yüksek olduğu bilinmektedir. Örneğin, *Arthrospira maxima* mikroalginin yaklaşık %70 dolaylarında protein içerdiği bilinmektedir. Algler, yüksek protein içeriklerinin yanısıra esansiyel amino asitler açısından da zengindir. Bu nedenler, algleri doğal proteinlerin önemli bir kaynağı haline getirmektedir (Muslu ve Gökçay, 2020).

2.1.3 Algal proteinlerin ekstraksiyonu

Makroalg proteinlerinin ekstraksiyonu ve kullanımı açıkça hücre duvarının yıkımlanmasına bağlıdır (Aras, 2020). Makroalgal proteinlerin ekstraksiyonu, algal proteinlerin çoğunlukla hücre içinde lokalize olmaları nedeni ile büyük ölçüde bunların erişilebilirliğine bağlıdır. Bu nedenle alg hücre duvarlarının karmaşık doğası, deniz yosununun protein kaynağı olarak değerlendirilmesinde temel zorluktur (Maehre, 2015).

Ekstraksiyon işleminde, hücre içi bileşenlerinin yüksek ekstraksiyon verimi ile hücre dışına çıkarılarak elde edilmesi amaçlanmaktadır (Truong vd., 2019). Bu noktada, sert hücre duvarı yapısı nedeniyle makroalglerden proteinlerin yüksek ekstraksiyon verimi ile ekstrakte edilebilmesi önemlidir. Protein ekstraksiyonu için kullanılan geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ile yüksek ekstraksiyon verimi elde edilememektedir. Son yıllarda, ultrases, süperkritik akışkan, mikrodalga ve yüksek hidrostatik basınç gibi çevre dostu yeni teknikler ile ekstraksiyon verimi artırılabilir. Ayrıca, ısıl olmayan bu teknikler, hem ısının neden olduğu ısıl hassas bileşiklerin zarar görmesinin engellenmesi hem de daha az kimyasal çözücü kullanımı içermesi gibi önemli avantajlara sahiptir (Şengül ve Topdaş, 2019).

Isıl olmayan ekstraksiyon yöntemlerinden olan ultrases destekli ekstraksiyonda, 20 kHz ve 1 GHz aralığındaki ses dalgaları kullanılarak, iç basıncın artırılması ve oluşan kabarcıkların patlamasıyla ekstrakte edilmek istenen bileşiğin hücre içinden hücre dışına salınması sağlanmaktadır (Jambrak vd., 2009). Enzimatik ekstraksiyon yönteminde ise kullanılan karbohidraz enzimler (selülaz, pektinaz vb.) ile polisakkaritlere bağlı olarak bulunan proteinler, serbest duruma getirilerek ekstraksiyon verimi artırılmaktadır (Şengül ve Topdaş, 2019). Örneğin Harnedy ve Fitzgerald (2013), %6,24 protein içeren *Palmaria palmata*'dan protein ekstraksiyonunda ekstraksiyon verimini %6,18 olarak gerçekleştirmişlerdir. Ekstraksiyon sırasında polisakkaridaz enzimleri kullandıklarında ise verim, %11,57'e yükselmiştir (Harnedy ve Fitzgerald, 2013).

2.1.4 Algal protein hidrolizatları

Protein hidrolizatları, peptit bağları ile birbirine bağlanan 2-20 amino asidi ihtiva etmektedir ve proteinlerin proteaz enzimleri ile hidrolizi sonucu elde edilirler (Akıncı, 2022). Protein hidrolizatlarının içerdiği biyoaktif peptitler, enzimatik hidrolize ilave olarak, fermentasyon ya da mide-bağırsak sindirimi sırasında da üretilebilirler. Son yıllarda yapılmış pek çok çalışmada, peptitlerin *in vitro* ve *in vivo* antimikrobiyal, antihipertansif, anti-kanser ve antioksidan aktivite gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip olduğu ve insan sağlığını olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir (Yalçın ve Rakıcıoğlu, 2020; Kadam vd., 2015).

Gıda proteinlerinin enzimatik hidrolizi ile biyoaktif peptitlerin açığa çıkmasını ve hidroliz derecesini etkileyen faktörler; kullanılan proteaz tipi ve konsantrasyonu, substrat olan proteinin tipi ve miktarı, sıcaklık, pH, kullanılan çözücü, basınç, iyonik kuvvet vb. olarak sayılabilir. Bu nedenle, en yüksek hidroliz derecesi ile protein hidrolizatlarının elde edilebilmesi için yanıt yüzey metodolojisi ile hidroliz koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir (Kartal vd., 2023).

2.1.5 *Sargassum vulgare* makroalgi

Sargassum vulgare; protein, karbonhidrat, vitamin ve mineral değerlerinden dolayı Doğu ülkelerinde bir gıda kaynağı olarak tüketilmektedir. *Sargassum vulgare* polifenoller, polisakkaritler, fitohormonlar, karotenoidler, vitaminler, doymamış yağ asitleri ve serbest amino asitler gibi temel metabolitleri içermektedir ve yetiştiği çevre koşullarına bağlı olarak kuru ağırlıkta %10-15 arasında protein ihtiva etmektedir (Karkhane vd., 2020; Field vd., 2017).

2.2 Oksidatif Stres ve Antioksidan Aktivite

Oksidasyon sırasında oluşan hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri, oksijen metabolizmasının bir sonucu olarak üretilmektedirler. Reaktif nitrojen türleri ise yüksek oksidatif etkiye sahip nitrik oksit ve peroksinitritten meydana gelmektedirler (Tierney vd., 2010). Sağlıklı bireylerde, oksijen radikalleri ve antioksidan savunma mekanizması arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin bozulması sonucu vücutta oksijen radikallerinin birikmesi durumuna “oksidatif stres” denir (Kurt, 2008). Hücrel bileşiklerin oksidatif/nitrozatif zararlanması; kanser,

diyabet, Parkinson, osteoporoz ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok kronik hastalığa neden olabilmektedir (Tierney vd., 2010).

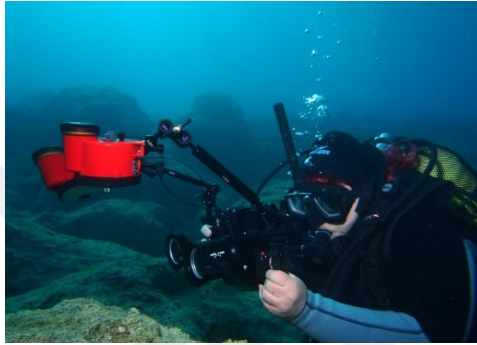
Antioksidan maddeler, oksidasyon reaksiyonlarının başlamasını ya da başlamış reaksiyonların ilerlemesini engelleyen ve böylece oksidasyonu geciktiren bileşiklerdir. Antioksidanlar, oksidatif strese karşı organizmayı korurlar. Gıda ürünlerinde antioksidan maddelerin kullanılması ile gıdalarda oksidasyon reaksiyonlarının engellenmesi/geciktirilmesi ile raf ömrü arttırılabilmektedir (Schwarz vd., 2001).

Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) gibi sentetik antioksidanlar, gıdalarda oksidasyonu geciktirerek raf ömrünü arttırmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Diğer taraftan, sentetik olan bu antioksidanların toksik ve kanserojen etkiye sahip olabileceklerinden şüphelenilmektedir. Bu nedenle, doğal kaynaklardan antioksidanların gıdalarda antioksidan madde olarak kullanım olanakları mevcuttur (Sevgili, 2019). Makroalgler protein, polifenolik bileşikler, doymamış yağ asitleri gibi biyoaktif bileşenleri içermeleri nedeniyle doğal antioksidan kaynağı olarak değerlendirilirler (Yucetepe vd., 2022).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 *Sargassum vulgare*'nin Analizlere Hazırlanması

Kahverengi makroalg *Sargassum vulgare*, 119O149 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında, Türkiye'nin Ege Denizi kıyılarından, 40°1'35.90 "K and 26°19'49.49 "D koordinatlarında, bu projede araştırmacı olarak görev yapan Dr. Emine Şükran Okudan tarafından toplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Makroalg toplama çalışmalarından görüntüler.

Makroalgin tanımlanması, Olympus SZ×16 marka stereo zoom ve B×51 model binoküler ışık mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tanımlama çalışmasından sonra toplanan makroalgler, epifitler, kum, çamur ve kaya gibi maddelerin uzaklaştırılması amacıyla tatlı su ile yıkanmıştır. Daha sonra, bir gölge ortamda doğrudan güneş ışınlarına maruz kalmadan, yaklaşık 30 °C sıcaklıkta kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Kurutulmuş örnekler bir laboratuvar tipi öğütücü (Waring 8011 Eb Blender, Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, ABD) kullanılarak öğütülüp, 500 µm mesh elek ile elenerek, <500 µm toz formda *Sargassum vulgare* (T-SV) güneş veya oksijen maruziyetini engelleyecek şekilde ambalajlanıp -20 °C'de analizlere kadar muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2) (Rouxel vd., 2001).



Şekil 3.2. Partikül çapı <500 µm toz *Sargassum vulgare*.

3.2 Protein Çözünürlüğü ve Zeta (ζ) Potansiyel Ölçümü

Morr vd., (1985)'nin metodu kullanılarak, *S. vulgare*'nin 2-13 arasında değişen (1,0 aralıklarla artan) pH değerlerinde protein çözünürlüğündeki değişim belirlenmiştir. Farklı pH'larda hazırlanan çözeltiler 4100 rpm'de 15 °C'de 10 dk süre boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonra, üst fazın protein miktarı Lowry metodu (Lowry vd., 1951) ile belirlenmiştir. Örneklerin % protein miktarını hesaplamak için Denklem 3.1 kullanılmıştır:

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

S. vulgare makroalginin pH'ya bağlı olarak araştırılan protein çözünürlüğünün yanı sıra zeta potansiyelindeki değişim de bir zeta potansiyel ölçer cihaz (Zetasizer NanoZS90, Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir.

3.3 Proteinlerin Ultrases Destekli Enzimatik Ekstraksiyonu

Sargassum vulgare'den proteinlerin ekstraksiyonunda, Bozdemir vd. (2022)'in metodunda bazı modifikasyonlarla ultrases destekli enzimatik ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır ve koşullar yanıt yüzey metodolojisi ile optimize edilmiştir. Öncelikle belirli miktardaki T-SV ile sitrat tampon çözeltisi (0,1 M, pH 4,5) karıştırılmış ve elde edilen karışım bir gece boyunca buzdolabında osmotik şok için beklemeye bırakılmıştır. Süre sonunda T-SV içeren solüsyon, bir ultrases cihazı (Sonopuls HD 2200 ultrasonic homogeniser, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Almanya) kullanılarak deney tasarımıdaki ultrases uygulama süreleri boyunca ultrasonikasyona maruz bırakılmıştır (Çizelge 3.1). Ultrasonikasyon işlemi sonunda, solüsyonlara deney tasarımıda belirtilen enzim/substrat oranlarında hemiselülaz enzim ilavesi yapılmıştır. Daha sonra bu solüsyonlar, bir çalkalamalı su banyosu içinde (N-Biotek-303, Biotek Co., Ltd. Korea) 35 °C'de 75 rpm çalkalama hızında ekstraksiyon işlemine maruz bırakılmıştır. Ekstraksiyon sonunda örnekler, enzim inaktivasyonu için 85 °C'de su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. Enzim inaktivasyonundan sonra, ekstraktlardaki protein miktarını arttırmak amacıyla, karışımın pH değeri, protein çözünürlüğü deneyi ile belirlenen, *Sargassum vulgare*'nin en iyi çözüldüğü pH değerine ayarlanmıştır. Son olarak örnekler, 35 °C'de çalkalamalı

su banyosunda belirli bir süre bekletilerek, ikinci ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Daha sonra, 4100 rpm’de 4 °C’de 15 dk boyunca santrifüj edildikten sonra üst fazın protein içeriğinin belirlenmesi amacıyla modifiye Lowry metodu (Barbarino ve Lourenço, 2005; Lowry, 1951) kullanılmıştır. Protein içeriği kuru ağırlıkta mg protein/g örnek olarak verilmiştir. Ekstraktlar karanlık bir ortamda -20 °C’de analizlere kadar muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. Protein ekstraksiyonunda ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için merkezi kompozit tasarım temelli deney tasarımında bağımsız değişkenlerin gerçek ve kodlanmış seviyeleri.

Bağımsız değişkenler	Kodlanmış seviyeler				
	-α	-1	0	1	+α
X ₁ ; Ultrases uygulama süresi (dk)	0,09	0,50	1,50	2,50	2,91
X ₂ ; Enzim/substrat oranı	0,18	0,30	0,60	0,90	1,02

3.4 Protein Hidrolizatlarının Hazırlanması

3.4.1 Tripsin ile enzimatik hidrolizde hidroliz koşullarının optimizasyonu

Optimum noktada üretilen *Sargassum vulgare* protein ekstraktı (SV-PE)’nin hidrolizi tripsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve hidroliz koşullarının optimizasyonu için Çizelge 3.2’de verilen bir merkezi kompozit tasarımı temelli YYM deney tasarımı kullanılmıştır. Özetle, 1 g SV-PE ile 20 mL saf su karıştırılarak, karışımın pH değeri 8,0’e ayarlanmıştır ve YYM ile hazırlanan deney tasarımına göre belirlenen miktarda tripsin enzimi ilave edilmiştir ve belirlenen hidroliz süreleri boyunca 37 °C’de çalkalamalı su banyosunda hidroliz gerçekleştirilmiştir. Hidroliz sonrasında, 85 °C’de 5 dk enzim inaktivasyonu ve ardından 4100 rpm, 20 dk ve 4 °C’de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Üst fazın (*Sargassum vulgare* protein hidrolizatlarının) protein miktarı (PM), hidroliz derecesi (HD) TFMM ve AOA’si belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Protein hidrolizinde hidroliz koşullarının optimizasyonu için merkezi kompozit tasarım temelli deney tasarımında bağımsız değişkenlerin gerçek ve kodlanmış seviyeleri.

Bağımsız değişkenler	Kodlanmış seviyeler				
	-α	-1	0	1	+α
X ₁ : Hidroliz süresi (dakika)	10,29	60	180	300	349,71
X ₂ : Enzim/substrat oranı	0,00	0,01	0,03	0,04	0,05

3.4.2 Pepsin ve tripsin enzimleri ile ardışık hidroliz

Tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidroliz çalışmasında hidroliz derecesi düşük kaldığından (yaklaşık %30), pepsin ve tripsin enzimleri ile ardışık hidrolizi içeren ikinci bir hidroliz çalışması gerçekleştirilerek hidroliz derecesinin artırılması hedeflenmiştir. Uygulanan hidroliz koşulları şu şekildedir: Öncelikle, 0,3:1 E/S oranında hazırlanan solüsyonun pH değeri pepsin enziminin çalışabilmesi için 2,0'ye ayarlanmıştır. Hidroliz sıcaklığı 37 °C, hidroliz süresi 2 saattir. Süre sonunda solüsyonun pH değeri, tripsin enziminin çalışabilmesi için 8,0'e ayarlanmıştır ve aynı şekilde 0,3:1 E/S oranında tripsin enzimi eklenerek pepsin enzimi ile gerçekleştirilen hidroliz koşullarındaki aynı süre ve sıcaklıkta tripsin ile hidroliz gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda enzim inaktivasyonu için 85 °C'de 5 dk ısıtma işlemi uygulandıktan sonra, hızlı soğutma uygulanan örnekler, 4100 rpm'de 4 °C'de 20 dk boyunca santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra, süzüntü alınarak Lowry yöntemi ile protein miktarı tespit edilmiş ve %HD hesaplanmıştır. Elde edilen hidrolizatlar uygun şekilde ambalajlanmış ve analizlere kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.2.1 Hidrolizatların hidroliz derecesinin belirlenmesi

Sargassum vulgare protein hidrolizatları (SV-PH)'nın hidroliz derecesi Vaştag vd. (2010)'nın yöntemine göre belirlenmiştir. Buna göre; hidrolizatlar 0,44 M TCA çözeltisi ile 1:1 (v/v) oranında karıştırılmıştır ve karışım 4 °C'de 30 dk tutulmuştur. Daha sonra, 4100 rpm'de 4 °C'de 20 dk santrifüj işlemi uygulanmış ve 0,22 M trikloroasetik asit (TCA)-çözünür protein fraksiyonunun ve TCA'sız hidrolizatların protein miktarı Lowry yöntemi (Lowry vd., 1951) ile belirlenmiştir. Standart protein olarak sığır serum albümin kullanılmıştır. HD (%)'nin hesaplanması için aşağıdaki Denklem 3.2 kullanılmıştır:

$$HD (\%) = \frac{\text{TCA çözünür fraksiyonun protein miktarı}}{\text{Toplam protein miktarı}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.5 *In vitro* Mide-Bağırsak Sindirimi

Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının *in vitro* sindirimi Minekus vd. (2014)'nin *in vitro* mide-bağırsak sindirimi prosedürü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem; ağız fazı, mide fazı ve bağırsak fazı taklit edilerek belirli pH, sıcaklık ve süre koşullarında inkübasyon

sonucu oluşan sindirim ürünlerinin analizlenmesi esasına dayanmaktadır. *In vitro* ağız fazı sindirimi için örnek ile SSF çözeltisi (0,5 mol/L'lik KCl çözeltisinden 15,1 mL, 0,5 mol/L'lik KH₂PO₄ çözeltisinden 3,7 mL, 1 mol/L'lik NaHCO₃ çözeltisinden 6,8 mL, 0,15 mol/L'lik MgCl₂(H₂O)₆ çözeltisinden 0,5 mL ve 0,5 mol/L'lik (NH₄)₂CO₃ çözeltisinden 0,06 mL içeren çözelti) karıştırılmış ve üzerine amilaz enzimi (75 U/mL) ve SSF'nin her mL için 0,5 µL CaCl₂ (588 g/L) eklenerek, pH 7'de 2 dk bekletilmiştir. *In vitro* mide sindirimi için ağız sindirimi sonucu oluşan çözelti:SGF (0,5 mol/L'lik KCl çözeltisinden 6,9 mL, 0,5 mol/L'lik KH₂PO₄ çözeltisinden 0,9 mL, 1 mol/L'lik NaHCO₃ çözeltisinden 12,5 mL, 2 mol/L'lik NaCl çözeltisinden 11,8 mL, 0,15 mol/L'lik MgCl₂(H₂O)₆ çözeltisinden 0,4 mL ve 0,5 mol/L'lik (NH₄)₂CO₃ çözeltisinden 0,5 mL içeren çözelti) karışımı (1:1) oluşturulmuştur. Bu karışıma pepsin enzimi (2000 U/m) ve 0,17 mM fosfolipit eklenmiş ve 37 °C'de pH 2'de 250 rpm'de çalkalamalı su banyosunda 1 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra *in vitro* bağırsak fazı sindirimi deneyine geçilmiş ve *in vitro* mide fazı sindirimi sonucu oluşan mide karışımı ile SIF (0,5 mol/L'lik KCl çözeltisinden 15,1 mL, 6,8 mol/L'lik KH₂PO₄ çözeltisinden 0,8 mL, 1 mol/L'lik NaHCO₃ çözeltisinden 42,5 mL, 2 mol/L'lik NaCl çözeltisinden 9,6 mL ve 0,15 mol/L'lik MgCl₂(H₂O)₆ çözeltisinden 1,1 mL içeren) + enzim ekstraktı (pankreatin (100 U/mL)+safra (safra ekstraktı ya da taze domuz safrası) karışımı (1:1) oluşturulmuştur. Karışım, 37 °C'de pH 7'de 250 rpm'de çalkalamalı su banyosunda 2 sa boyunca inkübe edilmiştir. Sindirim örnekleri toplanmış ve -20 °C'de analizlere kadar muhafaza edilmiştir. Sindirilmiş örneklerin % protein sindirilebilirliği (%PS), toplam fenolik madde miktarı (TFMM) ve antioksidan aktivitesi (AOA) belirlenmiştir.

3.5.1 *In vitro* protein sindirilebilirliği (%)

Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının *in vitro* protein sindirilebilirliği araştırılmıştır. *In vitro* mide ve bağırsak sindirimi sonrasında elde edilen örneklerin protein içeriği Lowry metodu (Lowry vd., 1951) ile belirlenmiştir. Protein standardı olarak sığır serum albümini kullanılmıştır. Örneklerin *in vitro* %PS değerleri aşağıdaki Denklem 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır: (PM: Protein miktarı, mg protein/g.)

$$\% \text{Protein sindirilebilirliği} = 100 - \left(\frac{(\text{In vitro mide-bağırsak sindirimden sonra PM})}{\text{Toplam PM}} \times 100 \right) \quad (3.3)$$

3.5.2 Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının toplam fenolik madde içeriği Toor ve Savage (2006)'un yöntemi ile belirlenmiştir. Absorbans ölçümleri, UV-VIS spektrofotometre (Scilogex Sci-UV1000 Spectrophotometer, Scilogex, ABD) ile

yapılmıştır. Sonuçlar kuru ağırlıkta mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g örnek olarak verilmiştir (Toor ve Savage, 2006).

3.5.3 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

3.5.3.1 DPPH metodu

Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl radikal yakalama) yöntemi uygulanmıştır. Örneklerin absorbansları 517 nm’de UV-VIS spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar mg Trolox eşdeğeri (TE)/g olarak ifade edilmiştir (Kumaran vd., 2006).

3.5.3.2 CUPRAC metodu

Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacı ile CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgenme antioksidan kapasitesi) yöntemi uygulanmıştır. Örneklerin absorbansları 450 nm’de UV-VIS spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar mg TE/g olarak ifade edilmiştir (Apak vd., 2004).

3.5.3.3 ABTS metodu

Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt) yöntemi ile antioksidan aktivitesi Rice-Evans vd. (1997)'a göre belirlenmiştir. Örneklerin absorbansları 734 nm’de UV-VIS spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar mg TE/g olarak ifade edilmiştir.

3.6 Protein Ekstraktlarının Tekno-Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

3.6.1 Su tutma kapasitesi

Optimum koşullarında hazırlanan protein ekstraktlarının su tutma kapasitesi (STK) Kumar vd. (2014)'nın yöntemi ile belirlenmiştir ve aşağıdaki denklem kullanılarak protein ekstraktlarının STK’i hesaplanmıştır (Denklem 3.4).

$$\text{Su Tutma Kapasitesi (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100 \quad (3.4)$$

W_0 : Protein ekstraktının ağırlığı, W_1 : Protein ekstraktı ve tüp ağırlığının toplamı, W_2 : Çökelti ve tüp ağırlığının toplamı.

3.6.2 Yağ tutma kapasitesi

Örneklerin yağ tutma kapasitesi (YTK) Kumar vd. (2014)'ın yöntemi ile belirlenmiştir. Protein ekstraktlarının YTK'i aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Denklem 3.5).

$$\text{Yağ Tutma Kapasitesi (\%)} = \frac{O_2 - O_1}{O_0} \times 100 \quad (3.5)$$

O_0 : Protein ekstraktının ağırlığı, O_1 : Protein ekstraktı ve tüp ağırlığının toplamı, O_2 : Çökelti ve tüp ağırlığının toplamı.

3.6.3 Emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi

Protein ekstraktlarının emülsiyon aktivitesi (EA) ve stabilitesini (ES) Tan vd. (2014)'nin metodu kullanılarak belirlenmiştir. Protein ekstraktlarının EA ve ES aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır (Denklem 3.6 ve Denklem 3.7).

$$\text{Emülsiyon aktivitesi (\%)} = \frac{\text{Emülsiyon olmuş tabakanın yüksekliği}}{\text{Tüp içeriğinin yüksekliği}} \times 100 \quad (3.6)$$

$$\text{Emülsiyon stabilitesi (\%)} = \frac{\text{Kalan emülsiyon olmuş tabakanın yüksekliği}}{\text{Orijinal emülsiyon olmuş tabakanın yüksekliği}} \times 100 \quad (3.7)$$

3.6.4 Köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi

Proteinlerin ekstraktlarının köpürme kapasitesi (KK) ve köpürme stabilitesi (KS)'nin belirlenmesi amacıyla Jarpa-parra vd., (2014)'in metodu kullanılmıştır ve KK ve KS değerleri aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır (Denklem 3.8 ve Denklem 3.9).

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

$$KS (\%) = \frac{\text{Bekletme işleminden sonra hacim (ml)} - \text{Çırpma işleminden önce hacim (ml)}}{\text{Çırpma işleminden önce hacim (ml)}} \times 100 \quad (3.9)$$

3.7 Protein Ekstraktlarını Karakterizasyonu

3.7.1 SDS-PAGE analizi

Optimum ekstraksiyon koşullarında hazırlanan protein ekstraktlarındaki protein fraksiyonlarının %12'lik ayırma ve %5'lik istifleme jelleri (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0,18 M glisin ve %0,1 SDS) 80 Volt'ta uygulanarak, sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE, Biorad, Hercules, CA, ABD) ile tanımlanma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, 10-250 kDa molekül ağırlığında protein markerları kullanılmış ve protein bantları coomassie boyasıyla belirlenmiştir.

3.7.2 FT-IR analizi

Optimum koşullarda hazırlanan protein ekstraktlarındaki organik grupların tanımlanması, örneklerin Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizi ile fourier dönüşümlü kızılötesi spektrumu, 400 ile 4000 1/cm'e Diamond ATR'li (Attenuated Total Reflectance) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7.3 DSC analizi

Optimum ekstraksiyon koşullarında hazırlanan protein ekstraktlarının ısı özellikleri Kumar vd. (2014) tarafından tanımlanan metoda göre bir diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC 60 Plus, Shimadzu, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir (Kumar vd., 2014). Özetle, 20 mg protein ekstraktı alüminyum kapsüllere yerleştirilmiştir. Proses koşulları ise 10 °C/dk ısıtma hızı ile 25 °C'den 125 °C'ye sıcaklık uygulaması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Örneklerin ısıl stabilitesi pik denatürasyon sıcaklığı (T_d) olarak açıklanmıştır.

3.8 Amino Asit Kompozisyonunun Belirlenmesi

Optimum hidroliz koşullarında elde edilen SV-PH'nin amino asit kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla, hidrolizatlar OPA/FMOC ile türevlendirilmiştir (Hao vd. 2019). Aminoasit analizi, degazör (Prominence Degasser DGU-20A3, Shimadzu), otomatik örnekleyici (Prominence AutoSampler SIL-20AHT, Shimadzu), pompa (LD-20A, Shimadzu), denetleyici (Prominence Controller Bus CBM-20A Lite, Shimadzu), fırın (Prominence Column Oven CTO-10ASVP, Shimadzu) ve PDA dedektörlü (SPD M20A, Shimadzu) bir Shimadzu 20 A serisi UHSK ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UFLC, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Amino asit ayrımı, C18 (4,6×250 mm, 5 µm) kolonu kullanılarak, 40 °C sabit kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Gradyan solvent sistemi için A fazı; fosfat/borat tamponu (10 mM Na₂HP0₄:10 mM Na₂B₂O₇ (pH= 8.2):5 mM NaN₃) ve B fazı; MeOH:ACN:H₂O (45:45:10, v/v/v)'dir. Akış hızı 1,5 mL/dk olacak şekilde: 0,85 dk, %2 B; 33,4 dk, %57 B; 33,5 dk, %85 B; 39,3 dk, %85 B; 39,4 dk, %2 B; 40,0 dk, %2 B akış programı kullanılmıştır.

3.9 Deney Tasarımı ve İstatistiksel Analiz

Ekstraksiyonun optimizasyonu Merkezi Kompozit Dizayn (Central Composite Dizayn, CCD) temelli yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve 2 bağımsız değişkenin (ultrases uygulama süresi ve enzim/substrat oranı) etkisi araştırılmıştır. Yanıt fonksiyonları (Y) ise protein miktarı (mg protein/g), toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g) ve antioksidan aktivite (mg TE/g)'dir.

Protein ekstraktlarının enzimatik hidrolizinde de hidroliz koşullarının optimizasyonu için de bir CCD temelli deney tasarımı hazırlanmış ve 2 bağımsız değişkenin (hidroliz süresi ve enzim/substrat oranı) etkisi araştırılmıştır. Yanıt fonksiyonları (Y) hidroliz derecesi (%), toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g örnek) ve antioksidan aktivite (mg TE/g örnek)'dir.

Ekstraksiyon ve hidroliz koşulları Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Yanıt ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi gösteren, matematiksel model Denklem 3.10'da verilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \epsilon \quad (3.10)$$

β_0 : Sabit terim, β_i : Lineer etki, β_{ii} : Kuadratik etki ve β_{ij} : İnteraksiyon etkidir. Varyans analizi (ANOVA) kullanılarak, istatistiksel önem ($p < 0,05$), modelin uyumu ve regresyon katsayıları araştırılmıştır. YYM çalışmaları kapsamında, Design Expert 7.1 yazılımının (Stat-Ease, Inc., MN, ABD) deneme sürümü kullanılmıştır. Model uyumluluğu ise model analizi, belirleme katsayısı (R^2) ve modelin uyumsuzluğu (lack of fit) kullanılarak araştırılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Protein Çözünürlüğü ve Zeta (ζ) Potansiyeli

Proteinlerin çözünürlüğü, çözünür olarak bulunan bir protein ürünündeki nitrojenin oranı olarak bilinir. Çözünürlük, bir numunedeki çözelti içinde çözünen protein miktarıdır (Zayas ve Zayas, 1997). Sunulan çalışmada, en düşük protein çözünürlüğü değeri $\%16,50 \pm 0,43$ (pH 3) olarak belirlenmişken, en yüksek protein çözünürlüğü değeri $\%40,70 \pm 2,10$ (pH 13) olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). Bildiğimiz kadarıyla, *Sargassum vulgare* makroalginin protein çözünürlüğü hakkında yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, diğer algler ile ilgili çalışmalar ile kıyaslama yapılmıştır. García-Vaquero vd. (2016), *Himanthalia elongata* kahverengi alginin en düşük protein çözünürlüğü değerini pH 4’de ($\%22,5 \pm 1,1$) ve en yüksek çözünürlük değerini pH 12’de ($\%96,15 \pm 0,15$) elde etmiştir. Harnedy ve Fitzgerald (2013)’e göre makroalg proteinlerinin protein çözünürlüğü alkali koşullarda artmaktadır.

Zeta potansiyel, çözelti içerisindeki bir katı yüzeyin ölçülebilen potansiyel değeridir (Korkmaz, 2015). Zeta potansiyel değeri, ortamın pH’sının yanı sıra, iyonların varlığına ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilmektedir (Dikmen, 2007). Sunulan tez çalışması kapsamında, *Sargassum vulgare* için en yüksek zeta potansiyeli pH 2’de $-7,84 \pm 1,18$ mV iken, pH 12’de ise en düşük zeta potansiyel değeri -3.86 ± 0.62 mV olarak belirlenmiştir ve zeta potansiyel değerleri bütün pH aralıklarında negatif değere sahiptir (Çizelge 4.1). pH’nın zeta potansiyeli üzerinde doğrudan bir etkisi vardır ve partiküllerin zeta potansiyelinin pH’nın artmasıyla azaldığı daha önce yapılan çalışmalar ile de bildirilmiştir (Jiang vd., 2009; Peng vd., 2004). Çalışmamızda elde ettiğimiz negatif zeta potansiyel değerlerinin nedeni, hücre duvarında bulunan anyonik polisakkaritlerden kaynaklandığı söylenebilir (Baş Yıldırım, 2022).

Çizelge 4.1. *Sargassum vulgare*'nin farklı pH değerlerinde protein çözünürlüğü (%) ve ζ -potansiyel değeri (mV).

pH	Protein çözünürlüğü (%)	ζ -potansiyel (mV)
2	19,58±0,14	-7,84±1,18
3	16,50±0,43	-
4	19,29±0,05	-12,63±0,18
5	24,78±1,56	-8,61±0,34
6	31,47±1,68	-11,63±0,46
7	21,36±0,00	-13,46±1,08
8	28,03±0,00	-12,4±0,77
9	30,82±0,39	-11,66±0,12
10	33,23±1,24	-16,23±0,70
11	36,21±0,10	-
12	36,21±0,58	-23,86±0,62
13	40,70±2,10	-12,5±0,5

4.2 *Sargassum vulgare* Proteinlerinin Ekstraksiyonu

4.2.1 Modelin uyumu

Doğal ve kodlanmış ekstraksiyon şartlarıyla merkezi kompozit deney tasarımı ve yanıtlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. *S. vulgare*'den proteinlerin ekstraksiyonunda, ekstraktların PM, TFMM ve AOA değerleri üzerine ultrases uygulama süresi ve E/S oranının lineer, interaksiyon ve kuadratik etkisi etkisi araştırılmıştır (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.5). PM, AOA ve TFMM'nin tahminlenen değerleri regresyon modelleri kullanılarak hesaplanıp, her bir bağımsız değişken için varyans analizi ve R^2 değerleri Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. ANOVA sonuçlarına göre, PM, TFMM ve AOA üzerine E/S oranının etkisi önemlidir ($p<0,05$). Daha önceki çalışmalarda da benzer bir etki rapor edilmiştir (Liadakis vd., 1995; Yucetepe vd., 2022). PM, TFMM, AOA_{CUPRAC} ve AOA_{ABTS}'nin R^2 değerleri sırasıyla 0,96, 0,99, 0,82 ve 0,51'dir. AOA_{ABTS} hariç diğer yanıtlara ilişkin modellerin R^2 değerinin 0,80'den büyük olması modellerin uyumunu göstermektedir. DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite deneyinde, örnekler analizde kullanılan DPPH radikaline yanıt vermediğinden AOA_{DPPH} hesaplanamamıştır. Modelin düşük varyasyon katsayısı (CV), incelenen sistemlerin tekrar üretilebilirliğinin iyi olduğunun bir göstergesidir. Bu bağlamda, PM (CV: %10,33), TFMM (CV: %2,38), AOA_{CUPRAC} (CV: %9,05) ve AOA_{ABTS} (CV: %12,12) ortalama değerlerinde düşük CV değerlerine sahiptir. Modelin uyumsuzluğu, PM TFMM ve AOA için anlamlı olarak bulunmamıştır ($p>0,05$). PM, TFMM ve AOA_{CUPRAC} için modellerin p değeri 0,05'ten küçüktür (Çizelge 4.3 - Çizelge 4.5). Bu sonuçlar, PM, TFMM ve AOA_{CUPRAC} *S. vulgare*'den proteinlerin ekstraksiyonunda, ekstraksiyon parametrelerini optimize etmek için kullanılabileceğini göstermektedir. PM, TFMM ve AOA_{CUPRAC} üzerine E/S'nin lineer etkisi

istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.5). Ultrases uygulama süresinin PM üzerindeki kuadratik etkisi önemlidir ($p<0,05$). Ayrıca, ultrases uygulama süresinin TFMM üzerindeki lineer etkisi ve ultrases uygulama süresi ve E/S arasındaki interaksiyon etkisi anlamlıdır ($p<0,05$).

Çizelge 4.2. Doğal ve kodlanmış ekstraksiyon şartlarıyla merkezi kompozit deney tasarımı ve deneysel olarak elde edilen yanıtların değerleri.

Deney Numarası	Bağımsız değişkenler				Yanıtlar			
	A: Ultrases zamanı, dakika	Kod	B: Enzim/Su bstrat oranı	Kod	PM (mg protein/g ekstrakt)	TFMM (mg GAE/g ekstrakt)	AOA _{CUPRA} (mg TE/g ekstrakt)	AOA _{ABTS} (mg TE/g ekstrakt)
1	1,50	0	1,02	0	248,53	41,57	55,01	16,98
2	1,50	0	0,18	-α	34,92	20,80	37,76	19,09
3	1,50	0	0,60	-α	147,00	31,97	53,66	20,62
4	2,91	1	0,60	-α	143,10	32,86	52,63	19,69
5	1,50	0	0,60	-α	146,67	32,42	47,36	17,55
6	1,50	0	0,60	-α	152,50	33,06	49,90	18,94
7	0,50	-α	0,90	-α	194,11	37,62	53,18	12,60
8	1,50	0	0,60	-α	161,97	34,17	43,70	19,69
9	2,50	1	0,30	-α	85,96	25,45	36,61	18,66
10	2,50	1	0,90	-α	258,55	39,37	53,28	17,85
11	1,50	0	0,60	-α	176,30	31,98	44,36	14,72
12	0,50	-α	0,30	-α	100,00	23,47	32,49	20,67
13	0,09	-α	0,60	-α	157,76	31,41	40,80	20,90

PM: Protein miktarı, TFMM: Toplam fenolik madde miktarı, AOA_{CUPRA}: CUPRAC yöntemiyle antioksidan aktivite. AOA_{ABTS}: ABTS yöntemiyle antioksidan aktivite. Sonuçlar kuru ağırlıkta verilmiştir.

4.2.2 Protein miktarı

S. vulgare'den proteinlerin ekstraksiyonunda elde edilen sonuçlara göre *S. vulgare*'nin protein içeriği, ekstraksiyon parametrelerine bağlı olarak kuru madde cinsinden 34,92-258,55 mg/g (%3,49-25,85) arasında belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Benzer olarak, bazı *Sargassum* türlerinin protein içeriği %4,13 ile %15,42 arasında (Perumal vd., 2019) ve bazı *Gracilaria* türlerinin protein içeriği %5,6 ile %30,2 arasında değişmiştir (Valente vd., 2006; Chan ve Matanjun, 2017; Gressler vd., 2010). Vasquez vd., (2018), enzim destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların protein içeriğinin *M. pyrifera*'da 100 g makroalg başına kuru maddede 7,39 g protein ve *C. chamissoi*'de 100 g makroalg başına kuru maddede 6,35 g protein olduğunu bildirmiştir. Bulgularımız bu yazarların sonuçlarıyla uyumludur.

Uygulanan ekstraksiyon koşullarında (ultrases uygulama süresi: 2,5 dk, E/S: 0,90) en yüksek PM'ı 258,55 mg/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). E/S'nin PM üzerindeki lineer etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$, Çizelge 4.3). Bunun nedeni, alg hücre duvarının kullanılan enzim tarafından tahrip edilmesi ve böylece çözücü ortama daha fazla protein

salınması olabilir. Harnedy ve Fitzgerald (2013), polisakkaridaz enzimlerinin hücre duvarını parçalamak için kullanılmasının, makroalglerden proteinlerin ekstraksiyonunda ekstraksiyon etkinliğini artırdığını bildirmiştir. Protein verimi genellikle enzim muamelesine duyarlıdır. Ramakrishnan vd. (2013), artan enzim konsantrasyonu ile protein verimi arasında doğrudan bir eğilim olduğunu ve en yüksek enzim konsantrasyonunun kullanıldığı koşullarda %76,30 ekstrakte edilmiş protein elde edildiğini bildirmiştir. Yücepe (2022)'nin çalışmasında da E/S oranı 1'in üzerinde olduğunda, algal protein ekstraktlarının protein miktarı artmıştır. Benzer bir sonuç Bozdemir vd. (2022) tarafından elde edilmiştir. Bu çalışmada da, *Gracilaria dura*'dan protein ekstraksiyonunda, ekstrakte edilen protein miktarı kullanılan enzimin konsantrasyonu ile artmıştır (Bozdemir vd., 2022).

E/S ve ultrases uygulama süresinin PM üzerine interaksyon etkisi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre; ~1-2,5 dk ultrases uygulama süresi ve E/S'nin ~0,75-0,90 olduğu koşullarda en yüksek protein miktarı, E/S oranının ~0,30-0,40 arasında ve tüm ultrases uygulama sürelerinde ise en düşük protein içeriği elde edilmiştir (Şekil 4.1).

Çizelge 4.3. İkinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).

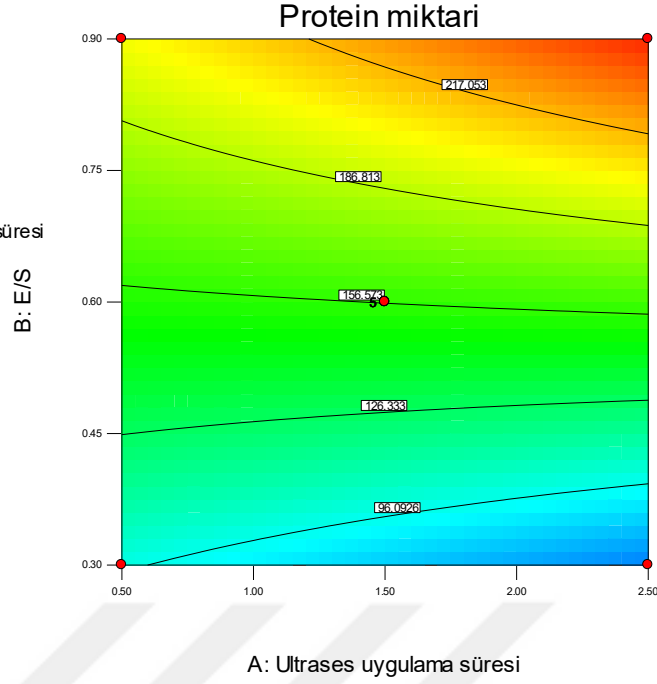
Kaynak	Karelerin toplamı	DF	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri
Protein miktarı					
Model	42216,30	5	8443,26	33,17	0.0001*
Doğrusal					
β_1	110,02	1	110,02	0,43	0,5319
β_2	40440,67	1	40440,67	158,88	0,0001*
Kaudratik					
β_{11}	1540,00	1	1540,00	6,05	0.0435*
β_{22}	0,19	1	0,19	7.384E-004	0.9791
İteraksiyon					
β_{12}	122,03	1	122,03	0,48	0,5110
Artan	1781,70	7	254,53	-	-
Modelin uyumsuzluğu	1157,67	3	385,89	2,47	0,2011
Saf hata	624,03	4	156,01	-	-
Toplam	43998,00	12	-	-	-
R ² =0.9595; C.V.(%)=10,33					

*p≥0,05 düzeyinden önemli.

Design-Expert® Software

Protein miktarı
● Design Points
258.551
34.9179

X1 = A: Ultrases uygulama süresi
X2 = B: E/S



Şekil 4.1. Ekstraktların protein miktarı üzerine E/S ve ultrases uygulama süresinin etkisi.

4.2.3 Toplam fenolik madde miktarı

Sonuçlara göre, SV-PE'nın TFMM üzerine E/S oranının lineer etkisi önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). TFMM için model istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0.0001$, Çizelge 4.4). Çalışmamızda, PM'ye benzer şekilde fenolik bileşikler proteinlere kovalent olarak bağlı olduğu için E/S oranının TFMM üzerindeki etkisi yüksek bulunmuştur (Acosta-Estrada vd., 2014). Çalışmamızın sonuçlarına göre, SV-PE'nın TFMM değerleri 20,80 ile 41,57 mg GAE/g arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). En düşük TFMM, ultrases uygulama süresi 1,50 dk ve E/S oranı 0,18'de belirlenirken, en yüksek TFMM 1,50 dk ultrases uygulama süresi ve 1,02 E/S oranında elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Khaled vd. (2012), *S. vulgare*'nin TFMM'nı $12,71 \pm 0,03$ mg GAE/g, *P. pavonica*'nın ise 10,55 mg GAE/g olarak belirlemiştir. İlave olarak, Somanah vd. (2012) tarafından *Sargassum binderi*, *S. latifolium*, *S. duplicatum*, *Padina gymnospora*, *P. tetrastrumatica* ve *Turbinaria ornata* makroalglerde benzer fenolik konsantrasyon gözlemlenmiştir. Özgün ve Turan (2015), İskenderun Körfezi'nden topladıkları *Cystoseira barbata*'nın toplam fenolik madde miktarı $0,456 \pm 0,06$ mg/g olarak belirlemiştir. Şekil 4.2'de yaklaşık $>0,80$ E/S'de ve tüm ultrases uygulama sürelerinde, ekstraktların TFMM'ı artmıştır.

Çizelge 4.4. İkinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Karelerin toplamı	DF	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri
Toplam fenolik madde miktarı					
Model	421,90	5	84,38	145,74	0.0001*
Doğrusal					
β_1	4,20	1	4,20	7,25	0,0310*
β_2	412,70	1	412,70	712,82	0,0001*
Kaudratik					
β_{11}	0,015	1	0,015	0,026	0.8760
β_{22}	0,80	1	0,80	1,38	0.2784
İnteraksiyon					
β_{12}	4,60	1	4,60	7,95	0,0258*
Artan	4,05	7	0,58	-	-
Modelin uyumsuzluğu	0,63	3	0,21	0,24	0,8622
Saf hata	3,43	4	0,86	-	-
Toplam	425,95	12	-	-	-

$R^2=0,9905$; C.V.(%)=2,38

* $p \geq 0,05$ düzeyinden önemli.

Design-Expert® Software

TFMM

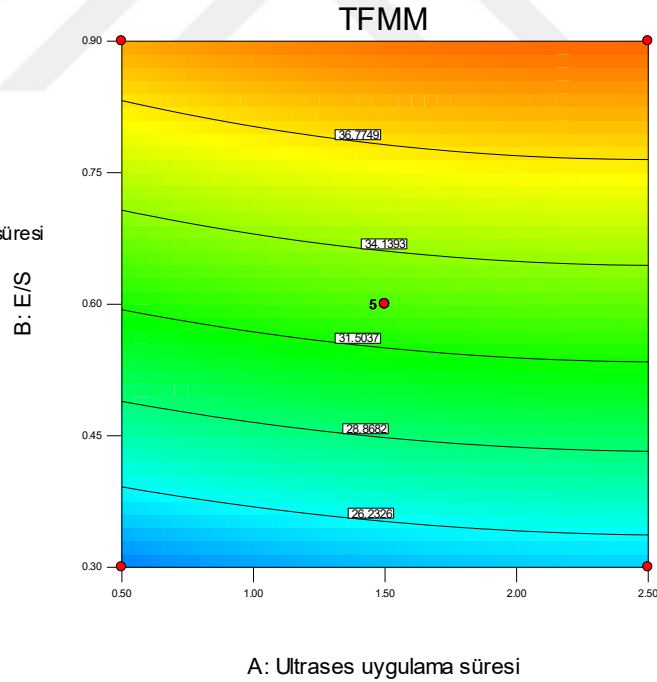
● Design Points

41.5676

20.7933

X1 = A: Ultrases uygulama süresi

X2 = B: E/S



Şekil 4.2. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı üzerine E/S ve ultrases uygulama süresinin etkisi

4.2.4 Antioksidan aktivite

Sonuçlara göre, AOA_{CUPRAC} için model istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0154$). SV-PE'nin AOA_{CUPRAC} üzerine E/S oranının lineer etkisi önemli bulunmuştur ($p<0,05$, Çizelge 4.5). TFMM'na benzer şekilde, polifenolikler yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğundan ekstraktların AOA'si enzim miktarındaki artışla artmıştır (Barclay ve Vinqvist, 2003). Diğer taraftan, incelenen parametrelerin lineer etkilerinin hiçbirisi AOA_{ABTS}'de önemli farklılıklara neden olmamıştır ($p>0,05$).

Ekstraksiyon koşulları altında protein ekstraktlarının AOA_{CUPRAC} 32,49 ila 55,01 mg TE/g ve AOA_{ABTS} 12,60 ila 20,90 mg TE/g olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). Diğer taraftan, en yüksek AOA_{CUPRAC} ultrases uygulama süresi 1,50 dk ve E/S oranı 1,02 ile elde edilmiştir. En yüksek AOA_{ABTS} ise ultrases uygulama süresi 0,09 dk ve E/S oranı 0,60 koşullarında sağlanmıştır. Şekil 4.3'e göre, yaklaşık 0,65-0,90 E/S oranlarında ve tüm ultrases uygulama sürelerinde AOA_{CUPRAC} artmıştır. Diğer taraftan, ~0,30-0,45 E/S ve ~0,50-1 dk ultrases uygulama sürelerinde AOA_{ABTS} en yüksektir (Şekil 4.4). Yuan vd. (2018), *Lessonia nigrecens* için ABTS testi ile en yüksek AOA'yi $0,95\pm0,01$ mg TE/g olarak bildirmiştir. Kumar vd. (2020) FRAP yöntemini kullanarak *Sargassum wightii* için 8,21 mg TE/g, *Ulva rigida* için 6,90 mg TE/g ve *Gracilaria edulis* için 1,06 mg TE/g AOA elde etmiştir. Nurşit vd. (2020), polifenol içeriği ve antioksidan aktivitedeki bu farklılıkların, alglerin toplandığı mevsim, hasat zamanı, coğrafi konum ve alg türlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceğini bildirmiştir.

Çizelge 4.5. İkinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Karelerin toplamı	DF	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri
CUPRAC					
Model	556,11	5	111,22	6,36	0.0154*
Doğrusal	54,83	1	54,83	3,13	0,1199
β_1	476,72	1	476,72	27,25	0,0012*
β_2					
Kaudratik	4,04	1	4,04	0,23	0.6454
β_{11}	10,10	1	10,10	0,58	0.4721
β_{22}					
İnteraksiyon	13,07	1	13,07	0,75	0,4160
β_{12}					
Artan	122,44	7	17,49	-	-
Modelin uyumsuzluğu	54,74	3	18,25	1,08	0,4532
Saf hata	67,70	4	16,93	-	-
Toplam	678,55	12	-	-	-

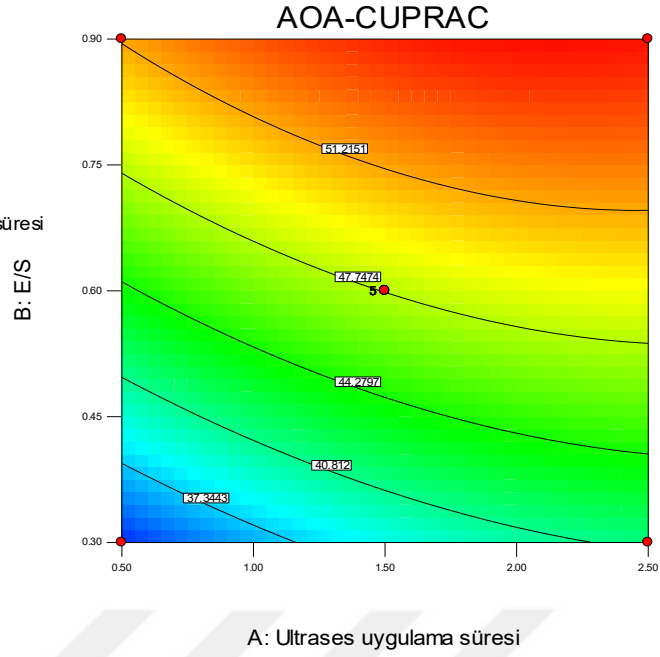
$R^2=0.8196$; C.V.(%)=9,05

* $p\geq0,05$ düzeyinden önemli.

Design-Expert® Software

AOA-CUPRAC
 ● Design Points
 55.0079
 32.4888

X1 = A: Ultrases uygulama süresi
 X2 = B: E/S



A: Ultrases uygulama süresi

Şekil 4.3. Ekstraktların antioksidan aktivitesi üzerine E/S ve ultrases uygulama süresinin etkisi.

Çizelge 4.6. İkinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Karelerin toplamı	DF	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri
ABTS					
Model	36.17	5	7.23	1.47	0.3096
Doğrusal					
β_1	0,29	1	0,29	0,059	0,8144
β_2	17,59	1	17,59	3,58	0,1005
Kaudratik					
β_{11}	13.18	1	13.18	2,68	0,1457
β_{22}	2.22	1	2.22	0,45	0,5228
İnteraksiyon					
β_{12}	2,22	1	2,22	0,45	0,5235
Artan	34,43	7	4,92	-	-
Modelin uyumsuzluğu	13,33	3	4,44	0,84	0,5378
Saf hata	21,10	4	5,28	-	-
Toplam	70,60	12	-	-	-

$R^2=0,5123$; C.V.(%)=12,12

* $p \geq 0,05$ düzeyinden önemli.

Design-Expert® Software

ABTS

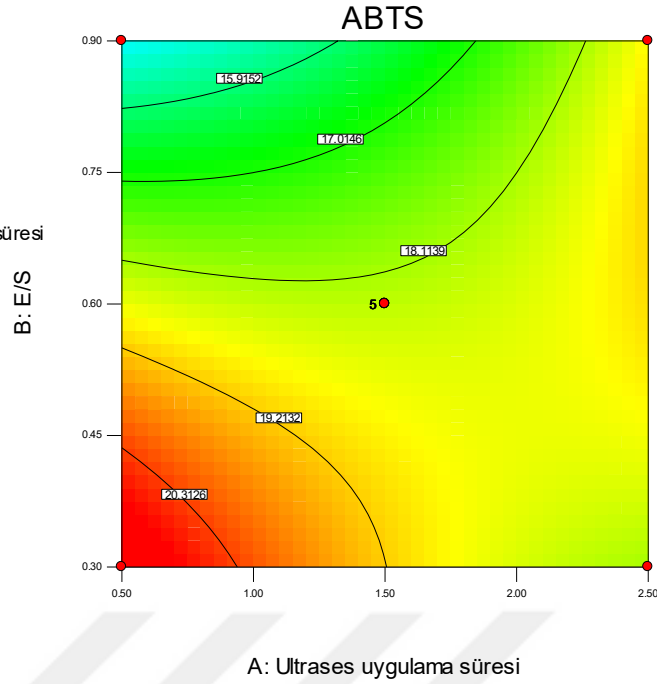
● Design Points

20.9

12.6

X1 = A: Ultrases uygulama süresi

X2 = B: E/S



Şekil 4.4. Ekstraktların antioksidan aktivitesi üzerine E/S ve ultrases uygulama süresinin etkisi.

4.2.5 Optimizasyon ve doğrulama

PM, TFMM, AOA_{CUPRAC} ve AOA_{ABTS} için maksimum değerleri elde etmek üzere bağımsız değişkenlerin optimum seviyesini tahmin etmek amacıyla optimizasyon prosedürleri gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar altında (ultrases uygulama süresi: 2,50 dk ve E/S: 0,90), tahmin edilen PM, TFMM, AOA_{CUPRAC} ve AOA_{ABTS} değeri sırasıyla 247,29 mg/g km, 39,41 mg GAE/g km, 54,55 mg TE/g km ve 18,82 mg TE/g km idi (Desirability: 0,89). Optimum koşullarda, deneysel değerler; PM için 245,30 mg/g km, TFMM için 40,03 mg GAE/g km, AOA_{CUPRAC} için 53,77 mg TE/g km ve AOA_{ABTS} için 19,88 mg TE/g km olarak bulunmuştur. Tahmin edilen ve deneysel değerlerin ortalaması %5 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak farklı değildir ($p>0,05$).

4.2.6 Tekno-fonksiyonel özellikler

4.2.6.1 Su ve yağ tutma kapasitesi

Bir proteinin STK'si, viskoz gıdalarda ağızda bıraktığı his, koyulaşma ve viskoziteye etkisi bakımından kritik bir özelliktir (Kandasamy vd, 2012). Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen SV-PE'nin STK'si kuru ağırlıkta $89,0\pm0,63$ olarak hesaplanmıştır. SV-PE'nin STK değeri diğer makroalglerle karşılaştırıldığında, oldukça düşüktür. Örneğin, *Porphyra sp.*'nin su tutma kapasitesi 882 ± 40 , *Undaria pinnatifida*'nın $799,1\pm24,5$, *Gracilaria*

spp.'nin (%767,0±30,0), *Sargassum* spp.'nin %691,0±15,0, *Saccharina* spp.'nin %659,0±23,0 ve *H. fusiformis*'nin %622,0±30,0 olarak bulunmuştur (Kumari vd., 2022).

Chandi ve Sogi (2007), proteinlerin YTK'sinin özellikle et, sosis, mayonez için bir diğer önemli fonksiyonel özellik olduğunu bildirmiştir. Sunulan bu tez çalışmasında optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen SV-PE'nin yağ tutma kapasitesi %317,0±30,0 olarak bulunmuştur. Bu değer, diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, diğer alglerin YTK'ne yakın ya da yüksek olduğu görülmektedir. Örneğin, *Gracilaria* spp.'nin yağ tutma kapasitesi %323,0±8,0, *U. pinnatifida*'nın %192,0±22,0, *K. alvarezii*'nin %129,0±20,0, *E. Linza*'nın %105,0±7,0 ve *E. tubulosa*'nın %108,0± 4,0 olarak bulunmuştur (El Nasri ve El Tinay, 2007). STK ve YTK değerlerindeki bu farklılıklar, amino asit bileşimi ve proteinin protein konformasyonu ve ekstraksiyon parametrelerindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Mevcut çalışmanın sonuçları, kabul edilebilir YTK değerine sahip *S. vulgare*'nin doku arttırıcı özellikleri ile gıda uygulamaları için uygun bir aday olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

4.2.6.2 Köpürme ve emülsifikasyon özellikleri

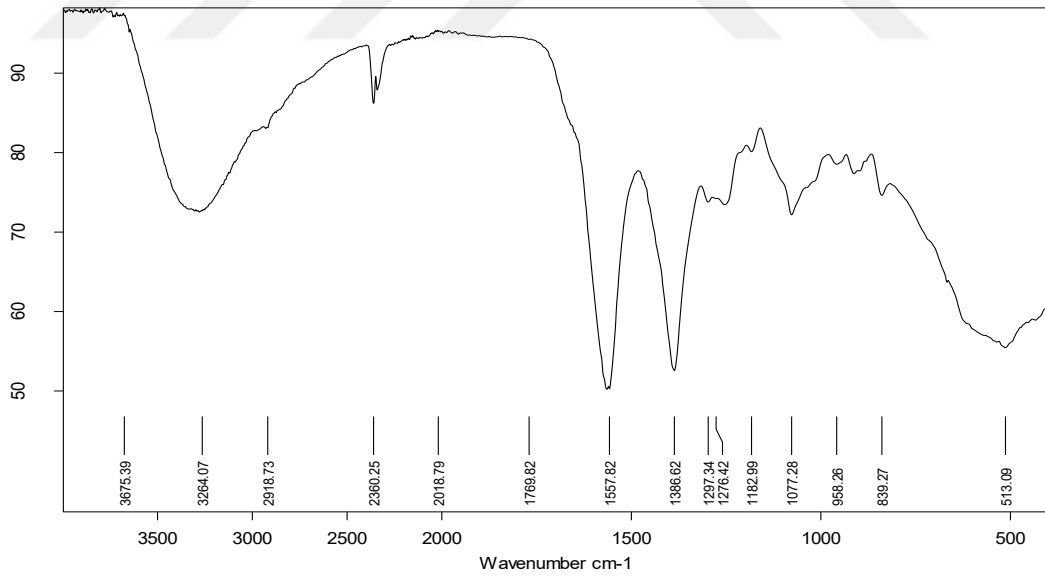
Köpük, hava hücrelerinden oluşan ve bu hava kabarcıklarının etrafında ince bir sıvı tabakanın bulunduğu bir sistemdir (Makri vd., 2005). Sunulan bu tez çalışmasında SV-PE'nin köpürme kapasitesi %12,50±0,01 olarak bulunmuştur. Ancak, *S. vulgare* proteinleri iyi bir köpürme stabilitesi sergilememiştir. Başka bir çalışmada, *Hyaleucerea fusiformis* iyi bir köpük oluşturma kapasitesi sergilemiştir (%38,0±2,0). Makroalglerden elde edilen proteinlerin KK ve KS'leri, ekstraksiyon prosedürü, makroalgal genotip, köpük oluşum süreci ve çevre koşulları gibi faktörlerden etkilenebilir (Makri ve Doxastakis, 2006). Ayrıca, proteinlerin KK'sinin çözünürlükten, yüzey yükünden ve hidrofilik ve hidrofobik amino asitler arasındaki dengeden etkilenmektedir (Zheng vd., 2020; Gündoğan ve Karaca, 2020).

Emülsiyon kapasitesi, protein çözeltisinin yağı emülsifiye edebilme özelliğidir ve 1 gram proteinin özel koşullarda oluşturduğu yağ miktarı olarak ifade edilmektedir. Emülsiyon stabilitesi, emülsiyon damlaları birleşmeden ve bulanıklık oluşmadan çözünür kalabilme özelliğidir. Emülsiyon stabilitesini etkileyen faktörler; pH, net yük, damlacık boyutu ve ara yüzey gerilimi olarak sıralanabilir (Hung ve Zayas, 1991). Optimum ekstraksiyon koşullarında üretilen *S. vulgare* proteinlerinin EA ve ES değerleri sırasıyla %53,36±0,84 ve %3,35±0,66 olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada, *Himanthalia elongata*'dan elde edilen proteinlerin emülsiyon aktivitesi %90,7-100 olarak bulunmuştur (Hung ve Zayas, 1991).

4.2.7 Protein ekstraktlarının karakterizasyonu

4.2.7.1 FT-IR analizi

Optimum ekstraksiyon koşulları altında elde edilen SV-PE'nin FT-IR spektrumu, Şekil 4.5'te gösterildiği gibi fonksiyonel gruplar için birkaç tipik bant içermektedir. Örneğin, ~3264 1/cm'deki geniş bant, amid A'ya ait O–H ve N–H gruplarının gerilme titreşimlerinden kaynaklanmış olabilir (Aboul-Enein vd., 2014). Ayrıca, ~2918 1/cm'deki pikler, nötr proteinlerin, karbonhidratların ve lipidlerin varlığını gösteren C–H gruplarının gerilme titreşimlerine atfedilir (Wu vd., 2019). Amid II bandı (~1557 cm⁻¹), C–N gerilmesinin ve N–H gruplarının bükülme titreşimlerinin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu bandın varlığı, örneklerde protein varlığının göstergesidir (Pistorius vd., 2009). Ayrıca, ~1297-1386 1/cm dalga boyundaki pikler, C–N ve N-H gruplarının amid III bandı germe titreşimlerini göstermektedir. COO için ~2360 1/cm ve ~1769 1/cm'de gözlenen pikler; ketonlar, aldehitler, karboksilik asitler, birincil amidler ve esterlerin neden olabileceği C = O gerilme titreşimine karşılık gelmektedir (Wei vd., 2018).



C:\Users\PC\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\Data\MEAS\alg-136.1

alg-136

Instrument type and / or accessory

09.04.2022

Page 1/1

Şekil 4.5. *Sargassum vulgare* protein ekstraktlarının FT-IR spekturumu.

4.2.7.2 SDS-PAGE analizi

Şekil 4.6’da görüldüğü gibi, 80 V, %12 ayırma jeli, %5’lik yürütme jeli koşullarında, optimum koşullarda hazırlanan *S. vulgare* proteinlerinin, 180-135 kDa molekül ağırlığı arasında bir bant yoğunluğu görülmektedir. Ayrıca 20 kDa-25 kDa arasında molekül ağırlığında bir fraksiyona sahip olduğu görülmektedir. Moorthi vd. (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *Sargassum muticum*’un SDS-PAGE analizinde 20-48 kDa arasında bir bant yoğunluğu elde edilmiştir. Mohd Rosn vd. (2015)’in çalışmasında *Sargassum polycystum* yaklaşık 20-45 kDa aralığında belirgin pikler sergilemiştir. Jong vd. (2015), makroalg kompozisyonunun aynı türde bile farklı çevresel koşullar altında değişebileceğini ve farklı protein ekspresyonlarına neden olabileceğini bildirmiştir.

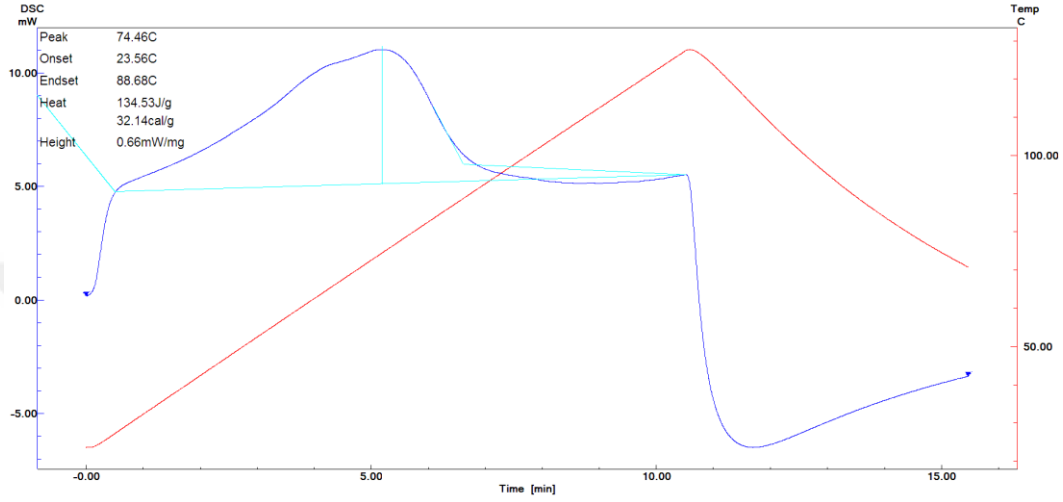


Şekil 4.6. *Sargassum vulgare* protein ekstraktları (SV-PE)’nin SDS-PAGE görüntüsü.

4.2.7.3 DSC analizi

Sunulan çalışmada, SV-PE’nin denatürasyon sıcaklığı 88,68 °C, denatürasyon entalpisi 134,25 J/g olarak bulunmuştur (Şekil 4.7). Benzer olarak, Chen vd. (2019), ultrases destekli ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanan üç farklı mikroalg protein ekstraktının termal denatürasyon sıcaklığının 73,68-80,83 °C arasında değiştiğini rapor etmiştir. Diğer taraftan bir mikroalg olan *Chlorella pyrenoidosa* proteinleri 60,1 °C’de denatüre edilmiştir (Waghmare

vd., 2016). Ayrıca, termal denatürasyon sıcaklıkları arasındaki farkların β -yaprakların konformasyon oranından kaynaklanabileceğinden de bahsetmişlerdir (Chen vd., 2019). Denatürasyon sıcaklığı ve denatürasyon entalpisi, spesifik proteine ve deneyin koşullarına bağlı olarak değişebilir. Yüksek bir denatürasyon sıcaklığı, proteinin ısıya dayanıklı olduğunu gösterebilir. Polipeptitlerin homojenliği, peptitler arasındaki bağın türü ve proteinin amino asit içeriği termal stabiliteyi etkileyen faktörlerdir (Tang ve Sun, 2011).



Şekil 4.7. *Sargassum vulgare* protein ekstraktının DSC termogramı.

4.3 *Sargassum vulgare* Proteinlerinin Hidrolizi

4.3.1 Tripsin ile enzimatik hidroliz koşullarının optimizasyonu

4.3.1.1 Modelin uyumu

Sargassum vulgare'den protein ekstraktlarının hidrolizi için yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak tripsin enzimi ile hidroliz koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. *Sargassum vulgare* protein ekstraktlarının hidrolizinde doğal ve kodlanmış ekstraksiyon koşulları ve yanıtların deneysel olarak elde edilen değerleri ile merkezi kompozit tasarımı Çizelge 4.7'de verilmiştir. Hidroliz derecesi üzerine E/S oranı ve hidroliz süresinin lineer, kuadratik ve interaksiyon etkileri merkezi kompozit tasarım kullanılarak araştırılmıştır (Çizelge 4.8). Varyans analizi ve belirleme katsayısı (R^2) Çizelge 4.7'de verilmiştir. DH, TFMM ve AOA_{CUPRAC} için R^2 değeri sırasıyla 0,77, 0,73 ve 0,36'dır (Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.8). DH, TFMM ve AOA_{CUPRAC}'nin varyasyon katsayısı (CV) sırasıyla %9,21, %12,83 ve %28,96. Diğer taraftan, ANOVA analizine göre, HD için modelin "lack of fit" değeri istatistiksel olarak önemli değildir ($p>0,05$). Bu sonuçlara göre hidroliz derecesine ilişkin modelin, *Sargassum*

vulgare proteinlerinin hidrolizinde hidroliz derecesinin tahminlenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.7. *Sargassum vulgare* protein ekstraktlarının hidrolizinde doğal ve kodlanmış ekstraksiyon koşulları ve yanıtların deneysel olarak elde edilen değerleri ile merkezi kompozit tasarım.

Deney numarası	Bağımsız değişkenler				Yanıtlar		
	A: Enzim/substrat oranı		B: Hidroliz süresi (dk)		Hidroliz derecesi, %	TFMM, mg GAE/g	AOA _{CUPRAC} mg TE/g
1	0,03	0	180,00	0	26,37	11,85	4,10
2	0,03	0	10,29	-α	27,24	10,98	3,85
3	0,04	+1	300,00	+1	29,18	11,79	0,80
4	0,03	0	180,00	0	27,00	10,72	3,74
5	0,05	+α	180,00	0	26,21	9,49	3,72
6	0,01	-1	60,00	-1	26,86	10,63	4,02
7	0,00	+α	180,00	0	15,22	4,36	2,28
8	0,03	0	180,00	0	32,32	10,17	2,71
9	0,04	+1	60,00	-1	26,99	11,36	3,88
10	0,01	-1	300,00	+1	25,85	9,79	3,33
11	0,03	0	180,00	0	27,86	10,77	3,62
12	0,03	0	180,00	0	28,49	10,54	3,59
13	0,03	0	349,71	+α	29,99	9,61	3,64

TFMM: Toplam fenolik madde miktarı, AOA_{CUPRAC}: CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktivite.

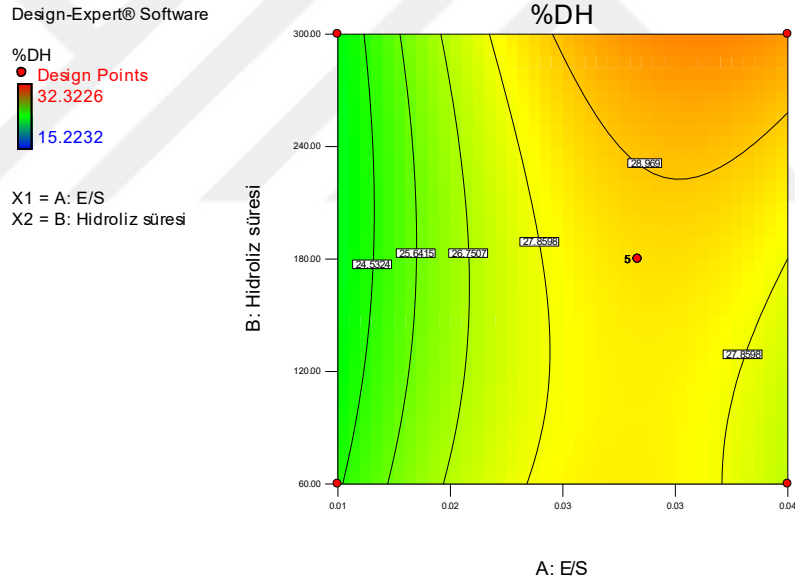
4.3.1.2 Hidroliz derecesi

Sargassum vulgare protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi, Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi 0,03 E/S ve 180 dk hidroliz süresinde en yüksek iken (%32,32), 0,00 E/S ve 180 dk hidroliz süresinde en düşük %HD değeri (%15,22) elde edilmiştir. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi yaklaşık 0,03'den büyük E/S oranlarında ve 240-300 dk hidroliz sürelerinde en yüksek %HD elde edilmiştir. E/S'nin HD üzerindeki lineer ve kuadratik etkisi istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$, Çizelge 4.8). Benzer şekilde, Pan vd. (2016), *Ulva clathrata*'nın hidrolizasyonu için alkalaz enzimini kullanmış ve hidroliz derecesini %24,35 olarak rapor etmişlerdir. Paiva vd. (2017) *Ulva rigida* c. agardh'ın farklı enzimler ile protein hidrolizasyonunu araştırmışlardır. Hidrolizatların verim yüzdesini sırasıyla bromelain, pepsin, kimotripsin ve tripsin için %31,5±0,6, %27,8±0,8, %28,5±0,7 ve %28,1±0,6 olarak rapor etmişlerdir (Paiva vd., 2017).

Çizelge 4.8. *Sargassum vulgare* protein ekstraktlarının hidrolizinde ikinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Kareler ortalaması	DF	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri
Hidroliz derecesi					
Model	143,03	5	28,61	4,66	0,0342*
Lineer					
β_1	46,14	1	46,14	7,52	0,0288*
β_2	1,83	1	1,83	0,30	0,6018
Kuadratik					
β_{11}	61,16	1	61,16	9,97	0,0160
β_{22}	1,97	1	1,97	0,32	0,5887
İnteraksiyon					
β_{12}	3,16	1	3,16	0,51	0,4965
Kalıntı	42,95	7	6,14	-	-
Modelin uyumsuzluğu	21,20	3	7,07	1,30	0,3898
Saf hata	21,75	4	5,44	-	-
Cor total	185,98	12	-	-	-
$R^2=0,77$; C.V.(%)=9,21					

*İstatistiksel önem düzeyi: $p < 0.05$, β_1 : Enzim/substrat oranı, β_2 : Hidroliz süresi (dk).

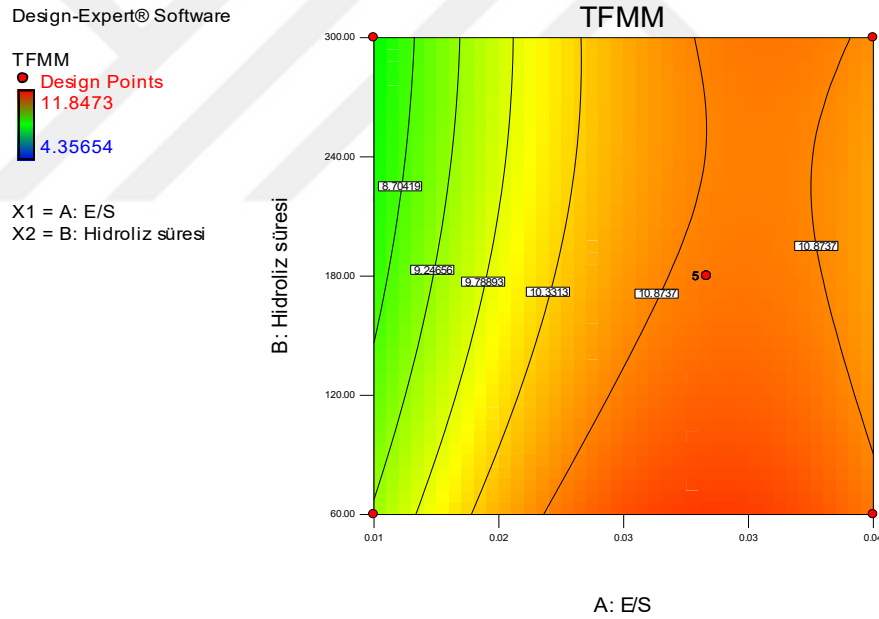


Şekil 4.8. *Sargassum vulgare* proteinlerinin enzimatik hidrolizinde hidroliz derecesi üzerine enzim/substrat oranı ve hidroliz süresinin etkisi.

4.3.1.3 Toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite

Sargassum vulgare protein hidrolizatları 0,03 E/S ve 180 dk hidroliz süresinde en yüksek TFMM (%11,85 mg GAE/g) ve AOACUPRAC (4,09 mg TE/g) değerlerine sahip olmuştur (Çizelge 4.7). Diğer taraftan, *S. vulgare* proteinlerinin, 0,00 E/S ve 180 dk hidroliz süresinde en düşük TFMM değeri (4,36 mg GAE/g), 0,04 E/S ve 300 dk hidroliz süresinde ise en düşük AOACUPRAC değeri (0,80 mg TE/g) elde edilmiştir.

(Çizelge 4.7). E/S'nin TFMM üzerindeki lineer ve kuadratik etkisi istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$, Çizelge 4.9). AOACUPRAC üzerine hiçbir faktörün etkisi önemli değildir ($p > 0,05$, Çizelge 4.10). Şekil 4.9'de görüldüğü gibi en yüksek TFMM yaklaşık 0,02-0,04 E/S ve tüm hidroliz süresi koşullarında elde edilmiştir. Diğer taraftan Şekil 4.10'a göre, yaklaşık 60-150 dk hidroliz süresi ve 0,02-0,04 E/S koşullarında en yüksek AOA elde edilmiştir. Çizelge 4.2 ve 4.7'de görülebileceği gibi protein ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitesi enzimatik hidroliz ile elde edilen hidrolizatların TFMM ve AOACUPRAC'dan daha yüksektir. Hidroliz sırasında TFMM ve AOACUPRAC'de kayıplar meydana geldiği anlaşılmaktadır. Pan vd. (2016)'e göre, protein hidrolizatlarının antioksidan aktivite gibi biyoaktif özellikleri amino asit kompozisyonu ve diziliminden etkilenmektedir. İlave olarak, proteinlerin ileri hidrolizi, peptitlerin biyoaktif özelliklerine zarar verebilir (Kristinsson ve Rasco 2000).



Şekil 4.9. *Sargassum vulgare* protein hidrolizatlarının toplam fenolik madde miktarı üzerine enzim/substrat oranı ve hidroliz süresinin etkisi.

Çizelge 4.9. *Sargassum vulgare* protein ekstraktlarının hidrolizinde ikinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Kareler ortalaması	DF	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri
Toplam fenolik madde miktarı					
Model	31,34	5	6,27	3,69	0,0590
Lineer					
β_1	11,28	1	11,28	6,64	0,0366*
β_2	0,85	1	0,85	0,50	0,5026
Kuadratik					
β_{11}	12,92	1	12,92	7,61	0,0281*
β_{22}	0,29	1	0,29	0,17	0,6919
Interaksiyon					
β_{12}	0,24	1	0,24	0,14	0,7169
Kalıntı	11,88	7	1,70	-	-
Modelin uyumsuzluğu	10,31	3	3,44	8,78	0,0311*
Saf hata	1,57	4	0,39	-	-
Cor total	43,21	12	-	-	-
$R^2=0.73$; C.V.(%)=12,83					

Design-Expert® Software

AOA-CUPRAC

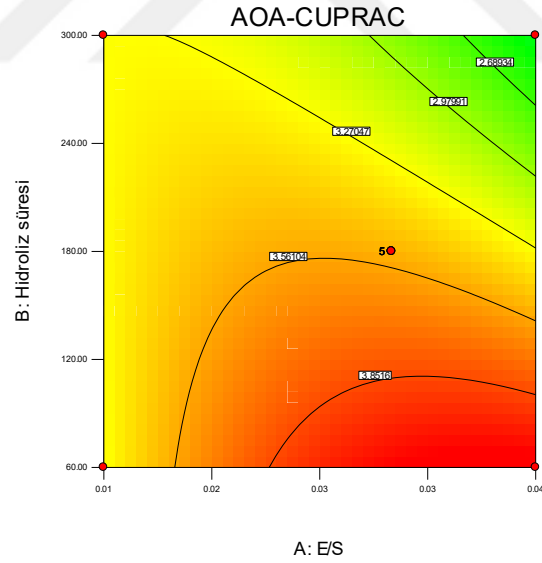
● Design Points

4.09443

0.797447

X1 = A: E/S

X2 = B: Hidroliz süresi



Şekil 4.10. *Sargassum vulgare* protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesi üzerine enzim/substrat oranı ve hidroliz süresinin etkisi.

Çizelge 4.10. *Sargassum vulgare* protein ekstraktlarının hidrolizinde ikinci dereceden polinomyal modelin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Kareler ortalaması	DF	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri
CUPRAC					
Model	3,60	5	0,72	0,78	0,5971
Lineer					
β_1	7,695E-005	1	7,695E-005	8,280E-005	0,9930
β_2	1,45	1	1,45	1,56	0,2521
Kuadratik					
β_{11}	0,71	1	0,71	0,77	0,4098
β_{22}	2,073E-003	1	2,073E-003	2,230E-003	0,9637
İnteraksiyon					
β_{12}	0,78	1	0,78	0,84	0,3886
Kalıntı	6,51	7	0,93	-	-
Modelin uyumsuzluğu	5,47	3	1,82	7,02	0,0451*
Saf hata	1,04	4	0,26	-	-
Cor total	10,11	12	-	-	-
R ² =0,36; C.V.(%)=28,96					

*İstatistiksel önem düzeyi: $p < 0.05$, β_1 : Enzim/substrat oranı, β_2 : Hidroliz süresi (dk).

4.3.1.4 Optimizasyon ve doğrulama

Optimum koşullar altında (hidroliz süresi: 300 dk ve E/S: 0,03), tahmin edilen HD (%), TFMM ve AOA_{CUPRAC} değerleri sırasıyla %30,08, 10,98 mg GAE/g ve 2,72 mg TE/g'dir (Desirability: 0,87). Optimum koşullarda hazırlanan hidrolizatların, deneysel değerler; HD (%) için %30,02, TFMM için 10,75 mg GAE/g km ve AOA_{CUPRAC} için 2,77 mg TE/g olarak bulunmuştur. Tahmin edilen ve deneysel değerlerin ortalaması %5 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak farklı değildir ($p > 0,05$).

4.3.2 Pepsin ve tripsin ile enzimatik hidroliz

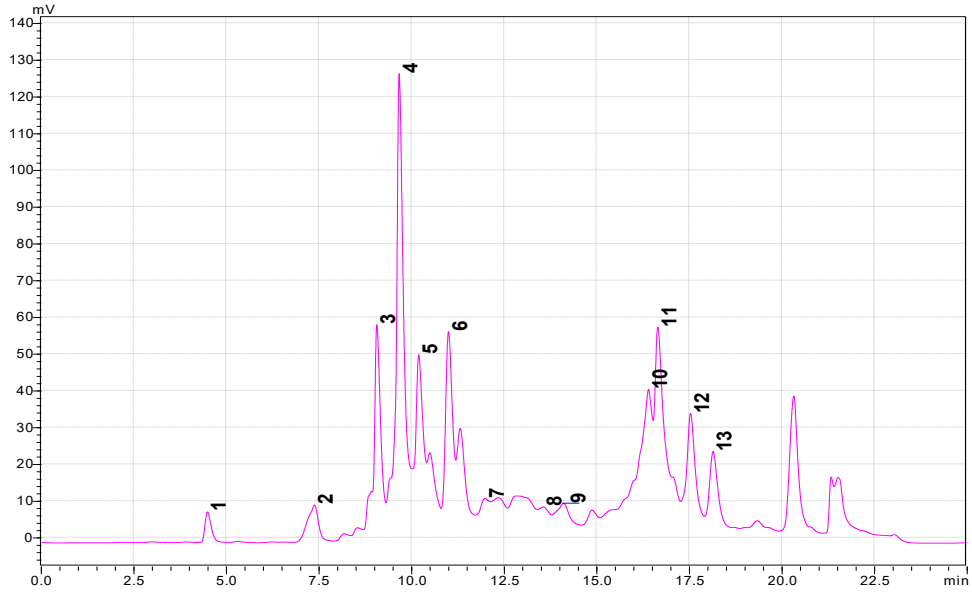
Tripsin enzimi ile gerçekleştirilen birinci hidroliz çalışmasında HD değeri düşük (%30,02) olduğundan pepsin ve tripsin enzimlerinin ardışık olarak kullanıldığı ikinci hidroliz çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu hidroliz çalışmasında, HD değeri %62,34±0,02 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde, Paiva vd. (2017), *Ulva rigida* c. agardh'ın bromelain ve pepsin kombinasyonu ile elde edilen hidrolizatların hidroliz derecesini %59,85±1,73 olarak belirlemiştir (Paiva vd., 2017). Hidrolizatların TFMM, AOA_{CUPRAC} ve AOA_{ABTS} sonuçları ise sırasıyla 15,68±1,22 mg GAE/g, 7,64±0,12 mg TE/g ve 7,53±0,11 mg TE/g'dir. *In vitro* sindirim çalışması için bu hidrolizatlar kullanılmıştır.

4.3.3 Hidrolizatların amino asit kompozisyonu

SV-PH’de bulunan amino asitler ve miktarları Çizelge 4.11’de verilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre SV-PH’de en yüksek oranda bulunan amino asit trozin amino asididir (Çizelge 4.11). Şekil 4.11’de SV-PH’nin amino asit kompozisyonuna ilişkin kromatogram verilmiştir. Yüksek oranda bulunan diğer amino asitlerin glutamik asit, glisin, lösin, lizin olduğu görülmektedir (Çizelge 4.11). Barbarino ve Lourenco (2005)’a göre, *Sargassum vulgare* lösin (%8,2), alanin (%6,8), glutamik asit (%17,4) ve aspartik asit (%10,6) amino asitlerini içermektedir. Ayrıca, temel aminoasitlerden metiyonini %1,7 düzeylerinde içermektedir (Barbarino ve Lourenco, 2005). Hidrolizatlarda bulunan amino asitlerin antioksidan aktiviteleri hakkında yapılmış çalışmalara bakıldığında; triptofan ve histidin amino asitleri yüksek antioksidan aktivite sergilerken, glisin ve alaninin zayıf antioksidan aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Je vd., 2005). Ayrıca, metionin ve sisteinin soya yağında antioksidan aktivite sergilediği ifade edilmiştir (Riisom vd., 1980). Uchida ve Kawakishi (1992), histidin içeren bir peptidin antioksidan aktivite sergilediğini, bunun da histidinin imidazol halkasının muhtemelen metal şelatlama ve lipid radikal yakalama kabiliyetine katkıda bulunmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.11. *Sargassum vulgare* protein hidrolizatlarının amino asit kompozisyonu.

No	Amino asit	µg/ml
1	Aspartik asit	5,10
2	Glutamik asit	12,16
3	Serine	10,26
4	Histidin	2,05
5	Glisin	12,30
6	Treonin	9,78
7	Arfinin	1,21
8	Alanin	3,64
9	Sistein	3,96
10	Valin	3,83
11	Metionin	3,12
12	Trozin	27,52
13	Fenilalanin	3,70
14	Izolösin	3,70
15	Lösin	16,43
16	Lizin	15,38
Toplam		134,15



Şekil 4.11. *Sargassum vulgare*'den protein hidrolizatlarının HPLC'de belirlenen amino asit kompozisyonu. 1: Aspartik asit, 2: Glutamik asit, 3: Serine, 4: Histidin, 5: Glisin, 6: Treonin, 7: Arfinin, 8: Alanin, 9: Sistein, 10: Valin, 11: Metiyonin, 12: Trozin, 13: Fenilalanin, 14: Izolösün, 15: Lösün ve 16: Lizin.

4.4 *In vitro* Sindirim

4.4.1 Protein miktarı ve *in vitro* protein sindirilebilirliğindeki değişim

Alg proteinlerinin insan mide-bağırsak koşullarında sindirilebilirliği, insan gıdası olarak kullanımları için oldukça önemlidir (Kazir vd., 2019). *In vitro* sindirimi gerçekleştirilen *S. vulgare* protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının protein miktarlarındaki ve % protein sindirilebilirliği (PS) değerlerindeki değişim Çizelge 4.12'de gösterilmiştir ve SV-PE hem de SV-PH'nin *in vitro* sindirim ile protein miktarındaki azalma istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$). %PS değerlerine bakıldığında, *in vitro* mide ve bağırsak sindirimi sırasında SV-PE'nin sırasıyla $90,94 \pm 0,51$ ve $88,36 \pm 0,95$ oranlarında sindirildiği görülmektedir (Çizelge 4.9). Protein hidrolizatlarının %PS ise *in vitro* mide ve bağırsak sindirimi sırasında sırasıyla $96,46 \pm 1,36$ ve $100 \pm 0,00$ olarak gerçekleşmiştir. *In vitro* sindirim, hem mide hem de bağırsak fazları sırasında alg proteinlerinin hidrolize uğradığını göstermiştir. Goni vd. (2002), çeşitli makroalglerin, %2 ila %24 arasında değişen önemli oranda sindirilemez protein içerdiğini göstermiştir. Bu bulgu, çalışmamızda elde ettiğimiz değerlere yakındır. Çalışmamızla uyumlu olarak, Kazir vd. (2019), *Ulva* sp. ve *Gracilaria* sp. proteinlerinin sırasıyla %89,4 ve %100'lük *in vitro* sindirim oranlarıyla bağırsak fazı sırasında oldukça sindirilebilir olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Niccolai vd. (2019), *Arthrospira platensis* ve *Chlorella vulgaris* için %protein sindirilebilirliği değerlerini sırasıyla %81 ve

%76 olarak bildirmişlerdir. Diğer taraftan, MişurCoVá vd. (2010)'un çalışmasında, *Saccharina japonica* makroalginin %60 *in vitro* protein sindirilebilirliği değeriyle düşük protein sindirilebilirliği sergilediğini ifade etmişlerdir. Marrion vd. (2005)'un çalışmasında, *Gracilariopsis longissima* makroalgi düşük (%30) *in vitro* protein sindirilebilirliği sergilemiştir. Düşük *in vitro* protein sindirilebilirliğinin, makroalg yapıda bulunan yüksek diyet lif içeriği nedeniyle *in vitro* sindirim sırasında proteolitik enzimlerin proteine erişiminin engellenmesinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (MişurCoVá vd., 2010, Marrion vd., 2005). İlave olarak, Fleurence vd. (1999) tarafından, yeşil bir deniz yosunu olan *Ulva armoricana*'da bulunan polisakkaritlerin ve fenolik bileşiklerin, proteinlerin *in vitro* sindirilebilirliğini etkileyebildiği ifade edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar SV-PE ve SV-PH'nin sindirim enzimleri tarafından iyi bir şekilde hidrolize edildiğini ve yüksek düzeyde sindirilebilirliği ile insan tüketimine uygun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.12. Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının *in vitro* mide-bağırsak sindirimi sırasında protein miktarındaki değişimi ve *in vitro* %protein sindirilebilirliği.

Örnek	<i>In vitro</i> sindirim öncesi PM, mg/g	<i>In vitro</i> mide sindirimi sonrası PM, mg/g	<i>In vitro</i> mide sindirimi sonrası %PS	<i>In vitro</i> bağırsak sindirimi sonrası PM, mg/g	<i>In vitro</i> bağırsak sindirimi sonrası %PS
SV-PE	245,30±0,67	20,04±0,82	90,94±0,51	25,75±1,05	88,36±0,95
SV-PH	137,86±5,16	4,88±0,51	96,46±1,36	0,00±0,00	100±0,00

SV-PE: *Sargassum vulgare*'dan protein ekstraktı. SV-PH: *Sargassum vulgare*'dan protein hidrolizatı. PM: Protein miktarı. PS: Protein sindirilebilirliği.

4.4.2 *In vitro* sindirim sırasında toplam fenolik madde miktarındaki değişim

Sargassum vulgare proteinlerinin ve protein hidrolizatlarının TFMM'deki değişimini araştırmak için *in vitro* mide-bağırsak sindirimi gerçekleştirilmiştir. SV-PE ve SV-PH'nin *in vitro* sindirim öncesi TFMM'ı sırasıyla 39,41±0,47 ve 15,68±1,22 mg GAE/g km'dir (Çizelge 4.13). *In vitro* mide-bağırsak sindiriminde SV-PE'nin TFMM'ı azalırken, SV-PH'nin artmıştır ($p<0,05$, Çizelge 4.13). Benzer olarak, Huang vd. (2021), yedi farklı makroalg *in vitro* mide sindiriminden sonra, özellikle *Sargassum thunbergia*'ın TFMM'da %174,44'lük bir artış kaydetmiştir. Diğer taraftan, Corona vd. (2017), *in vitro* sindirimden sonra kahverengi makroalg *Ascophyllum nodosum*'un TFMM'da %81,7'lik bir azalma kaydetmiştir. Bu bulguların algerde bulunan farklı polifenol türleri ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir. Ayrıca, pH, sıcaklık ve gıda matrisi dahil olmak üzere çeşitli faktörler bağırsakta fenolik bileşiklerin emilimini etkileyebilir (Fang ve Bhandari, 2010, Rein vd., 2013, Zhao vd., 2022). Diğer taraftan, makroalglerde bulunan proteinlerin fenolik maddelerle etkileşimi fenolik bileşiklerin emilimini engelleyebilmektedir. Bunun nedeni, polifenollerin, proteinlerdeki

amino veya sülfidril gruplar ile geri dönüşümsüz kovalent bağlar oluşturan kinonları oluşturmak için enzimatik olmayan reaksiyonlarda kolayca oksitlenmesidir. Bu durum, mide-bağırsak sistemdeki sindirim enzimlerinin polifenoller katabolize edememesine neden olmaktadır. Ayrıca, *in vitro* mide-bağırsak sindiriminde kullanılan enzimler proteinler üzerinde etkili olan proteaz enzimler olduğundan, polifenoller üzerindeki karboksil gruplar ayrıca sindirim enzimleri üzerindeki amino grupları ile kovalent olarak bağlanarak polifenollerin sindirimini ve emilimini daha da engelleyebilir. İlave olarak, proteinler ve polifenoller arasında insan vücudunda fenoliklerin emilimini engelleyen geri dönüşümlü kovalent olmayan bağlar da oluşabilir. Bu kovalent olmayan bağlar esas olarak hidrojen bağı, iyonik bağ ve hidrofobik etkileşimlerdir. Polifenol hidroksil grupları negatif, protein grupları pozitif yüklü olduğundan, proteinler ve polifenoller iyonik bağlar oluşturarak birbirlerine bağlanabilirler (Zhao vd., 2022).

Çizelge 4.13. Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının *in vitro* mide-bağırsak sindirimi sırasında toplam fenolik madde miktarındaki değişim.

Örnek	<i>In vitro</i> sindirim öncesi TFMM, mg GAE/g	<i>In vitro</i> mide sindirimi sonrası TFMM, mg GAE/g	<i>In vitro</i> bağırsak sindirimi sonrası TFMM, mg GAE/g
SV-PE	39,41±0,47a	16,30±2,86b	24,70±0,59b
SV-PH	15,68±1,22c	53,32±1,65b	68,61±1,31a

SV-PE: *Sargassum vulgare*'dan protein ekstraktı. SV-PH: *Sargassum vulgare*'dan protein hidrolizatı. TFMM: Toplam fenolik madde miktarı. Satırlarda bulunan a, b harfleri Tukey testi ile istatistiksel farklılığı ifade etmektedir (p<0,05).

4.4.3 *In vitro* sindirim sırasında antioksidan aktivitedeki değişim

In vitro sindirimden önce, amino asit kalıntılarının antioksidan aktivitesi, proteinin üçüncül yapısı içindeki erişilebilirlikleri ile sınırlıdır. Makroalglerin antioksidan aktivitesi, hem antioksidan özelliklere sahip amino asitlere hem de fenollere atfedilir. *In vitro* sindirimden önce, amino asit kalıntılarının antioksidan aktivitesi, proteinin üçüncül yapısı içindeki erişilebilirlikleri ile sınırlıdır. Antioksidan amino asitler enzimatik hidroliz işlemi sırasında daha fazla oksijene maruz kalırlar, bu da peroksil radikale hidrojen katma eğilimlerini artırabilir (Elias vd., 2008).

Çizelge 4.14'de görüldüğü gibi, SV-PE'nin *in vitro* sindirim ile TFMM'deki azalma ile uyumlu olarak AOA azalmıştır (p<0,05). Benzer şekilde, Huang vd. (2021), altı makroalgin AOA'sinin *in vitro* mide sindiriminden sonra belirgin şekilde azaldığını rapor etmişlerdir. Hem *in vitro* mide hem de bağırsak sindirimindeki bu düşüşler, pH ve gıda ve enzimlerdeki diğer bileşiklerin varlığı ile ilişkili olabilir ve polifenollerin kimyasında ve fiziksel durumunda geri dönüşümlü olmayan değişikliklere neden olabilir (Tomas vd., 2021). Ayrıca algal fenolik

bileşiklerin antioksidan aktivitesi ve stabilitesi alg tipi, sıcaklık ve diğer ekstraksiyon koşulları ile ilişkili olabilir (Garcia-Vaquero vd., 2021).

Diğer taraftan, SV-PH'nin *in vitro* sindirim ile TFMM artışı ile AOA artmıştır ($p<0,05$, Çizelge 4.14). Benzer şekilde, Chiang vd. (2013)'ün çalışmasında da hem TFMM hem de AOA *in vitro* sindirim sonrasında artış göstermiştir. Rodríguez-Roque vd. (2013)'nın çalışmasında, fenoliklerin gıda matrisinden *in vitro* sindirim sırasında salınımları arttığından, TFMM ve AOA'de artış meydana gelmiştir. Benzer şekilde, You vd. (2020)'nin çalışmasında, *Misgurnus anguillicaudatus*'dan protein hidrolizatlarının *in vitro* mide-bağırsak sindirim sırasında AOA'lerinde artış meydana belmiştir. *In vitro* bağırsak sindirimi sırasında pankreatin enzimi ile hidroliz derecesinin artması ve daha fazla serbest amino asitlerin açığa çıkması ile AOA'nin arttığı ifade edilmiştir. Ayrıca sindirim ile yüksek afiniteli metal bağlayıcı gruplar açığa çıkmıştır. Örneğin, imidazol ve karboksilik grupların Cu^{2+} ile elektrostatik ve iyonik etkileşimlerinin muhtemelen artması ile AOA'de artış kaydedilmiştir (You vd., 2010). Özellikle *in vitro* sindirim ile hidrofilik amino asitlerin açığa çıkmasının ABTS yöntemi ile tespit edilen AOA'de artışa neden olduğu rapor edilmiştir (You vd., 2010).

Çizelge 4.14. Protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının *in vitro* mide-bağırsak sindirimi sırasında antioksidan aktivitedeki değişim.

Örnek	<i>In vitro</i> sindirim öncesi	<i>In vitro</i> mide sindirimi sonrası	<i>In vitro</i> bağırsak sindirimi sonrası
AOA_{CUPRAC} (mg GAE/g)			
SV-PE	37,55±4,61a	6,43±0,08b	14,69±0,21b
SV-PH	7,53±0,11b	48,57±0,71a	30,65±6,95ab
AOA_{ABTS} (mg GAE/g)			
SV-PE	239,73±1,88a	59,43±3,20b	142,65±9,86a
SV-PH	7,64±0,12c	15,95±0,33b	22,46±0,47a

SV-PE: *Sargassum vulgare*'dan protein ekstraktı. SV-PH: *Sargassum vulgare*'dan protein hidrolizatı. AOA: Antioksidan aktivite. Satırlarda bulunan a, b, c harfleri Tukey testi ile istatistiksel farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında, *Sargassum vulgare*'den ultrases destekli enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen protein ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivitesi ve tekno-fonksiyonel özelliklerinin yanısıra, karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, *S. vulgare*'den protein ekstraktlarının su tutma kapasitesi, emülsifikasyon ve köpürme özelliklerinin diğer algal proteinler ile kıyaslandığında düşük olduğu görülmektedir. Diğer taraftan *S. vulgare* proteinlerinin iyi bir yağ tutma kapasitesi sergilediği tespit edilmiştir. Bu nedenle, *S. vulgare* proteinlerinin mayonez gibi ürünlerde kullanım potansiyeli bulunmaktadır.

S. vulgare proteinlerinin enzimatik hidrolizi ile hazırlanan protein hidrolizatlarının toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesinin yanısıra amino asit kompozisyonu araştırılmıştır. Hidrolizatların antioksidan aktivitesi, protein ekstraktlarının antioksidan aktivitesinden daha düşüktür. Diğer taraftan *in vitro* sindirim ile protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesi artarken, protein ekstraktlarının azalmıştır. Protein hidrolizatlarının *in vitro* mide ve bağırsak sindirim sırasında daha yüksek antioksidan aktivite sergilemesi, fonksiyonel gıda bileşeni olarak kullanım imkânına sahip olabileceğini göstermektedir. Ayrıca *S. vulgare* protein hidrolizatlarının histidin, treonin, valin, metionin, fenilalanin, izolösin, lösin ve lizin gibi esansiyel amino asitleri içerdiği tespit edilmiştir. İlave olarak, hem *S. vulgare* protein ekstraktları hem de protein hidrolizatları *in vitro* mide-bağırsak sindirim sırasında yüksek oranda protein sindirilebilirliği sergilemesi, bir gıda ya da fonksiyonel gıda bileşeni olarak tüketime uygun olabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, bir denizel kaynak olan makroalg *S. vulgare* protein ekstraktlarının ve protein hidrolizatlarının bir gıda ya da gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce, çeşitli gıda uygulamaları ile gıdanın duyusal özelliklerine etkisi araştırılmalıdır ve toksikolojik, ağır metal, pestisit kalıntısı gibi gıda güvenliği testlerinin yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz bulgular ile *S. vulgare*'den protein ekstraktlarının iyi düzeyde antioksidan aktivite ve yağ tutma kapasitesi sergilediğini, *S. vulgare*'den protein hidrolizatlarının ise düşük antioksidan aktiviteye sahip olmasına rağmen *in vitro* sindirim sırasında yüksek antioksidan aktivitesinin arttığı ve

hem *S. vulgare* protein ekstraktlarının hem de protein hidrolizatların neredeyse tamamen sindirilebildiği tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

- Aboul-enein, Y., Bunaciu, A. ve Fleschin, S., 2014. Evaluation of the protein secondary structures using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Gazi University Journal of Science, 27,1, 637-644.
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A. ve Serna-Saldívar, S. O., 2014. Bound phenolics in foods, a review, Food Chemistry, 152, 46-55.
- Akıncı, M., 2022. Mezbaha atıklarının akciğer dokularından kimyasal ve enzimatik yöntemlerle protein hidrolizat üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- 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.
- Aras, A., 2020. Denizel makroalg, *Ulva intestinalis* (Chlorophyta), *Ellisolandia elongata* (Rhodophyta), *Dictyota dichotoma* ve *Sargassum vulgare* (Pheophyta)'nin lipid içeriği ve antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi Yüksek Lisans Tezi, İskenderun Teknik Üniversitesi Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
- 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, 447-460.
- Barclay, L. R. C. ve Vinqvist, M. R., 2003. Phenols as antioxidants, The Chemistry of Phenols, 839-908.
- Barka, A. ve Blecker, C., 2016. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review, Base.
- Baş Yıldırım, H., 2022. *Laurencia pyramidalis* makroalginden proteinlerin ekstraksiyon koşullarının yanıt yüzey metodolojisi ile optimizasyonu: Ekstraktların biyoaktif ve tekno fonksiyonel potansiyelinin araştırılması ve karakterizasyon çalışmaları, Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray.
- Belluco, S., Halloran, A. ve Ricci, A., 2017. New protein sources and food legislation: the case of edible insects and EU law, Food Security, 9, 4, 803-814.
- Bleakley, S. ve Hayes, M., 2017. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production, Foods, 6, 5, 33.
- Boland, M. J., Rae, A. N., Vereijken, J. M., Meuwissen, M. P., Fischer, A. R., van Boekel, M. A., Rutherford, S. M., Gruppen, H., Moughan, P. J. ve Hendriks, W. H., 2013. The future supply of animal-derived protein for human consumption, Trends in Food Science & Technology, 29, 1, 62-73.

- Bozdemir, A., Şensu, E., Okudan, E. Ş., Özçelik, B. ve Yüçetepe, A., 2022. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of proteins from *Gracilaria dura*: Investigation of antioxidant activity and techno functional properties, *Journal of Food Processing and Preservation*, 46, 8, e16803.
- Cabrita, A. R., Maia, M. R., Sousa-Pinto, I. ve Fonseca, A. J., 2017. Ensilage of seaweeds from an integrated multi-trophic aquaculture system, *Algal Research*, 24, 290-298.
- Caf, F., 2015. Ekonomik değeri olan bazı alg türlerinden elde edilen ekstraktların biyokimyasal analizi ve *Saccharomyces cerevisiae* kültüründe besinsel değerinin ölçülmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- 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.
- Chan, P. T. ve Matanjun, P., 2017. Chemical composition and physicochemical properties of tropical red seaweed, *Gracilaria changii*, *Food Chemistry*, 221, 302-310.
- Chandi, G. K. ve Sogi, D. S., 2007. Functional properties of rice bran protein concentrates, *Journal of Food Engineering*, 79, 2, 592-597.
- 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.
- Chiang, C. J., Kadouh, H. ve Zhou, K., 2013. Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by *in vitro* digestion, *LWT-Food Science and Technology*, 51, 2, 417-422.
- Chopin, T. ve Tacon, A. G., 2021. Importance of seaweeds and extractive species in global aquaculture production, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29, 2, 139-148.
- Circuncisão, A. R., Catarino, M. D., Cardoso, S. M. ve Silva, A. M., 2018. Minerals from macroalgae origin: Health benefits and risks for consumers. *Marine drugs*, 16, 11, 400.
- Corona, G., Coman, M. M., Guo, Y., Hotchkiss, S., Gill, C., Yaqoob, P., Spencer, J. P. E. ve Rowland, I., 2017. Effect of simulated gastrointestinal digestion and fermentation on polyphenolic content and bioactivity of brown seaweed phlorotannin-rich extracts, *Molecular Nutrition & Food Research*, 61, 11, 1700223.
- Dikmen, S., Yilmaz, G., Yorukogullari, E. ve Korkmaz, E., 2012. Zeta potential study of natural-and acid-activated sepiolites in electrolyte solutions, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 90, 3, 785-792.
- El Nasri, N. A. ve El Tinay, A. H., 2007. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. *Food chemistry*, 103, 2, 582-589.

- 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.
- Fang, Z. ve Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols—a review, *Trends in food science & technology*, 21, 10, 510-523.
- FAO, I., 2016. The State of Food Insecurity in the World 2015, Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress, Food and Agriculture Organization Publications, Roma, Italya.
- FAO., 2020. FishStatJ, a tool for fishery statistics analysis. Release: 4.00.10. Universal Software for Fishery Statistical Time Series. Global aquaculture production: Quantity 1950-2018; Value 1950-2018; Global capture production, Rome (Italy).
- Field, L.M., Fagerberg, W. Y., Gatto, K. K. ve Böttger, S. A., 2017. A comparison of protein extraction methods optimizing high protein yields from marine algae and cyanobacteria, *Journal of Applied Phycology*, 29, 3, 1271-1278.
- Figueroa, V., Farfán, M. ve Aguilera, J. M., 2021. Seaweeds as novel foods and source of culinary flavors, *Food Reviews International*, 1-26.
- Fitzgerald, C., Gallagher, E., Tasdemir, D. ve Hayes, M., 2011. Heart health peptides from macroalgae and their potential use in functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 13, 6829-6836.
- Fleurence, J., Chenard, E. ve Luçon, M., 1999. Determination of the nutritional value of proteins obtained from *Ulva armoricana*, *Journal of Applied Phycology*, 11, 231-239.
- García-Vaquero, M. ve Hayes, M., 2016. Red and green macroalgae for fish and animal feed and human functional food development, *Food Reviews International*, 32, 1, 15-45.
- Garcia-Vaquero, M., Rajauria, G., Miranda, M., Sweeney, T., Lopez-Alonso, M. ve O'Doherty, J., 2021. Seasonal variation of the proximate composition, mineral content, fatty acid profiles and other phytochemical constituents of selected brown macroalgae, *Marine Drugs*, 19, 4, 204.
- Goñi, I., Valdivieso, L. ve Gudiel-Urbano, M., 2002. Capacity of edible seaweeds to modify *in vitro* starch digestibility of wheat bread, *Food/Nahrung*, 46, 1, 18-20.
- Gressler, V., Yokoya, N. S., Fujii, M. T., Colepicolo, P., Mancini Filho, 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.
- Grover, Z. ve Ee, L. C., 2009. Protein energy malnutrition, *Pediatric Clinics*, 56, 5, 1055-1068.
- Gundogan, R. ve Karaca, A. C., 2020. Physicochemical and functional properties of proteins isolated from local beans of Turkey, *LWT*, 130, 109609.

- Hao, G., Cao, W., Li, T., Chen, H., Zhang, J., Weng, W., Kazufumi, O. ve Ren, H., 2019. Effect of temperature on chemical properties and antioxidant activities of abalone viscera subcritical water extract, *The Journal of Supercritical Fluids*, 147, 17-23.
- Hamedy, P. A. ve Fitzgerald, R. J., 2013. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*, *LWT-Food Science and Technology*, 51, 1, 375-382.
- Huang, Z., Chen, Q., Hu, K., Zhang, R., Yuan, Y., He, S., Zeng, Q. ve Su, D., 2021. Effects of in vitro simulated digestion on the free and bound phenolic content and antioxidant activity of seven species of seaweeds, *International Journal of Food Science & Technology*, 56, 5, 2365-2374.
- 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.
- Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G. ve Badanjak, M., 2009. Physical properties of ultrasound treated soy proteins, *Journal of Food Engineering*, 93, 4, 386-393.
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han, J. ve Chen, L., 2014. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality, *LWT-Food Science and Technology*, 57, 2, 461-469.
- Je, J. Y., Kim, S. Y. ve Kim, S. K., 2005. Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes, *European Food Research and Technology*, 221, 157-162.
- Jiang, J., Oberdörster, G. ve Biswas, P., 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 77-89.
- Jong, L. W., Thien, V. Y., Yong, Y. S., Rodrigues, K. F. ve Yong, W. T. L., 2015. Micropropagation and protein profile analysis by SDS-PAGE of *Gracilaria changii* (*Rhodophyta, Solieriaceae*), *Aquaculture Reports*, 1, 10-14.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C. ve O'Donnell, C. P., 2015. Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides, *Trends in Food Science & Technology*, 46, 1, 60-67.
- Kandasamy, G., Karuppiyah, S. K. ve Rao, P. V. S., 2012. Salt-and pH-induced functional changes in protein concentrate of edible green seaweed *Enteromorpha* species, *Fisheries Science*, 78, 1, 169-176.
- Karkhane, M., Lashgarian, H. E., Mirzaei, S. Z., Ghaffarizadeh, A., Sepahvand, A. ve Marzban, A., 2020. Antifungal, antioxidant and photocatalytic activities of zinc nanoparticles synthesized by *Sargassum vulgare* extract, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101791.
- Kartal, C., Bakar, B., Türköz, B. K. ve Ötleş, S., 2023. Gıda kaynaklı protein ve biyoaktif peptit eldesi, saflaştırılması ve karakterizasyonunda kullanılan güncel yöntemler ve biyoinformatik yaklaşımlar Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 12, 2, 1-1.

- 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.
- Khaled, N., Hiba, M. ve Asma, C., 2012. Antioxidant and antifungal activities of *Padina pavonica* and *Sargassum vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast, *Advances in Environmental Biology*, 6, 1, 42-48.
- Konda, N. M., Singh, S., Simmons, B. A. ve Klein-Marcuschamer, D., 2015. An investigation on the economic feasibility of macroalgae as a potential feedstock for biorefineries, *BioEnergy Research*, 8, 3, 1046-1056.
- Korkmaz, E., 2015. Eskişehir yöresi sepiyoliti'nin zeta potansiyelinin tayini, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kristinsson, H. G. ve Rasco, B. A., 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties, *Critical reviews in food science and nutrition*, 40, 1, 43-81.
- Kumar, K. S., Ganesan, K., Selvaraj, K. ve Rao, P. 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, 102114.
- Kumaran, A., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*, *Food Chemistry*, 97, 1, 109-114.
- Kurt, O., Ozden, T. Y., Ozsoy, N., Tunali, S., Can, A., Akev, N. ve Yanardag, R., 2011. Influence of vanadium supplementation on oxidative stress factors in the muscle of STZ-diabetic rats. *Biometals*, 24, 943-949.
- Liadakis, G. N., Tzia, C., Oreopoulou, V. ve Thomopoulos, C. D., 1995. Protein isolation from tomato seed meal, extraction optimization, *Journal of Food Science*, 60, 3, 477-482.
- 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, 265-275.
- Mæhre, H. K., Malde, M. K., Eilertsen, K. E. ve Elvevoll, E. O., 2014. Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 15, 3281-3290.
- Makri, E. A. ve Doxastakis, G. I., 2006. Emulsifying and foaming properties of *Phaseolus vulgaris* and coccineus proteins, *Food Chemistry*, 98, 3, 558-568.

- Makri, E., Papalamprou, E. ve Doxastakis, G., 2005. Study of functional properties of seed storage proteins from indigenous European legume crops (lupin, pea, broad bean) in admixture with polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, 19, 3, 583-594.
- Marrion, O., Fleurence, J., Schwertz, A., Guéant, J. L., Mamelouk, L., Ksouri, J. ve Villaume, C., 2005. Evaluation of protein *in vitro* digestibility of *Palmaria palmata* and *Gracilaria verrucosa*, *Journal of Applied Phycology*, 17, 99-102.
- Minekus, M., Marie, A., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Brodtkorb, A., 2014. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus, *Food & function*, 5, 6, 1113-1124.
- MišurCoVá, L., KráčMar, S., KLeJduS, B. ve VaCeK, J., 2010. Nitrogen content, dietary fiber, and digestibility in algal food products, *Czech Journal of Food Sciences*, 28, 1, 27-35.
- 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.
- Mohd Rosni, S., Fisal, A., Azwan, A., Chye, F. Y. ve Matanjun, P., 2015. Crude proteins, total soluble proteins, total phenolic contents and SDS-PAGE profile of fifteen varieties of seaweed from Semporna, Sabah, Malaysia, *International Food Research Journal*, 22, 4.
- Moorthy, I. G., Maran, J. P., Muneeswari, S., Naganyashree, S. ve Shivamathi, C. S., 2015. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1323-1328.
- Morr, C., German, B., Kinsella, J., Regenstein, J., Buren, J. V., Kilara, A., Levis, B. A., Mangino, M., 1985. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure, *Journal of Food Science*, 50, 6, 1715-1718.
- Muslu, M. ve Gökçay, G. F., 2020. Sağlığın desteklenmesi ve sürdürülebilir beslenme için alternatif bir kaynak: Alg (yosunlar), *Bandırma Onyedil Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri ve Araştırmaları Dergisi*, 2, 3, 221-237.
- Niccolai, A., Zittelli, G. C., Rodolfi, L., Biondi, N. ve Tredici, M. R., 2019. Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility, *Algal Research*, 42, 101617.
- Nursid, M., Khatulistiani, T. S., Noviendri, D., Hapsari, F. ve Hardiyati, T., 2020. Total phenolic content, antioxidant activity and tyrosinase inhibitor from marine red algae extract collected from Kupang, East Nusa Tenggara, In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 493, 1, 012013.
- Øverland, M., Mydland, L. T. 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.

- Ozgun, S. ve Turan, F., 2015. Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey, *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 21, 2, 125-134.
- Paiva, L., Lima, E., Neto, A. I., Marcone, M. ve Baptista, J., 2017. Nutritional and functional bioactivity value of selected Azorean macroalgae: *Ulva compressa*, *Ulva rigida*, *Gelidium microdon*, and *Pterocladia capillacea*, *Journal of Food Science*, 82, 7, 1757-1764.
- Pan, S., Wang, S., Jing, L. ve Yao, D., 2016. Purification and characterisation of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory peptide derived from the enzymatic hydrolysate of *Enteromorpha clathrata* protein, *Food Chemistry*, 211, 423-430.
- Peng, W., Escobar, I. C. ve White, D. B., 2004. Effects of water chemistries and properties of membrane on the performance and fouling—a model development study, *Journal of membrane science*, 238, 1-2, 33-46.
- Perumal, B., Chitra, R., Maruthupandian, A. ve Viji, M., 2019. Nutritional assessment and bioactive potential of *Sargassum polycystum c. agardh* (Brown Seaweed).
- Pistorius, A. M., DeGrip, W. J. ve Egorova-Zachernyuk, T. A., 2009. Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy, *Biotechnology and bioengineering*, 103, 1, 123-129.
- Ramakrishnan, V. V., Ghaly, A. E., Brooks, M. S. ve Budge, S. M., 2013. Extraction of oil from mackerel fish processing waste using alcalase enzyme, *Enzyme Engineering*, 2, 2, 1-10.
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K. ve da Silva Pinto, M., 2013. Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy, *British journal of clinical pharmacology*, 75, 3, 588-602.
- Rice-Evans, C., Miller, N. ve Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2, 4, 152-159.
- Riisom, T., Sims, R. J. ve Fioriti, J. A., 1980. Effect of amino acids on the autoxidation of safflower oil in emulsions, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57, 10, 354-359.
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P. ve Martín-Belloso, O., 2013. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion, *Food Chemistry*, 136, 1, 206-212.
- Rouxel, C., Bonnabeze, E., Daniel, A., Jérôme, M., Etienne, M. ve Fleurence, J., 2001. Identification by SDS PAGE of green seaweeds (*Ulva* and *Enteromorpha*) used in the food industry, *Journal of Applied Phycology*, 13, 3, 215-218.

- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, M. I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L. ve Tijburg, L., 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds, *European Food Research and Technology*, 212, 319-328.
- Sevgili, S. Ş., 2019. Doğal katkı maddelerinin bitkisel yağların stabilitelerine etkileri, *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 34, 1, 61-68.
- Somanah, M. J., Abdoulraman, N., Bhagooli, R., Bahorun, T. ve Aruoma, O. I., 2012. Assessment of phenol content and antioxidant activities of shallow-water macroalgae from Mauritius, *Univ Mau Research vJ. A*, 18, 28-53.
- Şengül, M. ve Topbaş, E. F., 2019. Katı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılan modern teknikler ve bu teknikler arasında ultrason yardımlı ekstraksiyonun yeri, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50, 2, 201-216.
- 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.
- Tang, C. H. ve Sun, X., 2011. A comparative study of physicochemical and conformational properties in three vicilins from *Phaseolus* legumes: Implications for the structure–function relationship, *Food Hydrocolloids*, 25, 3, 315-324.
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E. ve Lall, S. P., 2016. Nutritional quality of some wild and cultivated seaweeds: Nutrient composition, total phenolic content and in vitro digestibility, *Journal of Applied Phycology*, 28, 6, 3575-3585.
- Tierney, M. S., Croft, A. K. ve Hayes, M., 2010. A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae, *Botanica Marina*, 53, 5, 387-408.
- Tomas, M., Zhang, L., Zengin, G., Rocchetti, G., Capanoglu, E. ve Lucini, L., 2021. Metabolomic insight into the profile, *in vitro* bioaccessibility and bioactive properties of polyphenols and glucosinolates from four Brassicaceae microgreens *Food Research International*, 140, 110039.
- Toor, R. K. ve Savage, G. P., 2006. Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes, *Food Chemistry*, 94, 1, 90-97.
- 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, 1-9.
- Uchida, K. ve Kawakishi, S., 1992. Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper (II)/ascorbate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1, 13-16.

- 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.
- Vásquez-Suárez, A., Lobos-González, F., Cronshaw, A., Sepúlveda-Ugarte, J., Figueroa, M., Dagnino-Leone, J., Bunster, M. ve Martínez-Oyanedel, J., 2018. The $\gamma 33$ subunit of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis* has a typical double linked phycourobilin similar to γ subunit, *PloS one*, 13, 4, e0195656.
- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V. ve Peričin, D., 2010. Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time, *Food and bioproducts processing*, 88, 2, 277-282.
- Verbeke, W., Marcu, A., Rutsaert, P., Gaspar, R., Seibt, B., Fletcher, D. ve Barnett, J., 2015. Would you eat cultured meat?: Consumers' reactions and attitude formation in Belgium, Portugal and the United Kingdom, *Meat science*, 102, 49-58.
- Waghmare, A. G., Salve, M. K., LeBlanc, J. G. ve Arya, S. S., 2016. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*, *Bioresources and Bioprocessing*, 3, 1, 1-11.
- Wei, X., Ma, X., Peng, X., Yao, Z., Yang, F. ve Dai, M., 2018. Comparative investigation between co-pyrolysis characteristics of protein and carbohydrate by TG-FTIR and Py-GC/MS, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 135, 209-218.
- Wu, C., Wang, L., Li, H. ve Yu, S., 2019. Analyzing 2-acetyl-4 (5)-(1, 2, 3, 4-tetrahydroxybutyl)-imidazole in beverages by dispersive micro-solid phase extraction using polymer cation exchange sorbent followed by ion chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Food Chemistry*, 292, 260-266.
- Yalçın, E. ve Rakıcioğlu, N., 2020. Biyoaktif besin peptitleri ve sağlık üzerine etkileri, *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10, 2, 241-246.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M. ve Ren, J., 2010. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion, *Food Chemistry*, 120, 3, 810-816.
- Yuan, Y., Zhang, J., Fan, J., Clark, J., Shen, P., Li, Y. ve Zhang, C., 2018. Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four economic brown macroalgae species and evaluation of their antioxidant activities and inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase and tyrosinase *Food Research International*, 113, 288-297.
- Yucetepe, A., Okudan, E. Ş. ve Özçelik, B., 2022. Antioxidant activity and techno-functional properties of protein extracts from *Caulerpa prolifera*: Optimization of enzyme-assisted extraction by response surface methodology. *Journal of Food & Nutrition Research*, 61, 3.

- Zayas, J. F. ve Zayas, J. F., 1997. Solubility of proteins. Functionality of proteins in food, 6-75.
- Zhao, W., Subbiah, V., Xie, C., Yang, Z., Shi, L., Barrow, C., Dunsheaa, F. ve Suleria, H. A., 2022. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in seaweed, Food Reviews International, 1-32.
- Zheng, J. X., Yin, H., Shen, C. C., Zhang, L., Ren, D. F. ve Lu, J., 2020. Functional and structural properties of spirulina phycocyanin modified by ultra-high-pressure composite glycation, Food Chemistry, 306, 125615.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Hatice DİNÇ

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Bayburt Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2013-2016

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, 2021-2024

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Aksaray Erkek Yurt Müdürlüğü, 2017-devam

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Dinç, H. 2022. Yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak *Sargassum vulgare* proteininin enzimatik hidroliz derecesinin optimizasyonu, Gıda Kimyası Kongresi 3-6 Mart, Antalya