



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



BİTKİSEL PROTEİN ÜRETİMİ VE EKSTRAKSİYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Yüksek Lisans Tezi

Miray ÇETİNER

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İzmir
2019

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BİTKİSEL PROTEİN ÜRETİMİ VE EKSTRAKSİYON
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

Miray Çetiner

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Seda ERSUS BİLEK

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 01.04.2019

Bornova-İZMİR

2019

Miray ÇETİNER tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunulan “Bitkisel Protein Üretimi ve Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 01.04.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:
Raportör Üye	:
Üye	:

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bitkisel Protein Üretimi ve Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

İmzası

Miray ÇETİNER

ÖZET**BITKİSEL PROTEİN ÜRETİMİ VE EKSTRAKSİYON
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

ÇETİNER, Miray

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Seda ERSUS BİLEK

Mart 2019, 74 sayfa

Günümüzde artan nüfusla birlikte mevcut protein kaynakları azalmakta ve yeni alternatif protein kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkisel protein kaynaklarının ucuz ve kolay ulaşılabilir olması, vegan ve vejetaryen gibi özel tüketici gruplarına hitap etmesi ve besleyici içeriklerinin yüksek olmasından dolayı, bu tip ürünler iyi bir alternatif protein kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, “Büyük ebegümeci” (*Malva sylvestris*) yapraklarından alternatif bitkisel protein tozu üretilmiştir. Ebegümeci yapraklarının kuru madde içeriği $18,58 \pm 0,11$, Dumas ve Kjeldahl yöntemleriyle belirlenen kuru madde bazında protein içeriği ise sırasıyla $40,01 \pm 0,23$ ve $37,93 \pm 0,31$ 'dir. Ebegümeci yapraklarının amino asit bileşimi incelendiğinde önemli oranlarda aspartik asit ($13,9$), glutamik asit ($11,9$) ve lösin ($9,6$) içerdiği belirlenmiştir. Ebegümeci yapraklarından yüksek verimde protein eldesi için en uygun yöntemin belirlenmesi amacıyla izoelektrik çöktürme, amonyum sülfat çöktürme ve izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemleri uygulanması sonucunda protein verimleri sırasıyla $14,04 \pm 0,42$, $17,30 \pm 0,87$ ve $26,53 \pm 0,81$ bulunmuştur. En yüksek protein verimine izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile ulaşıldığı belirlendikten sonra ekstraksiyon parametrelerinden pH değeri 8,5 ve katı:çözgen oranı 1:20'de sabit tutularak farklı ekstraksiyon sıcaklığı ($60,70$ ve 80 °C) ve sürenin (60 ve 120 dk.) protein verimine etkisi belirlenmiştir. Örnekler 8 konsantrasyonda enzim ile 45 °C'de 30 dk. bekletilerek hücrelerin enzimatik olarak parçalanması için ön işleme tabi tutulduktan sonra belirlenen koşullarda (80 °C ve 60 dk.) ekstrakte edilmiştir. Bu durumda, ebegümeci yaprağında bulunan proteinin $47,33 \pm 2,12$ 'si elde edilmiştir.

Ekstraklar liyoflizatörde (-48 °C, 9 sa) kurutulularak protein tozları üretilmiştir. Protein tozlarının toplam kuru madde içeriği %86,30±0,01, toplam kül içeriği ise kuru maddede %7,75±1,32 olarak bulunmuştur. Kuru madde bazında protein miktarı %81,74±1,74 olarak bulunmuştur. Protein tozu elzem amino asitlerden treonini (%8,3), elzem olmayan amino asitlerden ise serin (%16,2) ve aspartik asidi (%15,4) önemli oranlarda içermektedir.

Protein tozlarının kalite özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan analizler sonucu yığın yoğunluğu 175,96±2,97 kg/m³, sıkıştırılmış yığın yoğunluğu 253,14±3,61 kg/m³ olarak belirlenmiştir. Protein tozları hesaplanan Carr endeksi (%43,88±2,08) değerine göre iyi bir akabilirlik özelliği göstermediği saptanmıştır. Protein tozlarının L*, a* ve b* değerleri sırasıyla 66,82±0,01, 0,41±0,01 ve 15,22±0,04 bulunmuştur. Partikül yoğunluğu, ıslanabilirlik ve dağılıbilirlik değerleri sırasıyla 302,28±5,22 kg/m³, 54,67±4,11 sn ve %66,76±2,30 olarak saptanmıştır. Protein tozlarının pH 6,5, 7,5 ve 8,5 değerlerinde tamamen çözündüğü bulgulanmıştır.

Anahtar sözcükler: Bitkisel protein, ebegümeci, protein tozu

ABSTRACT**EXTRACTION OPTIMIZATION AND PRODUCTION OF PLANT
PROTEIN**

ÇETİNER, Miray

MSc in Food Eng.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Seda ERSUS BİLEK

March 2019, 74 pages

Today, with increasing populations, existing protein sources decrease over time, thus alternative protein sources are needed. Plant protein resources are considered as great alternative protein resources due to their rich nutritional content, cheapness, easy to access and address specific consumer groups such as vegan and vegetarian. In this thesis study, alternative plant protein powder is produced from *Malva sylvestris* (big mallow) leaves. The dry matter content of the mallow leaves was $18,58 \pm 0,11\%$ and the protein content based on the dry matter determined by Dumas and Kjeldahl methods was found as $40,01 \pm 0,23\%$ and $37,93 \pm 0,31\%$, respectively. When the amino acid composition of the mallow leaves is examined, it has been determined that it contains significantly aspartic acid (13,9%), glutamic acid (11,9%) and leucine (9,6%). In order to determine the most suitable method for produce protein in high yield from mallow leaves, isoelectric precipitation, ammonium sulphate precipitation and isoelectric/ammonium sulphate precipitation methods were tried and protein yields found as $14,04 \pm 0,42\%$, $17,30 \pm 0,87\%$ and $26,53 \pm 0,81\%$, respectively. After the determination of the highest protein yield was reached by isoelectric / ammonium sulfate precipitation method, the pH value and solid:solvent ratio of the extraction parameters were kept constant as 8.5 and the 1:20, respectively and, the effect of different extraction temperature (60,70 and 80°C) and time (60 and 120 min.) on protein yield were determined. Samples were incubated for 30 min at 45 ° C with 8% concentration of enzyme as pretreated for enzymatic degradation of the cells, then were extracted under determined

conditions (80°C, 60 min.). In this case, $47.33 \pm 2.12\%$ protein were obtained from mallow leaf protein.

The extracts were dried in the lyophilized medium (-48 °C, 9 h) to produce protein powders. The total dry matter content of the protein powders was 86.30 ± 0.01 and the total ash content was found as $7.75 \pm 1.32\%$ in the dry matter. The amount of protein on dry matter basis was found $81.74 \pm 1.74\%$. Protein concentrate powder contains threonine (8.3%) from essential amino acids, and cool (16.2%) and aspartic acid (15.4%) from non-essential amino acids.

In order to determine the quality characteristics of protein powders, bulk density was determined as $175.96 \pm 2.97 \text{ kg/m}^3$ and compressed bulk density was $253.14 \pm 3.61 \text{ kg/m}^3$. It was determined that the protein powders did not show a good flowability according to the calculated Carr index ($43.88 \pm 2.08\%$). L^* , a^* and b^* values of protein concentrates were found as 66.82 ± 0.01 , 0.41 ± 0.01 and 15.22 ± 0.04 , respectively. The particle density, wettability and dispersibility values were $302.28 \pm 5.22 \text{ kg/m}^3$, $54.67 \pm 4.11 \text{ sec}$ and $66.76 \pm 2.30\%$ respectively. Protein concentrates were found to dissolve completely at pH 6.5, 7.5 and 8.5.

Keywords: Plant protein, mallow, protein powder

TEŞEKKÜR

Tez alıőmam sűresince bilgi ve tecrűbelerini esirgemeyen ve vermiő olduėu manevi desteklerden dolayı deėerli tez danıőmanım sayın Doç. Dr. Seda ERSUS BİLEK'e

Laboratuar çalıőmalarım sűresinde yardımlarını esirgemeyen Gizem ÖZBEK'e, AYÇA AKYŪZ'e, Ayőe Binnur KARATAŐ'a ve

Son olarak hayatım boyunca verdiėim her kararda beni destekleyen babam MEHMET MURAT ÇETİNER'e, annem ŪLKŪ ÇETİNER'e ve kardeőim SİMAY ÇETİNER'e çok teőekkűr ederim



İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1 Proteinler	4
2.2 Bitkisel Proteinler	7
2.3 Ebegümeci Bitkisinin Genel Özellikleri	11
2.4 Protein Ayırma Yöntemleri	13
2.4.1 Alkali Ekstraksiyon/İzoelektrik Çöktürme Yöntemi	14
2.4.2 Tuz Destekli Ekstraksiyon/Amonyum Sülfat Çöktürme Yöntemi	15
2.5 Ekstraksiyon Parametrelerin Ekstraksiyon Verimine Etkisi.....	17
2.5.1 Optimum Ekstraksiyon Koşullarının Belirlenmesi.....	19
2.6 Enzimatik Ön İşlemlerin Protein Ekstraksiyonu Verimine Etkisi	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1 Materyal	24
3.2 Yöntem	23
3.2.1 Protein Ayırma Yöntemleri.....	23
3.2.1.1 İzoelektrik Çöktürme Yöntemi	25
3.2.1.2 Amonyum Sülfat ile Çöktürme Yöntemi	26
3.2.1.3 İzoelektrik/Amonyum Sülfat Çöktürmesi	28
3.2.2 Ekstraksiyon Parametrelerinin Belirlenmesi.....	28
3.2.3 Dondurarak Kurutma	30
3.2.4 Analiz Yöntemleri.....	30
3.2.4.1 Hammaddeye Yapılan Analizler	30
3.2.4.1.1 Toplam Kuru Madde Analizi	30
3.2.4.1.2 Toplam Kül Analizi	31
3.2.4.1.3 Toplam Protein Miktarı Analizi.....	31
3.2.4.1.4 Amino Asit Kompozisyonu Analizi.....	31
3.2.4.2 Protein Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi	31
3.2.4.3 Protein Tozlarına Yapılan Analizler	32
3.2.4.3.1 Protein Çözünürlüğü Tayini.....	32

3.2.4.3.2 Su Aktivitesi Tayini	32
3.2.4.3.3 Yığın Yoğunluğu Analizi	33
3.2.4.3.4 Sıkıştırılmış Yığın Yoğunluğu Analizi	33
3.2.4.3.5 Carr Endeks Değerinin Belirlenmesi	33
3.2.4.3.6 Partikül Yoğunluğu Analizi	34
3.2.4.3.7 Islanabilirlik Analizi	34
3.2.4.3.8 Dağılıbilirlik Analizi	34
3.2.4.3.9 Renk Analizi	35
3.2.4.3.10 İstatiksel Analiz	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1 Ebegümeçi Yaprığına Ait Analiz Sonuçları.....	36
4.2 Protein Tozu Eldesi.....	38
4.2.1 Protein Ayırma Yönteminin Belirlenmesi	37
4.2.2 Ekstraksiyon Parametrelerinin Belirlenmesi	39
4.2.3 Enzim Destekli Ekstraksiyonun Protein Verimine Etkisi.....	44
4.3 Protein Tozlarına Yapılan Analizler.....	45
4.3.1 Toplam Kuru Madde, Toplam Kül Miktarı, Protein ve Su Aktivitesi Analizi.....	45
4.3.2 Protein Tozlarının Amino Asit Kompozisyonu.....	46

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.3.3 Protein Çözünürlüğü	47
4.3.4 Renk Analizi	48
4.3.5 Yığın Yoğunluğu, Sıkıştırılmış Yığın Yoğunluğu ve Carr Endeksinin Belirlenmesi	50
4.3.6 Partikül Yoğunluğu, Islanabilirlik ve Dağılılabirlik Özelliklerinin Belirlenmesi	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR DİZİNİ	56
ÖZGEÇMİŞ	74
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Amino asitlerin genel yapısı	4
2.2 Polipeptit zincirinin genel yapısı	5
2.3 Proteinlerin üç boyutlu yapısı	5
2.4 Ebegümeçi (<i>Malva sylvestris</i>)	12
3.1 Tez çalışması kapsamında kullanılan ebegümeçi (<i>Malva sylvestris</i>) yaprakları	24
3.2 Ebegümeçi yapraklarından izoelektrik çöktürme yöntemiyle protein tozu üretimi	26
3.3 Ebegümeçi yapraklarından amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle protein tozu üretimi	27
3.4 Ebegümeçi yaprağından enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat yöntemi ile yapılan protein tozu üretimi akış şeması	29
4.1 Ekstraksiyon sıcaklığının protein verimine etkisini incelemek için yapılan ön denemeler sonucu elde edilen protein verimleri	40
4.2 Ekstraksiyon sıcaklığı ve sürenin protein verimine etkisi	43
4.3 pH değerinin enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle elde edilen protein tozunun protein çözünürlüğü üzerine etkisi	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Soya fasulyesi, nohut, kinoa ve pirinç kepeği proteinlerin amino asit kompozisyonu	9
2.2 Enzim destekli ekstraksiyon işleminde kullanılan bazı ticari enzimler	21
3.1 Carr Endeks değerine göre protein tozlarının akabilirliklerinin sınıflandırılması	33
4.1 Ebegümeçi yaprağının Kjeldahl ve Dumas yöntemleriyle hesaplanan azot ve protein miktarları.....	36
4.2 Ebegümeçi yaprağının amino asit kompozisyonu	37
4.3 Ebegümeçi yaprağına uygulanan çöktürme yöntemleri sonucu elde edilen protein verimleri.....	39
4.4 Protein tozlarına ait toplam kuru madde, toplam kül, protein ve su aktivitesi değerleri	45
4.5 Ebegümeçi yaprağından elde edilen protein tozu ile soya protein konsantresinin amino asit içerikleri	46
4.6 Enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle ebegümeçi yaprağından elde edilen protein tozu ve soya protein konsantresinin renk değerleri	49
4.7 Enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle ebegümeçi yaprağından elde edilen protein tozunun yığın yoğunluğu, sıkıştırılmış yığın yoğunluğu ve Carr Endeksi değerleri.....	50
4.8 Enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle ebegümeçi yaprağından elde edilen protein tozunun partükül yoğunluğu, ıslanabilirlik ve dağılılırlik değerleri.....	51



1.GİRİŞ

Canlıların temel yapıtaşı olan proteinler, vücudun hayati fonksiyonların düzenlenmesini sağlayan karmaşık yapıda makro moleküllerdir. Proteinler, 20 farklı amino asidin farklı sayıda, dizilimde ve oranlarda peptit bağlarıyla bağlanmasıyla oluşmaktadır (Saldamlı ve Temiz, 2017). Proteinlerin yapısında bulunan 20 amino asidin 12 çeşidini insan vücudu sentezleyebilirken 8 amino asit çeşidini sentezleyemez ve dışardan besin yoluyla alınması gerekmektedir. Aksi takdirde, bu amino asitlerden yapılan proteinler üretilemez ve bu durum sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Bu nedenle, tüketilen gıdaların elzem amino asit içeriği tüketiciler için önemli olmakla birlikte o gıdanın kalitesini belirlemektedir (Seydim ve Çağdaş, 2016). Günlük alınması gereken protein miktarı yaş ve cinsiyete bağlı olmakla birlikte yetişkin bireyler için 0,75 g/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (WHO, 1985).

Günümüze kadar protein ihtiyacı daha çok hayvansal protein kaynaklarından karşılanırken, son yıllarda hızla artan nüfusla birlikte bu ihtiyacın karşılanması zorlaşmaktadır. Buna karşılık, bitkisel kaynaklı proteinlerin ucuz ve geniş kaynak çeşitliliğine sahip olması dünyada protein eksikliği yaşanan gelişmekte olan ülkelerde, bitkisel protein kaynaklarının önemini arttırmıştır.

Bitkisel protein kaynakları içerisinde en çok üretilen ve tüketilen %40 oranında protein içeren soya fasulyesidir. Soya fasulyesinin, elzem amino asitlerin hepsini içermesi ve yüksek fonksiyonel özellik göstermesinden dolayı gıda uygulamalarında sıklıkla kullanılan bir bitkisel protein kaynağıdır. Soya fasulyesi dışında yağlı tohumlar (kolza/kanola tohumu, ayçiçeği çekirdeği, susam küspesi, yer fıstığı tohumu vb.), bakliyatlar (bezelye, acı bakla, nohut, mercimek vb.), tahıllar (pirinç, buğday, arpa, yulaf, kinoa vb.) önemli bitkisel protein kaynaklarıdır. Fakat başta soya fasulyesi olmak üzere acı bakla, yer fıstığı, bezelye, nohut, mercimek gibi birçok bitkisel protein alerjen maddeler de içermektedir (Singh and Bhalla, 2008; Riascos et al., 2010). Ayrıca soya fasulyesi üretiminde transgenik yapıda genlerinin değiştirilmesi ile genetiği değiştirilmiş tiplerin elde edilmesi bu ürünlere karşı tepkili yaklaşan tüketicilerin bu tür ürünleri tüketmemesi sonucu farklı bitkisel protein kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durumda, bol miktarda bulunan ve yüksek oranda besleyici bileşen ve protein içeren yeşil bitkiler

ve yapraklar yeni alternatif protein kaynağı olarak değerlendirilmekte ve bu kaynaklardan protein üretimi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Aletor et al., 2002; Fasuyi, 2006; Ghaly and Alkoik, 2010; Tenorio et al., 2016).

Ebegümeçigiller (Malvaceae) familyasında bulunan aynı cinsten 1500 türü olan, iki ya da çok yıllık otsu bitkilerin genel adı ebegümeçidir. Çalışmamızda kullanılan ebegümeçi, *Malva sylvestris* (Büyük ebegümeçi) türünden olup boyu 20–30 cm ve yaprakları yuvarlak, biçimli, kenarları dişli, uzun saplı, tüylü ve damarlıdır (Keskin vd., 2015). Çayırklar, hendek kenarları, gelgit nehirlerinin kıyıları gibi nemli alanları tercih eden ebegümeçi bitkisi daha çok Avrupa ve Asya'da yetişmektedir (Tabaraki et al., 2012; Samavati and Manoochehrizade, 2013). Tüketimi M.Ö. 3000 yılına dayanan *Malva sylvestris* içeriğinde yüksek oranda bulunan müsilaj, antioksidan ve fenolik maddeler sayesinde hastalıkların tedavisinde uzun süredir kullanılmaktadır (Henry and Piperno, 2008). Ebegümeçi bitkisinin bileşen içeriği ile ilgili çalışmaların kısıtlı olması ile birlikte Tabaraki ve arkadaşları (2012) ebegümeçi yapraklarının protein içeriğinin kuru maddede %16,5–18,7 olduğunu, başka bir çalışmada ise %12,25 olduğu tespit edilmiştir (Barros et al., 2010). Ebegümeçi yaprağının soya fasulyesi ve diğer baklagillerde olduğu gibi alerjen maddelerini içermemesi, bitkisel protein üretiminde iyi bir kaynak olabileceğini göstermektedir.

Bitkisel proteinlerin eldesi, ekstraksiyon ve çöktürme olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir. Çöktürme yöntemlerinden genel olarak izoelektrik ve amonyum sülfat çöktürme yöntemleri uygulanmaktadır. İki yöntemde de proteinlerin çözünürlüğü esas alınmaktadır. İzoelektrik çöktürme yönteminde pH değişiminden yararlanılırken, amonyum sülfat çöktürme yönteminde iyonik şiddet ayarlanılarak proteinlerin eldesi sağlanmaktadır. Proteinlerin ham maddeden ekstraksiyonu ise yüksek verimde protein eldesi için önemli bir aşamadır (Novák and Havlicek, 2016). Proteinlerin çözünürlüğünü, dolayısıyla ekstraksiyonunu etkileyen birçok faktör bulunmakla birlikte bunlar; sıcaklık, ekstraksiyon süresi, ortamın pH değeri, çözgen türü ve katı:çözgen oranıdır. Yüksek verimde protein eldesi için bu parametrelerin optimum değerlerinin belirlenmesi oldukça önemlidir (Ma et al., 2010; López et al., 2018; Jarpa–Parra et al., 2014; Oomah et al., 1994).

Yaprak proteinleri çoğunlukla kloroplastta bulunmakla birlikte suda çözünür ve suda çözünür olmayan proteinler olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Suda çözünür olmayan proteinler kloroplastta klorofil ile karmaşık yapıda bulunan membran proteinleridir. Membran proteinlerinin ekstraksiyonu oldukça zordur ve bunun için enzimatik ekstraksiyon yöntemi kullanılmaktadır (Nadar et al., 2018; Sari et al., 2015b; Wang et al., 2008; Vergara-Barberán et al., 2015). Ayrıca, enzim hücre duvarı ve zarını parçalayarak ekstraksiyon veriminde büyük ölçüde artış sağlamaktadır. Enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile birlikte yaprak proteinlerinden yüksek verimde ve kalitede protein eldesi mümkün olabileceği literatür çalışmalarında belirtilmiştir (Vergara-Barberán et al., 2015; Sari et al., 2016).

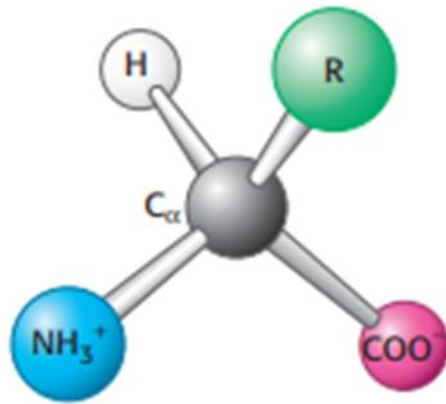
Bu tez çalışması kapsamında, ebegümeçi yapraklarından yüksek verimlilikte bitkisel protein tozu eldesinde, ön işlem olarak enzim uygulamasının, sıcaklık ve sürenin protein verimine etkisi ve ekstrakta bulunan proteinlerin çöktürülmesinde en uygun yöntemin belirlenmesi ve dondurarak kurutma işlemi ile toz forma getirilen protein konsantresinin gıda endüstrisi için hayvansal proteinlere alternatif bitkisel protein tozu olarak üretimi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, proteinlerin yapısı, bitkisel protein kaynaklarının özellikleri ile protein kaynağı olarak kullanılan ebegümeçi yaprağının özellikleri, protein ayırma yöntemleri, protein ekstraksiyonunda etkili olan parametrelerin belirlenmesi ve enzimatik ekstraksiyon işleminin ekstraksiyon verimine etkisi hakkında bilgiler verilmiştir.

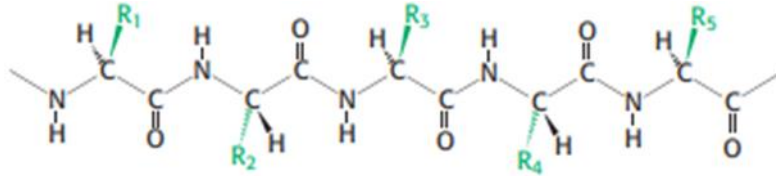
2.1 Proteinler

Vücudumuzun temel taşı olarak nitelendirilen proteinler, hayati fonksiyonların düzenlenmesini ve devamlılığını sağlayan birçok bileşiğin yapısında bulunan karmaşık yapılu moleküllerdir. Farklı sayı ve çeşitte amino asidin peptit bağlarıyla bir araya gelmesiyle oluşan proteinler karbonhidrat, lipit, mineral maddeler ve pigmentler de içerebilmektedirler (Saldamlı ve Temiz, 2017). Proteinlerin yapıtaşı olan amino asitler, merkezinde karbon atomu olmak üzere ona bağlı bir hidrojen atomu (H) amino grubu (-NH₂), bir karboksil grubu (-COOH) ve radikal gruptan (R) oluşmaktadır (Şekil 2.1). Radikal grup (değişken grup) her bir amino asit için farklı olup proteinlere farklı özellikler kazandırmaktadır (Berg et al., 2015). Amino asitlerin sayıları, dizilişleri ve oranları arasındaki farklılıklar sonsuz sayıda proteinin oluşumunu mümkün kılmaktadır (Seydim ve Çağdaş, 2016). Amino asitlerin genel yapısı Şekil 2.1’de verilmektedir.



Şekil 2.1 Amino asitlerin genel yapısı (Berg et al., 2015)

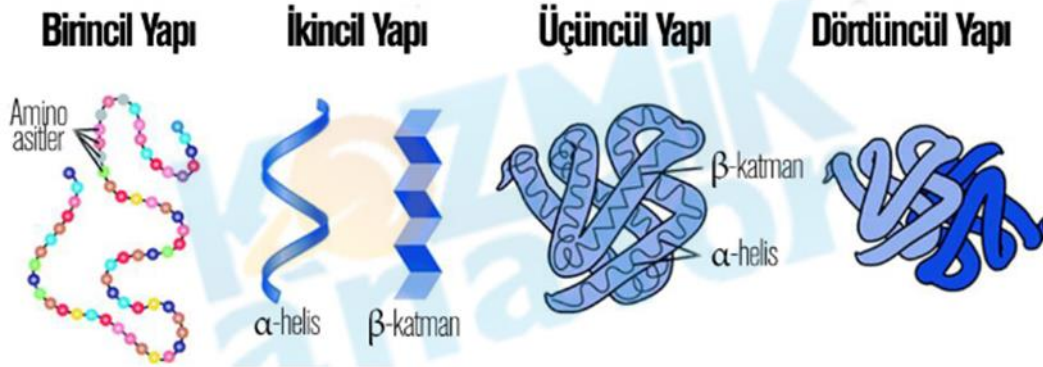
Amino asitler birbirlerine, α -karboksil grubunun diğer amino asidin α -amino grubuna peptit bağı ile bağlanmaktadır. Bu şekilde birçok amino asidin bağlanmasıyla polipeptit zincirleri oluşmaktadır (Şekil 2.2). Polipeptit zincirleri tek başlarına proteinleri oluşturduğu gibi birden çok polipeptit zinciri bir araya gelerek proteinleri meydana getirebilmektedir (Saldamlı ve Temiz, 2017). Polipeptit zincirinin genel yapısı Şekil 2.2 'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2 Polipeptit zincirinin genel yapısı (Berg et al., 2015)

Her protein kendine özgü üç boyutlu bir yapıya sahip olmakla birlikte bu üç boyutlu yapı proteinin işlevini belirlemektedir (Gaci and Baley, 2008). Üç boyutlu yapısı bozulan proteinler biyolojik etkinliğini kaybetmekte yani denatüre olmaktadır. Dolayısıyla her protein kendine özgü fiziksel ve kimyasal yapısını koruması ve görevini yerine getirmesi için bu yapıyı koruyabilmelidir. Proteinlerin üç boyutlu yapısı, birincil yapı, ikincil yapı, üçüncül yapı ve dördüncü yapı olmak üzere dört grupta incelenmektedir (Şekil 2.3). Peptit ve disülfid bağları ile amino asitlerin oluşturduğu polipeptit zinciri birincil yapı (primer), polipeptit zincirindeki iki amino asidin R grubu dikkate alınmaksızın karboksil ve amino gruplarının hidrojen bağı ile katlanarak oluşturduğu yapı ikincil yapıdır. İkincil yapı, α -heliks ve β - tabaka olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır. Polipeptit zincirinin birbirinin üstüne gelen amino asitlerin sarmal şekil oluşturacak şekilde hidrojen bağları ile bağlanması sonucu α -heliks yapısı oluşurken, β - tabaka konformasyonunda polipeptit zincirleri paralel ya da antiparalel konumda olacak şekilde hidrojen bağlarıyla bağlanmaktadır (Nelson and Cox, 2005; Hames and Hopper, 2006). Üçüncül yapı ise polipeptit zincirindeki R gruplarının arasındaki etkileşimlerle oluşturduğu üç boyutlu yapıdır ve hidrojen bağları, van der Waals bağlar, polar bağlar, sülfidril bağlar gibi kovalent bağlar ile iyonik bağlar ve hidrofobik bağlar gibi kovalent bağlar sonucunda oluşmaktadır. Dördüncül yapı ise birçok polipeptit

zincirinin alt birimlerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır (Nelson and Cox, 2005; Saldamlı ve Temiz, 2017).



Şekil 2.3 Proteinlerin üç boyutlu yapısı (Durur, 2018)

İnsan vücudu enerji ihtiyacının %20-25'ini proteinlerden sağlamaktadır. Vücutta hormon ve enzim üretimi, hücre onarımı ve görme gibi hayati fonksiyonları gerçekleştiren proteinin günlük beslenmede rolü çok önemlidir (Seydim ve Çağdaş, 2016). Beslenmede yeteri kadar protein alınmadığı takdirde vücutta hücre içinde çeşitli sorunlar oluşmakta ve hipoglisemi, hipertansiyon, obezite, diyabet ve kalp rahatsızlıkları gibi metabolik ve fizyolojik hastalıklar ortaya çıkmaktadır (Chalvon-Demersay et al., 2017). Ayrıca, daha çok çocuklarda ve gelişmekte olan ülkelerde görülen Kwashiorkor (protein yetersizliği) hastalığı ciddi metabolik sorunlara yol açmaktadır (Seydim ve Çağdaş, 2016). Bu nedenle proteinlerin beslenmede yeterli miktarda alınması çok önemlidir. Araştırmacılar, günlük alınması gereken protein miktarının yaş ve cinsiyete bağlı olmakla birlikte yetişkin bireyler için 0,75 g/kg vücut ağırlığı olduğunu belirtmişlerdir (WHO, 1985).

Proteinlerin yapıtaşını oluşturan amino asitler doğada 20 çeşitte bulunmaktadır ve bunlardan 8 tanesini insan vücudu kendi sentezleyememekte ve dışarıdan besin yoluyla almak zorundadır. Elzem amino asitler olarak adlandırılan bu amino asitler, gıdanın protein kalitesini büyük ölçüde belirlemektedir (Chalupa-Krebdak et al, 2018). Elzem amino asitler; lizin, lösin, izolösin, fenilalanin, triptofan, valin, treonin, arginin, histidin ve metiyonindir. Ayrıca, büyüme çağında üretilmeyen arginin ve histidin çocuklar için elzem aminoasitlerdendir. Bu kapsamda insanlar, vücudun metabolik ve fizyolojik faaliyetlerinde görev alan

proteinlerin sentezini gerçekleştirebilmesi için bu amino asitlerin dışarıdan gıdalar aracılığı ile vücuda alınması gerekmektedir (Litwack, 2018).

2.2 Bitkisel Proteinler

Gıda proteinleri bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteinler olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Bitkisel ve hayvansal proteinler, amino asit içeriği olmak üzere, sindirilebilirlik, fonksiyonel özellikleri ve yan bileşenleri açısından farklılıklar göstermekte ve her ikisinin de birçok avantajı ve dezavantajı bulunmaktadır (Beran et al., 2018). Hayvansal kaynaklı proteinler tüm elzem amino asitleri içermesiyle birlikte sindirilebilirlikleri de bitkisel kaynaklı proteinlere göre daha yüksektir. Fakat yüksek oranda ve kalitede protein içeren hayvansal protein kaynakları, sık tüketildiğinde içeriğindeki kolesterol ve yağ oranı nedeniyle obezite, kanser, kalp ve damar hastalıklarının riskini arttırabilmektedir (Muguerza et al., 2004). Ayrıca son zamanlarda gelişen çevre bilinci ve nüfus artışı nedeniyle sürdürülebilir gıdaların üretimi ve tüketimi önem kazanmaya başlamıştır (Aiking, 2011). Hayvansal kaynaklı proteinlerin üretimi hem sera gazı salınımını arttırarak iklim değişikliğine etki ettiği hem de fazla miktarda enerji ve su tüketimine sebep olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hayvansal proteinlerin yerine, bitkisel proteinlerin üretimi sağlanarak çevresel sorunların azaltılabileceği düşünülmektedir. (Nielsen et al., 2018; Stehfest et al., 2009).

Bitkisel kaynaklı proteinler hayvansal kaynaklı proteinlere göre daha az protein içeriğine ve sindirilebilirliğe sahiptir. Fakat tüketilen bitkisel protein miktarı artırıldığında, vücutta sindirilen protein miktarının da arttığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Bu kapsamda, hayvansal proteinlere göre daha ucuz ve geniş kaynak çeşitliliğine sahip olan bitkisel proteinler, gelişmekte olan ve protein eksikliği yaşayan ülkelerde iyi bir alternatif protein kaynağı olabilmektedir (Mariotti, 2017). Ayrıca vegan ve vejetaryen gibi özel tüketici gruplarının da tercih ettiği bitkisel proteinler yüksek oranda içerdiği lif sayesinde, hayvansal proteinlere göre daha uzun süre tokluk hissi verdiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Kristensen et al., 2016; Asgar et al., 2010).

Bitkisel proteinlerin ucuz ve geniş kaynak çeşitliliğine sahip olması, vegan ve vejetaryen gibi özel tüketici gruplarına hitap etmesi, yüksek oranda vitamin,

mineral ve lif içermesi gibi avantajları dışında birçok dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar; bitkisel protein kaynaklarının besleyici olmayan bileşenler içermesi (taninler, fitik asitler, tripsin inhibitörleri, oligosakkaritler vb.), hayvansal proteinlere göre daha zayıf amino asit çeşitliliği göstermesi, sindirilebilirliğinin ve fonksiyonel özelliklerinin yeterince iyi olmamasıdır.

Bitkisel proteinler genel olarak depo proteinleri olarak adlandırılmaktadır. Depo proteinleri bitki fizyolojisi ve metabolizmasına etki etmekte ve ayrıca bitkisel protein kaynaklarının besleyici değerlerini ve fonksiyonel özelliklerini de belirlemektedir (Saldamlı ve Temiz, 2017). Bitkisel depo proteinleri, farklı çözgen çeşitlerinde gösterdiği çözünürlük özelliklerine göre dört grupta incelenmektedir. Bunlar; albümin (suda çözünür), globülin (tuz çözeltisinde çözünür), prolamin (alkolde çözünür) ve glutelindir (su, etanol ve alkolde çözünür olmayan) (Osborne, 1924). Her hammadde için farklı oranlarda bulunan depo proteinleri, bitkisel proteinlerin farklı fonksiyonel özellikler göstermesine neden olmaktadır. Örneğin; soya depo proteinlerinden glisin ve β - konglisinin buldukları gıdaların viskozitesini, fiziksel özelliklerini ve fonksiyonel özelliklerini etkilerken, kolza/kanola depo proteinlerinden cruciferin (12S globülin) iyi bir jelleştirici, napin (2S albümin) ise yüksek köpürme özelliği göstermektedir (Murphy, 2008; Schmidt et al., 2004; Ghodsvali et al., 2005).

Bitkisel proteinler içerisinde ticari olarak en çok üretim ve tüketime sahip olan soya proteinleridir. Bunun başlıca sebepleri ise soya fasulyesi tohumunun %40 gibi yüksek bir oranda protein içeriğine sahip olması, ekonomik ve ulaşılabilir olması, emülsiyon ve doku oluşturma gibi fonksiyonel özelliklerinin yüksek olmasıdır (Endres, 2001, Nilüfer, 2006). Soya fasulyesi protein sentezi için gerekli olan tüm elzem amino asitleri içermekle birlikte bünyesinde yüksek oranda lif, demir, kalsiyum ve çinko bulundurmaktadır (Asgar et al., 2010). Soya fasulyesi dışında yağlı tohumlar (kolza/kanola tohumu, ayçiçeği çekirdeği, susam küspesi, yer fıstığı tohumu vb.), bakliyatlar (bezelye, acı bakla, nohut, mercimek vb.), tahıllar (pirinç, buğday, arpa, yulaf, kinoa vb.) önemli bitkisel protein kaynaklarıdır. Her bir bitkisel protein kaynağı farklı oranlarda amino asit içeriğine sahiptir. Çizelge 1' de bakliyat proteinlerinden soya fasulyesi ve nohut proteinlerinin amino asit içeriği ile tahıl proteinlerinden kinoa ve pirinç kepeği proteinlerinin amino asit

içerikleri verilmektedir. Bakliyat proteinleri metiyonin, sistein, triptofan gibi kükürt içeren amino asitleri düşük oranda içerirken, lizin içeriği ise tahıl ürünlerine kıyasla oldukça yüksektir. Bu nedenle, bakliyatların ve tahılların birlikte tüketilmesi doğru beslenme için gerekli olan tüm zorunlu amino asitlerin birlikte alınmasını sağlamaktadır (Duranti, 2006).

Çizelge 2.1 Soya fasulyesi, nohut, kinoa ve pirinç kepeği proteinlerinin amino asit kompozisyonu (g/16 g N) (Kumar et al., 2002; Wang et al., 1999; Ranhotra et al., 1993; Alajaji and El-Adawy, 2006).

Elzem Amino Asitler	Soya Fasulyesi	Nohut	Kinoa	Pirinç kepeği
İzolösin	4,5	4,1	3,0	3,0
Lösin	7,8	7	6,9	8,0
Lizin	6,4	7,7	6,3	5,5
Triptofan	1,3	1,1	-	0,7
Metiyonin	1,3	1,6	2,3	2,0
Valin	4,8	3	3,7	5,7
Fenilalanin	4,5	5,9	4,5	5,1
Treonin	3,9	3,6	4,4	4,4
Elzem Olmayan Amino Asitler				
Arginin	7,2	10,3	9,7	9,0
Histidin	2,5	3,4	4,1	3,0
Sistein	1,3	1,3	1,4	2,6
Tirozin	3,1	3,7	3,7	3,7
Aspartik asit	11,7	11,4	10,5	10,5
Glutamik asit	18,7	17,3	17,3	15,3
Serin	5,1	4,9	5,6	5,3
Prolin	5,5	4,6	3,5	Rapor edilmemiştir
Glisin	4,1	4,1	6,3	6,1
Alanin	4,3	4,4	5,5	6,8

Ancak, besleyici bileşenleri ve yüksek protein içeriğinin yanı sıra soya fasulyesi, acı bakla, yer fıstığı, bezelye, nohut, mercimek gibi birçok bitkisel protein alerjen maddeler de içermektedir (Singh and Bhalla, 2008; Riascos et al., 2009). Ayrıca gıda endüstrisinin büyük bir kısmını kaplayan soya fasulyesi üretiminde transgenik genlerinin değiştirilmesi bunun sonucunda genetiği değiştirilmiş ürünlere karşı tepkili yaklaşan tüketicilerin bu tür ürünleri tüketmemesi sonucu farklı bitkisel protein kaynaklarına ihtiyaç duyulmuştur.

Bir diğer önemli bitkisel protein kaynağı, yeşil bitkiler ve yapraklardır. Özellikle bol miktarlarda bulunmaları ve yüksek oranda protein içermelerinden dolayı protein üretimi için kullanılacak alternatif bitkisel protein kaynaklarıdır. Yeşil bitkiler ve yapraklar protein dışında mineraller (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Zn, Si), vitaminler (A, B, C, D, E, K, U), fitokimyasal bileşenler (karoten, klorofil, kumarinler, izoflavonlar) ve ikincil metabolitler (izoflavonlar ve kolesterol gibi fitoöstrojenler) açısından da zengindir (Tenorio, 2017a). Yüksek oranda protein içeren ıspanak, çim, yonca, pancar yaprağı ve çay yaprağı gibi yeşil bitkiler birçok çalışmanın konusu olmuş, fakat çalışmalar sonucunda bu proteinlerin ticari olarak gıda uygulamalarında kullanımının henüz mümkün olmadığı belirtilmiştir (Tenorio et al., 2016).

Yeşil bitki ve yaprak proteinleri daha çok kloroplastta bulunmaktadır ve suda çözünür ve çözünmez olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Membran proteinleri olarak da belirtilen suda çözünür olmayan proteinler yeşil protein olarak adlandırılmaktadır. Membran proteinlerin amino asit içerikleri çözünür proteinlere göre daha zayıf olmakla birlikte, istenmeyen bileşenler bulundurmasından dolayı ekstraksiyon aşamasında uzaklaştırılmaktadır (Lamsal et al., 2007). Ancak, toplam proteinlerin yarısını oluşturan membran proteinlerin uzaklaştırılması, protein ekstraksiyon verimini büyük ölçüde olumsuz etkilemektedir (Tenorio et al., 2017b). Bu nedenle, yeşil bitki ve yaprak proteinlerinin tamamının eldesi için membran proteinlerinin ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmeli ve bu yönde araştırmalar yapılmalıdır (Tenorio et al., 2016).

Yeşil bitki ve yapraklardan gıda endüstrisinde kullanılmak üzere elde edilen protein konsantrisi suda çözünür protein fraksiyonudur. Beyaz renkte ve aromasız

olan protein konsantrasyonunun büyük bir çoğunluğunu ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz / oksijenaz (rubisco) oluşturmaktadır (Tenorio, 2017a). Rubisco'nun fonksiyonel özellikleri gıda endüstrisinde kullanımı için kabul edilebilir ölçüde olmakla birlikte ham madde ve saflık derecesine göre değişmektedir (De Jong and Nieuwland, 2011; Lamsal ve ark., 2007).

Yeşil sebze ve yaprakların %85-95 gibi yüksek oranda nem içermesi, bu yapraklardan büyük ölçekte protein üretimini kısıtlamaktadır. Mikrobiyal ve enzimatik bozunma riski fazla olan yapraklar, taşınma sırasında dondurma ya da kurutma işlemleriyle stabil hale getirilmelidir. Fakat, kurutma işleminin protein ekstraksiyonunu zorlaştırdığından iyi bir stabil hale getirme yöntemi olmadığı literatürde belirtilmiştir (Bals et al., 2012, Tenorio ve ark., 2017c). Buna karşılık, dondurma yöntemi ise, Tenorio ve arkadaşlarının (2017c) gerçekleştirdiği şeker pancarı yaprağından protein üretimi ile ilgili çalışma sonucunda en uygun stabilizasyon yöntemi olarak belirlenmiştir.

Son yıllarda hızla artan nüfusla birlikte, dünyanın gıda ihtiyacının karşılanabilmesinde zorluklar karşımıza çıkmaktadır. Özellikle protein ihtiyacının karşılanması gün geçtikçe zorlaşmaktadır. Bu nedenle, bitkisel protein kaynakları hem lif, fenolik madde ve antioksidan gibi besleyici bileşenleri içermesinin yanısıra hem de yüksek oranda ve iyi kalitede protein içermeleri nedeniyle hayvansal protein kaynaklarına alternatif protein kaynaklarıdır.

2.3 Ebegümece Bitkisinin Genel Özellikleri

Ebegümecegiller (Malvaceae) familyasında bulunan aynı cinsten 1500 türü olan, iki ya da çok yıllık otsu bitkilerin genel adı ebegümedir. Türkiye'de 8 türü yetişmektedir ve bunlardan en önemlisi *Malva sylvestris* (Büyük ebegümece)' dir (Keskin ve ark., 2015; Tabaraki et al., 2012). Boyu 20–30 cm arasında değişen *M. sylvestris* 'ın yaprakları yuvarlak, biçimli, kenarları dişli, uzun saplı, tüylü ve damarlıdır. Çayır, hendek kenarları, gelgit nehirlerinin kıyıları gibi nemli alanları tercih eden ebegümece bitkisi daha çok Avrupa ve Asya'da yetişmektedir (Tabaraki et al., 2012; Samavati and Manoochehrizade, 2013). Yaz boyunca ve sonbahar

başlarında açtığı pembe renkli, eflatuni çizgilere sahip olan *M. sylvestris*, döktüğü tohumlarla çoğalmaktadır (Keskin ve ark., 2015).



Şekil 2.4 Ebegümece (*Malva sylvestris*) (Keskin ve ark., 2015)

Geleneksel tıpta kullanılan yabancı bitkiler arasında *Malva sylvestris* kullanım çeşitliliği ile öne çıkan ve tüketiminin M.Ö. 3000 yılına dayandığı bilinen önemli bir yabancı bitkidir (Gasparetto et al., 2012). Ayrıca, Suriye bölgesinde yapılan arkeolojik çalışmalar sonucunda araştırmacılar bu yabancı bitkinin hem yenilebilir bir bitki olması hem de olası tıbbi özellikleri nedeniyle uzun yıllardır tüketiminin devam ettiği sonucuna varmışlardır (Henry and Piperno, 2008). Ebegümece, yapraklarında %6,0–7,2 (Hiçsönmez et al., 2009), çiçek kısmında %3,8–7,3 ve köklerinde %7,5 olmak üzere önemli miktarda musilaj içermektedir (Karawya et al., 1971). Musilaj temel olarak glukuronik asit, galakturonik asit, ramnoz, galaktoz, fruktoz, glikoz ve sakkarozdan oluşan bir polisakkarittir (Gasparetto et al., 2012). İçerdiği yüksek miktarda musilaj ile ebegümece açık yara, egzama, bronşit (Pirbalouti et al., 2009), kuru öksürük (Classen and Blaschek, 2002), gastrit ve peptik ülser (Yeole et al., 2010) gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, ebegümece yaprakları bünyesinde bulunan C vitamini sayesinde musilajın kozmetik sektöründe ve akne tedavisinde de kullanıldığı literatür çalışmalarında belirtilmektedir (Gasparetto et al., 2012; Barros et al., 2010). Buna ek olarak, ebegümece yaprakları fenolik madde, flavonoid, karatenoid, tokoferoller, doymamış yağ asitleri (özellikle α -linolenik asit) içeriği bakımından zengin olduğundan yüksek antioksidan özellik göstermektedir (Barros et al., 2010). Ebegümece yapraklarının bir diğer önemli özelliği sülfat oksidaz enzimi içermesidir.

Sülfür içeren amino asitlerin oksidatif bozunmasında son reaksiyondan sorumlu olan sülfid oksidaz enziminin fizyolojik önemi büyüktür ve eksikliği ölümlerle sonuçlanabilmektedir (Gasparetto et al., 2012).

Literatür incelendiğinde ebegümece bitkisinin bileşen içeriği ile ilgili çalışmaların kısıtlı olduğu görülmüştür. Tabaraki ve arkadaşlarının (2012) yaptığı bir çalışmada İran'ın farklı bölgelerinden topladıkları *Malva sylvestris* yapraklarının protein içeriği kuru maddede %16,5–18,7 aralığında tespit edilmişken, başka bir çalışmada Portekiz'de toplanan *Malva sylvestris* yapraklarının protein içeriği kuru maddede %12,25 olduğu rapor edilmiştir (Barros et al., 2010).

2.4 Protein Ayırma Yöntemleri

Proteinleri ayırma yöntemleri olarak kromatografi, ultrafiltrasyon ve çöktürme gibi yöntemler kullanılmaktadır (Novák ve Havlíček, 2016). Kromatografi ve ultrafiltrasyon yöntemlerinde proteinlerin yük, boyut ve şekil özelliklerini kullanarak ayırma işlemini gerçekleştirilirken, çöktürme yönteminde ise (amonyum sülfat, izoelektrik, aseton,) proteinlerin çözünürlük özelliklerinden yararlanılmaktadır (Kumar and Sharma, 2015).

Çöktürme yönteminde ilk önce ekstraksiyon işlemi uygulanmaktadır. Uygun koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi ile proteinlerin çözgen yardımıyla ham maddeden ayrılması sağlanır. Ardından, çöktürme aşamasında, çözgen içinde bulunan proteinlerin çözünürlüğü azaltılarak çöktürülür (Novák ve Havlíček, 2016). Elde edilen proteinler kuru maddede içerdikleri protein miktarına göre sınıflandırılmaktadır. Protein içeriği minimum %65 ve üzerinde olanlar protein konsantresi iken, %90 ve üzerinde protein içeriğine sahip olanlar ise protein izolatu olarak adlandırılmaktadır (Oreopoulou and Tzia, 2007).

Proteinlerin ekstraksiyon ve çöktürme işlemleri temel olarak çözünürlük esaslarına dayanmaktadır. Protein çözünürlüğü sıcaklık, iyonik kuvvet ve pH değeri gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme ve tuz destekli ekstraksiyon/ amonyum sülfat ile çöktürme yöntemleri

gıda uygulamalarında sıklıkla kullanılan, yüksek verimde protein elde edilebilen yöntemlerdendir (Novák ve Havlíček, 2016).

2.4.1 Alkali Ekstraksiyon/ İzoelektrik Çöktürme Yöntemi

Alkali ekstraksiyon işleminin proteinde bulunan hidrojen bağlarını parçalayıp, hidrojeni sülfat gruplarından ayırmaya yardımcı olduğu, böylece, yüzey yükü artan protein moleküllerin suda daha yüksek çözünürlük gösterdiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Shen et al., 2008). Dolayısıyla ekstraksiyon işleminde yüksek alkali çözeltilerin kullanılması protein verimini arttırmaktadır. Proteinlerin yapılarında hem amino (-NH₂) hem de karboksil grubu (-COOH) bulunmaktadır. Bundan dolayı buldukları ortamın pH değerine bağlı olarak asit veya baz gibi davranmaktadırlar (Saldamlı ve Temiz, 2017). Ancak, her bir proteinin kendine özgü net yükünün sıfır olduğu bir pH değeri vardır ve bu pH değeri izoelektrik nokta olarak adlandırılmaktadır (Burgess, 2009). Proteinler izoelektrik noktada en düşük çözünürlük göstermektedir ve bu noktada proteinler çözelti içinde çökme eğilimindedirler. Dolayısıyla alkali ekstraksiyon/ izoelektrik çöktürme yönteminde proteinlerin farklı pH değerlerinde gösterdiği çözünürlük esas alınarak proteinler elde edilmektedir.

Gıda uygulamalarında kullanılmak üzere bitkisel kaynaklardan protein tozu eldesinde alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme yöntemi sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Boye ve arkadaşlarının (2010) sarı bezelye, kabuli ve desi nohut, yeşil ve kırmızı mercimek ile yaptığı bir çalışmada; sarı bezelye ve nohut 1:15 katı:sıvı oranında, pH 9,5 değerinde 35 °C'de ekstraksiyona tabii tutulurken, kırmızı ve yeşil mercimek için ekstraksiyon pH 9 değerinde, 1:10 katı: sıvı oranında ve 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Ardından, tüm ham maddeler için pH 4,5 değerinde 30 dk. boyunca çöktürme işlemi uygulanmıştır. Çalışma sonunda elde edilen sarı bezelye, kabuli nohut, desi nohut, kırmızı ve yeşil mercimek protein izolatlarının protein içerikleri sırasıyla %81,7, %63,9, %73,6, %78,2 ve %79,1 olarak tespit edilmiştir. Kaushik ve arkadaşlarının (2016) keten tohumundan protein izolatu eldesi ile ilgili yaptığı bir çalışmada ekstraksiyon pH 8,6 değerinde, katı: çözen oranı 1:16 olacak şekilde 24 sa boyunca gerçekleştirilmiş, daha sonra pH 4,2 değerinde 4 °C'de 16 sa çöktürme işlemi uygulanmış ve çalışma sonunda %90,6 saflıkla protein izolatu elde

edilmiştir. Başka bir çalışmada ise kenevir tohumu küspesinden protein izolatu üretimini amaçlanmıştır. Protein ekstraksiyonu pH 10 değerinde, 1:20 katı:sıvı oranında 2 sa 35 °C’de gerçekleştirilmiş, daha sonra pH 5 değerinde 4 °C’de gece boyunca çöktürme işlemi uygulanmış ve çalışma sonunda %91,4 protein içeriğine sahip protein izolatları elde edilmiştir (Hadnağev et al.,2018).

Alkali ekstraksiyon/ izoelektrik çöktürme yöntemi pH değerine bağlı çözünlülük esasına dayanan bir yöntemdir. Uygun ekstraksiyon koşullarında (katı: sıvı oranı, sıcaklık, süre ve pH değeri) gerçekleştirilen ekstraksiyon sonunda ekstraktın pH değeri izoelektrik noktasına ayarlanması ile proteinler çöktürölmektedir.

2.4.2 Tuz Destekli Ekstraksiyon/Amonyum Sülfat Çöktürme Yöntemi

Tuz destekli ekstraksiyon/ amonyum sülfat çöktürme yöntemi, protein moleküllerin iyonik şiddetinin ayarlanarak protein çözünlülüğünü değiştirme esasına dayanan bir yöntemdir. Protein çözeltilisine düşük tuz konsantrasyonu eklendiğinde tuz iyonları protein molekülleriyle elektrostatik etkileşime girerek proteinlerin diğer moleküllerle bađ yapmasını engeller, böylece proteinlerin çözünlülüğü artar. Bu olaya ‘tuz ile çözümlendirme (salting- in)’ denir (Novák ve Havlíček, 2016). Protein çözeltilisinde tuz konsantrasyonu arttıkça bir süre sonra iyonik şiddet de artar ve proteinlerin çözünlülüğü azalır. Bu olaya da ‘tuz ile çöktürme (salting-out)’ denir (Wingfield, 1998). Tuz konsantrasyonu arttıkça, su molekülleri proteinlerle değil, artan tuz iyonları ile etkileşime geçerek yüzey gerilimini arttırır. Bu durum da proteinlerin daha sıkı katlanmasına neden olur. Protein yüzey alanının azalmasıyla da daha az protein-su etkileşimi meydana gelir, böylece protein molekülünde bulunan hidrofobik gruplar birleşerek çözeltili içinde çökerler (Novák ve Havlíček, 2016). Tuz ile çöktürme yönteminde potasyum klorür, sodyum klorür gibi birçok farklı tuzlar kullanılabilse de amonyum sülfat, protein yapısını korumasıyla, yüksek çözünlülük göstermesi ve ucuz olmasıyla en çok tercih edilen tuzdur (Burgess, 2009).

Tuz destekli ekstraksiyon/amonyum sülfat çöktürme yönteminden sonra tuzu uzaklaştırmak amacıyla diyaliz işlemi gerçekleştirilmelidir (Duong-Ly et al., 2014). Diyaliz işlemi, diyaliz torbasında bulunan yüksek konsantrasyondaki tuzun

yarı geçirgen zar yardımıyla tampon çözeltisine difüzyon yoluyla geçmesi prensibine dayanmaktadır. Diyaliz torbası, çözeltiden tuzun uzaklaşmasını sağlayarak proteinlerin saflaşmasını sağlamaktadır (Purwanto, 2016).

Tuz ile çöktürme yönteminde her ne kadar proteinlerin üç boyutlu yapısı bozursa da proteinler denatüre olmazlar (Panadare and Rathod, 2018). Bundan dolayı tuz ile çöktürme yöntemi genellikle protein ve enzim saflaştırma işlemlerinde kromatografik uygulamalarında ön işlem olarak gerçekleştirilmektedir (Ito, 2000; Purwanto, 2016; Li et al., 2018; Panadare and Rathod, 2018; Negi et al., 2018, McCue, 2014). Koksall ve arkadaşlarının (2012) yaptığı bir çalışmada su kabağından peroksidaz enzimi üretimi amaçlanmıştır. Bunun için, 20 g su kabağı unu 50 ml pH değeri 7 olan fosfat tamponu ile ekstrakte edilmiş, %60-90'lık amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış, 12 sa 4 °C'de yapılan diyaliz ile tuz uzaklaştırıldıktan sonra kromatografik yöntemle saflaştırma işlemi tamamlanmıştır. Nitsawang ve arkadaşlarının (2006) *Carica papaya* lateksinden papain enzimi üretimi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada ise iki aşamalı tuz ile çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Lateks, 3:1 katı:sıvı oranında, pH değeri 5,6 olan 40 mM sistein ile 4 °C'de 15 dk. boyunca ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuş, ardından %45'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır ve sonuç olarak %96 verim elde edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, *Albizia lebbbeck* tohumlarından tripsin inhibitörü elde edilmiştir. Un haline getirilen *Albizia lebbbeck* tohumları 10:1 oranında, pH 7.5 değerinde sodyum fosfat tamponu ile 30 dk. boyunca ekstrakte edilmiş, %20 ve %80'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Ardından diyalize bırakılan çökeleklerin kromatografik yöntem ile saflaştırma işlemi tamamlanmıştır (Sharma et al., 2012). Son olarak, depolanmış ve yeni hasat edilmiş şeker kamışından selülaz enzimi üretimi ile ilgili bir çalışmada, pH değeri 4,8 olan sitrat tamponu ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve daha sonra %80'lik amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Çalışma sonunda depolanmış ve yeni hasat edilmiş şeker kamışından sırasıyla %35 ve %49 verimde selülaz elde edilmiştir (Adetuyi et al., 2018).

İzoelektrik ve amonyum sülfat çöktürme yöntemlerin her hammadde farklı protein verimlerine neden olduğu literatür çalışmalarında belirtilmiştir. Bundan dolayı, yüksek verimde protein eldesi için hammaddeye en uygun yöntemin

bulunması gerekmektedir. Alsohaimy ve arkadaşlarının (2007) mercimek proteini üretimi ile ilgili yaptığı bir çalışmada izoelektrik çöktürme, amonyum sülfat çöktürme ve alkol ile çöktürme yöntemleri ile protein izolatları üretilmiştir. Çalışma sonunda, amonyum sülfat ve alkol ile çöktürme yöntemleri ile sırasıyla %93 ve %100 protein veriminde protein izolatları üretildiği belirtilmiştir. Çay yapraklarıyla ilgili yapılan bir çalışmada ise izoelektrik çöktürme, amonyum sülfat ile çöktürme ve izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemleri ile üretilen proteinlerin protein içerikleri karşılaştırılmış ve izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle üretilen protein izolatlarının %89,70 ile en yüksek protein içeriğine sahip olduğu bulunmuştur (Cui et al., 2017). Son olarak patates protein konsantresi üretimiyle ilgili yapılan bir çalışmada izoelektrik ve amonyum sülfat çöktürme yöntemleri protein içeriği açısından karşılaştırılmış ve izoelektrik çöktürme yöntemiyle üretilen protein konsantrelerinin %85,80 ile en yüksek protein içeriğine sahip olduğu belirtilmiştir (Zhang et al., 2017).

Alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme ve tuz destekli ekstraksiyon/amonyum sülfat ile çöktürme yöntemleri ile birlikte yüksek kalitede protein üretimi mümkün olabilmektedir. Çöktürme yöntemlerin ucuz olması ve kaliteli protein eldesini sağlanmasından dolayı bu yöntemler, gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan yöntemlerdir (Burgess, 2009).

2.5 Ekstraksiyon Parametrelerinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Protein eldesinde ekstraksiyon aşaması önemli bir işlem olup, proteinlerin çözünürlüğünün artırılarak hammaddede bulunan proteinlerin çözüme geçmesi sağlanmaktadır. Proteinlerin çözünürlüğünü, dolayısıyla ekstraksiyonunu etkileyen birçok faktör bulunmakla birlikte bunlar; sıcaklık, ekstraksiyon süresi, ortamın pH değeri, çözgen türü ve çözgen: katı oranıdır.

Sıcaklık protein verimini genellikle olumlu etkileyen bir parametredir. Yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen ekstraksiyonun hücre zarının bozulmasına yardımcı olduğu ve protein ekstraksiyonunu engelleyen selüloz ve lignin gibi karbonhidratları parçalayarak proteinlerin çözünmesini sağladığı birçok literatür çalışmasında belirtilmiştir (Sari et al., 2015a; Shen et al., 2008). Ancak, yüksek sıcaklık proteinlerin denatüre olmasına neden olduğundan, dolayısıyla protein

kalitesini olumsuz etkilemesinden dolayı her hammadde için optimum sıcaklığın belirlenmesi gerekmektedir (Zhang et al., 2014). Proteinlerin ekstraksiyonunda etkili olan en önemli parametre ise pH değeridir. Alkali ortam, hücre duvarının parçalanmasını sağlayarak proteinin ekstrakte edilebilirliğini kolaylaştırmaktadır (Sari et al., 2015b). Ayrıca, proteinler, pozitif ve negatif yüklerinin eşit olduğu izoelektrik noktasında (pH: 4-5) çözünürlükleri düşüktür ve çökme eğilimindedirler (Saldamlı ve Temiz, 2017). Bundan dolayı asidik koşullarda (pH: 4-5) gerçekleştirilen protein ekstraksiyonu verimli olamamaktadır. Protein ekstraksiyon verimine etki eden bir diğer faktör ise iyonik kuvvet, yani tuz konsantrasyonudur. Düşük konsantrasyonlarda tuz ilavesi protein moleküllerin diğer moleküllerle bağ yapmasını engelleyerek proteinlerin çözünürlüğünü arttırmakta ve böylece protein ekstraksiyonunu kolaylaştırmaktadır (Novák ve Havlíček, 2016). Ekstraksiyon süresi ve verimi arasında doğru bir orantı olduğu literatür çalışmalarında belirtilmiştir. Her ne kadar ekstraksiyon süresinin artması protein ekstraksiyon veriminin de artmasını sağlasa da uzun ekstraksiyon sürelerinin mikrobiyal bozunma riskini arttıracığından önerilmemektedir. Bundan dolayı her hammadde için uygun ekstraksiyon süresi belirlenmelidir (Sari et al., 2015b). Çözgen türünün ve çözgen: katı oranının da protein ekstraksiyon verimine etki ettiği yapılan literatür çalışmalarında belirtilmiştir (Nahar et al., 2013; Sari et al., 2015b). Düşük miktarda çözgen kullanımı ekstraksiyon sırasında proteinlerin hızlı bir şekilde difüzyon olmasını sağlamaktadır. Çözgen miktarı arttırıldığında ise çözgünde bulunan protein konsantrasyonu ile hammaddeki protein konsantrasyonu farkı artmakta, bu durum proteinin çözüme geçmesi için itici bir güç oluşturmaktadır. Fakat, fazla miktarda çözgen kullanımı endüstriyel üretimde maliyetli olmasından ve ayrıca çevreye verdiği olumsuz etkiden dolayı mümkün değildir. Dolayısıyla, optimum çözgen: katı oranı belirlenmelidir (Sari et al., 2015b).

Proteinlerin eldesinde son ürün olarak üretilen protein konsantre ve izolatlarının protein içeriği, protein ekstraksiyon verimine bağlıdır. Dolayısıyla, yüksek verimde protein eldesi için, protein ekstraksiyonunu etkileyen parametrelerin optimizasyonun yapılmasını önemli kılmaktadır.

2.5.1 Optimum Ekstraksiyon Koşullarının Belirlenmesi

Protein ekstraksiyon veriminde pH değeri, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, çözügen türü ve çözügen: katı oranı gibi birçok faktör etkili olmaktadır. Yüksek verimde protein ekstraksiyonu için bu parametrelerin optimum değerleri belirlenmelidir. Bunun için, farklı parametre değerlerin protein ekstraksiyon verimine nasıl etki ettiğinin araştırıldığı ve ayrıca yanıt yüzey yönteminin (RSM) kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır (Ma et al., 2010; López et al., 2018; Jarpa—Parra et al., 2014; Oomah et al., 1994).

Firatligil-Durmus ve Evranuz (2010) tarafından yapılan bir çalışmada kırmızı biber çekirdeklerinden protein ekstraksiyonu gerçekleştirmek amacıyla ekstraksiyon parametreleri; sıcaklık (30, 35, 40, 45, 50°C), süre (20, 30, 40, 50, 60 dk.), pH değeri (7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0), çözügen: katı oranı (10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1 v/w) yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile protein verimine göre optimize edilmiştir. RSM sonuçlarına göre optimum değerler, 31 °C, pH 8,8 değeri, 20 dk. ve 21:1 çözügen:katı oranı olarak belirlenmiştir. Bu parametre değerlerinde gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda ise protein verimi %12,24 olarak bulunmuştur. Mürdümükten (*Lathyrus sativus L.*) protein eldesi ile ilgili yapılan bir çalışmada ise pH değeri (2,5-10), su:hammadde oranı (5:1-30:1 v/w) ve süre (20-80 dk.) parametreleri yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile optimize edilmiş ve RSM sonuçlarına göre pH değeri 9,96, su:hammadde oranı 15:1, ekstraksiyon süresi ise 58 dk. optimum nokta olarak belirlenmiştir. Bu noktada üretilen protein izolatlarının protein içeriği ise %92,50 bulunmuştur (Feyzi et al., 2018). Mechmeche ve arkadaşlarının (2017) domates çekirdeği küspesinden protein izolatu üretimini amaçladıkları bir çalışmada ekstraksiyon sıcaklığı (30 °C) ve pH değeri (7,5) sabit tutulup, ekstraksiyon süresi (0,18,36,54,72 sa), karıştırma süresi (10,15,20,25, 30 dk) ve su: hammadde oranı (20:1, 40:1, 60:1, 80:1, 100:1) parametreleri yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile optimize edilmiştir. RSM sonuçlarına göre, su: hammadde oranı 82,81, karıştırma süresi 24,56 dk. ve ekstraksiyon süresi 49,76 sa bulunmuş ve bu koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonunda protein verimi %80,37 olarak belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada mercimek unundan protein izolatu üretilmiştir. Bunun için pH değeri (9 ve 11) ve katı:çözügen oranı (1:20 ve 1:10) yanıt yüzey yöntemi ile (RSM) optimize edilmiş ve optimum nokta pH 9 değeri ,

katı: çözügen oranı 1:10 olarak bulunmuştur. Belirlenen optimum noktalarda gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda protein verimi 14,5 g ekstrakt/100 g mercimek unu ve protein içeriği ise 82 g protein/100 g ekstrakt olarak rapor edilmiştir (Jarpa-Parra et al., 2014).

Protein ekstraksiyonunda etkili olan parametreler ve bu parametrelerin etkileşimi ekstraksiyon verimini büyük ölçüde etkilemektedir. Bundan dolayı bu parametrelerin optimizasyonunun yapılması yüksek verimde protein eldesi için önem arz etmektedir

2.6 Enzimatik Ön İşlemlerin Protein Ekstraksiyonu Verimine Etkisi

Gıda uygulamalarında kullanılan protein ekstraksiyon yöntemleri hem protein veriminde hem de proteinlerin fonksiyonel özellikleri konusunda yetersiz kalabilmektedir. Enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile hammaddede hücre duvarında bulunan ve proteinlerin ekstraksiyonunu engelleyen selüloz, hemiselüloz, lignin ve pektin gibi polisakkaritlerin parçalanarak hücre içindeki proteinlerin ekstraksiyonu sağlanmaktadır. Ayrıca, protein ekstraksiyonunda kullanılan sert kimyasallar enzim destekli ekstraksiyonda kullanılmamaktadır. Böylece hem daha kaliteli protein üretimi mümkün olabilmekte hem de çevreye olan olumsuz etki en aza indirilmektedir (Nadar et al., 2018). Bu durumda, enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile daha ılımlı koşullarda yüksek verimde ve fonksiyonel özelliklerle, besleyici değeri yüksek protein izolatu veya konsantresi üretilebilmektedir (Rosenthal et al.,2001).

Enzim destekli ekstraksiyon yönteminde birçok enzim ve enzim karışımları kullanılmaktadır. Çizelge 2.2’de protein ekstraksiyonunda kullanılan ticari enzimler verilmiştir.

Çizelge 2.2 Enzim destekli ekstraksiyon işleminde kullanılan bazı ticari enzimler

Hammadde	Ticari Enzim	Kaynak
Zeytin yaprağı	Celluclast 1.5L (selülaz)	Vergara-Barberan et al., 2015
Çay yaprağı küspesi	Nötraz, Alkalaz, Protamex ve Flavourzyme	Shen et al., 2008
Pirinç kepeği	Celluclast, hemiselülaz, Pectinex Ultra SP-L, Viscozyme L,	Hanmoungjai et al., 2002
Soya fasulyesi unu	Celluclast, Hemiselülaz, Pektinaz, Proteaz	Rosenthal et al., 2001
Yulaf kepeği	Viscozyme- L	Liu et al., 2008

Bitkisel kaynaklardan protein eldesinde proteolitik aktiviteye sahip alkalaz, nötraz ve protamex gibi ticari enzimler kullanıldığı gibi hücre duvarında bulunan polisakaritleri parçalayan ticari selülaz ve hemiselülaz gibi karbonhidrazlar da kullanılmaktadır (Voudouris et al., 2017). Buna ek olarak Pectinex Ultra SP-L gibi ticari enzimler de bitkisel kaynaklardan protein eldesinde kullanılmaktadır (Çizelge 2.2).

Enzim destekli ekstraksiyon yönteminde her hammaddenin kimyasal ve fizyolojik yapısına göre farklı enzimler kullanılmaktadır. Böylece, gerçekleştirilen ekstraksiyon ile daha ılımlı koşullarda, daha yüksek verimde ve kalitede protein elde edilebilmektedir. Liu ve arkadaşları (2008) Viscozyme L enzimi yardımıyla yulaf kepeğinden protein üretimini amaçlamışlardır. Bunun için, enzim miktarı ile birlikte, pH değeri, inkübasyon süresi ve sıcaklık yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile optimize edilmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda Viscozyme L enziminin protein ekstraksiyon verimini %14,76'dan %56,20' ye arttırdığı gözlemlenmiştir. Kolza tohumu, soya fasulyesi ve mikroalg küspelerinden protein eldesi için yapılan bir çalışmada, alkali ve enzim destekli ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Alkali ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyon verimi soya fasulyesi için %80, kolza tohumu için %15, mikroalg için %30 iken, enzim yardımıyla gerçekleştirilen ekstraksiyon ile ekstraksiyon verimlerinin soya için %90, kolza tohumu için %50, mikroalg için ise, %80'e ulaştığı rapor edilmiştir (Sari

et al., 2013). Latif ve Anwar (2011) susam tohumlarından enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile protein ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Bunun için Protex 7L, Alcalase 2.4L, Viscozyme L, Natu-zyme ve Kemzyme olmak üzere farklı enzim karışımları denenmiş ve en yüksek protein veriminin (%87,1) Protex 7L ile sağlandığı gözlemlenmiştir. İnka fıstığı (*Plukenetia Volubilis*) küspesi ile ilgili yapılan bir çalışmada ise Alcalase 2.4L enzimi kullanılarak protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için hem alkali ekstraksiyon parametreleri (sıcaklık, çözgen: katı oranı, NaCl konsantrasyonu) hem de enzim destekli ekstraksiyon parametreleri (enzim konsantrasyonu, süre) yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda alkali ekstraksiyonla ulaşılan %29,7 protein veriminin, enzim destekli ekstraksiyon ile %44,7 protein verimine ulaştığı gözlemlenmiştir (Chirinos et al., 2017).

Enzimatik ekstraksiyon yöntemi yaprak proteinlerinin ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Nadar et al., 2018; Sari et al., 2015b; Wang et al., 2008; Mudgett et al., 1978). Yaprak proteinleri suda çözünür ve suda çözünmez olmak üzere iki fraksiyondan oluşmaktadır ve suda çözünmez proteinler olarak da adlandırılan membran proteinleri kloroplastta bulunan klorofil ile karmaşık bir yapı oluşturmaktadırlar (Lamsal ve ark., 2007). Bu durum proteinlerin ekstraksiyonunu zorlaştırmaktadır. Klorofile bağlı karmaşık yapıda bulunan bu proteinler, enzim yardımıyla hücre çeperinin ve zarının parçalanması sağlanarak ekstrakte edilebilmektedirler. Vergara-Barberán ve arkadaşlarının (2015) yaptığı bir çalışmada enzim destekli ekstraksiyon ile zeytin yapraklarından protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için kullanılan Celluclast 1.5L enzimi, yaprak dokusunda bulunan mezokarp yapısını parçalayarak yaprak proteinlerin ekstraksiyonuna yardımcı olmuştur. Başka bir çalışmada, mikroalglerden alkali ve enzim destekli ekstraksiyon ile protein ekstraksiyonu sağlanmıştır. Alkali ekstraksiyonla %32,7 ekstraksiyon verimine ulaşılırken, proteaz (Protex 40XL) enziminin kullanımı ile ekstraksiyon veriminin %73,2'ye ulaştığı gözlemlenmiştir. (Sari et al., 2016).

Enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile hem ekstraksiyon verimi hem de proteinlerin kalitesi arttırılabilmektedir. Özellikle yaprak proteinlerinin fizyolojik

yapısından dolayı karşılaşılan düşük ekstraksiyon verimi enzim yardımıyla giderilebilmektedir. Enzimatik ekstraksiyon ile düşük maliyette yüksek kalitede proteinlerin üretimi mümkün olduğundan dolayı, bu yöntemin gıda endüstrisinde kullanımının artırılması için çalışmalar yaygınlaştırılmalıdır (Nadar et al., 2018).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışması kapsamında bitkisel protein üretimi için hammadde olarak ebegümece yaprakları (*Malva sylvestris*) kullanılmıştır. Ebegümece, Kasım-Aralık ayları içerisinde yerel bir pazardan temin edilmiş, yaprakları saplarından ayrıldıktan sonra üzerindeki çamur ve toprak yıkanarak uzaklaştırılıp, -18 °C'de dondurulmuştur. Enzimatik ekstraksiyon işlemine kullanılan Pectinex Ultra SP-L, Novozymes (Danimarka) firmasından temin edilmiştir. Bradford yöntemi ile toplam protein miktarı analizinde, standart eğrinin oluşturulmasında Thermo Fisher Scientific firmasından Bovine Gamma Globulin (2 mg/mL) kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan ebegümece (*Malva sylvestris*) yaprakları.

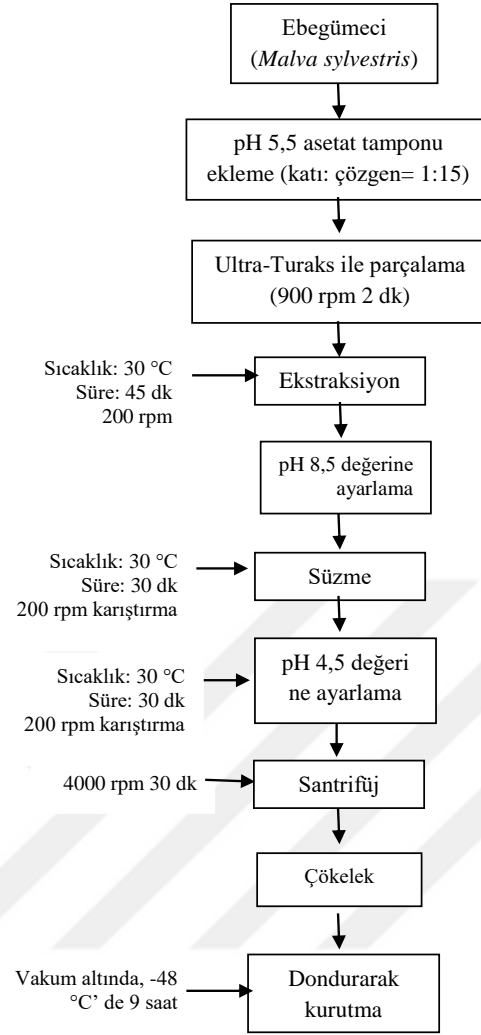
3.2 Yöntem

3.2.1. Protein Ayırma Yöntemleri

Ebegümece yaprağından protein eldesi için izoelektrik çöktürme, amonyum sülfat ile çöktürme ve izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemleri uygulanmıştır.

3.2.1.1 İzoelektrik Çöktürme Yöntemi

Ebegümecei yaprakları 1:15 oranında pH 5,5 değerinde asetat tamponuyla karıştırıldıktan sonra Ultra-Turrax T25 basic IKA-WERKE marka homojenizatör ile 2 dk. boyunca parçalanarak homojenize edilmiştir. Elde edilen çözelti su banyosunda 200 rpm'de 30 °C'de 45 dk. çalkalanmıştır. Daha sonra, 1 M NaOH ile çözeltinin pH değeri 8,5 ayarlanmış ve tülbent ile süzülmüştür. Süzüntü su banyosunda 30 °C'de 30 dk. boyunca 200 rpm'de çalkalandıktan sonra, 1 N HCl ile süzüntünün pH değeri 4,5 ayarlanmış ve 30 °C'de 30 dk. 200 rpm'de karıştırılarak proteinlerin çöktürülmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından, santrifüj (Nüve-NF 800 marka, Türkiye) işlemi uygulanarak (4000 rpm, 30 dk.) çökelek elde edilmiştir. Son olarak, çökelek -48 °C'de vakum altında 9 sa boyunca liyofilizatörde (Armfield, HA-308/3) kurutularak, protein tozları elde edilmiştir (Chel-Guerrero et al., 2002) (Şekil 3.2).

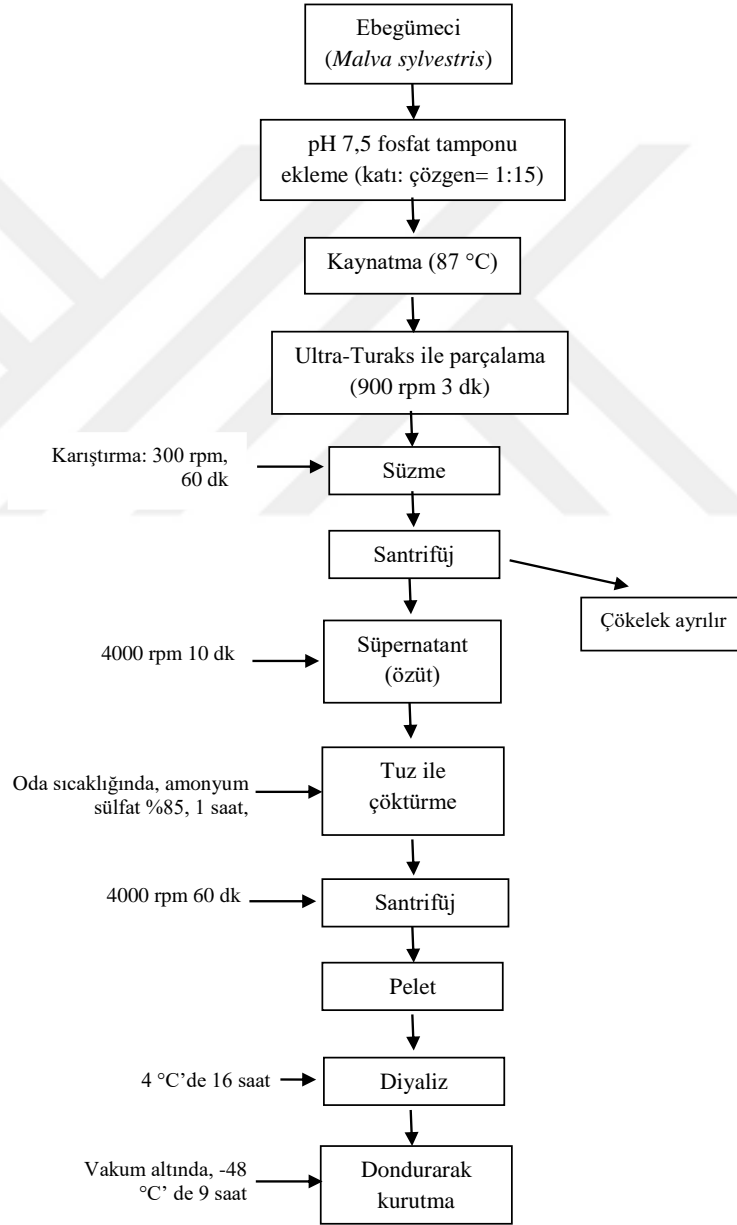


Şekil 3.2 Ebegümeçi yapraklarından izoelektrik çöktürme yöntemiyle protein tozu üretimi

3.2.1.2 Amonyum Sülfat ile Çöktürme Yöntemi

Ebegümeçi yaprakları 1:15 oranında pH 7,5 değerinde fosfat tamponuyla karıştırıldıktan sonra kaynama noktasına kadar ısıtılmış, ardından oda sıcaklığına soğutulmuştur. Karışım, Ultra-Turrax T25 basic IKA-WERKE marka homojenizatör (900 rpm'de 3 dk.) ile homojenize edildikten sonra tülbent ile süzölmüş, süzöntü manyetik karıştırıcı yardımıyla 300 rpm'de 60 dk. oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra, santrifüj (4000 rpm 10 dk.) ile süzöntünün çökelek ve süpernatant kısmı ayrılmış, çökeleğe yıkama işlemi uygulanmış (4000 rpm, 10 dk.) ve ilk santrifüjde elde edilen süpernatant kısmına eklenmiştir.

Ardından, süpernatanta %85 konsantrasyonunda amonyum sülfat eklenmiş ve 4000 rpm'de 60 dk. boyunca santrifüj işlemi uygulanarak proteinler çöktürülmüştür. Protein çökeltisinde bulunan tuzun uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi (4 °C/ 16 sa) uygulanmıştır. Bu amaçla 6–8 kDa por genişliğinde membranlar (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Tuz uzaklaştırma işleminden sonra proteinler, -48 °C'de 9 sa boyunca liyofilizatörde (Armfield, HA-308/3) kurutularak protein tozları elde edilmiştir (Koksal ve ark., 2012) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Ebegümeçi yapraklarından amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle protein tozu üretimi

3.2.1.3 İzoelektrik/Amonyum sülfat çöktürme yöntemi

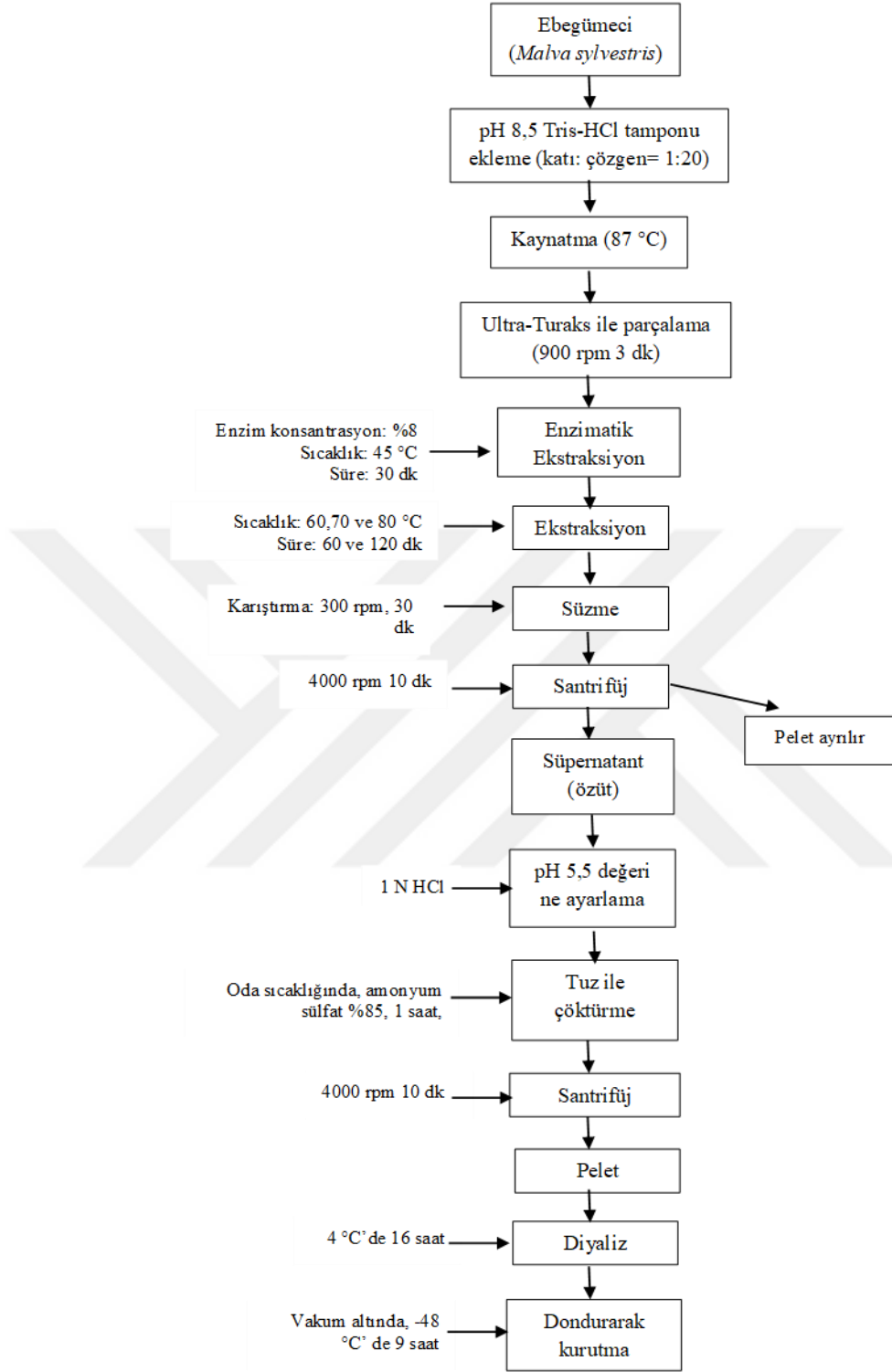
İzoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yönteminde, amonyum sülfat çöktürme yönteminin basamakları benzer şekilde uygulanmıştır. Fakat, tuz ilavesinden önce çözeltinin pH değeri 5,5'e ayarlanmış, daha sonra tekrar amonyum sülfat çöktürme yönteminin işlem basamakları takip edilmiştir (Cui et al., 2017).

3.2.2 Ekstraksiyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Tez çalışmamızda pH değeri ve katı:çözgen oranı parametreleri literatür çalışmaları ve yapılan ön denemeler esas alınarak sırasıyla 8,5 ve 1:20 olarak belirlenmiştir. (Lv et al., 2011; Fıratlıgil-Durmuş and Evranuz, 2010). Sıcaklığın protein verimine etkisini incelemek amacıyla belirlenen sıcaklık değerleri, 25, 38, 50, 63, 75 ve 95 °C sıcaklıkta yapılan ön denemeler sonucunda belirlenmiş, 60,70 ve 80 °C bulunmuştur. Uygun ekstraksiyon süresini belirlemek ve sürenin protein verimi üzerine etkisini incelemek için ise 60 ve 120 dk.'da ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir (Qiaoyun et al., 2017; Ma et al., 2010).

Enzimatik ekstraksiyon işlemi için poligalakturonaz, pektinesteraz, ve pektin trans eliminaz (PTE), hemiselülaz ve selülaz enzimlerin kombinasyonlarından oluşan Pectinex Ultra SP-L (enzim aktivitesi 3800 PGNU/ml) enzimi seçilmiştir. Ekstraksiyon işlemi öncesinde enzim uygulaması 45 °C'de, 30 dk. ve enzim konsantrasyonu %8 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Özkan ve Bilek, 2015).

Ebegümece yaprağından protein tozu üretimi için uygulanan ekstraksiyon aşamasına enzimatik ekstraksiyon işleminin eklenmesiyle oluşan son akım şeması Şekil 3.4 'de gösterilmektedir.



Şekil 3.4 Ebegümeçi yaprağından enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat yöntemi ile yapılan protein tozu üretimi akış şeması

3.2.3 Dondurarak Kurutma

Ebegümece yapraklarından elde edilen ekstraktlar Armfield, HA-308/3 marka liyofilizatörde vakum altında -48 °C'de 9 sa boyunca kurutularak toz formunda bitkisel protein eldesi sağlanmıştır

3.2.4 Analiz Yöntemleri

Hammaddeye ve protein tozlarına uygulanan analizler ayrı başlıklar halinde aşağıda verilmiştir.

Hammadde olarak belirlenen ebegümece yapraklarına toplam kuru madde (AOAC, 1990), toplam kül (Rannou et al., 2015), toplam protein (Kjeldahl, 1883; Dumas, 1826) ve amino asit kompozisyonu (Sanchez-Vioque et al., 1999) analizleri uygulanmıştır. Ayrıca, ekstraksiyon ve çöktürme işlemlerinin sonucunda toplam protein oranı (Bradford, 1976) belirlenmiştir. Üretilen protein tozlarının kalite özelliklerini belirlemek amacıyla ise toplam kuru madde (AOAC, 1990), toplam kül (Rannou et al., 2015), su aktivitesi (Shih et al., 2016), toplam protein (Kjeldahl, 1883), amino asit kompozisyonu (Sanchez-Vioque et al., 1999), protein çözünürlüğü (Gonzalez-Perez, 2003), renk (Salgado et al., 2011), yığın yoğunluğu (Kaur et al., 2015), sıkıştırılmış yığın yoğunluğu (Kaur et al., 2015), Carr endeks değeri (Jinapong et al., 2008), partikül yoğunluğu (Erbay, 2013), ıslanabilirlik (Jinapong et al., 2008) ve dağılıbilirlik (Jinapong et al., 2008) analizleri yapılmıştır.

3.2.4.1 Hammaddeye Yapılan Analizler

3.2.4.1.1 Toplam Kuru Madde Analizi

Toplam kuru madde oranının belirlenmesi için AOAC, 1990' da belirtildiği şekilde ağırlığı bilinen petri kaplarına örnekler tartılmış ve 65 °C, vakumu alınmış etüvde sabit ağırlığa gelene kadar örnekler kurutulmuştur. Etüvden çıkarılan örnekler desikatörde soğutulup son ağırlık kaydedilmiş ve % kuru madde aşağıda gösterilen Denklem 1' e göre hesaplanmıştır (AOAC, 1990). Toplam kuru madde analizi ebegümece yaprakları ve üretilen protein tozları için yapılmıştır.

$$\%KM = \frac{m_s - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \text{ (Denklem 1)}$$

m_1 :Sabit tartıma gelen boş petrinin darası (g)

m_2 :Örnek+petri darası (g)

m_3 :Sabit tartıma gelen örnek+petri darası (g)

3.2.4.1.2 Toplam Kül Analizi

Darası bilinen krozelere, ebegümece yaprakları ve protein tozları tartılıp, 550 °C'de 5 sa yakılarak toplam kül miktarı belirlenmiştir (Rannou et al., 2015). Toplam kül analizi hem hammaddeye hem de protein tozlarına uygulanmıştır.

3.2.4.1.3 Toplam Protein Miktarı Analizi

Ebegümece yaprağı ve protein tozlarının toplam protein miktarı Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) ve Dumas (Dumas, 1826) yöntemlerinde belirtildiği gibi örneklerin toplam azot miktarı belirlendikten sonra, 6,25 dönüşüm faktörü kullanılarak hesaplanmıştır (Barros et al., 2010; Tabaraki et al., 2012).

3.2.4.1.4 Amino Asit Kompozisyonu Analizi

Örnekler 110 °C'de 6 N HCl ile 24 sa boyunca hidrolize edildikten sonra ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi kullanılarak amino asit içeriği belirlenmiştir. Amino asit içeriği, 100 g protein başına g amino asit olarak gösterilmiştir (Sanchez-Vioque et al., 1999).

3.2.4.2 Protein Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi

Protein ekstraksiyon veriminin belirlenmesinde Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bradford yöntemi, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması ile oluşan rengin absorbansının ölçüldüğü kalorimetrik bir analizdir (Bradford, 1976). Test tüpüne kör için 100 µL tris-HCl tamponu, diğer tüplere 100 µL örnek konulmuş, ardından üzerine 1 mL Coomassie Brilliant boyası eklenmiştir. Karanlık ortamda 15 dk. bekletildikten sonra örneklerin absorbans değerleri kör değerine karşı spektrofotometrede 595 nm'de okunmuştur. Standart

eğri grafiği için ise, test tüplerine 0,05-0,1-0,12-0,15-0,2-0,225-0,25 mg/mL konsantrasyonlarında protein (Bovine Gamma Globulin-2 mg/mL) zeltileri hazırlanmış ve bu zeltilere 1 ml Coomassie Brilliant boyası eklendikten sonra karanlık bir ortamda 15 dakika bekletilip 595 nm’de absorbans değerleri okunmuş ve standart eğri çizilmiştir.

3.2.4.3 Protein Tozlarına Yapılan Analizler

Hammaddeye yapılan toplam kuru madde, toplam kül, toplam protein ve amino asit kompozisyonu analizleri protein tozlarına da yapılmıştır. Hammaddeye yapılan analizler dışında protein tozlarına uygulanan analizler aşağıda verilmiştir.

3.2.4.3.1 Protein özünürlğ Analizi

Protein tozları, 4 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde saf suda zndrlmştir. Ardından, zeltinin pH değeri 0,5 aralıkla 2,5 ve 8,5 arasında değişen pH değerlerine ayarlandıktan sonra oda sıcaklığında 300 rpm’de 2 sa boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra 6000 rpm’de 15 dk. boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş, süpernatant ve başlangıçta hazırlanan 4 mg/mL konsantrasyonundaki zeltinin protein miktarı Bradford (Bradford, 1976) yöntemi ile belirlenmiştir. Proteinin znrlğ aşağıdaki denklemde (Denklem 2) gösterildiği gibi hesaplanmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir (Gonzalez-Perez, 2003).

$$\%Protein \ znrlğ = \frac{m_s}{m_t} \times 100 \text{ (Denklem 2)}$$

m_s = Süpernatantın protein oranı

m_t = Proteinin başlangıç konsantrasyonunun (4 mg/mL) protein oranı

3.2.4.3.2 Su Aktivitesi Tayini

Protein tozlarının su aktivite değerleri Testo marka (Almanya) cihaz ile belirlenmiştir. Toz rnek cihazın haznesine yerleştirilmiş ve su aktivite değerindeki değişimin 0.001’den az olduğu durumda değer kaydedilmiştir (Shih et al., 2016).

3.2.4.3.3 Yığın Yoğunluğu Analizi

Toz ürün 100 mL'lik darası alınmış bir mezüre huni yardımıyla basınç uygulamadan hacim çizgisine kadar aktarılmış ve yığın yoğunluğu örnek ağırlığının hacme oranından (kg/m³) belirlenmiştir (Kaur et al., 2015).

3.2.4.3.4 Sıkıştırılmış Yığın Yoğunluğu Analizi

100 mL'lik mezüre aktarılmış olan toz örneğe 100 defa sabit kuvvet uygulanmış ve toz örneğin kapladığı son hacim kaydedilmiştir. Sonuç kg/m³ olarak verilmiştir (Kaur et al., 2015).

3.2.4.3.5 Carr Endeks Değerinin Belirlenmesi

Carr endeksi; ürünün boyutu, şekli, yüzey alanı, yapışkanlık gibi özellikleri hakkında dolaylı bilgi veren bir değerdir. Carr endeks değeri yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yığın yoğunluğu değerleri kullanılarak belirlenmektedir (Kaur et al., 2015). Carr endeksine göre toz ürünlerin akabilirliği hakkında Çizelge 3.1'de verilen bilgilere göre yorum yapılabilmektedir.

$$CI = \frac{\text{Sıkıştırılmış yığın yoğunluğu} - \text{Yığın yoğunluğu}}{\text{Yığın yoğunluğu}} \times 100 \text{ (Denklem 3)}$$

Çizelge 3.1 Carr Endeks değerine göre protein tozlarının akabilirliklerinin sınıflandırılması (Jinapong et al., 2008)

CE(%)	Akabilirlik
<15	Çok iyi
15 – 20	İyi
20 – 35	Orta
35-45	Kötü
>45	Çok kötü

3.2.4.3.6 Partikül Yoğunluğu Analizi

100 mL' lik piknometrenin darası kaydedilmiş ve toz ürün eklenip tartılmıştır (m_t). Ardından, piknometrenin üzerine önce bir miktar petrol eteri eklenmiş ve toz yığını içerisindeki boşlukların petrol eteriyle dolması için hafifçe köpürtmeden çalkalanmıştır Daha sonra, piknometre hacmi petrol eteri ile tamamlanıp son ağırlık kaydedilmiştir (m_{tp}). Ayrıca piknometrenin sadece petrol eteriyle dolu hali de tartılmıştır (m_p). Sonuç aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmış ve kg/m^3 olarak ifade edilmiştir (Erbay, 2013).

$$Partikül\ Yoğunluğu = \frac{(m_t - m_0) \times \text{petrol eteri yoğunluğu}}{(m_p - m_0) - (m_{tp} - m_t)} \quad (\text{Denklem 4})$$

3.2.4.3.7 Islanabilirlik Analizi

Islanabilirlik analizinde, 250 mL'lik behere, 100 mL saf su (25 °C) eklenmiştir. Beherde bulunan sıvının yüzeyi ile huninin alt kısmı arasındaki uzaklık 10 cm olacak şekilde ayarlanmıştır. Huninin içerisine bir cam test tüpü yerleştirilmiş ve 0,1 g toz örnek test tüpünün çevresine konulmuştur. Toz örneğin tamamıyla ıslanma süresi kronometre ile belirlenmiştir (Jinapong et al., 2008).

3.2.4.3.8 Dağılıbilirlik Analizi

Dağılıbilirlik analizi için, 50 mL'lik behere 10 mL saf su (25 °C) konulup, üzerine 1 g toz örnek eklenmiştir. Daha sonra, bir kaşık yardımıyla beherde bulunan sıvı 15 sn boyunca saat yönünde ve 25 sn saat yönünün tersinde dairesel hareket ile karıştırılmıştır. Karışım sonrasında 212 μm 'lik elekten süzölmüştür. Ardından süzüntüden 1 mL örnek alınıp, darası bilinen kurutma kabına aktarılarak vakum etüvde (65 °C) sabit tartıma dek tutulmuş ve aşağıdaki denklem kullanılarak sonuç hesaplanmıştır (Jinapong et al., 2008).

$$\%Dağılıbilirlik = \frac{(10 + a) \times b}{a \times \frac{100 - c}{100}} \quad (\text{Denklem 5})$$

a: Toz ürün miktarı (1 g)

b: İşlem sonrası süzütünün % kuru madde değeri

c: Toz ürünün % nem değeri

3.2.3.3.9 Renk Analizi

Toz örneklerin CIELAB renk değerleri (L^* , a^* ve b^*) Hunter-Lab kolorimetresi Colorflex model renk ölçüm cihazı (Management Company, USA) ölçülmüştür (Mokni et al., 2018). L^* değeri koyuluk ve parlaklığı, a^* değeri kırmızılığı ($+a^*$), yeşilliği ($-a^*$) ve b^* değeri ise maviliği ($-b^*$) sarılığı ($+b^*$) göstermektedir (Hunter, 1975).

3.2.4.3.10 İstatiksel Analiz

Tüm analizler üçer tekrarlı ve üçer paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen verilerin istatiksel değerlendirilmesi SPSS paket programı (SPSS Inc. Chicago, IL, ABD) ile yapılmıştır. Elde edilen veriler sonuçlar üzerine faktörlerin etkisi varyans analizi uygulanarak tespit edilmiştir ve ortalamalar arasındaki farklılık Duncan çoklu karşılaştırılma testi ($P<0,05$) ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, tez çalışmasında ham madde olarak seçilen ebegümeçi yaprağına ve enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle elde edilen protein tozlarına ilişkin analiz sonuçları ile ekstraksiyon koşullarının belirlenmesine ilişkin analiz sonuçlarına yer verilmektedir.

4.1 Ebegümeçi Yaprağına Ait Analiz Sonuçları

Ebegümeçi yaprağının toplam kuru madde içeriği $18,58 \pm 0,11$ olarak bulunmuştur. Literatür incelendiğinde ebegümeçi yaprağının kuru madde içeriğinin $13,77 - 17,20$ (Tabaraki et al., 2012) ve $23,74$ (Barros et al., 2010) arasında değiştiği bildirilmiştir. Ham maddenin toplam kül miktarının kuru madde bazında $12,55 \pm 0,05$ olduğu belirlenmiştir. Literatürde bu değer ortalama $13,53 \pm 0,11$ (Barros et al., 2010), $13,10 - 14,85$ (Tabaraki et al., 2012) olduğu belirtilmiştir. Ebegümeçi yaprağında bulunan azot ve protein miktarı ise Kjeldahl ve Dumas yöntemleri ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Ebegümeçi yaprağının Kjeldahl ve Dumas yöntemleriyle hesaplanan azot ve protein miktarları (%)

Azot Analizi Yöntemi	% N (kuru madde)	% Protein (N x 6,25)
Kjeldahl	$6,06 \pm 0,05$	$37,93 \pm 0,31$
Dumas	$6,40 \pm 0,03$	$40,01 \pm 0,23$

Literatürde, yapılan çalışmalarda yaprak proteinlerin yapısında bulunan azot oranına göre 6,25 dönüşüm faktörünün kullanıldığı bilinmektedir (Cemeroğlu, 2013; Barros et al., 2010; Tabaraki et al., 2012; Tenorio et al., 2017a; Cui et al., 2017). Bu kapsamda, ebegümeçi yaprağının protein oranı Kjeldahl ve Dumas yöntemleri ile belirlenen % azot miktarından hesaplanmış ve sırasıyla $37,93 \pm 0,31$ ve $40,01 \pm 0,23$ bulunmuştur. Tez çalışmasında ebegümeçi yapraklarının Dumas yöntemi ile belirlenen protein oranının Kjeldahl yöntemi ile belirlenen protein oranından daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, Dumas yönteminde protein olmayan tüm azot bileşiklerinin de ölçülerek toplam azot miktarının

bulunmasıdır (Thompson et al., 2002). Dumas yöntemi Kjeldahl yöntemi ile karşılaştırıldığında daha hızlı sonuç vermekte ve sert kimyasallar kullanılmamaktadır. Ayrıca, Dumas yönteminin azot miktarını belirlemekte daha doğru sonuç verdiği literatür çalışmalarında belirtilmektedir (Simonne et al., 1997).

Literatür incelendiğinde ebegümeçi yaprağının bileşimi ile ilgili kısıtlı çalışmalar bulunmakla birlikte, Tabaraki ve arkadaşları (2012) İran’ da yetişen ebegümeçi yapraklarının protein oranının kuru madde bazında %16,5–18,7 olduğunu, Barros ve arkadaşları (2010) ise %12,25 olduğunu belirtmiştir. Ebegümeçi bitkisinin aynı cinsten 1500 türünün olması, Avrupa, Güney Afrika ve Asya gibi geniş bir coğrafyada yetişmesi ve kökenin çok eski çağlara kadar dayanması yapılan çalışmalarda ebegümeçi bitkisinin kimyasal kompozisyonunda farklılar görülmesine neden olduğu düşünülmektedir (Keskin ve ark., 2015).

Proteinin kalitesini belirleyen en önemli faktörlerden biri içerdiği elzem amino asit içeriği ve miktarıdır. Bu nedenle, ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi ile ebegümeçi yaprağında bulunan elzem ve elzem olmayan amino asitler ve bu amino asitlerin oranları belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2’ de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Ebegümeçi yaprağının amino asit kompozisyonu

Elzem Amino Asitler	g/ 16 g N
İzolösin	5,9
Lösin	9,6
Lizin	5,8
Metiyonin	1,2
Valin	5,4
Fenilalanin	4,2
Treonin	6,8
Elzem Olmayan Amino Asitler	
Arginin	7,2
Histidin	2,2

Tirozin	2,7
Aspartik asit	13,9
Glutamik asit	11,9
Serin	7,5
Prolin	3,3
Glisin	4,9
Alanin	7,2
Tirozin	2,7

Ebegümece yaprağının izolösin, lösin, lizin, metiyonin, valin, fenilalanin ve treonin gibi protein kalitesinin önemli ölçüde etkileyen elzem amino asitleri içerdiği görülmektedir. Bunun yanı sıra ebegümece yaprağının yüksek oranda, aspartik asit, glutamik asit, serin, alanin ve arginin gibi elzem olmayan amino asitleri de içerdiği saptanmıştır. Ebegümece yaprağının amino asit içeriği, ticari olarak en çok üretilen ve tüketilen soya proteini ile karşılaştırıldığında önemli farklılıkların olmadığı tespit edilmiştir. Hatta, soya proteini elzem amino asitlerden lösini %7,8, treonini %3,9 oranında içerirken, ebegümece yaprağının %9,6 lösin, %6,8 treonin içerdiği saptanmış ve bu değerlerin soya fasulyesinden yüksek olduğu belirlenmiştir (Kumar et al., 2002). Bu nedenle ebegümece yaprağının yeni bir alternatif bitkisel protein kaynağı olarak değerlendirilebileceği öngörülmektedir.

4.2 Protein Tozu Eldesi

4.2.1 Protein Ayırma Yönteminin Belirlenmesi

Proteinlerin elde edilmesi için kullanılan çöktürme yöntemleri farklı ham maddelerde farklı protein verimlerine neden olduğundan dolayı farklı ham maddeler için en uygun çöktürme yönteminin belirlenmesi gerekmektedir (Alsohaimy et al., 2007; Cui et al., 2017; Zhang et al., 2017; Cui et al., 2017).

Bu çalışmada, ebegümece yaprağından protein eldesi için ekstraksiyon koşullarının belirlenmesinden önce izoelektrik, amonyum sülfat ve izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemleri uygulanmış ve sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3 Ebegümece yaprağına uygulanan çöktürme yöntemleri sonucu elde edilen protein verimleri (%)

Protein Eldesinde Kullanılan Yöntem	Protein Verimi (%)
İzoelektrik Çöktürme	14,04±0,42 ^a
Amonyum Sülfat Çöktürme	17,30±0,87 ^b
İzoelektrik-Amonyum Sülfat Çöktürmesi	26,53±0,81 ^c

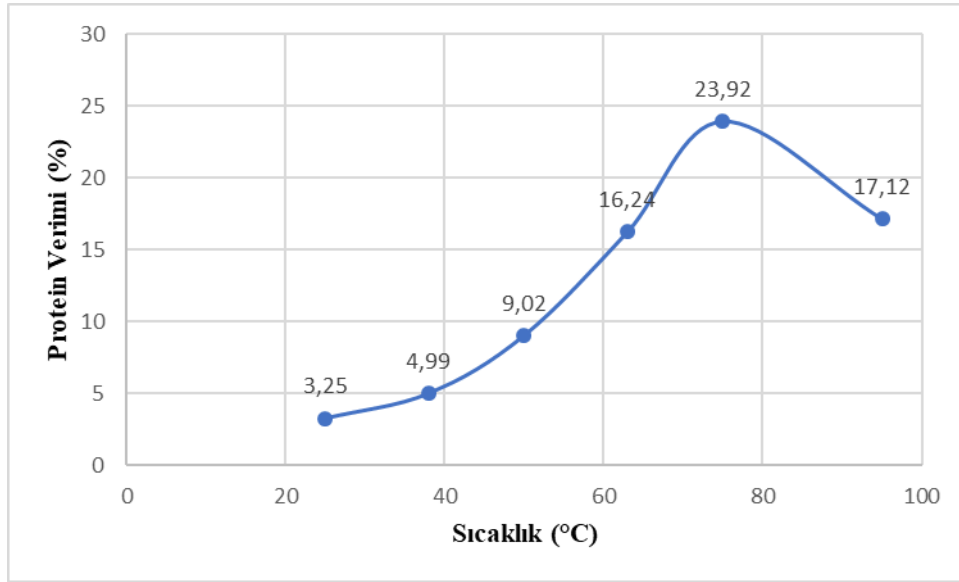
^{a-b-c} Aynı sütunda farklı harflerle işaretlenen gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,05$).

İzoelektrik çöktürme yöntemi ile ebegümece yaprağındaki proteinin %14,04'ü elde edilirken amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle %17,30'u elde edilmiştir. Buna karşılık, iki yöntemin birlikte uygulandığı izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yönteminde ebegümece yapraklarında bulunan proteinin %26,53'ü elde edilebilmiştir (Çizelge 4.3). En yüksek protein veriminin izoelektrik – amonyum sülfat çöktürmesinin birlikte farklı çöktürme yöntemlerinin protein verimine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Yaprak proteinleriyle ilgili çalışmalar literatürde sınırlı olmakla birlikte, Cui ve arkadaşları (2017) çay yapraklarından protein eldesi için izoelektrik, amonyum sülfat ve izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemlerinden çalışmamızda ulaşılan sonuca benzer şekilde en yüksek verime izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile ulaşıldığını belirlemiştir.

Bitkisel proteinlerinin farklı çözenlerde gösterdikleri çözünebilir özelliklerine göre dört fraksiyondan oluştuğu ve bu fraksiyonların protein çöktürme yönteminin belirlenmesinde önemli olduğu literatürde belirtilmektedir (Hadnağev et al., 2017). Bu protein fraksiyonları albümin (suda çözünen), globülin (tuz çözeltisinde çözünen), prolamin (alkolde çözünen) ve glutelinler (su, etanol ve alkolde çözünür olmayan) olmak üzere dört grupta incelenmektedir (Osborne, 1924). Bu kapsamda, hammaddede baskın olarak bulunan protein fraksiyonuna göre en uygun protein çöktürme yöntemi seçilerek protein verimi artırılabilir.

4.2.2 Ekstraksiyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Protein ekstraksiyon veriminde etkili olan parametrelerden pH değeri ve çözen:kati oranı yapılan ön denemeler sonucunda sırasıyla 8,5 ve 20 olarak belirlenmiştir (Lv et al., 2011; Fıratlıgil-Durmuş and Evranuz, 2010). Uygun ekstraksiyon süresini belirlemek ve sürenin protein verimi üzerine etkisini incelemek için ise 60 ve 120 dk.'da ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir (Qiaoyun et al., 2017; Ma et al., 2010). Ekstraksiyon sıcaklığının protein verimine etkisini incelemek için ise öncelikli olarak 25, 38, 50, 63, 75 ve 95 °C sıcaklıklarda ön denemeler yapılmıştır.



Şekil 4.1 Ekstraksiyon sıcaklığının protein verimine etkisini incelemek için yapılan ön denemeler sonucu elde edilen protein verimleri.

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere 25, 38, 95 °C'lerde düşük protein verimi elde edilirken 50 °C'den 75 °C'ye sıcaklık artışı sağlandığında protein veriminin de arttığı görülmüştür. Literatürde yaprak proteinlerinden protein ekstraksiyonunun en az 60 °C'de gerçekleşmesi gerektiği, fakat bazı hammaddeler için 120 °C gibi yüksek sıcaklıkların da yeterli gelmediği belirtilmiştir (Sari et al., 2015a). Bizim çalışmamızda ise sıcaklığın 95 °C'ye arttırılmasının protein verimini olumsuz etkilediği görülmektedir. Bu nedenle, yüksek verimde protein tozu elde edebilmek ve sıcaklığının ve sürenin protein verimine etkisini incelemek amacıyla 60, 70, 80 °C sıcaklıkta ve 60 ve 120 dk. sürede ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu

parametrelerde gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonucunda hesaplanan protein verimleri Çizelge 4.4 'te verilmektedir.

Çizelge 4.4 Belirlenen sıcaklıklarda ve sürelerde gerçekleşen ekstraksiyon sonucunda elde edilen protein verimleri

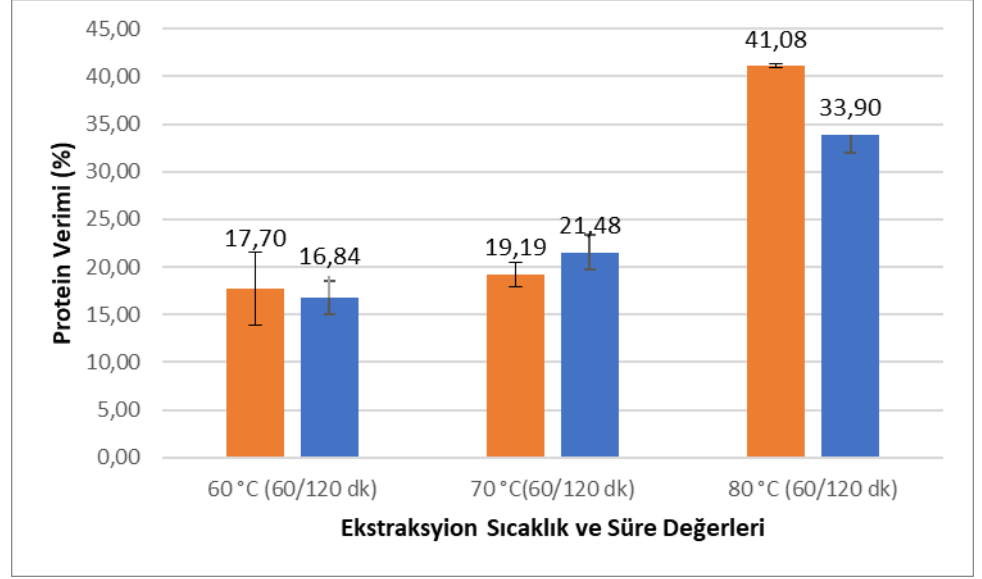
Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C)	Ekstraksiyon Süresi (dk.)	Protein verimi (%)
60	60	17,70±3,83
60	120	16,84±1,84
70	60	19,19±1,27
70	120	21,48±1,73
80	60	41,08±0,20
80	120	33,90±1,87

Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi sıcaklık ve sürenin etkisinin belirlenmesi sonucunda ham maddede bulunan toplam proteinin %41,08±0,20'si ancak ekstrakte edilebilmiştir. Bu sonucun birkaç nedeninin olduğu düşünülmektedir. Bitki hücrelerinde yer alan hücre duvarının yaprak proteinlerinin ekstraksiyonunda büyük bir engel oluşturduğu literatürde belirtilmektedir. Özellikle mikroalglerden protein ekstraksiyonu ile yapılan bir çalışmada alkali işlemin hücre duvarının tamamen parçalanması için yeterli olmadığı saptanmıştır (Safi et al., 2013). Çalışmamızda, ebegümece yaprağından düşük protein eldesinin nedenlerinden birinin hücre duvarının tamamen parçalanamamasından olabileceği düşünülmektedir. Hücre duvarının etkin bir şekilde parçalanmasını etkileyen faktörlerden bir tanesi de ebegümeceinde yüksek miktarda bulunan müsilajdır. Müsilaj temel olarak glukuronik asit, galakturonik asit, ramnoz, galaktoz, fruktoz, glikoz ve sakkarozdan oluşan hücrenin yapısında bulunan, suda çözünebilir bir polisakarittir ve proteinlerin ekstraksiyonunu olumsuz yönde etkilediği literatür çalışmalarında belirtilmiştir. (Kaushik et al.,2016; Gasparetto et al., 2012; Jideani

and Bello, 2009). Müsilajın nem tutucu yapısından dolayı hammaddenin çözgen ile etkileşime girmesine engel olduğu, bundan dolayı proteinlerin çözgen içinde çözünmesini engellediği düşünülmektedir (Kaushik et al.,2016). Literatürde, müsilaj ekstraksiyonun genel olarak alkol ya da su ile gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Ziolkovska, 2012; Ibañez and Ferrero, 2003; Tomoda et al., 1989). Fakat yapılan çalışmalarda müsilajın ekstraksiyonu sırasında proteinlerinin de müsilaj ile birlikte çöktüğü rapor edilmiştir (Dev and Quensel, 1988; Jideani and Bello, 2009). Bu nedenle, müsilajın uzaklaştırılması işlemi de protein kaybına neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, müsilajın elde edilen protein tozlarının su tutma kapasitesini, emülsifiye edici özelliklerini ve viskozitesini geliştirdiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Jideani and Bello, 2009). Bu yüzden proteinlerle birlikte elde edilmesinde bir sakınca olmayabilir.

Bunun dışında yaprak proteinlerinin hücrede buldukları konum da yaprak proteinlerin ekstrakte edilebilirliklerini zorlaştırmaktadır. Tahıllar, yağlı tohumlar ve baklagiller gibi bitkisel kaynaklarda bulunan proteinler çoğunlukla depo proteinleri olarak adlandırılmakta ve hücrede sitoplazmada içi sıvı dolu boşluklar olan kofullarda bulunmaktadır. Buna karşılık yaprak proteinlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturan rubisco (ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz oksijenaz) ise kloroplastta bulunmaktadır ve kloroplastın karmaşık yapısı nedeniyle rubisco'nun ekstraksiyonu oldukça zor olmaktadır (Sari et al., 2015a).

Literatür incelendiğinde, genel olarak sıcaklık artışının protein verimini olumlu etkilediği görülmüştür. Fakat, Sari ve arkadaşları (2015a), farklı ham maddeler üzerine yaptıkları bir çalışmada arpadan ve buğdaydan 25 °C' de yüksek verimde protein elde edebilmiş ve daha yüksek sıcaklıklara gerek duyulmadığı belirtilmiştir. Bunun yanısıra, çimden protein eldesinde 25 °C ekstraksiyon sıcaklığı yeterli olamamış düşük protein verimi elde edilmiştir. Farklı ham maddeler için ekstraksiyon sıcaklığının ekstraksiyon verimine etkisinin belirlenmesi ve optimize edilmesi bir zorunluluk olarak karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 4.2 Ekstraksiyon sıcaklığı ve sürenin protein verimine etkisi

Yaprak proteinlerin ekstraksiyonunda yüksek sıcaklıklara gereksinim duyulduğu birçok literatür çalışmasında belirtilmektedir (Shen et al., 2008; Urribarrí et al., 2009; Sari et al., 2015a; Aletor et al., 2002). Yapılan ön denemeler sonucunda ekstraksiyon sıcaklık parametreleri 60, 70 ve 80 °C olarak belirlenmiş ve bu sıcaklık değerlerin sabit ekstraksiyon koşullarında (pH değeri 8,5, katı:çözgen oranı 1:20, süre 60 dk. veya 120 dk.) protein verimine etkisi Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığının 60 °C’den 70 °C’ye artırılmasının protein verimi artışında büyük bir değişikliğe neden olmadığı, 80 °C’de ise protein veriminin büyük ölçüde arttığı görülmektedir. Çalışmamızda 80 °C ekstraksiyon sıcaklığında %41,08±0,20 oranında protein verimine ulaşıldığı görülmektedir. Bu durumun, 80 °C ekstraksiyon sıcaklığının, ebeğümeci yaprağında bulunan ve proteinlerin ekstraksiyonunu olumsuz etkileyen müsilajı ve hücre çeperini parçalamak için yeterli olmadığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Genellikle, ekstraksiyon süresinin uzaması hammaddede bulunan proteinin çözgen içerisinde çözünmesi için daha çok zaman tanıyacağından protein verimini artırmaktadır. Çay yapraklarından protein eldesi ile ilgili bir çalışmada ekstraksiyon süresinin 1 saatten 6 saate çıkarılmasının protein verimini %12’den %38’e arttırdığı rapor edilmiştir (Shen et al., 2008). Fakat, bazı literatür çalışmalarında, ekstraksiyon süresinin protein veriminde önemli bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Jarpa-Parra et al., 2014). Bu tez çalışmasında Şekil 4.2’de görüldüğü üzere

ekstraksiyon süresinin protein verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Bununla birlikte, literatürde uzun ekstraksiyon süresi hem protein kalitesini düşürdüğünden hem de mikrobiyal kontaminasyon riskini arttırdığından dolayı önerilmemektedir (Sari et al., 2015b; Babbar et al., 2015).

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde yüksek verimde protein ekstraksiyonuna en uygun sıcaklık 80 °C, süre ise 60 dk. olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda gerçekleşen ekstraksiyon sonucunda $\%41,08\pm0,20$ protein verimine ulaşılmıştır.

4.2.3 Enzim Destekli Ekstraksiyonun Protein Verimine Etkisi

Ebegümeçi yaprağında bulunan, protein ekstraksiyonunu engelleyen hücre duvarındaki polisakkarit yapılarını parçalamak ve kloroplastta bulunan membran proteinlerini ekstrakte edebilmek için enzimatik ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Bunun için, Pectinex Ultra SP-L enzimi kullanılmıştır. Enzimatik ekstraksiyon işlemi 45 °C sıcaklıkta, %8 enzim konsantrasyonunda ve 30 dakika sürede gerçekleştirilmiştir (Özkan and Bilek, 2015).

Enzim kullanılmadan gerçekleştirilen ekstraksiyon ve izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme sonucunda elde edilen protein verimi $\%41,08\pm0,20$ iken enzim uygulaması ile bu değer $\%47,33\pm2,12$ 'e yükselmiştir. Sonuç olarak, enzimatik ekstraksiyon işlemi ile protein veriminin %13,29 arttığı gözlemlenmiştir.

Ebegümeçi yaprağında bulunan müsilaj yapısının yapılan çalışmalar sonucunda ramnogalakturonan tipte olduğu tespit edilmiştir (Classen and Blaschek, 2002). Ramnogalakturonan pektinin yapısında bulunan karmaşık yapıda bir polisakkarittir (Arslan, 1994). Enzimatik ekstraksiyon işleminde kullanılan Pectinex Ultra SP-L, çoğunlukla poligalakturonaz, pektinesteraz ve pektin trans-eliminaz (PTE) enzimlerini içeren, aynı zamanda düşük oranda hemiselülaz ve selülaz aktivitelerine sahip ticari bir enzimdir. Pectinex ultra SP-L enziminin sahip olduğu pektolitik aktivite sayesinde, ekstraksiyon ile parçalanmadığı düşünülen müsilaj yapısı parçalanarak protein ekstraksiyon veriminin arttırıldığı düşünülmektedir. Ayrıca düşük aktivitede bulunan selülaz ve hemiselülaz

enzimleri sayesinde yaprak dokusunda bulunan mezokarp yapısı parçalanarak proteinlerin ekstraksiyonu sağlanmıştır (Vergara-Barberán et al., 2015).

4.3 Protein Tozlarına Yapılan Analizler

Ebegümece yaprağından protein tozu eldesi için protein ekstraksiyonu, çöktürme ve diyaliz işlemleri uygulanmış, ardından elde edilen çökelek $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de vakum altında kurutulmuştur. Elde edilen protein tozlarının özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan analizlerin sonuçları bu bölümde verilmiştir.

4.3.1 Toplam Kuru Madde, Toplam Kül Miktarı, Protein ve Su Aktivitesi Analizi

Ebegümece yapraklarından izoelektrik-amonyum sülfat yöntemi ile elde edilen protein tozlarının toplam kuru madde, toplam kül ve protein analiz sonuçları Çizelge 4.4' de verilmektedir.

Çizelge 4.4 Protein tozlarına ait toplam kuru madde, toplam kül, protein ve su aktivitesi değerleri

Toplam Kuru Madde (%)	86,30±0,10
Toplam Kül (%) KM'de	7,75±1,32
Protein (%) KM'de	81,74±1,74
Su aktivitesi (25 °C)	0,54±0,01

Ebegümece yapraklarından toz formda elde edilen proteinin kuru maddesi %86,30±0,10, kuru madde bazında hesaplanan toplam protein miktarı ise %81,74±1,74 olarak belirlenmiştir. Literatürde, kuru madde bazında protein içeriği %65' ten fazla olan ürünlerin protein konsantresi olarak ifade edildiği belirtilmektedir (Oreopoulou and Tzia, 2007). Dolayısıyla elde edilen protein tozları protein konsantresi kapsamında değerlendirilmiştir. Protein tozlarının mineral içeriği kül analizi ile belirlenmiş ve kuru madde bazında %7,75±1,32 olarak hesaplanmıştır. Su aktivitesi değeri ise 0,54 olarak belirlenmiştir. Su aktivitesi değeri 0,62' den az olan ürünlerde genel olarak mikrobiyal gelişme mümkün

olmadığından, üretilen protein tozları uzun süre depolanabilecektir (Sablani, 2006). Literatür incelendiğinde farklı hammaddelerden elde edilen protein tozlarının kuru madde değerlerinin %91 ve %98 arasında değiştiği, toplam kül miktarının ise %2,01 ile %22,5 arasında değiştiği görülmüştür (Wu et al., 2009; Rodsamran and Sothornvit, 2018; Salgado et al., 2011; Tirgar et al., 2017; Aletor et al., 2002). Sonuç olarak, elde edilen protein tozlarının kül miktarının literatürde belirtilen sonuçlarla benzerlik gösterdiği görülmektedir. Buna karşılık, protein tozlarının kuru madde içeriğinin literatürde verilen değerlere göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeninin ebegümece yapraklarında bulunan müsülaj yapısının suyu tutmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.3.2 Protein Tozlarının Amino Asit Kompozisyonu

Proteinlerin amino asit içeriği proteinlerin kalitesini belirleyen en önemli özelliklerindedir. Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozlarının amino asit kompozisyonu karşılaştırma yapmak amacıyla soya proteininin amino asit içeriği (Hughes et al., 2011) ile birlikte Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozu ile soya protein konsantresinin amino asit içerikleri

Elzem Amino Asitler	Ebegümece protein tozu (g/16 gN)	Soya Protein konsantresi (g/16 g N)
İzolösin	7,0	4,7
Lösin	7,2	7,7
Lizin	2,3	6,3
Metiyonin	1,7	1,3
Valin	6,8	4,8
Fenilalanin	3,8	5,0
Treonin	8,3	3,7
Elzem Olmayan Amino Asitler	Ebegümece protein tozu (g/16 gN)	Soya Protein konsantresi (g/16 g N)
Arginin	Tespit edilmemiştir	8,6
Histidin	0,6	2,6

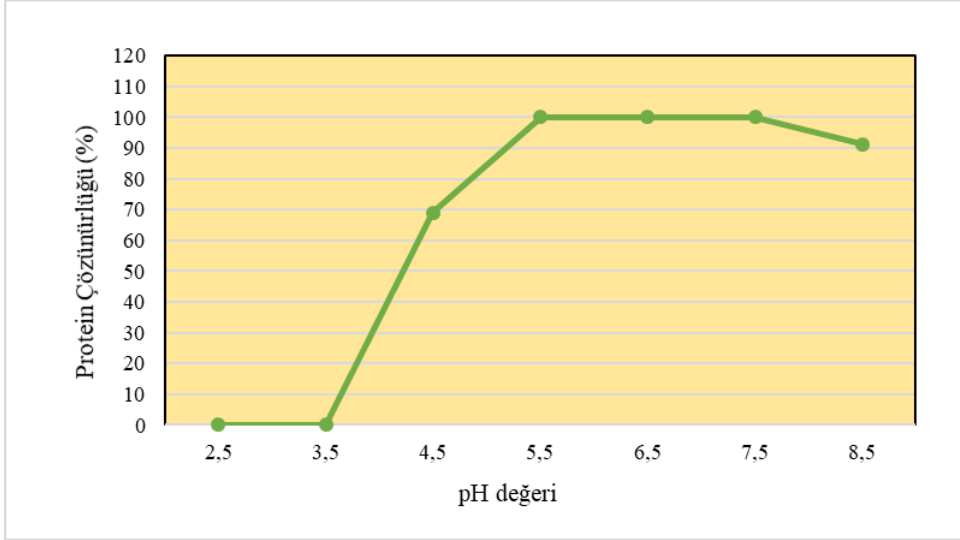
Tirozin	5,9	3,8
Aspartik asit	15,4	12,9
Glutamik asit	8,2	20,2
Serin	16,2	5,1
Prolin	4,6	5,2
Glisin	5,9	4,2
Alanin	6,3	4,0
Tirozin	5,9	3,8

Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozunun elzem amino asit içeriği incelendiğinde en fazla %8,3 oranla treoin ardından ise %7,0 izolösin ve %7,2 lösini içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, ebegümece protein tozunun ticari olarak en çok üretime ve tüketime sahip soya protein konsantresi ile karşılaştırıldığında benzer amino asit içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Buna ek olarak, ebegümece protein tozu izolösin, metiyonin, valin ve treonin içeriği bakımından soya protein konsantresine göre daha zengin olduğu saptanmıştır.

Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozunda %16,2 bir yüksek bir oranda bulunan serin dikkat çekmektedir. Bunun nedeni ebegümece yaprağında hücre duvarında bulunan arabinogalaktan proteinleridir. Arabinogalaktan proteinleri yüksek oranda serin içeren ve hücre duvarında pektinler ile birlikte bulunan karmaşık yapılardır (Classen and Blaschek, 2002). Enzimatik ekstraksiyon yönteminde yüksek pektolitik aktiviteye sahip Pectinex Ultra SP-L enziminin ebegümece yaprağının hücre duvarının parçalandığı, böylece serin amino asidi içeren arabinogalaktan proteinlerin ayrıldığı düşünülmektedir.

4.3.3 Protein Çözünürlüğü

Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozlarının çözünürlüğünde pH değeri değişiminin etkisi araştırılmış ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 pH değerinin enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle elde edilen protein tozunun protein çözünürlüğü üzerine etkisi

Protein tozlarının çözünürlüğü, bulunduğu ortamın pH değerine bağlıdır. Şekil 4.3' de görüldüğü üzere ebeğümeci yapraklarından elde edilen protein tozlarının çözünürlüğü pH değerlerine göre değişiklik göstermektedir. En düşük çözünürlük pH 2,5 ve 3,5 değerlerinde görülürken en yüksek çözünürlük ise pH 5,5, 6,5 ve 7,5 değerlerinde %100 gibi yüksek bir oranda olduğu görülmektedir. Protein çözünürlüğü, protein izolatu ve tozlarının emülsiyon, jelleşme ve köpürme gibi fonksiyonel özelliklere etki etmekle birlikte proteinlerin gıda uygulamalarından kullanılabilmesinde en önemli kriterlerdendir (Aider and Barbana, 2011). Bu kapsamda, ebeğümeci yaprağından elde edilen protein tozlarının protein çözünürlüğünün yüksek olması, gıda uygulamalarında kullanımını olumlu etkileyecektir.

4.3.4 Renk Analizi

Ebeğümeci yapraklarından enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle elde edilen protein toz örneklerinin CIELAB (L*, a* ve b) değerleri karşılaştırma yapmak amacıyla literatürde verilen ticari soya protein konsantresi ile birlikte Çizelge 4.6' de verilmiştir.

Çizelge 4.6 Enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle ebegümece yaprağından elde edilen protein tozu ve soya protein konsantresinin renk değerleri

	L*	a*	b*
Ebegümece yaprağı protein protein tozu	66,82± 0,01	0,41±0,01	15,22±0,04
Soya protein konsantresi (Toews and Wang, 2013)	88,40	1,10	14,56

Elde edilen protein tozu örneklerinin L* değeri 66,82± 0,01, a* değeri 0,41±0,01, b değeri ise 15,22±0,04 olarak belirlenmiştir. Literatürde verilen bilgiye göre, L* değeri koyuluk-parlaklık, a* değeri kırmızılık (+a*) yeşillik (-a*) ve b* değeri ise mavilik (-b*) sarılık (+b*) şeklinde ifade edilmektedir (Hunter, 1975). Bu kapsamda, ticari olarak satılan soya protein konsantresinin renk değerleriyle karşılaştırıldığında elde edilen protein tozlarının daha koyu olduğu görülmektedir. Bunun nedeni ebegümece yaprağının soya fasulyesine göre çok daha yüksek oranda fenolik madde içermesi ile açıklanabilir (Sari et al., 2013; Gasparetto et al., 2012). Fenolik bileşikler alkali ortamda okside olurlar ve okside olmuş fenolik bileşikler proteinlerle etkileşime girerek koyu rengin oluşmasına neden olurlar. Bu durum sağlanan ekstraksiyon koşulları dışında ebegümece yaprağında bulunan ve fenolik maddelerin oksidasyonunu katalizleyen tirozin amino asidinden de kaynaklanabilceği düşünülmektedir (Pavlista et al., 1997). Ayrıca, elde edilen protein tozlarının ticari soya protein konsantrelerine göre daha düşük oranda kırmızılık (a*) ve daha yüksek oranda sarılık (b*) içerdiği görülmektedir. Literatür incelendiğinde protein tozlarının renk özelliklerinin ham maddeye ait renk pigmentlerine (Toews and Wang, 2013), kurutma (Joshi et al., 2011), ve protein elde edilme yöntemine (Salgado et al., 2011) göre farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, ebegümece yaprağından elde edilen protein tozlarının renk değerlerinin uygun olduğu görülmektedir.

4.3.5 Yığın Yoğunluğu, Sıkıştırılmış Yığın Yoğunluğu ve Carr Endeksinin Belirlenmesi

Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozlarının yığın yoğunluğu, sıkıştırılmış yığın yoğunluğu ve Carr endeksi değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle ebegümece yaprağından elde edilen protein tozunun yığın yoğunluğu, sıkıştırılmış yığın yoğunluğu ve Carr Endeksi değerleri

Yığın Yoğunluğu (kg/m³)	175,96± 2,97
Sıkıştırılmış Yığın Yoğunluğu (kg/m³)	253,14 ± 3,61
Carr Endeksi (%)	43,88±2,08

Toz ürünlerin yığın ve sıkıştırılmış yığın yoğunluğu bu ürünlerin ambalajlanması, depolanması ve taşınması açısından önemli özelliklerdir (Dirim ve ark., 2015). Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozunun yığın yoğunluğu 175,96± 2,97 kg/m³, sıkıştırılmış yığın yoğunluğu ise 253,14 ± 3,61 kg/m³ olarak belirlenmiştir. Literatür incelendiğinde yaprak protein tozlarının yığın özellikleri hakkında çalışmalara rastlanılmamıştır. Fakat, ticari olarak en çok üretilen soya protein izolatlarının yığın yoğunluğunun 386 kg/m³ olduğu belirtilmiştir (Dench et al., 1981). Ebegümece yapraklarından elde edilen protein tozunun yığın yoğunluğunun ticari soya protein konsantresinin yığın yoğunluğundan düşük olduğu görülmektedir. Genel olarak düşük yığın yoğunluğu ambalajlama işleminde paket hacmini arttıracığından istenmemektedir (İşleroğlu ve ark., 2018). Bununla birlikte, literatürde toz ürünlerin yığın özelliklerine ürünün nem içeriğinin (Dirim ve ark., 2015), kurutma yönteminin (Caparino et al., 2012; Timilsena et al., 2016), partikül boyutunun ve ürünün kimyasal özelliklerinin (İşleroğlu ve ark., 2018) etki ettiği belirtilmektedir. Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozunun yığın ve sıkıştırılmış yığın yoğunluğunun düşük olması ise partikül boyutunun büyük olması, içerdiği musilaj yapısından kaynaklanan yapışkan yapı ve dondurularak kurutulmuş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Toz ürünlerin akabilirliğinin göstergesi olan Carr Endeksi, toz ürünlerin yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yığın yoğunluğu değerleri kullanılarak hesaplanmaktadır. Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozlarının Carr Endeksi $43,88 \pm 2,08$ (%35-45) olarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.1’de verilen tabloya göre elde edilen protein tozun akabilirlik özelliğinin kötü olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde akabilirlik özelliğinin toz ürünlerin depolama, paketlenme, karıştırma, ölçme ve taşıma gibi özellikleri için önemli olduğu belirtilmektedir (Çalışkan ve Dirim, 2016). Bu sonucun nedeninin, ebegümece yaprağından elde edilen protein konsantresinin içerdiği müsilağın yapışkan yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.3.6 Partikül Yoğunluğu, Islanabilirlik ve Dağılıbilirlik Özelliklerinin Belirlenmesi

Ebegümece yaprağından elde edilen protein konsantrelerin partikül yoğunluğu, ıslanabilirlik ve dağılıbilirlik özellikleri Çizelge 4.5’ de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Enzim destekli izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle ebegümece yaprağından elde edilen protein tozunun partikül yoğunluğu, ıslanabilirlik ve dağılıbilirlik değerleri

Partikül Yoğunluğu (kg/m³)	302,28± 5,22
Islanabilirlik (s)-0,1 g toz	54,67±4,11
Dağılıbilirlik (%)	66,76± 2,30

Partikül yoğunluğu, partikülün iç kısmındaki gözenekler de dikkate alınarak hesaplanan yoğunluktur. Partikül boyutu ve şekline bağlı olan partikül yoğunluğu, toz ürünlerin rekonstitüsyon özelliklerini doğrudan etkilemektedir (İşleroğlu ve ark., 2018). Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozlarının partikül yoğunluğu $302,28 \pm 5,22$ kg/m³ olarak hesaplanmıştır. Literatürde yığın ve sıkıştırılmış yığın yoğunluk değerlerinde olduğu gibi yaprak proteinlerinin partikül yoğunluk değerleriyle ilgili verilere rastlanılmamıştır. Fakat, süt ve peynir altı suyu protein konsantrelerin partikül yoğunluğunun sırasıyla 800 kg/m³ ve 1205 kg/m³ olduğu belirtilmiştir (Crowley et al., 2014; Schuck, 2013). Dolayısıyla ebegümece

yaprağından elde edilen protein tozlarının partikül yoğunluğu değerlerinin literatürde gösterilen protein izolatlarıyla karşılaştırıldığında, düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

Islanabilirlik, toz ürünün sıvıyı emebilme ölçüsüdür (İşleroğlu ve ark., 2018). Ebegümece yaprağından elde edilen 0,1 g protein tozlarının ıslanma süresi $54,67 \pm 4,11$ saniye olarak ölçülmüştür. Literatürde iyi bir ıslanma süresinin 10 gram toz ürün için 120 saniyenin altında olması gerektiği belirtilmektedir (Shuck et al., 2012). Bu kapsamda değerlendirildiğinde, ebegümece yapraklarından elde edilen protein tozlarının ıslanabilirlik özelliğinin iyi olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumun nedenin yüksek oranda içerdiği protein olduğu düşünülmektedir (Shuck et al., 2012).

Dağılılırlik, toz ürünlerin su içerisinde düşük bir karıştırma uygulanmasıyla dağılılırme yeteneğinin bir göstergesidir (Kim et al., 2002). Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozlarının dağılılırliğı $\%66,76 \pm 2,30$ olarak hesaplanmıştır. Literatürde toz ürünün iyi bir dağılılırlik gösterebilmesi için dağılılırlik indeksi olan $\%95$ 'ten büyük olması gerektiği belirtilmektedir (Schuck et al., 2012). Bu doğrultuda, ebegümece yaprağından elde edilen protein tozları düşük dağılılırlik yeteneği göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında, elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

1. Günümüzde artan nüfusla birlikte, protein ihtiyacının karşılanması zorlaşmakta ve alternatif protein kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda hammadde olarak seçilen “Büyük ebegümece” (*Malva sylvestris*) yapraklarının protein içeriği kuru madde bazında %40 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, ebegümece yaprağının soya fasulyesi ve diğer baklagillerde olduğu gibi alerjen maddeleri içermemesi ve birçok yerde yetişebilmesi açısından bitkisel protein tozu üretiminde iyi bir ham madde olabileceği düşünülmektedir.

2. Bitkisel proteinlerin eldesinde hammadde kaynağına bağlı olarak değişmekle birlikte, izoelektrik, amonyum sülfat ve izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme olmak üzere üç farklı yöntem kullanılmaktadır. Bitkisel proteinler, farklı çözgen çeşitlerinde gösterdiği çözünürlük özelliklerine göre dört grupta ayrılmaktadır. Bunlar; albümin (suda çözünür), globülin (tuz çözeltisinde çözünür), prolamin (alkolde çözünür) ve glutelindir (su, etanol ve alkolde çözünür olmayan). Yüksek oranda protein verimi için ham madde içinde bulunan bu proteinlerin dağılımına göre en uygun protein çöktürme yönteminin belirlenmesi gerekmektedir. Bu kapsamda, ebegümece yapraklarından en yüksek protein çöktürme işlemi izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile sağlanarak ebegümece yapraklarında bulunan proteinin %26,53±0,81'i elde edilebilmiştir.

3. İzoelektrik/ amonyum sülfat çöktürme yönteminde protein verimini arttırmak amacıyla ekstraksiyon işlemi uygulanan sıcaklık (60, 70 ve 80 °C) ve süre (60 ve 120 dk.) değerlerinin ekstraksiyon verimine etkisi belirlenerek en yüksek verim alınan parametreler belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek protein verimine %41,08±0,20 ile 80 °C ve 60 dk.'lık ekstraksiyon koşullarında ulaşılmıştır. Ayrıca, farklı sıcaklık ve sürelerde gerçekleşen ekstraksiyon sonucunda sıcaklığın arttıkça protein veriminin arttığı buna karşılık ekstraksiyon süresinin (60 ve 120 dk.) etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$).

4. Protein verimini arttırmak ve ebegümece yaprağında klorofile bağlı bulunan proteinleri elde edebilmek amacı ile ön işlem olarak enzimatik ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Enzim destekli ekstraksiyon uygulaması için ticari bir enzim olan Pectinex Ultra SP-L kullanılmış ve protein veriminin %47,33±2,12'e artışı sağlanmıştır. Elde edilen sıvı protein çözeltisi dondurarak kurutma işlemi ile kurutularak protein toz forma dönüştürülmüştür.

5. Elde edilen tozun protein içeriği kuru madde bazında %81,74±1,74 bulunmuştur. Literatürde verilen bilgiye göre %65 ve üzeri protein içeren toz formda bulunan proteinler protein konsantresi olarak adlandırılmaktadırlar. Bu durumda elde edilen protein tozları protein konsantresi olarak ifade edilebilmektedirler. Ebegümece yaprağından elde edilen protein tozlarının kalite özelliklerinin belirlemek amacıyla fiziksel ve kimyasal analizler yapılmıştır. Protein tozlarının ürün kalitesi açısından olumlu özelliklerinin düşük su aktivesine sahip olması, elzem amino asitlerini içermesi, protein çözünürlüğünün yüksek olması ve renk değerlerinin uygun olmasıdır. Bunun karşılık, partikül yoğunluğunun, akabilirliğinin, yığın ve sıkıştırılmış yığın yoğunluğunun ve dağılılabirliğinin diğer ticari olarak üretilen protein tozları ile karşılaştırıldığında düşük olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ebegümece yaprağından protein tozu üretimi izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile gerçekleştirilmiş, en yüksek verimin elde edildiği ekstraksiyon sıcaklık (80 °C) ve süre (60 dk) değerleri belirlenmiştir. Bununla birlikte, enzimatik ön işlem ile protein veriminde %13,29 artış sağlanmıştır.

Yapılan çalışmada karşılaşılan en büyük zorluk ham maddede yüksek oranda bulunan müsilaştır. Ulaşılan verimden daha yüksek verimde protein eldesi için ebegümece yaprağında bulunan ve protein ekstraksiyonunu olumsuz etkileyen müsilaç yapısının uzaklaştırılması konusunda yapılacak gelecekteki çalışmaların bu çalışmanın daha da iyileştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Buna ek olarak, müsilaç yapısının daha iyi parçalanabilmesi ve dolayısıyla protein veriminin arttırılabilmesi için farklı enzimlerle ekstraksiyon koşullarının optimizasyonunun sağlanabilceği düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen protein tozlarının duyuşsal ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilebilir. Ebegümece protein tozlarının farklı gıda ürünlerine eklenmesi

ile ürün geliştirme çalışmaları sağlanabilir. Bu tez çalışması sonucunda, daha önce literatürde protein kaynağı olarak çalışılmayan *Malva sylvestris* (Büyük ebegümece) hammadde olarak kullanılmış ve soya ve diğer ticari protein konsantrelerine alternatif yeni bitkisel protein tozu üretimi gerçekleştirilmiştir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adetuyi, F. O., Akintimehin, E. S., Karigidi, K. O., Okonji, R. E., & Adeniyi, D. A.,** 2018, Partial purification and characterisation of cellulase from sugarcane as affected by postharvest storage of sugarcane (*Saccharum officinarum* L) stem. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 41(1), 379-391.
- Aider, M., & Barbana, C.,** 2011, Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity—a practical and critical review. *Trends in food science & technology*, 22(1), 21-39.
- Aiking, H.,** 2011. Future protein supply. *Trends in Food Science & Technology*, 22: 112-120.
- Alajaji, S. A., & El-Adawy, T. A.,** 2006, Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(8), 806–812.
- Aletor, O. L. U. W. A. T. O. Y. I. N., Oshodi, A. A., & Ipinmoroti, K.,** 2002, Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates. *Food chemistry*, 78(1), 63-68.
- Alsohaimy, S. A., Sitohy, M. Z., & El-Masry, R. A.,** 2007, Isolation and partial characterization of chickpea, lupine and lentil seed proteins. *World J. Agric. Sci*, 3(1), 123-129.
- AOAC,** 1990, Official Methods of Analysis of The AOAC, Volume 2 (No. Ed. 15), Association of Official Analytical Chemists Inc.
- Arslan, N.,** 1994, Pektinin Fizikokimyasal Özellikleri, Üretimi ve Gıdalarda Kullanımı. *Gıda Dergisi*, 19(3).
- Asgar, M. A., Fazilah, A., Huda, N., Bhat, R., Karim, A. A.,** 2010, Nonmeat protein alternatives as meat extenders and meat analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 513-529.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Babbar, N., Roy, S. V., Wijnants, M., Dejonghe, W., Caligiani, A., Sforza, S., & Elst, K.**, 2015, Effect of extraction conditions on the saccharide (neutral and acidic) composition of the crude pectic extract from various agro-industrial residues. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(1), 268-276.
- Bals, B. D., Dale, B. E. and Balan, V.**, 2012, Recovery of Leaf Protein for Animal Feed and High-Value Uses. *Biorefinery Co-Products: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing*, 179-197.
- Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C.**, 2010, Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1466-1472.
- Beran, M., Drahorad, J., Vltavsky, O., Urban, M., & Laknerova, I.**, 2018, Pilot-Scale Production and Application of Microparticulated Plant Proteins. *J Nutr Food Sci*, 8(655), 2.
- Berg, J.M., Stryer, L., Tymoczko, J.L. and Gatto, G.J.**, 2015, *Biochemistry*. 8th Edition, WH Freeman, 1120 p.
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H.**, 2010, Comparison of the functional properties of pea , chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537–546.
- Bradford, M. M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Burgess, R. R.**, 2009, Protein precipitation techniques, *Methods in enzymology*, 463, Academic Press, 331-342.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Caparino, O. A., Tang, J., Nindo, C. I., Sablani, S. S., Powers, J. R., & Fellman, J. K.**, 2012, Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine ‘Carabao’ var.) powder. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 135-148.
- Cemeroğlu, B.**, 2013, Gıda Analizleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara.
- Chalupa-Krebzdak, S., Long, C. J., & Bohrer, B. M.**, 2018, Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. *International Dairy Journal*.
- Chalvon-Demersay, T., Azzout-Marniche, D., Arfsten, J., Egli, L., Gaudichon, C., Karagounis, L. G., & Tomé, D.**, 2017, A Systematic Review of the Effects of Plant Compared with Animal Protein Sources on Features of Metabolic Syndrome–3. *The Journal of nutrition*, 147(3), 281-292.
- Chel-Guerrero, L., Perez-Flores, V., Betancur-Ancona, D., & Davila-Ortiz, G.**, 2002, Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 584-591.
- Chirinos, R., Aquino, M., Pedreschi, R., & Campos, D.**, 2017, Optimized Methodology for Alkaline and Enzyme-Assisted Extraction of Protein from Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) Kernel Cake. *Journal of Food Process Engineering*, 40(2), e12412.
- Classen, B., & Blaschek, W.**, 2002, An arabinogalactan-protein from cell culture of *Malva sylvestris*. *Planta medica*, 68(03), 232-236.
- Crowley, S. V., Gazi, I., Kelly, A. L., Huppertz, T., & O’Mahony, J. A.**, 2014, Influence of protein concentration on the physical characteristics and flow properties of milk protein concentrate powders. *Journal of Food Engineering*, 135, 31-38.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cui, Q., Ni, X., Zeng, L., Tu, Z., Li, J., Sun, K., Chen, X. and Li, X.,** 2017, Optimization of Protein Extraction and Decoloration Conditions for Tea Residues, *Horticultural Plant Journal*, 3(4), 172–176.
- De Jong, A. and Nieuwland, M.,** 2011, Literature study on the properties of Rubisco. TNO, Netherlands, 34.
- Dench, J. E., Rivas R, N., & Caygill, J. C.,** 1981, Selected functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) flour and two protein isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(6), 557-564.
- Dev, D. K., & Quensel, E.,** 1988, Preparation and functional properties of linseed protein products containing differing levels of mucilage. *Journal of food science*, 53(6), 1834-1837.
- Dirim, S. N., Çalışkan, G., & Ergün, K.,** 2015, Dondurularak Kurutulmuş Bazı Meyve Tozlarının Toz Ürün Özelliklerinin Belirlenmesi. *Gıda Dergisi*. 40(2), 85-92.
- Dumas, M.,** 1826, Précis des événemens militaires, ou essais historiques sur les campagnes de 1799 à 1814: Campagnes de 1806 et 1807; T. 5. 19, Treuttel et Würtz.
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B.** (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. In *Methods in enzymology*, Academic Press, Vol. 541, 85-94.
- Duranti, M.** (2006) Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77: 67-82.
- Durur, D.** 2018. “Proteinler ve Kimyasal Yapıları”, <https://rasyonalist.org/yazi/proteinler-ve-kimyasal-yapilari/> (Erişim tarihi: 24 Aralık 2018).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Endres, J. G.**, 2001, Soy protein products: characteristics, nutritional aspects, and utilization, 11-57, AOCS Publishing, Indiana, United States of America.
- Fasuyi, A. O.**, 2006, Nutritional potentials of some tropical vegetable leaf meals: chemical characterization and functional properties. *African Journal of Biotechnology*, 5(1), 49-53.
- Feyzi, S., Milani, E., & Golimovahhed, Q. A.**, 2018, Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.) Protein Isolate: The Effect of Extraction Optimization and Drying Methods on the Structure and Functional Properties. *Food Hydrocolloids*, 74, 187-196.
- Firatligil-Durmus, E., & Evranuz, O.**, 2010, Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). *LWT-Food Science and Technology*, 43(2), 226-231.
- Gaci, O. and Balev, S.**, 2008, Proteins: From Structural Classification to Amino Acid Interaction Networks. In *The 2008 International Conference on Bioinformatics & Computational Biology.*, 2 (1), 728-734.
- Gasparetto, J. C., Martins, C. A. F., Hayashi, S. S., Otuky, M. F., & Pontarolo, R.**, 2012, Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(2), 172-189.
- Ghaly, A. E., & Alkoaik, F. N.**, 2010, Extraction of protein from common plant leaves for use as human food. *American Journal of Applied Sciences*, 7(3), 331.
- Ghodsvali, A., Khodaparast, M. H., Vosoughi, M., & Diosady, L. L.**, 2005, Preparation of canola protein materials using membrane technology and evaluation of meals functional properties. *Food Research International*, 38(2), 223-231.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gonzalez-Perez, S.**, 2003, Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins, Ph.D. thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Guarrera, P. M.**, 2005, Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia*, 76(1), 1-25.
- Hadnadev, M., Dapčević-Hadnadev, T., Lazaridou, A., Moschakis, T., Michaelidou, A. M., Popović, S., & Biliaderis, C. G.**, 2018, Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. Physicochemical properties. *Food Hydrocolloids*, 79, 526-533.
- Hames, D. And Hooper, N.**, 2006, Biochemistry, Taylor & Francis Group, United Kingdom, 29-75.
- Hanmoungjai, P., Pyle, D. L., & Niranjana, K.**, 2002, Enzyme-assisted water-extraction of oil and protein from rice bran. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 77(7), 771-776.
- Henry, A. G., & Piperno, D. R.**, 2008, Using plant microfossils from dental calculus to recover human diet: a case study from Tell al-Raḡā'i, Syria. *Journal of Archaeological Science*, 35(7), 1943-1950.
- Hiçsönmez, Ü., Ereeş, F. S., Özdemir, C., Özdemir, A. And Cam, S.**, 2009, Determination of major and minor elements in the *Malva sylvestris* L. from Turkey using ICP-OES techniques. *Biological trace element research*, 128(3), 248-257
- Hughes, G. J., Ryan, D. J., Mukherjea, R. and Schasteen, C. S.**, 2011, Protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) for soy protein isolates and concentrate: Criteria for evaluation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(23), 12707-12712.
- Hunter, R.**, 1975, The Measurement of Appearance, John Wiley & Sons, New York.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ibañez, M. C., and Ferrero, C.**, 2003, Extraction and characterization of the hydrocolloid from *Prosopis flexuosa* DC seeds. *Food Research International*, 36(5), 455-460.
- Ito, Y.**, 2000, Centrifugal precipitation chromatography: principle, apparatus, and optimization of key parameters for protein fractionation by ammonium sulfate precipitation. *Analytical biochemistry*, 277(1), 143-153.
- İşleroğlu, H., Koç, B., ve Türker, İ.**, 2018, Püskürtmeli-Dondurarak Kurutma İşleminin Maltodekstrinin Fiziksel Özellikleri Üzerine Etkisi. *GIDA*, 43(2), 197-210.
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han, J. and Chen, L.**, 2014, Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 461-469.
- Jideani, V. A., and Bello, B. M.**, 2009, Functional properties of okra protein products containing different levels of mucilage. *Journal of food, agriculture & environment*, 7(2), 252-255.
- Jinapong, N., Suphantharika, M. and Jannong, P.**, 2008, Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration, *Journal of Food Engineering*, 84(2), 194–205.
- Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., and Kasapis, S.**, 2011, Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods. *Food Chemistry*, 129(4), 1513-1522.
- Karawya, M. S., Balbaa, S. I., and Afifi, M. S. A.**, 1971, Investigation of the carbohydrate contents of certain mucilaginous plants. *Planta medica*, 20(03), 14-23.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaur, P., Singh, S. K., Garg, V., Gulati, M. and Vaidya, Y.,** 2015, Optimization of spray drying process for formulation of solid dispersion containing polypeptide-k powder through quality by design approach, *Powder Technology*, 284, 1–11.
- Kaushik, P., Dowling, K., McKnight, S., Barrow, C. J., Wang, B., Adhikari, B.,** 2016, Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate. *Food chemistry*, 197: 212-220.
- Keskin F., Cihanalp C., Külcü R., Yilmaz D.,** 2015, "Ebegümece Bitkisinin Bazı Fiziko Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi", 29. Ulusal Tarımsal Mekanizasyon ve Enerji Kongresi, DİYARBAKIR, TÜRKİYE, ss.403-407
- Kim, E. H. J., Chen, X. D. and Pearce, D.,** 2002, Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 26(3), 197-212.
- Kjeldahl, C.,** 1883, A new method for the determination of nitrogen in organic matter, *Anal Chem*, 22, 366.
- Koksal, E., Bursal, E., Aggul, A. G., and Gulcin, I.,** 2012, Purification and characterization of peroxidase from sweet gourd (*Cucurbita moschata* Lam. Poirét). *International Journal of Food Properties*, 15(5), 1110–1119.
- Kristensen, M. D., Bendsen, N. T., Christensen, S. M., Astrup, A. and Raben, A.,** 2016, Meals based on vegetable protein sources (beans and peas) are more satiating than meals based on animal protein sources (veal and pork)—a randomized cross-over meal test study. *Food & nutrition research*, 60(1), 32634.
- Kumar, P. and Sharma, S. M.,** 2015, An overview of purification methods for proteins, *International Journal of Applied Research*, 1(12), 450-459.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, R., Choudhary, V., Mishra, S., Varma, I. K. and Mattiason, B.,** 2002, Adhesives and plastics based on soy protein products. *Industrial Crops and Products*, 16(3), 155–172.
- Lamsal, B. P., Koegel, R. G., Gunasekaran, S.,** 2007, Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 1520-1526.
- Latif, S. and Anwar, F.,** 2011, Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction. *Food chemistry*, 125(2), 679-684.
- Li, Z., Scott, K., Hemar, Y., Zhang, H. and Otter, D.,** 2018, Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit. *Food chemistry*, 256, 228-234.
- Litwack, G. ,** 2018, Proteins. *Human Biochemistry*, 63-94.
- Liu, J., Guan, X., Zhu, D. and 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.
- López, D. N., Ingrassia, R., Busti, P., Wagner, J., Boeris, V. and Spelzini, D.** (2018). Effects of extraction pH of chia protein isolates on functional properties. *LWT - Food Science and Technology*, 97, 523-529.
- Ma, T., Wang, Q. and Wu, H.,** 2010, Optimization of extraction conditions for improving solubility of peanut protein concentrates by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1450-1455.
- Mariotti, F.,** 2017, In *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention*, 621-642, Academic Press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McCue, J. T.**, 2014, Use and application of hydrophobic interaction chromatography for protein purification. In *Methods in enzymology*, Academic Press, 541,51-65,
- Mechmeche, M., Kachouri, F., Chouabi, M., Ksontini, H., Setti, K. and Hamdi, M.**, 2017, Optimization of Extraction Parameters of Protein Isolate from Tomato Seed Using Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*, 10(3), 809–819.
- Mokni, A., Ben, A., Maklouf, I., Lahiani, M., Bejar, M., Triki, M., ... Besbes, S.**, 2018, Toward the enhancement of sensory profile of sausage “ Merguez ” with chickpea protein concentrate. *Meat Science*, 143(April), 74–80.
- Mudgett, R. E., Rufner, R., Bajracharya, R., Kim, K. and Rajagopalan, K.**, 1978, Enzymatic effects on cell rupture in plant protein recovery. *Journal of Food Biochemistry*, 2(2), 185-207.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D. and Astiasarán, I.**, 2004, New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 15(9), 452-457.
- Murphy, P. A.**, 2008, Soybeans- Chemistry, production, processing and utilization, Urbana: AOCS Press, 229–267.
- Nadar, S. S., Rao, P. and Rathod, V. K.**, 2018, Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108(February), 309–330.
- Nahar, M. K., Zakaria, Z. and Hashim, U.**, 2013, Effect of Buffer and pH on the Protein Extraction for Chicken Meat. In *Advanced Materials Research*, Trans Tech Publications, 795, 206-210.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Negi, P., Chand, S., Thakur, N. and Nath, A. K.**, 2018, Biological Activity of Serine Protease Inhibitor Isolated from the Seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Agricultural Research*, 7(3), 265-270.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L. and Cox, M. M.**, 2005, Lehninger Biyokimyannın İlkeleri, (Çev. N. Kılıç), Palme Yayıncılık, Ankara, 115-138.
- Nielsen, L. V., Kristensen, M. D., Klingenberg, L., Ritz, C., Belza, A., Astrup, A., & Raben, A.**, 2018, Protein from Meat or Vegetable Sources in Meals Matched for Fiber Content has Similar Effects on Subjective Appetite Sensations and Energy Intake—A Randomized Acute Cross-Over Meal Test Study. *Nutrients*, 10(1), 96.
- Nilüfer, D., Boyacıoğlu, D.**, 2006, Soya Esaslı Ürünlerde Protein Denatürasyonunun İki Farklı Yöntem ile İncelenmesi, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, Türkiye, 895–898.
- Nitsawang, S., Hatti-Kaul, R. and Kanasawud, P.**, 2006, Purification of papain from *Carica papaya* latex: aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial technology*, 39(5), 1103-1107.
- Novák, P. and Havlicek, V.**, 2016, Protein Extraction and Precipitation, Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition), 51-62.
- Oomah, B. D., Mazza, G. and Cui, W.**, 1994, Optimization of protein extraction from flaxseed meal. *Food Research International*, 27(4), 355–361.
- Oreopoulou, V. and Tzia, C.**, 2007, Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants. In Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry, Springer, Boston, MA., 209-232.
- Özkan, G. and Ersus Bilek, S.**, 2015, Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach, *Food Chemistry*, 176, 152–157.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Panadare, D. and Rathod, V. K.**, 2018, Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 431-437.
- Paufique JJ.** Method for extracting a active principle based on *Malva sylvestris*, the active principle obtained and cosmetic treatment using it. Patent Application: FR 2000-11973 20000920.
- Pavlista, A. D. and Ojala, J. C.**, 1997, Potatoes: Chip and French fry processing, *Processing Vegetables, Science and Technology*, Lancaster: Technomic Publishing, Inc, 237-284.
- Pirbalouti, A. G., Yousefi, M., Nazari, H., Karimi, I., and Koochpayeh, A.**, 2009, Evaluation of burn healing properties of *Arnebia euchroma* and *Malva sylvestris*. *Electronic Journal of Biology*, 5(3), 62-6.
- Purwanto, M. G. M.**, 2016, The Role and Efficiency of Ammonium Sulphate Precipitation in Purification Process of Papain Crude Extract. *Procedia Chemistry*, 18, 127-131.
- Ranhotra, G. S., Gelroth, J. A., Glaser, B. K., Lorenz, K. J., & Johnson, D. L.**, 1993, Composition and protein nutritional quality of quinoa. *Cereal chemistry*, 70, 303-303.
- Rannou, C., Queveau, D., Beaumal, V., David-Briand, E., Le Borgne, C., Meynier, A., Anton, M., Prost, C., Schuck, P. and Loisel, C.**, 2015, Effect of spray-drying and storage conditions on the physical and functional properties of standard and n-3 enriched egg yolk powders. *Journal of Food Engineering*, 154, 58–68.
- Razavi, S. M., Zarrini, G., Molavi, G. and Ghasemi, G.**, 2011, Bioactivity of *Malva sylvestris* L., a medicinal plant from Iran. *Iranian journal of basic medical sciences*, 14(6), 574.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Riascos, J. J., Weissinger, A. K., Weissinger, S. M. and Burks, A. W.**, 2009, Hypoallergenic legume crops and food allergy: factors affecting feasibility and risk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 20-27.
- Rodsamran, P. and Sothornvit, R.**, 2018, Physicochemical and functional properties of protein concentrate from by-product of coconut processing. *Food Chemistry*, 241, 364-371.
- Rosenthal, A., Pyle, D. L., Niranjana, K., Gilmour, S. and Trinca, L.**, 2001, Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(6), 499-509.
- Sablani, S. S.**, 2006, Drying of fruits and vegetables: retention of nutritional/functional quality. *Drying technology*, 24(2), 123-135.
- Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P. Y.**, 2013, Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of applied phycology*, 25(2), 523-529.
- Saldamlı, İ. ve Temiz, A.**, 2017, Amino Asitler, Peptitler, Proteinler. Gıda Kimyası, Saldamlı, İ. (baş ed.), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, Türkiye, s. 227-317
- Salgado, P. R., Molina Ortiz, S. E., Petruccelli, S. and Mauri, A. N.**, 2011, Sunflower protein concentrates and isolates prepared from oil cakes have high water solubility and antioxidant capacity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 351-360.
- Samavati, V. and Manoochehrizade, A.**, 2013, Polysaccharide extraction from *Malva sylvestris* and its anti-oxidant activity. *International journal of biological macromolecules*, 60, 427-436.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sanchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J. and Millan, F.,** 1999, Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): Chemical composition, functional properties and protein characterization, *Food Chemistry*, 64(2), 237-243.
- Sari, Y. W., Bruins, M. E. and Sanders, J. P.,** 2013, Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*, 43, 78-83.
- Sari, Y. W., Mulder, W. J., Sanders, J. P. and Bruins, M. E.,** 2015b, Towards plant protein refinery: review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology journal*, 10(8), 1138-1157.
- Sari, Y. W., Sanders, J. P. M. and Bruins, M. E.,** 2016, Techno-economical evaluation of protein extraction for microalgae biorefinery. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing, 31(1), 012034.
- Sari, Y. W., Syafitri, U., Sanders, J. P. M. and Bruins, M. E.,** 2015a, How biomass composition determines protein extractability. *Industrial Crops & Products*, 70, 125–133.
- Seydim A. C. Ve Çağdaş E.,** 2016, Proteinler Bu Kadar Önemli (Böl. 9), Z.B. Seydim, *Fonksiyonel Beslenme* (s.115-138), İzmir, Sidas Medya.
- Schmidt, I., Renard, D., Rondeau, D., Richomme, P., Popineau, Y., Axelos, M. A. V.,** 2004, Detailed physicochemical characterization of the 2S storage protein from rape (*Brassica napus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 52: 5995-6001.
- Schuck, P.,** 2013, Dairy Protein Powders, *Advances in Dairy Ingredients*, Wiley-Blackwell, USA, 1-29.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schuck, P., Jeantet, R. and Dolivet, A.**, 2012, Determination of rehydration ability, Analytical Methods for Food and Dairy Powders, John Wiley & Sons, Oxford, UK.
- Sharma, P., Nath, A. K., Kumari, R. and Bhardwaj, S. V.**, 2012, Purification, characterization and evaluation of insecticidal activity of trypsin inhibitor from *Albizia lebbek* seeds. *Journal of forestry research*, 23(1), 131-137.
- Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y. and Chen, J.**, 2008, Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry*, 107(2), 929-938.
- Shih, M.-C., Hwang, T. S. and Chou, H. Y.**, 2016, Physicochemical and functional property changes in soy protein isolates stored under high relative humidity and temperature, *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 902–908.
- Simonne, A. H., Simonne, E. H., Eitenmiller, R. R., Mills, H. A., & Cresman III, C. P.**, 1997, Could the Dumas method replace the Kjeldahl digestion for nitrogen and crude protein determinations in foods?, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(1), 39-45.
- Singh, M. B. and Bhalla, P. L.**, 2008, Genetic engineering for removing food allergens from plants. *Trends in plant science*, 13(6), 257-260.
- Stehfest, E., Bouwman, L., Van Vuuren, D. P., Den Elzen, M. G., Eickhout, B. and Kabat, P.**, 2009, Climate benefits of changing diet. *Climatic change*, 95(1-2), 83-102.
- Tabaraki, R., Yosefi, Z. and ASADI, G. H. A.**, 2012, Chemical Composition and Antioxidant Properties of *Malva sylvestris* L. *Journal of Research in Agricultural Science*, 8(1),59 – 68.
- Tenorio, A. T.**, 2017a, Sugar beet leaves for functional ingredients, Doktora tezi, Wageningen University, Wageningen, Netherlands, 199.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tenorio, A. T., Boom, R. M., van der Goot, A. J.**, 2017b, Understanding leaf membrane protein extraction to develop a food-grade process. *Food chemistry*, 217: 234-243.
- Tenorio, A. T., Gieteling, J., De Jong, G. A., Boom, R. M., Van Der Goot, A. J.**, 2016, Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation. *Food chemistry*, 203: 402-408.
- Tenorio, A. T., Schreuders, F. K. G., Zisopoulos, F. K., Boom, R. M., Van der Goot, A. J.**, 2017c, Processing concepts for the use of green leaves as raw materials for the food industry. *Journal of cleaner production*, 164: 736-748.
- Thompson, M., Owen, L., Wilkinson, K., Wood, R. and Damant, A.**, 2002, A comparison of the Kjeldahl and Dumas methods for the determination of protein in foods, using data from a proficiency testing scheme. *Analyst*, 127(12), 1666-1668.
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J. and Adhikari, B.**, 2016, Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food chemistry*, 212, 648-656.
- Tirgar, M., Silcock, P., Carne, A. and Birch, E. J.**, 2017, Effect of extraction method on functional properties of flaxseed protein concentrates. *Food chemistry*, 215, 417-424.
- Toews, R. and Wang, N.**, 2013, Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses. *Food research international*, 52(2), 445-451.
- Tomoda, M., Gonda, R., Shimizu, N. and Yamada, H.**, 1989, Plant Mucilages. XLII.: An Anti-complementary Mucilage from the Leaves of *Malva sylvestris* var. *mauritiana*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 37(11), 3029-3032.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Urribarrí, L., Chacón, D., González, O. and Ferrer, A.,** 2009, Protein extraction and enzymatic hydrolysis of ammonia-treated cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz). *Applied biochemistry and biotechnology*, 153(1-3), 94-102.
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M., Herrero-Martínez, J. and Simó-Alfonso, E. F.,** 2015, Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. *Food chemistry*, 169, 28-33.
- Voudouris, P., Tenorio, A. T., Lesschen, J. P., Kyriakopoulou, K., Sanders, J. P., van der Goot, A. J. and Bruins, M. E.,** 2017, Sustainable protein technology: an evaluation on the STW Protein programme and an outlook for the future (No. 1786). Wageningen Food & Biobased Research.
- Wang, M., Hettiarachchy, N. S., Qi, M., Burks, W. and Siebenmorgen, T.,** 1999, Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 411-416.
- Wang, W., Tai, F. and Chen, S.,** 2008, Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of separation science*, 31(11), 2032-2039.
- Wingfield, P.,** 1998, Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current protocols in protein science*, 13(1), A-3F.
- World Health Organization,** 1985, FAO/WHO/UNU, Energy and Protein Requirements, Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation, Technical Report Series no. 724, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wu, G.,** 2009, Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 37(1), 1-17.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, H., Wang, Q., Ma, T. and Ren, J.**, 2009, Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Research International*, 42(3), 343-348.
- Yeole, N. B., Sandhya, P., Chaudhari, P. S. and Bhujbal, P. S.**, 2010, Evaluation of *Malva sylvestris* and *Pedalium murex* mucilage as suspending agent. *International Journal of PharmTech Research*, 2(1), 385-389.
- Zhang, C., Sanders, J. P. and Bruins, M. E.**, 2014, Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. *Biomass and Bioenergy*, 67, 466-472.
- Zhang, D. Q., Mu, T. H., Sun, H. N., Chen, J. W. and Zhang, M.**, 2017, Comparative study of potato protein concentrates extracted using ammonium sulfate and isoelectric precipitation. *International Journal of Food Properties*, 20(9), 2113-2127.
- Ziolkowska, A.**, 2012, Laws of flaxseed mucilage extraction. *Food hydrocolloids*, 26(1), 197-204.

ÖZGEÇMİŞ

Miray ÇETİNER 17/10/1993 tarihinde Nazilli/AYDIN’da doğmuştur. İlk, orta ve lise eğitimini Lüleburgaz, Afyonkarahisar ve İzmir’de tamamladı. 2011 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitimini tamamladı. 2016 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra 2016 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Meyve-Sebze İşleme ve Mühendisliği Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.

EKLER

Ek 1. Bradford protein tayinine ait Bovine Gamma Globulin standart eğrisi

