



**EGE ÜNİVERSİTESİ**



**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GIDA ENDÜSTRİSİ İÇİN ALTERNATİF BİTKİSEL  
PROTEİN TOZU ÜRETİMİ**

**Ayça AKYÜZ**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Seda ERSUS BİLEK**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi : 26.12.2018**

**Bornova-İZMİR**

**2018**



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**GIDA ENDÜSTRİSİ İÇİN ALTERNATİF BİTKİSEL  
PROTEİN TOZU ÜRETİMİ**

**Ayça AKYÜZ**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Seda ERSUS BİLEK**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 26.12.2018**

**Bornova-İZMİR**

**2018**



Ayça AKYÜZ tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunulan “Gıda Endüstrisi için Alternatif Bitkisel Protein Tozu Üretimi” 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 26.12.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**Jüri Başkanı: Doç. Dr. Seda ERSUS BİLEK**

**Raportör Üye: Dr. Öğr. Üyesi Kemal DEMİRAĞ**

**Üye: Dr. Öğr. Üye. Zeki Hepçimen**

**İmza**

.....  
.....  
.....



## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Gıda Endüstrisi için Alternatif Bitkisel Protein Tozu Üretimi” 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.

26/12/2018

İmzası

Ayça AKYÜZ



**ÖZET****GIDA ENDÜSTRİSİ İÇİN ALTERNATİF BİTKİSEL PROTEİN  
TOZU ÜRETİMİ**

AKYÜZ, Ayça

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Seda ERSUS BİLEK

Aralık 2018, 77 sayfa

Bu tez çalışmasında, şeker pancarı yapraklarından maksimum verimde alternatif bitkisel protein tozu üretimi amaçlanmıştır. Maksimum verimde protein eldesi amacıyla, izoelektrik, amonyum sülfat ve bu iki yöntemin kombinasyonu olan izoelektrik-amonyum sülfat çöktürme yöntemleri uygulanmıştır. Bunun yanı sıra, protein verimini arttırmak amacıyla özütleme işlemindeki etken parametreler optimize edilmiş ve enzimatik ön işlem uygulanmıştır. Bu kapsamda, şeker pancarı yaprağının kuru madde bazında  $24,02 \pm 0,18$  protein içerdiği belirlenmiştir. Protein tozu eldesinde en yüksek verimin izoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi uygulanarak elde edildiği tespit edilmiştir. Ekstraksiyon işleminde etken parametreler olan ekstraksiyon sıcaklığı ( $25-75$  °C), ekstraksiyon süresi (40-120 dk.) ve çözelti:katı oranı (15-45 mL/g) yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmiş ve optimizasyon işlemi sonuçlarına göre  $54,25$  °C sıcaklık, 81,35 dakika ekstraksiyon süresi ve 27,65 mL/g çözelti:katı oranı ekstraksiyon koşullarında protein verimi  $55,15 \pm 2,82$  olarak bulunmuştur. Enzim destekli ekstraksiyon ile ise protein verimi  $43,27$  oranında arttırılarak  $79,01 \pm 0,27$  olarak saptanmıştır.

Elde edilen protein tozlarının kuru madde bazında protein içeriği  $69,08$  (ağ/ağ) olarak saptanmıştır. Protein tozlarının amino asit kompozisyonuna bakıldığında, esansiyel amino asitlerden treonin ( $4,20$ ), valin ( $3,99$ ) ve fenilalaninin ( $3,62$ ) ve esansiyel olmayan amino asitlerden ise serin ( $55,22$ ) ve aspartik asidin ( $7,41$ ) yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. Protein tozlarının protein çözünürlüğü pH 7,5 değerinde  $98,71$  olarak saptanmıştır. Bunun yanı sıra, protein tozlarının kalite özelliklerini belirlemek amacıyla, renk, yağın yoğunluğu,

sıkıştırılmış yığın yoğunluğu, Carr endeksi, partikül yoğunluğu, ıslanabilirlik, dağılılabirlik ve su aktivitesi tayinleri yapılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Protein, bitkisel protein, protein çöktürme yöntemleri, optimizasyon



**ABSTRACT****ALTERNATIVE PLANT PROTEIN POWDER PRODUCTION FOR  
FOOD INDUSTRY**

AKYÜZ, Ayça

MSc in Food Eng.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Seda ERSUS BİLEK

December 2018, 77 pages

In this thesis, it is aimed to produce plant based protein powder in maximum yield from sugar beet leaves. In order to obtain maximum protein yield, isoelectric precipitation, ammonium sulphate precipitation and isoelectric-ammonium sulfate precipitation methods have been applied. In addition, in order to increase protein yield, the effective parameters in the extraction process were optimized and enzymatic pretreatment was applied. In this context, it was determined that sugar beet leaves contained  $24,02 \pm 0,18\%$  protein on dry matter basis. It was determined that the highest yield of protein powder was obtained by applying isoelectric-ammonium sulfate precipitation. The extraction temperature ( $25-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), the extraction time (40-120 min) and the solvent:solid ratio (15-45 mL/g), which are the effective parameters in the extraction process, were optimized by the response surface methodology and according to the results of the optimization, protein yield was found  $55,15 \pm 2,82\%$  at the extraction conditions of  $54,25\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperature, 81,35 minutes extraction time and 27,65 mL/g solvent:solid ratio. Also the optimization process results were  $54,25\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperature, 81,35 minutes extraction time and 27,65 mL/g solvent:solid ratio. Also, with enzyme-assisted extraction protein yield increased by 43,27% was determined as  $79,01 \pm 0,27\%$ .

The protein content of the protein powders was  $69,08 \pm 0,59\%$  (w/w) on a dry matter basis. When the amino acid composition of protein powders is examined, it was detected that the essential amino acids of threonine (4,20%), valine (3,99%) and phenylalanine (3,62%) and non-essential amino acids of serine (55,22%) and aspartic acid (7,41%) were found to have a significant amount. The protein solubility of the protein powders was found to be 98.71% at pH 7.5. In addition,

color, bulk density, tapped bulk density, Carr Index, particle density, wettability, dispersibility and water activity were determined to determine the quality characteristics of protein powders.

**Key words:** Protein, plant protein, protein precipitation methods, optimization



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sũresince bilgi ve tecrũbelerini esirgemeyen ve vermiő olduğu manevi desteklerden dolayı değerli tez danıőmanım sayın Doç. Dr. Seda ERSUS BİLEK'e

Laboratuar çalıőmalarım sũresinde yardımlarını esirgemeyen Gizem ÖZBEK'e, Miray ÇETİNER'e, Pınar MANARGA BİRLİK'e ve Mustafa CEYHAN'a

Son olarak hayatım boyunca verdiğim her kararda beni destekleyen babam Atila AKYÜZ'e, annem Ünzile AKYÜZ'e ve kardeőim Arda AKYÜZ'e çok teőekkũr ederim.



**İÇİNDEKİLER**Sayfa

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 Şeker Pancarı Yaprağının Genel Özellikleri .....	9
2.4 Türkiye’de ve Dünyada Şeker Pancarı Üretimi .....	11
2.5 Protein Eldesinde Kullanılan Yöntemler .....	13
2.5.1 Alkali Ekstraksiyon/İzoelektrik Çöktürme Yöntemi .....	13
2.5.2 Tuz Destekli Ekstraksiyon/Amonyum Sülfat Çöktürme Yöntemi .....	15
2.6 Ekstraksiyon Koşullarının Belirlenmesi .....	16
2.7 Yanıt Yüzey Yöntemi ile Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu .....	17
2.8 Enzimatik Ön İşlemlerin Ekstraksiyon Verimine Etkisi .....	19

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1 Materyal .....	22
3.2 Yöntem .....	22
3.2.1 Protein Eldesinde Kullanılan Yöntemler .....	22
3.2.1.1 İzoelektrik Çöktürme Yöntemi .....	22
3.2.1.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	23
3.2.1.3 İzoelektrik-Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	25
3.2.2 Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu.....	25
3.2.3 Enzim Destekli Ekstraksiyon .....	25
3.2.4 Analiz Yöntemleri.....	27
3.2.4.1 Hammaddeye Yapılan Analizler.....	27
3.2.4.1.1 Toplam Kuru Madde Tayini .....	27
3.2.4.1.2 Toplam Kül Tayini.....	27
3.2.4.1.3 Toplam Protein Miktarı Tayini .....	28
3.2.4.1.4 Amino Asit Kompozisyonu Tayini .....	28
3.2.4.2 Protein Veriminin Belirlenmesi .....	28
3.2.4.3 Protein Tozlarına Yapılan Analizler .....	28
3.2.4.3.1 Protein Çözünürlüğü Tayini.....	29

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3.2.4.3.2 Renk Tayini .....	29
3.2.4.3.3 Yığın Yoğunluğu Analizi .....	29
3.2.4.3.4 Sıkıştırılmış Yığın Yoğunluğu Analizi .....	29
3.2.4.3.5 Carr Endeks Değerinin Belirlenmesi .....	30
3.2.4.3.6 Partikül Yoğunluğu Analizi .....	30
3.2.4.3.7 Islanabilirlik Tayini .....	31
3.2.4.3.8 Dağılılılılık Tayini .....	31
3.2.4.3.9 Su Aktivitesi Tayini .....	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	32
4.1 Şeker Pancarı Yaprağına Ait Analiz Sonuçları .....	32
4.2 Protein Tozu Eldesi .....	35
4.2.1 Protein Eldesi Yönteminin Belirlenmesi .....	35
4.2.2 Ekstraksiyon Parametrelerinin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu .....	36
4.2.2.1 Ekstraksiyon Sıcaklığı, Ekstraksiyon Süresi ve Çözelti:Katı Oranının Protein Verimine Etkisi .....	36
4.2.2.2 Optimizasyon .....	41
4.2.3. Enzim Destekli Ekstraksiyonun Protein Verimine Etkisi .....	41
4.3 Protein Tozlarına Yapılan Analizler .....	42

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
4.3.1 Toplam Kuru Madde, Protein, Toplam Kül ve Su Aktivitesi Tayini.....	42
4.3.2 Protein Tozlarının Amino Asit Kompozisyonu .....	43
4.3.3 Protein Çözünürlüğü .....	45
4.3.4 Renk Tayini.....	45
4.3.5 Yığın Yoğunluğu, Sıkıştırılmış Yığın Yoğunluğu ve Carr Endeksinin Belirlenmesi .....	46
4.3.6 Partikül Yoğunluğu, Islanabilirlik ve Dağılılabirlik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	53
ÖZGEÇMİŞ .....	77
EKLER .....	

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Amino asitlerin genel yapısı .....	4
2.2 Polipeptitlerin ve peptit bağının oluşumu.....	5
2.3 Proteinlerin üç boyutlu yapıları .....	5
2.4 Şeker pancarı .....	9
2.5 Şeker pancarı üreticisi ülkeler .....	11
3.1 Çalışmada kullanılan şeker pancarı yaprakları .....	22
3.2 İzoelektrik çöktürme akım şeması .....	23
3.3 Amonyum sülfat çöktürmesi akım şeması.....	24
3.4 İzoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi akım şeması .....	26
4.1 Sıcaklık, süre ve çözelti:katı oranının protein verimine etkisi .....	40
4.2 pH değerinin protein konsantrasyonunun çözünürlüğü üzerine etkisi .....	45

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Soya fasulyesi, kinoa, buğday ve pirincin amino asit kompozisyonu .....	8
2.2 Şeker pancarının yaprağında bulunan amino asitlerin toplam amino asit içeriğine oranı .....	10
2.3 İl bazında şeker pancarı üretimi .....	12
2.4 Enzim destekli protein ekstraksiyonunda kullanılan ticari enzimler .....	21
3.1 Carr Endeks değerine göre protein tozlarının akabilirliklerinin sınıflandırması.....	30
4.1 Şeker pancarı yaprağının toplam kuru madde, toplam kül ve protein oranları .....	32
4.2 Şeker pancarı yaprağının amino asit kompozisyonu.....	34
4.3 Farklı protein eldesi yöntemleri ile bulunan protein verimleri .....	35
4.4 Optimize edilen ekstraksiyon parametreleri ve seviyeleri .....	37
4.5 Yanıt yüzey yöntemi ile oluşturulan deney tasarımı.....	37
4.6 Ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu için ANOVA tablosu.....	38
4.7 Protein tozlarına ait kuru madde, protein, kül ve su aktivitesi analiz sonuçları .....	42
4.8 Protein tozlarının amino asit kompozisyonu.....	43
4.9 Şeker pancarı yaprağı ve soya protein konsantrelerinin renk değerleri .....	46

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**ÇizelgeSayfa

- 4.10 Şeker pancarı yaprağı protein konsantresinin yığın yoğunluğu, sıkıştırılmış yığın yoğunluğu ve Carr Endeksi sonuçları..... 47
- 4.11 Protein tozlarının partikül yoğunluğu, ıslanabilirlik ve dağılıbilirlik analiz sonuçları..... 48





## 1.GİRİŞ

Proteinler, 20 çeşit amino asidin peptit bağları ile birleşmesinden oluşan, küçük peptitlerden büyük polimerlere kadar değişen binlerce farklı boyutta olabilen hücrelerin her bölümünde bulunan biyolojik makromoleküllerdir (Nelson and Cox, 2005). İnsan vücudu, 20 çeşit amino asidin 12 çeşidini sentezlerken, 8 amino asit çeşidini sentezleyemez ve bu amino asitlerin besin yoluyla vücuda alınması gerekmektedir. Besin yoluyla alınması gereken esansiyel (zorunlu) amino asitlerin varlığı gıdanın besleyici kalitesini belirlemektedir (Saldamlı ve Temiz, 2017). Yeterli miktarda esansiyel amino asit alım miktarı yaş ve cinsiyet gibi faktörlere bağlı olmakla birlikte, erişkin kişilerde günlük 0,75 g/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (WHO, 1985).

Genellikle, protein ihtiyacı et, süt ve balık gibi proteince zengin hayvansal kaynaklı gıdalardan sağlanmaktadır. Ancak, günümüzde artan nüfus ile beraber protein ihtiyacının hayvansal kaynaklardan sağlanması güçleşmektedir. Ayrıca, bireylerin, vegan ve vejetaryen beslenme şekline yönelmesi bitkisel kaynaklı proteinlerin önemini arttırmaktadır.

Yüksek oranda protein içeren baklagiller, en önemli bitkisel protein kaynakları arasında sayılmaktadır. Soya fasulyesi, bitkisel protein kaynakları arasında en fazla üretim ve tüketime sahip olmakla beraber bitkisel protein tozu üretiminde de kullanılmaktadır. Ayrıca, soyaya alternatif olarak bezelye (Johnson and Brekke, 1983), nohut (Paredes-Lopez et al., 1991), acı bakla (Berghout et al., 2014), kolza (Chabanon et al., 2007), pirinç (Shih and Daigle, 2000), mercimek (Boye et al., 2010) ve kenevir (Tang et al., 2006) bitkisel protein kaynağı olarak kullanılabilir. Ancak, bitkisel protein eldesinde en önemli dezavantajlardan birisi hammadde kaynaklı istenmeyen alerjen özellikte maddelerin de ekstrakta geçebilmesidir. Yapılan çalışmalarda, soyada en az 16 adet alerjen protein bulunduğu tespit edilmiştir (L'Hocine and Boye, 2007). Soya proteininin bir diğer istenmeyen özelliği ise yapısında bulunan fitatın demir ile birleşerek suda çözünmeyen birleşikler oluşturarak vücuttaki demir emilimini engelleyici etki göstermesidir (Cook et al., 1981). Bu gibi nedenler, soyaya alternatif yeni bitkisel protein kaynaklarının arayışına neden olmaktadır. Dolayısıyla, son yıllarda alerjen etkisi olmayan yaprak proteinlerinin eldesi ve elde edilen bu proteinlerin

fonksiyonel özellikleri ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmaktadır (Fasuyi and Aletor, 2005; Lamsal et al., 2007; Agbede et al., 2012; Sun et al., 2017).

*Amaranthaceae* (ıspanakgiller) familyasına ait bir bitki olan şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.), kök ve yaprak olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Lukaszewska and Sliwinska, 2007). Şeker pancarı, Konya, Eskişehir, Yozgat ve Ankara gibi İç Anadolu illerinde çiftçiler tarafından gelir getirici tarımsal faaliyet olarak tercih edilmektedir. Bunun sebebi, Türkiye'nin iklim ve toprak özelliklerinin şeker pancarı üretimine uygun olması ve yumru şeklindeki kök kısmının şeker üretiminde kullanılmasıdır. Şeker pancarı yaprağı ise, şeker pancarının bir yan ürünü olup sınırlı olarak hayvan besiciliğinde kullanılmaktadır (Ak ve Uzaticı, 2001). Ancak, yapılan çalışmalar, şeker pancarı yaprağının kuru madde bazında %22,8 ile yüksek oranda protein içerdiğini göstermektedir (Lammens et al., 2012; Merodio and Sabater, 1988). Bunun yanı sıra, protein kalitesini belirleyen esansiyel amino asitlerin (metiyonin, lizin, fenilalanin, treonin, valin, lösin ve izolösin) varlığı ve baklagil proteinlerinin aksine gluten gibi alerjen proteinleri içermemesi, şeker pancarı yaprağının bitkisel protein üretiminde kaynak olabilecek bir hammadde olarak karşımıza çıkmasını sağlamaktadır (Kiskini et al., 2016).

Bitkisel proteinlerin eldesinde izoelektrik ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Burgess, 2009). Her iki yöntemin temeli de çözünürlük esasına dayanmakla birlikte izoelektrik çöktürme yönteminde pH değişimi, amonyum sülfat çöktürmesinde ise iyonik kuvvet değişimi esastır. İzoelektrik ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemlerinin her ikisinde de hammaddeden proteinin özütlenmesi önemli bir aşamadır (Novak and Havlicek, 2016). Bu nedenle, çözünürlüğü etkileyen ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu, yüksek verimde protein eldesi için oldukça önemlidir. Literatür incelendiğinde, çözelti:kati oranı, pH değeri, sıcaklık ve sürenin protein ekstraksiyonunda optimize edilen parametreler olduğu görülmektedir (Lv et al., 2011; Meshkani et al., 2016; Mechmeche et al., 2017).

Yaprak proteinlerinin ekstraksiyonundaki zorluklardan biri kloroplastın içinde yer alan ve klorofil ile kompleks oluşturan membran (tilakoid) proteinlerini elde etmektir (Fiorentini and Galoppini, 1983). Bu proteinlerin eldesi için enzim

destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanmaktadır. Enzim destekli ekstraksiyon yöntemi, geleneksel yöntemlerde uygulanan sert kimyasalların kullanımını sınırlandırmaktadır (Puri et al., 2012). Aynı zamanda, bu yöntemin en önemli avantajı ise hücre çeperlerinin ve hücre zarının parçalanmasını sağlayarak ekstraksiyon verimini arttırmasıdır (De Almeida et al., 2014; Sari et al., 2013; Jiang et al., 2010). Literatürde kullanılması önerilen enzimler sayesinde klorofile bağlı bu proteinler, önemli ölçüde ekstrakte edilebilmektedir (Cheng et al., 2015).

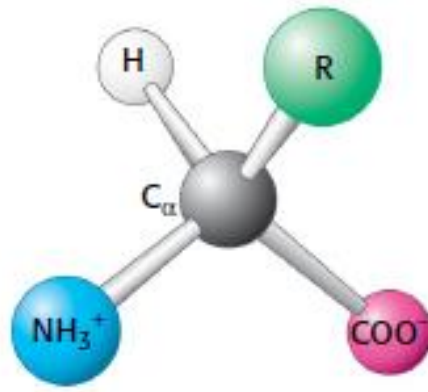
Bu tez çalışması kapsamında, şeker pancarı yapraklarından uygun yöntemlerle maksimum verimde protein özütü eldesi için özütleme işleminde etken parametrelerin optimizasyonu ve optimum koşullarda elde edilen özütten, dondurarak kurutma işlemi ile gıda endüstrisi için alternatif bir bitkisel protein tozu üretimi amaçlanmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, proteinlerin yapısı ve bitkisel proteinlerin genel özellikleri ile protein kaynağı olarak kullanılan şeker pancarı yaprağının özellikleri ve şeker pancarının Türkiye'deki üretimi, protein eldesi yöntemleri, ekstraksiyon işlem koşullarının belirlenmesi, Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu ve enzimatik ön işlemlerin ekstraksiyon verimine etkisi ile ilgili çalışmalara yer verilmiştir.

### 2.1. Proteinler

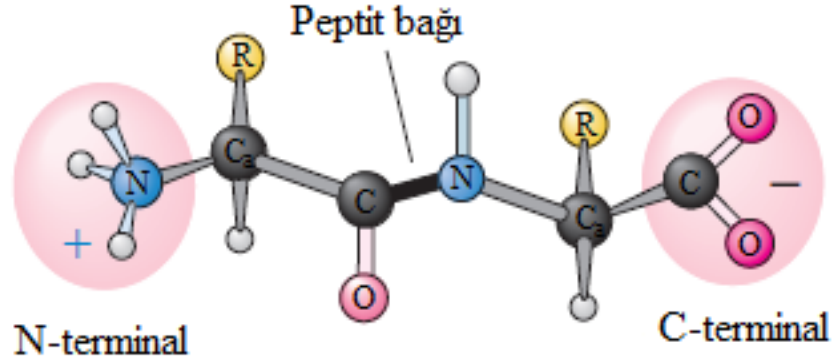
Proteinler, canlılığın temel yapıtaşı olan hücrelerin tüm yaşamsal faaliyetlerinde yer alan karmaşık yapıli moleküllerdir. Büyüme ve gelişme, enzim, hormon ve antikor üretimi, taşıma mekanizması, depolama ve mekanik destek gibi önemli hücresel faaliyetleri yönetmektedirler (Berg et al., 2015). Proteinler, amino asitlerin peptit bağları ile bir araya gelmesiyle meydana gelmekte ve  $\alpha$ -karbon atomuna bağlı karboksil grubu (COOH), amino grubu (NH<sub>2</sub>), hidrojen atomu (H) ve radikal gruptan (R) oluşmaktadır (Fujii et al., 2018). Radikal grup değişken grup olarak da adlandırılır ve 20 çeşit amino asit, farklı radikal/değişken grupların  $\alpha$ -karbon atomuna bağlanması ile meydana gelmektedir. Amino asitlerin, farklı diziliş ve kombinasyonlarda sıralanması ile çeşitli görevde ve işlevde sayısız protein çeşidi ortaya çıkmaktadır (Nelson and Cox, 2005). Amino asitlerin genel yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



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

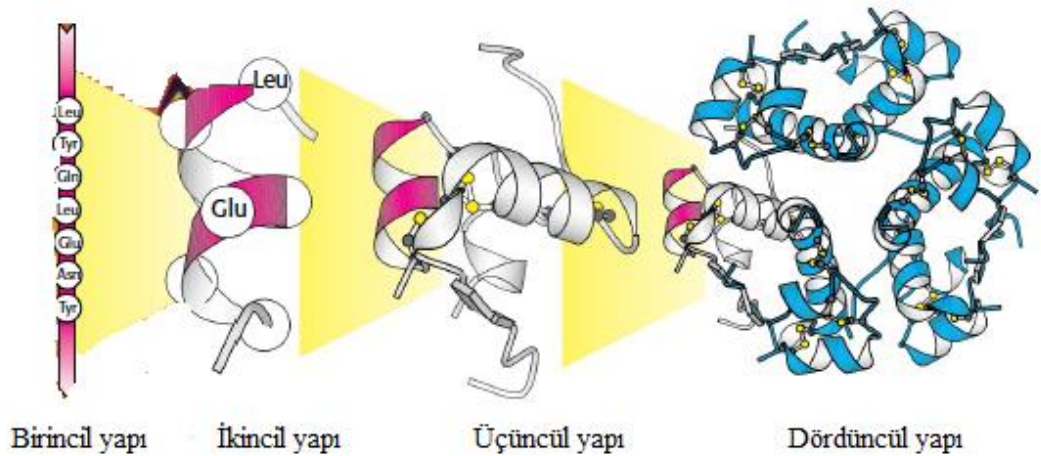
Amino asitlerin  $\alpha$ -karboksil grubu ile diğer aminoasidin  $\alpha$ -amino grubunun peptit bağı ile bağlanması ile peptitler ve bu şekilde birçok amino asidin birleşmesi

ile ise polipeptitler oluşmaktadır. 10.000 daltonun (Da) üstünde moleküler ağırlığa sahip polipeptitler ise protein olarak adlandırılmaktadır (Llano and Sánchez, 2003). Polipeptitlerin ve peptit bağının oluşumu Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Polipeptitlerin ve peptit bağının oluşumu (Campbell and Farrell, 2009).

Proteinlerin birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuarter) olmak üzere 4 çeşit yapısı vardır. Amino asitlerin peptit bağları ile zincir halindeki düz dizilimi birincil, R-grupları dikkate alınmaksızın zincirin uzaydaki yönelimi ikincil, R-grupları da dikkate alınarak zincirin uzaydaki yapısı üçüncül ve birden çok polipeptit zincirinin bir arada bulunmasıyla oluşan yapı ise dördüncül yapıyı ifade etmektedir (Tellingan, 2001). Proteinlerin üç boyutlu yapıları Şekil 2.3’te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Proteinlerin üç boyutlu yapıları (Berg et al., 2015)

Proteinlerin ikincil yapısı sarmal ( $\alpha$ -sarmal) ve düzlemsel tabaka ( $\beta$ -düzlemsel tabaka) şeklinde olmaktadır. Şekil 2.3'te verilen ikincil yapı sarmal şeklinde olup molekül içi hidrojen bağlarının etkileşimi sonucu düz zincirin kıvrılması ile oluşmaktadır. Düzlemsel tabaka konfigürasyonunda ise hidrojen bağları polipeptit zincirinin farklı bölgeleri arasında ya da iki ayrı polipeptit zinciri arasında kurulmaktadır (Nelson and Cox, 2005). Üçüncül yapıyı, hidrojen bağlarının yanı sıra van der waals, iyonik ve disülfid bağları meydana getirmektedir. Dördüncül yapı ise birden fazla polipeptit zincirinin alt birimlerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır (Hames and Hooper, 2005). Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı o proteinin üç boyutlu yapısını dolayısıyla şeklini belirlemektedir. Şekline göre proteinler ise lifsi (fibröz) ve küresel (globular) proteinler olarak sınıflandırılmaktadır (Nadathur et al., 2016). Lifsi proteinler, hayvan hücrelerinde mekanik destek gibi yapısal bir öneme sahiptir. Kemik yapısında yer alan kolajenler, saç ve tırnak yapısında yer alan keratinler, bağ doku ve eklemlerin yapısında bulunan elastinler lifsi proteinlerdir (Wang et al., 2006). Küresel proteinler ise hücrelerdeki sentez ve taşıma gibi hayati metabolik faaliyetleri gerçekleştirmektedir. Kas hücrelerinin yapısındaki miyogloblin, oksijenin taşınmasını sağlayan hemoglobin, enzimler ve hormonlar küresel proteinlere örnektir (Puri, 2018).

Proteinler, hücrelerdeki mekanik destek, taşıma, sentez, hormon üretimi gibi çeşitli önemli metabolik faaliyetleri yönetmektedir. Dolayısıyla, protein eksikliği durumunda bu metabolik faaliyetlerin gerçekleştirilememesi hücre içinde çeşitli sorunlara yol açabilmektedir. Bu nedenle, yeterli miktardaki protein alımı, hücrel faaliyetlerin düzgün gerçekleşmesi bakımından önem taşımaktadır (McGuire and Berman, 2012).

Doğada 20 çeşit amino asit bulunmakta ve insan vücudunun sentezleyemediği 8 çeşidi, esansiyel amino asitler olarak adlandırılmaktadır (Maloy, 2013). Esansiyel amino asitler; metiyonin, triptofan, lizin, fenilalanin, treonin, valin, lösin ve izolösindir. Ayrıca, histidin ve arginin amino asitlerinin ise çocuklar için esansiyel amino asit sınıfında olduğu bilinmektedir (Litwack, 2018). Protein sentezi, beslenme ile alınan amino asitlerden ve vücut içinde metabolizma ile dönüşüme uğrayan diğer amino asitlerden yapılabilmektedir. Bu sebeple,

proteinlerin sentezlenebilmesi için bu amino asitlerin dışarıdan besin yolu ile vücuda alınması gerekmektedir (Nelson and Cox, 2005; Asif et al., 2011).

## 2.2. Bitkisel Proteinler

Gıda proteinleri, hayvansal ve bitkisel kaynaklı proteinler olarak sınıflandırılmaktadır. Hayvansal ve bitkisel proteinlerin amino asit profilleri farklılık göstermektedir ve her ikisinin de kendine göre avantajları bulunmaktadır. Hayvansal kaynaklı proteinlerde, protein içeriğinin yüksek olması ve esansiyel amino asitlere sahip olması bir avantaj iken bitkisel proteinlerin ise antioksidan madde ve lif içeriğinin yapıyı oluşturan maddelerle beraber bulunması bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (Millward, 1999). Bu sebeple, hayvansal ve bitkisel proteinlerin dengeli tüketilmesi sağlık açısından önem arz etmektedir. Ancak, artan vejetaryen ve vegan nüfusu ile hayvanları ve hayvansal kaynakları tüketmeyen ve bitkisel kaynaklı protein kaynaklarına ihtiyaç duyan bireylerin sayısı gittikçe artmaktadır. Vejetaryenlik tanım olarak et, balık ve kümes hayvanlarının tüketilmediği, süt ürünleri ve yumurtanın ise tercihe bağlı olarak tüketildiği, veganlık ise herhangi bir hayvansal kaynağın hiçbir şekilde tüketilmediği beslenme tarzlarıdır (Tunçay, 2016). Artan vejetaryen ve vegan gibi özel tüketici gruplarının ihtiyaç duyduğu protein ürünlerini karşılamak amacıyla soya başta olmak üzere çeşitli bitkisel kaynaklı proteinler ticari olarak satılmaktadır. Soya fasulyesine alternatif bitkisel protein kaynakları arasında patates, pirinç, mısır, nohut, mercimek, fasulye, susam, yerfıstığı, ceviz, fındık ve buğday ürünleri bulunmaktadır (Özdemir vd., 2013).

Soya fasulyesi Doğu Asya'ya özgü, kuru madde bazında yaklaşık %40 oranında protein içeren protein izolatı üretimi için uygun bir baklagil türüdür. Dengeli amino asit kompozisyonu, sağlık açısından antioksidan ve lif gibi faydalı bileşenleri ve üstün fonksiyonel özellikleri soya proteinlerinin tercih edilmesini sağlamaktadır (Nishinari et al., 2014). Çizelge 2.1'de görüldüğü üzere, soya fasulyesi, protein sentezi için gerekli ve beslenme ile alınması gereken tüm esansiyel amino asitleri içermektedir. Ancak, soya proteinlerinin kullanımını sınırlayan olumsuz özellikleri de vardır. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA, 2004) verilerine göre, soya fasulyesinin gıda alerjenlerini içeren 8 besin sınıfından biri olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, soya üretiminde transgenik genlerin

kullanıldığı bilmesi ve insanların genetiği değiştirilmiş (GDO) ürünlere kuşkuyla yaklaşması alternatif bitkisel protein kaynaklarının arayışına neden olmuştur. Alternatif bitkisel protein kaynakları protein içeriklerinin yüksek olması sebebiyle genellikle kinoa (Vega-Gálvez et al., 2010), buğday (Ahmedna et al., 1999) ve pirinç (Kalman, 2014) gibi baklagillerden sağlanmaktadır. Bu bitkisel proteinler, protein içeriği, amino asit kompozisyonu ve fonksiyonel özellikleri bakımından soya proteinleri ile kıyaslanmaktadır. Soya fasulyesinin, kinoa, buğday ve pirincin amino asit kompozisyonları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1** Soya fasulyesi, kinoa, buğday ve pirincin amino asit kompozisyonu (Kumar et al., 2002; Repo-Carrasco, 1992).

<b>Esansiyel Amino Asitler</b>	<b>Soya Fasulyesi (g/16 g N)</b>	<b>Kinoa (g/16 g N)</b>	<b>Buğday (g/16 g N)</b>	<b>Pirinç (g/16 g N)</b>
Metiyonin	1,3	3,1	1,3	3,6
Triptofan	1,3	1,1	1,2	1,1
Lizin	6,4	5,6	2,8	3,2
Fenilalanin	4,5	3,7	4,9	4,8
Treonin	3,9	3,4	2,9	3,2
Valin	4,8	4,2	4,6	5,1
Lösin	7,8	6,1	6,7	7,5
İzolösin	4,5	3,4	4,3	3,5
<b>Esansiyel Olmayan Amino Asitler</b>				
Arginin	7,2	8,1	4,8	6,3
Histidin	2,5	2,7	2,0	2,2
Sistein	1,3	1,7	2,2	2,5
Tirozin	3,1	2,5	3,7	2,6
Alanin	4,3	4,1	3,5	5,2
Aspartik asit	11,7	7,8	4,7	8,0
Glutamik asit	18,7	13,2	31,3	16,9
Glisin	4,1	5,0	6,1	4,1
Prolin	5,5	3,4	10,4	4,0
Serin	5,1	3,9	4,6	4,5

Soyaya alternatif kinoa, buğday ve pirinç proteinlerinin tüm esansiyel amino asitleri (özellikle yüksek oranda lösin) ve bunun yanı sıra yüksek oranda esansiyel olmayan amino asitleri de içerdiği görülmektedir (Çizelge 2.1). Vegan ve vejetaryenlere özgü üretilen protein takviyelerinin üretiminde soya, kinoa, buğday ve pirincin yanı sıra bezelye (Shand et al., 2007), nohut (Sanchez-Vioque et al., 1999), mercimek (Boye et al., 2010) ve kenevir (Tang et al., 2006) gibi bitkisel kaynakların kullanımı da araştırılmaktadır.

Proteinlerin kalitesi esansiyel amino asitlerin varlığı ile belirlense de esansiyel olmayan amino asitler büyüme, gelişme ve üremeye katkıda bulunmakta ve bu nedenle, besin yoluyla vücuda alınması gerekmektedir (Hou et al., 2015). Baklagil proteinleri, bu açıdan avantaj sahibi olsa da içerisinde alerjenik etki gösteren gluten gibi proteinler de bulundurması kullanımlarını sınırlandırmaktadır (Pietzak, 2012). Bu nedenle, alerjik etki göstermeyen alternatif protein tozlarının eldesine ihtiyaç bulunmaktadır.

### 2.3. Şeker Pancarı Yaprağının Genel Özellikleri

Şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.), *Amaranthaceae* (ıspanakgiller) familyasına ait bir bitkidir. 2 yıllık olan bu bitki ilk yılında vejetatif organlarını ikinci yıl generatif kısmını geliştirir. Şeker pancarının etli kökü işlenerek şeker üretiminde kullanılmaktadır (Biancardi et al, 2010). Şeker pancarlarının ekimi İç Anadolu ve geçit bölgelerde Mart sonu ile Nisan ortası arasında yapılmaktadır. 180-185 günde hasat edilecek olgunluğa gelen şeker pancarları Ekim ayında hasat edilmektedir (Tuğrul ve ark., 2010). Şeker pancarı bitkisi Şekil 2.4'te görülmektedir.



Şekil 2.4 Şeker pancarı (FAO, 2009).

Beyaz şeker (çay şekeri), şeker pancarının ana ürünü olup, yan ürünler ve bu yan ürünlerin değerlendirilmesiyle de melas, sulu küspe, melaslı kuru küspe ve etil alkol ortaya çıkmaktadır (Yücer ve ark., 2006). Bu ürünler şeker pancarı bitkisinin kökünden elde edilmektedir. Yaprakların ise sınırlı olarak hayvan besiciliğinde kullanıldığı görülmektedir. Yaprakların kuru maddesinin %75-80'ni polisakkaritlerden oluşmaktadır. Geriye kalan kısmı ise hemiselüloz ve selüloz birleşimi olan lignoselülozlardır ve vücut tarafından sindirilemediği için insan beslenmesinde enerji verici olarak rol almamakla birlikte beslenme açısından farklı faydalar sağlamaktadır (Patelski et al., 2015). Şeker pancarı yaprağının kuru madde içeriğinin ikinci ana kütlesi olan protein ise, insan sağlığı ve beslenme açısından oldukça önemli bir bileşendir. Yaş halde bulunan şeker pancarı yapraklarının kuru madde içeriğinin %13 ile 17 arasında olduğu bilinmektedir (Ak ve Uzaticı, 2001). Kuru madde esasına göre hesaplanan protein içerikleri ise %22,8 (Lammens et al., 2012; Merodio and Sabater, 1988), %19,4 (Tenorio et al., 2017), %17,7 (Vargas et al., 1965) ve %12-15 (Mack et al., 2007) olarak bildirilmiştir.

Şeker pancarı yaprakları, metiyonin, lizin, fenilalanin, treonin, valin, lösin ve izölösün esansiyel amino asitlerini ve esansiyel olmayan arginin, histidin, sistein, tirozin, alanin, aspartik asit, glutamik asit, glisin, prolin ve serin amino asitlerini içermektedir (Kiskini et al., 2016). Çizelge 2.2'de şeker pancarı yaprağının amino asit kompozisyonu verilmiştir.

**Çizelge 2.2** Şeker pancarı yaprağının amino asit dağılımı (Kiskini et al., 2016)

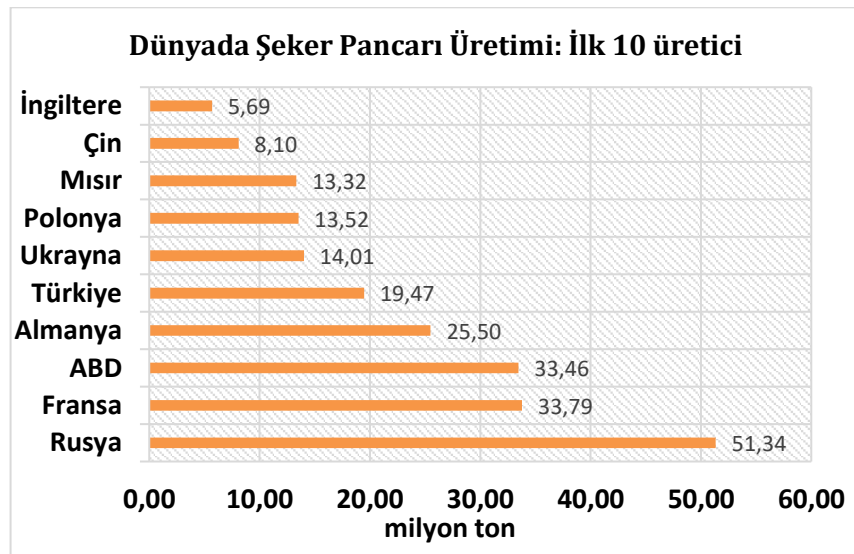
<b>Esansiyel Amino Asitler</b>	<b>g/16 g Azot</b>	<b>Esansiyel Olmayan Amino Asitler</b>	<b>g/16 g Azot</b>
Metiyonin	2,21	Arginin	5,44
Lizin	5,65	Histidin	3,10
Fenilalanin	6,02	Sistein	1,74
Treonin	5,20	Tirozin	4,52
Valin	6,24	Alanin	6,30
Lösün	9,39	Aspartik asit	10,74
İzölösün	4,85	Glutamik asit	12,03
		Glisin	6,43
		Prolin	5,24

Şeker pancarı yaprağında yüksek oranda bulunan esansiyel amino asitler sırasıyla lösin (%9,39), valin (%6,24) ve fenilalanin (%6,02) iken esansiyel olmayan amino asitler ise glutamik asit (%12,03), aspartik asit (%10,74) ve glisin (%6,43)'dir (Çizelge 2.2). Şeker pancarı yaprağının esansiyel amino asitleri içeriyor olması, şeker pancarı yaprağından elde edilen protein izolatlarının tek başına direkt protein kaynağı olarak değerlendirilebilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, bu proteinler, soya fasulyesi ya da buğday izolatlarının yer aldığı ürünlerin yapısına katılarak, besleyici özelliğın arttırılmasında da kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

Şeker pancarı yaprağının soya fasulyesine alternatif olacak yüksek protein içeriğine sahip olması, ülkemizde şeker pancarının bolca yetiştirilmesi ve yaprağın gluten ve kazein gibi alerjenik proteinleri içermemesi, şeker pancarı yaprağının önemli bir protein izolat kaynağı olarak görülmesini sağlamaktadır.

#### 2.4. Türkiye’de ve Dünyada Şeker Pancarı Üretimi

Şeker pancarı, FAOSTAT (2016) verilerine göre yaklaşık 277 milyon ton ile en fazla tarımı yapılan ürünler arasında yer almaktadır. 2016 yılında şeker pancarı üretiminin en çok yapıldığı ilk 5 ülke Rusya, Fransa, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Almanya ve Türkiye’dir. Şekil 2.5’te dünyada ilk 10 şeker pancarı üreticisi ülkeler ve üretilen miktarlar gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Şeker pancarı üreticisi ülkeler (FAOSTAT, 2016).

Şeker pancarı, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütüne (FAO) göre 2016 yılında yaklaşık 277 milyon ton üretimi yapılan ve bu üretimin %66,8'i ile en büyük payı Avrupa kıtasına ait önemli bir tarım ürünüdür. Şekil 2.5'te de görüleceği üzere Rusya, Fransa ve ABD şeker pancarı üretiminde başı çekmektedir. Türkiye ise yaklaşık 19 milyon ton ile şeker pancarı üretiminde dünya genelinde beşinci sırada yer almaktadır (FAOSTAT, 2016).

Türkiye'nin iklim ve toprak özelliklerinin şeker pancarı üretimine uygun olması sebebiyle, Türkiye genelinde 2017 yılı itibarıyla 3.392.742 dekar alanda 21.149.020 ton şeker pancarı yetiştirilmiştir (TÜİK, 2017). Ülkemizde, Konya'nın başı çektiği şeker pancarı üretimi, Eskişehir, Afyonkarahisar ve Yozgat gibi Orta Anadolu şehirlerinde çiftçiler tarafından gelir getirici tarımsal faaliyet olarak tercih edilmektedir (Çizelge 2.3)

**Çizelge 2.3** İl bazında şeker pancarı üretimi (Türkşeker, 2017).

İl	Ekilen Alan (Dekar)	Üretim (Ton)	Verim (Ton/Dekar)
Konya	300.533	2.097.152	6,98
Eskişehir	164.751	1.072.589	6,51
Afyonkarahisar	143.196	942.103	6,58
Yozgat	122.956	722.349	5,87
Ankara	101.052	637.179	6,31
Karaman	91.109	634.096	6,96
Tokat	105.205	591.468	5,62
Aksaray	59.160	456.709	7,72
Kahramanmaraş	65.679	431.448	6,57
Erzincan	87.958	424.682	4,83
Muş	90.094	410.632	4,56

Şeker pancarı üretiminde ekilen alan ve üretim miktarı bakımından Konya, Eskişehir, Afyonkarahisar, Yozgat ve Ankara başı çeken illerdir. Ancak, Aksaray, birim dekar alanda 7,72 ton ile diğer illere göre daha yüksek verimde üretimin yapıldığı ildir. Yüksek verimde üretimin yapıldığı diğer iller ise sırasıyla Konya, Karaman, Afyonkarahisar ve Kahramanmaraş'tır (Türkşeker, 2017).

## 2.5. Protein Eldesinde Kullanılan Yöntemler

Proteinlerin eldesinde, çöktürme, kromatografi, elektroforez, santrifüj ve ultrafiltrasyon gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Proteinlerin kromatografik (iyon değişimi ve jel filtrasyonu kromatografisi) ve elektroforez yöntemleri ile ayrılmasında, proteinlerin yük, boyut ve şekil özelliklerinden yararlanılırken çöktürme yöntemlerinde ise çözünürlük özelliği kullanılmaktadır. (Kumar and Sharma, 2015).

Proteinlerin çöktürülerek eldesi yöntemi, temel olarak ekstraksiyon (özütleme) ve çöktürme olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Proteinlerin ekstraksiyonu, çözgen yardımı ile proteinlerin hammaddeden ayrılması işlemidir. Ekstraksiyon aşamasında, proteinlerin çözünürlüğünün maksimum olduğu koşullarda proteinlerin çözüme geçmesi sağlanmaktadır. Çöktürme aşamasında ise, çözünürlüğün minimum olduğu koşulda protein izolatlarının sıvı fazdan ayrılması ile proteinler elde edilmiş olur (Novak and Havlicek, 2016). Bu ürünler, kuru maddede içerdikleri protein miktarına göre konsantre veya izolat olarak sınıflandırılmaktadır. Minimum %65 ve üzerindeyse protein konsantresi; %90 ve üzerinde ise protein izolatı olarak adlandırılmaktadır (Uzzan, 1988).

Protein ekstraksiyonu ve çöktürmesi birbirini izleyen ve çözünürlük esasına dayalı işlemlerdir. Proteinlerin çözünürlüğü pH değeri, iyonik kuvvet ve sıcaklık gibi etmenlere bağlıdır (Kramer et al., 2012). Gıda formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon/çöktürme yöntemleri alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme ve tuz destekli ekstraksiyon/amonyum sülfat çöktürmesidir (Mane et al., 2018).

### 2.5.1. Alkali Ekstraksiyon/İzoelektrik Çöktürme Yöntemi

Proteinler, yapısında hem karboksil (COOH) hem de amino grubunu (NH<sub>2</sub>) bulundurmaktadır. Bu da proteinin ortam asidik olduğunda baz gibi, ortam bazik olduğunda ise asit gibi davranmasına neden olmaktadır (Harvey and Ferrier, 2010). Ancak, her proteinin ne asit ne de baz ile tepkime vermediği, net yükünün sıfır olduğu kendine özgü bir pH değeri vardır ve bu pH değeri izoelektrik nokta olarak adlandırılmaktadır. Proteinler, izoelektrik noktada düşük çözünürlük

göstermektedir (Moldoveanu and David, 2013). Bu bilgiden hareketle, pH değerinin değişiminin çözünürlük üzerine etkisi kullanılarak alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme yöntemi geliştirilmiştir.

Bitkisel proteinlerin eldesinde, alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme geleneksel yöntem olarak tanımlanmakta ve sıklıkla kullanılmaktadır (Kiosseoglou et al., 1999; Chove et al., 2001; Makri et al., 2005; Wu et al., 2009; Malik and Saini, 2017). El-Adawy ve arkadaşlarının (2001) acı bakla ile yaptığı çalışmada, 1:10 katı:sıvı oranında, oda sıcaklığında ve pH 9 değerinde 1 saat ekstraksiyona tabi tutulmuş ve pH 4,5 değerinde çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen acı bakla protein izolatının, protein içeriği %91,25 olarak bulunmuştur. Ulloa ve arkadaşlarının (2017) tropik bir meyvenin (jackfruit) çekirdeklerinden protein eldesi üzerine yapılan çalışmada, alkali ekstraksiyon ve izoelektrik çöktürme yöntemi kullanılmıştır. pH 2-12 değerleri arasında 25 °C'de 30 dakika ve 1:20 katı sıvı oranında ekstraksiyon yapılarak jackfruit çekirdeği proteinlerinin çözünürlüğünün maksimum ve minimum olduğu nokta belirlenmiştir. pH 12 değerinde proteinlerin çözünürlüğünün %80 ile en yüksek olduğu, pH 4 değerinde ise %19,4 ile en düşük olduğu ve dolayısıyla ekstraksiyonun pH 12 değerinde, çöktürmenin ise pH 4 değerinde yapılmasına karar verilmiştir. Ayrıca, elde edilen protein izolatlarının protein içeriği ise 844,3 g/kg olarak bulunmuştur. Son olarak, bir diğer çalışmada ise wonderful cola (*Buchholzia coriacea*) çekirdeklerinden protein konsantreleri üretilmesi amaçlanmıştır. pH 8 değerinde ve 1:20 katı:sıvı oranında, 37 °C'de 2 saat boyunca ekstraksiyon işlemi uygulanmış ve daha sonra pH 5 değerinde ise çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen protein konsantrelerinin protein içeriği %56,45 olarak bulunmuştur (Ijarotimi et al., 2018).

Alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme yönteminde, pH değeri değişimi ile proteinlerin eldesi sağlanmaktadır. Özetle, uygun sıcaklık, süre, katı:sıvı oranı ve bazik ortamda protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmekte ve bunu takiben, çözeltinin pH değerinin, proteinlerin çözünürlüğünün en düşük olduğu değere (izoelektrik noktada) ayarlanması ile ise proteinlerin çöktürülmesi sağlanmaktadır (Matak et al., 2015).

### 2.5.2. Tuz Destekli Ekstraksiyon/Amonyum Sülfat Çöktürme Yöntemi

Tuz destekli ekstraksiyon/amonyum sülfat çöktürme yönteminde, iyonik şiddeti değiştirerek proteinlerin önce çözünürlüğü artırılıp sonrasında azaltılması ile proteinlerin eldesi sağlanmaktadır. Düşük tuz konsantrasyonunda, tuz iyonları ve proteinler arasında elektrostatik etkileşim meydana gelir ve dolayısıyla proteinlerin çözünürlükleri artar ve buna ‘tuz ile çözündürme (salting in)’ denir. Ancak, tuz konsantrasyonunun artmaya devam etmesi ile proteinlerin çözünürlüğü azalmaya başlar ve çökme gerçekleşir, bu olaya ise ‘tuz ile çöktürme (salting out)’ denir (Curtis et al., 1998). Tuz çöktürmesi yönteminde sodyum klorür ve potasyum klorür gibi diğer tuzlar kullanılabilse de amonyum sülfat tuzu sudaki yüksek çözünürlüğü ve ekonomik olması sebebiyle yaygın olarak tercih edilmektedir (Nelson and Cox, 2005).

Tuz ile çöktürme yönteminde önemli aşamalardan biri de diyaliz işlemi ile fazla tuzun uzaklaştırılmasıdır. Diyaliz işlemi, yarı geçirgen bir zar yardımı ile pasif difüzyon prensibine göre gerçekleşmektedir. Diyaliz torbasındaki yüksek konsantrasyondaki tuz, tampon çözeltisine difüzyon yolu ile geçer ve bu şekilde protein çözeltisi saflaştırılmış olur (Harcum, 2008).

Tuz çöktürmesi yöntemi, genellikle protein ve enzimlerin saflaştırılmasında kromatografik yöntemlerin ön basamağı olarak kullanılmaktadır (Bano and Sivaramakrishnan, 1980; Solanki et al., 2018; Negi et al., 2018; Omeje and Eze, 2018; Sharma and Vaidya, 2018). Örneğin; Vishwasrao ve arkadaşları (2017) tropikal bir meyveden (*Kalipatti sapota*) peroksidaz ve polifenoloksidaz enzimlerinin eldesi üzerine yaptıkları çalışmada amonyum sülfat çöktürmesi boyut dışlama ve anyon değişim kromatografisi yöntemlerini birlikte kullanılarak, saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Meyve pulpu, 1:2 katı:sıvı oranında, pH 7 fosfat tamponunda 4°C’de 180 dakika boyunca ekstrakte edilmiş ve %80’lik amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Bir diğer çalışmada, su kestanesinden kalkon izomeraz enzimi elde edilmek istenmiştir. Fosfat tamponu (pH=7) ile ekstraksiyona tabi tutulan su kestaneleri, aşamalı olarak %35 ve %80’lik amonyum sülfat ile çöktürülmüş, 1 gece diyalize bırakılmış ve kromatografik yöntem ile saflaştırma işlemi tamamlanmıştır (He and Pan, 2017). Son olarak, Yamazaki ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada mükus proteinlerinin taze soğandan elde

edilmesinde sırasıyla %80'lik amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve hidrofobik etkileşim kromatografisi işlemleri uygulanmıştır.

Literatür incelendiğinde, izoelektrik ve tuz çöktürmesinin farklı hammaddelerde farklı verimlere sebep olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, protein verimi açısından hammaddeye uygun yöntemin bulunması amacıyla izoelektrik ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri çeşitli çalışmalara konu olmuştur (Karaca et al., 2011; Muranyi et al., 2013; Stone et al., 2015; Muranyi et al., 2016). Çay yaprakları ile yapılan çalışmada, izoelektrik, amonyum sülfat ve izoelektrik-amonyum sülfat çöktürme yöntemleri protein içeriği bakımından karşılaştırılmış ve izoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen izolatların %89,70 ile en yüksek protein içeriğine sahip olduğu bulunmuştur (Cui et al., 2017). Kırmızı (*Porphyra umbilicalis*), yeşil (*Ulva lactuca*) ve kahverengi (*Saccharina latissima*) deniz yosunları ile yapılan çalışmada ise izoelektrik çöktürme ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri protein verimi açısından karşılaştırılmıştır. Kırmızı ve kahverengi deniz yosunları için izoelektrik çöktürmesi, yeşil deniz yosunu için ise amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ile elde edilen izolatların protein verimi yüksek bulunmuştur (Harrysson et al., 2018). Waglay ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada, patatesten çeşitli çöktürme yöntemleri (ısı/asit kombinasyonu, asit, demir klorür ve mangan klorür, etanol ve amonyum sülfat çöktürmeleri) ile protein konsantresi üretilmiş ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ile üretilen protein konsantrelerinin %98,60 ile en yüksek protein verimine sahip olduğu belirtilmiştir.

Alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme ve tuz destekli ekstraksiyon/amonyum sülfat çöktürmesi yöntemlerinin protein eldesinde çeşitli avantajları vardır. Çöktürme yöntemlerinin uygulamaya aktarılabilecek ticari potansiyelinin olması ve üretim maliyetlerinin ucuz olması, protein eldesinde yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Burgess, 2009).

## **2.6. Ekstraksiyon Koşullarının Belirlenmesi**

Ekstraksiyon işlemi, proteinlerin eldesinde ön önemli aşamalardan biridir. Ekstraksiyon veya özütleme, proteinlerin çözünürlüğünün arttırılması ile proteinlerin hammaddeden çözüme geçmesi işlemidir. Dolayısıyla, proteinlerin

çözünürlüğünü etkileyen faktörler aynı zamanda ekstraksiyonun verimini de etkilemektedir (Preece et al., 2017).

Proteinlerin ekstraksiyonunda, sıcaklık, ortamın pH değeri, iyonik kuvvet, çözügen türü, çözelti:kati oranı ve ekstraksiyon süresi gibi çeşitli faktörler etkilidir (Liu, 1997). Sıcaklığın artması oligomerik proteinlerin çözünmesini sağlayarak protein ekstraksiyonuna yardımcı olmaktadır (Shen, 1976; Ly et al., 1998). Proteinlerin ekstraksiyonunu etkileyen parametrelerden biri de ortamın pH değeridir. İzoelektrik noktaya bağlı olmakla birlikte ortamın pH değerine göre proteinler artı veya eksi yüklenirler. Proteinlerin net yükünün sıfır olduğu pH değerinde yani izoelektrik noktada (pI) ise çözünürlükleri en düşüktür ve çökelirler (Ly et al., 1998). Bir diğer faktör iyonik kuvvet veya tuz konsantrasyonudur ve proteinlerin çözünürlüğünü hem arttırıcı (salting in) hem de azaltıcı (salting out) etki göstermektedir. Düşük konsantrasyonda tuz ilavesi ile proteinlerin ekstrakte edilebilirliği arttırılmaktadır (Arakawa and Timasheff, 1984). Çözügen türünün de (aseton, alkol, tampon) protein ekstraksiyonunu etkileyen parametrelerden biri olduğu yapılan çalışmalarda bulunmuştur (Nahar et al., 2013). Ayrıca, çözügenin türü kadar hammaddeye hangi oranda ekleneceği (çözelti:kati oranı) ve ekstraksiyon süresi protein ekstraksiyonu etkileyen diğer parametrelerdir (Quanhong and Caili, 2005).

Son ürün olarak elde edilen protein konsantresi veya izolatatının protein içeriği, ekstraksiyon işleminin verimliliği ile doğrudan ilgilidir. Dolayısıyla, protein ekstraksiyonunu etkileyen parametrelerin optimizasyonu, yüksek verimde protein izolataı üretimi için önemli bir rol oynamaktadır.

## **2.7. Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu**

Protein ekstraksiyonunu etkileyen sıcaklık, ortam pH değeri, ekstraksiyon süresi, çözügen türü, çözelti:kati oranı gibi birçok faktör bulunmakta ve bu faktörlerin birbirleri ile etkileşimi de protein ekstraksiyonunu etkilemektedir. Bu durumda, yanıt yüzey yöntemi (RSM), ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu için kullanılabilir.

Literatür incelendiğinde, protein ekstraksiyonunu etkileyen parametrelerin yanıt yüzey yöntemi ile optimize edildiği çalışmalar bulunmaktadır (Vaidya et al., 2017; Dong et al., 2012; Quanhong and Caili, 2005; Ma et al., 2010). Üzüm çekirdeklerinden protein ekstraksiyonu için çözgen/katı oranı (17,5-22,5), ekstraksiyon sıcaklığı (35-45 °C), pH (9-10) ve ekstraksiyon süresi (20-60 dk.) faktörleri Yanıt Yüzey Metodu (RSM) ile optimize edilmiş ve RSM sonuçlarına göre 22,5 çözültü/katı oranı, 35 °C ekstraksiyon sıcaklığı, pH 9,8 değeri ve 29 dakika ekstraksiyon süresi ekstraksiyon verimi açısından optimum nokta olarak bildirilmiştir (Lv et al., 2011). Mechmeche ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışmada, domates çekirdeklerinden protein izolatu üretimi yapılmıştır. Bu çalışmada, su/hammadde oranı (20/1-100/1), ekstraksiyon süresi (0-72 saat) ve karıştırma süresi (10-30 dakika) ekstraksiyonu etkileyen parametreler olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlemi pH 7,5 değerinde 30 °C'de su banyosunda gerçekleştirilmiş ve daha sonra karıştırma işleminin ardından santrifüjlenmiştir. RSM sonuçlarına göre, 82.81/1 su/hammadde oranı, 49,76 saat ekstraksiyon süresi ve 24,56 dakika karıştırma süresi optimum koşullar olarak bulunmuş ve bu koşullarda protein veriminin %80,37 olduğu bildirilmiştir. Domates atıkları ve çekirdekleri ile yapılan başka bir çalışmada ise optimize edilen ekstraksiyon parametreleri; alkali pH değeri (10-12), asidik pH değeri (3,1-4,3), sıcaklık (10-50 °C), ekstraksiyon süresi (30-70 dakika) ve katı:çözültü oranı (1:10-1:50) olarak belirlenmiştir. RSM sonuçlarına göre, optimum noktanın, ekstraksiyon pH değerinin 12, çöktürme pH değerinin 3,73, sıcaklığın 37,73 °C, 60 dakika ekstraksiyon süresi ve katı:çözültü oranınının 1:40 olduğu gözlenmiştir. Bu noktadaki domates atık ve çekirdeklerinin ekstraksiyon verimlerinin sırasıyla %86,84 ve %64,15 olduğu bildirilmiştir (Meshkani et al., 2016). Fıratlıgil-Durmuş ve Evranuz (2010) tarafından yapılan çalışmada, kırmızı biber çekirdeklerinde etkin bir protein ekstraksiyonu gerçekleştirmek amacıyla ekstraksiyonu etkileyen parametreler; sıcaklık (30, 35, 40, 45 ve 50 °C), pH değeri (7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0), ekstraksiyon süresi (20, 30, 40, 50 ve 60 dk.) ve çözültü:katı oranı (10:1, 15:1, 20:1, 25:1 ve 30:1 v/w), yanıt yüzey yöntemi ile protein verimi (%) yanıtına göre optimize edilmiştir. RSM sonuçlarına göre, 31 °C, pH 8,8 değeri, 20 dakika ekstraksiyon süresi ve 21:1 çözültü:katı oranı optimum ekstraksiyon koşulu olarak bulunmuş ve bu koşuldaki protein veriminin %12,24 olduğu bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada, mercimek unundan yüksek verimde ve protein içeriğinde protein konsantreleri ekstrakte

edilmek istenmiş ve bu amaçla pH değeri ve katı:çözelti oranı yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir. RSM sonuçlarına göre pH 9 değeri ve 1:10 katı:çözelti oranı optimum nokta olarak bulunmuş ve bu noktada veriminin 14,5 g ekstrakt/100 g mercimek unu ve protein içeriğinin ise 82 g protein/100 g ekstrakt olarak bildirilmiştir (Jarpa-Parra et al., 2014). Feyzi ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan çalışmada ise, mürdümük baklagilinin protein ekstraksiyon koşulları yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir. Ekstraksiyonu etkileyen bağımsız değişken parametreler pH değeri (2,5-10), ekstraksiyon süresi (20-80 dk.) ve çözelti:katı oranı (5:1-30:1 mL/mg) olarak belirlenmiştir. RSM sonuçlarına göre optimum noktada (pH 2.57 değeri, 48 dakika ekstraksiyon süresi ve çözelti:katı oranı 10:1) elde edilen protein izolatının protein içeriğinin %92,50 olduğu bildirilmiştir.

Proteinlerin ekstraksiyonunu etkileyen parametrelerin çokluğu, bu parametrelerin birbirleri ile olan etkileşimi ve hammaddeye göre bu koşulların değişmesi optimizasyonun yapılmasını gerektirmektedir. Tüm bu çalışmalardan bulgulandığı üzere, yanıt yüzey yöntemi ile ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu, yüksek oranda protein verimi sağlamaktadır.

## **2.8. Enzimatik Ön İşlemlerin Ekstraksiyon Verimine Etkisi**

Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak çeşitli bileşenlerin eldesi konusunda yapılan çalışma sonuçlarına göre verim değerleri düşük ve ürün kalitesi istenen özelliklere sahip olamayabilmektedir. Aynı zamanda, ekstraksiyon sırasında sert kimyasalların kullanımı hem maliyet hem de çevreye verdiği zarar açısından geleneksel ekstraksiyon yönteminin uygulanmasını sınırlanmaktadır (Puri et al., 2012). Bu nedenle, ekstraksiyon verimini arttırmak ve ürün kalitesini iyileştirmek için alternatif ön işlemler konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Genellikle ön işlem olarak, enzim uygulamaları (Hardouin et al., 2016), mikrodalga ısıtma (Choi et al., 2006) ve ohmik ısıtma (Nair et al., 2014) gibi ısı işlemler ve vurgulu elektrik alan (Zhou et al., 2017), ultrasonikasyon (Chittapalo and Noomhorm, 2009; Yagoub et al., 2017) ve yüksek hidrostatik basınç (Cao et al., 2018) gibi ısı olmayan işlemler kullanılabilir.

Enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile daha ılımlı koşullarda daha yüksek verim ve kalitede, üstün fonksiyonel özellikli ve besleyici değeri yüksek protein

izolatlarının eldesi mümkün olabilmektedir (Marathe et al., 2017). Literatür incelendiğinde, enzim destekli ekstraksiyon ile protein eldesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Bu kapsamda, Jiang ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada, fıstık proteinleri alkalaz enzimi yardımıyla elde edilmiştir. Enzim miktarı diğer ekstraksiyon parametreleri (sıcaklık, pH değeri, ekstraksiyon süresi ve katı:çözelti oranı) ortogonal test ile birlikte optimize edilmiştir. Protein verimi, alkali ekstraksiyon ile %71,38 iken, alkalaz enzimi kullanımı ile verimin %88,22'ye ulaştığı görülmüştür. Soya proteinlerinin ekstraksiyonu ile ilgili yapılan çalışmada, proteaz enzimi kullanılmış ve 50 °C ekstraksiyon sıcaklığı, pH 9 değeri, 1:6 katı:sıvı oranı, 1 saat ekstraksiyon süresi ve 6 (w/v) substrat:enzim oranı ekstraksiyon koşulları olarak belirlenmiştir. Soya proteinlerinin bu koşullardaki ekstraksiyon verimi ise %97 olarak bulunmuştur (De Almeida et al., 2014; Nadar et al., 2018). Sari ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada, protein izolatları, kolza tohumu, soya fasulyesi ve mikroalg küspelerinden enzim destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Alkali ekstraksiyon yöntemi ile ekstraksiyon veriminin, soya fasulyesi küspesi için %80, kolza ve mikroalg küspesi için %15-30 dolaylarında olduğu, ancak enzim destekli ekstraksiyon ile bu değerlerin soya için %90'a, kolza ve mikroalg için ise %50-80 dolaylarına ulaştığı gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada, toz haline getirilmiş balkabağı çekirdeğinden albüminler ultrasonik ve enzim destekli ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilmiş ve verim açısından geleneksel yöntem ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile protein veriminin %16 oranında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tu et al., 2015).

Yaprak proteinlerinin ekstraksiyonundaki zorluklarından birisi kloroplastın içinde yer alan ve klorofil ile kompleks oluşturabilen membran (tilakoid) proteinlerinin, yaprak proteinlerinin yaklaşık %80'ini oluşturmasıdır (Fiorentini and Galoppini, 1983). Klorofillere bağlı bu proteinleri ekstrakte edebilmek için enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile hücre çeperlerinin ve hücre zarının parçalanması sağlanarak çözünmez formdaki membran proteinlerinin eldesi mümkün olabilmektedir (Ajila et al., 2011; Nadar et al., 2018). Sari ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan çalışmada, mikroalglerden protein eldesi alkali ve enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile yapılmıştır. Mikroalglerin alkali yöntem ile ekstraksiyon veriminin %32,7 ile düşük olduğu belirtilmiştir. Ancak, proteaz

enziminin kullanımı ile hücre çeperinin parçalanması sonucu ekstraksiyon veriminin %73,2'ye çıktığı görülmüştür.

Literatür incelendiğinde enzim destekli ekstraksiyon yönteminde çeşitli enzim ve enzim karışımlarının kullanıldığı görülmektedir. Protein ekstraksiyonunda kullanılan ticari enzimler Çizelge 2.4'te gösterilmiştir.

**Çizelge 2.4** Enzim destekli protein ekstraksiyonunda kullanılan ticari enzimler

Hammadde	Ticari Enzim	Kaynak
Çay yaprakları pulpu	Nötraz, Alkalaz, Protamex ve Flavourzyme	Shen et al., 2008
Mikroalg	Protex 40XL	Sari et al., 2016
Zeytin yaprakları	Celluclast 1.5L (selülaz)	Vergara-Barberan et al., 2015
Fıstık	Alkalaz 2.4L	Jiang et al., 2010
Pirinç kepeği	Celluclast, hemiselülaz, Pectinex Ultra SP-L, Viscozyme L,	Hanmoungjai et al., 2002

Bitkisel proteinlerin eldesinde kullanılan enzim karışımlarına bakıldığında proteinlerin ayrılması için genellikle proteolitik aktiviteye sahip alkalaz, nötraz ve protamex gibi enzimler kullanılmaktadır. Ayrıca, hücre duvarını parçalamak için selülaz ve hemiselülaz enzimlerin kullanıldığı gibi Pectinex Ultra SP-L gibi pektolitik aktiviteye sahip ticari enzim karışımlarının kullanıldığı da Çizelge 2.4'te görülmektedir (Hanmoungjai et al., 2002).

Enzim uygulamalarının, düşük maliyette üstün kalite ve yüksek verimde ürün üretimi vaat etmesi gıda endüstrisinde kullanımının giderek yaygınlaşmasını sağlamaktadır. Özellikle bitkisel proteinlerin eldesinde bitkinin yapısal özellikleri sebebiyle karşılaşılan düşük ekstraksiyon verimi gibi sorunların enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile giderilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Nadar et al., 2018).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Bitkisel protein tozu üretimi için hammadde olarak seçilen şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) yaprakları Ekim ayında Eskişehir’de faaliyet gösteren şeker üretimi yapan bir firmanın tarlalarından temin edilmiştir (Şekil 3.1). Yaprakların üzerinde bulunan çamur ve toprağın uzaklaştırılması amacıyla hammadde çeşme suyu altında yıkandıktan sonra, -18 °C’de donmuş olarak muhafaza edilmiştir. Enzim destekli ekstraksiyon aşamasında kullanılan Pectinex Ultra SP-L enzimi Novozymes (Danimarka) firmasından temin edilmiştir. Toplam protein miktarı tayininde, standart eğri için Thermo Fisher Scientific firmasından temin edilen Bovine Gamma Globulin (2 mg/mL) kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan şeker pancarı yaprakları

#### 3.2. Yöntem

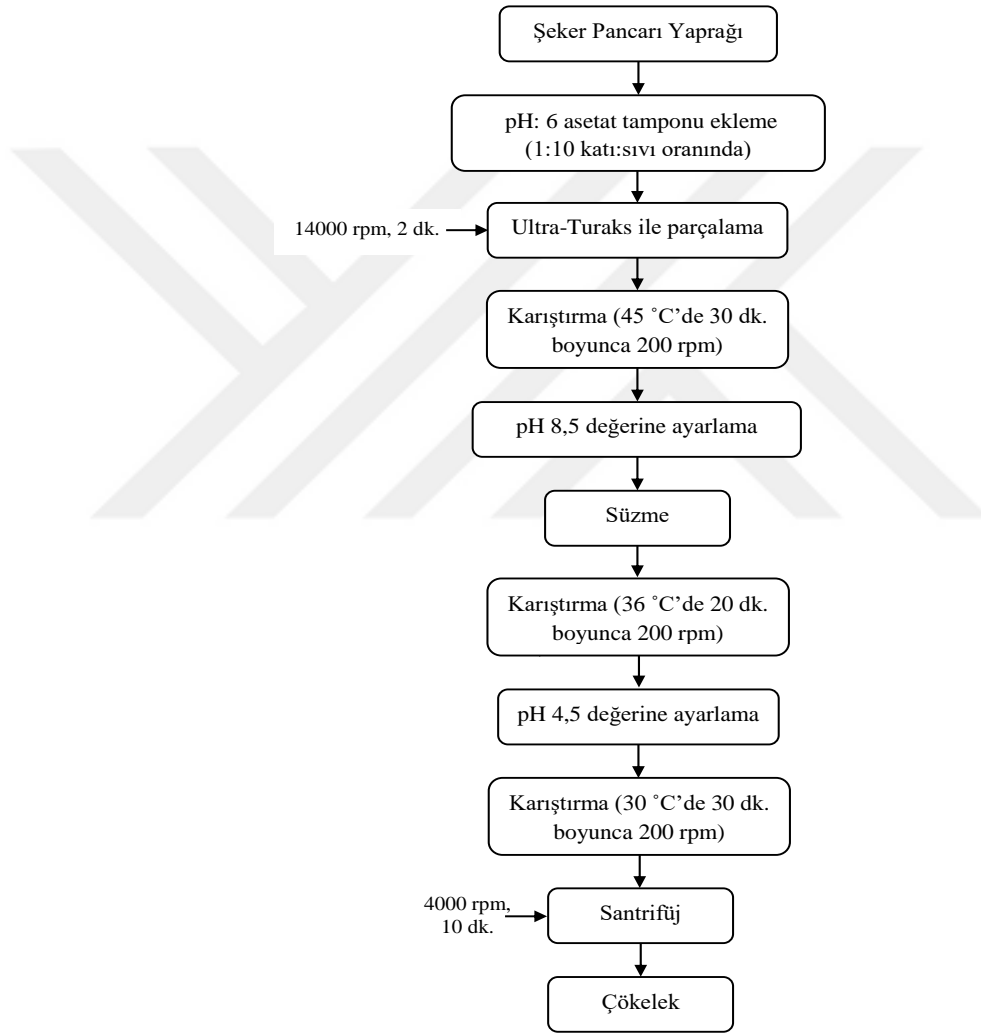
##### 3.2.1. Protein Eldesinde Kullanılan Yöntemler

Şeker pancarı yaprağından protein eldesi için literatürde yer alan izoelektrik, amonyum sülfat ve izoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri uygulanmıştır.

##### 3.2.1.1. İzoelektrik Çöktürme Yöntemi

Şeker pancarı yapraklarına 1:10 oranında pH değeri 6 olan sodyum asetat tamponu eklendikten sonra Ultra-Turrax T25 basic IKA-WERKE marka homojenizatör (14000 rpm’de 2 dk.) yardımı ile karışım homojen hale getirilmiştir.

Çözelti, su banyosunda 200 rpm'de 45 °C'de 30 dk. boyunca çalkalandıktan sonra, 1 M NaOH ile çözeltinin pH değeri 8,5 ayarlanmış ve tülbent yardımı ile süzülmüştür. Süzüntü, 36 °C'de 20 dk. çalkalandıktan (200 rpm) sonra 1 M HCl ile pH değeri 4,5'e getirilmiş ve 30 °C'de 30 dk. boyunca 200 rpm'de çalkalanarak proteinler çöktürülmüştür. Santrifüj işleminin (4000 rpm, 10 dk.) ardından çökelek elde edilmiştir (Şekil 3.2). Son olarak, örnekler -48 °C'de vakum altında 9 saat boyunca liyofilizatörde (Armfield, HA-308/3) kurutularak toz örnekler elde edilmiştir (Boye et al., 2010).

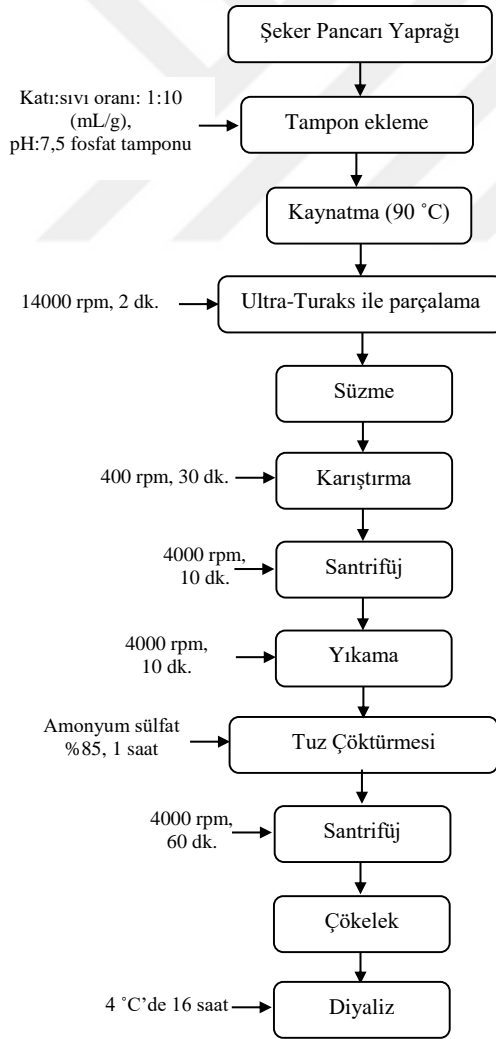


Şekil 3.2 İzoelektrik çöktürme yöntemi akım şeması

### 3.2.1.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Şeker pancarı yapraklarına 1:10 oranında pH değeri 7,5 olan fosfat tamponu ilave edilmiştir. Karışım kaynama noktasına kadar ısıtıldıktan sonra 25 °C'ye soğutulmuştur. Karışım, Ultra-Turrax T25 basic IKA-WERKE marka

homojenizatör (14000 rpm’de 2 dk.) ile homojen hale getirilmiştir. Çözelti tülbent ile süzöldükten sonra 30 dk. oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımı 300 rpm’de karıştırılmıştır. Santrifüj işlemi (4000 rpm/10 dk.) ile çökelti ve üst faz (süpernatant) ayrımı yapılmış ve çökeltiye tampon ilavesi ile yıkama işlemi uygulanmış ve ilk santrifüj işlemi sonucu elde edilen süpernatanta eklenmiştir. Üst faza %85 konsantrasyonda amonyum sülfat eklenmiş ve ardından 4000 rpm’de 60 dk. santrifüj işlemi ile çökelek elde edilmiştir. Protein çökeleğindeki fazla tuzun uzaklaştırılması amacıyla, diyaliz işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla, Sigma-Aldrich firmasından temin edilen 6–8 kDa por genişliğine sahip membranlar kullanılarak tampon içerisinde proteinler 4 °C’de 16 sa bekletilmiş ve membran içindeki tuzun uzaklaştırılması sağlanmıştır (Şekil 3.3). Son olarak, örnekler -48 °C’de vakum altında 9 saat boyunca liyofilizatörde (Armfield, HA-308/3) kurutularak toz örnekler elde edilmiştir (Lv et al., 2017).



**Şekil 3.3** Amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi akım şeması

### 3.2.1.3. İzoelektrik-Amonyum Sülfat Çöktürmesi

İzoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi yönteminde, amonyum sülfat çöktürmesi yöntemindeki işlem basamaklar takip edilmiştir. Ancak, amonyum sülfat çöktürmesinden farklı olarak amonyum sülfat ilavesinden önce çözeltinin pH değeri 5,5 ayarlanmıştır. Bu işlemin ardından tuz çöktürmesi yöntemindeki işlem basamakları takip edilmiştir (Cui et al., 2017).

Ayrıca, uygulanan üç yöntem ile belirlenen ekstraksiyon verimleri arasındaki farklılık SPSS programı, Duncan çoklu karşılaştırma testi (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile %95 güven aralığında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

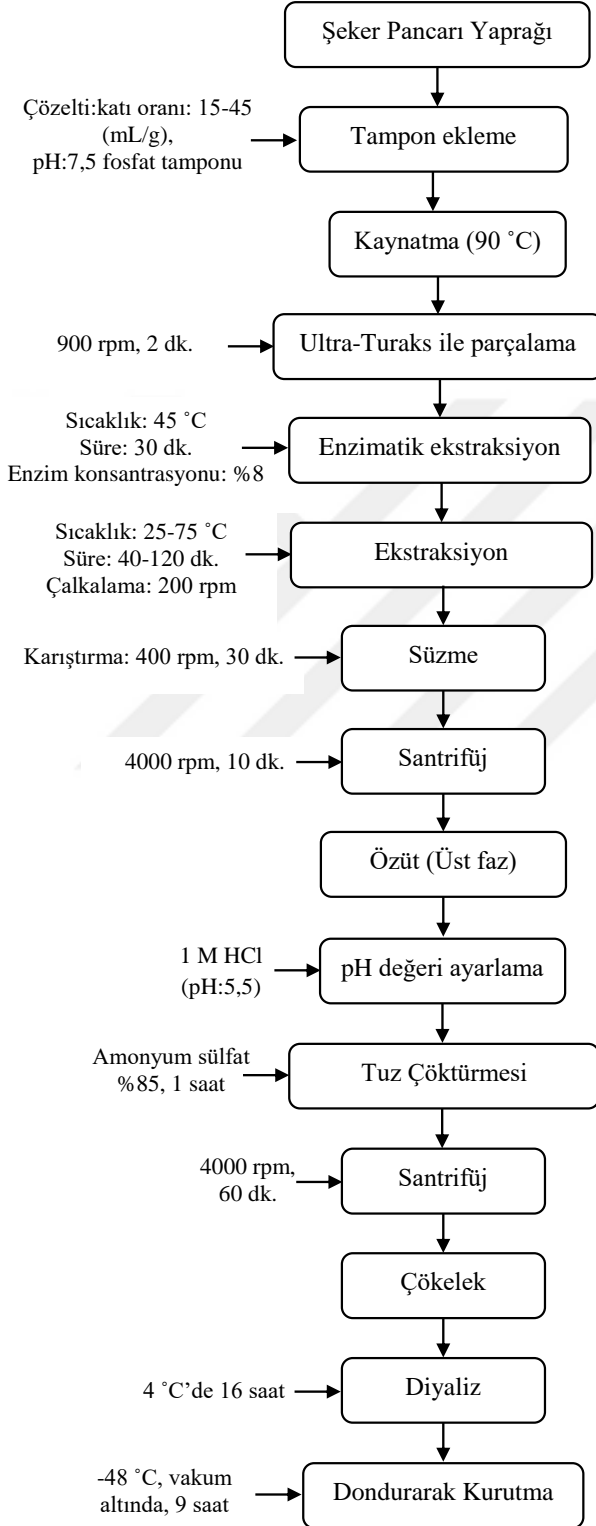
### 3.2.2. Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Optimize edilen ekstraksiyon parametreleri literatürde yer alan çalışmalar temel alınarak (Lv et al., 2011; Fıratlıgil-Durmuş and Evranuz, 2010; Meshkani et al., 2016) sıcaklık, süre ve çözelti:katı oranı olarak belirlenmiştir. Elde edilen her bir bağımlı değişken için çoklu regresyon analiz yöntemi ile bir matematiksel model oluşturularak modeldeki önemli terimler varyans analizi (ANOVA) ile bulunmuştur. Modelin doğruluğu programın ANOVA çıktıları olan lack of fit ve Fisher test değerine (F-değeri) bakılarak değerlendirilmiştir. Optimizasyon, Design Expert programında yanıt yüzey metodunun (RSM) Merkezi Birleşik Tasarımı (CCRD: Central Composite Rotatable Design) ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3. Enzim Destekli Ekstraksiyon

Enzim destekli ekstraksiyon işleminde daha önce ‘İspanaktan Ekstrakte Edilen Zn-Klorofil Türevlerinin Emülsiyon/Soğuk Jelleşme Metodu ile Mikroenkapsülasyonu’ adlı tez çalışmasında kullanılan Pectinex Ultra SP-L (enzim aktivitesi 3800 PGNU/ml) enziminin kullanılmasına karar verilmiştir (Özkan, 2014). Ekstraksiyon parametreleri ise, 45 °C sıcaklık, 30 dakika inkübasyon süresi ve %8 enzim konsantrasyonu olarak seçilmiştir (Özkan and Bilek, 2015).

Ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu ve enzim destekli ekstraksiyon uygulamasının eklenmesi ile protein tozu üretiminin nihai akım şeması Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4 İzoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi akım şeması

### 3.2.4. Analiz Yöntemleri

Hammaddeye; şeker pancarı yaprağına toplam kuru madde (AOAC, 1990), toplam kül (Rannou et al., 2015) toplam protein (Dumas, 1826; Kjeldahl, 1883) ve amino asit kompozisyonu (Sanchez-Vioque et al., 1999) analiz yöntemlerine göre yapılmıştır. Ekstraksiyon ve protein çöktürme işlemlerinin ardından toplam protein (Bradford, 1976) belirlenmiştir. Dondurarak kurutulan toz protein ürünlerine ise ürün özelliklerini ve kalitesini belirlemek üzere 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 Tayini

Kuru madde değerlerinin belirlenmesi için tartım kaplarına tartılan örnekler, vakumlu etüvde (65 °C) sabit ağırlığa ulaşıncaya kadar bekletilmiştir. Etüvden çıkarılan tartım kapları desikatörde soğuduktan sonra tartılmış ve %kuru madde aşağıdaki bağlantıyla (Denklem 1) hesaplanmıştır (AOAC, 1990). Toplam kuru madde miktarı analizi şeker pancarı yapraklarına ve protein tozlarına 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 Tayini

Kül tayininde darası alınan krozelere örnekler tartılmış ve 550 °C'de 5 saat yakılarak toplam kül miktarı belirlenmiştir (Rannou et al., 2015). Kül tayini şeker pancarı yapraklarına ve protein tozlarına yapılmıştır.

### **3.2.4.1.3. Toplam Protein Miktarı Tayini**

Şeker pancarı yaprağının ve toz ürünün protein miktarı, Dumas (Dumas, 1826) ve Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) metotları ile belirlenmiştir. Dumas ve Kjeldahl metotları, proteinlerin yapısında bulunan azotun kantitatif tayini için kullanılan yöntemlerdir. Toplam protein miktarı hesabı için 6,25 faktörü kullanılmıştır hesaplanmıştır (Hojilla-Evangelista et al., 2017; Cui et al., 2017).

### **3.2.4.1.4. Amino Asit Kompozisyonu Tayini**

24 saat boyunca 110 °C'de 6 N HCl ile hidrolize edilen örneklerin içerdiği amino asitler, ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi ile belirlenmiştir. Amino asit bileşimi, 100 g protein başına gram amino asit olarak ifade edilmiştir (Sanchez-Vioque et al., 1999).

### **3.2.4.2. Protein Veriminin Belirlenmesi**

Ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonunda yanıt olarak belirlenen protein verimi, Bradford metodu ile tayin edilmiştir. Bir kolorimetrik protein analizi olan Bradford testi, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucu absorbans değişimi prensibine dayanır. Test tüpüne kör için 100 µL fosfat tamponu, örnekler için 100 µL ekstrakt konulduktan sonra tüplere 1 mL Coomassie Brilliant boyası eklenmiştir. Tüpler vortekslendikten sonra 15 dakika karanlıkta tutulmuş ve 595 nm'de kör değerine karşı örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede okunmuştur. Standart eğri için farklı konsantrasyonlarda (0,05-0,1-0,12-0,15-0,2-0,225-0,25 mg/mL) protein (Bovine Gamma Globulin-2 mg/mL) çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilere 1 ml Coomassie Brilliant boyası eklendikten sonra 595 nm'de absorbans değerleri okunmuş ve standart eğri çizilmiştir (Bradford, 1976).

### **3.2.4.3. Protein Tozlarına Yapılan Analizler**

Hammaddeye yapılan toplam kuru madde (AOAC, 1990), toplam kül (Rannou et al., 2015) toplam protein (Kjeldahl, 1883) ve amino asit kompozisyonu (Sanchez-Vioque et al., 1999) analizleri protein tozlarına da yapılmıştır.

### 3.2.4.3.1. Protein Çözünürlüğü Tayini

Protein tozları, son konsantrasyon 4 mg/mL olacak şekilde suda çözüldürülmüştür. Sonrasında, çözeltisinin pH değeri, 0,5 pH birim aralıkla 2,5 ile 8,5 arasında değişen nihai pH değerlerini ayarlanmasının ardından çözelti 2 saat oda sıcaklığında 300 rpm'de karıştırılmıştır. Daha sonra 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatantın ve analizde kullanılan proteinin başlangıç konsantrasyonunun (4 mg/mL) protein oranı Bradford yöntemi (Bradford, 1976) ile tayin edilmiştir. Yüzde protein çözünürlüğü aşağıdaki bağlantıyla (Denklem 2) hesaplanmıştır (Gonzalez-Perez, 2003).

$$\%Protein\ çözünürlüğü = \frac{m_s}{m_t} \times 100 \text{ (Denklem 2)}$$

$m_s$ = Süpernatantın protein oranı

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

### 3.2.4.3.2. Renk Tayini

Hunter-Lab kolorimetresi Colorflex model renk ölçüm cihazı (Management Company, USA) ile toz örneklerin  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri (CIELAB renk değerleri) ölçülmüştür (Salgado et al., 2011).  $L^*$  değeri koyuluk-parlaklık,  $a^*$  değeri kırmızılık ( $+a^*$ ) yeşillik ( $-a^*$ ) ve  $b^*$  değeri ise mavilik ( $-b^*$ ) sarılık ( $+b^*$ ) şeklinde ifade edilmektedir (Hunter, 1975).

### 3.2.4.3.3. Yığın Yoğunluğu Analizi

Elde edilen toz ürün 100 mL'lik darası alınmış bir mezüre huni yardımıyla basınç uygulamadan hacim çizgisine kadar aktarılarak yığın yoğunluğu örnek ağırlığının hacme oranından ( $\text{kg/m}^3$ ) belirlenmiştir (Kaur et al., 2015).

### 3.2.4.3.4. Sıkıştırılmış Yığın Yoğunluğu Analizi

100 mL'lik mezüre aktarılmış olan örnek 100 defa sabit kuvvetle sarsılmış ve toz örneğin kapladığı son hacim ölçülmüştür. Sonuç  $\text{kg/m}^3$  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 belirlenmiştir (Denklem 3) (Kaur et al., 2015). Carr endeks değerine göre örneklerin akabilirlikleri yorumlanabilmektedir. Buna ilişkin bilgiler Çizelge 3.1’de verilmiştir (Jinapong et al., 2008).

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

**Çizelge 3.1** Carr Endeks değerine göre protein tozlarının akabilirliklerinin sınıflandırması (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

Darası bilinen ( $m_0$ ) 100 mL’lik piknometre içerisine toz ürün eklenmiş ve tartılmıştır ( $m_t$ ). Üzerine önce bir miktar petrol eteri eklenip piknometre hafifçe köpürtmeden çalkalanmış (böylece toz yığını içerisindeki boşluklar petrol eteri ile dolar) ve sonrasında piknometre hacmi petrol eteri ile tamamlanıp son ağırlık belirlenmiştir ( $m_{tp}$ ). Ayrıca, piknometre boşken petrol eteri ile doldurularak tartılmış ( $m_p$ ) ve sonuç aşağıdaki bağlantı (Denklem 4) kullanılarak  $\text{kg/m}^3$  olarak ifade edilmiştir (Erbay, 2013).

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

### 3.2.4.3.7. Islanabilirlik Tayini

Gözlem süresine bağlı ıslanabilirlik analizinde, 250 mL'lik behere, 100 mL saf su (25 °C) eklenmiştir. Beher ve cam huniden oluşan bir düzenek oluşturularak (Beherdeki sıvı yüzeyi ile huninin uç kısmı arasındaki mesafe 10 cm olacak şekilde ayarlanmıştır) huninin içerisine bir cam test tüpü yerleştirilmiş ve 0.1 g toz örnek test tüpünün çevresine konulmuştur. Protein tozlarının tamamıyla ıslanma süresi kronometre ile ölçülmüştür (Jinapong et al., 2008).

### 3.2.4.3.8. Dağılıbilirlik Tayini

Dağılıbilirlik analizinde, 50 mL'lik behere 10 mL saf su (25 °C) konulmuş ve ardından 1 g toz örnek eklenmiştir. Bir kaşık yardımıyla, 15 saniye boyunca saat yönünde ve saat yönünün tersinde 25 dairesel hareket yapılmış ve sonrasında karışım 212 µm'lik elekten süzülerek süzüntüden 1 mL örnek alınıp, darası alınmış kurutma kabına aktarılarak vakumlu etüvde (65 °C) sabit tartıma gelene kadar tutulmuş ve aşağıdaki bağlantı (Denklem 5) ile 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 süzüntünün % kuru madde değeri

c: Toz ürünün % nem içeriği

### 3.2.4.3.9. Su Aktivitesi Tayini

Protein tozlarının su aktivite değerleri Testo marka (Almanya) cihaz ile belirlenmiştir. 0,5 gram örnek cihazın haznesine yerleştirilerek su aktivitesi değeri ölçülmüştür (Shih et al., 2016).

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, protein eldesi için hammadde olarak seçilen şeker pancarı yaprağına ve izoelektrik-tuz çöktürmesi yöntemi ile elde edilen protein tozlarına ait analiz sonuçları ile ekstraksiyon koşullarının optimizasyonuna ilişkin veriler bu bölümde verilmiştir.

##### 4.1. Şeker Pancarı Yaprığına Ait Analiz Sonuçları

Hammadde olarak belirlenen şeker pancarı yaprağının kimyasal kompozisyonunu belirlemek amacıyla toplam kuru madde, toplam kül ve azot tayini analizleri yapılmıştır. Şeker pancarı yaprağının toplam kuru madde ve nem içeriği sırasıyla  $16,98 \pm 0,30$  (ağ/ağ) ve  $83,02 \pm 0,30$  (ağ/ağ) olarak bulunmuştur. Literatürde, şeker pancarı yaprağının toplam kuru madde miktarının  $14,6$  (Starke and Hoffmann, 2014),  $15,8$  (Vissers et al., 2017) ve  $13-17$  (Ak ve Uzaticı, 2001) arasında değiştiği belirtilmiştir. Gıdanın yapısında mevcut olan toplam mineral madde miktarının ölçüsü olan toplam kül miktarı ise kuru madde bazında  $17,76 \pm 0,25$ 'dir. Literatürde, şeker pancarı yapraklarının toplam kül miktarının kuru madde bazında  $11,0-16,4$  (Kiskini et al., 2016) ve  $20,8$  (Starke and Hoffmann, 2014) olarak bulunduğu çalışmalar yer almaktadır. Şeker pancarı yaprağının Dumas ve Kjeldahl yöntemleri ile belirlenen % azot miktarı ve yaprak proteinlerinin yapısında bulunan azot oranına göre  $6,25$  faktörü çarpımı ile hesaplanan % protein oranı ise Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1** Şeker pancarı yaprağının Dumas ve Kjeldahl yöntemleri ile hesaplanan protein oranı

Azot Tayini Yöntemi	%N (Kuru madde)	%Protein (%Nx6,25) (Kuru madde)
Dumas	$4,521 \pm 0,003$	$28,26 \pm 0,02$
Kjeldahl	$3,843 \pm 0,03$	$24,02 \pm 0,18$

Literatürde yer alan çalışmalarda, yaprak proteinlerinin yapısında bulunan azot oranına göre  $6,25$  faktörünün kullanıldığı bilinmektedir (Cemeroğlu, 2013; Hojilla-Evangelista et al., 2017; Cui et al., 2017; Tenorio et al., 2017; Merodio and Sabater, 1988). Bu kapsamda şeker pancarı yaprağının içerdiği % azot oranından

hesaplanan protein oranları, Dumas ve Kjeldahl yöntemleri için kuru madde bazında sırasıyla %28,26±0,02 ve %24,02±0,18 olarak bulunmuştur. Literatürde şeker pancarı yaprağının kuru madde bazında protein oranı Kjeldahl yöntemi ile %22,8 (Lammens et al., 2012; Merodio and Sabater, 1988) ve Dumas yöntemi ile %19,4 (Tenorio et al., 2017) olarak bulgulanmıştır. Çalışmada kullanılan şeker pancarı yaprağının Dumas metodu ile hesaplanan protein oranının Kjeldahl metoduna göre yüksek olduğu görülmektedir. Bir kuru yakma metodu olan Dumas yönteminin hızlı sonuç vermesi ve sert kimyasalların kullanılmaması gibi avantajları vardır (Müller, 2017). Ancak, yapılan araştırmalar, hammadde içeriğine göre değişmekle birlikte, Dumas metodunun Kjeldahl metoduna göre %1,5 oranında daha yüksek oranda sonuç verdiğini göstermiştir (Thompson et al., 2002). Bunun nedeni, Dumas yönteminde nitrit ve nitrat gibi protein olmayan azot bileşiklerinin de ölçülmesi ile toplam azot miktarının bulunmasıdır (Jung et al., 2003). Ayrıca, Simonne ve arkadaşları (1998), çeşitli sebze yaprakları için yaklaşık olarak Dumas metodu ile ölçülen azot miktarının, %25 oranında Kjeldahl metodu ile ölçülemediğini belirtmiştir. Bunun yanı sıra, çalışmada kullanılan şeker pancarı yaprağının protein oranı literatüre göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi ise, kimyasal kompozisyonun türe, coğrafi bölgelere, hasat zamanına, iklime ve toprağın özelliklerine göre farklılık göstermesidir (Han and Rowell, 1997; Molina-Alcaide and Yanez-Ruiz, 2008).

Proteinlerin kalitesini belirleyen faktörlerden biri içerdiği esansiyel amino asitler ve bu amino asitlerin ne oranda olduğudur. Bu kapsamda, şeker pancarı yaprağına amino asit kompozisyonu analizi sonucunda içerdiği esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler ve bu amino asitlerin % oranları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bunun yanı sıra, analiz sonucu bulunan değerlerin literatürde yer alan değerler ile karşılaştırılması yapılmıştır.

**Çizelge 4.2** Şeker pancarı yaprağının amino asit kompozisyonu

<b>Esansiyel Amino Asitler</b>	<b>Analiz Sonucu (g/16 g Azot)</b>	<b>Literatür (g/16 g Azot (Kiskini et al., 2016))</b>
Metiyonin	1,1	2,2
Lizin	4,2	5,7
Fenilalanin	4,9	6,0
Treonin	7,6	5,2
Valin	5,8	6,2
Lösin	10,2	9,4
İzolösin	6,6	4,9
<b>Esansiyel Olmayan Amino Asitler</b>		
Arginin	5,4	5,4
Histidin	2,4	3,1
Tirozin	2,8	4,5
Alanin	6,7	6,3
Aspartik asit	11,8	10,7
Glutamik asit	13,4	12,0
Glisin	5,9	6,4
Prolin	3,1	5,2
Serin	8,1	4,9

Şeker pancarı yaprağının, proteinlerin kalitesini belirleyen esansiyel amino asitlerden metiyonin, lizin, fenilalanin, treonin, valin, lösin ve izolösin amino asitlerini içerdiği görülmektedir. Bunun yanı sıra, şeker pancarı yaprağının bitkisel proteinlerin genelinde olduğu gibi yüksek oranda esansiyel olmayan amino asitleri içerdiği de saptanmıştır. Yüksek oranda bulunan esansiyel olmayan amino asitler, glutamik asit, aspartik asit ve serin amino asididir. Bunun yanı sıra, lösin, treonin, izolösin, valin ve fenilalanin esansiyel amino asitlerinin de önemli oranda bulunduğu saptanmıştır. Şeker pancarı yaprağında yüksek oranda bulunan bu esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitlerin metabolizmada çeşitli görevleri vardır. Özellikle, vücut tarafından sentezlenemeyen esansiyel amino asitlerin besin yoluyla alınması gerektiği için gıdanın içerdiği esansiyel amino asit miktarı oldukça önemlidir. Ticari olarak pazarda en çok satılan bitkisel protein kaynağı soya proteindir. Soyada bulunan esansiyel amino asit miktarlarına bakıldığında; %7,8

lösin, %4,8 valin, %4,5 izolösin, %4,5 fenilalanin ve %3,9 treonin içerdiği görülmektedir (Kumar et al., 2002). Çalışmada kullanılan şeker pancarı yaprağında bulunan bu amino asitlerin miktarları ise %10,2 lösin, %5,8 valin, %6,6 izolösin, %4,9 fenilalanin ve %7,6 treonin olarak belirlenmiş ve bu değerlerin soya fasulyesine göre yüksek olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, şeker pancarı yaprağının alternatif bir bitkisel protein kaynağı olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

## 4.2. Protein Tozu Eldesi

### 4.2.1. Protein Eldesi Yönteminin Belirlenmesi

Proteinlerin eldesinde kullanılan çöktürme yöntemleri, farklı hammaddelerde farklı verimlere sebep olması, seçilen hammadde için en uygun yöntemin bulunması gerekliliğini doğurmaktadır (Cui et al., 2017; Harrysson et al., 2018; Moongngarm et al., 2014).

Bu çalışmada, ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonundan önce, şeker pancarı yaprağından yüksek verimde protein eldesi için izoelektrik, amonyum sülfat ve izoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri uygulanmış ve % protein verimleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.3** Farklı protein eldesi yöntemleri ile bulunan protein verimleri

Protein Eldesinde Kullanılan Yöntem	Protein Verimi (%)
İzoelektrik Çöktürme	26,73±1,43 <sup>a</sup>
Amonyum Sülfat Çöktürme	30,71±1,19 <sup>b</sup>
İzoelektrik-Amonyum Sülfat Çöktürmesi	34,55±1,66 <sup>c</sup>

<sup>a-b-c</sup> Aynı sütunda farklı harflerle işaretlenen gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir (p< 0,05).

Çizelge 4.3'te görüldüğü üzere, izoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ile şeker pancarı yaprağındaki protein miktarının %34,31'si elde edilmiştir. Bu yöntemin ardından, %30,46 ile amonyum sülfat çöktürmesi ve %26,37 ile izoelektrik çöktürme yöntemi gelmektedir. Ayrıca, %95 güven aralığında, Duncan çoklu karşılaştırma sonucu, yöntemler arasında farkın anlamlı olduğu

görülmektedir. Literatür incelendiğinde, yüksek protein verimi veren çöktürme yönteminin hammaddenin içerdiği proteinlerin yapısına ve fraksiyonuna göre farklılık gösterdiği bilinmektedir (Hadnadev et al., 2017). Bitkisel proteinler çözünürlüklerine göre suda, tuz çözeltilerinde, alkolde ve asit veya baz çözeltilerinde çözünür olmak üzere dört sınıfa ayrılmaktadır. Özellikle, yağlı tohumlardaki depo proteinleri temel olarak globülin (tuz çözeltilerinde çözünür) ve albümin (suda çözünür) proteinlerden oluşmaktadır (Shewry et al., 1995). Dolayısıyla, baskın olan protein fraksiyonuna göre belirlenen çöktürme yöntemi ile ekstraksiyon verimi artırılabilir. Literatürde yaprak proteinleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olmakla birlikte çay yaprakları ile yapılan çalışmada, izoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ile yüksek ekstraksiyon veriminin sağlandığı belirtilmiştir (Cui et al., 2017). Sonuç olarak, şeker pancarı yaprağından protein eldesi için izoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesinin yüksek verimde protein eldesine olanak verdiği belirlenmiştir.

#### **4.2.2. Ekstraksiyon Parametrelerinin Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile Optimizasyonu**

Ekstraksiyonu etkileyen parametrelerden sıcaklık, süre ve çözelti:kati oranının protein verimine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, protein veriminin en yüksek bulunduğu optimum koşullarda, ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilerek protein tozu üretimi yapılmıştır.

##### **4.2.2.1. Ekstraksiyon Sıcaklığı, Ekstraksiyon Süresi ve Çözelti:Kati Oranının Protein Verimine Etkisi**

İzoelektrik-tuz çöktürmesi yönteminde, ekstraksiyon aşamasında proteinlerin çözüne geçmesini sağlamak ve elde edilen protein konsantrasyonunun protein oranını arttırmak amacıyla sıcaklık (25-75 °C) , süre (40-120 dk.) ve çözelti:kati oranı (15-45 mL/g) parametreleri Design Expert programı yardımı ile optimize edilmiştir. Optimizasyon, yanıt yüzey metodunun (RSM) Merkezi Birleşik Tasarımı (CCRD: Central Composite Rotatable Design) ile gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.4'te optimize edilecek ekstraksiyon parametreleri ve seviyeleri gösterilmiştir.

**Çizelge 4.4** Optimize edilen ekstraksiyon parametreleri ve seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	Faktör	Sembol	Değişkenler				
			$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Sıcaklık (°C)	X <sub>1</sub>	A	7,96	25	50	75	92,04
Süre (dk.)	X <sub>2</sub>	B	12,73	40	80	120	147,27
Çözelti:katı oranı (mL/g)	X <sub>3</sub>	C	4,77	15	30	45	55,23

Deneme deseni üçü orta nokta olmak üzere 17 deneysel noktadan oluşmaktadır. Ekstraksiyonu etkileyen bu parametrelerin optimizasyonunda, protein verimi (%) yanıt (bağımlı değişken) olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.5'te Design Expert programı ile oluşturulan deneme deseni ve bu desene bağlı analiz sonuçları verilmiştir.

**Çizelge 4.5** Yanıt yüzey yöntemi ile oluşturulan deney tasarımı

Deneme No	Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C)	Ekstraksiyon Süresi (dk.)	Çözelti:katı oranı (mL/g)	Protein Verimi (%)
1	75,00 (+1)	120,00 (+1)	15,00 (-1)	25,394
2	25,00 (-1)	120,00 (+1)	45,00 (+1)	4,045
3	75,00 (+1)	40,00 (-1)	45,00 (+1)	24,181
4	92,04 (+ $\alpha$ )	80,00 (0)	30,00 (0)	24,668
5	50,00 (0)	80,00 (0)	30,00 (0)	54,257
6	50,00 (0)	80,00 (0)	55,23 (+ $\alpha$ )	21,239
7	25,00 (-1)	120,00 (+1)	15,00 (-1)	20,726
8	7,96 (- $\alpha$ )	80,00 (0)	30,00 (0)	9,020
9	75,00 (+1)	120,00 (+1)	45,00 (+1)	15,517
10	50,00 (0)	147,27 (+ $\alpha$ )	30,00 (0)	25,050
11	75,00 (+1)	40,00 (-1)	15,00 (-1)	27,806
12	50,00 (0)	80,00 (0)	4,77 (- $\alpha$ )	28,339
13	25,00 (-1)	40,00 (-1)	15,00 (-1)	16,883
14	50,00 (0)	80,00 (0)	30,00 (0)	57,063
15	50,00 (0)	80,00 (0)	30,00 (0)	54,917
16	50,00 (0)	12,73 (- $\alpha$ )	30,00 (0)	10,353
17	25,00 (-1)	40,00 (-1)	45,00 (+1)	12,475

Çizelge 4.5'te görüldüğü üzere, protein veriminin %4,045 ile %57,063 arasında değişmektedir. Ayrıca, protein verimi için program tarafından ikinci dereceden (Quadratic) model önerilmesi, optimizasyon için uygun olduğunu göstermektedir (Azargohar and Dalai, 2005; Behera et al., 2018). Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

**Çizelge 4.6** Ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu için ANOVA tablosu

	<b>SD</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>p-değeri Prob&gt;F</b>	
Model	9	432,29	0,0004	anlamlı
A-Sıcaklık	1	310,18	0,0078	anlamlı
B-Süre	1	6,00	0,6238	
C-Çözelti:kati oranı	1	158,54	0,0336	anlamlı
AB	1	5,26	0,6457	
AC	1	7,20	0,5919	
BC	1	42,90	0,2126	
A <sup>2</sup>	1	2044,50	< 0,0001	anlamlı
B <sup>2</sup>	1	1953,48	< 0,0001	anlamlı
C <sup>2</sup>	1	1280,55	0,0001	anlamlı
Kalıntı	7	22,81		
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	5	31,08	0,0660	önemsiz
Saf Hata	2	2,15		
	<b>Katsayı</b>			
R <sup>2</sup>	0,9606			
Ayarlanmış-R <sup>2</sup>	0,9099			
Standart Sapma	4,78			

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

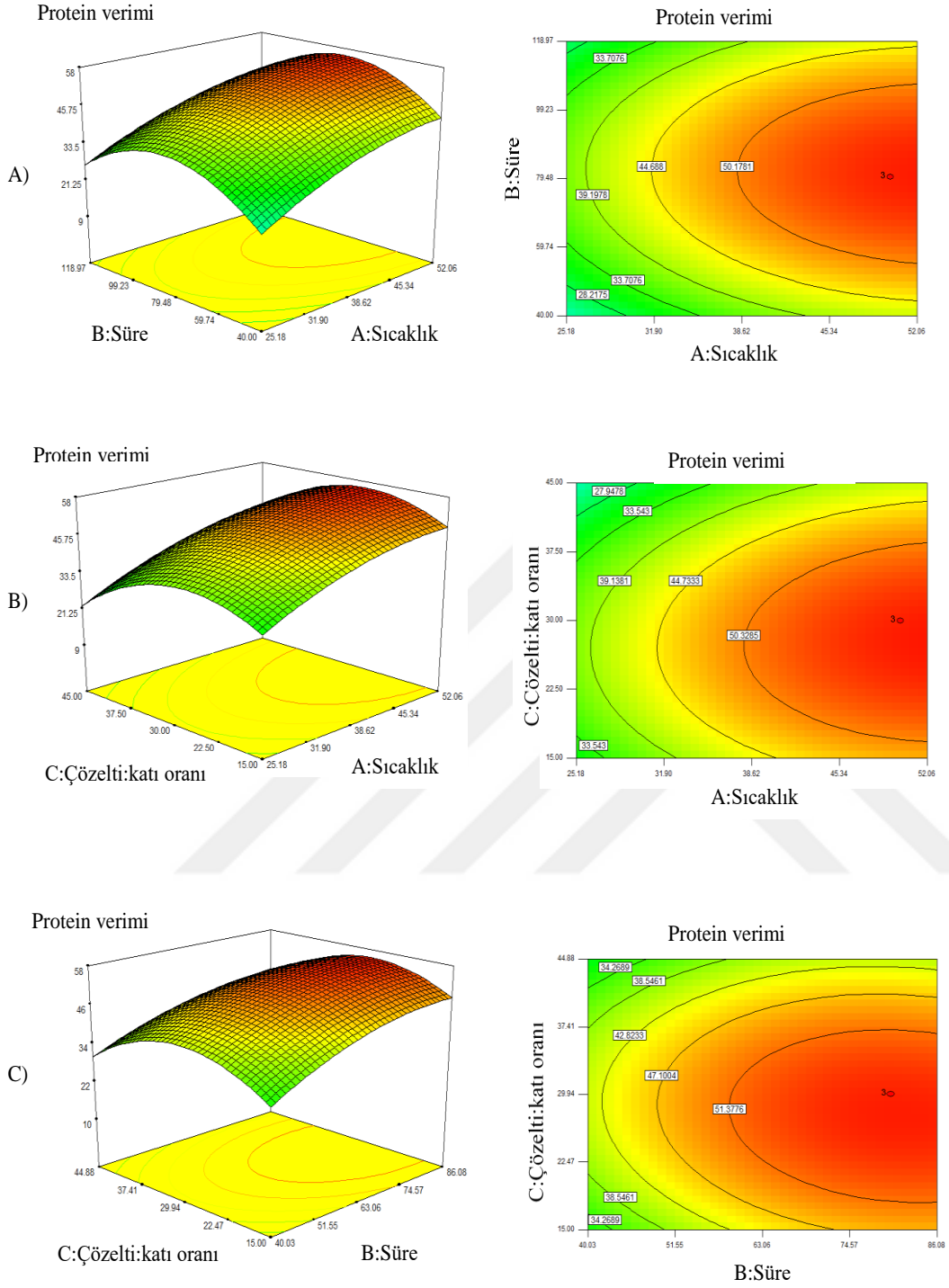
ANOVA tablosuna bakıldığında, %95 güven aralığında ( $p < 0,05$ ) modelin anlamlı olduğu ve değerler arasında uyum eksikliğinin olmadığı ( $p > 0,05$ ) görülmektedir. Ayrıca, sıcaklık ve çözelti:kati oranı parametrelerinin ve ikinci dereceden *sıcaklık x sıcaklık*, *süre x süre* ve *çözelti:kati oranı x çözelti:kati oranı* etkilerinin model için anlamlı olduğu saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Modelin anlamlılığı ve

uyum eksikliğinin önemsiz olması matematiksel modelin uygunluğunu göstermektedir (Behera et al., 2018).

Uyum katsayısı ( $R^2$ ), modelde deneysel veri değişiminin ne kadarının karşılandığını gösteren bir değer olmakla birlikte başarılı bir model için bu katsayının 0,75'in üstünde olması gerekmektedir (Le Man et al., 2010; Owolabi et al., 2018). Bu çalışmada, varyans analizi (ANOVA) sonucu, uyum katsayısının ( $R^2$ ) 0,9606 olarak bulunduğu yani model veri değişiminin %96,06'sının açıklanabildiği ve modelin bu açıdan yeterli olduğu belirlenmiştir.

İyi bir model ve doğru bir optimizasyon için uyum katsayısının yanı sıra diğer kriterlerden biri de ayarlanmış- $R^2$  değerinin de 0,8'den büyük olmasıdır (Myers et al., 2009; Rheem et al., 2017). Bu modelde ayarlanmış- $R^2$  değerinin 0,9099 olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla hem uyum katsayısı hem de ayarlanmış- $R^2$  değerinin literatürde yer alan optimizasyon kriterlerini sağladığı görülmektedir.

Sıcaklık, süre ve çözelti:katı oranının protein verimi üzerine etkisi Şekil 4.1'te gösterilmiştir. Sıcaklık, süre ve çözelti:katı oranının artması ile protein veriminin arttığı görülmektedir. Ancak, sıcaklık, süre ve çözelti:katı oranı parametrelerinin belirli bir seviyeden sonraki artışı ile protein veriminin değişmediği saptanmıştır.



**Şekil 4.1** Sıcaklık, süre ve çözelti:kati oranının protein verimine etkisi

Yanıt yüzey yönteminde protein veriminin, sıcaklık (A), süre (B) ve çözelti:kati oranı (C) parametrelerine bağlı model denklemini aşağıda verilmektedir.

$$\text{Protein verimi} = 55,36 + 4,77*A + 0,66*B - 3,41*C - 0,81*A*B + 0,95*A*C - 2,32*B*C - 13,47*A^2 - 13,16*B^2 - 10,66*C^2$$

#### 4.2.2.2. Optimizasyon

Varyans analizi (ANOVA) ile ekstraksiyon parametrelerinin protein verimine etkisi saptanmıştır. Bu aşamadan sonra, ekstraksiyon parametrelerinin en yüksek verimi verdiği optimum nokta, Design Expert programı yanıt yüzey yöntemi yardımı ile bulunmuştur. Yanıt yüzey yöntemi sonuçlarına göre 54,25 °C sıcaklık, 81,35 dakika ekstraksiyon süresi ve 27,65 mL/g çözelti:katı oranı optimum nokta olarak bulunmuştur. Ayrıca, bu noktada protein veriminin %56,0461 olması program tarafından öngörülmüştür. Yapılan doğrulama analizleri sonucu optimum noktada verim %55,15±2,82 olarak bulunmuş ve analiz sonucunun %98,37 oranında program tarafından öngörülen tahmini değeri karşıladığı saptanmıştır.

#### 4.2.3. Enzim Destekli Ekstraksiyonun Protein Verimine Etkisi

Şeker pancarı yaprağında klorofile bağlı proteinleri elde edebilmek ve verimi arttırmak amacıyla enzim destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanmış ve daha önce 'İspanaktan Ekstrakte Edilen Zn-Klorofil Türevlerinin Emülsiyon/Soğuk Jelleşme Metodu ile Mikroenkapsülasyonu' adlı tez çalışmasında kullanılan Pectinex Ultra SP-L (enzim aktivitesi 3800 PGNU/ml) enziminin kullanılmıştır (Özkan, 2014). Enzimatik ekstraksiyon işlemi, 45 °C sıcaklıkta, %8 enzim konsantrasyonunda 30 dakika boyunca uygulanmıştır (Özkan and Bilek, 2015).

Enzim kullanılmadan alkali ekstraksiyon ile şeker pancarı yaprağındaki protein miktarının %55,15±2,82'sinin, enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile ise %79,01±0,27'sinin elde edildiği saptanmıştır. Sonuç olarak, enzim destekli ekstraksiyon işlemi ile verimin %43,27 oranında arttığı gözlemlenmiştir.

Pectinex Ultra SP-L, temel olarak poligalakturonaz, pektinesteraz ve pektin trans eliminaz (PTE) enzimlerini içermekle beraber düşük oranda hemiselüloz ve selüloz aktivitelerine sahiptir (Hodzic and Shanks, 2014). Sahip olduğu pektolitik aktivite sayesinde, pektin zincirindeki glikozitik bağları parçalayarak şeker pancarı yaprağının hücre duvarının kırılmasını ve dolayısıyla ekstraksiyon veriminin artmasını sağlamıştır (Kohli et al., 2015). Aynı zamanda, içerdiği selüloz ve

hemiselülaz enzimlerinin, yapraklarda yağ birikiminin olduğu mezokarp yapısını parçaladığı ve bu sayede yapraktaki bileşenlerin serbest kalmasını sağladığı bilinmektedir (Vergara-Barberan et al., 2015).

### 4.3. Protein Tozlarına Yapılan Analizler

Şeker pancarı yapraklarından protein tozu eldesi için sırasıyla ekstraksiyon, çöktürme ve diyaliz işlemlerinin ardından dondurarak kurutma işlemi uygulanmıştır. Protein tozlarının ürün özelliklerini ve kalitesini belirlemek amacıyla yapılan analizlerin sonuçları bu bölümde verilmiştir.

#### 4.3.1. Toplam Kuru Madde, Protein, Toplam Kül ve Su Aktivitesi Tayini

Şeker pancarı yaprağından izoelektrik-amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile elde edilen protein tozlarının toplam kuru madde, protein, toplam kül ve su aktivitesi değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir.

**Çizelge 4.7** Protein tozlarına ait kuru madde, protein, kül ve su aktivitesi analiz sonuçları

<b>Toplam Kuru Madde (%)</b>	94,40±0,23
<b>Nem İçeriği (%)</b>	5,60±0,23
<b>Protein (%) -kuru madde bazında</b>	69,08±0,59
<b>Toplam Kül (%) -kuru madde bazında</b>	17,11±0,46
<b>Su aktivitesi (25 °C)</b>	0,38±0,06

Elde edilen protein tozlarının toplam kuru madde oranı %94,40 olarak bulunmuştur. Kuru madde üzerinden hesaplanan protein oranı ise %69,08 olarak saptanmıştır. Dolayısıyla kuru maddede içerdiği protein miktarı minimum %65’in üzerinde olduğu için şeker pancarı yaprağından elde edilen protein tozları protein konsantresi olarak adlandırılmaktadır (Uzzan, 1988). Protein konsantresinin kül tayini ile belirlenen mineral içeriği ise kuru madde bazında %17,11 olarak bulunmuştur. Su aktivitesi değeri 0,38 (<0,65) olarak ölçülmüştür. Bu değer, mikrobiyal gelişimi sınırlamakta ve dolayısıyla protein tozlarının uzun süre

muhafaza edilebilmesini sağlamaktadır (Potter et al., 1995). Literatür incelendiğinde, dört farklı yaprak türünden elde edilen protein konsantrelerinin toplam kuru madde oranının %94,5 ile %97,3 ve toplam kül oranının ise %9,5 ile %22,3 arasında değiştiği görülmektedir (Aletor et al., 2002). Ayrıca, soya, börülce ve fasulyeden elde edilen protein konsantrelerinin su aktivitesi değerleri sırasıyla 0,35, 0,36 ve 0,25 olarak bulunmuştur (Blaise et al., 2017). Bu nedenle, şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantrelerinin toplam kuru madde, toplam kül ve su aktivitesi değerleri bakımından literatür ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

#### 4.3.2. Protein Tozlarının Amino Asit Kompozisyonu

Proteinin kalitesini belirleyen faktörlerden biri de içerdiği amino asit bileşimidir. Çizelge 4.8’de şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantresinin amino asit dağılımı verilmiştir.

**Çizelge 4.8** Şeker pancarı yaprağı protein konsantresi amino asit dağılımı

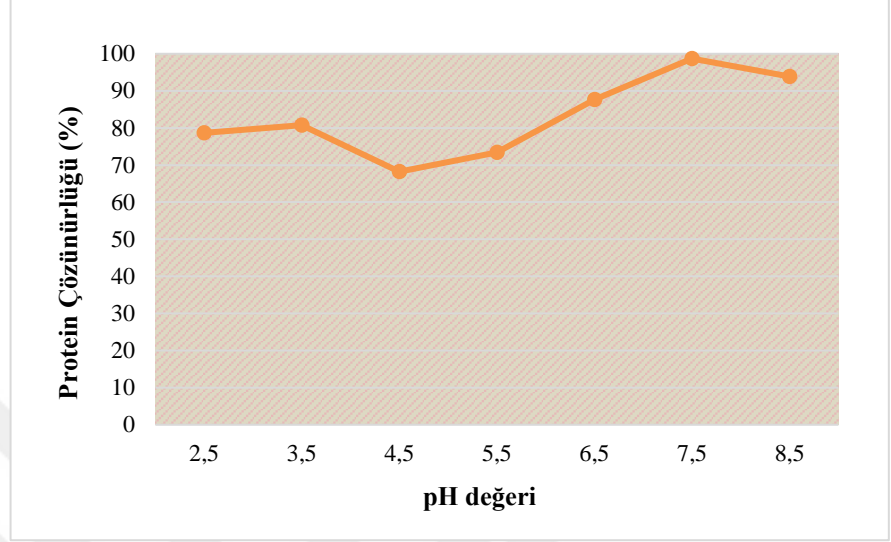
<b>Esansiyel Amino Asitler</b>	<b>Şeker pancarı yaprağı protein konsantresi</b>
Metiyonin	0,86
Lizin	1,09
Fenilalanin	3,62
Treonin	4,20
Valin	3,99
Lösin	3,30
İzolösin	3,60
<b>Esansiyel Olmayan Amino Asitler</b>	
Arginin	1,74
Histidin	0,29
Tirozin	3,02
Alanin	2,89
Aspartik asit	7,41
Glutamik asit	3,81
Glisin	2,67
Prolin	2,30
Serin	55,22

Şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantrelerinin esansiyel amino asit bileşimine bakıldığında, %4,20 ile treonin amino asidinin başı çektiği ve onu valin, fenilalanin ve izolösin amino asitlerinin izlediği görülmektedir. Özellikle, valin ve izolösin amino asitlerinin kas gelişiminde olumlu etkilerinin olması protein tozlarının gıda takviyesi olarak kullanımı açısından önemlidir (Brestensky et al., 2015). Esansiyel olmayan amino asitlerden ise serin, aspartik asit ve glutamik asit önemli oranda bulunmaktadır. Serinin, keratin ve DNA ve RNA'nın fonksiyonları için önemli olan pürin ve pirimidin sentezinde yer alması, aspartik asidin arginin, lisin, metiyonin, treonin ve izolösin sentezinde önemli rol oynaması ve glutamik asidin nörotransmitter olması, karbohidrat ve yağ metabolizmasında yer alması ve mono sodyum glutamat formunda gıda katkı maddesi olarak kullanılması şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantrelerinin kullanımını açısından olumludur (Tymchak, 2013).

Şeker pancarı yaprağı protein konsantresinin serin amino asidini %55,22 ile çok yüksek oranda içerdiği saptanmıştır. Bunun nedeni ise enzim destekli ekstraksiyon yönteminin kullanımı ile açıklanabilir. Hücre duvarı selüloz, hemiselüloz, pektin ve glikoproteinlerden oluşan oldukça kompleks bir yapıdan oluşmaktadır. Hücre duvarında bulunan başlıca glikoprotein, hidrokisprolin açısından zengin proteinler (HRGP) olup arabinogalaktan proteinler (AGP), ekstensinler (EXT) ve prolin açısından zengin proteinler (PRP) olmak üzere 3'e ayrılırlar. Arabinogalaktan proteinlerin yüksek oranda serin amino asidi içerdiği bilinmektedir (Johnson et al., 2017). Literatürde şeker pancarı posasında bulunan arabinogalaktan proteinlerinin hücre duvarındaki pektinler ile kompleks olarak bulunduğu belirtilmiştir (McKenna et al., 2006). Bunun yanı sıra, şeker pancarı yaprağındaki pektin yapısı ile posanın pektin yapısının da benzer olduğu bilgisi mevcuttur (Ismailov et al., 1980). Bu nedenle, pektolitik aktiviteye sahip Pectinex Ultra-SP-L enziminin kullanımı ile şeker pancarı yaprağındaki serin amino asidi içeren arabinogalaktan proteinlerinin ayrılmasının sağlandığı düşünülmektedir (Hijazi et al., 2014).

### 4.3.3. Protein Çözünürlüğü

pH değeri değişiminin şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantrelerinin çözünürlüğü üzerine etkisi araştırılmış ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 pH değerinin protein konsantresinin çözünürlüğü üzerine etkisi

Protein çözünürlüğünün pH değeri ile değiştiği bilinmektedir (Inyang and Iduh, 1996). Şekil 4.2’de görüldüğü üzere şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantrelerinin yüksek oranda çözünürlük gösterdiği ve pH değerlerine göre de değiştiği görülmektedir. Özellikle protein konsantrelerinin pH 7,5 değerinde %98,71 ile yüksek oranda çözünürlük göstermektedir. Protein konsantresinin çözünürlüğünün en düşük olduğu değer %68,21 ile pH 4,5 değerinin olduğu saptanmıştır. Protein çözünürlüğü, proteinlerin gıdalardaki kullanımını belirleyen özelliklerden biri olmakla birlikte emülsiyon, jelleşme ve köpürme gibi diğer fonksiyonel özellikler üzerinde de olumlu etkisi vardır (Özcan ve Delikanlı, 2011). Sonuç olarak, şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantrelerinin protein çözünürlüğünün yüksek olması, gıdalarda kullanımı açısından olumlu bir özelliktir.

### 4.3.4. Renk Tayini

Şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantrelerinin ve literatürde verilen ticari olarak satılan soya protein konsantrelerinin ölçülen CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$ ) değerleri Çizelge 4.9’da verilmiştir.

**Çizelge 4.9** Şeker pancarı yaprağı ve soya protein konsantrelerinin renk değerleri

	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
Şeker pancarı yaprağı protein konsantresi	79,55±0,03	0,33±0,02	13,27±0,02
Soya protein konsantresi (Toews and Wang, 2013)	88,40	1,10	14,56

Toz örneklerin L\* değeri 79,55±0,03, a\* değeri 0,33±0,02 ve b\* değeri ise 13,27±0,02 olarak ölçülmüştür. L\* değeri koyuluk-parlaklık, a\* değeri kırmızılık (+a\*) yeşillik (-a\*) ve b\* değeri ise mavilik (-b\*) sarılık (+b\*) şeklinde ifade edildiği bilinmektedir (Hunter, 1975). Bu bilgi ışığında, şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantrelerinin ticari olarak satılan soya konsantrelerine oranla bir miktar daha koyu olduğu görülmektedir. Şeker pancarı yaprağı protein konsantresinin koyu renkli olması hidroksil grubu içeren tirozin amino asidinin enzimatik oksidasyonu ile açıklanabilir. Tirozinin yaprakta bulunan polifenol oksidaz ile oksidasyonu sonucu oluşan melanin, koyu renk oluşumuna sebep olmaktadır (Pavlista and Ojala, 1997; Boeckx et al., 2015). Ayrıca, şeker pancarı yaprağı protein konsantrelerinin ticari olarak satılan soya protein konsantrelerine oranla düşük oranda kırmızılık ve düşük oranda sarılık gösterdiği görülmektedir. Literatür incelendiğinde, renk değerlerinin, hammaddenin sahip olduğu renk pigmentlerine (Toews and Wang, 2013), toz ürünün partikül boyutuna (Han and Khan, 1990), ekstraksiyonun gerçekleştiği pH değerine (Adebowale et al., 2007) ve protein elde etme yöntemine (Sosulski et al., 1988) göre değiştiği bulgulanmıştır. Ancak, şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantrelerinin renk açısından uygun olduğu görülmektedir.

#### **4.3.5. Yığın Yoğunluğu, Sıkıştırılmış Yığın Yoğunluğu ve Carr Endeksinin Belirlenmesi**

Şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantresinin yığın yoğunluğu, sıkıştırılmış yığın yoğunluğu ve Carr Endeksi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

**Çizelge 4.10** Şeker pancarı yaprağı protein konsantresinin yığın yoğunluğu, sıkıştırılmış yığın yoğunluğu ve Carr Endeksi sonuçları

<b>Yığın Yoğunluğu (kg/m<sup>3</sup>)</b>	80,73±0,11
<b>Sıkıştırılmış Yığın Yoğunluğu (kg/m<sup>3</sup>)</b>	99,77±1,24
<b>Carr Endeksi (%)</b>	19,08±0,91

Toz ürünlerin yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yığın yoğunluğu özellikleri ürünlerin işleme, ambalajlama ve depolamasında önemli bir role sahiptir (Chang et al., 1998). Şeker pancarı yaprağından elde edilen protein konsantresinin yığın yoğunluğu 80,73±0,11 kg/m<sup>3</sup> olarak bulunurken sıkıştırılmış yığın yoğunluğu ise 99,77±1,24 kg/m<sup>3</sup> olarak bulunmuştur. Literatür incelendiğinde, yaprak proteinlerinden elde edilen protein konsantreleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Ancak, yonca yapraklarından elde edilen proteinlerin sıkıştırılmış yığın yoğunluğunun 160 kg/m<sup>3</sup> olduğu belirtilmiştir (Wang and Kinsella, 1976). Ticari olarak satılan soya protein izolatlarının ise sıkıştırılmış yığın yoğunluğu 210 kg/m<sup>3</sup> olarak saptanmıştır (Kanu et al., 2007). Şeker pancarı yaprağından elde edilen protein tozlarının soya protein tozlarına oranla daha düşük yoğunlukta olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin, şeker pancarı yaprağından elde edilen toz ürünlerin partikül boyutunun büyük olması (Kanu et al., 2007), kullanılan alkali ekstraksiyon yöntemi (Wang and Kinsella, 1976) ve dondurarak kurutma yönteminin uygulanması (Zhang et al., 2018) ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Carr endeksi, toz ürünün akabilirlik özelliğinin yorumlanmasını sağlayan yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yığın yoğunluğu değerleri kullanılarak tespit edilen bir değerdir (Jinapong et al., 2008). Şeker pancarı yaprağından elde edilen protein tozlarının Carr indeksi %19,08±0,91 (%15-20) olarak bulunmuştur. Şeker pancarı yaprağından elde edilen protein tozlarının akabilirlik özelliği Çizelge 3.1'de yer alan tabloya göre 'iyi' olarak tanımlanmıştır.

#### 4.3.6. Partikül Yoğunluğu, Islanabilirlik ve Dağılılılık Özelliklerinin Belirlenmesi

Protein tozlarının üretiminin ardından depolama, taşıma ve işleme sırasındaki davranışlarını anlayabilmek amacıyla yapılan partikül yoğunluğu, ıslanabilirlik ve dağılılılık analiz sonuçları Çizelge 4.11’de verilmiştir.

**Çizelge 4.11** Protein tozlarının partikül yoğunluğu, ıslanabilirlik ve dağılılılık analiz sonuçları

<b>Partikül Yoğunluğu (kg/m<sup>3</sup>)</b>	826,04±2,88
<b>Islanabilirlik (s)-0,1 g toz</b>	38,17±3,40
<b>Dağılılılık (%)</b>	77,90±1,88

Partikül yoğunluğu sıvı yer değiştirmesi ile ölçülmekte ve sadece açık gözenekler hariç olmak üzere, parçacığın kütesinin hacmine bölünmesi ile ifade edilmektedir (Ortega-Rivas et al., 2006). Şeker pancarı yaprağından elde edilen protein tozlarının partikül yoğunluğu 826,04±2,88 kg/m<sup>3</sup> olarak saptanmıştır. Yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yığın yoğunluğu değerlerinde olduğu gibi literatürde yer alan protein izolatlarına göre daha düşük olduğu görülmektedir. Örneğin; süt ve peynir altı suyu protein izolatlarının partikül yoğunluğu sırasıyla 1168 kg/m<sup>3</sup> ve 1205 kg/m<sup>3</sup> olarak saptanmıştır (Schuck, 2013).

Islanabilirlik, toz ürünler ile su arasındaki etkileşimi ifade etmektedir (Fang et al., 2008). Şeker pancarı yaprağından elde edilen 0,1 gram protein tozunun ıslanma süresi 38,17±3,40 saniye olarak ölçülmüştür. Literatürde, iyi bir ıslanabilirlik özelliği için 10 gram toz için ıslanma süresinin 120 saniyenin altında olması gerektiği belirtilmiştir (Schuck et al., 2012). Çalışmada kullanılan toz miktarının 0,1 gram olduğu dikkate alındığında, şeker pancarı yaprağından elde edilen protein tozlarının iyi bir ıslanabilirlik göstermediği tespit edilmiştir. Bunun sebebi ise protein tozunun yüksek oranda protein içermesi ile açıklanabilir (Schuck et al., 2012).

Dağılılılık ise toz ürün parçacıklarının çok fazla karıştırılmadan suda dağılılılık yeteneğini ifade etmektedir (Koç et al., 2014). Şeker pancarı

yaprağından elde edilen protein tozlarının dağılılırlığı %77,90±1,88 olarak bulunmuştur. Literatür incelendiğinde, toz ürünün iyi bir dağılıma özelliği göstermesi için dağılılırlık indeksinin %95'ten büyük olması gerektiği görülmektedir. Bu bilgi doğrultusunda, şeker pancarı yaprağından elde edilen protein tozlarının protein oranının yüksek olması sebebiyle dağılılırlık açısından ıslanabilirlik özelliğinde olduğu gibi yeterli olmadığı görülmektedir (Schuck et al., 2012).



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında, bulgular doğrultusunda elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda maddeler halinde sunulmuştur:

1. Türkiye şeker pancarı üretiminde yaklaşık 19 milyon ton ile dünyada beşinci sırada yer almaktadır. Dolayısıyla, şeker pancarı üretiminin fazla olması şeker pancarının atık ürünü olan yaprağının da yüksek miktarda olmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada, gıda endüstrisi için soyaya alternatif olabilecek şeker pancarı yaprağı proteinleri bitkisel protein kaynağı belirlenmiştir. Ayrıca bu kaynaktan protein tozu üretiminin yanı sıra atık olan bir ürün olan yaprağın değerlendirilmesi yani “atıkların azaltılması ve atıktan ticarileştirilebilir bir ürün üretimi” de gerçekleştirilmektedir.

2. Soyanın alerjenik etkilere sahip olması ve soya üretiminde transgenik genlerin kullanılması gıda sanayiinde alternatif bitkisel proteinlere ihtiyaç duyulmaktadır. Şeker pancarının atık ürünü olan yaprağının kuru madde bazında %24,02±0,18 ile yüksek oranda protein içermesi ve beslenme açısından proteinin kalitesini belirleyen esansiyel amino asitlerden metiyonin, lizin, fenilalanin, treonin, valin, lösin ve izölösinin varlığı şeker pancarı yaprağının alternatif bir bitkisel protein kaynağı olmasını sağlamaktadır.

3. Literatürde proteinlerin eldesinde izoelektrik, amonyum sülfat ve izoelektrik amonyum sülfat çöktürme yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca, bu yöntemlerin hammaddeye göre protein verimini değiştirdiği bilinmektedir. Bu nedenle, seçilen hammadde için en uygun yöntemin bulunması gerekmektedir. Şeker pancarı yaprağına protein eldesi için uygulanan bu çöktürme yöntemlerinden izoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ile şeker pancarı yaprağındaki protein miktarının %34,55±1,66'sının elde edildiği saptanmıştır.

4. İzoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi yönteminin protein verimini artırmak amacıyla ekstraksiyon sıcaklığı, süresi ve çözelti:kati oranı parametreleri ile Design Expert programında matematiksel bir model oluşturulmuş ve ekstraksiyon sıcaklığı ve çözelti:kati oranının modelde önemli bağımsız değişkenler olduğu tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Ayrıca,

yanıt yüzey yöntemi sonuçlarına göre bulunan ekstraksiyon koşullarında; 54,25 °C ekstraksiyon sıcaklığı, 81,35 dakika ekstraksiyon süresi ve 27,65 mL/g çözelti:kati oranı, şeker pancarı yaprağındaki protein miktarının %55,15±2,82'si elde edilmiştir.

5. Protein verimini arttırmak ve şeker pancarı yaprağında klorofile bağlı proteinleri elde edebilmek amacıyla enzimatik ön işlem uygulanmıştır. Ticari bir enzim karışımı olan Pectinex Ultra SP-L ile şeker pancarı yaprağındaki protein miktarının %79,01±0,27'si elde edilmiş ve protein veriminin enzimsiz ekstraksiyona göre %43,27 arttırıldığı bulunmuştur.

6. Dondurarak kurutma işleminin ardından elde edilen protein tozlarının protein oranı kuru madde bazında %69,08±0,59 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, elde edilen toz ürün protein konsantresi tanımına uymaktadır. Ayrıca, şeker pancarı yaprağından elde edilen toz ürünün kalite özellikleri belirlemek amacıyla çeşitli analizler yapılmıştır. Protein tozlarının ürün kalitesi açısından olumlu özellikleri; düşük su aktivitesine sahip olması, esansiyel amino asitleri içermesi, protein çözünürlüğünün yüksek olması, renk değerlerinin uygun olması ve akabilirliğinin iyi olması olarak saptanmıştır. Ancak, yığın yoğunluğu, sıkıştırılmış yığın yoğunluğu ve partikül yoğunluğu değerlerinin soya ve diğer ticari ürünler ile karşılaştırıldığında düşük olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, şeker pancarı yaprağından protein konsantresi üretimi izoelektrik-amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu ve enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile protein verimi arttırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, daha sonraki çalışmalarda farklı enzim kullanımı ile protein ekstraksiyon verimliliğinin daha da arttırılması mümkün olabilir. Dolayısıyla farklı enzimler ile işlem koşullarının optimizasyonu konusunda çalışmalar yapılabilir. Ayrıca, bu çalışmadan hareketle elde edilen protein konsantrelerinin duyusal, renk, lezzet, tat, aroma, doku, fiziksel ve kimyasal viskozite, ekstrakte edilebilirlik, köpürme, hamurlaşma, emülsiyon jelleşme gibi fonksiyonel niteliklerinin belirlenmesi üzerinde yeni çalışmalar yapılabilir. Ayrıca, şeker pancarı protein konsantresinin farklı gıda ürünlerine

eklenmesi ve ürünün özellikleri üzerine etkilerinin ortaya çıkarılması ve geliştirilmesi sağlanabilir.

Tüm bu değerlendirmeler sonucunda ve şeker pancarı üretiminde Türkiye'nin dünyada önemli pay sahibi olduğu düşünüldüğünde, bu kaynağın bitkisel protein tozu üretimi için önemli bir alternatif olabileceği ve tüketilebilir herhangi bir meyve veya sebzededen protein tozu eldesi alanında çalışmaların yapılması gerektiği anlaşılmaktadır.



**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Adebowale, Y. A., Adeyemi, I. A., Oshodi, A. A. and Niranjan, K.,** 2007, Isolation, fractionation and characterisation of proteins from Mucuna bean, *Food Chemistry*, 104(1), 287-299.
- Agbede, J. O., Adeyeye, S. A. and Adegbenro, M.,** 2012, Nutritional, functional property and bioactive components of the leaf products from edible vegetables, Division of Nutritional Biochemistry , Dep. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(3), 741–748.
- Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W. and Rao, R. M.,** 1999, Solubilized wheat protein isolate: Functional properties and potential food applications, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1340–1345.
- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S. and Valéro, J. R.,** 2011, Extraction and analysis of polyphenols: recent trends, *Critical reviews in biotechnology*, 31(3), 227-249.
- Ak, İ. ve Uzatici, A.,** 2001, Şeker pancarı yapraklarının hayvan beslemede kullanımı, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 32(I), 95–99.
- Aletor, O., Oshodi, A. A. and Ipinmoroti, K.,** 2002, Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates, *Food chemistry*, 78(1), 63-68.
- AOAC,** 1990, Official Methods of Analysis of The AOAC, Volume 2 (No. Ed. 15), Association of Official Analytical Chemists Inc.
- Arakawa, T. and Timasheff, S. N.,** 1984, Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding, *Biochemistry*, 23(25), 5912-5923.
- Asif, M., Akram, M., Asif, H. M., Uzair, M., Akhtar, N., Madni, A. and Shah, S. M. A.,** 2011, Amino acids: A review article, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(17), 3997–4000.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Azargohar, R. and Dalai, A. K.,** 2005, Production of activated carbon from Luscar char: experimental and modeling studies, *Microporous and mesoporous materials*, 85(3), 219-225.
- Bano, M. and Sivaramakrishnan, V. M.,** 1980, Preparation and properties of L-asparaginase from green chillies (*Capsicum annum* L.), *Journal of Biosciences*, 2(4), 291–297.
- Behera, S. K., Meena, H., Chakraborty, S. and Meikap, B. C.,** 2018, Application of response surface methodology (RSM) for optimization of leaching parameters for ash reduction from low-grade coal, *International Journal of Mining Science and Technology*, 28(4), 621-629.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Gatto, G. J.,** 2015, *Biochemistry*, W.H. Freeman & Company, New York, USA, 27-65 pp.
- Berghout, J. A. M., Boom, R. M. and Van Der Goot, A. J.,** 2014, The potential of aqueous fractionation of lupin seeds for high-protein foods, *Food Chemistry*, 159, 64-70.
- Biancardi, E., McGrath, J. M., Panella, L. W., Lewellen, R. T. and Stevanato, P.,** 2010, Sugar beet, *Root and tuber crops*, Springer, New York, 173-219.
- Blaise, K., Nicolas, N. Y., Clémence, B. and Richard, K.,** 2017, Influence of spray-drying temperature on physicochemical and functional properties of protein isolates of three leguminous plants (*Canavalia ensiformis*, *Vigna unguiculata* and *Glycine max*) from Cameroon, *Cogent Chemistry*, 3(1), 1388140.
- Boeckx, T., Winters, A. L., Webb, K. J. and Kingston-Smith, A. H.,** 2015, Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization?, *Journal of Experimental Botany*, 66(12), 3571-3579.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., and 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.
- Brestensky, M., Nitrayová, S., Patrás, P., Heger, J. and Nitray, J.,** 2015, Branched chain amino acids and their importance in nutrition, *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5(2), 197.
- Burgess, R. R.,** 2009, Protein precipitation techniques, *Methods in enzymology*, 463, Academic Press, 331-342.
- Campbell, M. K. and Farrell, S. O.,** 2009, *Biochemistry*, Thomson Brooks/Cole, Belmont, CA.
- Cao, B., Fang, L., Liu, C., Min, W. and Liu, J.,** 2018, Effects of high hydrostatic pressure on the functional and rheological properties of the protein fraction extracted from pine nuts, *Food Science and Technology International*, 24(1), 53-66.
- Cemeroğlu, B.,** 2013, *Gıda Analizleri*, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara.
- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S. and Marc, I.,** 2007, Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates, *Process Biochemistry*, 42(10), 1419-1428.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Chang, K. S., Kim, D. W., Kim, S. S. and Jung, M. Y.,** 1998, Bulk flow properties of model food powder at different water activity, *International Journal of Food Properties*, 1(1), 45-55.
- Cheng, X., Bi, L. W., Zhao, Z. D. and Chen, Y. X.,** 2015, Advances in enzyme assisted extraction of natural products, *AER-Advances in Engineering Research*, 3rd ed.; Yarlagadda, P., Ed, 371-375.
- Chittapalo, T. and Noomhorm, A.,** 2009, Ultrasonic assisted alkali extraction of protein from defatted rice bran and properties of the protein concentrates, *International journal of food science & technology*, 44(9), 1843-1849.
- Choi, I. L., Choi, S. J., Chun, J. K. and Moon, T. W.,** 2006, Extraction yield of soluble protein and microstructure of soybean affected by microwave heating, *Journal of food processing and preservation*, 30(4), 407-419.
- Chove, B. E., Grandison, A. S. and Lewis, M. J.,** 2001, Emulsifying properties of soy protein isolate fractions obtained by isoelectric precipitation, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(8), 759–763.
- Cook, J. D., Morck, T. A. and Lynch, S. R.,** 1981, The inhibitory effect of soy products on nonheme iron absorption in man, *The American journal of clinical nutrition*, 34(12), 2622-2629.
- 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.
- Curtis, R. A., Prausnitz, J. M. and Blanch, H. W.,** 1998, Protein-protein and protein-salt interactions in aqueous protein solutions containing concentrated electrolytes, *Biotechnology and Bioengineering*, 57(1), 11–21.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- De Almeida, N. M., De Moura Bell, J. M. L. N. and Johnson, L. A.,** 2014, Properties of soy protein produced by countercurrent, two-stage, enzyme-assisted aqueous extraction, *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(6), 1077–1085.
- Dong, Y., Li, Q., Gao, N., Chen, X., Cheng, Y., Lu, J., Lin, F., Meng, Q. and Teng, L.,** 2012, Optimization of protein extraction from DDGS using response surface methodology and the properties of the protein, *2012 Fifth International Conference on Intelligent Computation Technology and Automation*, 242-245.
- Dumas, M.,** 1826, *Précis des événements militaires, ou essais historiques sur les campagnes de 1799 à 1814: Campagnes de 1806 et 1807; T. 5. 19*, Treuttel et Würtz.
- El-Adawy, T. A., Rahma, E. H. and Gafar, A. F,** 2001, Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates, *Food Chemistry*, 74, 455–462.
- Erbay, Z.,** 2013, Püskürtmeli kurutucuda beyaz peynir tozu üretim optimizasyonu ve peynir suyu ile maltodekstrin kullanımının ürün kalitesi ve depolama stabilitesi üzerine etkisi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Fang, Y., Selomulya, C. and Chen, X. D.,** 2008, On measurement of food powder reconstitution properties, *Drying technology*, 26(1), 3-14.
- FAO Investment Centre Division,** 2009, Sugar Beet White Sugar, *Agribusiness Handbooks*, 1–55.
- Fasuyi, A. O. and Aletor, V. A.,** 2005, Varietal composition and functional properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) leaf meal and leaf protein concentrates, *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(1), 43-49.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Feyzi, S., Milani, E. and 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.
- Fiorentini, R. and Galoppini, C.**, 1983, The proteins from leaves, *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 32(3-4), 335-350.
- Fırathgil-Durmus, E. and 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.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations Statistics (FAOSTAT)**, 2016, 'World production of Sugar Beet', <http://www.fao.org/faostat/en/#compare> (Erişim tarihi: 17 Eylül 2018).
- Food and Drug Administration (FDA)**, 2004, Food allergen labeling and consumer protection act of 2004, *Pub Law*, 108-282.
- Fujii, N., Takata, T., Fujii, N., Aki, K. and Sakaue, H.**, 2018, D-Amino acids in protein: The mirror of life as a molecular index of aging, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1866(7), 840-847.
- Gonzalez-Perez, S.**, 2003, Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins, Ph.D. thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Hadnadev, M. S., Dapcevic-Hadnadev, T. R., Pojic, M. M., Saric, B. M., Misan, A. C., Jovanov, P. T. and Sakac, M. B.**, 2017, Progress in vegetable proteins isolation techniques: A review, *Food and Feed Research*, 44(1), 11-21.
- Hames, D. and Hooper, N.**, 2005, Biochemistry (BIOS Instant Notes), Taylor and Francis, New York.
- Han, J. S. and Rowell, J. S.**, 1997, Chemical composition of fibers, *Paper and composites from agro-based resources*, 83-134.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Han, J. Y. and Khan, K.**, 1990, Physicochemical studies of pin-milled and air-classified dry edible bean fractions, *Cereal chemistry (USA)*.
- Hanmoungjai, P., Pyle, D. L. and 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.
- Harcum, S.**, 2008, Purification of protein solutions, *Biologically Inspired Textiles*, 26-43.
- Hardouin, K., Bedoux, G., Burlot, A. S., Donnay-Moreno, C., Bergé, J. P., Nyvall-Collén, P. and Bourgougnon, N.**, 2016, Enzyme-assisted extraction (EAE) for the production of antiviral and antioxidant extracts from the green seaweed *Ulva armoricana* (Ulvales, Ulvophyceae), *Algal Research*, 16, 233-239.
- Harrysson, H., Hayes, M., Eimer, F., Carlsson, N. G., Toth, G. B. and Undeland, I.**, 2018, Production of protein extracts from Swedish red, green, and brown seaweeds, *Porphyra umbilicalis* Kützinger, *Ulva lactuca* Linnaeus, and *Saccharina latissima* (Linnaeus) J. V. Lamouroux using three different methods, *Journal of Applied Phycology*, 1-16.
- Harvey, R. A. and Ferrier, D. R.**, 2010, Protein Structure and Function, *Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series)*, 40, 1-53.
- He, F. and Pan, Y.**, 2017, Purification and characterization of chalcone isomerase from fresh-cut Chinese water-chestnut, *LWT - Food Science and Technology*, 79, 402-409.
- Hijazi, M., Velasquez, S. M., Jamet, E., Estevez, J. M. and Albenne, C.**, 2014, An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture, *Frontiers in plant science*, 5, 395.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Hodzic, A. and Shanks, R.**, 2014, Natural fibre composites: materials, processes and properties. Woodhead Publishing, 77.
- Hojilla-Evangelista, M. P., Selling, G. W., Hatfield, R. and Digman, M.**, 2017, Extraction, composition, and functional properties of dried alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaf protein, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 882–888.
- Hou, Y., Yin, Y. and Wu, G.**, 2015, Dietary essentiality of “nutritionally non-essential amino acids” for animals and humans *Experimental Biology and Medicine*, 240(8), 997-1007.
- Hunter, R.**, 1975, The Measurement of Appearance, John Wiley & Sons, New York.
- Ijarotimi, O. S., Malomo, S. A., Fagbemi, T. N., Osundahunsi, O. F. and Aluko, R. E.**, 2018, Food Hydrocolloids Structural and functional properties of Buchholzia coriacea seed flour and protein concentrate at different pH and protein concentrations, *Food Hydrocolloids*, 74, 275–288.
- Inyang, U. E. and Iduh, A. O.**, 1996, Influence of pH and salt concentration on protein solubility, emulsifying and foaming properties of sesame protein concentrate, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(12), 1663-1667.
- Ismailov, Z. F., Rakhimov, D. A., Nogoibaeva, Z. R. and Shelukhina, N. P.**, 1980, Structure of sugar-beet pectin, *Chemistry of Natural Compounds*, 16(1), 28-30.
- 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.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Jiang, L., Hua, D., Wang, Z. and Xu, S.,** 2010, Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates, *Food and Bioproducts Processing*, 88(2–3), 233–238.
- Jinapong, N., Suphantharika, M. and Jamnong, P.,** 2008, Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration, *Journal of Food Engineering*, 84(2), 194–205.
- Johnson, E. A. and Brekke, C. J.,** 1983, Functional Properties of Acylated Pea Protein Isolates, *Journal of Food Science*, 48(3), 722-725.
- Johnson, K. L., Cassin, A. M., Lonsdale, A., Wong, G. K. S., Soltis, D., Miles, N. W., ... and Rothfels, C. J.,** 2017, Insights into the evolution of hydroxyproline rich glycoproteins from 1000 plant transcriptomes, *Plant physiology*, 174, 904-921.
- Jung, S., Rickert, D. A., Deak, N. A., Aldin, E. D., Recknor, J., Johnson, L. A. and Murphy, P. A.,** 2003, Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(12), 1169.
- Kalman, D.,** 2014, Amino Acid Composition of an Organic Brown Rice Protein Concentrate and Isolate Compared to Soy and Whey Concentrates and Isolates, *Foods*, 3(3), 394–402.
- Kanu, P. J., Kerui, Z., Ming, Z. H., Haifeng, Q., Kanu, J. B. and Kexue, Z.,** 2007, Sesame Protein 11: functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate as influenced by pH, temperature, time and ratio of flour to water during its production. *Asian J. Biochem*, 2(5), 289-301.
- Karaca, A. C., Low, N. and Nickerson, M.,** 2011, Emulsifying properties of canola and flaxseed protein isolates produced by isoelectric precipitation and salt extraction, *Food Research International*, 44(9), 2991–2998.

**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.
- Kiosseoglou, A., Doxastakis, G., Alevisopoulos, S. and Kasapis, S.,** 1999, Physical characterization of thermally induced networks of lupin protein isolates prepared by isoelectric precipitation and dialysis, *International Journal of Food Science and Technology*, 34(3), 253–263.
- Kiskini, A., Vissers, A., Vincken, J.-P., Gruppen, H. and Wierenga, P. A.,** 2016, Effect of Plant Age on the Quantity and Quality of Proteins Extracted from Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(44), 8305–8314. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03095>
- Kjeldahl, C.,** 1883, A new method for the determination of nitrogen in organic matter, *Anal Chem*, 22, 366.
- Koç, B., Sakin-Yilmazer, M., Kaymak-Ertekin, F. and Balkır, P.,** 2014, Physical properties of yoghurt powder produced by spray drying, *Journal of food science and technology*, 51(7), 1377-1383.
- Kohli, P., Kalia, M. and Gupta, R.,** 2015, Pectin methylesterases: a review, *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5(5), 1.
- Kramer, R. M., Shende, V. R., Motl, N., Pace, C. N. and Scholtz, J. M.,** 2012, Toward a molecular understanding of protein solubility: Increased negative surface charge correlates with increased solubility, *Biophysical Journal*, 102(8), 1907–1915.
- 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.
- L'Hocine, L. and Boye, J. I.,** 2007, Allergenicity of soybean: New developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization Technologies, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Lammens, T. M., Franssen, M. C. R., Scott, E. L. and Sanders, J. P. M.,** 2012, Availability of protein-derived amino acids as feedstock for the production of bio-based chemicals, *Biomass and Bioenergy*, 44, 168–181.
- Lamsal, B. P., Koegel, R. G. and Gunasekaran, S.,** 2007, Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins, *LWT - Food Science and Technology*, 40(9), 1520–1526.
- Le Man, H., Behera, S. K. and Park, H. S.,** 2010, Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate, *International Journal of Environmental Science & Technology*, 7(1), 157-164.
- Litwack, G.,** 2018, Metabolism of Amino Acids, *Human Biochemistry*, 359–394.
- Liu, K.,** 1997, Soybeans: chemistry, technology and utilisation, International Thompson Publisher, New York.
- Llano, D. G. and Sánchez, C. P.,** 2003, Peptides, *Encyclopedia of food sciences and nutrition*: Volumes 1-10 (No. Ed. 2), Elsevier Science BV.
- Lukaszewska, E. and Sliwinska, E.,** 2007, Most organs of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) plants at the vegetative and reproductive stages of development are polysomatic, *Sexual plant reproduction*, 20(2), 99-107.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Lv, C., Jia, X., Li, M., Yang, J. and Zhao, G.,** 2011, Optimization of Extraction Process of Crude Protein from Grape Seeds by RSM, *Food Science and Technology Research*, 17(5), 437–445.
- Lv, Y., Cai, L., Yang, M., Liu, X., Hui, N. and Li, J.,** 2017, Purification, characterisation, and thermal denaturation of polyphenoloxidase from prawns (*Penaeus vannamei*), *International Journal of Food Properties*, 20(sup3), S3345-S3359.
- Ly, Y. P., Johnson, L. A. and Jane, J.,** 1998, Soy protein as biopolymer, *Biopolymers from renewable resources*, Springer, Berlin, Heidelberg, 144-176.
- 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.
- Mack, G., Hoffmann, C. M. and Märlander, B.,** 2007, Nitrogen compounds in organs of two sugar beet genotypes (*Beta vulgaris* L.) during the season, *Field Crops Research*, 102(3), 210–218.
- Makri, E., Papalamprou, E. and Doxastakis, G.,** 2005, Study of functional properties of seed storage proteins from indigenous European legume crops (lupin, pea, broad bean) in admixture with polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, 19(3), 583-594.
- Malik, M. A. and Saini, C. S.,** 2017, Polyphenol removal from sunflower seed and kernel: Effect on functional and rheological properties of protein isolates, *Food Hydrocolloids*, 63, 705–715.
- Maloy, S.,** 2013, *Amino Acids. Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Vol. 1), Elsevier Inc.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Mane, S. P., Johnson, S. K., Duranti, M., Pareek, V. K. and Utikar, R. P.,** 2018, Lupin seed  $\gamma$ -conglutin: Extraction and purification methods-A review, *Trends in Food Science & Technology*, 73, 1-11.
- Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B. and Singhal, R. S.,** 2017, Enzyme-assisted extraction of bioactives, *Food Bioactives*, 171-201.
- Matak, K. E., Tahergorabi, R. and Jaczynski, J.,** 2015, A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods, *Food Research International*, 77, 697–703.
- McGuire, M. and Beerman, K. A.,** 2012, Protein, *Nutritional Sciences: from fundamentals to food*. Cengage Learning, 161-199.
- McKenna, C., Al-Assaf, S., Phillips, G. O. and Funami, T.,** 2006, The protein component in pectin-is it an AGP?, *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, 211(3), 264.
- 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.
- Merodio, C. and Sabater, B.,** 1988, Preparation and Properties of a White Protein Fraction in High Yield from Sugar Beet (*Beta vulgaris* L) Leaves, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44(3), 237–243.
- Meshkani, S. M., Mortazavi, S. A., Hosein, A., Rad, E. and Beigbabaie, A.,** 2016, Optimization of Protein Extraction and Evaluation of Functional Properties of Tomato Waste and Seeds from Tomato Paste Plants, *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(4), 2387-2401.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Millward, D. J.**, 1999, The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements, *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(2), 249-260.
- Moldoveanu, S. C. and David, V.**, 2013, Solutes in HPLC, *Essentials in Modern HPLC Separations*, 449–464.
- Molina-Alcaide, E. and Yanez-Ruiz, D. R.**, 2008, Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review, *Animal Feed Science and Technology*, 147(1-3), 247-264.
- Moongngarm, A., Sasanam, S., Pinsiri, W., Inthasoi, P., Janto, S. and Pengchai, J.**, 2014, Functional properties of protein concentrate from black cowpea and its application, *Am J Appl Sci*, 11(10), 1811–1818.
- Muranyi, I. S., Otto, C., Pickardt, C., Koehler, P. and Schweiggert-Weisz, U.**, 2013, Microscopic characterisation and composition of proteins from lupin seed (*Lupinus angustifolius* L.) as affected by the isolation procedure, *Food Research International*, 54(2), 1419–1429.
- Muranyi, I. S., Volke, D., Hoffmann, R., Eisner, P., Herfellner, T., Brunnbauer, M., Koehler, P. and Schweiggert-Weisz, U.**, 2016, Protein distribution in lupin protein isolates from *Lupinus angustifolius* L. prepared by various isolation techniques, *Food Chemistry*, 207, 6–15.
- Müller, J.**, 2017, Dumas or Kjeldahl for reference analysis, Comparison and considerations for nitrogen/protein analysis of food and feed, Denmark: Foss, 1-5.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C. and Anderson-Cook, C. M.**, 2009, Response surface methodology, Hoboken, *New Jersey: John Wiley & Sons, Inc*, 20, 38-44.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- 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, 309-330.
- Nadathur, S., Wanasundara, J. P. D. and Scanlin, L.,** 2016, *Sustainable protein sources*. Academic Press.
- Nahar, M. K., Zakaria, Z. and Hashim, U.,** 2013, Effect of Buffer and pH on the Protein Extraction for Chicken Meat, *Advanced Materials Research*, 795, 206-210.
- Nair, G. R., Divya, V. R., Prasannan, L., Habeeba, V., Prince, M. V. and Raghavan, G. V.,** 2014, Ohmic heating as a pre-treatment in solvent extraction of rice bran, *Journal of food science and technology*, 51(10), 2692-2698.
- 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. and Cox, M.,** 2005, *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th Ed.), W.H. Freeman and Company, New York.
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S. and Phillips, G. O.,** 2014, Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification, *Food Hydrocolloids*, 39, 301–318.
- Novak, P. and Havlicek, V.,** 2016, Protein Extraction and Precipitation, *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry* (Second Edition), 51-62.
- Omeje, K. O. and Eze, S. O. O.,** 2018, Biokemistri Properties partially purified peroxidase extracted from the fruit of *Solanum spp* . grown in Enugu North (variety A) and Plateau Central (variety B) zones of Nigeria, *Nigerian Society for Experimental Biology*, 30(1), 1–12.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ortega-Rivas, E., Juliano, P. and Yan, H.,** 2006, *Food powders: physical properties, processing, and functionality*, Springer Science & Business Media.
- Owolabi, R. U., Usman, M. A. and Kehinde, A. J.,** 2018, Modelling and optimization of process variables for the solution polymerization of styrene using response surface methodology, *Journal of King Saud University-Engineering Sciences*, 30(1), 22-30.
- Özcan, T. and Delikanlı, B.,** 2011, Gıdaların tekstürel özelliklerinin geliştirilmesinde peynir altı suyu protein katkılarının fonksiyonel etkileri, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(2), 77-88.
- Özdemir, Y., Güven, E. and Özdemir, B. A.,** 2013, Et Ürünlerinde Kullanılabilecek Soya Proteini Alternatifleri, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 8(81), 44–5144.
- Özkan, G.,** 2014, Ispanaktan ekstrakte edilen Zn-klorofil türevlerinin emülsiyon/soğuk jelleşme metodu ile mikroenkapsülasyonu, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Özkan, G. and Ersus Bilek, S.,** 2015, Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach, *Food Chemistry*, 176, 152–157.
- Paredes-Lopez, O., Ordorica-Falomir, C. and Olivares-Vazquez, M. R.,** 1991, Chickpea Protein Isolates: Physicochemical, Functional and Nutritional Characterization, *Journal of Food Science*, 56(3), 726-729.
- Patelski, P., Stanisz, M., Antczak, A., Balcerek, M., Pielech-Przybylska, K., Sapinska, E. and Dziekonska, U.,** 2015, Conversion of sugar beet leaf polysaccharides into single cell protein, *RSC Advances*, 5(27), 20961–20965.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- 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.
- Pietzak, M.**, 2012, Celiac disease, wheat allergy, and gluten sensitivity: When gluten free is not a fad, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(1), 68–75.
- Potter, N. N. and Hotchkiss, J. H.**, 1995, Food Dehydration and Concentration, *Food Science (5th edition)*, Potter and Hotchkiss (eds.), Chapman & Hall, New York, 240-243.
- Preece, K. E., Hooshyar, N. and Zuidam, N. J.**, 2017, Whole soybean protein extraction processes: A review, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 43(3), 163–172.
- Puri, D.**, 2018, *Textbook of medical biochemistry*, Elsevier Health Sciences, New Delhi, India.
- Puri, M., Sharma, D. and Barrow, C. J.**, 2012, Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37–44.
- Quanhong, L. and Caili, F.**, 2005, Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein, *Food chemistry*, 92(4), 701-706.
- 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.
- Repo-Carrasco, R.**, 1992, Andean Crops and Infant Nourishment., Report B 25 Finland: University of Helsinki, Institute of Development Studies.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Rheem, S., Rheem, I. and Oh, S.,** 2017, Response Surface Methodology Using a Fullest Balanced Model: A Re-Analysis of a Dataset in the Korean Journal for Food Science of Animal Resources, *Korean journal for food science of animal resources*, 37(1), 139.
- Saldamlı, İ. ve Temiz, A.,** 2017, Amino Asitler, Peptitler, Proteinler, *Gıda Kimyası*, Saldamlı, İ. (baş ed.), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, Türkiye, 227-317.
- Salgado, P. R., Molina Ortiz, S. E., Petrucci, S. and Mauri, A. N.,** 2011, Sunflower protein concentrates and isolates prepared from oil cakes have high water solubility and antioxidant capacity, *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 351–360.
- 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. M.,** 2013, Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals, *Industrial Crops and Products*, 43(1), 78–83.
- Sari, Y. W., Sanders, J. P. M. and Bruins, M. E.,** 2016, Techno-economical evaluation of protein extraction for microalgae biorefinery, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 31(1), 1-7.
- Schuck, P.,** 2013, Dairy Protein Powders, *Advances in Dairy Ingredients*, Wiley-Blackwell, USA, 1-29.
- Schuck, P., Jeantet, R. and Dolivet, A.,** 2012, Determination of rehydration ability, *Analytical Methods for Food and Dairy Powders*, John Wiley & Sons, Oxford, UK.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Shand, P. J., Ya, H., Pietrasik, Z. and Wanasundara, P. K. J. P. D.,** 2007, Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels, *Food Chemistry*, 102(4), 1119–1130.
- Sharma, S. and Vaidya, D.,** 2018, Kiwifruit enzyme: A new plant coagulant for the development of cottage cheese, *International Journal of Food Science and Nutrition*, 3, 6-13.
- Shen, J. L.,** 1976, Solubility profile, intrinsic viscosity, and optical rotation studies of acid precipitated soy protein and of commercial soy isolate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(4), 784-788.
- 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.
- Shewry, P. R., Napier, J. A. and Tatham, A. S.,** 1995, Seed storage proteins: structures and biosynthesis, *The plant cell*, 7(7), 945.
- Shih, F. F. and Daigle, K. W.,** 2000, Preparation and characterization of rice protein isolates, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(8), 885-889.
- 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, E. H., Harris, C. E. and Mills, H. A.,** 1998, Does the nitrate fraction account for differences between dumas-N and Kjeldahl-N values in vegetable leaves?, *Journal of plant nutrition*, 21(12), 2527-2534.
- Solanki, D. S., Kumar, S., Parihar, K., Sharma, K., Gehlot, P., Singh, S. K. and Pathak, R.,** 2018, Purification and characterization of a novel thermostable antifungal protein with chitinase activity from mung bean, *Journal of Environmental Biology*, 39(3), 406-412.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Sosulski, F., Sosulski, K. and McCurdy, A.,** 1988, Wet milling vs. air classification of field peas to isolate protein, starch and fiber, *Acta Alimentaria Polonica*, 41-49.
- Starke, P. and Hoffmann, C. M.,** 2014, Dry matter and sugar content as parameters to assess the quality of sugar beet varieties for anaerobic digestion, *Sugar Ind.*, 139(4), 232-240.
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D. and Nickerson, M. T.,** 2015, Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76(1), 31–38.
- Sun, C., Wu, W., Ma, Y., Min, T., Lai, F. and Wu, H.,** 2017, Physicochemical, functional properties, and antioxidant activities of protein fractions obtained from mulberry (*morus atropurpurea roxb.*) leaf, *International Journal of Food Properties*, 20(3), S3311–S3325.
- Tang, C. H., Ten, Z., Wang, X. S. and Yang, X. Q.,** 2006, Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8945–8950.
- Tellingén, C. V.,** 2001, Biochemistry from a phenomenological point of view, 70. Retrieved from <http://www.louisbolck.org/downloads/1282.pdf>
- Tenorio, T. A., Schreuders, F. K. G., Zisopoulos, F. K., Boom, R. M. and van der Goot, A. J.,** 2017, 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.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Toews, R. and Wang, N.**, 2013, Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses, *Food research international*, 52(2), 445-451.
- Tu, G. L., Bui, T. H. N., Tran, T. T. T., Ton, N. M. N. and Le, V. V. M.**, 2015, Comparison of enzymatic and ultrasonic extraction of albumin from defatted pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed powder, *Food technology and biotechnology*, 53(4), 479.
- Tuğrul, K. M., Kandal, A. ve Çolak, A.**, 2010, Pancar Boşaltma, Temizleme ve Yükleme Makinalarının Şeker Pancarının İç ve Dış Kalitesi ile Silo Özelliklerine Etkisi, *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 24(4), 60-69.
- Tunçay, G. Y.**, 2016, Veganism in terms of bioethics from different viewpoints, *Journal of Current Researches on Health Sector*, 6(1), 51-62.
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu)**, 2017, Diğer Bitkisel Ürünler; Yenilebilir Kök ve Yumrular. [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001) (Erişim Tarihi: 26 Eylül 2018).
- Türkşeker (Türkiye Şeker Fabrikaları A. Ş.)**, 2017, İllere göre şeker pancarı ekim ve üretimi. <https://www.turkseker.gov.tr/illereGorePancarEkimUretim.aspx> (Erişim Tarihi: 26 Eylül 2018).
- Tymchak, L. L.**, 2013, Amino Acids and Proteins, *Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations*, Lippincott Williams & Wilkins, 223-262.
- Ulloa, J. A., Villalobos Barbosa, M. C., Resendiz Vazquez, J. A., Rosas Ulloa, P., Ramírez Ramírez, J. C., Silva Carrillo, Y. and González Torres, L.**, 2017, Production, physico-chemical and functional characterization of a protein isolate from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds, *CyTA-Journal of Food*, 15(4), 497-507.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Uzzan, A.**, 1988, Vegetable protein products from seeds: technology and uses in the food industry, *Developments in food proteins*.
- Vaidya, A. M., Saxena, D. C. and Somani, V. B.**, 2017, Response Surface Methodology for Optimization of Protein Isolate Preparation from Custard Apple Seed Flour (*Annona squamosa*), *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(9), 3079-3089.
- Vargas, M., Urbá, R., Enero, R., Báez, H., Pardo, P. and Visconti, C.**, 1965, Composición de alimentos chilenos de uso en ganadería y avicultura, Santiago. Ministerio de Agricultura, Instituto de Investigación Veterinaria.
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L. and Martínez, E. A.**, 2010, Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: A review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(15), 2541–2547.
- 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.
- Vishwasrao, C., Chakraborty, S. and Ananthanarayan, L.**, 2017, Partial purification, characterisation and thermal inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase isolated from Kalipatti sapota (*Manilkara zapota*), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), 3568–3575.
- Vissers, A., Kiskini, A., Hilgers, R., Marinea, M., Wierenga, P. A., Gruppen, H. and Vincken, J. P.**, 2017, Enzymatic Browning in Sugar Beet Leaves (*Beta vulgaris* L.): Influence of Caffeic Acid Derivatives, Oxidative Coupling, and Coupled Oxidation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(24), 4911-4920.
- Waglay, A., Karboune, S. and Alli, I.**, 2014, Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties. *Food Chemistry*, 142, 373–382.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Wang, J. C. and Kinsella, J. E.**, 1976, Functional properties of novel proteins: Alfalfa leaf protein, *Journal of food science*, 41(2), 286-292.
- Wang, X., Kim, H. J., Wong, C., Vepari, C., Matsumoto, A. and Kaplan, D. L.**, 2006, Fibrous proteins and tissue engineering, *Materials today*, 9(12), 44-53.
- 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, 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.
- Yagoub, A. A., Ma, H. and Zhou, C.**, 2017, Ultrasonic-assisted extraction of protein from rapeseed (*Brassica napus* L.) meal: Optimization of extraction conditions and structural characteristics of the protein, *International Food Research Journal*, 24(2), 1-10.
- Yamazaki, T., Ogawa, T., Muramoto, K., Nakahigashi, J., Takeuchi, A. and Ueda, H.**, 2016, Isolation and Biochemical Characterization of Mucus Proteins in Japanese Bunching Onion (*Allium fistulosum*) Green Leaves, *Food Science and Technology Research*, 22(2), 235–243.
- Yücer, A., Bayaner, A. ve Polat, S.**, 2006, Ortak piyasa düzenleri alt çalışma grup raporları, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Strateji Geliştirme Başkanlığı, Ankara, 1-109.
- Zhang, R., Zhang, Y., Wu, Y., Liu, J., Ye, T. and Wang, S.**, 2018, Succinylated whey protein isolate as a sustained-release excipient of puerarin derivative oral tablets: preparation, optimization and pharmacokinetics, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 383-394.

**Zhou, Y., He, Q. and Zhou, D.,** 2017, Optimization Extraction of Protein from Mussel by High-Intensity Pulsed Electric Fields, *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), 1-8.



## ÖZGEÇMİŞ

Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olan Ayça AKYÜZ 1993 yılında Etlik (ANKARA)'de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Artvin, K.K.T.C. ve İzmir'de tamamladı. 2011 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2016 yılında 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

