

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
2018-YL-036**



**SUSAM KEPEĞİNDEN PROTEİN
ÖZÜTLENMESİNDE ENZİMİN VE ULTRASES
İŞLEMİNİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ahmet GÖRGÜÇ

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Cavit BİRCAN
Dr. Öğr. Üyesi Fatih Mehmet YILMAZ**

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ahmet GÖRGÜÇ tarafından hazırlanan “Susam Kepeğinden Protein Özütlemeinde Enzimin ve Ultrases İşleminin Etkilerinin Belirlenmesi” başlıklı tez, 15.08.2018 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Cavit BİRCAN	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Fatih Mehmet YILMAZ	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN	Harran Üniversitesi	
Üye : Doç. Dr. Aslı YORULMAZ	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Selda BULCA	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

15/08/2018

Ahmet GÖRGÜÇ

ÖZET

SUSAM KEPEĞİNDEN PROTEİN ÖZÜTLENMESİNDE ENZİMİN VE ULTRASES İŞLEMİNİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Ahmet GÖRGÜÇ

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cavit BİRCAN, Dr. Öğr. Üyesi Fatih Mehmet YILMAZ

2018, 104 sayfa

Bu tez çalışması kapsamında, bir gıda atığı olan susam kepeğinden protein özütlenmesinde iki farklı enzimin (viskozim L ve alkalaz), ultrases işleminin ve enzim ile ultrases kombine işleminin etkileri belirlenmiştir. Her bir işlem, protein verimi, toplam fenolik madde miktarı ve iki farklı antioksidan kapasite sonuçları ele alınarak değerlendirilmiştir. Optimum işlem parametreleri viskozim L için %0,58 enzim, 6,0 pH, 51 °C, 117 dk.; alkalaz için %0,52 enzim, 9,8 pH, 51 °C, 68 dk.; ultrases için 630 W güç, 54 °C, 86 dk.; kombine işlem için ise %0,62 enzim, 836 W güç, 43 °C ve 98 dk. olarak belirlenmiştir. İşlemler sonucu, viskozim L ile %44,8, alkalaz ile %78,9 ve ultrases ile %61,7 protein verimine ulaşılmıştır. En yüksek protein verimi ise kombine işlemde (%88,8) elde edilmiştir. Alkalaz ile özütleme işleminde elde edilen özütte 9 kDa'un üzerinde protein varlığı gözlenmemiştir. Uygulanan özütleme işlemlerinin susam kepeğinin hücresel yapısını etkilediği görülmüş; hücresel boyutta en fazla deformasyonun ise kombine işlem sonucu elde edilen susam kepeğinde gerçekleştiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, çalışmalarda kullanılan özütleme yöntemlerinin susam kepeğinden protein özütlemeye standart alkali özütleme yöntemine (%24,5) kıyasla çok daha etkili oldukları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Susam, Gıda yan ürünü, Protein, Özütleme, Enzimatik özütleme, Alkalaz, Viskozim L, Ultrases, Fenolik madde

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF ENZYME AND ULTRASOUND TREATMENT ON THE EXTRACTION OF PROTEIN FROM SESAME BRAN

Ahmet GÖRGÜÇ

Master of Science Thesis, Food Engineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Cavit BİRCAN, Assist. Prof. Dr. Fatih Mehmet YILMAZ

2018, 104 pages

In this thesis study, the effects of two different enzymes (viscozyme L and alcalase), ultrasound process and enzyme and ultrasound combination on the protein extraction from sesame bran -which is a food waste- have been determined. Each treatment was evaluated by considering the protein yield, total amount of phenolic compounds and the two different antioxidant capacity results. Optimum processing parameters were 0.58% enzyme, 6.0 pH, 51 °C, 117 min for viscozyme L; 0,52% enzyme, 9,8 pH, 51 °C, 68 min for alcalase; 630 W, 54 °C, 86 min for ultrasound; 0.62% enzyme, 836 W power, 43 °C and 98 min for the combined treatment. The obtained protein yield results were 44.8% with viscozyme L, 78.9% with alcalase and 61.7% with ultrasound. The highest protein yield was obtained in the combined treatment (88.8%). There was no protein presence over 9 kDa in the extract obtained by the extraction with alcalase. It was observed that the applied extraction processes affected the cellular structure of sesame bran; the maximum deformation in the cellular structure was observed in the sesame bran obtained with combined treatment. As a result, it was determined that the extraction methods used in the study were highly effective than standard alkaline extraction method (24.5%) on the protein extraction from sesame bran.

Keywords: Sesame, Food by-product, Protein, Extraction, Enzymatic extraction, Alcalase, Viscozyme L, Ultrasound, Phenolic compound

ÖNSÖZ

Tezin yürütülmesi esnasında her konuda destek olan sayın danışman hocalarım Prof. Dr. Cavit BİRCAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Fatih Mehmet YILMAZ'a teşekkür ederim.

Değerli zamanlarını ayırıp tezimi değerlendiren, tez savunma jüri üyesi hocalarım Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN, Doç. Dr. Aslı YORULMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Selda BULCA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalar esnasında her aşamada yardımlarını esirgemeyen Özge UYGUN, Pınar ÖZER, Öğr. Gör. Mehmet ÇELEBİ ve Öğr. Gör. Mustafa DURAN'a; SDS-PAGE analizleri esnasında yardımcı olan Öğr. Gör. Mürüvvet ABBAK'a teşekkür ederim.

Tez çalışması için maddi destek sağlayan TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı (Proje No: 217O066) ve Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine (Proje No: MF17020); çalışmalarda kullanılan hammadde teminini sağlayan Çelikler Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti. (Gaziantep, Türkiye)'den üretim müdürü Mehmet Ali ÇELİK'e teşekkür ederim.

Son olarak, ömür boyu desteklerini ve sevgilerini tüm kalbimle hissettiğim canım aileme; annem Selma GÖRGÜÇ, babam Mehmet Kadri GÖRGÜÇ ve kız kardeşim Leyla GÖRGÜÇ'e teşekkürü borç bilirim.

Ahmet GÖRGÜÇ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxii
EKLER DİZİNİ.....	xxiii
1 . GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Susam Bitkisi.....	3
2.1.1. Susam Üretimi.....	4
2.1.2. Susamın Besin Bileşimi.....	6
2.1.3. Susamın Kullanım Alanları.....	8
2.1.4. Susam Kepeği.....	9
2.2. Bitkisel Protein Kaynakları.....	10
2.2.1. Susam Proteinleri.....	13
2.2.2. Gıda Atıklarından Bitkisel Protein Üretimi.....	15
2.3. Protein Özütleme Verimini Artırmak İçin Kullanılan Yöntemler.....	16

2.3.1. Ultrases Destekli Özütleme.....	18
2.3.2. Enzimatik Özütleme.....	18
3 . MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal.....	21
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Susam Kepeğine Uygulanan Ön İşlemler.....	22
3.2.2. Susam Kepeğine Uygulanan Analizler.....	23
3.2.3. Susam Kepeğinden Fenolik Madde Özütleme İşlemleri.....	23
3.2.4. Susam Kepeğinden Bitkisel Protein Özütleme Çalışmaları.....	24
3.2.4.1. Alkali yöntem ile özütleme.....	24
3.2.4.2. Enzimatik özütleme.....	25
3.2.4.3. Ultrases destekli özütleme.....	27
3.2.4.4. Enzim + ultrases destekli özütleme.....	28
3.2.5. Protein Özütlerine Uygulanan Analizler.....	29
3.2.5.1. % protein verimi.....	29
3.2.5.1.1. Alkali ve ultrases destekli özütlerin % protein verimi.....	30
3.2.5.1.2. Viskozim L, alkalaz ve enzim + ultrases destekli özütlerin % protein verimi.....	30
3.2.6. Optimum Koşullarda Elde Edilen Protein Özütlerine Uygulanan Analizler.....	31
3.2.7. Analizler.....	31

3.2.7.1. Toplam kuru madde miktarı.....	31
3.2.7.2. Toplam mineral madde miktarı.....	31
3.2.7.3. Toplam protein miktarı.....	32
3.2.7.4. Toplam fenolik madde miktarı.....	34
3.2.7.5. Antioksidan kapasite.....	34
3.2.7.5.1. DPPH yöntemi ile antioksidan kapasite.....	35
3.2.7.5.2. ABTS yöntemi ile antioksidan kapasite.....	35
3.2.7.6. SDS-PAGE ile protein fraksiyonu.....	36
3.2.7.7. SEM ile hücre yapısının görüntülenmesi.....	37
3.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiki Analizler.....	38
4 . BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1. Özütleme İşlemlerinde Kullanılan Susam Kepeğinin Analizleri.....	39
4.2. Alkali Yöntem ile Elde Edilen Özüte Ait Analiz Sonuçları.....	40
4.3. Susam Kepeğinden Protein Özütlemeye İşlem Parametrelerinin Etkilerinin Belirlenmesi ve Optimizasyon Çalışmaları.....	41
4.3.1. Viskozim L ile Enzimatik Özütlemeye İşlem Parametrelerinin Etkisi.....	42
4.3.1.1. Viskozim L ile enzimatik özütlemeye ait işlem koşullarının optimizasyonu.....	53
4.3.2. Alkalaz ile Enzimatik Özütlemeye İşlem Parametrelerinin Etkisi.....	53
4.3.2.1. Alkalaz ile enzimatik özütlemeye ait işlem koşullarının optimizasyonu.....	63
4.3.3. Ultrases Destekli Özütlemeye İşlem Parametrelerinin Etkisi.....	63

4.3.3.1. Ultrases destekli özütlemeye ait işlem koşullarının optimizasyonu.....	71
4.3.4. Enzim ile Ultrases Kombine Özütlemeye İlişkin İşlem Parametrelerinin Etkisi....	72
4.3.4.1. Enzim ile ultrases kombine özütlemeye ait işlem koşullarının optimizasyonu.....	81
4.4. Optimum İşlem Koşullarında Üretilen Özütlere Uygulanan Analizler.....	81
4.4.1. SDS-PAGE ile Protein Fraksiyonu.....	82
4.4.2. SEM ile Hücresel Yapının Görüntülenmesi.....	83
5 . SONUÇ	86
KAYNAKÇA	88
EKLER.....	100
ÖZGEÇMİŞ.....	103

KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ANOVA	: Varyans analizi
AOAC	: Resmi analitik kimyagerler derneği
APS	: Amonyum persülfat
CCD	: Merkezi tümleşik dizayn
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
dk.	: Dakika
FAOSTAT	: Birleşmiş milletler gıda ve tarım örgütü istatistikleri
FBG	: Fungal beta glukanaz
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
KAE	: Kafeik asit eşdeğeri
kb	: Kuru ağırlık üzerinden
KM	: Kuru madde
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
N	: Normalite cinsinden konsantrasyon
<i>P</i>	: İstatistiki anlamlılık seviyesi
PBS	: Tuzlu fosfat tamponu
PEF	: Vurgulu elektrik alan

R^2	: Uyum katsayısı
rpm	: Dakikadaki tur sayısı
RSM	: Yanıt yüzey yöntemi
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SFE	: Süperkritik sıvı ekstraksiyonu
TE	: Troloks eşdeğeri
TEAK	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TFM	: Toplam fenolik madde
UV-VIS	: Mor ötesi-görünür ışık
v	: Hacim
Y	: Bağımlı değişken
β	: Regresyon katsayısı
w	: Ağırlık
W	: Watt
X_i	: Bağımsız değişken (i 'ye bağlı)
X_j	: Bağımsız değişken (j 'ye bağlı)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Susam bitkisi ve tohumları.....	4
Şekil 2.2. Dünya genelinde yıllara bağlı susam ekim alanı ve toplam susam üretimi.....	5
Şekil 3.1. Çalışmalarda kullanılan kurutulmuş ve öğütülmüş susam kepeği.....	23
Şekil 3.2. Çalkalamalı su banyosunda fenolik madde özütleme işlemi.....	24
Şekil 3.3. Alkali ve asidik pH değerlerine sahip özütlerin genel görünümü.....	26
Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan ultrases cihazı.....	27
Şekil 3.5. (a) Kjeldahl yakma ünitesi içerisinde yer alan örnekler; (b) Kjeldahl yöntemi için distilasyon aşaması.....	33
Şekil 3.6. Titrasyon işlemi öncesi ve sonrasında örneklerin genel görünümü.....	33
Şekil 3.7. Örneklerdeki proteinlerin elektroforez sisteminde yürütülmesi.....	37
Şekil 4.1. Viskozim L ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri.....	49
Şekil 4.2. Viskozim L ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TFM miktarı üzerine etkileri.....	50
Şekil 4.3. Viskozim L ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri.....	51
Şekil 4.4. Viskozim L ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri.....	52
Şekil 4.5. Alkalaz ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri.....	59
Şekil 4.6. Alkalaz ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TFM miktarı üzerine etkileri.....	60

Şekil 4.7. Alkalaz ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri.....	61
Şekil 4.8. Alkalaz ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri.....	62
Şekil 4.9. Ultrases ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri.....	68
Şekil 4.10. Ultrases ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TFM miktarı üzerine etkileri.....	69
Şekil 4.11. Ultrases ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri.....	70
Şekil 4.12. Ultrases ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri.....	71
Şekil 4.13. Alkalaz ve ultrases ile kombine özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri.....	77
Şekil 4.14. Alkalaz ve ultrases ile kombine özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TFM miktarı üzerine etkileri.....	78
Şekil 4.15. Alkalaz ve ultrases ile kombine özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri.....	79
Şekil 4.16. Alkalaz ve ultrases ile kombine özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri.....	80
Şekil 4.17. Optimum işlem koşullarında üretilen özütlerin protein fraksiyonları.....	82
Şekil 4.18. Optimum özütleme işlemleri sonrası kepeklere ait SEM görüntüleri.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Susam üreticisi ülkeler.....	5
Çizelge 2.2. Susam ithalatçısı ülkeler.....	6
Çizelge 2.3. Susam tohumunun besin bileşimi.....	7
Çizelge 2.4. Susamın amino asit ve yağ asidi kompozisyonu.....	7
Çizelge 2.5. Gıda atıklarından protein özütleme çalışmalarına örnekler.....	17
Çizelge 2.6. Farklı gıda hammaddelerinden enzimatik protein özütleme çalışmaları.....	20
Çizelge 3.1. Enzimatik özütleme aşamasına ait yanıt yüzey yöntemi için kodlanmış seviyeler.....	26
Çizelge 3.2. Ultrases destekli özütleme aşamasına ait yanıt yüzey yöntemi için kodlanmış seviyeler.....	28
Çizelge 3.3. Enzimatik ve ultrases destekli özütleme aşamasına ait yanıt yüzey yöntemi için kodlanmış seviyeler.....	29
Çizelge 4.1. Uygulamalarda kullanılan susam kepeğinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	40
Çizelge 4.2. Alkali yöntem ile elde edilen özütlere ait analiz sonuçları.....	41
Çizelge 4.3. Viskozim L enziminin etkisini belirlemede kullanılan merkezi tümleşik tasarım ve analizler sonucu elde edilen bağımlı değişkenlere ait değerler.....	45
Çizelge 4.4. Viskozim L enziminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları.....	46
Çizelge 4.5. Viskozim L ile özütlemeye en yüksek protein verimi, TFM ve TEAK (DPPH ve ABTS) değerleri için optimum işlem koşulları.....	53

Çizelge 4.6. Alkalaz enziminin etkisini belirlemede kullanılan merkezi tümleşik tasarım ve analizler sonucu elde edilen bağımlı değişkenlere ait değerler...	55
Çizelge 4.7. Alkalaz enziminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları.....	56
Çizelge 4.8. Alkalaz ile özütlemde en yüksek protein verimi, TFM ve TEAK (DPPH ve ABTS) değerleri için optimum işlem koşulları.....	63
Çizelge 4.9. Ultrases işleminin etkisini belirlemede kullanılan merkezi tümleşik tasarım ve analizler sonucu elde edilen bağımlı değişkenlere ait değerler...	64
Çizelge 4.10. Ultrases işleminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları.....	66
Çizelge 4.11. Ultrases ile özütlemde en yüksek protein verimi, TFM ve TEAK (DPPH ve ABTS) değerleri için optimum işlem koşulları.....	72
Çizelge 4.12. Alkalaz ile ultrases kombine işleminin etkisini belirlemede kullanılan merkezi tümleşik tasarım ve analizler sonucu elde edilen bağımlı değişkenlere ait değerler.....	73
Çizelge 4.13. Alkalaz + Ultrases kombine işleminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları.....	75
Çizelge 4.14. Alkalaz ve ultrases ile kombine özütlemde en yüksek protein verimi, TFM ve TEAK (DPPH ve ABTS) değerleri için optimum işlem koşulları.....	81

EKLER DİZİNİ

Ek 3.1. TFM analizi için gallik asit ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	100
Ek 3.2. TEAK (DPPH) analizi için troloks ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	101
Ek 3.3. TEAK (ABTS) analizi için troloks ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	102

1. GİRİŞ

Susam, kullanımı eski zamanlardan beri süregelen ve besinsel açıdan değerli bir gıda olup, en yaygın kullanım alanları susam yağı, tahin ve tahin helvası üretimidir (Batu ve Elyıldırım, 2009). Ülkemizde susam üretim miktarı çok yüksek olmamasına rağmen özellikle kavrulmuş susam ve tahin üreticisi firmalar tarafından yoğun olarak kullanılan hammaddedir. Bu nedenle Türkiye, dünyada en fazla susam ithalatı yapan ülkeler arasında yer almaktadır (FAOSTAT, 2017).

Son dönemlerde hayvansal kaynaklı proteinlere erişimin daha zor olması, dini veya vejetaryenlik gibi kişisel tercihler ve kimi sağlık endişelerinden kaynaklı beslenme biçimlerinin değişmesi gibi nedenlerle bitkisel proteinlere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Rodsamran ve Sothornvit, 2018). Günümüzde en yaygın olarak kullanılan bitkisel protein kaynağı soya olmasına karşın, farklı bitkisel materyallerden protein özütlenmesi ile ilgili çalışmalar da gün geçtikçe hız kazanmaktadır (Nehete vd., 2013; Nguyen ve Dao, 2017). Bu kapsamda, literatürde pirinç kepeği ve yağı alınmış ayçiçeği posası gibi gıda atıklarından protein özütlenmesi ile ilgili çokça çalışmalara rastlanmaktadır (Hourigan vd., 1997; Dabbour vd., 2018).

Protein özütleme çalışmalarında enzim, ultrases, vurgulu elektrik alan ve mikrodalga gibi verimi artırmaya yönelik uygulamalar da mevcuttur. Farklı bitkisel kaynaklardan karbohidraz ve proteazlar ile enzimatik özütleme, ultrases destekli özütleme ve süperkritik akışkan özütleme gibi işlemlerin, kontrol yöntemi olan alkali özütlemeye kıyasla protein özütleme verimini artırdığı rapor edilmektedir (Reyes vd., 2009; Wu vd., 2014). Protein özütleme verimini artırıcı etkisi bulunan uygulamaların kombine etkileri de birçok farklı materyal ve hedef madde için araştırılmaya başlanmıştır.

Susam tohumları, işlenmeden önce susamın %15 – 18'ini oluşturan kepek kısmından ayrılmaktadır (Yazıcıoğlu, 1953). Böylelikle kavrulmuş susam ve tahin üretimi esnasında yoğun olarak susam kepeği açığa çıkmakta ve açığa çıkan bu susam kepeği ise atık olarak görülmektedir. Oysaki susam kepeği, %10 – 20 protein içeriğiyle katma değer elde edilebilir bir kaynak olarak göze çarpmaktadır. Ayrıca susam proteinleri, metiyonin ve sistein gibi kükürt içeren amino asit içermesi ile diğer bitkisel proteinlere kıyasla önemli bir alternatif oluşturmaktadır

(Bandyopadhyay ve Ghosh, 2002). Ancak, literatürde yağı alınmış susam posasından protein özütlenmesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olsa da (Latif ve Anwar, 2011; Achouri vd., 2012), susam kepeğinin bir protein kaynağı olarak değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu tez çalışmasının amacı, ülkemizde kavrulmuş susam ve tahin üretim aşamalarından atık olarak çıkan ve hâlihazırda değerlendirilmeyen susam kepeğinden bitkisel protein özütleme koşullarının araştırılmasıdır. Bu kapsamda, selülotik bir enzim karışımı olan viskozim L, bir proteaz olan alkalaz, ultrases işlemi ve enzim ile ultrases kombine işlemlerinin susam kepeğinden protein özütlenmesindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır; her bir uygulamaya ait işlem parametreleri dikkate alınarak optimum işlem koşullarının belirlenmesi de hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Susam Bitkisi

Susam (*Sesamum indicum* L.), *Pedaliaceae* familyasına ait, diploid ($2n = 46$) ve çift çenekli, tropik ve sıcak bölgelerde yetişen bir bitkidir. Susamın ait olduğu *Sesamum* cinsi otuzdan farklı türü içermesine karşın, en fazla tarımı yapılan tür *Sesamum indicum*'dur. Susam, yağ elde edilen en eski tohumlardan olup, tarımı 5.000 yıldır özellikle Asya ve Afrika'da yaygın bir şekilde yapılmaktadır (Warra, 2011; Wei vd., 2011; Akbar vd., 2012). Susamın Orta Afrika'dan Mısır, Hindistan, Orta Doğu ve Çin'e, oradan da tüm dünyaya yayıldığı belirtilmektedir. Susam bitkisinin faydalı özellikleri eski dönemlerden beri bilinmekte olup, Antik Mısır döneminden susam bitkisinin tıbbi açıdan öneminin ifade edildiği papirüsler bulunmuştur (Namiki, 2007).

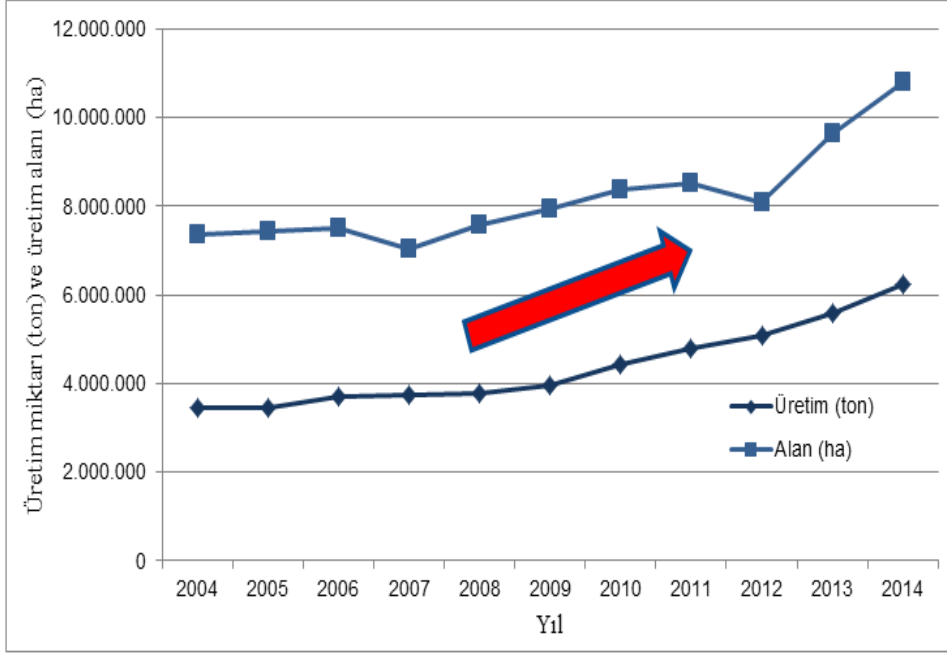
Susam bitkisi yıllık bir bitki olup büyüme periyodu genellikle 3 - 4 aydır, ancak çiçeklenme evresi 30 - 40 gün sonra başlamakta ve bitki olgunlaşmaya dek devam etmektedir. Olgunlaşma sonunda susam tohumları kapsüller içerisinden ayrılmaktadır. Tohum rengi, çeşide bağlı olarak kahverengi, kiremit kırmızısı, siyah, sarı, bej, gri ve beyaz tonlarında olabilmektedir. (Elleuch vd., 2007; Namiki, 2007). Susam bitkisi, genelde açık sarı renkte çiçeklere sahiptir; ancak bazı türlerde çiçek rengi mor ve mavi olabilmektedir. Bitki boyu 50 – 100 cm arasında değişmektedir. Meyve kısmı içerisinde 3 cm boyutunda kapsüller ve bu kapsüller içerisinde ise çok sayıda susam tohumu yer almaktadır. Her bir susam bitkisi 70 ila 100 tohum içeren 15 – 20 adet meyveye sahiptir (Anilakumar vd., 2010). Kabuk ve kepek kısmından ayrılmış susam tohumları, genel olarak açık krem renginde ve yumurta şeklinde fiziki bir görünüme sahip olup, yaklaşık olarak 2,5 - 3 mm uzunluk ve 1,5 mm genişliğe sahiptir. Bin adet susam tohumunun ağırlığı ise yaklaşık 3 g gelmektedir (Mukhopadhyay ve Ray, 1999; Asghar vd., 2014). Yüksek yağ içeriğine sahip susam tohumları, serin ve kuru ortamlarda depolanmalı, depo sıcaklığının 20 °C ve nisbi neminin de %75'in altında olması gerekmektedir (Şahin, 2014).



Şekil 2.1. Susam bitkisi ve tohumları

2.1.1. Susam Üretimi

Susam tarımı temel olarak Çin, Hindistan, Myanmar, Sudan, Orta Amerika ve diğer tropik ve subtropik bölgelerde yapılmakta olup, 2002 yılında dünya çapındaki üretimi 2,8 milyon ton, 2014 yılında ise 6,2 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (FAOSTAT, 2017). Dünyada toplam susam ekim alanı ise 2014 yılı itibarı ile 11 milyon hektara ulaşmıştır. Son 10 yıl incelendiğinde, susam ekili arazi alanının ve toplam susam üretiminin dünyada arttığı ve halen de artmakta olduğu gözlenmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Dünya genelinde yıllara bağlı susam ekim alanı ve toplam susam üretimi (FAOSTAT, 2017)

Çizelge 2.1. Susam üreticisi ülkeler (FAOSTAT, 2017)

Sıra no	Ülkeler	Yıllara Göre Üretim (bin ton)				
		2010	2011	2012	2013	2014
1	Tanzanya	144	357	456	1050	1139
2	Hindistan	893	810	685	636	811
3	Sudan	248	363	187	562	721
4	Çin	587	605	639	624	630
5	Myanmar	868	901	522	540	519
32	Türkiye	24	18	16	16	18

Türkiye, dünya genelinde en fazla susam ithalatı yapan ülkeler arasındadır. Özellikle tahin ve tahin helvası üretiminde yoğun olarak kullanılan bir hammadde olan susam, Nijerya, Etiyopya, Sudan, Pakistan, Hindistan ve Çin gibi ülkelerden yüksek miktarlarda ithal edilmektedir. Ülkemizde yıllık ithal edilen susam miktarı yaklaşık 110.000 ton olup, bu susamların ekonomik değeri 150 milyon dolar civarındadır (FAOSTAT, 2017). Çizelge 2.2’de en fazla susam ithalatı yapan ülkeler gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Susam ithalatçısı ülkeler (FAOSTAT, 2017)

Sıra no	Ülkeler	Yıllara Göre İthalat (bin ton)				
		2009	2010	2011	2012	2013
1	Çin	311	391	389	396	441
2	Japonya	129	161	164	159	142
3	Türkiye	92	102	101	116	107
4	Güney Kore	73	78	82	73	78
5	Hindistan	9	9	0,1	10	77

2.1.2. Susamın Besin Bileşimi

Susam tohumları, yağ (%44 - 58), protein (%18 - 25) ve karbonhidratça (%13 - 20) zengin bir besin olup geleneksel olarak doğrudan tüketilebilmektedir. Susam tohumunun besin bileşimi Çizelge 2.3’te; amino asit ve yağ asidi kompozisyonu ise Çizelge 2.4’te verilmiştir.

Susam, içeriğindeki doymamış yağ asitleri ve antioksidan bileşiklerden dolayı özel bir yere sahiptir. Esansiyel bir yağ asidi olan ve dolayısıyla vücutta sentezlenemeyen, gıdalarla alınması gereken α -linoleik asit, susamdaki doymamış yağ asitlerinin yaklaşık yarısını teşkil etmektedir (Asghar vd., 2014). Ayçiçek yağı ve mısırözü yağı gibi en yaygın tüketilen bitkisel yağlara kıyasla susam yağı daha

Çizelge 2.3. Susam tohumunun besin bileşimi (100 g'da) (Namiki, 2007)

Nem (%)	4,7	Fosfor (mg)	540
Yağ (g)	51,9	Demir (mg)	9,6
Protein (g)	19,8	Sodyum (mg)	2
Karbonhidrat (g)	18,4	Potasyum (mg)	400
Lif (g)	10,8	Karoten (µg)	17
Kül (g)	5,2	Vitamin B1 (mg)	0,95
Kalsiyum (mg)	1200	Vitamin B2 (mg)	0,25
Magnezyum (mg)	370	Niasin (mg)	5,1

Çizelge 2.4. Susamın amino asit ve yağ asidi kompozisyonu (Anilakumar vd., 2010)

Amino asitler (g/16 g N)		Yağ asitleri (%)	
Treonin	3,1 - 3,7	Palmitik asit (16:0)	11,7
Valin	3,9 - 4,6	Stearik asit (18:0)	5,2
Sistein + metiyonin	2,8 - 4,8	Oleik asit (18:1)	41,4
İzolösin	4,0 - 4,2	Linoleik asit (18:2)	39,4
Fenilalanin + tirozin	6,4 - 9,6	Linolenik asit (18:3)	0,4
Histidin	2,7	Araşidik asit (20:0)	0,4
Triptofan	1,3 - 1,5	Behenik asit (22:0)	0,6
Lisin	2,6 - 2,7		
Arjinin	12		

yüksek antioksidan madde içeriğine sahip olup, oleik, linoleik, palmitik ve stearik asit yönünden de zengindir (Lee vd., 2005; Wei vd., 2011).

Susam, sesamin ve sesamolin gibi zengin antioksidan madde içeriğinden dolayı antiseptik, bakterisit ve dezenfektan gibi ürünlerde de kullanılmaktadır. Susamda yer alan ve kimyasal olarak metilendioksifenil grubu içeren sesamin, episesamin, sesaminol ve sesamolin gibi lignanların obeziteyi önleme, kandaki kötü kolesterol (LDL) düzeyini düşürme, antikanserojen özellik gösterme gibi sağlık üzerine olumlu etkileri rapor edilmiştir (Sarkis vd., 2015). Susamda en yaygın bulunan lignan glikozitleri ise sesaminol triglikozit ve sesaminol diglikozittir. (Jeong vd., 2004; Warra, 2011). Susam, hidrofilik özellikteki pinoresinol ve sesaminol glikozitleri gibi antioksidan bileşikler de içermektedir (Sarkis vd., 2014). Susam %0,63 içeriğiyle, keten tohumu ile birlikte en zengin bitkisel lignan kaynağı olarak kabul edilmektedir. Tokoferoller, fitosteroller ve resveratrol de susamda yer alan diğer biyoaktif bileşenlerdendir (Latif ve Anwar, 2011). Susam, günlük mineral ihtiyacının karşılanması adına da değerli bir besindir. Yüz gram susam, günlük manganez ve potasyum ihtiyacının %100'ünü, fosfor ve demir ihtiyacının %57 – 65'ini, çinko, kalsiyum ve demir ihtiyacının ise %13 – 35'ini karşılamaktadır (Asghar vd., 2014).

2.1.3. Susamın Kullanım Alanları

Susamdan elde edilen ürünler arasında en yaygın kullanım alanı bulan ürün, tohumundan elde edilen yağdır. Susam yağı eldesinde temizleme, kavurma, öğütme ve presleme aşamaları olup, üretimde rafinasyon işlemi uygulanmamaktadır. Rafinasyon uygulanmaması nedeniyle besinsel bileşenlerin kaybı düşük orandadır. Susam yağının aroma özellikleri de uygulanan kavurma işlemi ile doğrudan ilişkilidir (Warra, 2011). Sesamin, episesamin, sesaminol ve sesamolin gibi lignanlarca zengin olan susam yağı, yüksek oksidasyon stabilitesi ile gıda olarak tüketiminin yanında parfümeri, kozmetik, ilaç, boya ve parlatici gibi birçok sektörde de kullanılmaktadır (Yoshida ve Takagi, 1997; Warra, 2011). Susam tohumları genel olarak ısıya maruz bırakılmaksızın kullanılırken Doğu Asya ülkelerinde tohumlar kavularak ekmek, bisküvi gibi ürünlerde; ülkemizde ise yaygın olarak simit ve poğaçaya gibi fırıncılık ürünlerinde kullanılarak ürünlere

özgün bir lezzet kazandırmaktadır. Susamın ezilmesi ile elde edilen susam macunu ve hamuru ise dünyanın birçok bölgesinde salata, pirinç pilavı, haşlanmış et vb. ile birlikte birçok yöresel yemekte kullanılmaktadır. Endüstriyel üretim olarak incelendiğinde ise susam yağı dışında susamdan en yaygın olarak üretilen ürünler tahin ve tahin helvasıdır (Namiki, 1995).

Tahin; susam tohumlarının uygun teknikle kabukları ve kepekleri ayrıldıktan sonra kavrulup, değirmende ezilmesi ile elde edilen bir üründür. Tahin, %60 yağ, %26 protein ve zengin B kompleks vitaminleri içeriğinden dolayı değerli bir gıda olarak sayılmaktadır (Batu ve Elyıldırım, 2009). Farklı gıda ürünlerinde ve yemeklerde kullanılmasına karşın en yaygın kullanım alanı tahin helvası üretimidir. Türkiye’de 15 bin civarında tahin ve tahin helvası üreten işletme bulunmaktadır. Bu nedenle tahin ve helvası işletmeleri, yerel ekonomiye katkıda bulunması ve istihdam kaynağı yaratması açısından da öneme sahiptir. Tahin helvasının ana bileşenlerini tahin ve şeker oluşturmaktadır. Bunların dışında helva üretimi için sitrik asit, çöven özütü, vanilya; çeşnili helvalar için ise yaygın olarak kakao, antep fıstığı ve kuru meyveler ilave edilmektedir. Tahinin en belirgin karakteristik fiziki özelliği, uzun süreli depolama sonucunda yoğunluk farkı nedeniyle gerçekleşen yağ fazı ayrılması ve partikül sedimentasyonudur (Evlogimenou vd., 2017). Türkiye’de 1980’li yıllarda yılda 35 – 40 bin ton civarında tahin helvası üretilmekte iken, günümüzde bu değer 80 bin tondan yüksek seviyelerdedir (Batu ve Elyıldırım, 2009).

2.1.4. Susam Kepeği

Susam tanesinin %15 - 18’i tahin üretim prosesinde kabuk ve kepek olarak ayrılmaktadır. Geriye kalan kısım ise öğütülerek tahin üretilmektedir. Böylelikle 100 kg susamdan 82 - 85 kg tahin elde edilebilmektedir (Yazıcıoğlu, 1953). Tahin, üretimi esnasında kabuk ayırma işleminden dolayı mineral madde, özellikle kalsiyum kaybına uğramaktadır. Kabuk ve kepek kısmı yüksek oranda oksalik asit (>%3), kalsiyum ve selenyum içeriğinden dolayı acı bir tada sahiptir. Aynı zamanda %1,44 (kb) oranında bulunan fitalatlar ve fitik asit (>%2), çinko, demir ve kalsiyum gibi metallerle kompleks oluşturmaktadır. Böylelikle bu mineraller sindirim sisteminde absorbe edilememektedir. Bu nedenlerle tahin üretiminde kullanılacak susamlar kabuk kısmından arındırılmaktadır (Lokumcu, 2000; Bandyopadhyay ve Ghosh, 2002; Liu ve Chiang, 2008; Cano-Medina vd., 2011).

Kepek kısmından arındırılmamış susamlardan elde edilen yağların, daha yüksek stabiliteye sahip olduğu; bu duruma da susam kepeğinde yer alan antioksidan özellikli bileşiklerin neden olduğu bildirilmektedir (Jeong vd., 2004). Aynı nedenle kabuk ve kepek ayırma işleminin, susam tohumunun depolama süresini de azalttığı ifade edilmektedir.

Susam tohumundan kabuk ve kepek ayrımı, ıslak ve kuru hat adı verilen iki farklı yöntem ile gerçekleştirilmektedir. Geleneksel olarak kullanılan ıslak hat yönteminde susam tohumları öncelikle içme suyu içerisinde birkaç saat bekletilmektedir. Bu esnada susam tanesinin en dış katmanı olan kabuk, şişerek taneden ayrılmaktadır. Ardından dışta kalan kepek katmanını ayırmak için susam taneleri sıralı iki tuzlu su içeren havuzlarda bekletilmekte ve böylelikle kepekler de uzaklaştırılmaktadır. Daha yeni ve sınırlı kullanımı olan kuru hat yönteminde ise su havuzları kullanılmamakta, kabuk ve kepek katmanları mekanik sıyırıcılar yardımı ile susam tanesinden ayrılmaktadır. Kepek ayırma aşamasında toplam susamın %5 - 6'sı kepek olarak ayrılmaktadır. Islak hatta işlenen ve su havuzundan çıkan susamlar, ıslak halde mikrobiyal gelişime açık olduklarından kurutulmaları gerekmektedir. Kabuk ve kepek ayrımı yapılan susam tanelerinin kurutulması, doğal olarak ek bir kurutma maliyetini de beraberinde getirmektedir (Anilakumar vd., 2010).

Sonuç olarak, ülkemizde yıllık toplam işlenen susam miktarı (~130.000 ton) göz önüne alındığında, yıllık yaklaşık 7.800 ton susam kepeği değerlendirilmeden atılmaktadır. Susam kepeğinin %15 toplam protein içeriği hesaba katıldığında ise, sadece ülkemizde yıllık 1.200 tona yakın önemli bir bitkisel protein kaynağının değerlendirilmeden atıldığı anlaşılmaktadır.

2.2. Bitkisel Protein Kaynakları

Beslenmenin sağlıklı yaşam ile ilişkili olmasıyla ilgili farkındalığın artması, üreticileri besin öğelerince zengin, yüksek kalitede gıda ürünleri üretmeye teşvik etmiştir. Diğer yandan, gıda üretiminde kullanılmak üzere yetiştirilen hammaddelerin, eski zamanlara kıyasla esansiyel mineral ve vitaminleri daha az oranda içerdikleri ifade edilmektedir. Bu durumun nedenleri arasında artan dünya nüfusunu besleyebilmek için verim artışı amacıyla yapılan hatalı tarım

uygulamaları gösterilebilir (Sikiric vd., 2003). Proteinler, vücut için gerekli temel gıda bileşenlerindedir. Yeni doku oluşumu için yapısal bir kaynak olmasından dolayı proteinlere, vücutta karbonhidrat, vitamin ve minerallere kıyasla daha yüksek miktarlarda ihtiyaç duyulmaktadır. Proteinler, tüm organizmalarda bulunan biyolojik makro moleküllerdir. Tüm proteinler amino asitlerden meydana gelen polimerlerdir ve temelde 20 farklı L- α -amino asitten oluşurlar. Genel olarak 40'tan az sayıda amino asit içeren moleküller, peptid olarak isimlendirilmektedir. Proteinlerin biyolojik fonksiyonlarını etkin bir şekilde gerçekleştirebilmeleri için, en az 50 amino asit alt ünitesine sahip olmaları gerektiği ifade edilmektedir. Temel olarak primer (birincil), sekonder (ikincil), tersiyer (üçüncül) ve kuarterner (dördüncül) olmak üzere dört farklı protein yapısı bulunmaktadır (Ghaly ve Alkhaik, 2010). Gıda proteinlerinin fonksiyonel özellikleri, molekül büyüklüğü, iyonik yük dağılımı ve üç boyutlu yapıya bağlılık göstermektedir. Proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri, kompleks gıda sistemlerinde diğer gıda bileşenleriyle etkileşimlerini de doğrudan etkilemektedir (Ma vd, 2018). Dünya nüfusunun artışıyla gıda ve gıda hammaddelerine olan talep her geçen gün artmaktadır. Dünya genelinde 500 milyondan fazla insanın proteince eksik beslendiği bildirilmektedir (Dando, 2012). Proteince eksik beslenme, önemli sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Ghaly ve Alkhaik, 2010). Protein eksikliği, özellikle çocuklarda büyüme bozukluklarına ve hastalık oranlarında artışlara neden olmaktadır. Beslenme eksikliğinin olduğu durumlarda vücuttaki protein enerji için kullanılabilen, ancak vücut diğer besin öğelerini (karbonhidrat, yağ) enerji kaynağı olarak sonrasında bulsa da kaybedilen protein vücuda yeniden kazandırılmamaktadır (Pimentel vd., 1975).

Artan dünya nüfusu ve proteince zengin beslenmeye olan eğilimlerden dolayı bitkisel proteinlere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda dini, kültürel veya vejetaryen/vegan beslenme biçimi gibi kişisel tercihler ile tüketici tercihlerinin değişim göstermeye başlaması da bitkisel kaynaklı proteinlere olan ilgiyi artıran faktörlerdendir (Rodsamran ve Sothornvit, 2018). Günümüzde dünya nüfusu, protein ihtiyacının %70'ini bitkisel kaynaklardan karşılamaktadır. Hayvansal proteinlerin besleyici özelliği, bitkisel proteinlere kıyasla daha fazladır. Bunun nedeni de sekiz esansiyel amino asiti daha fazla oranda içermeleri ve biyoyararlılıklarının daha yüksek olmasıdır. Bitkisel proteinler ise çoğu durumda lizin ve metiyonin içeriği bakımından fakirdir. Örneğin pirinç, buğday ve mısır, düşük miktarda lizin içeriğine sahiptir (Pimentel vd., 1975); ancak hayvansal

protein kaynaklarına göre esansiyel olmayan amino asitleri daha fazla miktarda içermektedirler. Referans protein kaynağı olarak tavuk yumurtası ile kıyaslandığında bitkisel proteinler, esansiyel amino asitleri %62 – 81 oranında, esansiyel olmayan amino asitleri ise %111 – 129 oranında içermektedir (Krajcovicova-Kudlackova vd., 2005). Yüksek miktarda hayvansal kaynaklı gıda tüketimi, bazı sağlık sorunları ile ilişkilendirilmektedir. Örneğin yüksek serum kolesterolü ile ilişkilendirilen koroner kalp hastalığı riskinin, hayvansal kaynaklı gıda tüketimi ile arttığı gözlemlenmiştir. Bu duruma da hayvansal kaynaklı gıdaların bitkisel olanlara kıyasla daha fazla kolesterol ve doymuş yağ asidi içermesi neden olmaktadır (Pimentel vd., 1975). Bunun yanında bitkisel proteinlerin serum kolesterölünü düşürücü etkileri gözlemlenmiştir (Jenkins vd., 2000). Sonuç olarak bitkisel proteinler, yenilenebilir ve çok daha bol miktarda bulunan hammadde kaynağı nedeniyle hayvansal proteinlere iyi bir alternatiftir (Moure vd., 2006). Bitkisel proteinler aynı zamanda gıda takviyesi, aroma artırıcı, gıdaların besinsel açıdan zenginleştirilmesi ve fonksiyonel gıda üretimi gibi birçok amaçla kullanılmaktadır (Bandyopadhyay vd., 2008). Gıda bileşeni olarak gıda formülasyonlarında yer alan proteinlerin çeşitli fonksiyonel özellikleri vardır. Proteinlerin fonksiyonel özellikleri, gıdaların işleme ve depolama koşullarını da etkilemektedir. Su tutma ve köpük bağlama kapasitesi, yağların emülsifikasyonu, aroma tutuculuğu ile çözünürlük ve jelleşme özellikleri örnek olarak verilebilir (Kanu vd., 2007; Yavuz ve Özçelik, 2016; Rodsamran ve Sothornvit, 2018). Yapılan çalışmalarla gün geçtikçe daha fazla aydınlatılan bitkisel proteinlerin fonksiyonel özellikleri, ticari olarak sıklıkla kullanılan peynir altı suyu proteinlerine de alternatif oluşturmaya başlamıştır (Clemente, 2000).

Esansiyel amino asitlerce zengin proteinlerin ekonomik olarak üretilmesinde bitkisel proteinler büyük önem taşımaktadır (Young ve Pellett, 1994). Soya, buğday, mısır, pirinç ve ayçiçeği gibi yüksek miktarda üretimi yapılan ürünlerin atıklarından bitkisel protein üretilmektedir (Nehete vd., 2013). Gıda endüstrisinde protein özütlerinin kullanımı, yüksek protein içeriği, etkin fonksiyonellik ve düşük anti-beslenme faktörü (fitik asit vb.) içeriğinden dolayı gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır (Singharaj ve Onsaard, 2015). Protein özütleri fonksiyonel ingredient, aroma artırıcı ve gıda zenginleştirici olarak; şekerleme, kozmetik, atıştırılabilirlik, sos, et ürünleri ve gazsız içecekler gibi birçok üründe kullanılmaktadır (Bandyopadhyay ve Ghosh, 2002). Protein özütleri, özellikle

sağlık üzerine olumlu etkileri ön planda olan peptidleri içerdikleri için birçok çalışmaya da konu olmaktadır. Hidrolize proteinlerden elde edilen kısa zincirli peptidlerin, daha yüksek besleyici özelliklere sahip olduğu ve vücut tarafından serbest amino asitlere kıyasla daha etkin bir şekilde değerlendirilebildiği rapor edilmiştir. Protein özütleri ayrıca, yaşlı ve bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerin beslenmesinde de kullanılabilir (Gao vd., 2014).

Tahıllar ve yağlık tohumlar, iki temel bitkisel protein kaynağı grubunu teşkil etmektedir (Erickson, 2015). Tahıllar, yağlık tohumlara kıyasla %10 – 12 daha az oranda protein içeriğine sahip olmasına karşın, üretim miktarlarının daha fazla olması ile en az yağlık tohumlar kadar önemli bir bitkisel protein kaynağı olarak öne çıkmaktadır. Yağı alınmış yağlık tohum küspelerinde ise protein miktarı %35 – 60 oranlarına değişmektedir. Bitki yaprakları ve bitki üzerinde yer alan algler de doğada bol miktarlarda bulunmaları nedeniyle protein eldesi açısından yüksek potansiyele sahiptir (Erickson, 2015). Dünyada en yaygın kullanılan bitkisel protein soya proteinidir (Nguyen ve Dao, 2017). Soya dışında buğday gluteni, mısır, kolza, pamuk, ayçiçeği ve yer fıstığı proteinleri, yaygın olarak kullanılan diğer bitkisel proteinlerdendir (Moure vd., 2006). Günümüzde ayrıca kinoa ve ceviz gibi kaynaklardan elde edilen bitkisel proteinler mevcuttur (Poveda vd., 2016). Tarım sektöründe üretilen proteinin yalnızca %35'i gıda olarak kullanılmaktadır. Kalan protein ise yem veya gıda dışı sektörlerde kullanım alanı bulmaktadır; hatta bir kısmı atık olarak açığa çıkmakta ve hiç değerlendirilmemektedir (Sari vd., 2015). Bu nedenle, ileri atık değerlendirme çalışmaları ile hem israfın önlenmesi, hem de yüksek miktarlarda bitkisel protein üretimi mümkün hale gelebilecektir.

2.2.1. Susam Proteinleri

Susam proteinleri, diğer bitkisel proteinlere kıyasla esansiyel amino asitlerden metiyonin ve triptofanı önemli oranda içermektedir; ayrıca diğer bitkisel kaynaklarda oldukça az bulunan ve insan metabolizması için önemli olduğu belirtilen kükürt içeren amino asitlere (metiyonin ve sistein) sahiptir. Bu nedenlerle, susam proteininin diğer bitkisel protein kaynakları arasında önemli bir yere sahip olduğu vurgulanmaktadır (Bandyopadhyay ve Ghosh, 2002; Gandhi ve Srivastava, 2007; Karataş, 2015). Bulunduğu gıdaların besinsel değerine katkıda bulunan susam proteinleri, fizikokimyasal ve diğer yapısal özelliklerini yansıtan

birçok fonksiyonel özelliklere sahiptir. Susam proteinleri kullanımı, gıda ürünlerinde köpük, emülsiyon ve jel özelliklerini de geliştirebilmektedir. Bu nedenle, daha cazip ürünlerin üretilmesi adına susam proteinlerinin fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar hızla artmaktadır (Cano-Medina vd., 2011). Susam proteinleri, süt, yer fıstığı ve yumurta proteinlerinde olduğu gibi bazı bireyler için alerjen özellik göstermektedir. Susam proteinlerinden 2S albümin, 7S globülin, 11S globülin alt üniteleri ve oleosin izoformlarının, alerjenite oluşturabildiği rapor edilmiştir (Achouri vd., 2012). Susam tüketiminin özellikle son yıllarda artmasıyla birlikte Avrupa'da susam tüketimi kaynaklı alerjik vaka sayısında ve şiddetinde artış gözlenmiştir. Bu duruma ise susam proteinlerinin neden olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle susam, Avrupa Birliği ve Kanada'da öncelikli alerjenler listesine eklenmiştir. (Fremont vd., 2002; Achouri ve Boye, 2013).

Susamın başlıca kullanım alanı susam yağı eldesidir. Bu nedenle, yağ eldesi sonucu önemli miktarlarda yağsız susam posası açığa çıkmaktadır. Bu yan ürün, genelde hayvan yemi veya gübre olarak değerlendirilmektedir (Gandhi ve Srivastava, 2007). Susamdan protein özütleme çalışmaları incelendiğinde ise, genelde hammadde olarak yağsız susam posasının kullanıldığı görülmektedir. Kullanılan özütleme yöntemine bağlı olarak protein içeriği %50'lere kadar varabilen susam posasından protein eldesi, özütleme işlemi ile başlayan bir takım süreçleri kapsamaktadır. Çözgen olarak sıklıkla distile su veya tuzlu su çözeltisi; pH değerinin alkali hale getirilmesi için ise sodyum hidroksit, sodyum karbonat ve sodyum bikarbonat gibi bileşiklerin kullanıldığı görülmektedir (Escamilla-Silva vd., 2003). Susamdan yağ eldesi sonucu açığa çıkan yağsız susam küspesinde, varlığı istenmeyen bileşiklerden fitik asit %2'den %5'e; ham lif miktarı ise %5,3'lere çıkabilmektedir. Bu dezavantajlara rağmen yüksek protein içeriğinden dolayı susam proteinleri kullanım alanı bulmaktadır (Cano-Medina vd., 2011). Susam kepeği de %15,2 protein, %7,6 besinsel lif ve %6,84 nem içeriğine sahip, önemli bir protein kaynağıdır. Susam kepeği, susamın bir yan ürünü olarak açığa çıkmakta ve genellikle hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel atık olarak kanalizasyon sistemlerine hatta denizlere de dökülebilmekte ve çevre kirliliğine neden olmasının yanı sıra değerli bir protein kaynağı kaybedilmektedir (Farran vd., 2000). Ancak, literatürde henüz susam kepeğinden protein özütlenmesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Susam protein izolat veya konsantreleri, çoğunlukla izoelektrik çöktürme ile hazırlanmakta olup, %2,5 – 4 metiyonin ve %3,8 – 5,5 kükürtlü amino asit içeriğine sahiptir. Protein fraksiyonunu ise %67,3 globulin (%80 α -globulin ve %20 β -globulin), %8,6 albumin, %6,9 glutelin ve %1,4 prolaminler oluşturmaktadır. Bu izolatların içecek ve ekmek gibi ürünlerde kullanımı rapor edilmiştir (Sharma vd., 2016; Poveda vd., 2016). Elde edilen özütlerden susam proteini bazı yenilebilir film üretimi ile ilgili çalışmalar da literatürde mevcuttur (Sharma ve Singh, 2016).

2.2.2. Gıda Atıklarından Bitkisel Protein Üretimi

Artan nüfusla birlikte gıda endüstrisinde işlenen ürün miktarı ve çeşitliliğin artması, açığa çıkan atık miktarının artışını da beraberinde getirmektedir. Özellikle son yıllarda bitkisel ürünlerin işlenmesinin ardından oluşan yan ürünlerden protein içeriği yüksek atıkların değerlendirildiği çalışmalara ağırlık verildiği görülmektedir. Buğday kepeği, pirinç kepeği, yulaf kepeği, ayçiçeği küspesi ve susam küspesi, protein üretilen kaynaklardan bazılarıdır (Hanmoungjai vd., 2001; Latif ve Anwar, 2011; Nehete vd., 2013; Gao vd., 2014). Gıda atıklarından protein özütleri genel olarak yağsız hammaddeden uygun özütleme/çöktürme yöntemi ile üretilmektedir. Bitkisel kaynaklardan protein özütlemek için yaygın olarak kullanılan yöntemler alkali özütleme/izoelektrik çöktürme, asit özütleme/izoelektrik çöktürme, suyla özütleme/izoelektrik çöktürme, tuzla özütleme/misel çöktürme ve ultrafiltrasyondur (Boye vd., 2010; Poveda vd., 2016; Sharma vd., 2016). Literatürde kabuk ve kepek kısmından arındırılmış gıda materyallerinden çözgen (genellikle su) yardımı ile protein özütü elde edilen birçok çalışma bulunmaktadır. İşlem genel olarak alkali yöntem ile gerçekleştirilmektedir. Çoğu bitkisel protein alkali ortamda çözünmekte (Johnson vd., 1979); bu nedenle alkali ortam sağlanıp süpernatanttan protein özütü elde edilmektedir (Escamilla-Silva vd., 2003; Demirhan vd., 2011). Alkali yöntem ile elde edilen protein verimi daha düşük olduğundan, süpernatanttan proteinleri ayırmak için izoelektrik noktada çöktürme işlemi de sıklıkla ek bir basamak olarak uygulanmaktadır (Gandhi ve Srivastava, 2007; Sharma vd., 2016; Sharma ve Singh, 2016; Rodsamran ve Sothornvit, 2018). Alkali yöntem haricinde gıda atıklarından protein özütlenmesinde enzim, ultrases, mikrodalga, vurgulu elektrik alan ve süperkritik akışkan ile özütleme gibi verimi artırmaya yönelik yaklaşımlar da mevcuttur.

2.3. Protein Özütleme Verimini Artırmak İçin Kullanılan Yöntemler

Protein özütlemesinde alkali yöntem dışındaki uygulamalardan da faydalanılmaktadır. Yapılan çalışmalar yeni teknolojilerin kullanımının, protein özütleme verimliliğini artırdığını işaret etmektedir (Sarkis vd., 2015). Enzim, ultrases, mikrodalga, vurgulu elektrik alan ve süperkritik akışkan gibi uygulamaların farklı gıda atıklarından protein özütlenmesinde etkilerini inceleyen çalışmaların sayısı da hızla artış göstermektedir. Çizelge 2.5'te bu konuda literatürden derlenen bazı çalışmalara yer verilmiştir.

Enzimatik, ultrases, vurgulu elektrik alan (PEF), mikrodalga, yüksek voltaj ve süperkritik akışkan (SFE) gibi tekniklerin ayrıca özütleme işlem süresini azalttığı, ürün kalitesini artırdığı ve Maillard tepkimelerini kontrol altında tuttuğu belirtilmektedir (Ohshima vd., 1995). Modern tekniklerden birisi olan mikrodalga destekli özütlemeye, bitki hücre matriksi bünyesinde bulunan su, mikrodalga enerjisini absorbe etmektedir. Böylece hücrenin içten ısınması sağlanarak hücre parçalanması hızlanmakta ve hücre yapısında bulunan bileşenlerin matriks dışına geçiş hızı artmaktadır (Wang ve Weller, 2006). İşlem, iyonik kondüksiyon ve dipol rotasyon olmak üzere iki mekanizma sayesinde gerçekleşmektedir. Mikrodalga destekli özütleme performansını etkileyen temel parametreler çözücü tipi, mikrodalga gücü, işlem süresi ve sıcaklık olarak tanımlanmaktadır (Madej, 2009). Mikrodalga destekli özütleme yöntemi ile susam (Papadakis vd., 2006), kabak çekirdeği (Jiao vd., 2014), astragalus (Xiao vd., 2008), elma (Wang vd., 2007) ve pirinç kepeği (Khan vd., 2011) gibi farklı materyaller ile yapılan çalışmalar mevcuttur. Bir diğer protein özütleme tekniği olan ultrafiltrasyon ile proteinler partikül büyüklüğü veya molekül ağırlıklarına göre ayrılmaktadır (Romero-Baranzini vd., 1995). Vurgulu elektrik alan uygulamasında hücre membranlarına kritik elektriksel potansiyel uygulanmakta, böylelikle doku parçalanması ve doku geçirgenliğinin artışı ile birlikte proteinlerin hücre dışına transferi hızlanmaktadır. Yüksek voltaj ile özütleme işleminde de benzer bir mekanizma söz konusudur; iki elektrot arasında üretilen yüksek voltajlı elektrik boşalması ile bitkisel dokuya doğrudan yoğun bir enerji akışı sağlanarak kütle transferi hızlandırılmaktadır (Rosello-Soto vd., 2015).

Çizelge 2.5. Gıda atıklarından protein özütleme çalışmalarına örnekler

Gıda Atığı	Özütleme Yöntemi	Özütleme Verimi (%)	Kaynak
Pirinç kepeği	Enzimatik	25,9 – 57,9	Hourigan vd. 1997
Kayısı çekirdeği	Alkali	13,5 – 18,3	Sharma vd. 2010
Pirinç kepeği	Mikrodalga	22,1	Phongthai vd. 2016
Ayçiçeği posası	Ultras	28,0 – 54,3	Dabbour vd. 2018
Susam posası	Alkali	15,0 – 20,0	Achouri vd. 2012
Zeytin posası	Enzimatik	30,0	Vioque vd. 2000

Bitkisel kaynaklardan farklı maddelerin özütlenmesinde kombine işlemlerin etkisi de yaygın olarak araştırılmaktadır. Enzim ve ultrases işleminin bir arada kullanıldığı bir çalışmada, ultrases dalgalarının immobilize enzimlerin substratları ile buluşmasını kolaylaştırarak özütleme işleminin etkinliğini artırdığı rapor edilmiştir (Mason vd., 1996). Bir başka çalışmada ise aynı kombine uygulama sonucu buğday kepeğinden arabinoksilan özütlenmesinde verimin kontrole kıyasla yüksek olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2014). Selülaz, pektaz ve papain enzimleri ile ultrases işleminin bir arada kullanılması ile balkabağından polisakkarit özütlenmesinin ele alındığı da görülmektedir (Wu vd., 2014). Literatürde farklı hammaddelerden mikrodalga destekli enzimatik özütlemenin yapıldığı çalışmalar da mevcuttur. Balıklardan arsenik ve selenyum minerallerinin özütlenmesinin ele alındığı bir çalışmada, enzim ve mikrodalga kombinasyonunun özütleme süresini önemli ölçüde (20 saatten 30 dk.'ya) düşürdüğü rapor edilmiştir (Reyes vd., 2009). Görüldüğü üzere, alkali yöntemle kıyasla protein özütleme verimini artırıcı etkisi bulunan uygulamaların kombine etkileri de birçok farklı materyal ve hedef madde için araştırılmaktadır.

Sonuç olarak mikrodalga ve ultrases gibi yeni olarak adlandırılan teknikler, özütleme işlemlerinde alkali yöntemle göre daha yüksek verim sağlamaktadır. Farklı gıda atıkları ve özütleme teknikleri ile yapılacak ileri çalışmalarla gıda

atıklarından protein eldesi için kullanılabilir en uygun yöntem ve işlem parametreleri belirlenebilecektir.

2.3.1. Ultrases Destekli Özütleme

Ultrases, 20 kHz ile 1 GHz aralığında frekansa sahip ses dalgalarını kapsamaktadır (Davies, 1959). Ultrases, kavitasyon sonucu bitki hücre duvarının etkilenmesini sağlayarak, bitki matriksinde bulunan bileşenlerin hücre dışına geçişini hızlandırmaktadır (Alupului vd., 2009). Ultrases dalgalarının meydana getirdiği ultrasonik enerji, sıvı ortama nüfuz ederek iç basıncı artırmakta ve hızla küçük kabarcıkların oluşumunu sağlamaktadır. Bu kabarcıkların patlaması esnasında ise kabarcıkların iç yüzeyinde çok yüksek sıcaklık ve basınç değerlerine ulaşılmakta (Jambrak vd., 2009), böylelikle hedef analitin matriksten salınımı kolaylaşmaktadır. Ultrases dalgaları özütleme işlemi esnasında ısı ve kütle aktarımını hızlandırarak bitki hücre duvarından protein ve polifenol gibi bileşiklerin açığa çıkmasını sağlamaktadır (Roselló-Soto vd., 2015). Polifenol, antosiyanin, aromatik bileşikler, polisakkarit ve diğer bileşiklerin özütleme esnasında ultrases işleminin kullanıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur (Vilkhu vd., 2008). Örnek olarak Moulton ve Wang (1982), 20 kHz ve 3 W/g değerlerinde uygulanan ultrases işlemlerinin soya proteini özütleme verimini kontrole kıyasla sırasıyla %53 ve %23 oranlarında artırdığını rapor etmişlerdir.

Ultrases teknolojisinin gıda endüstrisine entegrasyonunun artırılması ile özellikle bitkisel materyallerden katma değeri yüksek biyoaktif özellikteki bileşenlerin özütleme esnasında daha yaygın hale getirilebileceği düşünülmektedir.

2.3.2. Enzimatik Özütleme

Enzim uygulaması, bitkilerden protein özütleme esnasında kullanılan yöntemlerden biridir. Özellikle karbohidrazların (selülaz, pektinaz, viskozim L), bitki materyallerinde polisakkarit matrikse bağlı bulunan proteinleri serbest hale getirerek özütleme verimini artırdığı belirtilmektedir (Hourigan vd., 1997). Örneğin ksilanaz enzimi, hücre duvarı polisakkaritlerinden birisi olan ksilanı hidrolize ederek kısa zincirli ksilo-oligosakkaritlere parçalamaktadır. Böylece

polisakkarit matriks içerisindeki bağlar parçalanarak hücre içerisinde bulunan protein gibi moleküller serbest hale geçmektedir (Hourigan vd., 1997). Karbohidrazların haricinde protein özütleme verimini artırmaya yönelik alkalaz (Hanmoungjai vd., 2001; Jiang vd., 2010; Demirhan vd., 2011), flavorzim (Klompong vd., 2007; Kanu vd., 2009) ve protizim (Sharma vd., 2002) gibi proteaz enzimlerinin kullanıldığı da görülmektedir. Özütleme verimini artırmasının yanında daha düşük sıcaklıklarda işlem yapılabilmesi, patlayıcı nitelikte çözücü kullanımı gerekmemesi ve zararlı atık madde üretilmemesi, enzimatik özütlemenin avantajları arasında gösterilebilir (Hanmoungjai vd., 2001). Enzimatik özütleme ile elde edilen bitkisel proteinlerin, düşük viskozite ve yüksek çözünürlük gibi özelliklerinden dolayı birçok gıda ürünüde fonksiyonel olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu belirtilmektedir (Adler-Nissen, 1979).

Literatürde bitkisel kaynaklardan protein elde edilmesi konusunda enzimatik işlemin uygulandığı çalışmalar incelendiğinde, karbohidrazların ve proteazların ayrı ayrı ele alındığı çalışmalara rastlanmaktadır. Bu çalışmalar detaylı olarak incelendiğinde, karbohidrazlardan viskozim L'nin ve proteazlardan alkalaz enziminin farklı bitki matrikslerinden protein özütlemeye en verimli karbohidraz ve proteaz oldukları anlaşılmaktadır. Viskozim L enzimi, arabanaz, selüloz, hemiselüloz ve ksilanaz gibi birden fazla farklı karbohidrazları içermektedir (Hourigan vd., 1997). Alkalaz enzimi ise optimum olarak 7 – 9 pH ve 30 – 65 °C sıcaklık aralıklarında çalışan bir proteolitik enzimdir. Tez çalışması kapsamında kullanılan bu enzimlerle ilgili çalışmalar incelenecek olursa; Kanu vd. (2009), susamdan protein özütlemeye farklı proteolitik enzimlerin etkinliklerini incelemiş ve verimlilik açısından en verimli enzimi alkalaz olarak bildirmişlerdir. Benzer şekilde çay yaprağından protein özütlemesini ele alan Shen vd. (2008), farklı proteolitik enzimler arasında en verimli enzimi alkalaz olarak bildirmişlerdir. Latif ve Anwar (2011) ile Ribeiro vd. (2013) susam posası ve keten tohumundan protein özütlemeye en verimli ilk iki enzimi viskozim L ve alkalaz olarak ayrı ayrı rapor etmişlerdir. Bu çalışmalarda viskozim L'nin alkalaza kıyasla protein özütlemeye daha etkili enzim olduğu belirtilmesine rağmen, Hanmoungjai vd. (2002) viskozim L'ye kıyasla alkalazın pirinç kepeğinden protein özütlemeye daha etkili enzim olduğunu yaptıkları çalışmanın sonucunda bildirmişlerdir. Nguyen ve Dao (2017) ile Minh (2015) ise soya fasulyesinden protein özütlemeye farklı proteaz enzimlerini ele aldıkları ayrı ayrı çalışmalarda en etkili enzimi alkalaz olarak rapor etmişlerdir. Çizelge 2.6'da ise farklı gıda hammaddelerinden enzimatik protein

özütlemesi ile ilgili çalışmalar, kullanılan enzimler ile elde edilen verimlerin yüksekten düşüğe sıralaması ile verilmiştir.

Çizelge 2.6. Farklı gıda hammaddelerinden enzimatik protein özütleme çalışmaları

Hammadde	Özütleme Verimi Sıralaması	Kaynak
Susam unu	Alkalaz>Protameks>Nötraz>Flavorzim	Kanu vd. 2009
Susam posası	Viskozim L>Alkalaz>Protameks	Latif ve Anwar 2011
Pirinç kepeği	Alkalaz>Viskozim L	Hanmoungjai vd. 2002
Soya fasulyesi	Alkalaz>Protameks	Nguyen ve Dao 2017
Keten tohumu	Viskozim L>Alkalaz>Flavorzim>Nötraz	Ribeiro vd. 2013
Çay	Alkalaz>Protameks>Nötraz>Flavorzim	Shen vd. 2008

Sonuç olarak enzimatik özütleme teknikleri, kullanılabilir enzim çeşitliliğinin getirdiği avantajın yanı sıra, özütleme verimine olumlu etkileri sayesinde birçok özütleme uygulamalarında kullanılma potansiyeline sahiptir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan atık susam kepeği, Çelikler Gıda San. Tic. Ltd. Şti. (Gaziantep, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Özütleme işlemleri ve analizlerde kullanılan sodyum hidroksit (Tekkim Kimya – 100418163001) ve sülfürik asit (Tekkim Kimya – 080118171001) teknik saflıkta; diğer tüm kimyasallar ise analitik saflıkta olup tedarik edilen firma ve katalog numaraları ile birlikte belirtilen şekildedir: Kjeldahl katalizör tablet (Ekiciler Kimya – 3,5 g potasyum sülfat + 400 mg bakır sülfattan oluşan tabletler), borik asit (Merck – 1.00165.1000), metilen kırmızısı (Sigma-Aldrich – 32654-25G), metilen mavisi (Sigma-Aldrich – 66720-100G), hidroklorik asit (Merck – 1.00317.2501), aseton (Merck – 1.00014.2511), etanol (Tekkim Kimya – 020118185001), metanol (Sigma-Aldrich – 24229-2.5L-R), Folin-Ciocalteu ayracı (Merck – 1.09001.0500), sodyum karbonat (Merck – 1.06392.1000), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Aldrich – D9132-1G), 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) (Roche Diagnostics – 10102946001), potasyum persülfat (Merck – 1.05091.1000), monobazik sodyum fosfat (Sigma-Aldrich – S0751-100G), dibazik sodyum fosfat (Sigma-Aldrich – 04272-1KG), sodyum klorür (Merck – 1.06404.1000), viskozim L (Novozymes), alkalaz (Novozymes), protein işaretleyici (Sigma – 94964-500UL), akrilamid (Sigma – A3553-100G), N'N'-bis-metilen-akrilamid (Sigma – M7279-25G), sodyum dodesil sülfat (Sigma – L3771-25G), tris baz (Roche – 10708976001), gliserol (Sigma – G2025-100ML), bromfenol mavisi (Sigma – B0126), β -merkaptotanol (Sigma – M3148-25ML), glisin (Sigma – G8898-500G), amonyum persülfat (Sigma – A3678-25G), 1,2-bis (dimetilamino) etan (TEMED) (Sigma – T9281-25ML), coomassie brilliant blue (Sigma – B8647-1EA), metanol (Sigma – 1060081000), asetik asit (Sigma – 695092-2.5L).

3.2. Yöntem

Çalışma kapsamında, özütleme verimini artırmaya yönelik tekniklerin etkileri incelenmiş ve her bir işlem için en verimli özütleme tekniği belirlenmiştir. Bu kapsamda selülotik enzim karışımı olan viskozim L ile enzimatik özütleme (1), proteolitik enzim olan alkalaz ile enzimatik özütleme (2) ve ultrases destekli özütleme (3) işlemlerinin özütleme verimine etkileri incelenmiştir. Ayrıca, bu

aşamada elde edilen sonuçlar baz alınarak yeni bir deneysel plan oluşturulmuş ve etkinliği yüksek olan enzim kullanılarak enzimatik ve ultrases kombine işleminin özütleme verimine etkileri de incelenmiştir. Bu aşamaların her birinde yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılmıştır. Özütleme tekniklerinin verimlilikleri, işlemler sonunda elde edilen özütlerle toplam protein, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite (DPPH ve ABTS yöntemleri ile) analizleri uygulanarak belirlenmiştir. Bu aşamada elde edilen özütlerin özellikleri hem kendi aralarında hem de kontrol yöntemi olan alkali özütleme ile elde edilen özütün özellikleri ile kıyaslanmıştır. Her bir özütleme tekniği ile elde edilen optimum koşullarda üretilen protein özütlerine ise SDS-PAGE ile protein fraksiyonu analizi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüleme analizi uygulanmıştır.

3.2.1. Susam Kepeğine Uygulanan Ön İşlemler

Endüstride kavrulmuş susam ve tahin üretim aşamasında suda bekletilerek şişen susam kabuğunun susamdan ayrılmasının ardından, kabuğu soyulmuş susamlar farklı tuz konsantrasyonlarında (%20 ve %10 - 12) sıralı iki su havuzunda belirli süre bekletilerek susam kepeğinin susam çekirdeğinden ayrılması sağlanır. Uygulanan diğer bir teknolojiye ise susam kepeği, mekanik sıyırıcılar ile kabuğu soyulmuş susamdan ayrılmaktadır. Bu aşamada prosesten ayrılan ve gıda yan ürünü olarak görülen ve değerlendirilmeyen susam kepekleri kavrulmuş susam ve tahin üreticisi firmadan temin edilmiştir.

Tedarik edilen susam kepeği, Adnan Menderes Üniversitesi Gıda Mühendisliği laboratuvarlarına taşınmış ve ilk etapta hızla taş ve toz gibi yabancı maddelerden ayrıştırılmıştır. Ardından fanlı tepsili kurutucuda (60 ± 2 °C; 1,4 m/s hava akış hızı; <%10 bağıl nem) nem içeriği %5'in altına düşene dek kurutulmuştur. Kurutma sonrası kepekler 500 mikronluk elekten geçirilmiş ve <500 µm partikül boyutuna sahip kepekler hava geçirmez polietilen torbalar içerisine alınarak işlemlere dek buzdolabında (+4 °C) depolanmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmalarda kullanılan kurutulmuş ve öğütülmüş susam kepeği

3.2.2. Susam Kepeğine Uygulanan Analizler

Kurutulmuş ve öğütülmüş susam kepeğine temel fiziki özelliklerinin belirlenmesi açısından toplam kuru madde, toplam mineral madde ve toplam protein analizleri uygulanmıştır.

3.2.3. Susam Kepeğinden Fenolik Madde Özütleme İşlemleri

Özütleme işlemi laboratuvarında geçmiş çalışmalarda uygulanan yöntemle gerçekleştirilmiştir. Susam kepeğinden fenolik madde özütleme amacıyla asetonun %70'lik sulu çözeltisi kullanılmıştır.

Özütleme işlemi için otoklav şişelerine susam kepeğinden 10 gram alınarak, 92 mL %70'lik aseton çözeltisi (v/v) ile karıştırılmıştır. Böylelikle 1:10 (w/v) katı/çözgen oranı elde edilmiştir. Susam kepeğinin lifli yapısı göz önüne alınarak özütleme verimini artırmak amacıyla ayrıca %0,1 oranında hidroklorik asit eklenmiştir. Ardından karışım, 1 saat çalkalamalı su banyosunda (Daihan Scientific Maxturdy-30, Korea) (50 rpm; 55 °C) bekletilmiştir (Şekil 3.2). Homojenat 6000 rpm'de 15 dk. santrifüj (Centurion Scientific K241, Birleşik Krallık) edildikten sonra süpernatant kısmı falkon tüplere aktarılmış ve analizlere dek -20 °C'de depolanmıştır (Yılmaz, 2017).



Şekil 3.2. Çalkalamalı su banyosunda fenolik madde özütlemesi işlemi

Elde edilen özütler ise toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite (DPPH ve ABTS yöntemleri ile) analizleri uygulanmıştır.

3.2.4. Susam Kepeğinden Bitkisel Protein Özütlemesi Çalışmaları

Susam kepeğinden bitkisel protein özütlemesi işlemleri; alkali yöntem ile, viskozim L ve alkalaz ile enzim destekli, ultrases destekli ve enzim + ultrases destekli olmak üzere beş farklı şekilde ve iki tekrür halinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. Alkali yöntem ile özütlemesi

Protein özütlemesi işlemi, ilk olarak bitkisel protein üretiminde en yaygın kullanılan ve konvansiyonel yöntem olan alkali özütlemesi ile gerçekleştirilmiştir. İşlem için kapaklı cam şişe içerisine 10 g susam kepeği tartılmış ve üzerine 92 mL deiyonize su eklenmiştir; böylelikle 1:10 (w/v) oranında bir karışım elde edilmiştir. Karışımın pH değeri, 2 N NaOH çözeltisi ile 9,5'e ayarlanmış ve çalkalamalı su banyosunda (45 °C sıcaklık ve 50 rpm hızında) 120 dk. bekletilmiştir. Ardından kaba filtre kağıdı ile filtre edilip, 4000 g'de 30 dk. santrifüj edildikten sonra

süpernatant kısmı toplanmıştır (Cano-Medina vd., 2011; Guan ve Yao, 2008). Elde edilen özütler, analizlere dek -20 °C sıcaklıkta depolanmıştır.

3.2.4.2. Enzimatik özütleme

Susam kepeğinden enzimatik protein özütlenmesinde selülotik enzim karışımı olan viskozim L ve bir proteolitik enzim olan alkalazın etkileri belirlenmiştir. Her iki tür enzimin çalıştığı pH değerleri farklılık göstermektedir. Bu kapsamda, her iki enzimin de özütleme verimine etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. Enzimatik özütleme işleminde enzim oranının, pH değerinin, işlem sıcaklığının ve süresinin etkileri yanıt yüzey metodu (Response surface methodology, RSM) kullanılarak merkezi tümleşik dizayn (Central composite design, CCD) ile incelenmiş ve ayrıca optimum enzimatik işlem koşulları da belirlenmiştir.

Enzimatik özütleme işlemlerinde kullanılan merkezi tümleşik dizayna ait bağımsız değişkenler ile onların kodlanmış seviyeleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

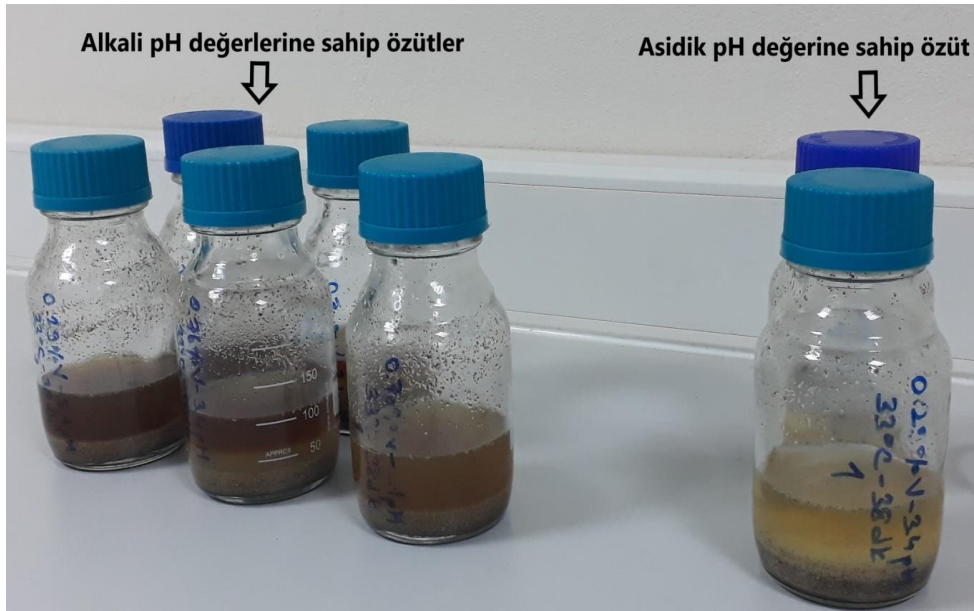
Enzimatik özütleme işleminde ilk olarak kapaklı cam şişelere 10 g susam kepeği tartılmış, üzerine 92 mL deiyonize su eklenerek 1:10 (w/v) oranında bir karışım elde edilmiştir. Karışımın pH değeri, deneme planına göre 2 N HCl veya NaOH çözeltisi ile ayarlandıktan sonra yine deneme planına göre enzim (kepeğin yüzdesi cinsinden) ilave edilmiştir (Şekil 3.5). Karışım, çalkalamalı su banyosunda deneme sıcaklığında (25 – 55 °C) 50 rpm hızında deney planında belirlenmiş süre boyunca (10 – 120 dk.) bekletilmiştir. Ardından karışımın pH değeri 9,5'e ayarlanıp çalkalamalı su banyosunda 50 rpm ve 45 °C'de 30 dakika daha bekletilmiştir. Son olarak karışım kaba filtre kağıdı ile filtre edilip, 4000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı toplanmıştır. Süpernatantlar, analizlere dek -20 °C'de bekletilmiştir.

Çizelge 3.1. Enzimatik özütleme aşamasına ait yanıt yüzey yöntemi için kodlanmış seviyeler

Bağımsız Değişkenler	Birim	-1	+1	-alfa	+alfa
Enzim miktarı	%	0,29	0,76	0,05	1
Sıcaklık	°C	33	48	25	55
Süre	dk.	38	93	10	120
pH değeri	pH ^a	3,4	5,1	2,5	6
	pH ^b	7,3	9,8	6	11

pH^a: Viskozim L enzimi ile özütleme işlemine ait değişken

pH^b: Alkalaz enzimi ile özütleme işlemine ait değişken



Şekil 3.3. Alkali ve asidik pH değerlerine sahip özütlerin genel görünümü

3.2.4.3. Ultrases destekli özütleme

Susam kepeğinden ultrases destekli protein özütlenmesinde kullanılan ultrases cihazı, 35 kHz sabit frekansta farklı güçlerde (528 – 1232 W) ultrases gücü sağlayabilmektedir. Bu özelliği sayesinde, literatürde çalışmalarda sıkça kullanıldığı görülen klasik laboratuvar tipi ultrases cihazlarından (~375 W) çok daha etkin ultrases etkisi göstermektedir. Ayrıca özütleme işlemi esnasında, entegre sıcaklık kontrol sistemi sayesinde sıcaklık değeri de kontrol edilebilmektedir. Cihaza ait görsel, Şekil 3.4’te verilmiştir.



Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan ultrases cihazı

Ultrases işleminin özütleme işlemine etkisi RSM ile CCD kullanılarak belirlenmiştir. Ultrases destekli özütleme işleminde kullanılan merkezi tümleşik dizayna ait bağımsız değişkenler ile onların kodlanmış seviyeleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Ultrases uygulamasında ilk olarak cam şişe içerisine susam kepeği ve deiyonize su 1:10 (g/mL) oranında karıştırılmıştır. Ultrases cihazında yer alan 5 L saf su içerisine cam şişeler yerleştirilmiştir. Ardından deneme planına göre farklı ultrases güçlerinde (528 – 836 W), farklı sıcaklıklarda (25 – 55 °C) ve sürelerde (10 – 120 dk.) özütleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ardından karışımın pH değeri 9,5'e ayarlanıp çalkalamalı su banyosunda 50 rpm ve 45 °C'de 30 dk. bekletilmiştir. Son olarak kaba filtre kağıdı ile filtre edilen karışım, 4000 g'de 30 dk. santrifüj edilip süpernatant kısmı toplanmıştır. Süpernatantlar, analizlere dek -20 °C'de depolanmıştır.

Çizelge 3.2. Ultrases destekli özütleme aşamasına ait yanıt yüzey yöntemi için kodlanmış seviyeler

Bağımsız Değişkenler	Birim	-1	+1	-alfa	+alfa
Ultrases gücü	W	550	704	528	836
Sıcaklık	°C	31	49	25	55
Süre	dk.	32	98	10	120

3.2.4.4. Enzim + ultrases destekli özütleme

Enzimatik ve ultrases destekli kombine özütleme uygulamasında her iki işlem göz önünde bulundurularak yeni bir deneme planı oluşturulmuştur. Kombine yeni bir işlem olduğu ve bağımsız değişkenlerin karşılıklı etkileşimleri yeni durumda farklılık gösterebileceği için her iki etki için ayrı ayrı denenen bağımsız değişkenler tekrardan bu aşamada ele alınmıştır. Enzim + ultrases destekli özütleme işleminde, viskozim L ve alkalaz enzimleri arasında daha verimli olan alkalaz enzimi kullanılmıştır.

Bu aşamada yine RSM ile CCD kullanılarak oluşturulan deneme planı Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Bu aşamada, cam şişe içerisine susam kepeği ve deiyonize su 1:10 (w/v) oranında karıştırılmış ve deneme planına göre enzim ilave edilmiştir. Ardından cam şişeler,

içerisinde 5 L saf su bulunan ultrases cihazı içerisine yerleştirilmiş ve deneme planında yer alan ultrases gücü ve sıcaklığında, yine deneme planındaki süre boyunca işleme tabi tutulmuştur. Ardından karışımın pH değeri 9,5'e ayarlanıp çalkalamalı su banyosunda 50 rpm ve 45 °C'de 30 dk. bekletilmiştir. Son olarak kaba filtre kağıdı ile filtre edilip 4000 g'de 30 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı alınmıştır. Süpernatantlar, analizlere dek -20 °C'de bekletilmiştir.

Çizelge 3.3. Enzimatik ve ultrases destekli özütlenme aşamasına ait yanıt yüzey yöntemi için kodlanmış seviyeler

Bağımsız Değişkenler	Birim	-1	+1	-alfa	+alfa
Enzim miktarı	%	0,29	0,76	0,05	1
Ultrases gücü	W	550	704	528	836
Sıcaklık	°C	33	48	25	55
Süre	dk.	38	93	10	120

3.2.5. Protein Özütlerine Uygulanan Analizler

Viskozim L ve alkalaz ile enzim destekli, ultrases destekli ve enzim + ultrases destekli özütlenme yöntemleri ile elde edilen protein özütlerine, toplam protein miktarı, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite (DPPH ve ABTS yöntemleri ile) analizleri uygulanmıştır. Ayrıca, özütlerin “% protein verimi” değerleri hesaplanmıştır.

3.2.5.1. % protein verimi

Örneklerin % protein verimleri, toplam protein miktarı tayini sonrası elde edilen veriler yardımı ile hesaplanmıştır. Yüzde protein verimi, özütlenme işlemleri sonrasında susam kepeğinde yer alan proteinin yüzde kaçının özütlenebildiğini ifade etmektedir.

3.2.5.1.1. Alkali ve ultrasses destekli özütlerin % protein verimi

Alkali ve ultrasses destekli özütleme yöntemleri ile elde edilen özütlerin % protein verimi değerleri, aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ protein verimi} = \frac{(V_{\text{ç}})(\%_{\text{protein,özüt}})}{(m_s)(\%_{\text{protein,kepek}})} \times 100$$

$V_{\text{ç}}$: Özütlemeye kullanılan çözgen miktarı, mL

$\%_{\text{protein,özüt}}$: Özütün protein içeriği, %

m_s : Özütlemeye kullanılan susam kepeği miktarı, g

$\%_{\text{protein,kepek}}$: Susam kepeğinin protein içeriği, %

3.2.5.1.2. Viskozim L, alkalaz ve enzim + ultrasses destekli özütlerin % protein verimi

Viskozim L, alkalaz ve enzim + ultrasses destekli özütleme yöntemleri ile elde edilen özütlerin % protein verimi değerleri, aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır. Hesaplamalarda, özütlemeye kullanılan enzimden gelen protein çıkarılmıştır.

$$\% \text{ protein verimi} = \frac{(V_{\text{ç}})(\%_{\text{protein,özüt}}) - (V_{\text{e}})(\%_{\text{protein,enzim}})}{(m_s)(\%_{\text{protein,kepek}})} \times 100$$

$V_{\text{ç}}$: Özütlemeye kullanılan çözgen miktarı, mL

$\%_{\text{protein,özüt}}$: Özütün protein içeriği, %

V_{e} : Özütlemeye kullanılan enzim miktarı, %

$\%_{\text{protein,enzim}}$: Özütlemeye kullanılan enzimin protein içeriği, %

m_s : Özütlemeye kullanılan susam kepeği miktarı, g

$\%_{\text{protein,kepek}}$: Susam kepeğinin protein içeriği, %

3.2.6. Optimum Koşullarda Elde Edilen Protein Özütlerine Uygulanan Analizler

Viskozim L ve alkalaz ile enzim destekli, ultrases destekli ve enzim + ultrases destekli özütleme işlemleri ile elde edilen özütlerin protein verimi, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite sonuçları göz önüne alınarak optimizasyon ve verifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Her bir işlem için belirlenen optimum koşullarda üretilen özütlerin, SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat – poliakrilamid jel elektroforezi) analizi ile protein fraksiyonları belirlenmiş ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüleme analizleri yapılmıştır.

3.2.7. Analizler

3.2.7.1. Toplam kuru madde miktarı

Toplam kuru madde analizi için ilk olarak kullanılan tartım kapları, sabit tartıma gelmeleri için etüvde (Lab. Companion ON-11E, Güney Kore) 105 °C'de iki saat bekletilmiş ve desikatörde soğutulmuştur. Ardından $2 \pm 0,01$ g tartılan susam kepeği, etüvde (105 °C) sabit tartıma ulaşıncaya dek bekletilmiş, etüvden çıkarılıp desikatörde soğutulduktan sonra yeniden tartılmıştır (AOAC, 1998). Sonuçlar %KM (kuru madde) cinsinden, aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{KM} = [(m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)] \times 100$$

m_0 : Tartım kabı darası (g)

m_1 : Kurutma öncesi tartım kabı darası + örnek ağırlığı (g)

m_2 : Kurutma sonrası tartım kabı darası + örnek ağırlığı (g)

3.2.7.2. Toplam mineral madde miktarı

Toplam mineral madde miktarı (kül) tayini, AOAC (1988) resmi metoduna göre yapılmıştır. Porselen krezeler, sabit tartıma gelmeleri için etüvde (105 °C) iki saat bekletilmiş ve desikatörde soğutulmuştur. Ardından kroze içerisine $1 \pm 0,01$ g örnek tartılmış, kül fırınında (MagmaTherm MT1110-E4, Türkiye) 550 °C

sıcaklıkta 6 saat yakıldıktan sonra kalan ağırlık üzerinden toplam mineral madde (kül) miktarı yüzdesel olarak belirlenmiştir.

3.2.7.3. Toplam protein miktarı

Toplam protein miktarı tayini, Kjeldahl yöntemine (AOAC, 1998) göre yapılmıştır. Analizler, yarı otomatik Kjeldahl sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz; yakma, distilasyon ve titrasyon olmak üzere üç aşamadan meydana gelmektedir.

İlk aşamada Kjeldahl yakma tüpüne 1 g örnek, bir adet katalizör tablet (3,5 g potasyum sülfat ve 0,4 g bakır sülfattan oluşan) ve 25 mL konsantre sülfürik asit eklenmiş; ardından tüpler yakma ünitesine (Velp Scientifica DK6, İtalya) yerleştirilmiştir (Şekil 3.5 (a)). Bu aşamada 420 °C'de bir saat yakma işlemi gerçekleştirilmiş ve tüpler bir saat oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır.

İkinci aşamada tüpler, distilasyon ünitesine (Velp Scientifica UDK132, İtalya) yerleştirilmiştir. Distilasyon ünitesinde örnekteki azotlu bileşiklerin toplanacağı diğer kısma bir erlen içerisine 50 mL %4'lük borik asit çözeltisi ve 2 – 3 damla indikatör (etanollü % 0,3'lük metilen kırmızısı : etanollü %0,1'lik metilen mavisi, 1:1 (v/v)) eklenmiş ve başlama komutu verilmiştir. Distilasyon işlemi esnasında öncelikle yakma tüpü içerisine 50 mL saf su, ardından 100 mL %33'lük sodyum hidroksit (w/v) çözeltisi eklenmiş ve 5 dk.'lık distilasyon işlemi başlatılmıştır. Bu işlem esnasında yakma tüpü içerisinde kaynayıp buharlaşan ve ardından yoğunlaşan azotlu bileşenler, erlen içerisinde borik asit tarafından hapsedilmiştir (Şekil 3.5 (b)).

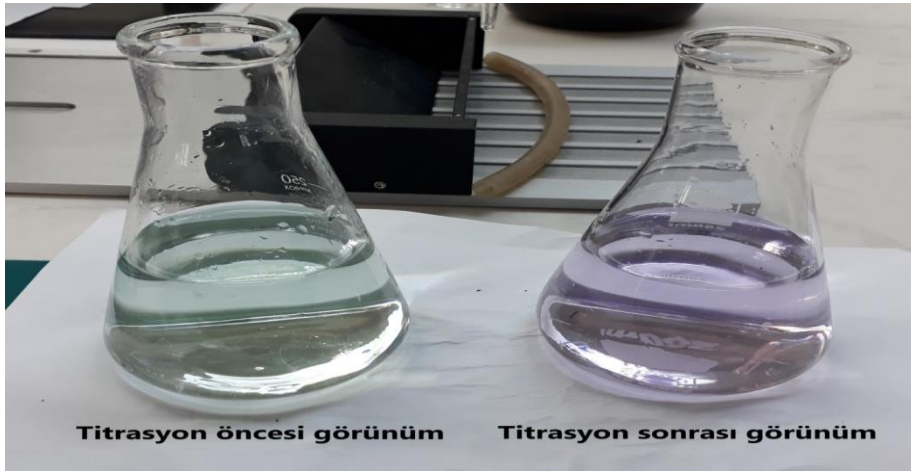
Son aşamada ise büret içerisine titrant olarak ayarlı 0,01 N hidroklorik asit çözeltisi doldurulmuş ve distilasyondan çıkan, erlen içerisindeki yeşil renkli çözelti titre edilmiştir. Oluşan renk soğan kabuğu rengine döndüğü an titrasyon işlemi durdurulmuş ve harcanan 0,01 N hidroklorik asit miktarı not edilmiştir (Şekil 3.6).



(a)

(b)

Şekil 3.5. (a) Kjeldahl yakma ünitesi içerisinde yer alan örnekler; (b) Kjeldahl yöntemi için distilasyon aşaması



Şekil 3.6. Titrasyon işlemi öncesi ve sonrasında örneklerin genel görünümü

Sonuçlar aşağıdaki eşitlik yardımı ile “% protein miktarı” cinsinden ifade edilmiş ve hesaplamada azot dönüşüm faktörü ‘6,25’ olarak alınmıştır (Johnson vd., 1979).

$$\% \text{ Protein} = \frac{(0,014)(\text{HCl normalitesi, N})(\text{Titrasyonda harcanan HCl miktarı, mL})(6,25)}{(\text{Örnek miktarı, g veya mL})} \times 100$$

3.2.7.4. Toplam fenolik madde miktarı

Toplam fenolik madde analizi, Sarkis vd. (2014)’nin önerdiği yönteme göre, bazı modifikasyonlar ile spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Özütlere 30 µL alınıp, 2,37 mL deiyonize su ve 150 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ile oda sıcaklığında karıştırılmış ve karanlıkta 8 dk. bekletilmiştir. Ardından 450 µL doygun sodyum karbonat çözeltisi eklenmiş ve vorteksenerek karıştırılmıştır. Etüvde 40 °C sıcaklıkta 30 dk. bekletilen karışımın 750 nm dalga boyundaki absorptans değeri UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu V-1800, Japonya) ile ölçülmüştür. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi için protein özütü yerine farklı konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri kullanılmış ve analiz aynı şartlarda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, elde edilen kalibrasyon eğrisi ve örneklerin absorptans değerleri kullanılarak “mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g örnek” cinsinden ifade edilmiştir. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi, Ek 3-1’de verilmiştir.

3.2.7.5. Antioksidan kapasite

Örneklerin antioksidan kapasite değerleri, DPPH ve ABTS yöntemlerine göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. DPPH yöntemi için kalibrasyon eğrisi, örnek yerine farklı konsantrasyonlarda troloks kullanılarak, aynı analiz koşullarının gerçekleştirilmesi ile edilmiştir. ABTS yöntemi için kalibrasyon eğrisi ise, troloksun farklı konsantrasyonlarına karşı yüzde inhibisyon sonuçları ile elde edilen eğri ile oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrileri ile örneklerin absorptans ve yüzde inhibisyon sonuçları kullanılarak, antioksidan kapasite değerleri “µmol Troloks eşdeğeri (TE)/g örnek” cinsinden ifade edilmiştir. DPPH ve ABTS yöntemleri için oluşturulan kalibrasyon eğrileri, sırası ile Ek 3-2 ve Ek 3-3’te verilmiştir.

3.2.7.5.1. DPPH yöntemi ile antioksidan kapasite

DPPH yöntemi ile antioksidan kapasite tayini, Grajeda-Iglesias vd. (2016)'ne göre, bazı modifikasyonlar ile yapılmıştır. Öncelikle 0,1 mL özüt üzerine 2,9 mL 0,1 mM etanolde hazırlanmış DPPH çözeltisi eklenip çalkalanmış ve oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dk. bekletilmiştir. Ardından absorbans değeri, 517 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu V-1800, Japonya) ölçülmüştür.

3.2.7.5.2. ABTS yöntemi ile antioksidan kapasite

ABTS yöntemi ile antioksidan kapasite tayini, Cemeroğlu (2010)'na göre, bazı modifikasyonlar ile yapılmıştır. ABTS radikalinin hazırlanması için ilk olarak 0,0384 g ABTS tartılıp, bir miktar saf suda çözündürülerek kayıpsız bir şekilde 10 mL'lik bir balon jojeye aktarılmıştır. Ayrıca hazırlanan 12,25 mM potasyum persülfat çözeltisinden 2 mL alınarak bu balon jojeye ilave edilmiştir. Ardından balon joje, saf su ile hacmine tamamlanmıştır. Elde edilen karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 12 – 16 saat bekletilmiş ve böylelikle, 2,45 mM potasyum persülfat içeren 7 mM ABTS radikal çözeltisi elde edilmiştir. PBS (Phosphate buffer saline: tuzlu fosfat tampon, pH 7,4) çözeltisinin hazırlanması için öncelikle ise 19 mL 0,2 M monobazik sodyum fosfat çözeltisi ile 81 mL 0,2 M dibazik sodyum fosfat çözeltileri karıştırılmıştır. Ardından bu karışıma 8,77 g sodyum klorür eklenip, 1 L'lik balon joje içerisinde saf su ile hacmine tamamlanmıştır.

Analiz için öncelikle ABTS radikal çözeltisi, PBS çözeltisi ile UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu V-1800, Japonya) 734 nm dalga boyunda absorbans değeri 0,700 ($\pm 0,02$) olana dek seyreltilmiştir. Seyreltilen ABTS radikal çözeltisinden spektrofotometre küvetine 2,98 mL aktarılıp, başlangıç (0. dk.) absorbans değeri not edilmiştir. Ardından radikalın bulunduğu küvete 20 μ L özüt ilave edilip kronometre başlatılmıştır. Altı dakika sonunda 734 nm dalga boyundaki absorbans değeri (6. dk.) de not edilmiş ve yüzde inhibisyon değeri, aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = \left[\frac{((0. \text{ dk. absorbans}) - (6. \text{ dk. absorbans}))}{(0. \text{ dk. absorbans})} \right] \times 100$$

3.2.7.6. SDS-PAGE ile protein fraksiyonu

Optimum işlem parametrelerinde elde edilen özütlerin protein fraksiyonları, Laemmli (1970)'ye göre poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmiştir.

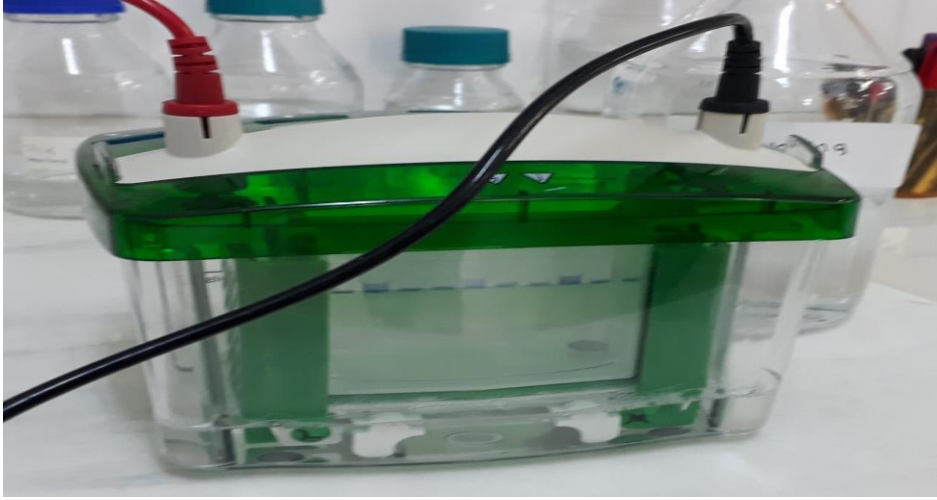
Öncelikle proteinlerin yürütüleceği jelleri hazırlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. İlk olarak akrilamid/bis çözeltisinin hazırlanması için 87,6 g %29,2'lik akrilamid ile 2,4 g %0,8'lik N'N'-bis-metilen-akrilamid karıştırılmış ve deiyonize su ile 300 mL'ye tamamlanmıştır. SDS çözeltisi ise %10 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Üst jelde kullanılmak üzere 27,23 g %18,15'lik tris bazı 80 mL deiyonize su ile karıştırılmış, pH değeri 6 N HCl ile 8,8'e ayarlandıktan sonra son hacim 150 mL'ye tamamlanmıştır. Böylelikle 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 elde edilmiştir. Alt jelde kullanılmak üzere ise 6 g tris bazı ile 60 mL deiyonize su karıştırılmış, pH değeri 6 N HCl ile 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye tamamlanarak 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 elde edilmiştir. Örnek tamponu, 3,55 mL deiyonize su, 1,25 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 2,5 mL gliserol, 2 mL %10'luk SDS, %0,5 (w/v)'lik bromfenol mavisi karıştırılarak toplamda 9,5 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Elektroforez sistemine dökülecek elektrot tamponu için ise 30,3 g tris bazı, 144 g glisin ve 10 g SDS ile karıştırılıp son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

Jeller, alt jel (yürütme jeli) %17'lik ve üst jel %4'lük olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu kapsamda, hazırlanan çözeltilerden üst jelin eldesi için 6,1 mL deiyonize su, 1,3 mL akrilamid/bis, 2,5 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) ve 0,1 mL %10'luk SDS karıştırılmış ve 50 µL %10'luk amonyum persülfat (APS) çözeltisi ile 5 µL TEMED eklenmiştir. Alt jelin eldesi için ise 1,7 mL deiyonize su, 5,7 mL akrilamid/bis, 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) ve 0,1 mL %10'luk SDS karıştırılmış ve 50 µL %10'luk amonyum persülfat (APS) çözeltisi ile 10 µL TEMED eklenmiştir. Örnek tamponu, kullanım öncesi 95:5, v/v oranında β-merkaptoetanol ile karıştırılmıştır. Karışımlar sonucu elektroforez sistemine önce alt, sonra üst jelin dökülüp donması beklenmiştir. Jeller donduktan sonra üst jelde yer alan tarak hafifçe çıkarılmış ve örneklerin yükleneceği oyuklar elde edilmiştir.

Elektroforez sistemine yüklenecek örnekler ise, örnek tamponu:özüt (1:1, v/v) oranında karıştırılmıştır. Elde edilen örnekler, denatürasyon işlemi yapılarak (95

°C sıcaklıkta 5 dk. boyunca) ve yapılmadan olmak üzere iki farklı şekilde jelle yüklenmiştir.

Jelde yer alan oyuklara 25'er µL örnek yüklendikten sonra elektroforez sistemi (Bio-rad PowerPac Basic, ABD) 90 V akımda bir saat çalıştırılarak proteinler elektrik alanında yürütülmüştür. Yürütülen jel, coomassie brilliant blue içerisinde bir saat boyunca hafifçe çalkalanmış ve ardından boya çıkarma çözeltisi (asetik asit:metanol:su, 1:4:5, v/v/v) içerisinde de çalkalayıcıda 12 saat bekletilmiştir. Son olarak ise protein bantlarının elde edildiği jel fotoğraflanmıştır. Standart olarak ise, 11-245 kDa kütle aralığında protein işaretleyicileri kullanılmıştır.



Şekil 3.7. Örneklerdeki proteinlerin elektroforez sisteminde yürütülmesi

3.2.7.7. SEM ile hücre yapısının görüntülenmesi

Çalışmada hammadde olarak kullanılan susam kepeği ile özütlemeye işlemleri sonucu elde edilen susam kepekleri, taramalı elektron mikroskobu (Zeiss Gemini Sigma 300 VP, Almanya) ile görüntülenerek kepeklerin hücre yapıları incelenmiştir. Örnekler, görüntüleme öncesi altın ile kaplanmış ve 1000X büyütme ile fotoğraflanmıştır.

3.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler

Verilerin istatistiki değerlendirilmesi SPSS paket programı (SPSS 7.0, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen verilerde, sonuçlar üzerine parametrelerin etkisi varyans analizi (ANOVA) ile tespit edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılık ($P < 0,05$) Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Optimizasyon, Design-Expert (Design-Expert 7.0, USA) adlı istatistik programı kullanılarak yanıt yüzey metodu (Response Surface Methodology, RSM) uygulanarak yapılmıştır. Deneysel veriler ikinci derece polinom modeline örtüştürülmüş ve regresyon katsayıları çoklu doğrusal regresyon ile elde edilmiştir:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

Burada Y tahmin edilen bağımlı değişken; X_i ve X_j , Y değerini etkileyen bağımsız değişkenler ($i \neq j$); β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} sırasıyla kesişim, doğrusal, ikinci dereceden ve etkileşim terimlerinin regresyon katsayılarıdır; k ise değişken sayısını ifade etmektedir.

Modelin doğruluğu, programın ANOVA çıktıları olan uyum eksikliği (lack of fit), uyum katsayısı (R^2) ve Fisher test değerine (F-değeri) göre değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Özütleme İşlemlerinde Kullanılan Susam Kepeğinin Analizleri

Özütleme işlemlerinde hammadde olarak kullanılan kurutulmuş ve öğütülmüş susam kepeğine, bazı temel özelliklerinin belirlenmesi açısından toplam kuru madde, toplam mineral madde (kül), toplam protein, TFM ve DPPH ile ABTS yöntemleri ile gerçekleştirilen TEAK (troloks eşdeğeri antioksidan kapasite) analizleri uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Özütleme işlemlerinde kullanılan susam kepeğinin %11,4 protein içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Susam kepeği, özütleme çalışmalarına en fazla konu olan kepeklerden yulaf kepeği (%17,6) (Guan ve Yao, 2008), pirinç kepeği (%12,6) (Jiamyangyuen vd., 2005) ve buğday kepeği (%15,9) (Noort vd., 2010) ile karşılaştırılabilir protein içeriğine sahiptir. Bu nedenle, özellikle susam yağı ve ülkemizde tahin üretim proseslerinden atık olarak çıkan susam kepeği de, bitkisel bir protein kaynağı olarak değerlendirilebilme potansiyeline sahiptir.

Zhou ve Yu (2004), buğday kepeğinden fenolik madde özütlenmesinde farklı çözenlerin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında %70’lik metanol, % 70’lik etanol ve %50’lik aseton çözeltileri için TFM değerlerini sırasıyla 1,00, 0,84 ve 2,63 mg GAE/g; TEAK (ABTS) değerlerini ise sırasıyla 7,83, 9,23 ve 15,26 μ mol TE/g olarak bulgulamışlardır. Sonuç olarak, en uygun çözenin %50’lik aseton çözeltisi olduğunu rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada, farklı pirinç kepeği örneklerinde yapılan TFM analizleri sonucunda elde edilen değerlerin ise 2,51 – 3,59 mg GAE/g aralığında olduğu rapor edilmiştir (Iqbal vd., 2005). Literatür bulguları ile kıyaslandığında susam kepeğinin TFM ve TEAK (ABTS) değerlerinin, buğday ve pirinç kepeği gibi farklı gıda atıkları veya yan ürünlerinden daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.1. Uygulamalarda kullanılan susam kepeğinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Analiz	Birim	Değer*
Kuru madde	%	96,4 ± 0,07
Mineral madde	%	20,8 ± 0,11
Protein	%	11,4 ± 0,31
TFM	mg GAE/g	6,03 ± 0,25
TEAK (DPPH)	µmol TE/g	4,96 ± 0,09
TEAK (ABTS)	µmol TE/g	42,1 ± 0,12

*Değerler "ortalama ± standart sapma" olarak verilmiştir (n=3).

4.2. Alkali Yöntem ile Elde Edilen Özüte Ait Analiz Sonuçları

Alkali özütleme teknolojik olarak bitkisel materyallerden protein özütlenmesinde kullanılan yöntemdir. Alkali özütleme, aynı zamanda, bitkisel materyallerden protein özütleme çalışmalarında kontrol yöntemi olarak kullanılmaktadır (Shen vd., 2008). Bu özütleme tekniğinde enzim, ultrases veya mikrodalga gibi özütleme verimini olumlu veya olumsuz yönde etkileyen herhangi bir işlem uygulanmamakta; hammaddedeki proteinler bir çözgen içerisinde, alkali ortam sağlanarak özütlenmektedir. Tez çalışması kapsamında uygulanan farklı özütleme tekniklerinin etkinlik açısından kıyaslanması amacıyla alkali yöntem ile protein özütleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen alkali özüte, diğer özütleme uygulamalarında da gerçekleştirilen toplam protein, TFM ve TEAK (DPPH ve ABTS yöntemleri ile) analizleri uygulanmış, analiz sonuçları ise Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Hourigan vd. (1997), pirinç kepeğinden alkali yöntem ile özütleme işlemi sonucu protein veriminin %25,4 olduğunu rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise buğday kepeğinden alkali özütleme sonucu elde edilen protein veriminin %18,5 olduğu bildirilmiştir (Zhou vd., 2010). Kim vd. (2006), farklı buğday kepeklerinden alkali özütleme sonucunda serbest fenolik asitler için 0,10 – 0,15 mg GAE/g ve bağlı fenolik asitler için ise 2,15 – 2,33 mg GAE/g aralığında değerler elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Torre vd. (2008) ise mısır koçanı kullanarak elde ettikleri alkali özütte TFM miktarını 5,00 mg KAE/g olarak

bildirmişlerdir. Literatür sonuçları dikkate alındığında, susam kepeğinden alkali özütleme sonucu elde edilen protein verimi ve fenolik madde miktarının, farklı kepek ve gıda atığı türlerinden edinilen değerler ile benzeştiği görülmektedir.

Çizelge 4.2. Alkali yöntem ile elde edilen özütlerle ait analiz sonuçları

Analiz	Birim	Değer*
Protein	% verim	24,5 ± 3,94
TFM	mg GAE/g	3,45 ± 0,22
TEAK (DPPH)	µmol TE/g	2,53 ± 0,02
TEAK (ABTS)	µmol TE/g	35,1 ± 0,89

*Değerler "ortalama ± standart sapma" olarak verilmiştir.

4.3. Susam Kepeğinden Protein Özütlemeye İşlem Parametrelerinin Etkilerinin Belirlenmesi ve Optimizasyon Çalışmaları

Çalışma kapsamında, susam kepeğinden protein özütlemeye enzimatik özütleme (viskozim L ve alkalaz ile), ultrases destekli özütleme ve enzim ile ultrases kombine özütleme işlemlerinin etkileri, her bir yönteme ait işlem parametrelerinin etkileri değerlendirilerek RSM ile belirlenmiştir.

Susam kepeğinden protein özütleme işlemlerinin etkinliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan bağımlı değişkenler, yapılan literatür çalışmalarının incelenmesi sonucu belirlenmiştir. Protein verimi, hammaddede mevcut olan toplam protein miktarının özütleme işlemi sonucunda ne kadarlık bir kısmının (% cinsinden) elde edilebildiğini ifade eden bir kavram olup, protein özütleme çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir parametre olduğu gözlenmiştir (Wani vd., 2008). Bu nedenle protein verimi, özütleme işlemlerinde değerlendirilmek üzere bir bağımlı değişken olarak seçilmiştir. Protein özütleme işlemleri esnasında hammaddeden çözünebilir, protein dışında bileşenlerin de geçtiği bildirilmektedir (Wang vd., 2006). Özellikle sağlık üzerine olumlu etkiler ile ilişkilendirilen bu bileşenler, elde edilen protein özütlerine fonksiyonel özellikler de katabilmektedir (Dai ve Mumper, 2010). Bu bileşenlerden birisi olan fenolik maddelerin de protein özütleme çalışmalarında değerlendirilen bir parametre olduğu gözlenmiş ve toplam fenolik madde miktarı, diğer bir bağımlı değişken olarak seçilmiştir. Antioksidan bileşiklerin, vücutta oksidasyon tepkimelerini

engelleme ve yaşlandırmayı geciktirme gibi sağlık üzerine olumlu etkilere sahip oldukları bildirilmektedir (Koçyiğit vd., 2018). Antioksidan kapasite ise, antioksidan özellikteki bileşen miktarının troloks veya gallik asit gibi referans bir bileşik cinsinden ifade edildiği bir analiz yöntemidir (Proestos vd., 2006). Bu nedenle, çalışmalarda antioksidan kapasite (DPPH ve ABTS yöntemleri ile) değeri de bir diğer bağımlı değişken olarak değerlendirilmiştir.

Ayrıca, her bir yöntemle elde edilen sonuçlar baz alınarak yapılan optimizasyon çalışmaları ile en uygun işlem parametreleri belirlenmiştir. Her bir özütleme işlemi için işlem parametrelerinin etkisinin belirlenmesinin ardından, işlem parametrelerinin optimum değerleri Design Expert programı kullanılarak belirlenmiştir. Optimizasyon sürecinde, özütlerde en yüksek protein ve fenolik madde miktarını sağlayan işlem parametre değerlerine ulaşılmaya çalışılmıştır. Bu nedenle, programda TFM, TEAK (DPPH) ve TEAK (ABTS) değerlerinin maksimuma yakın olduğu optimum işlem parametresinin bulunması amaçlanmıştır.

4.3.1. Viskozim L ile Enzimatik Özütlemeye İşlem Parametrelerinin Etkisi

Viskozim L, asidik koşullarda optimum faaliyet gösteren selülotik bir enzim karışımıdır (Rosset vd., 2012). Literatürde viskozim L'nin farklı gıda yan ürünleri veya atıklarından, protein ve yağ gibi farklı bileşenlerin özütlenmesinde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Guan ve Yao, 2008; Agarwal ve Bosco, 2014). Tez çalışması kapsamında, viskozim L ile enzimatik özütleme işlemine ait bağımsız değişkenler enzim oranı (susam kepeğinin yüzdesi cinsinden), pH değeri, işlem sıcaklığı ve işlem süresi olarak belirlenmiştir. Bu işlemlerde kullanılan pH aralığı, viskozim L'nin optimum çalışma koşulları göz önünde bulundurularak belirlenmiştir.

Merkezi tümleşik tasarıma göre programın belirlediği toplam 28 deney için bağımsız değişkenlerin değerleri ve bağımlı değişkenler olarak deneyler sonucu elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.3'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, protein veriminin %31,0 ile %44,8; TFM miktarının 1,57 ile 2,88 mg GAE/g; TEAK (DPPH) değerinin 0,49 ile 4,96 $\mu\text{mol TE/g}$; TEAK (ABTS) değerinin ise 19,8 ile 35,7 $\mu\text{mol TE/g}$ arasında değiştiği görülmektedir.

TEAK değerleri ele alındığında, antioksidan kapasite sonuçlarının kullanılan yöntemle bağlı olarak değişiklik gösterebildiği bildirilmektedir (MacDonald-Wicks vd., 2006). Her gıdada yer alan antioksidan ve oksidan bileşenler farklı tepkime hızı ve sabitlerine sahip olup, analizin gerçekleştirildiği koşullar, gıdanın tipi ve kullanılan ölçüm yöntemi de antioksidan kapasite sonuçlarını etkileyen faktörlerdir (MacDonald-Wicks vd., 2006). Örnek olarak, gıdalalarda DPPH ve ABTS yöntemleri ile elde edilen antioksidan kapasite sonuçlarındaki korelasyonun meyve ve içeceklerde yüksek, ancak sebzelerde ise düşük olduğu bildirilmektedir (Floegel vd., 2011). Birçok sebze DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite değerlerinin, ABTS yöntemi ile elde edilene kıyasla çok daha düşük olduğu bulgulanmıştır. Bu iki yöntem ile yapılan ölçüm sonuçlarındaki farklılıkların nedenlerinden birisi olarak DPPH'in sadece hidrofobik sistemlerde, ABTS radikalinin ise hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan sistemlerde uygulanabilmesi gösterilmektedir (Floegel vd., 2011). Ayrıca, proteinlerin glukoz ve diğer indirgen şekerler ile enzimatik olmayan tepkimelerinden oluşan protein glikasyon ürünlerinin, ortamda serbest radikal oluşumunu artırarak antioksidan kapasite değerlerini etkilediği bildirilmektedir (Kim ve Kim, 2003). Bu bulgular, tez çalışması kapsamında DPPH ve ABTS yöntemleri ile elde edilen TEAK değerlerindeki farklılıkların nedenleri arasında gösterilebilir.

Viskozim L ile deneysel tasarıma ait model regresyon katsayıları ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir. Uyum katsayısı (R^2) değeri, bir modelin matematiksel açıdan tutarlılığını gösteren bir değer olup 0 ile 1 arasında bir sayıdır; sayının bire yaklaşması, modelin tutarlılığını artırmaktadır (Liu vd., 2008). Uyum katsayıları (R^2) protein verimi için 0,9730; TFM için 0,9962; TEAK (DPPH) için 0,9992 ve TEAK (ABTS) için 0,9683 olarak bulunmuştur. Bir model üzerinden sonuçların yorumlanıp yorumlanamayacağının belirlenmesinde kullanılan uyum eksikliği (lack of fit) testine (Silva vd., 2007) göre tüm bağımlı değişkenlerin uyum eksikliği, istatistiki açıdan önemsiz ($P>0,05$) olarak belirlenmiştir. Bu da modelin deneysel veri için uygunluğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4 incelendiğinde, herbir bağımsız değişkenin (enzim oranı, pH, sıcaklık ve süre) de protein verimi üzerinde etkili olduğu ($P<0,001$) görülmektedir. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *enzim oranı x pH* ($P<0,05$)'nin negatif, *enzim oranı x süre* ($P<0,01$) ve *sıcaklık x süre* ($P<0,001$)'nin pozitif etkileşimleri, protein verimi üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Deneyisel tasarımda yer alan dört bağımsız değişkenin (enzim oranı, pH, sıcaklık ve süre) TFM miktarı üzerinde de etkili olduğu ($P<0,001$) görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *enzim oranı x pH* ($P<0,001$), *enzim oranı x sıcaklık* ($P<0,001$) ve *enzim oranı x süre* ($P<0,001$)'nin negatif; *pH x süre* ($P<0,05$) ve *sıcaklık x süre* ($P<0,01$)'nin ise pozitif etkileşimleri, TFM miktarı üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Enzim oranı, pH, sıcaklık ve süre parametrelerinin, TEAK (DPPH) değerini de etkilediği ($P<0,001$) görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise tüm etkileşimler, TEAK (DPPH) üzerine istatistiki olarak anlamlı ($P<0,001$) bulunmuştur.

İşlem parametrelerinden enzim oranı ($P<0,05$), pH ($P<0,001$), sıcaklık ($P<0,001$) ve sürenin ($P<0,001$) TEAK (ABTS) değerini de etkilediği görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *pH x süre* ($P<0,05$) ve *sıcaklık x süre* ($P<0,01$)'nin pozitif etkileşimleri, TEAK (ABTS) değeri üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Yanıt yüzey yönteminde bağımlı değişkenler olan protein verimi, TFM, TEAK (DPPH) ve TEAK (ABTS) değerlerine ait model denklemleri, enzim oranı (A), pH (B), işlem sıcaklığı (C) ve işlem süresine (D) bağlı olarak ve yalnızca istatistiki olarak anlamlı ($P<0,05$) model parametreleri kullanılarak sırasıyla aşağıda verilmiştir:

$$Y (\text{Protein verimi}) = 2,64905 + 16,60539x(A) + 11,95802x(B) - 0,17179x(C) - 0,048834x(D) - 2,31880x(AXB) + 0,10134x(AXD) + 0,00427576x(CXD) - 8,81440x(A^2) - 0,75714x(B^2) - 0,000687190x(D^2)$$

$$Y (TFM) = -2,56100 + 5,70840x(A) + 0,91690x(B) - 0,00130513x(C) + 0,013375x(D) - 0,40602x(AXB) - 0,038246x(AXC) - 0,00660287x(AXD) + 0,000857143x(BXD) + 0,000154545x(CXD) - 1,15051x(A^2) - 0,048844x(B^2) + 0,000512963x(C^2) - 0,000132094x(D^2)$$

Çizelge 4.3. Viskozim L enziminin etkisini belirlemede kullanılan merkezi tümleşik tasarım ve analizler sonucu elde edilen bağımlı değişkenlere ait değerler

Deney No*	Bağımsız değişkenler				Bağımlı değişkenler			
	Enzim oranı (%)	pH	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)	Protein verimi (%)	TFM (mg GAE/g)	TEAK (DPPH) (µmol TE/g)	TEAK (ABTS) (µmol TE/g)
1	0,53	4,3	40	65	38,1	2,56	2,66	29,9
2	0,29	3,4	33	38	31,0	1,57	3,00	23,2
3	0,53	2,5	40	65	32,5	1,99	4,06	23,0
4	0,53	4,3	40	10	34,7	2,00	4,49	25,4
5	0,53	6,0	40	65	41,8	2,82	4,96	27,0
6	0,53	4,3	55	65	41,8	2,99	0,49	35,7
7	0,29	3,4	33	93	31,5	1,69	2,03	19,8
8	0,53	4,3	40	65	39,1	2,53	2,62	28,6
9	0,29	5,1	48	93	39,9	2,88	3,02	33,2
10	0,76	3,4	48	93	41,0	2,54	1,67	31,8
11	0,29	5,1	33	38	38,8	2,19	4,05	25,8
12	0,76	5,1	48	38	39,5	2,69	2,60	28,6
13	0,53	4,3	40	120	40,2	2,31	2,45	31,0
14	0,29	3,4	48	93	35,6	2,19	2,17	30,3
15	0,76	3,4	48	38	35,2	2,51	3,42	26,7
16	0,76	5,1	48	93	44,8	2,85	1,61	36,1
17	0,53	4,3	40	65	39,7	2,55	2,64	26,7
18	0,29	3,4	48	38	32,9	1,95	4,15	26,7
19	0,76	5,1	33	38	38,8	2,65	3,78	24,5
20	0,53	4,3	40	65	39,2	2,54	2,64	28,9
21	0,76	3,4	33	38	35,2	2,32	3,65	25,1
22	0,29	5,1	48	38	38,0	2,52	4,30	28,4
23	0,29	5,1	33	93	37,0	2,35	3,67	24,1
24	0,76	3,4	33	93	36,8	2,30	2,93	21,8
25	0,76	5,1	33	93	40,0	2,67	3,64	24,9
26	1,00	4,3	40	65	40,0	2,66	2,86	29,5
27	0,05	4,3	40	65	35,0	1,93	3,62	26,4
28	0,53	4,3	25	65	37,8	2,35	1,47	22,4

*Harmanlanmış sıra

Çizelge 4.4. Viskozim L enziminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistikî analiz sonuçları ve model katsayıları

Model parametreleri	Katsayı	Protein verimi	TFM	TEAK (DPPH)	TEAK (ABTS)
Kesişim	β_0	2,64905 ^{***}	-2,56100 ^{***}	-6,76135 ^{***}	9,74179 ^{***}
Doğrusal					
Enzim oranı, A	β_1	16,60539 ^{***}	5,70840 ^{***}	8,21146 ^{***}	4,68344 [*]
pH, B	β_2	11,95802 ^{***}	0,91690 ^{***}	-3,58964 ^{***}	10,58983 ^{***}
Sıcaklık, C	β_3	-0,17179 ^{***}	-1,30513x10 ^{-3***}	0,86063 ^{***}	-0,25202 ^{***}
Süre, D	β_4	-0,048834 ^{***}	0,013375 ^{***}	-0,044052 ^{***}	-0,41369 ^{***}
Etikileşimli					
Enzim oranı x pH, A x B	β_{12}	-2,31880 [*]	-0,40602 ^{***}	-1,12180 ^{***}	-0,86617
Enzim oranı x Sıcaklık, A x C	β_{13}	0,059298	-0,038246 ^{***}	-0,19614 ^{***}	0,044211
Enzim oranı x Süre, A x D	β_{14}	0,10134 ^{**}	-6,60287x10 ^{-3***}	9,66507x10 ^{-3***}	0,064689
pH x Sıcaklık, B x C	β_{23}	-0,024286	-2,19048x10 ⁻³	-0,032476 ^{***}	0,012952
pH x Süre, B x D	β_{24}	-0,010208	8,57143x10 ^{-4*}	6,83117x10 ^{-3***}	0,023117 [*]
Sıcaklık x Süre, C x D	β_{34}	4,27576x10 ^{-3***}	1,54545x10 ^{-4**}	-1,14848x10 ^{-3***}	8,73939x10 ^{-3***}
İkinci derece					
Enzim oranı x Enzim oranı, A ²	β_{11}	-8,81440 ^{**}	-1,15051 ^{***}	2,82364 ^{***}	-4,28070
pH x pH, B ²	β_{22}	-0,75714 ^{**}	-0,048844 ^{***}	0,62272 ^{***}	-1,27211 ^{***}
Sıcaklık x Sıcaklık, C ²	β_{33}	1,36111x10 ⁻³	5,12963x10 ^{-4***}	-7,21296x10 ^{-3***}	5,74074x10 ⁻⁴
Süre x Süre, D ²	β_{44}	-6,87190x10 ^{-4**}	-1,32094x10 ^{-4***}	2,86639x10 ^{-4***}	-2,38292x10 ⁻⁴
R²		0,9730	0,9962	0,9992	0,9683
Ayarlanmış R²		0,9440	0,9922	0,9983	0,9342
p-değeri		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
F-değeri		33,51	245,36	1131,65	28,37
Uyum eksikliği (Lack of fit)		0,3771	0,0623	0,0521	0,8554

Önem düzeyleri: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Model denklemi: $Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_4D + \beta_{12}(Ax B) + \beta_{13}(Ax C) + \beta_{14}(Ax D) + \beta_{23}(Bx C) + \beta_{24}(Bx D) + \beta_{34}(Cx D) + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 + \beta_{44}D^2$

$$Y \text{ (TEAK (DPPH))} = -6,76135 + 8,21146x(A) - 3,58964x(B) + 0,86063x(C) - 0,044052x(D) - 1,12180x(AXB) - 0,19614x(AXC) + 0,00966507x(AXD) - 0,032476x(BXC) + 0,00683117x(BXD) - 0,00114848x(CXD) + 2,82364x(A^2) + 0,62272x(B^2) - 0,00721296x(C^2) + 0,000286639x(D^2)$$

$$Y \text{ (TEAK (ABTS))} = 9,74179 + 4,68344x(A) + 10,58983x(B) - 0,25202x(C) - 0,41369x(D) + 0,023117x(BXD) + 0,00873939x(CXD) - 1,27211x(B^2)$$

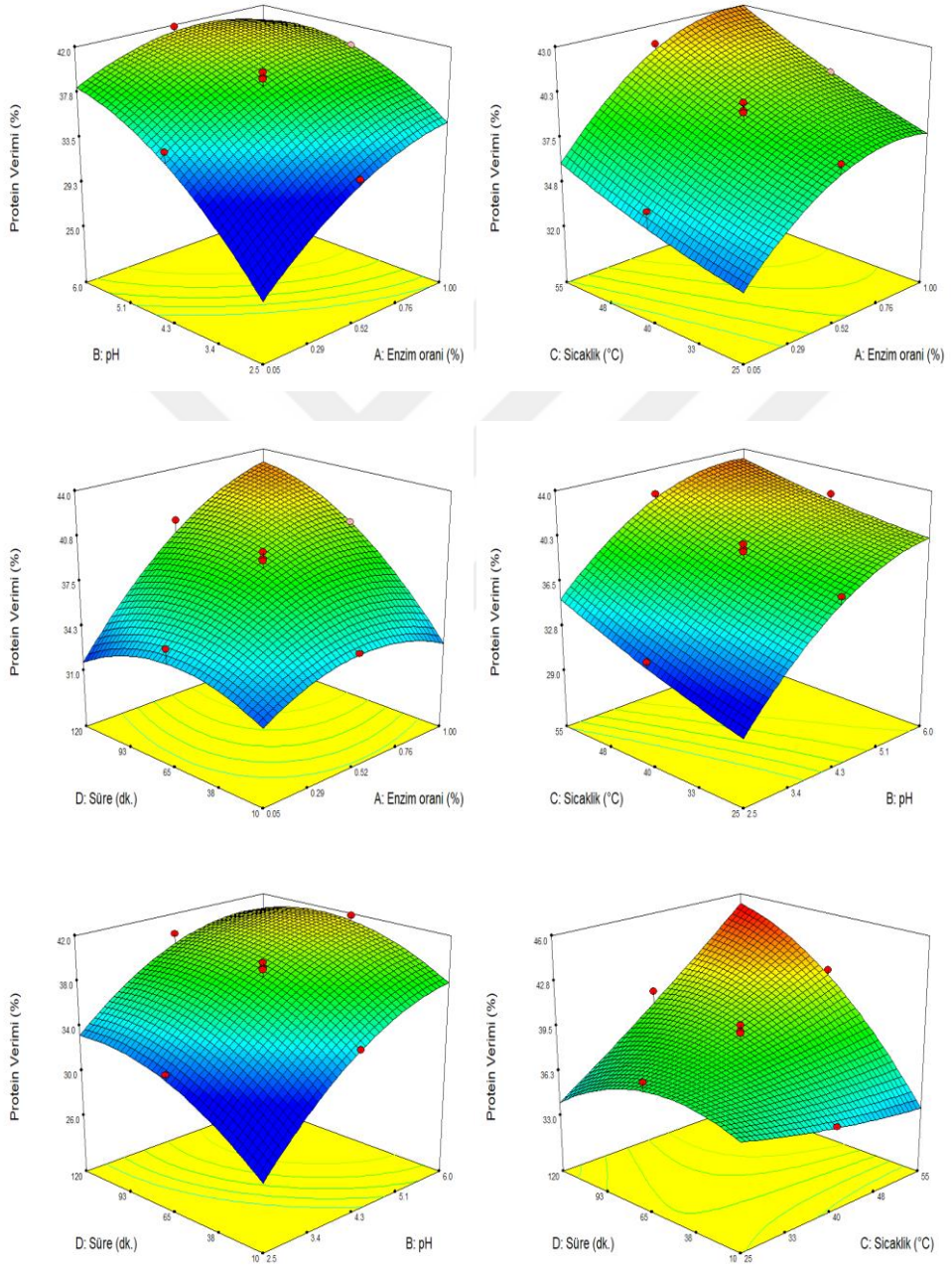
Bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri Şekil 4.1'de; TFM üzerine etkileri Şekil 4.2'de, TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri Şekil 4.3'te ve TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri ise Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere enzim oranı ve pH'nın artışıyla protein veriminin de belli bir noktaya kadar arttığı, sonrasında ise değişmediği görülmektedir. Viskozim L ile yulaf kepeğinden protein özütlemesini ele alan bir çalışmada da benzer bir durum, yani enzim oranının ve pH'nın artışının belirli bir noktaya kadar protein özütleme verimini artırdığı rapor edilmiştir (Guan ve Yao, 2008). Bağımsız değişkenlerden birisi olan sıcaklığın artışı ile birlikte protein veriminin de doğrusal bir artış gösterdiği gözlenmektedir. İşlem süresinin belli bir noktaya kadar artışı ile de protein verimi artmakta, ancak sürenin daha da artması durumunda protein veriminde düşüşün gerçekleştiği görülmektedir. Bazı proteinlerin, işlem süresi veya sıcaklığının artmasıyla çözünebilirliğinin düşmesi (Perez-Gago ve Krochta, 2001), bu durumun nedenlerinden birisi olarak görülebilir. Artan enzim oranı ve pH değerinin TFM miktarını belli bir noktaya kadar artırdığı ve sonrasında sabit bir duruma getirdiği görülmektedir (Şekil 4.2). İşlem sıcaklığının artışı ise TFM miktarını doğrusal olarak artırmıştır. İşlem süresinin artmasıyla TFM miktarı da belli bir noktaya kadar artmış, ardından azalış göstermeye başlamıştır. Şekil 4.3'te görüldüğü üzere TEAK (DPPH) değeri artan pH ile birlikte önce azalıp sonra artmış, artan sıcaklık değeriyle birlikte ise önce artış ve ardından azalış göstermeye başlamıştır. TEAK (ABTS) değeri, sıcaklığın artmasıyla birlikte artış göstermiş, enzim oranı ve pH'nın artması ile de belli bir noktaya kadar artış gösterip ardından sabit konuma gelmiştir (Şekil 4.4).

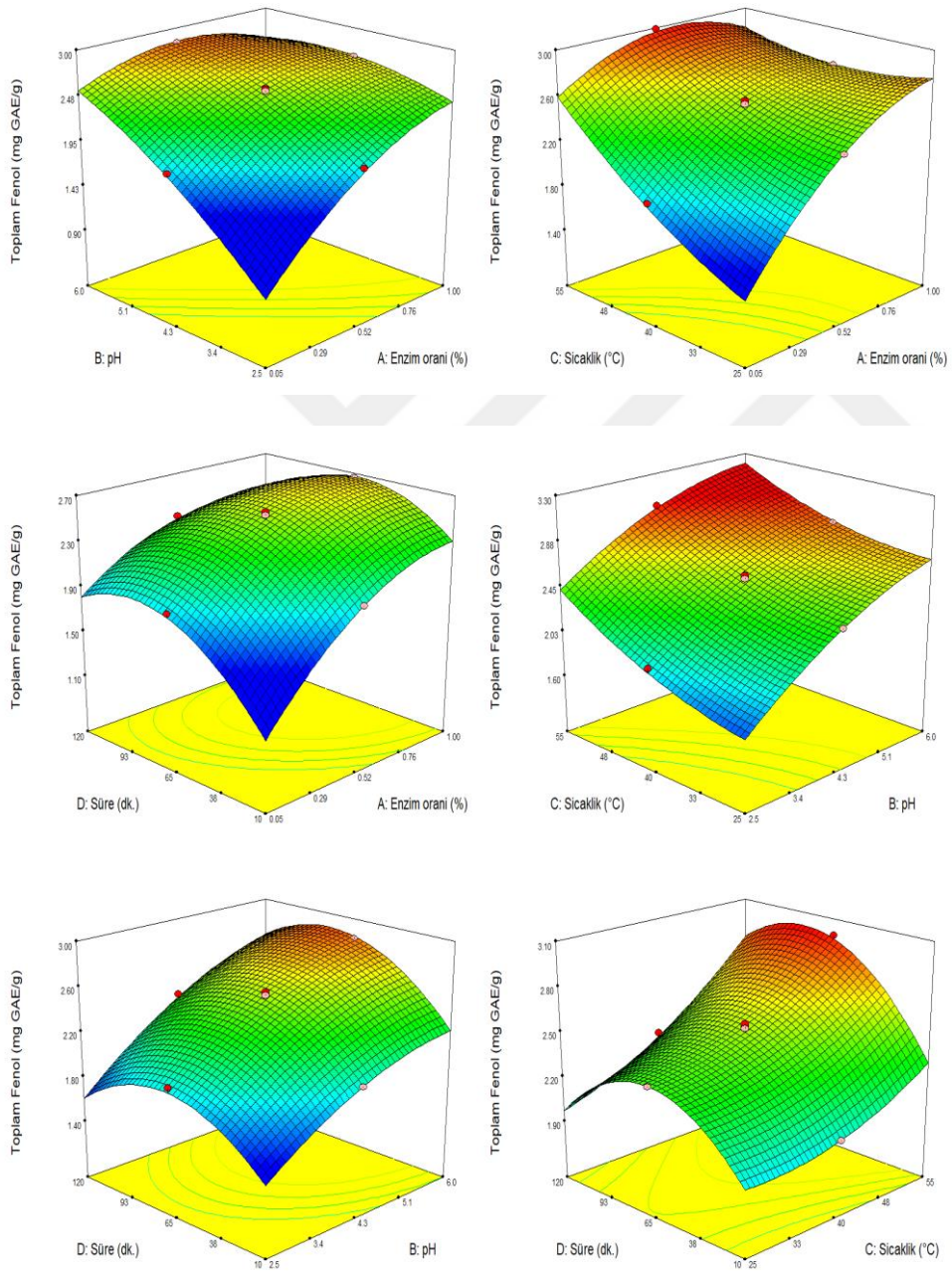
Viskozim L'nin kullanıldığı ve aynı bağımsız değişkenlerin ele alındığı bir çalışmada, enzimatik uygulamanın yulaf kepeğinden protein özütleme verimini %14,8'den %56,2'ye artırdığı bildirilmiştir (Liu vd., 2008). Aynı çalışmada optimum işlem parametreleri ise 30 FBG enzim konsantrasyonu, 2,8 saat işlem süresi, 4,6 pH ve 44 °C işlem sıcaklığı olarak bildirilmiştir. Bir başka çalışmada artan işlem sıcaklığının, elde edilen sonuçları destekler nitelikte protein verimini artırdığı rapor edilmiştir (Hourigan vd., 1997). Agarwal ve Bosco (2014), hindistan cevizinden viskozim L destekli hindistan cevizi yağı özütlemesini ele aldıkları çalışmalarında kullandıkları bağımsız değişkenlerden enzim miktarı ve

işlem süresinin pozitif etkileşiminin, özütlenen yağ verimi üzerinde istatistiki olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir.

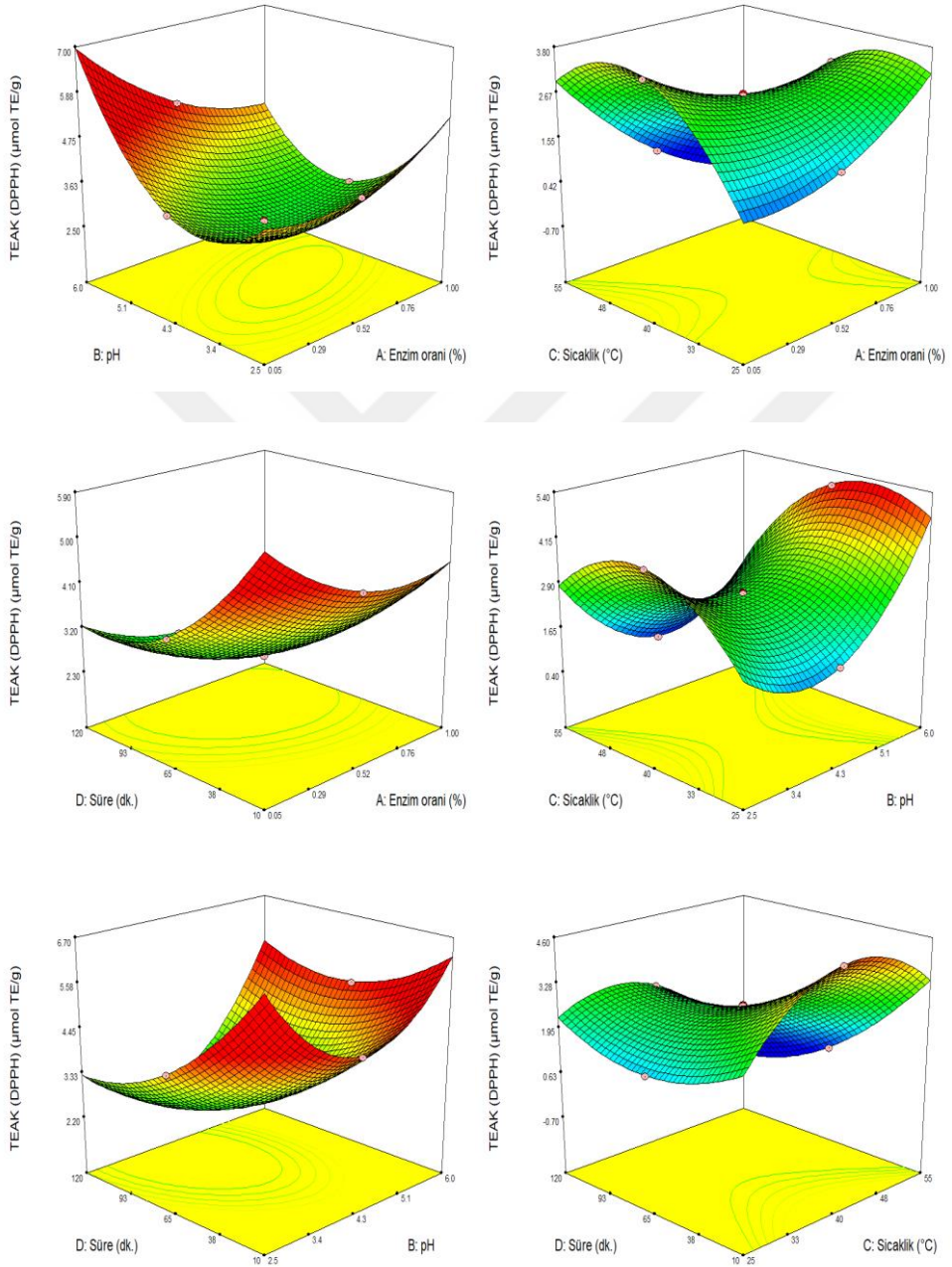
Sonuç olarak viskozim L ile enzimatik özütleme işleminin, hammaddeden protein ve fenolik madde özütlenmesinde verimi artıcı etkisi olduğu ifade edilebilir. Bu etki ise, viskozim L'nin özütleme işlemi esnasında hammaddenin hücre duvarı yapısına hasar vermesi sonucu hücre içerisindeki proteinlerin serbest hale geçmesi, böylece özütlenebilen protein miktarının artması ile açıklanmaktadır (Hanmoungjai vd., 2002).



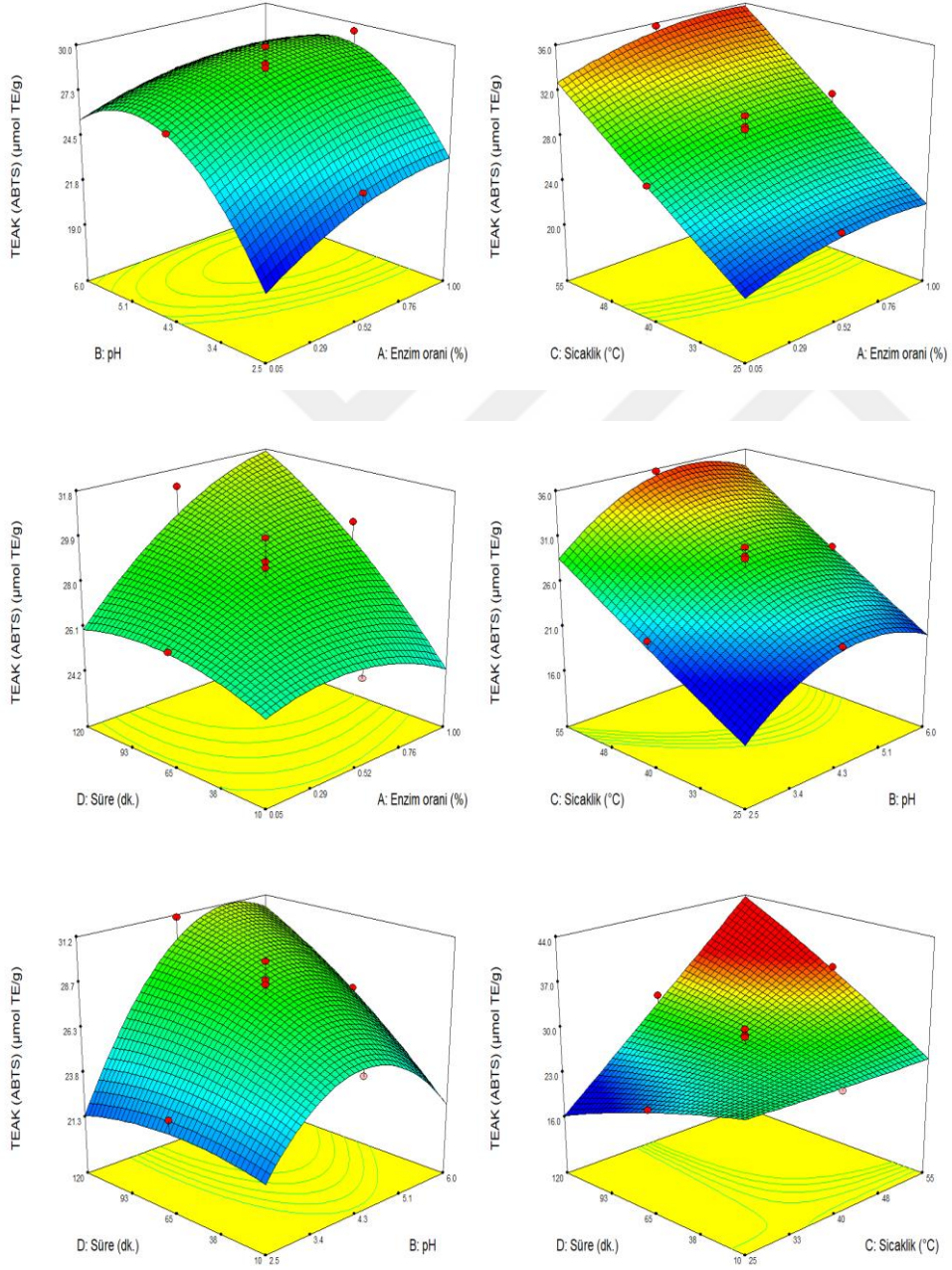
Şekil 4.1. Viskozim L ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri



Şekil 4.2. Viskozim L ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TFM miktarı üzerine etkileri



Şekil 4.3. Viskozim L ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri



Şekil 4.4. Viskozim L ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri

4.3.1.1. Viskozim L ile enzimatik özütlemeye ait işlem koşullarının optimizasyonu

Viskozim L ile enzimatik özütleme işlemi için yapılan optimizasyon çalışmasına göre optimum enzim oranı (A) %0,58, pH değeri (B) 6,0, işlem sıcaklığı (C) 51 °C ve işlem süresi (D) 117 dk. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Optimum koşullarda programın tahmini değerleri protein verimi (%) için 44,8, TFM (mg GAE/g) miktarı için 2,98, TEAK (DPPH) ($\mu\text{mol TE/g}$) değeri için 2,83 ve TEAK (ABTS) ($\mu\text{mol TE/g}$) değeri için 40,4 olarak bulunmuştur. Optimum işlem koşulu için güvenilirlik değeri ise 0,921 olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen dört farklı üretim ile protein verimi %42,7, TFM 3,01 mg GAE/g, TEAK (DPPH) 2,81 $\mu\text{mol TE/g}$ ve TEAK (ABTS) değeri ise 36,6 $\mu\text{mol TE/g}$ olarak ölçülmüştür. Doğrulama çalışması için deneysel veriler ile programın tahmini değerleri ayrı ayrı kıyaslanmış, veriler arasında istatistiki açıdan farklılık olmadığı görülmüştür ($P>0,05$). Gama vd. (2015), elma posasından viskozim L kullanılarak enzimatik hidroliz ile biyoyakıt üretimini ele alan çalışmalarında viskozim L'nin pH 3,0 – 6,0 gibi geniş bir aralıkta optimal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Tez çalışması kapsamında, susam kepeğinden viskozim L ile enzimatik protein özütlenmesinde ise optimum pH değeri 6,0 olarak bulgulanmıştır. Bu nedenle, viskozim L'nin farklı hammaddelerden farklı bileşiklerin özütlenmesinde hafif asidik koşullarda optimum aktivite gösterdiği ifade edilebilir.

Çizelge 4.5. Viskozim L ile özütlemeye en yüksek protein verimi, TFM ve TEAK (DPPH ve ABTS) değerleri için optimum işlem koşulları

Viskozim L İşlem Parametreleri					Parametre	Program çıktısı	Deneysel sonuç
Enzim oranı	pH	Sıcaklık	İşlem süresi	Güvenilirlik			
%0,58	6,0	51 °C	117 dk.	0,921	Protein verimi	44,8	41,7 ± 1,52
					TFM	2,98	3,01 ± 0,03
					TEAK (DPPH)	2,83	2,81 ± 0,17
					TEAK (ABTS)	40,4	36,6 ± 0,52

4.3.2. Alkalaz ile Enzimatik Özütlemeye İşlem Parametrelerinin Etkisi

Alkalaz, alkali koşullarda optimum faaliyet gösteren proteolitik bir enzimdir (See vd., 2011). Literatürde alkalazın farklı gıda yan ürünleri veya atıklarından, protein ve karbonhidrat gibi farklı bileşenlerin özütlenmesinde kullanıldığı çalışmalar

mevcuttur (Shen vd., 2008; Charoensiddhi vd., 2016). Tez çalışması kapsamında, alkalaz ile enzimatik özütleme işlemine ait bağımsız değişkenler enzim oranı (susam kepeğinin yüzdesi cinsinden), pH değeri, işlem sıcaklığı ve işlem süresi olarak belirlenmiştir. Bu işlemlerde kullanılan pH aralığı, alkalazın optimum çalışma koşulları göz önünde bulundurularak belirlenmiştir.

Merkezi tümlşik tasarıma göre programın belirlediği toplam 28 deney için bağımsız değişkenlerin değerleri ve bağımlı değişkenler olarak deneyler sonucu elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.6'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, protein veriminin %41,1 ile %77,7; TFM miktarının 2,90 ile 6,24 mg GAE/g; TEAK (DPPH) değerinin 1,32 ile 3,34 $\mu\text{mol TE/g}$; TEAK (ABTS) değerinin ise 31,3 ile 38,8 $\mu\text{mol TE/g}$ arasında değiştiği görülmektedir.

Alkalaz ile deneysel tasarıma ait model regresyon katsayıları ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir. Uyum katsayıları (R^2) protein verimi için 0,9748; TFM için 0,9821; TEAK (DPPH) için 0,9820 ve TEAK (ABTS) için 0,9866 olarak bulunmuştur. Uyum eksikliği testine göre tüm bağımlı değişkenlerin uyum eksikliği, istatistiki açıdan önemsiz ($P>0,05$) olarak belirlenmiştir. Bu da modelin deneysel veri için uygunluğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7 incelendiğinde, tüm işlem parametrelerinin protein verimini etkilediği ($P<0,001$) görülmektedir. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *enzim oranı x pH* ($P<0,01$) ve *enzim oranı x sıcaklık* ($P<0,05$)'ın negatif, *sıcaklık x süre* ($P<0,05$)'nin pozitif etkileşimleri, protein verimi üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Deneysel tasarımda yer alan işlem tüm parametrelerinin (enzim oranı, pH, ve sıcaklık için ($P<0,001$), süre için ($P<0,05$)) TFM miktarını da etkilediği görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *enzim oranı x pH* ($P<0,001$)'ın negatif ve *pH x sıcaklık* ($P<0,001$)'ın ise pozitif etkileşimleri, TFM miktarı üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

İncelenen dört işlem parametresinin TEAK (DPPH) değerini de etkilediği (enzim oranı ve süre için ($P<0,05$), pH için ($P<0,01$) ve sıcaklık için ($P<0,001$)) görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *enzim*

oranı x pH ($P<0,05$)'nin negatif ve *enzim oranı x sıcaklık* ($P<0,001$)'in pozitif etkileşimleri, TEAK (ABTS) değeri üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Alkalaz enziminin etkisini belirlemede kullanılan merkezi tümleşik tasarım ve analizler sonucu elde edilen bağımlı değişkenlere ait değerler

Deney No*	Bağımsız değişkenler				Bağımlı değişkenler			
	Enzim oranı (%)	pH	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)	Protein verimi (%)	TFM (mg GAE/g)	TEAK (DPPH) (μmol TE/g)	TEAK (ABTS) (μmol TE/g)
1	0,76	9,8	48	38	70,4	5,62	2,96	37,4
2	0,29	7,3	33	93	41,3	2,93	2,52	31,9
3	0,76	9,8	33	38	59,6	3,80	2,16	36,0
4	0,76	9,8	33	93	61,0	4,30	2,11	37,5
5	0,76	9,8	48	93	75,5	5,69	3,02	38,3
6	0,53	8,5	40	65	66,9	4,89	3,19	38,1
7	0,29	9,8	48	38	63,1	5,49	2,84	38,4
8	0,53	8,5	40	10	48,3	3,36	1,72	34,5
9	0,29	9,8	33	38	54,1	3,80	2,51	33,5
10	0,29	9,8	33	93	55,3	4,05	2,40	34,6
11	0,76	7,3	48	38	62,2	4,75	3,15	37,9
12	0,53	11,0	40	65	77,7	5,72	3,04	38,0
13	0,29	9,8	48	93	73,3	5,59	2,69	38,8
14	0,29	7,3	48	93	62,9	4,08	2,78	38,0
15	0,29	7,3	48	38	53,5	3,86	2,88	37,0
16	0,53	6,0	40	65	60,0	4,09	3,19	36,6
17	0,76	7,3	33	93	62,1	4,25	2,53	35,8
18	1,00	8,5	40	65	71,9	4,95	3,24	37,8
19	0,53	8,5	40	65	70,9	5,19	3,19	38,1
20	0,53	8,5	25	65	45,6	3,15	2,56	32,0
21	0,29	7,3	33	38	41,1	2,90	2,51	31,3
22	0,76	7,3	33	38	60,7	4,00	2,52	35,8
23	0,53	8,5	40	65	70,2	4,89	3,24	37,9
24	0,53	8,5	40	120	60,1	3,83	1,32	37,1
25	0,05	8,5	40	65	48,9	3,85	2,88	35,5
26	0,53	8,5	55	65	74,7	6,24	3,34	38,5
27	0,76	7,3	48	93	69,3	4,82	3,17	38,4
28	0,53	8,5	40	65	69,3	4,62	3,15	37,8

*Harmanlanmış sıra

Tüm işlem parametrelerinin TEAK (ABTS) değerini de etkilediği ($P<0,001$) görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *enzim oranı x pH* ($P<0,01$), *enzim oranı x sıcaklık* ($P<0,001$) ve *pH x sıcaklık*

($P<0,01$)'ın negatif etkileşimleri, TEAK (ABTS) değeri üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.7. Alkalaz enziminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları

Model parametreleri	Katsayı	Protein verimi	TFM	TEAK (DPPH)	TEAK (ABTS)
Kesişim	β_0	-130,28613 ^{***}	-3,64168 ^{***}	-1,34023 ^{***}	-34,69381 ^{***}
Doğrusal					
Enzim oranı, A	β_1	186,08853 ^{***}	10,93831 ^{***}	-0,30011 [*]	39,39309 ^{***}
pH, B	β_2	6,75256 ^{***}	-0,093299 ^{***}	0,15147 ^{**}	3,97612 ^{***}
Sıcaklık, C	β_3	3,64805 ^{***}	0,023343 ^{***}	0,062181 ^{***}	1,75543 ^{***}
Süre, D	β_4	0,45625 ^{***}	0,060527 [*]	0,071351 [*]	0,087238 ^{***}
Etkileşimli					
Enzim oranı x pH, A x B	β_{12}	-7,27200 ^{**}	-0,75221 ^{***}	-0,18379 [*]	-1,20695 ^{**}
Enzim oranı x Sıcaklık, A x C	β_{13}	-0,94295 [*]	-0,028737	0,060947 ^{***}	-0,49674 ^{***}
Enzim oranı x Süre, A x D	β_{14}	-0,057531	2,66986x10 ⁻³	3,53110x10 ⁻³	-2,49761x10 ⁻³
pH x Sıcaklık, B x C	β_{23}	0,064680	0,020100 ^{***}	2,82000x10 ⁻³	-0,034860 ^{**}
pH x Süre, B x D	β_{24}	-1,96364x10 ⁻⁴	6,70909x10 ⁻⁴	-3,43636x10 ⁻⁴	3,71455x10 ⁻³
Sıcaklık x Süre, C x D	β_{34}	8,30182x10 ^{-3*}	-1,77273x10 ⁻⁴	-8,18182x10 ⁻⁶	-1,66364x10 ⁻⁴
İkinci derece					
Enzim oranı x Enzim oranı, A ²	β_{11}	-41,27535 ^{***}	-2,27535 ^{**}	-0,56676	-5,63269 ^{***}
pH x pH, B ²	β_{22}	-0,13860	-1,50000x10 ⁻³	-0,011820	-0,10686 [*]
Sıcaklık x Sıcaklık, C ²	β_{33}	-0,042390 ^{***}	-9,81667x10 ⁻⁴	-1,06833x10 ^{-3***}	-0,012028 ^{***}
Süre x Süre, D ²	β_{44}	-5,12256x10 ^{-3***}	-4,37479x10 ^{-4***}	-5,51033x10 ^{-4***}	-7,19132x10 ^{-4***}
R²		0,9748	0,9821	0,9820	0,9866
Ayarlanmış R²		0,9476	0,9628	0,9626	0,9721
p-değeri		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
F-değeri		35,89	50,90	50,62	68,17
Uyum eksikliği (Lack of fit)		0,2870	0,8790	0,0541	0,0501

Önem düzeyleri: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

$$\text{Model denklemini: } Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_4D + \beta_{12}(Ax B) + \beta_{13}(Ax C) + \beta_{14}(Ax D) + \beta_{23}(Bx C) + \beta_{24}(Bx D) + \beta_{34}(Cx D) + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 + \beta_{44}D^2$$

Yanıt yüzey yönteminde bağımlı değişkenler olan protein verimi, TFM, TEAK (DPPH) ve TEAK (ABTS) değerlerine ait model denklemleri, enzim oranı (A), pH (B), işlem sıcaklığı (C) ve işlem süresine (D) bağlı olarak ve yalnızca istatistiki olarak anlamlı ($P<0,05$) model parametreleri kullanılarak sırasıyla aşağıda verilmiştir:

$$Y (\text{Protein verimi}) = -130,28613 + 186,08853x(A) + 6,75256x(B) + 3,64805x(C) + 0,45625x(D) - 7,27200x(AXB) - 0,94295x(AXC) + 0,00830182x(CXD) - 41,27535x(A^2) - 0,042390x(C^2) - 0,00512256x(D^2)$$

$$Y (\text{TFM}) = -3,64168 + 10,93831x(A) - 0,093299x(B) + 0,023343x(C) + 0,060527x(D) - 0,75221x(AXB) + 0,020100x(BXC) - 2,27535x(A^2) - 0,000437479x(D^2)$$

$$Y (\text{TEAK (DPPH)}) = -1,34023 - 0,30011x(A) + 0,15147x(B) + 0,062181x(C) + 0,071351x(D) - 0,18379x(AXB) + 0,060947x(AXC) - 0,00106833x(C^2) - 0,000551033x(D^2)$$

$$Y (\text{TEAK (ABTS)}) = -34,69381 + 39,39309x(A) + 3,97612x(B) + 1,75543x(C) + 0,087238x(D) - 1,20695x(AXB) - 0,49674x(AXC) - 0,034860x(BXC) - 5,63269x(A^2) - 0,10686x(B^2) - 0,012028x(C^2) - 0,000719132x(D^2)$$

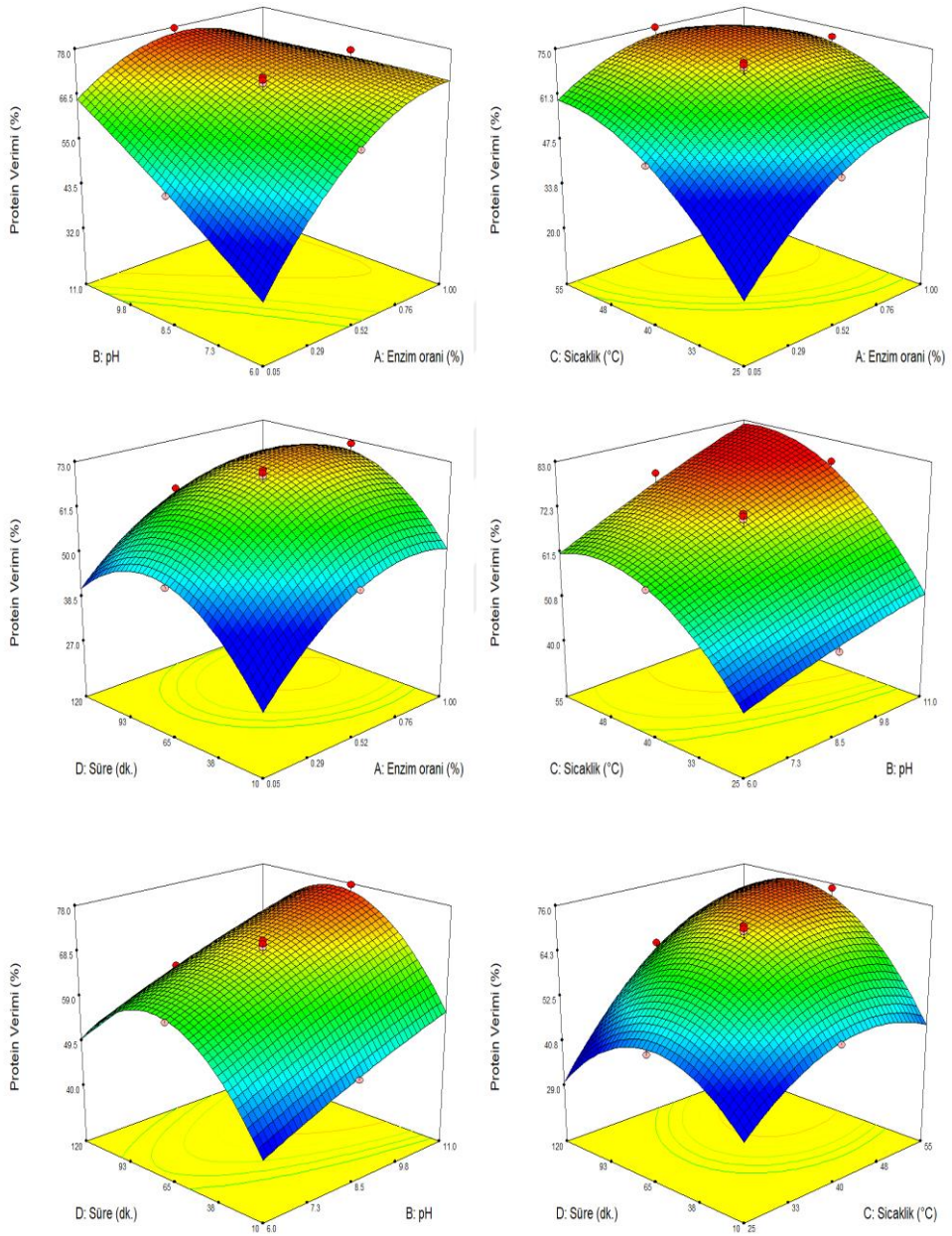
Bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri Şekil 4.5'te; TFM üzerine etkileri Şekil 4.6'da, TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri Şekil 4.7'de ve TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri ise Şekil 4.8'te gösterilmiştir.

Bağımsız değişkenlerden enzim oranının artışı ile birlikte bağımlı değişken değerlerinin de belli noktaya kadar artış gösterdiği, ardından sabitlendiği gözlenmiştir. Artan işlem süresi ile tüm bağımlı değişkenlere (protein verimi, TFM, TEAK (DPPH ve ABTS)) ait değerlerde belli bir noktaya kadar artışın, ardından azalışın gerçekleştiği görülmektedir.

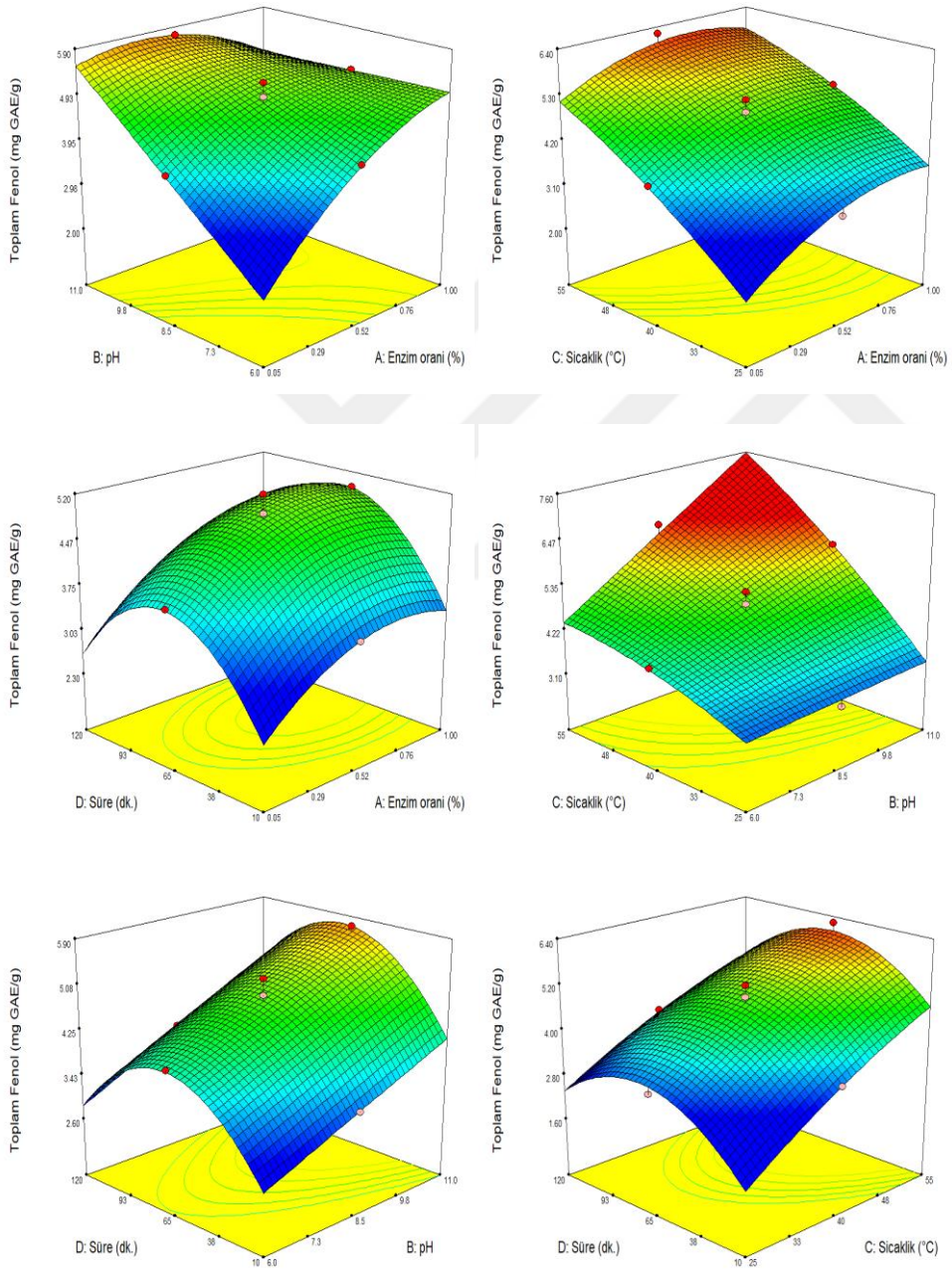
Artan pH değerinin ise protein verimi, TFM ve TEAK (ABTS) değerlerinde de artışa neden olduğu, ancak TEAK (DPPH) değerini etkilemediği gözlenmiştir. Suda çözünmez özellikteki proteinler, alkalaz enzimi tarafından hidroliz edildiğinden alkali pH ortamının protein verimini önemli oranda etkileyen bir faktör olmadığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2007). Ancak, alkalazın optimum çalışma aralığının alkali koşullar olduğu göz önüne alınırsa yeterli hidrolizasyonun sağlanabilmesi için alkali ortam sağlanması gerekliliği de ortaya çıkmaktadır. Örnek olarak Yuan vd. (2008), kudret narı meyvesinden alkalaz destekli protein özütlenmesini ele aldıkları çalışmalarında optimum pH değerini 9,2 olarak rapor etmişlerdir. Fabian ve Ju (2011) ise alkali ortam oluşturmada kullanılan sodyum hidroksitin pirinç kepeği proteinlerindeki hidrojen, disülfid ve amid bağlarını kırması nedeniyle, alkali ortamın protein çözünürlüğü açısından etkili olduğunu

bildirmişlerdir. Roselló-Soto vd. (2015), zeytin çekirdeğinden fenolik madde özütlenmesinde 2,5 pH; protein özütlenmesinde ise 12 pH değerinin optimum olduğunu rapor etmişlerdir. Buradan hareketle, optimizasyon çalışmalarında hedef bileşen için belirlenen bağımsız değişkenlere ait değerlerin farklılık gösterebildiği görülmektedir. Mevcut tez çalışması kapsamında susam kepeğinden alkalaz ile enzimatik protein özütlenmesinde ise protein verimi, TFM miktarı ve TEAK (DPPH ve ABTS) için en yüksek değerlerin elde edilmesi hedeflenmiş, bu doğrultuda optimum pH değeri 9,8 olarak belirlenmiştir.

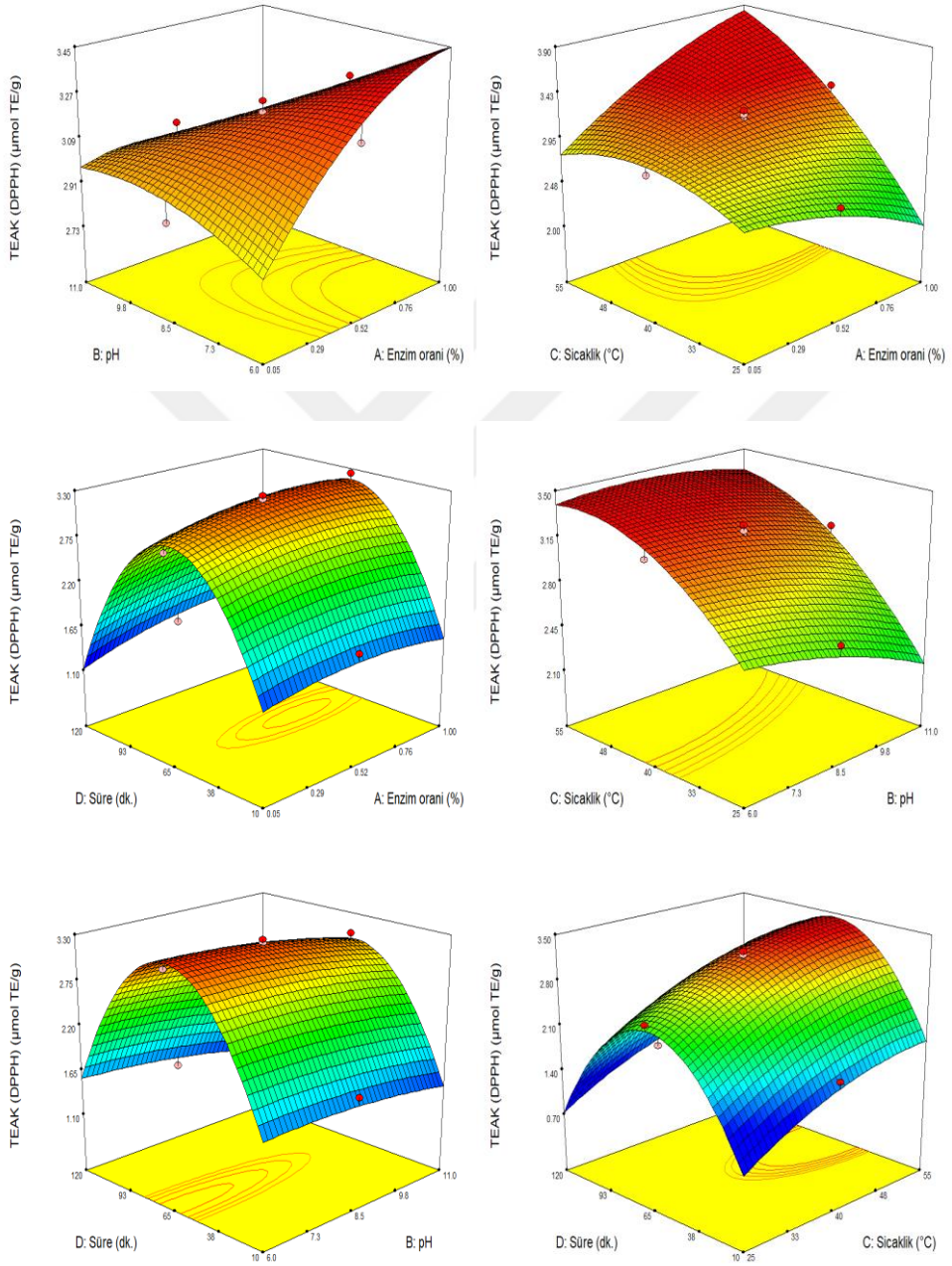
İşlem sıcaklığının artışı ile TFM miktarında doğru orantılı bir artışın, protein verimi ve TEAK değerlerinde de belli bir noktaya kadar artışın ve ardından sabitlenmenin olduğu görülmektedir. Alkalaz ile enzimatik özütleme işleminin, antioksidan özellik gösteren peptid veya amino asitleri açığa çıkarabileceği ifade edilmektedir (Jodayree vd., 2012). Bu nedenle çeşitli bitkisel dokulardan alkalaz ile enzimatik işlem sonucu elde edilen proteinler, fonksiyonel gıda üretiminde kullanım potansiyeline de sahiptir.



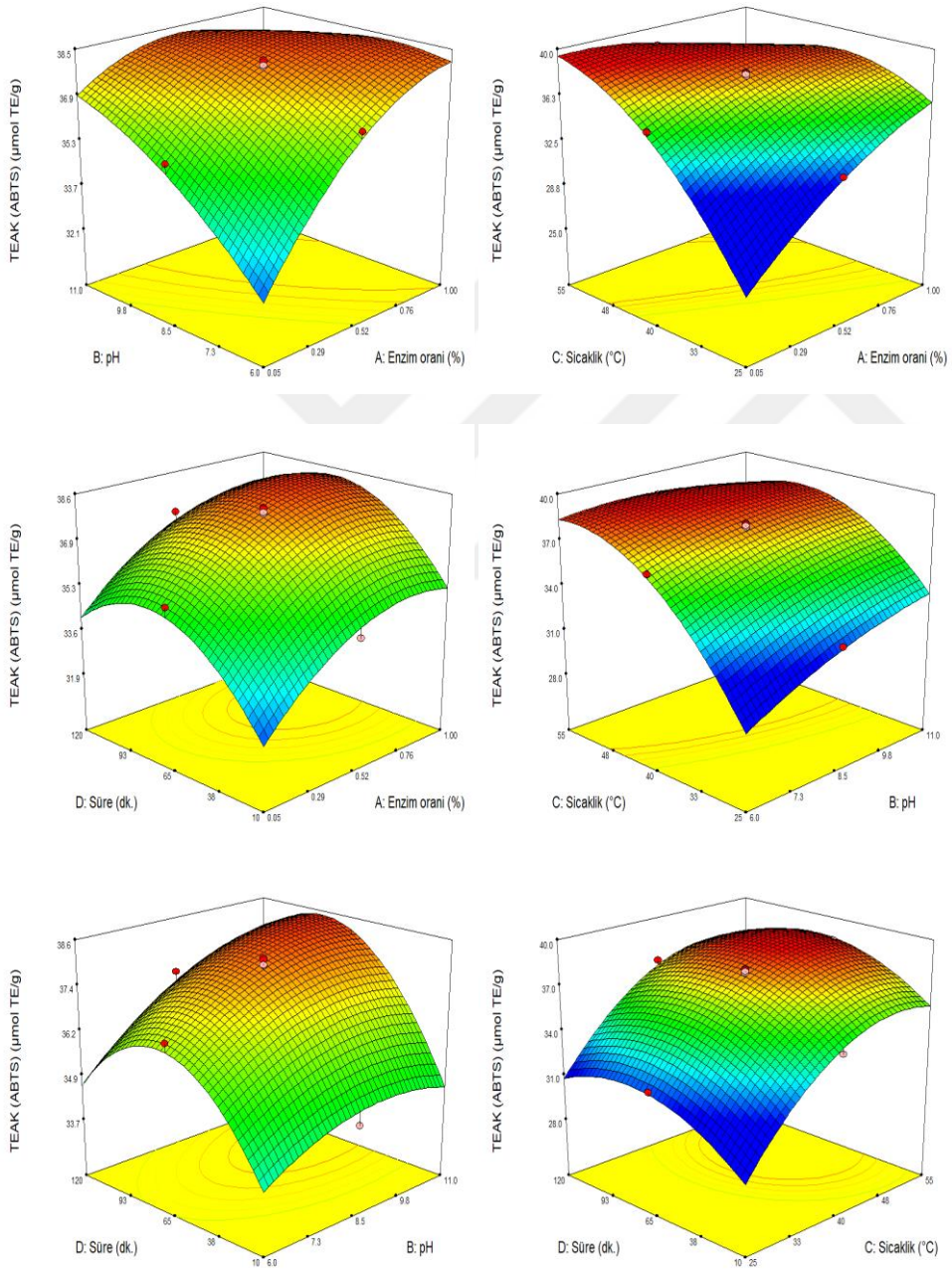
Şekil 4.5. Alkalaz ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri



Şekil 4.6. Alkalaz ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TFM miktarı üzerine etkileri



Şekil 4.7. Alkalaz ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri



Şekil 4.8. Alkalaz ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri

4.3.2.1. Alkalaz ile enzimatik özütlemeye ait işlem koşullarının optimizasyonu

Alkalaz ile enzimatik özütleme işlemi için yapılan optimizasyon çalışmasına göre optimum enzim oranı (A) %0,52, pH değeri (B) 9,8, işlem sıcaklığı (C) 51 °C ve işlem süresi (D) 68 dk. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Optimum koşullarda programın tahmini değerleri protein verimi (%) için 78,9 TFM (mg GAE/g) miktarı için 6,52, TEAK (DPPH) ($\mu\text{mol TE/g}$) değeri için 3,35 ve TEAK (ABTS) ($\mu\text{mol TE/g}$) değeri için 38,9 olarak bulunmuştur. Optimum işlem koşulu için güvenilirlik değeri ise 1,000 olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen dört farklı üretim ile protein verimi %86,6, TFM 7,20 mg GAE/g, TEAK (DPPH) 3,77 $\mu\text{mol TE/g}$ ve TEAK (ABTS) değeri ise 42,8 $\mu\text{mol TE/g}$ olarak ölçülmüştür. Doğrulama çalışması için deneysel veriler ile programın tahmini değerleri ayrı ayrı kıyaslanmış, veriler arasında istatistiki açıdan farklılık olmadığı görülmüştür ($P>0,05$).

Çizelge 4.8. Alkalaz ile özütlemeye en yüksek protein verimi, TFM ve TEAK (DPPH ve ABTS) değerleri için optimum işlem koşulları

Alkalaz İşlem Parametreleri					Parametre	Program çıktısı	Deneysel sonuç
Enzim oranı	pH	Sıcaklık	İşlem süresi	Güvenilirlik			
%0,52	9,8	51 °C	68 dk.	1,000	Protein verimi	78,9	79,3 \pm 1,52
					TFM	6,52	6,61 \pm 0,02
					TEAK (DPPH)	3,35	3,38 \pm 0,04
					TEAK (ABTS)	38,9	40,8 \pm 0,04

4.3.3. Ultrases Destekli Özütlemeye İşlem Parametrelerinin Etkisi

Ultrases destekli özütleme yöntemi, bitkisel materyallerden doğal bileşiklerin özütlenmesinde kullanılan verim artırıcı yöntemlerden birisi olarak göze çarpmaktadır (Yılmaz ve Bilek, 2018). Tez çalışması kapsamında da etkisi değerlendirilen ultrases destekli özütleme işlemine ait bağımsız değişkenler ultrases gücü, işlem sıcaklığı ve işlem süresi olarak belirlenmiştir.

Merkezi tümleşik tasarıma göre programın belirlediği toplam 18 deney için bağımsız değişkenlerin değerleri ve bağımlı değişkenler olarak deneyler sonucu elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.9'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, protein veriminin %39,8 ile %58,5; TFM miktarının 2,51 ile 4,10 mg GAE/g; TEAK

(DPPH) değerinin 1,76 ile 2,12 $\mu\text{mol TE/g}$; TEAK (ABTS) değerinin ise 27,1 ile 38,5 $\mu\text{mol TE/g}$ arasında değiştiği görülmektedir.

Çizelge 4.9. Ultrases işleminin etkisini belirlemede kullanılan merkezi tümleşik tasarım ve analizler sonucu elde edilen bağımlı değişkenlere ait değerler

Deney No*	Bağımsız değişkenler				Bağımlı değişkenler		
	Güç (W)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)	Protein verimi (%)	TFM (mg GAE/g)	TEAK (DPPH) ($\mu\text{mol TE/g}$)	TEAK (ABTS) ($\mu\text{mol TE/g}$)
1	682	40	120	51,7	3,66	1,97	32,3
2	528	40	65	39,8	2,97	2,00	28,2
3	682	40	65	44,2	3,15	2,12	31,8
4	774	49	98	58,5	4,04	1,83	36,9
5	774	31	98	47,4	3,22	1,96	31,7
6	590	49	32	46,2	3,44	1,91	31,4
7	836	40	65	48,5	3,62	1,85	33,4
8	774	31	32	47,4	2,78	1,93	29,1
9	590	31	32	39,8	2,51	1,93	27,1
10	682	55	65	58,5	4,10	1,91	38,5
11	682	40	65	42,2	3,16	2,08	31,6
12	590	31	98	46,2	3,00	1,95	29,5
13	774	49	32	54,1	3,81	1,76	34,3
14	682	25	65	42,6	2,69	1,99	31,5
15	682	40	65	44,2	3,15	2,10	30,4
16	682	40	65	42,2	3,03	2,10	32,0
17	682	40	10	42,6	2,83	1,85	28,0
18	590	49	98	58,1	3,80	2,06	33,0

*Harmanlanmış sıra

Ultrases ile deneysel tasarıma ait model regresyon katsayıları ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir. Uyum katsayıları (R^2) protein verimi için 0,9696; TFM için 0,9905; TEAK (DPPH) için 0,9896 ve TEAK (ABTS) için 0,9829 olarak bulunmuştur. Uyum eksikliği testine göre tüm bağımlı değişkenlerin uyum eksikliği, istatistiki açıdan önemsiz ($P>0,05$) olarak belirlenmiştir. Bu da modelin deneysel veri için uygunluğunu göstermektedir.

Çizelge 4.10 incelendiğinde, üç işlem parametresinin (ultrases gücü, sıcaklık ve süre) de protein verimini etkilediği ($P<0,001$) görülmektedir. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *güç x süre* ($P<0,05$)'nin

negatif ve *sıcaklık x süre* ($P<0,05$)'nin pozitif etkileşimleri, protein verimi üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Üç işlem parametresinin (ultrases gücü, sıcaklık ve süre) TFM miktarını da etkilediği ($P<0,001$) görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri ise TFM miktarı üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

Üç işlem parametresinin (ultrases gücü, sıcaklık ve süre) TEAK (DPPH) değerini de etkilediği ($P<0,001$) görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *güç x sıcaklık* ($P<0,001$)'ın negatif ve *sıcaklık x süre* ($P<0,01$)'nin pozitif etkileşimleri, TEAK (DPPH) üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Tüm işlem parametrelerinin TEAK (ABTS) değerini de etkilediği ($P<0,001$) görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri ise TEAK (ABTS) değeri üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

Yanıt yüzey yönteminde bağımlı değişkenler olan protein verimi, TFM, TEAK (DPPH) ve TEAK (ABTS) değerlerine ait model denklemleri, ultrases gücü (A), işlem sıcaklığı (B) ve işlem süresine (C) bağlı olarak ve yalnızca istatistiki olarak anlamlı ($P<0,05$) model parametreleri kullanılarak sırasıyla aşağıda verilmiştir:

$$Y (\text{Protein verimi}) = 96,82681 - 0,065325x(A) - 2,79601x(B) + 0,083926x(C) - 0,000580212x(AXC) + 0,00424264x(BXC) + 0,0000963888x(A^2) + 0,038604x(B^2) + 0,00174742x(C^2)$$

$$Y (\text{TFM}) = 4,86072 - 0,00847912x(A) - 0,051490x(B) + 0,012168x(C) + 0,00000732156x(A^2) + 0,00121617x(B^2) + 0,0000408721x(C^2)$$

$$Y (\text{TEAK (DPPH)}) = -3,87750 + 0,012204x(A) + 0,086842x(B) + 0,00834427x(C) - 0,0000596908x(AXB) - 0,00000292193x(AXC) + 0,0000728534x(BXC) - 0,00000742211x(A^2) - 0,000671212x(B^2) - 0,0000631480x(C^2)$$

$$Y (\text{TEAK (ABTS)}) = 24,02991 + 0,048990x(A) - 1,17046x(B) + 0,080678x(C) + 0,014781x(B^2) - 0,000510494x(C^2)$$

Çizelge 4.10. Ultrases işleminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistikî analiz sonuçları ve model katsayıları

Model parametreleri	Katsayı	Protein verimi	TFM	TEAK (DPPH)	TEAK (ABTS)
Kesişim	β_0	96,82681 ^{***}	4,86072 ^{***}	-3,87750 ^{***}	24,02991 ^{***}
Doğrusal					
Güç, A	β_1	-0,065325 ^{***}	-8,47912x10 ^{-3***}	0,012204 ^{***}	0,048990 ^{***}
Sıcaklık, B	β_2	-2,79601 ^{***}	-0,051490 ^{***}	0,086842 ^{***}	-1,17046 ^{***}
Süre, C	β_3	0,083926 ^{***}	0,012168 ^{***}	8,34427x10 ^{-3***}	0,080678 ^{***}
Etkileşimli					
Güç x Sıcaklık, A x B	β_{12}	-7,65267x10 ⁻⁵	1,83664x10 ⁻⁵	-5,96908x10 ^{-5***}	3,73450x10 ⁻⁴
Güç x Süre, A x C	β_{13}	-5,80212x10 ^{-4*}	-7,51353x10 ⁻⁶	-2,92193x10 ⁻⁶	5,25947x10 ⁻⁵
Sıcaklık x Süre, B x C	β_{23}	4,24264x10 ^{-3*}	-1,45707x10 ⁻⁴	7,28534x10 ^{-5**}	-3,34269x10 ⁻⁴
İkinci derece					
Güç x Güç, A ²	β_{11}	9,63888x10 ^{-5*}	7,32156x10 ^{-6*}	-7,42211x10 ^{-6***}	-3,77064x10 ⁻⁵
Sıcaklık x Sıcaklık, B ²	β_{22}	0,038604 ^{***}	1,21617x10 ^{-3***}	-6,71212x10 ^{-4***}	0,014781 ^{***}
Süre x Süre, C ²	β_{33}	1,74742x10 ^{-3**}	4,08721x10 ^{-5*}	-6,31480x10 ^{-5***}	-5,10494x10 ^{-4**}
R²		0,9696	0,9905	0,9896	0,9829
Ayarlanmış R²		0,9354	0,9798	0,9780	0,9637
p-değeri		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
F-değeri		28,33	92,39	84,89	51,21
Uyum eksikliği (Lack of fit)		0,2476	0,4474	0,6164	0,8653

Önem düzeyleri: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

Model denklemi: $Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}(Ax B) + \beta_{13}(Ax C) + \beta_{23}(Bx C) + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2$

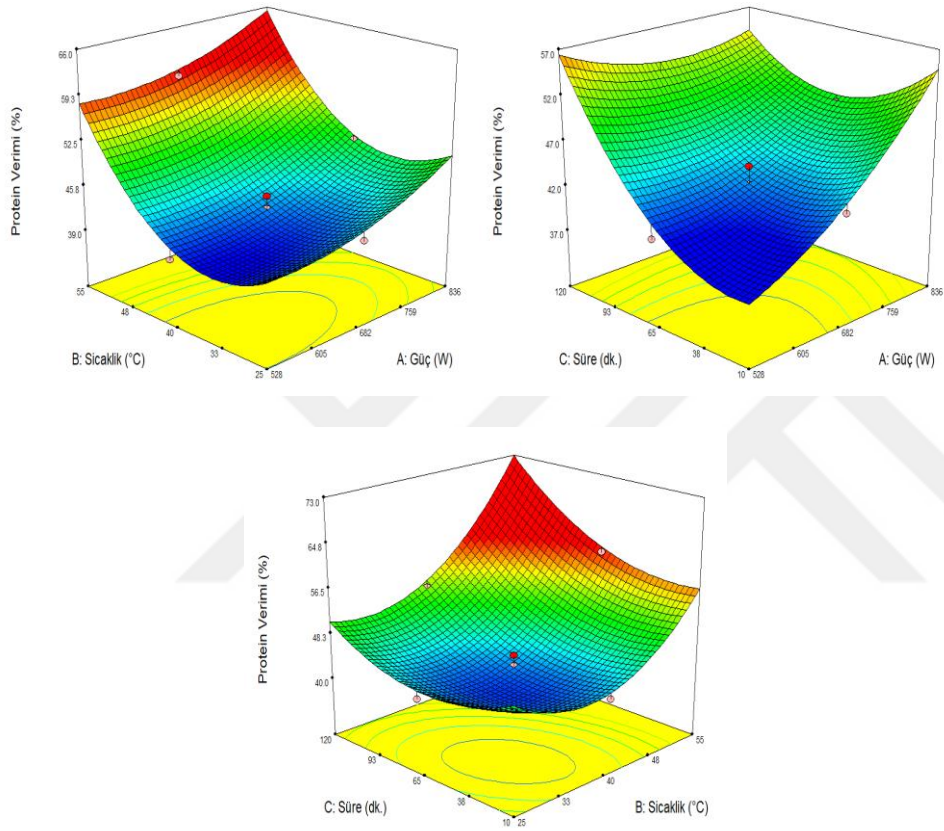
Bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri Şekil 4.9'da, TFM üzerine etkileri Şekil 4.10'da, TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri Şekil 4.11'de ve TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri ise Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

Bağımsız değişkenlerden ultrases gücünün artışıyla birlikte protein verimi, TFM ve TEAK (ABTS) değerlerinin arttığı; TEAK (ABTS) değerinin ise bir süre artıktan sonra düşüşe geçtiği görülmektedir. Ultrases dalgaları tarafından oluşturulan yüksek sıcaklık ve şok dalgalarının, hücre duvarı ve moleküler bağları kırdığı, kavitasyon oluşumu ile kütle transferini artırdığı ve böylelikle protein ve fenolik madde özütlenme verimini artırdığı bildirilmektedir (Tang vd., 2002; Kenari vd., 2014). Susam posasından fenolik madde özütlenmesinde ultrases işleminin kullanıldığı bir çalışmada, çözen türünün önemi de vurgulanmıştır (Kenari vd., 2014). Protein ve fenolik madde gibi bileşenlerin özütlenmesi ile ilgili

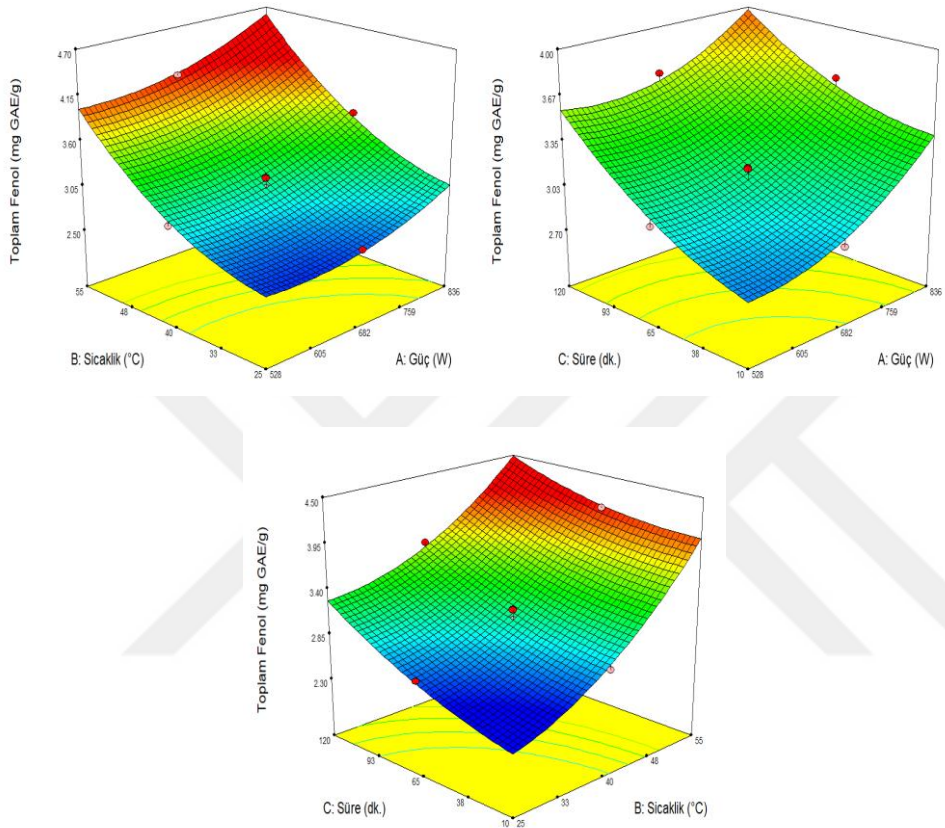
çalışmalarda kullanılan çözenlerin gıda olarak tüketime uygun nitelikte olması, elde edilen ürünlerin ileri vadede ticarileştirilebilir olmasını da sağlayabilme potansiyeline sahiptir.

İşlem süresinin artışıyla birlikte protein verimi (Şekil 4.9) ve TFM miktarı (Şekil 4.10) artış göstermiş, TEAK (ABTS) değeri (Şekil 4.12) ise bir süre arttıktan sonra sabit konuma gelmiştir. Yu vd. (2016), ultrases gücü ve işlem süresindeki artışın, protein ve polifenol özütleme verimini de artırdığını bulgulamışlardır. Artan işlem sıcaklığının protein verimi ve TEAK (ABTS) değerlerinde belirli bir noktadan sonra artışa neden olduğu görülmektedir. TFM miktarı ise işlem sıcaklığı ile doğru orantılı olarak artış göstermiştir. Annatto bitkisinden doğal renk maddesi özütlenmesinde ultrases işleminin kullanıldığı bir çalışmada sabit 300 W ultrases gücü kullanılmış, RSM ile yapılan optimizasyon sonucu optimum işlem parametreleri 7,25 dk. işlem süresi, %14 tohum/çözgen oranı ve 72,7 °C işlem sıcaklığı olarak belirlenmiştir (Yolmeh vd., 2014). Zhu ve Fu (2012), perilla tohumundan ultrases destekli protein özütlenmesini ele alan çalışmalarında *ultrases gücü x işlem sıcaklığı ile işlem süresi x işlem sıcaklığına* ait pozitif etkileşimlerin, protein verimi üzerine istatistiki açıdan anlamlı ($P<0,05$) olduğunu rapor etmişlerdir. Bu nedenle, diğer özütleme işlemlerinde olduğu gibi ultrases destekli özütleme işlemlerinde de optimizasyon çalışmaları yapılırken ele alınan işlem parametrelerinin birbirleri ile etkileşimleri göz önünde bulundurulmalıdır. Şekil 4.9 ve Şekil 10'da görüldüğü üzere artan ultrases gücü, protein verimi ve TFM miktarını doğrusal olarak artırmaktadır. Literatürde ultrases destekli özütleme işlemlerini ele alan çalışmalar inceleniğinde ise, mevcut tez çalışmasında kullanılan ultrases güçlerinden daha düşük (<500 W) güçlerde çalışıldığı gözlenmektedir (Zhu ve Fu, 2012; Yolmeh vd., 2014; Yu vd., 2016). Bu nedenle, daha yüksek ultrases güçlerinin protein verimi üzerine hem doğrusal hem de diğer işlem parametreleri ile etkileşimli etkileri, farklı bitkisel materyaller ile yapılacak ileri özütleme çalışmaları ile belirlenebilir.

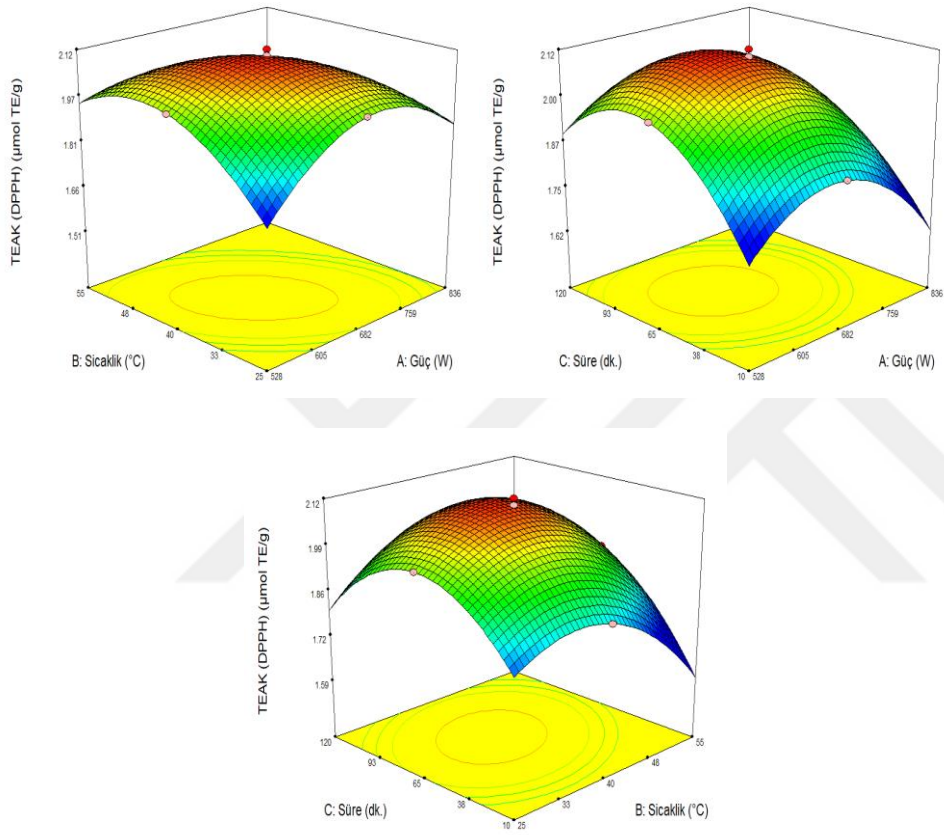
Sonuç olarak ultrases işleminin, kontrole (alkali yöntem) kıyasla protein ve fenolik madde özütleme verimini artırıcı etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Aynı zamanda, elde edilen verim artışının yanında ultrases destekli özütleme yöntemi ile elde edilen ürünlerde yer alan fenolik madde gibi mikro bileşenlerin, vücutta daha yüksek biyoyararlanıma sahip olduğu da belirtilmektedir (Vilku vd., 2008).



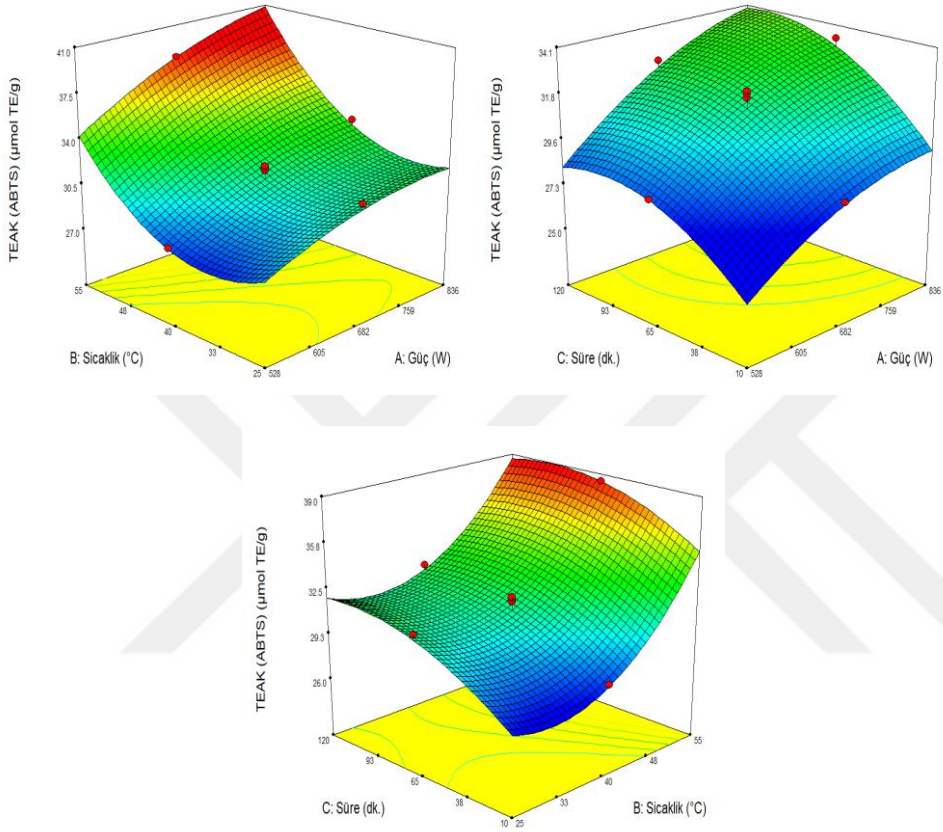
Şekil 4.9. Ultrases ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri



Şekil 4.10. Ultrases ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TFM miktarı üzerine etkileri



Şekil 4.11. Ultrases ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri



Şekil 4.12. Ultrases ile özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri

4.3.3.1. Ultrases destekli özütlemeye ait işlem koşullarının optimizasyonu

Ultrases destekli özütleme işlemi için yapılan optimizasyon çalışmasına göre optimum ultrases gücü (A) 630 W, işlem sıcaklığı (B) 54 °C ve işlem süresi (C) 86 dk. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Optimum koşullarda programın tahmini değerleri protein verimi (%) için 61,7, TFM (mg GAE/g) miktarı için 4,10, TEAK (DPPH) (µmol TE/g) değeri için 1,99 ve TEAK (ABTS) (µmol TE/g) değeri için 37,2 olarak bulunmuştur. Optimum işlem koşulu için güvenilirlik değeri ise 0,932 olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen dört farklı üretim ile protein verimi %58,8, TFM 3,90 mg GAE/g, TEAK (DPPH) 2,12 µmol TE/g ve TEAK (ABTS) değeri ise 38,0 µmol TE/g olarak ölçülmüştür. Doğrulama çalışması için deneysel veriler ile programın tahmini değerleri ayrı ayrı

kıyaslanmış, veriler arasında istatistiki açıdan farklılık olmadığı görülmüştür ($P>0,05$).

Çizelge 4.11. Ultrases ile özütlemeye en yüksek protein verimi, TFM ve TEAK (DPPH ve ABTS) değerleri için optimum işlem koşulları

Ultrases İşlem Parametreleri				Parametre	Program çıktısı	Deneysel sonuç
Ultrases gücü	Sıcaklık	İşlem süresi	Güvenilirlik			
630 W	54 °C	86 dk.	0,932	Protein verimi	61,7	59,8 ± 1,15
				TFM	4,10	3,95 ± 0,02
				TEAK (DPPH)	1,99	2,09 ± 0,02
				TEAK (ABTS)	37,2	38,0 ± 0,41

4.3.4. Enzim ile Ultrases Kombine Özütlemeye İşlem Parametrelerinin Etkisi

Çalışmalarda kullanılan viskozim L ve alkalaz enzimlerinden alkalazın özütlemeye etkinliğinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin optimum koşullarda viskozim L ile özütlemeye işlemi sonucu protein verimi %41,2 iken, bu değer alkalaz ile özütlemeye işlemi sonrasında %86,6 olarak elde edilmiştir. Bu nedenle, alkalaz ve ultrases işlemlerinin bir arada uygulandığı kombine bir özütlemeye işlemi için yeni bir deneysel tasarım oluşturulmuştur. Bağımsız değişkenlerin interaksiyonlarının sonuçları etkileyebileceği dikkate alınarak enzim oranı, ultrases gücü, sıcaklık ve süre değişkenlerinin her biri bu aşamada yeniden ele alınmıştır.

Merkezi tümleşik tasarıma göre programın belirlediği toplam 28 deney için bağımsız değişkenlerin değerleri ve bağımlı değişkenler olarak deneyler sonucu elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.12’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, protein veriminin %52,9 ile %88,4; TFM miktarının 3,82 ile 6,03 mg GAE/g; TEAK (DPPH) değerinin 1,24 ile 3,55 µmol TE/g; TEAK (ABTS) değerinin ise 37,9 ile 42,3 µmol TE/g arasında değiştiği görülmektedir.

Alkalaz + ultrases ile deneysel tasarıma ait model regresyon katsayıları ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.13’te verilmiştir. Uyum katsayıları (R^2) protein verimi için 0,9870; TFM için 0,9835; TEAK (DPPH) için 0,9813 ve TEAK (ABTS) için 0,9811 olarak bulunmuştur. Tüm bağımlı

değişkenlerin uyum eksikliği ise istatistiki açıdan önemsiz ($P>0,05$) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. Alkalaz ile ultrases kombine işleminin etkisini belirlemede kullanılan merkezi tümleşik tasarım ve analizler sonucu elde edilen bağımlı değişkenlere ait değerler

Deney No*	Bağımsız değişkenler					Bağımlı değişkenler		
	Enzim oranı (%)	Güç (W)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)	Protein verimi (%)	TFM (mg GAE/g)	TEAK (DPPH) (µmol TE/g)	TEAK (ABTS) (µmol TE/g)
1	0,76	605	33	93	73,0	4,76	3,45	39,8
2	0,29	759	48	93	85,5	4,83	2,06	41,2
3	0,29	605	48	93	72,8	5,29	2,37	41,0
4	1,00	682	40	65	82,8	4,47	3,35	40,7
5	0,29	605	48	38	63,7	5,00	2,35	40,9
6	0,76	759	48	38	81,3	4,54	2,29	41,4
7	0,53	682	40	65	77,6	4,36	3,04	39,9
8	0,29	759	33	38	68,2	4,60	3,29	37,9
9	0,76	759	33	38	72,5	4,53	3,33	39,8
10	0,76	759	33	93	74,4	5,35	3,43	41,4
11	0,05	682	40	65	61,6	4,12	2,81	38,2
12	0,76	605	48	38	72,0	5,23	2,62	41,1
13	0,53	682	40	65	81,3	4,25	2,98	40,1
14	0,53	682	55	65	86,1	5,51	1,24	42,3
15	0,53	682	25	65	61,1	4,56	3,22	39,1
16	0,53	682	40	65	81,2	4,36	2,96	39,9
17	0,53	682	40	65	80,2	4,27	2,92	39,4
18	0,53	682	40	120	73,8	5,36	3,30	40,5
19	0,53	528	40	65	68,4	4,95	3,55	39,9
20	0,76	759	48	93	88,8	5,13	2,32	41,8
21	0,53	682	40	10	61,0	4,00	3,40	39,7
22	0,29	605	33	38	52,9	3,82	3,27	37,8
23	0,53	836	40	65	88,4	5,33	3,10	41,1
24	0,76	605	48	93	83,5	6,03	2,68	41,2
25	0,29	605	33	93	53,4	4,02	3,27	38,2
26	0,29	759	48	38	76,9	4,60	2,06	40,8
27	0,76	605	33	38	70,8	3,89	3,67	39,0
28	0,29	759	33	93	67,9	4,91	3,11	39,6

*Harmanlanmış sıra

Çizelge 4.13 incelendiğinde, etkisi incelenen dört bağımsız değişkenin de protein verimini etkilediği ($P<0,001$) görülmektedir. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *enzim oranı x güç* ($P<0,001$) ve *enzim oranı x sıcaklık*

($P < 0,01$) 'ın negatif, ve *sıcaklık x süre* ($P < 0,001$)'nin ise pozitif etkileşimleri, protein verimi üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Etkisi incelenen işlem parametrelerinin (enzim oranı, sıcaklık ve süre için ($P < 0,001$), ultrases gücü için ($P < 0,05$)) TFM miktarını da etkilediği görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *enzim oranı x güç* ($P < 0,05$) ile *güç x sıcaklık* ($P < 0,001$)'ın negatif, *enzim oranı x süre* ($P < 0,001$)'nin ise pozitif etkileşimleri, TFM miktarı üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Enzim oranı, ultrases gücü ve işlem sıcaklığı, TEAK (DPPH) değerini etkileyen ($P < 0,001$) parametreler olarak görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri ise, TEAK (DPPH) değeri üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

DeneySEL tasarımda yer alan dört bağımsız değişkenin, TEAK (ABTS) değerini de etkilediği ($P < 0,001$) görülmüştür. İşlem parametrelerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise *enzim oranı x sıcaklık* ($P < 0,001$), *güç x sıcaklık* ($P < 0,05$) ve *sıcaklık x süre* ($P < 0,01$)'nin negatif, *güç x süre* ($P < 0,05$)'nin ise pozitif etkileşimleri, TEAK (ABTS) değeri üzerine istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Yanıt yüzey yönteminde bağımlı değişkenler olan protein verimi, TFM, TEAK (DPPH) ve TEAK (ABTS) değerlerine ait model denklemleri, enzim oranı (A), ultrases gücü (B), işlem sıcaklığı (C) ve işlem süresine (D) bağlı olarak ve yalnızca istatistiki olarak anlamlı ($P < 0,05$) model parametreleri kullanılarak sırasıyla aşağıda verilmiştir:

$$Y (\text{Protein verimi}) = -147,62589 + 174,60383x(A) + 0,22481x(B) + 2,41691x(C) + 0,35525x(D) - 0,12987x(AXB) - 0,75789x(AXC) + 0,00981818x(CXD) - 36,52816x(A^2) - 0,0000860882x(B^2) - 0,030407x(C^2) - 0,00431129x(D^2)$$

$$Y (TFM) = 6,23190 + 2,03533x(A) - 0,021252x(B) + 0,18036x(C) - 0,00798362x(D) - 3,99863x(AXB) + 0,019617x(AXD) - 0,000579004x(BXC) + 0,0000348745x(B^2) + 0,00320926x(C^2) + 0,000121350x(D^2)$$

Çizelge 4.13. Alkalaz + Ultrases kombine işleminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları

Model parametreleri	Katsayı	Protein verimi	TFM	TEAK (DPPH)	TEAK (ABTS)
Kesişim	β_0	-127,62589 ^{***}	6,23190 ^{***}	3,58323 ^{***}	40,68581 ^{***}
Doğrusal					
Enzim oranı, A	β_1	174,60383 ^{***}	2,03533 ^{***}	0,97226 ^{***}	6,76721 ^{***}
Güç, B	β_2	0,22481 ^{***}	-0,021252 [*]	-0,012103 ^{***}	-0,031071 ^{***}
Sıcaklık, C	β_3	2,41691 ^{***}	0,18036 ^{***}	0,28101 ^{***}	0,18625 ^{***}
Süre, D	β_4	0,35525 ^{***}	-7,98362x10 ^{-3***}	-0,019897	-0,016870 ^{***}
Etkileşimli					
Enzim oranı x Güç, A x B	β_{12}	-0,12987 ^{***}	-3,99863x10 ^{-3*}	-1,05947x10 ⁻³	6,01504x10 ⁻³
Enzim oranı x Sıcaklık, A x C	β_{13}	-0,75789 ^{**}	1,05263x10 ⁻³	4,56140x10 ⁻³	-0,17614 ^{***}
Enzim oranı x Süre, A x D	β_{14}	0,049761	0,019617 ^{***}	1,24402x10 ⁻³	3,06220x10 ⁻³
Güç x Sıcaklık, B x C	β_{23}	8,22511x10 ⁻⁴	-5,79004x10 ^{-4***}	-8,54978x10 ^{-5*}	-2,90043x10 ^{-4*}
Güç x Süre, B x D	β_{24}	-1,65289x10 ⁻⁴	-6,19835x10 ⁻⁶	2,65643x10 ⁻⁶	8,32349x10 ^{-5*}
Sıcaklık x Süre, C x D	β_{34}	9,81818x10 ^{-3***}	-8,78788x10 ⁻⁵	1,24242x10 ⁻⁴	-1,06667x10 ^{-3**}
İkinci derece					
Enzim oranı x Enzim oranı, A ²	β_{11}	-36,52816 ^{***}	-0,079409	0,027701	-1,63250
Güç x Güç, B ²	β_{22}	-8,60882x10 ^{-5*}	3,48745x10 ^{-5***}	1,05941x10 ^{-5*}	2,78996x10 ^{-5***}
Sıcaklık x Sıcaklık, C ²	β_{33}	-0,030407 ^{***}	3,20926x10 ^{-3***}	-3,75000x10 ^{-3***}	3,71852x10 ^{-3***}
Süre x Süre, D ²	β_{44}	-4,31129x10 ^{-3***}	1,21350x10 ^{-4***}	9,13223x10 ^{-5**}	9,14601x10 ⁻⁵
R²		0,9870	0,9835	0,9813	0,9811
Ayarlanmış R²		0,9731	0,9657	0,9613	0,9606
p-değeri		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
F-değeri		70,67	55,35	48,86	48,08
Uyum eksikliği (Lack of fit)		0,6248	0,1559	0,0811	0,6994

Önem düzeyleri: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

Model denklemi: $Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_4D + \beta_{12}(AxB) + \beta_{13}(AxC) + \beta_{14}(AxD) + \beta_{23}(BxC) + \beta_{24}(BxD) + \beta_{34}(CxD) + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 + \beta_{44}D^2$

$$Y (TEAK (DPPH)) = 3,58323 + 0,97226x(A) - 0,012103x(B) + 0,28101x(C) - 0,0000854978x(BXC) + 0,0000105941x(B^2) - 0,00375000x(C^2) + 0,0000913223x(D^2)$$

$$Y (TEAK (ABTS)) = 40,68581 + 6,76721x(A) - 0,031071x(B) + 0,18625x(C) - 0,016870x(D) - 0,17614x(AXC) - 0,000290043x(BXC) + 0,0000832349x(BXD) - 0,00106667x(CXD) + 0,0000278996x(B^2) + 0,00371852x(C^2)$$

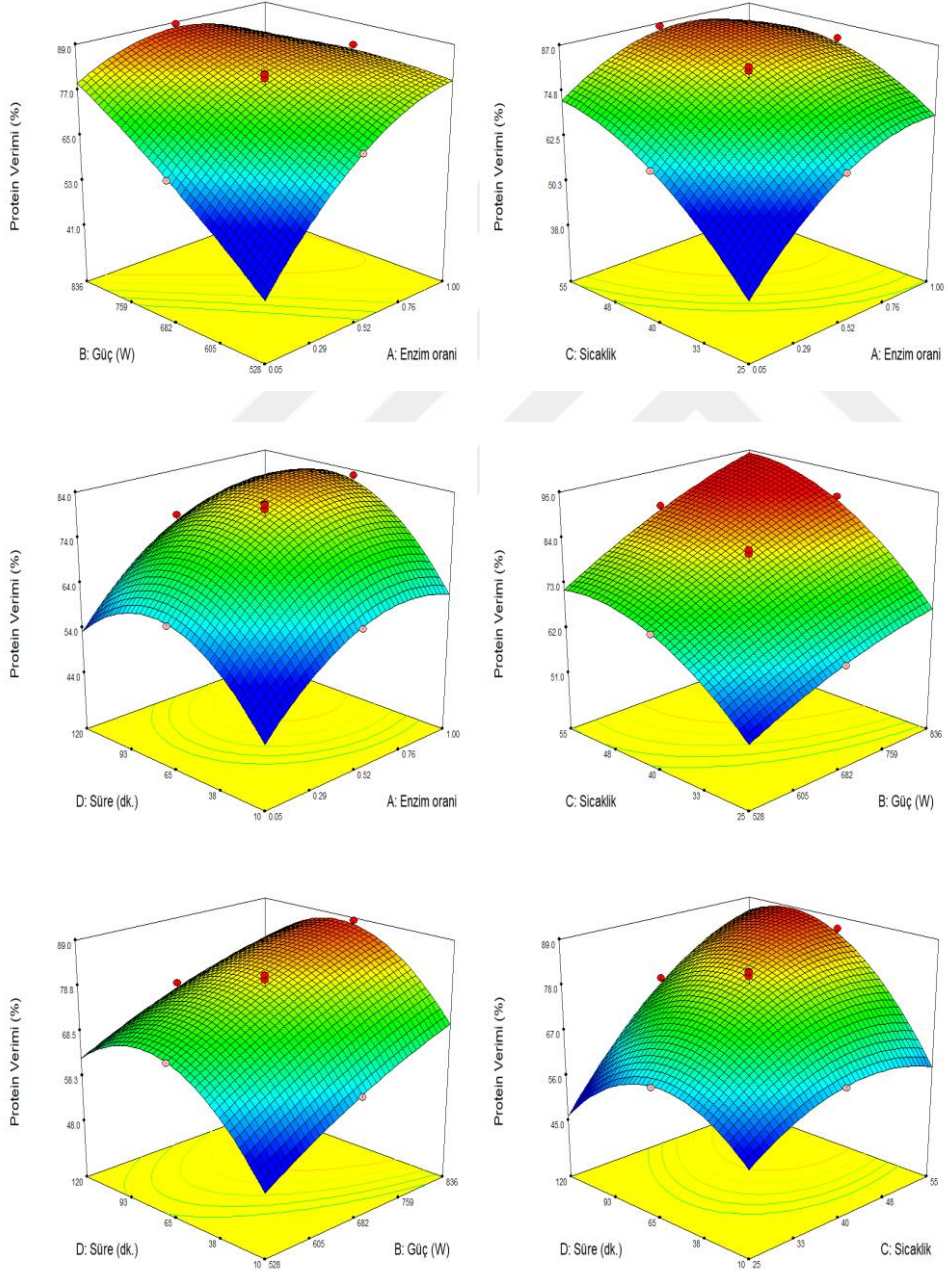
Bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri Şekil 4.13'te; TFM üzerine etkileri Şekil 4.14'te, TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri Şekil 4.15'te ve TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri ise Şekil 4.16'da gösterilmiştir.

Protein verimi, artan ultrases gücü ile birlikte artış göstermiş, artan enzim oranı ve sıcaklık ile ise belli bir noktaya kadar arttıktan sonra sabit duruma gelmiştir. TFM miktarı, artan enzim oranı ve işlem süresi ile birlikte artış göstermiş; artan ultrases gücü ve işlem sıcaklığı ile ise başlangıçta bir miktar düşüş ve ardından artış göstermiştir. TEAK (DPPH) değerinin enzim oranının artışı ile arttığı, işlem süresinin artışı ile ise başlangıçta düştüğü ve belirli bir noktadan sonra artışa geçtiği görülmektedir. İşlem sıcaklığındaki artışın ise TEAK (DPPH) değerini başlangıçta etkilemediği, belirli bir noktadan sonra ise bu değerde düşüş gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.15). Özütleme işlemlerinde optimum sıcaklık aralığının genellikle 40 – 55 °C arasında olduğu ve yeterli verimi sağlayan minimum sıcaklığın kullanıldığı ifade edilmektedir (Goula vd., 2018). Kombine işlem sonucu yapılan optimizasyon çalışması ile elde edilen optimum sıcaklık değerinin de bu yargıyı desteklediği görülmektedir. Son olarak TEAK (ABTS) değerinin ise, tüm bağımsız değişken değerlerinin artışıyla birlikte arttığı gözlenmektedir.

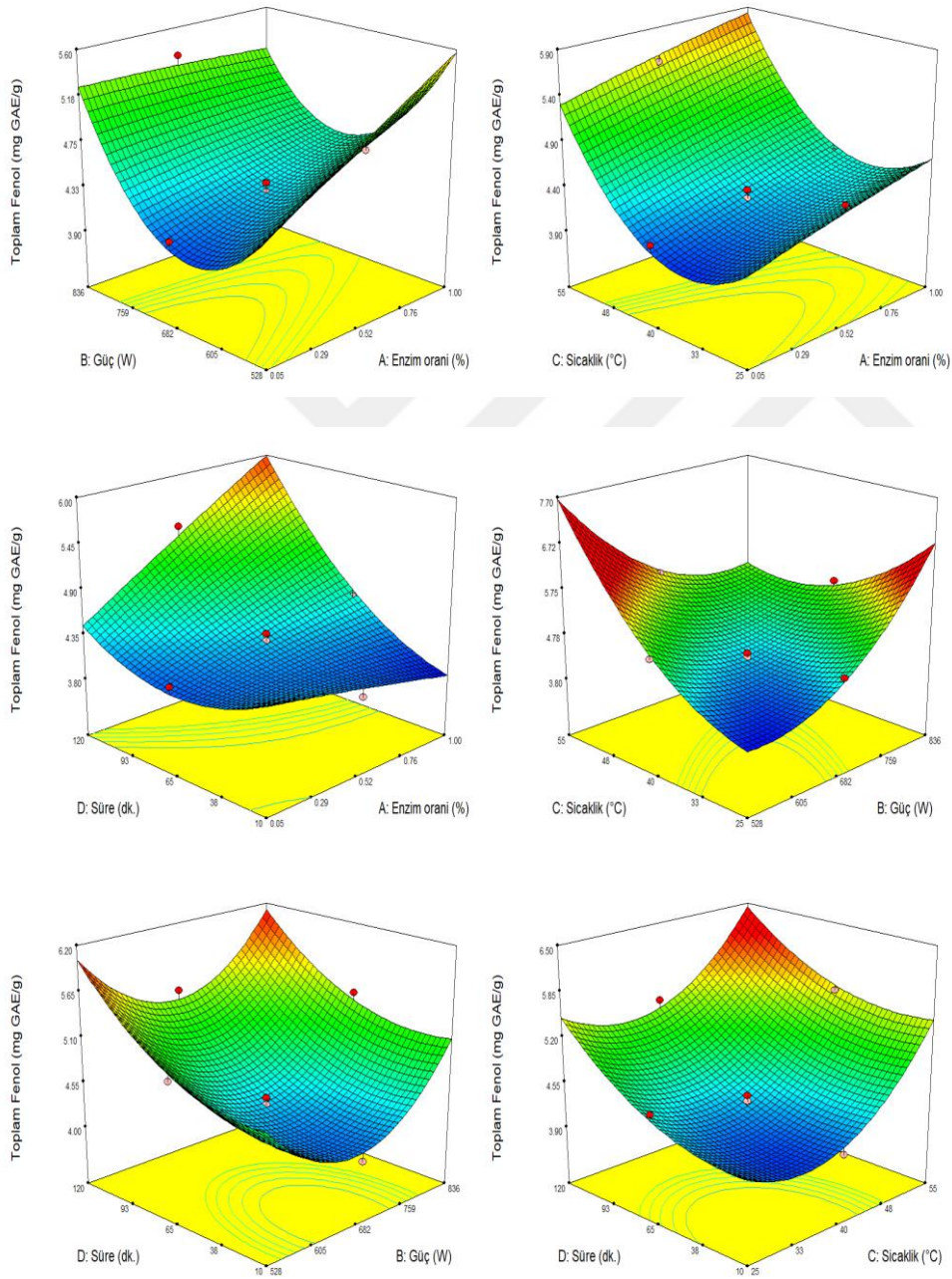
Wang vd. (2014), buğday kepeğinden arabinoksilan özütlenmesinde alkalaz ve ultrases kombine işleminin özütlenme verimini artırdığını belirtmiş, optimum işlem koşullarında (50 g/L hammadde konsantrasyonu, 4,5 g/L enzim oranı, 50 °C işlem sıcaklığı, 70 dk. işlem süresi ve 180 W ultrases gücü) arabinoksilan verimini %14,26 olarak rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada, aynı kombine işlemin balkabağından polisakkarit özütlenmesinde kullanıldığı ve optimum koşullardan elde edilen özütün doğal bir antioksidan olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Wu vd., 2014). Yumurta kabuğundan protein özütlenmesini ele alan bir çalışmada önce ultrases işlemi uygulanmış, ardından alkalaz ile enzimatik özütlenme işlemi gerçekleştirilmiştir (Jain ve Anal, 2016). Elde edilen protein özütünün işlem görmemiş kontrol örneğine kıyasla daha yüksek protein içeriği ve hidrolizasyon derecesine sahip olduğu, fonksiyonel özelliklerinin ise daha gelişmiş olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, kombine işlem sonucu elde edilen protein özütünün farklı gıda formülasyonlarında emülsifiye edici olarak kullanılabilceği ifade edilmiştir.

Sonuç olarak, alkalaz ve ultrases ile kombine özütlenme işleminde olduğu gibi farklı yöntemlerin bir arada kullanıldığı kombine teknikler gerek müşteri

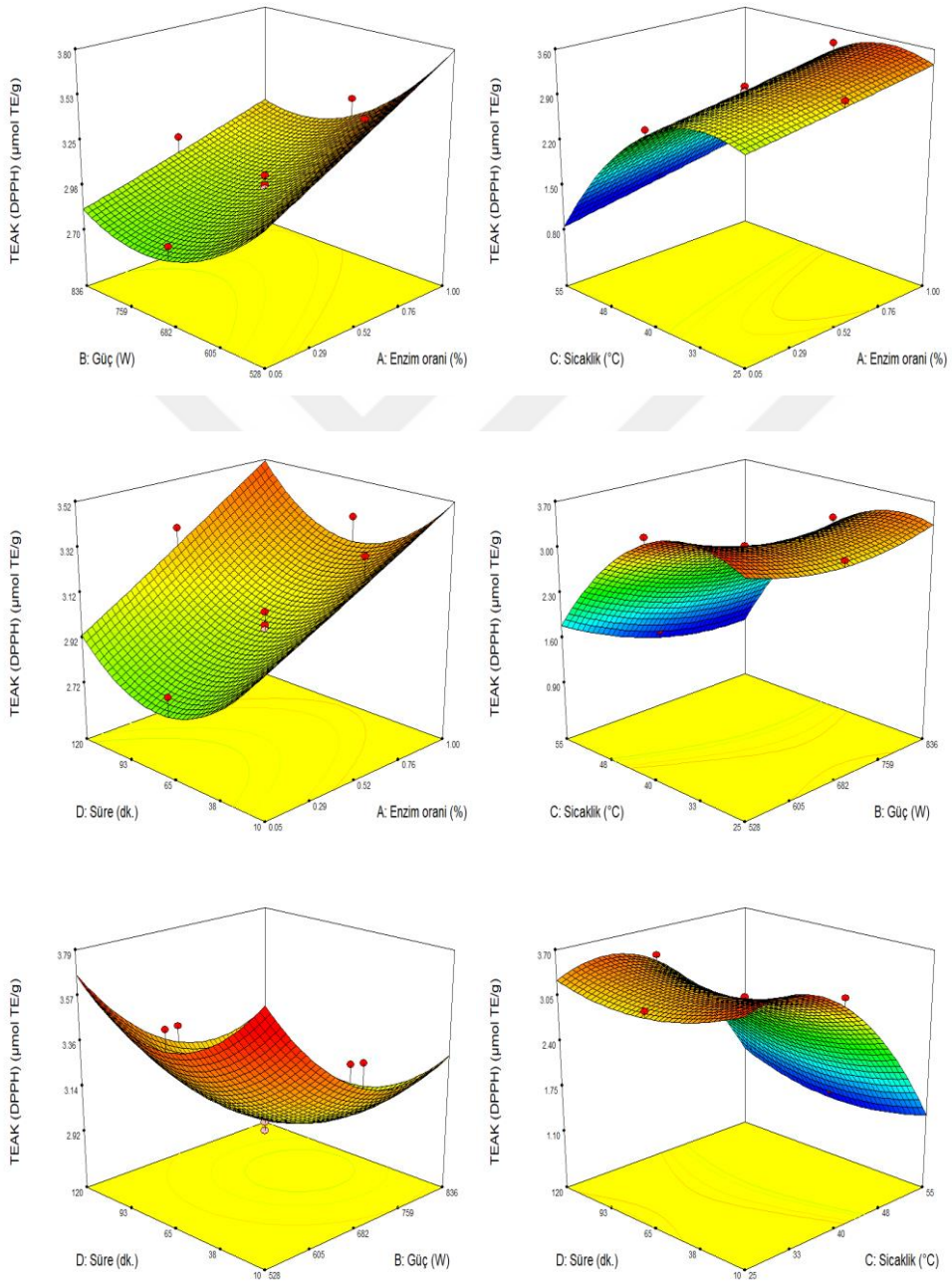
taleplerini gerekse sanayi için uzun vadede sürdürülebilir üretim koşullarını sağlayabilme potansiyeline sahiptir (Goula vd., 2018).



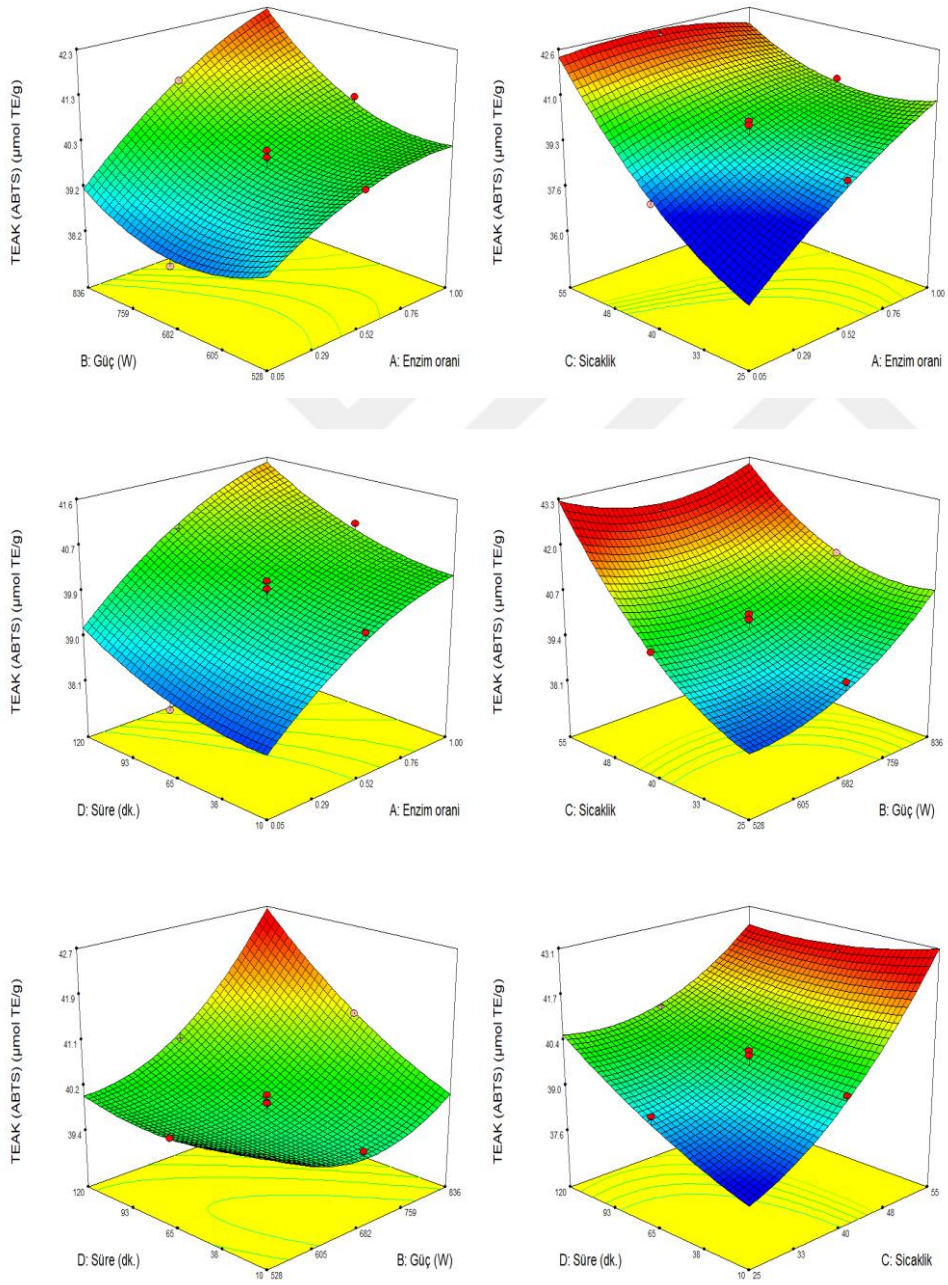
Şekil 4.13. Alkalaz ve ultrases ile kombine özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin protein verimi üzerine etkileri



Şekil 4.14. Alkalaz ve ultrases ile kombine özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TFM miktarı üzerine etkileri



Şekil 4.15. Alkalaz ve ultrases ile kombine özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (DPPH) değeri üzerine etkileri



Şekil 4.16. Alkalaz ve ultrases ile kombine özütleme işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) değeri üzerine etkileri

4.3.4.1. Enzim ile ultras es kombine özütlemeye ait işlem koşullarının optimizasyonu

Enzim (alkalaz) ile ultras es kombine özütleme işlemi için yapılan optimizasyon çalışmasına göre optimum enzim oranı (A) %0,62, ultras es gücü (B) 836 W, işlem sıcaklığı (C) 43 °C ve işlem süresi (D) 98 dk. olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Optimum koşullarda programın tahmini değerleri protein verimi (%) için 88,8, TFM (mg GAE/g) değeri için 5,59, TEAK (DPPH) ($\mu\text{mol TE/g}$) değeri için 2,83 ve TEAK (ABTS) ($\mu\text{mol TE/g}$) değeri için 42,4 olarak bulunmuştur. Optimum işlem koşulu için güvenilirlik değeri ise 0,922 olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen dört farklı üretim ile protein verimi %87,5, TFM 5,36 mg GAE/g, TEAK (DPPH) 3,30 $\mu\text{mol TE/g}$ ve TEAK (ABTS) değeri ise 39,3 $\mu\text{mol TE/g}$ olarak ölçülmüştür. Doğrulama çalışması için deneysel veriler ile programın tahmini değerleri ayrı ayrı kıyaslanmış, veriler arasında istatistiki açıdan farklılık olmadığı görülmüştür ($P>0,05$).

Çizelge 4.14. Alkalaz ve ultras es ile kombine özütlemeye en yüksek protein verimi, TFM ve TEAK (DPPH ve ABTS) değerleri için optimum işlem koşulları

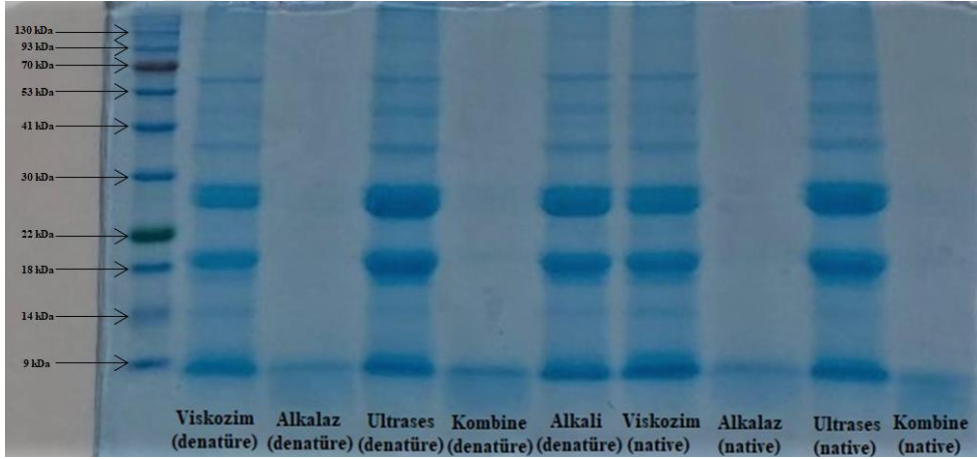
Alkalaz ve Ultras es Kombine İşlem Parametreleri					Parametre	Program çıktısı	Deneysel sonuç
Enzim oranı	Ultras es gücü	Sıcaklık	İşlem süresi	Güvenilirlik			
%0,62	836 W	43 °C	98 dk.	0,922	Protein verimi	88,8	87,9 ± 3,04
					TFM	5,59	5,46 ± 0,15
					TEAK (DPPH)	2,83	3,10 ± 0,02
					TEAK (ABTS)	42,4	39,9 ± 1,12

4.4. Optimum İşlem Koşullarında Üretilen Özütlere Uygulanan Analizler

Alkalaz ve viskozim L ile enzimatik, ultras es destekli ve enzim ile ultras es kombine özütleme işlemlerinden elde edilen veriler kullanılarak CCD ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Her bir işlem için belirlenen optimum koşullarda yeniden özütleme işlemleri gerçekleştirilmiş, elde edilen özütlere ve alkali yöntem ile üretilen özüte ait protein fraksiyonları SDS-PAGE analizi ile; kepeklere ait hücresel yapılar ise SEM analizi ile belirlenmiştir.

4.4.1. SDS-PAGE ile Protein Fraksiyonu

Her bir özütleme yönteminin optimum işlem koşullarında üretilen özütlerin, iki farklı şekilde –natürel (denatüre edilmemiş) ve denatüre (denatüre edilmiş)– protein fraksiyonları belirlenmiştir. Kıyaslama amacıyla, alkali yöntemle elde edilen özüt de denatüre formda analiz edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Optimum işlem koşullarında üretilen özütlerin protein fraksiyonları

Şekil 4.17’de görüldüğü üzere elde edilen özütlerde temel olarak 7 adet bant gözlenmektedir. En belirgin bantlar 22 – 30 kDa ve 18 – 22 kDa aralıklarında gözlenmekte olup, bu bantların denatüre edilmiş özütlerden viskozim, ultrases ve alkalide; denatüre edilmemiş özütlerden ise viskozim ve ultraseste yer aldıkları görülmektedir. Akbar vd. (2012) de susam ile yaptıkları çalışmada benzer aralıkta bantlar gözlemlenmiştir. Çalışılan aralıktaki en düşük protein ağırlığına sahip olan 9 kDa ağırlığındaki proteinlerin ise tüm özütlerde bulunduğu görülmektedir. Bu durum, özütlerde daha küçük molekül ağırlığına sahip fraksiyonların varlığına işaret edebilir.

Viskozim ve alkali özütlerde yer alan 14 kDa ağırlığındaki bantların, ultrases destekli özütlerdekine kıyasla bir miktar daha belirgin olduğu da görülmektedir. Ayrıca 30 – 41 kDa, 41 – 53 kDa ve 53 – 70 kDa aralığında da bantlar gözlenmekte olup, bir proteaz enzim olan alkalazın dâhil olduğu tüm işlemlerde

(denatüre ve native alkalaz; denatüre ve native kombine) ise 9 kDa'un üzerinde herhangi bir bant gözlenmemiştir. Buradan hareketle alkalazın özütleme işlemleri esnasında, mevcut proteinleri peptid ve amino asit gibi düşük molekül ağırlıklı alt ünitelere parçaladığı yorumu yapılabilir (Jodayree vd., 2012). Besinsel kalitenin yüksek olması için düşük molekül ağırlıklı peptidlerin fazla, serbest amino asit miktarının ise olabildiğince az olması gerektiği bildirilmektedir (Bhaskar vd., 2008). Bu nedenle, alkalaz ve kombine işlem uygulaması ile elde edilen özütlerde 9 kDa'dan düşük proteinlerin fraksiyonları da incelenerek potansiyel biyoaktif peptidlerin varlığı araştırılabilir.

Denatüre edilmiş ve edilmemiş özütlerin sahip olduğu protein profili arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Ly vd. (2018) de yağı alınmış pirinç kepeğinden ultrases destekli protein özütlemesi sonucu elde edilen özütlere ait protein fraksiyonlarının, alkali yöntem ile elde edilenle benzer olduğunu bildirmişlerdir. Denatürasyon işleminin daha yüksek sıcaklık ve/veya sürede yapılması ile denatüre örneklerde daha düşük molekül ağırlığına sahip bantların görünmesi sağlanabilir.

Literatürde susam proteinlerinin yaklaşık %25'ini teşkil eden 7 kDa ağırlığında 2S albumin ve 45 kDa ağırlığında 7S globulinlerin varlığı rapor edilmiştir (Beyer vd., 2002). Leduc vd. (2006) ise 11S globulinlerin susam tohumundaki proteinlerin %60 – 70'ini oluşturduğunu, izoformlarının ise 30 – 40 kDa ağırlığında asidik ve 20 – 25 kDa ağırlığında alkali alt birimlerden oluştuğunu bildirmiştir. Diğer bir protein fraksiyonu olan 2S albuminlerin ise toplam proteinin %15 – 25'ini teşkil eden 4 ve 9 kDa ağırlığında iki alt üniteden oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda, Şekil 4.17 incelendiğinde özellikle alkalazın dâhil olduğu özütleme işlemleri ile elde edilen protein özütlerinde 2S albuminlerin varlığı ile diğer tüm protein fraksiyonları, western blot gibi ileri teknikler kullanılarak açığa çıkarılabilir.

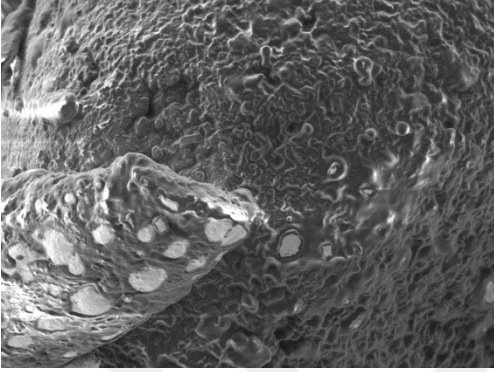
4.4.2. SEM ile Hücresel Yapının Görüntülenmesi

Optimum koşullarda gerçekleştirilen özütleme işlemlerinin ardından, özütleme sonrası açığa çıkan kepeklerin hücresel yapılarının incelenmesi amacıyla SEM ile görüntüleme analizi yapılmıştır. Görüntüler, 1000x büyütme oranı ile elde edilmiş olup sırasıyla '(a) işlem görmemiş susam kepeği', '(b) alkali özütleme sonrası

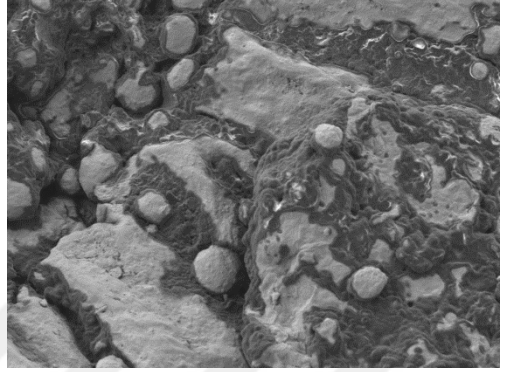
kepek', '(c) viskozim L ile özütleme sonrası kepek', '(d) alkalaz ile özütleme sonrası kepek', '(e) ultrases ile özütleme sonrası kepek' ve '(f) kombine işlem ile özütleme sonrası kepek' olacak şekilde Şekil 4.18'de verilmiştir.

Özütleme işlemi uygulanmayan susam kepeğinin (Şekil 4.19 (a)) sıkı bir hücreli yapıya sahip olduğu gözlenmektedir. Özütleme işlemi uygulanan kepeklerde ise hücreli yapılarda yer yer bozulmalar görülmekte olup, enzim ve ultrases işlemlerinin hücre duvarlarının degradasyonuna neden olduğu yorumu yapılabilir (Kaya vd., 2008). Şekiller incelendiğinde, en fazla hücreli deformasyonun enzim ve ultrases ile kombine özütleme işlemine ait kepekte (Şekil 4.19 (f)) gerçekleştiği görülmektedir. Özütleme işlemine tabi tutulan kepekler arasında en az hücreli bozulma ise, alkali yöntem ile elde edilen kepekte (Şekil 4.19 (b)) gözlenmiştir. Soya fasulyesinden yağ özütlenmesinde ultrases işleminin etkisini ele alan bir çalışmada, işlem süresinin artışı ile birlikte hammaddenin yüzey morfolojisinde hücreli bozulmaya işaret eden gözenekli yapılarda artış görüldüğü bildirilmiştir (Li vd., 2004). Ayrıca, enzim ve ultrases uygulamalarının hücre duvarına verdikleri hasardan dolayı çözücünün materyalin iç kısımlarına nüfus ederek hedef analitin daha etkin bir şekilde özütlenmesini sağladığı ifade edilmektedir (Zhang vd., 2009). Mısırdan flavonoid özütlenmesinde farklı tekniklerin etkilerini inceleyen bir çalışmada ultrases işleminin mikrodalgaya kıyasla bitkisel hücre yapısını daha fazla tahrip ederek hücre yüzeyinde çok sayıda çukurlu yapıların oluşumunu sağladığı rapor edilmiştir (Biesaga, 2011). Böylelikle, hücre içerisindeki bileşenlerin kavite etkileri aracılığıyla çözücünün bulunduğu ortama hızla salındığı ve bu durumun flavonoid degradasyonunu artırabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, özütleme işlemlerinde özütlenecek hedef bileşenin kaybını en az seviyede tutacak optimum işlem parametrelerinin belirlenmesi de önem arz etmektedir.

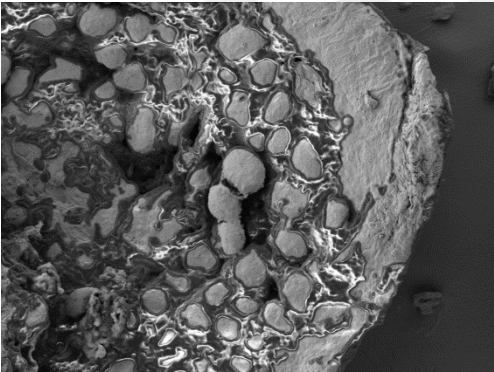
Sonuç olarak, uygulanan özütleme işlemlerinin susam kepeği üzerindeki hücreli boyuttaki etkileri, daha önce elde edilen özütleme verimi sonuçlarını destekler niteliktedir.



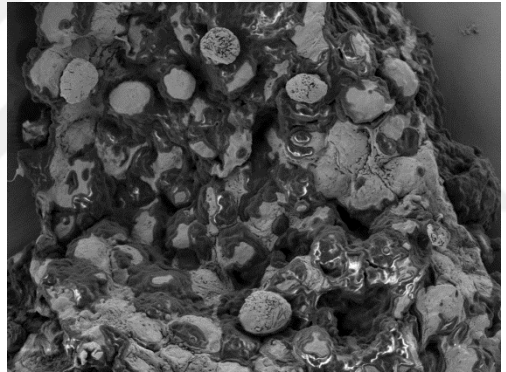
(a)



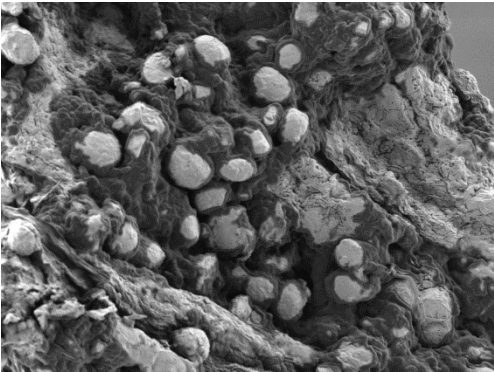
(b)



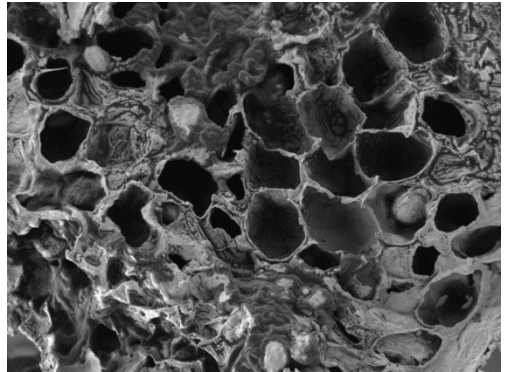
(c)



(d)



(e)



(f)

Şekil 4.18. Optimum özütleme işlemleri sonrası kepeklere ait SEM görüntüleri

5. SONUÇ

Tez çalışması sonucunda susam kepeğinden enzimatik ve ultrases destekli protein özütleme işlemleri için optimum işlem parametreleri belirlenmiştir. Kombine enzim ve ultrases işleminin etkisi de ayrıca değerlendirilmiştir.

Protein özütlemeye kontrol yöntemi olarak kullanılan alkali yöntemle kıyasla, uygulanan özütleme yöntemlerinin protein verimini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. En yüksek protein verimi ise kombine uygulama sonucunda elde edilmiştir. Özütlerin, proteinin yanı sıra fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasite özellikleri de değerlendirilmiştir.

Protein özütleme çalışmalarında viskozim L ve alkalaz ile enzimatik, ultrases destekli ve kombine (alkalaz ve ultrases ile) uygulamalar gerçekleştirilmiş; işlemlerde kullanılan parametrelerin etkileri ise yanıt yüzey yöntemi kullanılarak merkezi tümleşik dizayn ile değerlendirilmiştir. Çalışmalarda, kullanılan özütleme yöntemine bağlı olarak enzim oranı, ultrases gücü, pH değeri, işlem sıcaklığı ve işlem süresi, bağımsız değişkenler olarak ele alınmıştır.

Uygulamalar sonucu en yüksek protein verimi, fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasite değerlerinin hedef alındığı optimizasyon çalışmaları ile optimum işlem koşulları viskozim L ile özütleme işlemi için %0,58 enzim oranı, 6,0 pH, 51 °C işlem sıcaklığı, 117 dk. işlem süresi; alkalaz için %0,52 enzim, 9,8 pH, 51 °C, 68 dk.; ultrases için 630 W ultrases gücü, 54 °C, 86 dk.; alkalaz ve ultrasesin bir arada kullanıldığı kombine işlem için ise %0,62 enzim, 836 W güç, 43 °C ve 98 dk. olarak belirlenmiştir.

Alkali yöntem ile elde edilen protein verimi %24,5 iken, özütleme uygulamaları sonucu ulaşılan protein verimleri düşükten yükseğe sırasıyla viskozim L için %44,8, ultrases için %61,7, alkalaz için %78,9 ve kombine işlem için %88,8 olarak belirlenmiştir.

Her bir özütleme yöntemi için belirlenen optimum koşullardan elde edilen özütlerle SDS-PAGE ve SEM analizleri uygulanmıştır. Proteinlerin fraksiyonları ele alındığında denatürasyon işleminin bir farklılık yaratmadığı görülmüştür. Bir

proteaz olan alkalazın dâhil olduğu örneklerde ise 9 kDa'un üzerinde herhangi bir bant gözlenmemiştir. Aynı zamanda, özütleme işlemleri sonucu açığa çıkan susam kepeklerinin hücresel boyutta yapıları incelenmiştir. Uygulanan özütleme yöntemine bağlı olarak özütleme verimi arttıkça kepekte de hücresel deformasyonların önemli derecede arttığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, özellikle ülkemizde kavrulmuş susam ve tahin üretim proseslerinden yoğun bir şekilde atık olarak çıkan susam kepeğinin, bitkisel bir protein kaynağı olarak değerlendirilebileceği görülmektedir. Yapılacak ileri çalışmalar ile farklı özütleme tekniklerinin etkileri ve elde edilecek proteinin karakterizasyonunun belirlenmesi sonucu, bir gıda atığı olan susam kepeğinin katma değer oluşturan bir ürüne dönüştürülme potansiyeline sahip olduğu ifade edilebilir.

KAYNAKÇA

- Achouri, A., Nail, V., Boye, J.I. 2012. Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. **Food Research International**, 46(1), 360-369.
- Achouri, A., Boye, J.I. 2013. Thermal processing, salt and high pressure treatment effects on molecular structure and antigenicity of sesame protein isolate. **Food Research International**, 53(1), 240-251.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 27(6), 1256-1262.
- Agarwal, R.K., Bosco, S.J.D. 2014. Effect of extraction processes on physicochemical properties and antioxidant activity of virgin coconut oil. **Journal of Plantation Crops** (India).
- Akbar, F., Yousaf, N., Rabbani, M.A., Shinwari, Z.K., Masood M.S. 2012. Study of total seed proteins pattern of sesame (*Sesamum indicum* L.) landraces via sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). **Pakistan Journal of Botany**, 44(6), 2009-2014.
- Alupului, A., Calinescu, I., Lavric, V. 2009. Ultrasonic vs. microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants. In **Proceedings of the AIDIC Conference Series**, Vol. 9, pp. 1-8, Italy.
- Anilakumar, K.R., Pal A., Khanum, F., Bawa, A.S. 2010. Nutritional, medicinal and industrial uses of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds-an overview. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, 75(4), 159-168.
- AOAC (1988) Official Method of Analysis. 7th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- AOAC (1998) Official Method of Analysis. 15th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Asghar, A., Majeed, M.N., Akhtar, M.N. 2014. A review on the utilization of sesame as functional food. **American Journal of Food and Nutrition**, 4(1), 21-34.
- Bandyopadhyay, K., Ghosh, S. 2002. Preparation and characterization of papain-modified sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50:6854-6857.

- Bandyopadhyay, K., Misra, G., Ghosh, S. 2008. Preparation and characterisation of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal. **Journal of Oleo Science**, 57(1), 47-52.
- Batu, A., Elyıldırım, F. 2009. Geleneksel helva üretim teknolojisi. **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, 4(3):32-43.
- Beyer, K., Bardina, L., Grishina, G., Sampson, H.A. 2002. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 110(1), 154-159.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., Lalitha, R.G. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. **Bioresource Technology**, 99(2), 335-343.
- Biesaga, M. 2011. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, 1218(18), 2505-2512.
- Boye, J., Zare, F., Pletch, A. 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Research International**, 43:414-431.
- Cano-Medina, A., Jimenez-Islas, H., Dendooven, L., Herrera, R.P., Gonzalez-Alatorre, G., Escamilla-Silva, E.M. 2011. Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. **Food Research International**, 44:684-692.
- Cemeroğlu, B. 2010. Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 2. Baskı, Ankara.
- Charoensiddhi, S., Lorbeer, A.J., Lahnstein, J., Bulone, V., Franco, C.M., Zhang, W. 2016. Enzyme-assisted extraction of carbohydrates from the brown alga *Ecklonia radiata*: Effect of enzyme type, pH and buffer on sugar yield and molecular weight profiles. **Process Biochemistry**, 51(10), 1503-1510.
- Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, 11(7), 254-262.
- Dabbour, M., He, R., Ma, H., Musa, A. 2018. Optimization of ultrasound assisted extraction of protein from sunflower meal and its physicochemical and functional properties. **Journal of Food Process Engineering**, e12799.
- Dai, J., Mumper, R.J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, 15(10), 7313-7352.
- Dando, W.A. 2012. Food and famine in the 21st Century (2 volumes). ABC-CLIO, United States.

- Davies, R. 1959. Observations on the use of ultrasound waves for the disruption of micro-organisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, 33(2), 481-493.
- Demirhan, E., Kılıç Apar, D., Özbek, B. 2011. A kinetic study on sesame cake protein hydrolysis by alcalase. **Journal of Food Science**, 76(1):64-67.
- Elleuch, M., Besbes, S., Roiseux, O., Blecker, C., Attia, H. 2007. Quality characteristics of sesame seeds and by-products. **Food Chemistry**, 103:641-650.
- Erickson, D.R. (2015). Practical handbook of soybean processing and utilization. Elsevier, United States.
- Escamilla-Silva, E.M., Guzman-Maldonado, S.H., Cano-Medinal, A., Gonzalez-Alatorre, G. 2003. Simplified process for the production of sesame protein concentrate. Differential scanning calorimetry and nutritional, physicochemical and functional properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 83:972-979.
- Evlogimenou, A., Paraskevopoulou, A., Kiosseoglou, V. 2017. Exploitation of hazelnut, maize germ and sesame seed aqueous extraction residues in the stabilisation of sesame seed paste (tahini). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97(1), 215-221.
- Fabian, C., Ju, Y.H. 2011. A review on rice bran protein: Its properties and extraction methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 51(9), 816-827.
- FAOSTAT. 2017. Production quantities of Sesame seed by country. Kaynak: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, (Erişim Tarihi: 09.08.2017)
- Farran, M.T., Uwayjan, M.G., Miski, A.M.A., Akhdar, N.M., Ashkarian, V.M. 2000. Performance of broilers and layers fed graded levels of sesame hull. **The Journal of Applied Poultry Research**, 9:453-459.
- Floegel, A., Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I., Chun, O.K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, 24(7), 1043-1048.
- Fremont, S., Zitouni, N., Kanny, G., Veneri, V., Metche, M., Moneret-Vautrin, D.A., Nicolas, J.P. 2002. Allergenicity of some isoforms of white sesame proteins. **Clinical & Experimental Allergy**, 32(8), 1211-1215.

- Gandhi, A.P., Srivastava, J. 2007. Studies on the Production of Protein Isolates From Defatted Sesame Seed (*Sesamum indicum*) Flour and Their Nutritional Profile. **ASEAN Food Journal**, 14(3):175-180.
- Gama, R., Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I. 2015. Optimisation of enzymatic hydrolysis of apple pomace for production of biofuel and biorefinery chemicals using commercial enzymes. **3 Biotech**, 5(6), 1075-1087.
- Gao, Q., Smith, J.C., Tsopmo, A. 2014. Optimized Protamex digested oat bran proteins: antioxidant properties and identification of new peptides. **Austin Journal of Nutrition and Food Sciences**, 2, 1053.
- Ghaly, A.E., Alkoik, F.N. 2010. Extraction of protein from common plant leaves for use as human food. **American Journal of Applied Sciences**, 7(3): 331-342.
- Goula, A.M., Papatheodorou, A., Karasavva, S., Kaderides, K. 2018. Ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pomegranate seeds. **Waste and Biomass Valorization**, 9(1), 1-11.
- Grajeda-Iglesias, C., Salas, E., Barouh, N., Barea, B., Panya, A., Figueroa-Espinoza, M.C. 2016. Antioxidant activity of protocatechuates evaluated by DPPH, ORAC, and CAT methods. **Food Chemistry**, 194:749-757.
- Guan, X., Yao, H. 2008. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, 106: 345-351.
- Hanmoungjai, P.Y.L.E., Pyle, D.L., Niranjana, K. 2001. Enzymatic process for extracting oil and protein from rice bran. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 78(8), 817-821.
- Hourigan, J.A., Chesterman, C.F. 1997. Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 74(2), 141-146.
- Iqbal, S., Bhangar, M.I., Anwar, F. 2005. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. **Food Chemistry**, 93(2), 265-272.
- Jain, S., Anal, A.K. 2016. Optimization of extraction of functional protein hydrolysates from chicken egg shell membrane (ESM) by ultrasonic assisted extraction (UAE) and enzymatic hydrolysis. **LWT-Food Science and Technology**, 69, 295-302.
- Jambrak, A.R., Lelas, V., Mason, T.J., Kresic, G., Badanjak, M. 2009. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. **Journal of Food Engineering**, 93:386-393.

- Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Garsetti, M., Rosenberg-Zand, R.S., Jackson, C.J., Agarwal, S., Vuksan, V. 2000. Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormone receptor activity—a controlled crossover trial. **Metabolism-Clinical and Experimental**, 49(4), 537-543.
- Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Nam, K.C., Ahn, D.U., Lee, S.C. 2004. Effect of seed roasting conditions on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. **Journal of Food Science**, 69(5), C377-C381.
- Jiamyangyuen, S., Srijesdaruk, V., Harper, W. J. 2005. Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. **Extraction**, 27(1), 56.
- Jiang, L., Hua, D., Wang, Z., Xu, S. 2010. Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates. **Food and Bioproducts Processing**, 88:233–238.
- Jiao, J., Li, Z.G., Gai, Q.Y., Li, X.J., Wei, F.Y., Fu, Y.J., Ma, W. 2014. Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. **Food Chemistry**, 147, 17-24.
- Jodayree, S., Smith, J.C., Tsopmo, A. 2012. Use of carbohydrase to enhance protein extraction efficiency and antioxidative properties of oat bran protein hydrolysates. **Food Research International**, 46(1), 69-75.
- Johnson, L.A., Suleiman, T.M., Lusas, E.W. 1979. Sesame protein: a review and prospectus. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 56:463-468.
- Kanu, P.J., Kanu, J.B., Sandy, E.H., Kandeh, J.B.A., Mornya, P.M.P., Huiming, Z. 2009. Optimization of enzymatic hydrolysis of defatted sesame flour by different proteases and their effect on the functional properties of the resulting protein hydrolysate. **American Journal of Food Technology**, 4(6):226-240.
- Kanu, P.J., Kerui, Z., Ming, Z.H., Haifeng, Q., Kanu, J.B., Kexue, Z. 2007. Sesame Protein 11: Functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate as influenced by pH, temperature, time and ratio of flour to water during its production. **Asian Journal of Biochemistry**, 2(5), 289-301.
- Karataş, G. 2015. Effects of pre-treatments on quality characteristics and oil yields of sesame seeds. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.

- Kaya, I., Yigit, N., Benli, M. 2008. Antimicrobial activity of various extracts of *Ocimum basilicum* L. and observation of the inhibition effect on bacterial cells by use of scanning electron microscopy. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, 5(4), 363-369.
- Kenari, R., Mohsenzadeh, F., Amiri, Z.R. 2014. Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. **Food Science & Nutrition**, 2(4), 426-435.
- Khan, S.H., Butt, M.S., Sharif, M.K., Sameen, A., Mumtaz, S., Sultan, M.T. 2011. Functional properties of protein isolates extracted from stabilized rice bran by microwave, dry heat, and parboiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59(6), 2416-2420.
- Kim, H.Y., Kim, K. 2003. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(6), 1586-1591.
- Kim, K., Tsao, R., Yang, R., Cui, S.W. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chemistry**, 95:466-473.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D, Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, 102:1317-1327.
- Koçyiğit, A., Güler, E.M., Dikilitaş, M. 2018. Role of Antioxidant Phytochemicals in Prevention, Formation and Treatment of Cancer. In: *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells* (Cristiana, F. and Elena, A., Eds.), Intech Open, pp.21-45, United Kingdom.
- Krajcovicova-Kudlackova, M., Babinska, K., Valachovicova, M. 2005. Health benefits and risks of plant proteins. **Bratislavske Lekarske Listy**, 106(6/7), 231.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227(5259), 680.
- Latif, S., Anwar, F. 2011. Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction. **Food Chemistry**, 125(2), 679-684.
- Leduc, V., Moneret-Vautrin, D.A., Tzen, J.T.C., Morisset, M., Guerin, L., Kanny, G. 2006. Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. **Allergy**, 61(3), 349-356.
- Lee, S.C., Jeong, S.M., Kim, S.Y., Nam, K.C., Ahn, D.U. 2005. Effect of far-infrared irradiation on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(5), 1495-1498.

- Li, H., Pordesimo, L., Weiss, J. 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, 37(7), 731-738.
- Liu, B.L., Chiang, P.S. 2008. Production of hydrolysate with antioxidative activity and functional properties by enzymatic hydrolysis of defatted sesame (*Sesamum indicum* L.). **International Journal of Applied Science and Engineering**, 6(2), 73-83.
- Liu, J., Guan, X., Zhu, D., Sun, J. 2008. Optimization of the enzymatic pretreatment in oat bran protein extraction by particle swarm optimization algorithms for response surface modeling. **LWT-Food Science and Technology**, 41(10), 1913-1918.
- Lokumcu, F. 2000. Tahinin reolojik karakterizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Ly, H.L., Tran, T.M.C., Tran, T.T.T., Ton, N.M.N., Le, V.V.M. 2018. Application of ultrasound to protein extraction from defatted rice bran. **International Food Research Journal**, 25(2).
- Ma, M., Ren, Y., Xie, W., Zhou, D., Tang, S., Kuang, M., Du, S.K. 2018. Physicochemical and functional properties of protein isolate obtained from cottonseed meal. **Food Chemistry**, 240, 856-862.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86(13), 2046-2056.
- Madej, K. 2009. Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, 28(4), 436-446.
- Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. 1996. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, 3(3), S253-S260.
- Minh, N.P. 2015. Alcalase and protamex hydrolysis of bioactive peptides from soybean. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, 4(7), 132-143.
- Moulton, K.J., Wang, L.C. 1982. A pilot-plant study of continuous ultrasonic extraction of soybean protein. **Journal of Food Science**, 47(4), 1127-1129.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., Parajó, J.C. 2006. Functionality of oilseed protein products: a review. **Food Research International**, 39(9), 945-963.
- Mukhopadhyay, N., Ray, A.K. 1999. Effect of fermentation on the nutritive value of sesame seed meal in the diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, 5(4), 229-236.

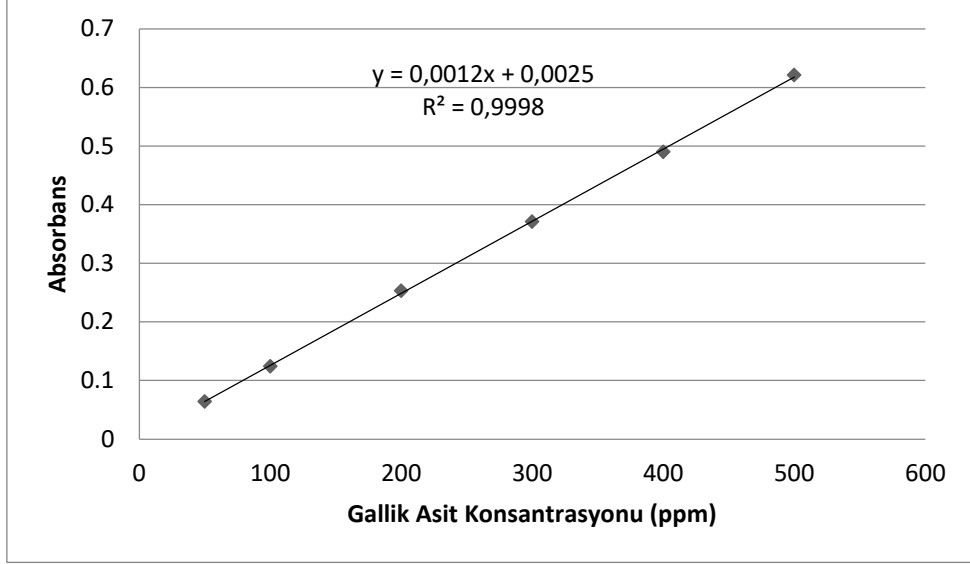
- Namiki, M. 1995. The chemistry and physiological functions of sesame. **Food Review International**, 11:281-329.
- Namiki, M. 2007. Nutraceutical functions of sesame: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47:651–673.
- Nehete, J.Y., Bhambar, R.S., Narkhede, M.R., Gawali, S.R. 2013. Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. **Pharmacognosy Reviews**, 7(14):107-116.
- Nguyen, H.Q., Dao, D.T.A. 2017. Release bioactive peptides from soybean by optimization the enzymatic hydrolysis by alcalase and protamex using response surface methodology. **Vietnam Journal of Science and Technology**, 55(2), 137.
- Noort, M.W., van Haaster, D., Hemery, Y., Schols, H.A., Hamer, R.J. 2010. The effect of particle size of wheat bran fractions on bread quality–Evidence for fibre–protein interactions. **Journal of Cereal Science**, 52(1), 59-64.
- Ohshima, T., Sato, M., Saito, M. 1995. Selective release of intracellular protein using pulsed electric field. **Journal of Electrostatics**, 35(1), 103-112.
- Papadakis, E.N., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E. 2006. Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1127(1-2), 6-11.
- Perez-Gago, M.B., Krochta, J.M. 2001. Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. **Journal of Food Science**, 66(5), 705-710.
- Phongthai, S., Homthawornchoo, W., Rawdkuen, S. 2016. Preparation, properties and application of rice bran protein: A review. **International Food Research Journal**, 24(1), 25.
- Pimentel, D., Dritschilo, W., Krummel, J., Kutzman, J. 1975. Energy and land constraints in food protein production. **Science**, 190(4216), 754-761.
- Poveda, T., Vilcacundo, R., Carpio, C., Carrillo, W. 2016. Analysis of sesame proteins isolate (*Sesamum indicum* L.) with water and salt treatment. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, 9(3):404-407.
- Proestos, C., Komaitis, M. 2006. Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction technics. **Journal of Food Quality**, 29(5), 567-582.

- Reyes, L.H., Mar, J.L.G., Rahman, G.M., Seybert, B., Fahrenholz, T., Kingston, H.S. 2009. Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, 78(3), 983-990.
- Ribeiro, B.D., Barreto, D.W., Coelho, M.A.Z. 2013. Enzyme-enhanced extraction of phenolic compounds and proteins from flaxseed meal. **ISRN Biotechnology**, 2013, 1-6.
- Rodsamran, P., Sothornvit, R. 2018. Physicochemical and functional properties of protein concentrate from by-product of coconut processing. **Food Chemistry**, 241, 364-371.
- Romero-Baranzini, A.L., Yanez-Farias, G.A. and Barron-Hoyos, J.M. 1995. A high protein product from chickpeas (*Cicer arietinum* L.) by ultrafiltration, preparation and functional properties. **Journal of Food Processing and Preservation**, 19:319-329.
- Roselló-Soto, E., Barba, F.J., Parniakov, O., Galanakis, C.M., Lebovka, N., Grimi, N., Vorobiev, E. 2015. High voltage electrical discharges, pulsed electric field, and ultrasound assisted extraction of protein and phenolic compounds from olive kernel. **Food and Bioprocess Technology**, 8(4), 885-894.
- Rosset, M., Prudencio, S.H., Beléia, A.D.P. 2012. Viscozyme L action on soy slurry affects carbohydrates and antioxidant properties of silken tofu. **Food Science and Technology International**, 18(6), 531-538.
- Sari, Y.W., Mulder, W.J., Sanders, J.P., Bruins, M.E. 2015. Towards plant protein refinery: review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. **Biotechnology Journal**, 10(8), 1138-1157.
- Sarkis, J.R., Michel, I., Tessaro, I.C., Marczak, L.D.F. 2014. Optimization of phenolics extraction from sesame seed cake. **Separation and Purification Technology**, 122:506–514.
- Sarkis, J.R., Boussetta, N., Blouet, C., Tessaro, I.C., Marczak, L.D.F., Vorobiev, E. 2015. Effect of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on polyphenol and protein extraction from sesame cake. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 29, 170-177.
- See, S.F., Hoo, L.L., Babji, A.S. 2011. Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. **International Food Research Journal**, 18(4), 1359-1365.

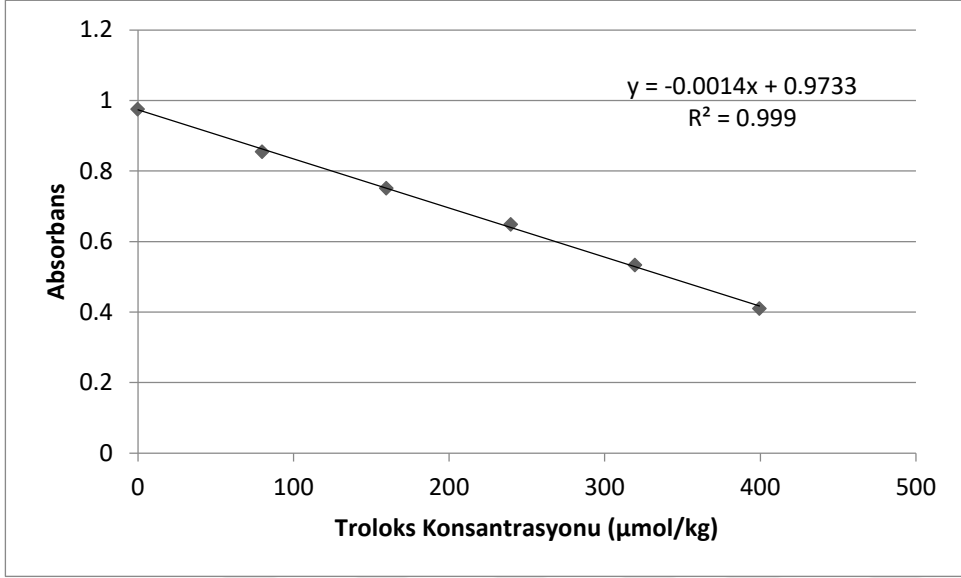
- Sharma, A, Khare, S.K., Gupta, M.N. 2002. Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 79(3):215-218.
- Sharma, L., Singh, C., Sharma, H.K. 2016. Assessment of functionality of sesame meal and sesame protein isolate from Indian cultivar. **Food Measure**, 10:520-526.
- Sharma, L., Singh, C. 2016. Sesame protein edible films: Development and characterization. **Food Hydrocolloids**, 61:139-147.
- Sharma, P.C., Tilakratne, B.M.K.S., Gupta, A. 2010. Utilization of wild apricot kernel press cake for extraction of protein isolate. **Journal of Food Science and Technology**, 47(6), 682-685.
- Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y., Chen, J. 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. **Food Chemistry**, 107(2), 929-938.
- Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y., Chen, J. 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. **Food Chemistry**, 107(2), 929-938.
- Sikirić, M., Brajenović, N., Pavlović, I., Havranek, J.L., Plavljančić, N. 2003. Determination of metals in cow's milk by flame atomic absorption spectrophotometry. **Czech Journal of Animal Science**, 48(11), 481-486.
- Silva, E.M., Rogez, H., Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, 55(3), 381-387.
- Singharaj, S., Onsaard, E. 2015. Production and characteristics of sesame proteins. **Journal of Food Science and Agricultural Technology**, 1(1):188-192.
- Şahin, G. 2014. Sesame as an important oil plant with decreasing production. **İnsan ve Toplum Bilimleri Araştırmaları Dergisi**; Cilt 3, Sayı 2, 404-433.
- Tang, S., Hettiarachchy, N.S., Shellhammer, T.H. 2002. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran. 1. Physical processing and enzyme treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(25), 7444-7448.
- Torre, P., Aliakbarian, B., Rivas, B., Domínguez, J.M., Converti, A. 2008. Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, 40(3), 500-506.

- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 9(2), 161-169.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Millán, F. 2000. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 77(4), 447-450.
- Wang, J., Sun, B., Liu, Y., Zhang, H. 2014. Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction of arabinoxylan from wheat bran. **Food Chemistry**, 150, 482-488.
- Wang, L., Weller, C.L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, 17(6), 300-312.
- Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X. 2007. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, 78(2), 693-700.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., Cresti, M. 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, 27(13), 2782-2786.
- Wani, A.A., Kaur, D., Ahmed, I., Sogi, D.S. 2008. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology. **LWT-Food Science and Technology**, 41(8), 1514-1520.
- Warra, A.A. 2011. Sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil methods of extraction and its prospects in cosmetic industry: a review. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, 4(2):164-168.
- Wei, W., Qi, X., Wang, L., Zhang, Y., Hua, W., Li, D., Lv, H., Zhang, X. 2011. Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. **BMC Genomics**, 12:451.
- Wu, H., Zhu, J., Diao, W., Wang, C. 2014. Ultrasound-assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata*). **Carbohydrate Polymers**, 113, 314-324.
- Xiao, W., Han, L., Shi, B. 2008. Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*. **Separation and Purification Technology**, 62(3), 614-618.
- Yavuz, M., Özçelik, B. 2016. Bitkisel protein izolatlarının fonksiyonel özellikleri. **Academic Food Journal**, 14(4), 424-430.

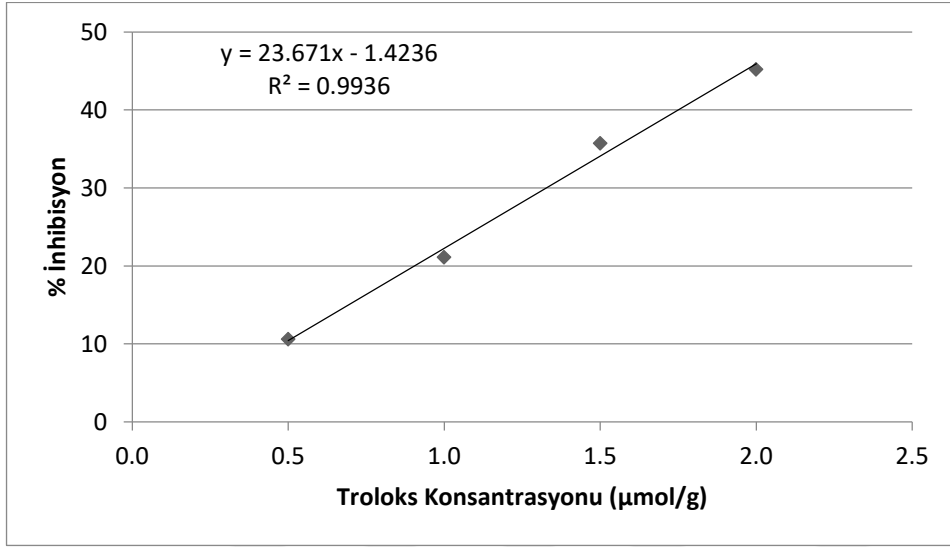
- Yazıcıoğlu, T. 1953. Tahin helvasının yapılışı ve terkihi. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı**, 1(2):109-116.
- Yılmaz, F.M. 2017. Vakumlu emdirim tekniğinin tüketime hazır taze elmanın doğal renk maddesi ve bazı katkı maddeleri ile zenginleştirilmesi amacıyla kullanılması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmamış), İzmir.
- Yılmaz, F.M., Bilek, S.E. 2018. Ultrasound-assisted vacuum impregnation on the fortification of fresh-cut apple with calcium and black carrot phenolics. **Ultrasonics Sonochemistry**, 48, 509-516.
- Yolmeh, M., Najafi, M.B.H., Farhoosh, R. 2014. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, 155, 319-324.
- Yoshida, H., Takagi, S. 1997. Effects of seed roasting temperature and time on the quality characteristics of sesame (*Sesamum indicum*) oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 75:19-26.
- Young, V.R., Pellett, P.L. 1994. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 59(5), 1203-1212.
- Yuan, X., Gu, X., Tang, J. 2008. Optimization of the production of *Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Ser. protein hydrolysates with hypoglycemic effect using Alcalase. **Food Chemistry**, 111(2), 340-344.
- Zhang, S.B., Wang, Z., Xu, S.Y. 2007. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 84(1), 97-105.
- Zhang, H.F., Yang, X.H., Zhao, L.D., Wang, Y. 2009. Ultrasonic-assisted extraction of epimedin C from fresh leaves of *Epimedium* and extraction mechanism. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 10(1), 54-60.
- Zhou, S., Liu, X., Guo, Y., Wang, Q., Peng, D., Cao, L. 2010. Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction. **Carbohydrate Polymers**, 81(4), 784-789.
- Zhou, K., Yu, L. 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. **LWT-Food Science and Technology**, 37(7), 717-721.
- Zhu, J., Fu, Q. 2012. Optimization of ultrasound-assisted extraction process of perilla seed meal proteins. **Food Science and Biotechnology**, 21(6), 1701-1706.

EKLER

EK 1: TFM analizi için gallik asit ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi



EK 2: TEAK (DPPH) analizi için troloks ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi



EK 3: TEAK (ABTS) analizi için troloks ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ahmet GÖRGÜÇ

Doğum Yeri ve Tarihi : Edirne – 30.04.1991

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü (2009 – 2014)

Lisans Yandal Öğrenimi : Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Endüstri Mühendisliği Bölümü (2011 – 2014)

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri
Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2016 – ...)

Yabancı Diller : İngilizce (2016 Güz YDS: 93,75)

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

A) Makaleler

-Yılmaz, F., M., Görgüç, A., Karaaslan, M., Vardin, H., Bilek, S., Uygun, Ö.,
Bircan, C., 2018. Sour cherry by-products: compositions, functional
properties and recovery potentials – a review. **Critical Reviews in Food
Science and Nutrition**, DOI: 10.1080/10408398.2018.1496901.

B) Bildiriler

-Yılmaz, F., M., Görgüç, A., Karaaslan, M., Vardin, H., Bircan, C., 2018.
Recovery potentials of grape and sour cherry by products. In Proceedings of
the **First International GAP Agriculture and Livestock Congress**, pp.
26. Harran University, Şanlıurfa, Turkey.

- Yılmaz, F., M., Görgüç, A., Bircan, C., 2018. Protein isolation from sesame bran. In Proceedings of the **First International GAP Agriculture and Livestock Congress**, pp. 29. Harran University, Şanlıurfa, Turkey.
- Yılmaz, F., M., Görgüç, A., Yıldırım, E., Karakuş, M., 2018. Formulation and production of colored hard candy. In Proceedings of the **First International GAP Agriculture and Livestock Congress**, pp. 546. Harran University, Şanlıurfa, Turkey.
- Yılmaz, F., M., Görgüç, A., Elmas, F., Mutlu, Ç., G., Atılgan, Ö., 2018. Ultrasound assisted extraction of natural colorant from red beet (*Beta vulgaris* L.). In Proceedings of the **First International GAP Agriculture and Livestock Congress**, pp. 547. Harran University, Şanlıurfa, Turkey.
- Görgüç, A., Yılmaz, F., M., Bircan, C., 2018. Food waste sesame bran: a new plant protein source. In Proceedings of the **Fifth International ISEKI Food Conference**, pp. 93. Hohenheim University, Stuttgart, Germany.
- Yılmaz, F., M., Görgüç, A., Birişik, M., Genç, E., Başkurt, C., 2018. Enzymatic extraction of betalains from red beet. In Proceedings of the **Fifth International ISEKI Food Conference**, pp. 126. Hohenheim University, Stuttgart, Germany.
- Yılmaz, F., M., Görgüç, A., Karaaslan, M., Vardin, H., Bilek, S., Uygun, Ö., Bircan, C., 2018. Composition and functional properties of sour cherry seed oil – a review. In Proceedings of the **Fifth International ISEKI Food Conference**, pp. 275. Hohenheim University, Stuttgart, Germany.

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : ahmet.gorguc@adu.edu.tr

Tarih : 15/08/2018