

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**AYÇİÇEĞİ YAĞI KÜSPESİ VE KABAK ÇEKİRDEĞİ YAĞI KÜSPESİNDEN
PROTEİN EKSTRAKSİYONU KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zehranur TORUN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

HAZİRAN 2023

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**AYÇİÇEĞİ YAĞI KÜSPESİ VE KABAK ÇEKİRDEĞİ YAĞI KÜSPESİNDEN
PROTEİN EKSTRAKSİYONU KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Zehranur TORUN
(506201525)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK

HAZİRAN 2023

ISTANBUL TECHNICAL UNIVERSITY★ GRADUATE SCHOOL

**OPTIMIZATION OF PROTEIN EXTRACTION CONDITIONS FROM
SUNFLOWER OIL MEAL AND PUMPKIN SEED OIL MEAL**

M.Sc. THESIS,

**Zehranur TORUN
(506201525)**

Department of Food Engineering

Food Engineering Programme

Thesis Advisor: Prof. Dr. Beraat OZCELİK

JUNE 2023

İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 506201525 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Zehranur TORUN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “AYÇİÇEĞİ YAĞI KÜSPESİ VE KABAK ÇEKİRDEĞİ YAĞI KÜSPESİNDEN PROTEİN EKSTRAKSİYONU KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Derya Kahveci KARINCAOĞLU**.....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Sibel ULUATA
İnönü Üniversitesi

Teslim Tarihi : 25 Mayıs 2023
Savunma Tarihi : 22 Haziran 2023





Biricik aileme,



ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerini aktaran değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK'e

Tüm laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Elif Feyza AYDAR'a, Zehra MERDİNÇ'e ve Evren DEMİRCAN'a

Hayatım boyunca verdiğim her kararda beni destekleyen babam Hasan TORUN'a, annem Gülcihan TORUN'a ve kardeşlerime

Son olarak birlikte sayısız eğlenceli ve mutlu anılar biriktirdiğim, yoluma ışık tutan fikirleri, düşünceleri ve güzel kalpleri ile daima yanımda olmalarını dilediğim sevgili dostlarım Şeyma Ceren SANLI'ya, Emine Sultan ÇAKIR'a, Zehra ÖZATİK'e, Hale İZ'e ve Şule İZ'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, 43466 proje numarası ile İTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimince desteklenmiştir. Ayrıca tezde gerçekleştirilen hesaplamalarda "TÜBİTAK 2237-A, Proses Analizi ve Optimizasyonu (1129B372201396)" Eğitimi'nde paylaşılan bilgilerden faydalanılmıştır. Başta proje yöneticisi Doç. Dr. Erkan KARACABEY olmak üzere tüm eğitmenlere teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2023

Zehranur TORUN
(Gıda Mühendisi)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SEMBOLLER	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xix
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR.....	5
2.1 Bitkisel Proteinler ve Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri	5
2.2 Bitkisel Proteinlerin Ekstraksiyon Yöntemleri	8
2.3 Fermantasyonun Bitki Bazlı Proteinlerin Kalitesi Üzerindeki Etkisi	9
2.4 Ayçiçeği ve Yağ Küspesi	11
2.5 Ayçiçeği Yağı Küspesinin Proteinleri.....	12
2.6 Kabak Bitkisi, Çekirdeği ve Yağ Küspesi.....	14
2.7 Kabak Çekirdeği Yağı Küspesinin Proteinleri	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1 Materyal	17
3.2 Yöntem	18
3.2.1 Hammaddelerin kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi	18
3.2.2 Bitkisel protein izolatu eldesi ve ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu.....	18
3.2.2.1 Alkali ekstraksiyon.....	19
3.2.2.2 Enzim destekli ekstraksiyon.....	21
3.2.2.3 Ultrason destekli ekstraksiyon	22
3.2.2.4 Mikrodalga destekli ekstraksiyon	22
3.2.2.5 Protein izolatının kurutulması	22
3.2.2.6 Protein veriminde optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi ..	22
3.2.3 Analiz yöntemleri.....	23
3.2.3.1 Protein tayini	23
3.2.3.2 Renk analizi.....	23
3.2.3.3 Termal özelliklerin belirlenmesi	23
3.2.3.4 Protein izolatının fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi	23
3.2.4 İstatistiksel İşlem.....	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1 Ayçiçeği Yağı Küspesi.....	27
4.1.1 Kimyasal kompozisyonu	27
4.1.2 Protein izolatu eldesi ve ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu	27
4.1.2.1 Alkali ekstraksiyon.....	27

4.1.2.2 Enzim destekli ekstraksiyon.....	29
4.1.2.3 Ultrason destekli ekstraksiyon	31
4.1.2.4 Mikrodalga destekli ekstraksiyon.....	32
4.1.2.5 Protein veriminde optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi	34
4.1.3 Renk analizi.....	35
4.1.4 Termal özelliklerin belirlenmesi	36
4.1.5 Fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi	37
4.1.5.1 Su tutma kapasitesi.....	38
4.1.5.2 Yağ tutma kapasitesi	39
4.1.5.3 Emülsiyon oluşturma kapasitesi.....	39
4.1.5.4 Köpük kapasitesi	40
4.2 Soğuk Sıkım Kabak Çekirdeği Yağı Kuspesi	41
4.2.1 Kimyasal kompozisyonu	41
4.2.2 Protein izolatu eldesi	42
4.2.2.1 Alkali ekstraksiyon.....	42
4.2.2.2 Enzim destekli ekstraksiyon.....	44
4.2.2.3 Ultrason destekli ekstraksiyon	45
4.2.2.4 Mikrodalga destekli ekstraksiyon.....	47
4.2.2.5 Protein veriminde optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi	49
4.2.3 Renk analizi.....	50
4.2.4 Termal özelliklerin belirlenmesi	50
4.2.5 Fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi	51
4.2.5.1 Su tutma kapasitesi.....	52
4.2.5.2 Yağ tutma kapasitesi	52
4.2.5.3 Emülsiyon oluşturma kapasitesi.....	53
4.2.5.4 Köpük kapasitesi	54
5. SONUÇ	55
KAYNAKLAR.....	59
EKLER.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	81

KISALTMALAR

ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi
AOAC	: Resmi Analitik Kimyagerler Birliği
BSA	: Bovine serum albümin
diğ./diğ	: diğerleri
dk	: dakika
DSC	: diferansiyel taramalı kalorimetre
GRAS	: Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen
RSM	: Tepki-Yüzeyleri Metodolojisi (Response Surface Methodology)
TCA	: Trikloroasetik asit
UV/Vis	: Ultraviyole ve görünür ışık
vb.	: ve benzeri



SEMBOLLER

°C : santigrant derece

µm : mikrometre

J : joule

kcal : kilokalori

kg : kilogram

mg : miligram

mL : mililitre

N : Normalite

W : Watt



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 : Ayçiçeği küspesi için Alkali Ekstraksiyonda Box-Behnken tasarımı için bağımsız değişkenler ve seviyeler.	20
Çizelge 3.2 : Kabak çekirdeği küspesi için Alkali Ekstraksiyonda Box-Behnken tasarımı için bağımsız değişkenler ve seviyeler.	20
Çizelge 3.3 : Ayçiçeği küspesi ve kabak çekirdeği küspesi için enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyonların deneysel tasarımı için bağımsız değişkenler ve seviyeler.	21
Çizelge 4.1 : Ayçiçeği küspesi için alkali ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.	28
Çizelge 4.2 : Ayçiçeği küspesi için enzim destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.	30
Çizelge 4.3 : Ayçiçeği küspesi için ultrason destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.	31
Çizelge 4.4 : Ayçiçeği küspesi için mikrodalga destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.	33
Çizelge 4.5 : Ayçiçeği küspesi için optimum koşullardaki alkali, enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun izolat verimi ve geri kazanılan protein içeriği.	35
Çizelge 4.6 : Ayçiçeği küspesi protein izolatının termal özellikleri.	37
Çizelge 4.7 : Ayçiçeği protein izolatının termal özellikleri.	38
Çizelge 4.8 : Soğuk sıkım kabak çekirdeği küspesi için alkali ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.	42
Çizelge 4.9 : Soğuk sıkım kabak çekirdeği küspesi için enzim destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.	44
Çizelge 4.10 : Kabak çekirdeği küspesi için Faktöriyel tasarım ile ultrason destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.	46
Çizelge 4.11 : Kabak çekirdeği küspesi için Faktöriyel tasarım ile mikrodalga destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen mikrodalga gücü ve uygulama süresi ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.	48
Çizelge 4.12 : Kabak çekirdeği küspesi için optimum koşullardaki alkali, enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun izolat verimi ve geri kazanılan protein içeriği.	49
Çizelge 4.13 : Kabak çekirdeği küspesi protein izolatının termal özellikleri.	51
Çizelge 4.14 : Kabak çekirdeği küspesi protein izolatının fonksiyonel özellikleri. ..	52



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1 : Ayçiçeği yağı küspesi ve yağsızlaştırılıp öğütülmüş hali.	17
Şekil 3.2 : Soğuk pres sıkım kabak çekirdeği yağı küspesi ve öğütülmüş hali.	18
Şekil 3.3 : Ekstraksiyon yöntemin belirlenmesinde deney tasarımı.	19
Şekil 3.4 : Küspelerden protein izolat eldesi akış şeması.	21
Şekil 4.1 : Ayçiçeği küspesi için alkali ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.	29
Şekil 4.2 : Ayçiçeği küspesi için enzim destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.	30
Şekil 4.3 : Ayçiçeği küspesi için ultrason destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.	32
Şekil 4.4 : Ayçiçeği küspesi için mikrodalga destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.	34
Şekil 4.5 : Kabak çekirdeği küspesi için alkali ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.	43
Şekil 4.6 : Kabak çekirdeği küspesi için enzim destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.	45
Şekil 4.7 : Kabak çekirdeği küspesi için ultrason destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.	47
Şekil 4.8 : Kabak çekirdeği küspesi için mikrodalga destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.	49



AYÇİÇEĞİ YAĞI KÜSPESİ VE KABAK ÇEKİRDEĞİ YAĞI KÜSPESİNDEN PROTEİN EKSTRAKSİYONU KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

ÖZET

Dünyada en çok üretilen endüstriyel atıklardan biri de bitkisel matrikslerden yağ ekstraksiyonu sonrası elde edilen yan ürünler olan küspelerdir. Ayçiçeği, yağ endüstrisinde en çok kullanılan üç bitki arasında bir tohum iken, ortalama %43 oranında yağ verimi elde edilmekte ve kalan küspe hayvan yemi olarak kullanılmakta ve bu da onu sürdürülebilirlik potansiyeli yüksek bir malzeme haline getirmektedir. Kabak tohumları ise yağ ekstraksiyonu için Türkiye’de yaygın olarak kullanılsa da önemli bir potansiyel protein kaynağıdır ve sadece %25-30 oranında yağ elde edilmektedir.

Tez kapsamında, ayçiçeği yağı küspesi (*Helianthus annuus*) ve soğuk sıkım kabak çekirdeği yağı küspesi (*Cucurbita pepo*) kullanılmıştır. Küspe bir öğütücüde öğütüldü ve 450 µm’lik bir elekten geçirilerek “öğütülmüş ayçiçek yağı küspesi” ve “öğütülmüş kabak çekirdeği yağı küspesi” elde edilmiştir. Küspeler analiz çalışmaları boyunca +4°C’de muhafaza edildi.

İlk olarak üç faktörlü, üç seviyeli Box-Behnken tasarımı 8.0, 9.5 ve 11.0 pH, %0, %1 ve %2 NaCl konsantrasyonu ve %0,04, %0,12 ve %0,20 katı:çözgen oranı olarak uygulanan ayçiçeği küspesinin alkali ekstraksiyon koşullarını optimize etmek için yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM) kullanılmıştır. Ardından enzim destekli ekstraksiyonun koşullarını (%0,1 ve %2,0 selüloz enzim konsantrasyonu; 30 dk ve 120 dk enzim uygulama süresi), ultrason destekli ekstraksiyonun koşullarını (60 W ve 120 W ultrasonik güç; 1 dk ve 10 dk ultrason uygulama süresi) ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun koşullarını (140 W ve 700 W mikrodalga gücü; 1 dk ve 3 dk) optimize etmek için faktöriyel tasarım uygulanmıştır.

Ayçiçeği yağı küspesinin RSM ile optimize edilen alkali ekstraksiyonu koşulları pH 11, %0 NaCl konsantrasyonu ve %0,04 katı:çözgen oranı ve faktöriyel tasarım ile optimize edilen enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon koşulları sırasıyla %2 selüloz enzimi konsantrasyonu ve 120 dk enzim uygulama süresi, 120 W ultrason gücü ve 10 dk uygulama süresi, 700 W mikrodalga gücü ve 1 dk uygulama süresi olarak tespit edilmiştir. Ayrıca her bir ekstraksiyon yönteminde bağımsız değişkenlere bağlı olarak ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli elde edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda en yüksek protein ekstraksiyon yüzdesine sahip ultrason destekli ekstraksiyon ile ayçiçeği küspesi protein izolatu verimi ortalama %22,656 ve geri kazanılan protein ise %58,826 elde edilmiştir. Belirlenen optimum koşulda ayçiçeği protein izolatlarının denatürasyon sıcaklığı 86-126°C aralığında ve denatürasyon entalpisi 8.75 ± 1.63 J/g olarak bulunmuştur. Su tutma, yağ tutma, emülsifiye etme ve köpürme kapasitesi sırasıyla 2.78 ± 0.08 , 2.49 ± 0.04 , 58.33 ± 2.36 ve 50.00 ± 0.00 belirlenmiştir. Protein izolatın renk analizi sonucuna

göre L^* değeri $29,143 \pm 0,53$, a^* değeri $0,817 \pm 0,09$, b değeri ise $7,543 \pm 0,35$ olarak kaydedilmiştir.

Benzer şekilde, üç faktörlü, üç seviyeli Box-Behnken tasarımını 8.0, 9.5 ve 11.0 pH, %0, %4 ve %8 NaCl konsantrasyonu ve %0,030, %0,115 ve %2,000 katı:çözgen oranı olarak uygulanan soğuk sıkım kabak çekirdeği küspesinin alkali ekstraksiyon koşullarını optimize etmek için RSM kullanılmıştır. Daha sonra ayçiçeği küspesinde uygulanan aynı değerlerle enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon koşulları, faktöriyel tasarım ile optimize edilmiştir.

Soğuk sıkım kabak çekirdeği yağı küspesinin RSM ile optimize edilen alkali ekstraksiyonu koşulları pH 11, %8 NaCl ve %0,1 katı:çözgen oranı ve faktöriyel tasarım ile optimize edilen enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon koşulları sırasıyla %2 selüloz enzimi konsantrasyonu ve 30 dk enzim uygulama süresi, 120 W ultrason gücü ve 1 dk ultrason uygulama süresi, 140 W mikrodalga gücü ve 1 dk uygulama süresi olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, her bir ekstraksiyon yönteminde bağımsız değişkenlere bağlı olarak ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli elde edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda en yüksek protein ekstraksiyon yüzdesine sahip ultrason destekli ekstraksiyon ile kabak çekirdeği küspesi protein izolatu verimi ortalama %46,243 ve geri kazanılan protein ise %100 elde edilmiştir. Belirlenen optimum koşulda kabak çekirdeği protein izolatlarının denatürasyon sıcaklığı $57,60-100,57^{\circ}\text{C}$ aralığında ve denatürasyon entalpisi $15,33 \text{ J/g}$ olarak bulunmuştur. Su tutma, yağ tutma, emülsifiye etme ve köpürme kapasitesi sırasıyla $\%3,25 \pm 0,03$, $\%2,78 \pm 0,10$, $\%30,00 \pm 4,08$ ve $\%20,00 \pm 0,00$ belirlenmiştir. Kabak çekirdeği küspesinden elde edilen protein izolatın renk analizi sonucuna göre L^* değeri $69,92 \pm 0,360$, a^* değeri $-3,39 \pm 0,005$ ve b^* değeri ise $23,36 \pm 0,140$ olarak kaydedilmiştir.

OPTIMIZATION OF PROTEIN EXTRACTION CONDITIONS FROM SUNFLOWER OIL MEAL AND PUMPKIN SEED OIL MEAL

SUMMARY

One of the most produced industrial wastes in the world is meals, which are by-products obtained after oil extraction from vegetable matrices. While sunflower is a seed among the three most used plants in the oil industry, an average of 43% oil yield is obtained and the remaining pulp is used as animal feed, making it a material with high sustainability potential. Pumpkin seeds, on the other hand, are not widely used for oil extraction in Turkey, but they are an important potential protein source and only 25-30% oil is obtained.

In this thesis, sunflower oil meal (*Helianthus annuus*) and cold pressed pumpkin seed oil meal (*Cucurbita pepo*) were used. The meals were ground in a grinder and sieved through a 450 μm sieve to obtain "ground sunflower oil meal" and "ground pumpkin seed oil meal". They were stored at +4°C throughout the analysis studies.

Firstly, response surface methodology (RSM) was used to optimize the alkaline extraction conditions of sunflower meal with three-factor, three-level Box-Behnken design as pH 8.0, 9.5 and 11.0, 0% 1% and 2% NaCl concentration and 0.04%, 0.12% and 0.20% meal:solvent ratio. Then, a fractional factorial design was applied to optimize the conditions of enzyme assisted extraction (0.1% and 2.0% cellulase enzyme concentration; 30 minutes and 120 minutes enzyme treatment time), the conditions of ultrasound assisted extraction (60 W and 120 W ultrasonic power; 1 minute and 10 minute ultrasound treatment time) and conditions of microwave assisted extraction (140 W and 700 W; 1 minute and 3 minutes treatment time).

The alkali extraction conditions of sunflower oil meal optimized by response surface methodology were determined as pH 11, 0% NaCl concentration and 0.04% meal:solvent ratio. The enzyme, ultrasound and microwave assisted extraction conditions optimized with factorial design were determined as 2% cellulase enzyme concentration - 120 minutes enzyme application time, 120 W ultrasound power - 10 minutes application time and 700 W microwave power - 1 minute application time, respectively. In addition, a quadratic polynomial regression model was obtained depending on the independent variables in each extraction method. As a result of the optimization studies, the yield of sunflower meal protein isolate was 22.656% and the recovered protein was 58.826%, with ultrasound assisted extraction, which had the highest protein extraction percentage. In the optimum condition determined, the denaturation temperature of sunflower protein isolates was found to be in the range of 86-126°C and the enthalpy of denaturation was 8.75 ± 1.63 J/g. Water holding, oil holding, emulsifying and foaming capacity were determined as $2.78 \pm 0.08\%$, $2.49 \pm 0.04\%$, $58.33 \pm 2.36\%$ and $50 \pm 0.00\%$, respectively. According to the color analysis result of the protein isolate, L*, a* and b* values were recorded as 29.143 ± 0.53 , 29.143 ± 0.53 , 0.817 ± 0.09 , 7.543 ± 0.35 , respectively.

Similarly, the three-factor-three-level Box-Behnken design was applied as a pH 8.0, 9.5 and 11.0, 0% 4% and 8% NaCl concentration, and 0.030%, 0.115% and 2.00% meal:solvent ratio for cold-pressed pumpkin seed meals. Response surface methodology (RSM) was used to optimize the alkali extraction conditions. Then, enzyme, ultrasound and microwave assisted extraction conditions with the same values applied in sunflower meal were optimized by fractional factorial design.

The alkaline extraction conditions of cold pressed pumpkin seed oil meal optimized by response surface methodology were determined as pH 11, 8% NaCl and 0.1% meal:solvent ratio. The enzyme, ultrasound and microwave assisted extraction conditions optimized with factorial design were determined as 2% cellulase enzyme concentration - 30 minutes enzyme application time, 120 W ultrasound power - 1 minute ultrasound application time and 140 W microwave power - 1 minute application time. In addition, a quadratic polynomial regression model was obtained depending on the independent variables in each extraction method. As a result of the optimization studies, the yield of pumpkin seed meal protein isolate was 46.243% and the recovered protein was 100% with ultrasound assisted extraction, which has the highest protein extraction percentage. The denaturation temperature of pumpkin seed protein isolates was found to be between 57.60-100.57°C and the enthalpy of denaturation was 15.33 J/g in the determined optimum condition. Water holding, oil holding, emulsifying and foaming capacity were determined as $3.245 \pm 0.03\%$, $2.776 \pm 0.1\%$, $30 \pm 4.08\%$ and $20 \pm 0.00\%$, respectively. According to the color analysis result of protein isolate obtained from pumpkin seed meal, The alkaline extraction conditions of cold pressed pumpkin seed oil meal optimized by response surface methodology were determined as pH 11, 8% NaCl and 0.1% solid:solvent ratio. The enzyme, ultrasound and microwave assisted extraction conditions optimized with factorial design were determined as 2 % cellulase enzyme concentration - 30 minutes enzyme application time, 120 W ultrasound power - 1 minute ultrasound application time and 140 W microwave power - 1 minute application time. In addition, a quadratic polynomial regression model was obtained depending on the independent variables in each extraction method. As a result of the optimization studies, the yield of pumpkin seed meal protein isolate was 46.243% and the recovered protein was 100% with ultrasound assisted extraction, which has the highest protein extraction percentage. The denaturation temperature of pumpkin seed protein isolates was found to be between 57.60-100.57°C and the enthalpy of denaturation was 15.33 J/g in the determined optimum condition. Water holding, oil holding, emulsifying and foaming capacity were determined as $3.25 \pm 0.03\%$, $2.78 \pm 0.10\%$, $30.00 \pm 4.08\%$ and $20.00 \pm 0.00\%$, respectively. According to the color analysis result of protein isolate obtained from pumpkin seed meal, L^* , a^* and b^* values were recorded as 69.92 ± 0.360 , -3.39 ± 0.005 and 23.36 ± 0.140 , respectively.

This thesis study has revealed the potential for use of by-products and wastes produced from local soil crops grown in our country in the food industry and reemphasized that our natural resources can be used effectively. In addition, the extraction method of the protein concentrates to be formed has offered economical, environmentally friendly and clean alternatives to the traditional extraction method such as enzyme, ultrasound and microwave application for plant-based protein production. With this study, thanks to the high extraction efficiency and recovered protein yield obtained as a result of the optimization study, it is possible to obtain protein isolate from vegetable wastes, both to contribute to food sustainability and to obtain protein isolate from local crops as an alternative to soybean plant, which is the most important oilseed plant imported in

Turkey. Furthermore, this study showed that it could lead to innovative use of sunflower and pumpkin seed meal as a protein source, as a functional ingredient or as a nutritional supplement.





1. GİRİŞ

Proteinlerin özellikleri ve işlevleri nedeniyle insan bedeni için önemi bilinen bir gerçektir. Bir insanın sağlıklı bir hayat sürdürebilmesi için kilogram başına günlük yaklaşık 1,6 gram olan protein ihtiyacını tükettiği gıdalardan karşılaması gerekmektedir (Schoenfeld ve Aragon, 2018). Artan dünya nüfusuyla birlikte bireylerin bu gereksinimini karşılayacak olan gıdaya ihtiyacı da hızla artmakta, özellikle gelişmekte olan ülkelerde et tüketiminde büyük oranda yükseliş görülmektedir (UNDP, 1998). Bu durum, çevre açısından büyük risk oluşturmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne göre hayvancılığın neden olduğu sera gazı emisyonu, insanlar tarafından üretilenin %18'ine karşılık gelmektedir. Bu oran küresel olarak tüm taşımacılık sistemlerinin toplam emisyonundan fazladır (FAO, 2019). Yapılan araştırmaların sonuçlarına göre gıda ürünlerine yönelik küresel ihtiyacın 2012 ile 2050 yılları arasında %35-50 oranında artacağı tahmin edilmektedir (FAO, 2019). Bu ihtiyacı karşılamak adına bilinçsizce atılan adımlar doğal kaynakları tüketirken, iklim değişikliği, su kirliliği, biyolojik çeşitlilik kaybı gibi olumsuz çevresel sorunları doğurmaktadır. Küresel çapta et tüketiminde görülen hızlı bir artışa paralel olarak hayvancılık sektörüne ait tesisler de sürekli artmakta, yoğunlukla sürdürülebilir olmayan koşullar altında üretim yapmakta ve çeşitli çevresel etkileri ortaya çıkarmaktadır (OECD-FAO, 2019).

Son yıllarda tüketicilerin bitki bazlı beslenmeye giderek artan bir ilgisi bulunmaktadır. 'Bitki bazlı' kelimesi, New Nutrition Business'a göre 2014'ten beri ilk on küresel gıda trendi arasında yer almakta ve 2020'da ise ilk üç popüler konudan biridir (New Nutrition Business, 2020). Bu eğilimin nedenleri arasında, yukarıda bahsedildiği gibi iklim ve sürdürülebilirlik endişesi, hayvansal gıdaların tüketimine tepkiler ve tüketicinin artan sağlıklı beslenme bilinci yer almaktadır. Pahalılık, sürdürülebilir olmaması ve çevreye olumsuz etkileri nedeniyle hayvansal kaynaklı proteinlerin tüketiminin azalacağı öngörülmektedir. Aynı zamanda hayvanlardan bulaşan çeşitli salgın hastalıklar nedeniyle tüketicilerin hayvansal gıdaların güvenliği ile ilgili endişesi giderek artmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı gıda endüstrisi, hayvansal

ürünlerin bitkisel ikamelerinin üretimine yönelmiştir. Tüketiciler tarafından günden güne daha çok tercih edilen ikamelerden biri bitki bazlı et/et ürünleri, daha açık bir ifadeyle, bitkisel protein kaynakları ile ikamedir. Bitkilerden elde edilen protein ile üretilen bitkisel bazlı et alternatifleri, estetik olarak ve besin değeri açısından et ürünlerine oldukça benzer özelliklerde üretilen ürünlerdir (Broad, 2020). Bitkisel proteinleri, hayvansal proteine alternatif olarak gıda endüstrisine sunmak, su ve enerji kaynakları açısından önemli bir kazanç sağlamakta, böylece değerli gıda kaynakları korunmasına katkıda bulunmaktadır. Bitkisel protein kaynakların zengin besleyici içeriğine sahip olması, vegan, vejetaryen gibi özel tüketici grupları tarafından tercih edilmesi, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması, bitkisel proteinlerin gıda uygulamalarında kullanılması için iyi bir alternatif kaynak olmasını sağlamıştır (Balandrán-Quintana ve diğ, 2019; Çetiner ve Bilek, 2018).

Alternatif protein arayışı, bitkisel bazlı et alternatifleri üretimi için gerekli ilk adım olarak görülmektedir. Mintel GNPD kaynaklarına göre 2018 yılında ve etin ikame edildiği yeni ürünlerde en çok kullanılan bitkisel protein, buğday proteini olup soya fasulyesi ve bezelye de yaygın kullanılmaktadır. Tüketiciler tarafından en çok bilinen soyadan üretilen “tofu”, “tempeh”, “yuba”, buğday proteininden üretilen “seitan” gibi ürünlerdir (Kyriakopoulou ve diğ, 2019). Aynı zamanda, farklı teknolojiler ve uygun formülasyonlar kullanılarak mantar, buğday, bakliyatlar, kolza tohumu ve kanola gibi bitkisel ürünlerden elde edilen proteinler ile et ikamesi üretilebilmektedir (Kumar ve diğ, 2017). Ayrıca, et ikameleri için bitki kökenli proteinlerine olan ilgi artışına paralel olarak üzerinde yürütülen çalışmalar ve üretim de artmaktadır. Euromonitor verilerine göre, et ikameleri, dünya çapında 2019 yılı cirosu 16.350,0 milyon Euro iken, 2023 yılında 20.406,0 milyon Euro olması beklenmektedir.

Türkiye, iklim ve toprak koşullar yönünden birçok yağ hammaddesinin tarımına elverişlidir. Soya, kanola, yer fıstığı, pamuk, zeytin, kabak, mısır ve ayçiçeği, yağ elde edilen bitkiler içinde en çok tarımı yapılan mahsullerdir. Sürekli olarak artan tarımsal üretimin sonucunda, her yıl büyük miktarda yan ürün ortaya çıkmaktadır. Dünyada en çok üretilen endüstriyel atıklardan biri, bitkisel matrislerden yağın çıkarılmasından sonra elde edilen yan ürünler olan yağlı küspelerdir (Sivaramakrishnan ve Gangadharan, 2009). Ayçiçeği, soya fasulyesi ve kolzadan sonra dünyada en çok kullanılan üç yağ bitkisinden biridir (FAO, 2019). Ayçiçeği, yağ endüstrisi için çok önemli bir yağlı tohum iken ortalama %43 yağ verimi elde edilmekte ve geriye kalan

küspesi ise hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir (TEPGE, 2020). Ayrıca, Türkiye'nin 2018/2019 döneminde ayçiçeği yağı küspesi ihracatı yaklaşık 10 bin tonu bulmuştur (TÜİK, 2020). Kabak tohumları ise yağ ekstraksiyonu için Türkiye'de yaygın olarak kullanılsa da önemli bir potansiyel protein kaynağıdır ve sadece %25-30 oranında yağ elde edilmektedir (Bulut, 2018). Bu nedenle, bu tez doğrultusunda ayçiçek yağı küspesi ve soğuk pres kabak çekirdeği yağı küspesi üzerinde çalışma yürütüldü. Küspelerden farklı ekstraksiyon metotlarıyla elde edilen protein izolatları üretilerek yağ sanayinin yan ürünlerinden yüksek katma değeri olan bir ticari bir ürün elde edilmesi amaçlandı. Bu sayede bitkisel atıkların, tüketimi trend, global ve giderek artacak olan bitkisel protein sektöründe hammadde olarak kullanımı ve fonksiyonları araştırılarak, yağlı tohum küspeleri ve geliştirilen ekstraksiyon metodu gıda endüstrisine kazandırılmaya çalışıldı.

Bitki bazlı et ve et ürünlerin hammaddesi olarak kullanılan protein izolatları, halihazırda yurtdışından ithal edilmekte ve bu durum maliyetleri çok yükseltmektedir. Pazar payı giderek genişleyen bu sektörde en fazla kullanılan sarı bezelye ve soya gibi ithal ürünler yerine yerel hammaddelerin, bitkisel yan ürünlerin ve bitkisel atıkların kullanımını sağlamak bu tez çalışmasının öncelikli hedefleri arasındadır. Ek olarak, protein izolatu/konsantratu eldesi için yurtdışı örneklerinde sıkça kullanılan alkali ekstraksiyon ve izoelektrik çöktürme gibi metotların uygulanmasının yanı sıra, düşük maliyetli, süreyi azaltan, çevre dostu yeşil teknolojilerden olan enzim, ultrason ve mikrodalga gibi farklı yöntemler kullanılarak en yüksek verimde protein izolatu elde edilebilecek bir yöntem belirlenmiştir. Ardından, en yüksek verim veren ekstraksiyon yönteminden elde edilen protein izolatlarının protein içeriği, renk, fonksiyonel özellikleri (su tutma, yağ tutma, emülsiyon oluşturma ve köpük kapasitesi) ve termal özellikleri mevcut çalışmada sunulmuştur.



2. LİTERATÜR

2.1 Bitkisel Proteinler ve Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri

Dünya nüfusunun, 2050 yılında tahmini 9,8 milyar kişiye ulaşması beklenmektedir. Dünya nüfustaki bu hızlı artış, güvenilir ve sürdürülebilir protein kaynaklarına olan ihtiyacı da arttırmaktadır. Nüfus artışı ile gıdaya yönelik talepte %70-100 arası tahmini artış beklenmektedir (FAO, 2018). Artan dünya nüfusunun protein ihtiyacını karşılamaya çalışan hayvancılık sektörünün çevresel sürdürülebilirlik, gıda güvenliği ve küresel sağlık konuları üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır (Van Loo ve diğ, 2020). Özellikle 1980’lerde deli dana hastalığının ortaya çıkmasıyla birlikte, başta Avrupa olmak üzere dünya genelinde, et proteininin ikamesi konusu oldukça ilgi kazanmıştır (Asgar ve diğ, 2010; Morrison ve diğ, 1999). Markets and Markets’a (2020) göre, bitki bazlı et pazarının 2020’de 4,3 milyar ABD Doları değerinde olduğu ve %14’lük bir Bileşik Büyüme Hızı ile 2025 yılına kadar 8,3 milyar ABD Dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir. Mordor and Intelligence’ in (2020) raporuna göre ise bitki bazlı etler ve diğer gıdalar COVID-19 salgını sırasında güçlü bir büyüme göstermiştir ve bitki proteinlerinin pazar payı yükselmeye devam edeceği ön görülmektedir.

Tüketicilerin bitki bazlı beslenmeye giderek artan eğilimin nedenleri arasında, iklim ve sürdürülebilirlik endişesi, hayvansal gıdaların tüketimine tepkiler ve tüketicinin artan sağlıklı beslenme bilinci yer almaktadır. Bu amaçla, gıda endüstrisi, hayvansal ürünlerin bitkisel ikamelerinin üretimine yönelmiştir. Bitki proteinleri, gıda formülasyonlarında fonksiyonel bileşenler olarak hayvansal proteinlere kıyasla ekonomik ve sürdürülebilir alternatiflerdir. Gıda sanayiinde bitkisel protein izolatlarının geniş bir kullanım alanı vardır. Özellikle bebek maması formülasyonlarında, sporcu gıdalarında, medikal beslenme amaçlı kullanılan özel karışımlarda ve çeşitli proteince zengin fonksiyonel gıdaların üretiminde protein konsantrelerinin ve izolatlarının kullanımı yaygındır. Bununla birlikte, ürün yelpazesi geniş olan geleneksel et/et ürünleri ve süt/süt ürünleri için alternatif protein

kaynaklarının oluşturulmasında, gıda endüstrisinin protein konsantreleri ve izolatlarına ihtiyacı günden güne artmaktadır.

İnsan beslenmesi için çok önemli bir bileşik olan proteinin niceliği kadar fonksiyonel özellikleri de önemlidir. Gıda sistemlerindeki proteinlerin işleme, depolama, pişirme ve tüketim boyunca davranışlarını düzenleyen fiziksel ve kimyasal özelliklerine fonksiyonel özellikler denir (Kinsella, 1982). Özellikle yeni gıdaların geliştirilmesi için protein işlevselliğinin tam olarak anlaşılması gerekir. Bu nedenle, proteinin işlevselliğini belirleyen su tutma, yağ tutma, emülsiyon oluşturma ve köpük oluşturma kapasitesi özelliklerin bilinmesi gıda endüstrisi için önem arz etmektedir.

Fonksiyonel özellikler, etki mekanizmasına göre “hidrasyonla ilgili özellikler (yağ/su absorpsiyonu, çözünürlük, koyulaşma ve ıslanabilirlik), proteinin yapısı ve reoloji ile ilgili özellikler (viskozite, elastikiyet, yapışkanlık, agregasyon ve jelleştirme) ve protein yüzeyiyle bağlantılı nitelikler (kırpılabilirlik, emülsifikasyon ve köpürme aktiviteleri ve protein-lipid film oluşumu” olarak sınıflandırılmaktadır. Su tutma, yağ tutma, emülsiyon ve köpük oluşturma kapasitesi proteinlerin önemli fonksiyonel özellikleri arasında yer almaktadır.

Su tutma kapasitesi, moleküller tarafından emilen su miktarı olup, proteinlerin yerçekimine karşı suyu emme yeteneğini ölçer. İyon-dipol, dipol-dipol, dipol kaynaklı dipol ve hidrofobik etkileşimlerin tümü su bağlanmasına katkıda bulunur (Damodaran ve Paraf, 1997). Protein çözünmeden suyu bağlayabilir, böylece koyulaşmayı ve viskoziteyi artırır (Seena ve Sridhar, 2005). Bu değer, saklama koşullarının belirlenmesinde önemlidir (Nevara ve diğ, 2021).

Yağ tutma kapasitesi, bir gram protein tarafından emilebilen yağ miktarıdır. Gıda analizlerinde lezzet tutmanın önemli bir parametresidir. Bu parametre, proteinin yapısına, mevcut lipid türüne ve lipidlerin dağılımına ve stabilizasyonuna bağlıdır. Proteinlerin yağ tutma kapasitesi, mayonez gibi ürünler için çok önemli olan emülsiyon özellikleri ile ilgilidir (Escamilla-Silva ve diğ, 2003) ve et üretimi emülsifikasyonunda onaylanmış bir özelliktir (Foegeding ve Davis, 2011). Emülsifiye edici kimyasalların mevcudiyetinin yanı sıra damlacık boyutu ve dağılımı da bu kabiliyeti etkilemektedir (Hall, 1996). Yüksek yağ absorpsiyonuna sahip protein, kıyma formülasyonunda, katkı maddelerinde ve ikame maddeleri gibi farklı ürünlerin formülasyonunda kullanılabilir (Kaur ve Singh, 2007).

Emülsiyon oluşturma kapasitesi, birbirine karışmayan iki sıvının karışma özelliği olarak bilinir (Amza ve diğ, 2011) ve proteinin birim ağırlığı başına stabilize edilebilen arayüzey alanı miktarını ölçer (Boye ve diğ, 2010). Emülsifikasyon mekanizması, homojenleştirme işleminde yeni oluşan yağ damlacıklarının yüzeydeki peptitleri adsorbe etmesi yağ damlacıklarının birleşmesini önlemek için koruyucu filmler oluşturmaktadır (Dabbour ve diğ, 2019). Gıdalarda emülsifikasyon için düşük moleküler ağırlıklı yüzey aktif maddeler yerine proteinler kullanılmaktadır. Proteinlerin emülgatör olarak işlev görmesi, proteinlerin moleküler özelliklerine göre değişir; ana faktörler molar kütle, hidrofobiklik, konformasyon kararlılığı, yük ve pH, iyonik kuvvet ve sıcaklık gibi fiziko-kimyasal faktörlerdir (Kinsella, 1982). Çeşitli yağlı tohum protein izolatların emülsiyon özellikleri, partikül boyutu dağılımı veya yağ damlacığı boyutu ile de belirlenmektedir (González-Pérez ve diğ, 2005; Puppo ve diğ, 2005).

Köpükler, sıvı veya katı sürekli fazlı gaz kabarcığı dispersiyonlarıdır ve köpürme, iç ve dış kuvvetlere dayanıklı bir ara yüzey filmi oluşumunu kolaylaştırmak için geniş bir arayüz alanı gerektirir. Bir proteinin üretebileceği arayüzey alanı miktarı köpürme kapasitesi ile ölçülür (Damodaran, 2017). Bu fonksiyonel özellik, çırpılmış soslar, sufle ve beze gibi çeşitli gıdaların üretiminde çok önemli bir parametredir. Gaz halinde dağılmış fazı stabilize etmek için gerekli olan ana yüzey aktif maddeler olan proteinler, yüksek arayüzey aktivitelerinden dolayı gıdalardaki köpürmeden sorumludur. Hava/su arayüzünde viskoelastik bir bölge oluşturur ve sürekli-kohezyonlu güçlü filmler üretir (Foegeding ve Davis, 2011). Protein esnekliği, yüzey gerilimi ve fiziko-kimyasal özellikleri (hidrofobiklik, net yük ve yük dağılımı, hidrodinamik özellikler) köpürme özelliklerini etkileyen faktörlerdir (Klompong ve diğ, 2007). Proteinlerin köpürme özellikleri, protein kaynağı, işleme yöntemleri, sıcaklık, pH, protein konsantrasyonu, karıştırma süresi ve köpürme yöntemi gibi birçok faktörden etkilenir. Difüzyonu, adsorpsiyonu ve yayılmayı kolaylaştırması sayesinde çözünür protein, daha iyi köpürme özelliği için gereklidir. İyi bir köpürme ajanı, bir proteinin köpürme sırasında havayı hızla adsorbe edebilmesi ve ayrıca hava-su arayüzünde konformasyonel değişikliklere ve yeniden düzenlemeye uğraması gerekir (Vinayashree ve Vasu, 2021).

2.2 Bitkisel Proteinlerin Ekstraksiyon Yöntemleri

Bitkisel proteinlere olan talep ve ihtiyaç artmasıyla birlikte besin değeri yüksek, uygun işlevsellliğe sahip, düşük maliyetli ve çevre dostu üretimi olan potansiyel protein kaynakları araştırılmaktadır. Bitkisel proteinleri ekstrakte etmek için kullanılan yöntemler, genel olarak bu moleküllerin suda düşük çözünürlüğüne dayanmaktadır. İzoelektrik çökeltmenin yanı sıra alkali ve alkollü çözeltiler kullanılarak özütleme gerçekleştirilmektedir. Bu geleneksel tekniklerin düşük verim, yüksek pH değerleri gibi aşırı koşulların kullanılması (Prado ve diğ, 2020) ve polifenollerin oksidasyonu gibi bazı dezavantajları vardır. Polifenollerin oksidasyonunun sonucu olarak da düşük protein sindirilebilirlik ve çözünürlük, burukluk-acı tat ve renkte değişiklik gibi proteinlerin teknolojik özellikleri olumsuz etkilenmektedir. Ayrıca bu işlem süresince çevre için risk oluşturabilecek kimyasal ürünlerin bertaraf edilmesine dikkat edilmelidir (González-Pérez, 2015; Pojić ve diğ, 2018).

Protein izolatlarının üretimi için kullanılan ekstraksiyon yöntemleri, bitki hücrelerinin içinden protein salınımını sağlamak için ön aşama olarak hücre parçalanmasını gerektirmektedir. Klasik olarak hücre parçalanması öğütme gibi mekanik yöntemlerle veya ısı ve kimyasal işlemlerle gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, proteinlerin ısı veya çözen kullanıma karşı yüksek hassasiyetleri nedeniyle daha yüksek verim sağlayan ve ekstraksiyon süresi, çevresel etki, proses maliyetleri bakımından daha etkin yeni teknolojiler bulunmaktadır. Bitkisel hücre yıkımı için ultrason destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik akışkan destekli ekstraksiyon, basınçlı sıvı ekstraksiyonu ve darbeleri elektrik alanı gibi yeni teknolojiler kullanılabilmektedir (Pojić ve diğ, 2018).

Protein ekstraksiyonu etkinliği, substratın özelliklerine, kimyasal bileşime, hücre duvarı sertliğine, protein yapısına ve proteinin depolama konumuna bağlı olarak değişmektedir (De Schouwer ve diğ, 2019). Proteinler yüksek basınç ve sıcaklığa duyarlı biyomoleküller arasında yer almakta olup, yüksek basınç proteinlerin üç boyutlu yapısını bozabilmektedir (Lullien-Pellerin ve Balny, 2002). Burdějová ve diğ, (2021) badem proteinlerinin eldesi için 5 dk süreyle basınçlı su (15 MPa) uygulaması ile 40°C sıcaklıkta en yüksek verimi bildirmişlerdir. Farklı çözenlerin arasından en yüksek protein ekstraksiyon verimi fosfat- (pH 7.4), sodyum borat- (pH 8.5), ve Tris-HCl tampon (pH 8.5) çözeltileri kullanılarak elde edilmiştir.

Enzim destekli ekstraksiyon ise protein izolatu eldesinde kullanabilen bir diğerk yöntemdir. Kimyasal hidrolizasyondan farklı olarak daha düşük sıcaklıkta ve daha geniş pH aralığında çalışmaya elverişli olduğundan dolayı son yıllarda proteinlerden izolat eldesinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Ultrason uygulaması, kavitasyonel kabarcıklar üreterek yüksek basınç ve sıcaklığa sahip makroskopik ölçekte yerel sıcak noktalar oluşturarak ekstraksiyonun gerçekleşmesini sağlar. Ultrasonun, diğerk yöntemlere kıyasla avantajları, daha az zaman alması, daha az solvent kullanımı gerektirmesi ve diğerk ekstraksiyon teknikleriyle kolayca birleştirilebilmesi olarak sıralanabilir. Ultrason uygulaması ile ekstraksiyon oda sıcaklığında gerçekleştirildiğinden, gıda bileşenlerinin oksidasyonu ve bozunmasını önlenir. Termal olmayan ve yeşil bir işleme teknolojisi olarak kullanılan ultrason uygulaması, bezelye proteini, soya fasulyesi proteini, pirinç proteini ve buğday tohumu proteininin moleküler yapısını değiştirmek gibi protein modifikasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ultrason, kavitasyon etkisiyle hidrojen bağı ve elektrostatik kuvvet gibi moleküler bağları yok ederek proteinlerin yapısını değiştirebilmektedir. Bu tür modifikasyonlar, proteinlerin çözünürlüğünü, jelleşmesini, emülsiyonunu ve köpürme özelliklerini iyileştirmektedir (Li ve diğ, 2020).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon, bitkisel matrislerden biyoaktif bileşikler elde etmek için tercih edilen çevre dostu bir ekstraksiyon yöntemidir (Llompart ve diğ, 2019). Bu işlem sırasında mikrodalga ışıması, bitki hücrelerinde bulunan suyun sıcaklığını yükselterek içlerindeki basıncı artırır. Basıncıdaki bu yükselme, hücre duvarının aşınmasını sağlayarak, ekstrakte edilmek istenilen moleküllerin hızlı ve verimli bir şekilde dışarı salınmasına izin vermektedir. Bu yöntemin avantajları esas olarak ekstraksiyon süresinin, solvent tüketiminin, enerji tüketiminin ve ihtiyaç duyulan hammadde miktarının azaltılması, ekstraksiyon veriminin ise artmasıdır (Vinatoru ve diğ, 2017).

2.3 Fermantasyonun Bitki Bazlı Proteinlerin Kalitesi Üzerindeki Etkisi

Bitki bazlı proteinlerin kalitesi, sindirilebilirliklerine, amino asit içeriklerine ve fenolik bileşikler ve beslenme karşıtı bileşikler gibi besleyici olmayan bileşiklerin varlığına bağlıdır.

Bitki bazlı proteinler, hayvan kökenli proteinlere kıyasla düşük sindirilebilirliğe sahiptir. Bu nedenle, bu proteinler, gastrointestinal rahatsızlıklara yol açarak dışkıda aşırı protein atılımına neden olabilmektedir (FAO, 2013; Päivärinta ve diğ, 2020; Wu ve diğ 2022,). Bitkisel proteinlerin bu olumsuz niteliği, fermentasyon prosesi ile çözülebilir. Çünkü, fermentasyon, proteinlerin kısmen parçalanmasını sağlayarak emilmeyen proteinlerin seviyesini düşürmekte ve zayıf bağırsak emiliminin neden olduğu alerjik etkileri azaltmaktadır (Salem ve diğ, 2013; Ogodo ve diğ, 2019; Dawood ve Koshio 2020; Alrosan ve diğ, 2021b). Protein için önemli bir nitelik olan sindirilebilirlik, vücut tarafından emilen ve tutulan amino asit bileşimini yönetmekte (Moore ve Soeters, 2015) ve genellikle bir proteinin proteoliz kabiliyetini ve varlığını değerlendirmek için bir gösterge olarak kullanılmaktadır (Berrazaga ve diğ, 2019). Fermentasyon, besleyici olmayan bileşiklerin azalmasına neden olabilmektedir. Fermentasyon, proteinlerin çapraz bağlanmasını, proteolizi ve proteinlerin matrinden salınmasını teşvik ederek bitki bazlı proteinlerin sindirilebilirliğini arttırmaktadır (Chandra- Hioe ve diğ, 2016; Alrosan ve diğ, 2022c; Pranoto ve diğ, 2013; Çabuk ve diğ, 2018; Yasar ve diğ, 2020; Alrosan ve diğ, 2021b).

Bitki bazlı proteinlerde bulunan beslenme karşıtı bileşiklerin olumsuz etkisi, fermentasyon ile bertaraf edilebilmektedir (Alrosan ve diğ, 2022; Çabuk ve diğ, 2018). Fermentasyon sırasında mikroorganizmalarda bulunan enzimler, proteinler ve beslenme karşıtı bileşikler arasındaki bağların ayrılmasını sağlayarak bitki bazlı proteinlerin protein sindirilebilirliğinin ve fonksiyonel özelliklerinin artmasına neden olmaktadır.

Fermentasyonun amino asit içeriğine, protein tipine, kullanılan bakteriye ve fermentasyon koşullarına bağlı olarak protein verimi üzerinde çeşitli etkileri olduğu bilinmektedir (Pranoto ve diğ, 2013). Fermentasyon, şekerlerin parçalanması nedeniyle protein içeriğini (Çabuk ve diğ, 2018; Alrosan ve diğ, 2022c) ve tüm amino asitlerin (metiyonin ve sistein hariç) içeriğini arttırmaktadır (Jannathulla ve diğ, 2017; Çabuk ve diğ, 2018). Fermentasyon süresi arttıkça peptitlerin ve amino asitlerin serbest bırakılması, yüzey yükü, yüzey hidrofobikliği, protein sindirilebilirliği ve su-yağ tutma kapasitesi artmakta ve üçüncül yapı, katlanma ve viskozite azalmaktadır. Yanı sıra, proteinin ikincil yapısı değişmekte ve köpürme özellikleri, emülsiyon özellikleri ve besin değeri gelişmektedir (Alrosan ve diğ, 2022).

2.4 Ayçiçeği ve Yağ Küspesi

Asteraceae familyasına ait *Helianthus* cinsindeki 67 türden biri olan ayçiçeği (*Helianthus annus* L.), tek yıllık bir kültür bitkisidir. Achene olarak da bilinen ayçiçeği çekirdeği, kuru, basit, tek çekirdeklidir ve bir tohum endosperminden ve meyvenin duvarı olan yapışık bir perikarptan oluşmaktadır (Lusas, 1985).

Ayçiçeği bitkisi, yenilebilir tohumları ve yağı için yaygın olarak yetiştirilmektedir. 2017’de 47 milyon tonun oldukça üzerindeki üretimiyle dünyanın en çok üretilen dördüncü yağlı tohumudur (FAO, 2019). Yanı sıra, bitkisel yağ üretiminde dördüncü en önemli kültür ve yağlı tohum küspesi üretiminde üçüncü en önemli mahsuldür (Dantas ve diğ, 2017; Pilorgé, 2020). ABD, Ukrayna ve Arjantin, küresel üretimin %66,36’sını oluşturan başlıca ayçiçeği üreticileri olarak bilinmektedir (Dantas ve diğ, 2017).

Ayçiçeği tohumunda kabuk ve çekirdek oranı önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Yağlı tohum olmayan ayçiçeği türleri %47 kabuk içerirken yağlı tohum türlerinden %20-30 kabuk içermektedir. Tohumun bileşimi, ayçiçeği çeşidine göre değişmektedir (Salunkhe ve diğ, 1992). Ayçekirdeği bileşimi yaklaşık %15 protein, %58 toplam yağ, %3 kül ve %24 karbonhidrat olup 675 kcal toplam enerji içermektedir (Prado ve diğ, 2020). Ayçiçeği yetiştiriciliği ağırlıklı olarak yağ elde etmek ve biyoyakıt üretimi amacıyla yapılmaktadır (Dantas ve diğ, 2017).

Sürekli olarak artan tarımsal üretimin sonucunda, her yıl büyük miktarda yan ürün ortaya çıkmaktadır. Dünyada en çok üretilen endüstriyel atıklardan biri, bitkisel matrislerden yağın çıkarılmasından sonra elde edilen yağlı küspelerdir (Sivaramakrishnan ve Gangadharan, 2009). Ayçiçeği, soya fasulyesi ve kolzadan sonra dünyada en çok kullanılan üç yağ bitkisinden biridir (FAO, 2019). Kullanılan yöntemeye bağlı olarak ayçiçeği çekirdeği kırma işlemi, tohumun %25 ila %33’ünü yağa dönüştürmektedir (Kartika ve diğ, 2010). Ardından, ayçiçeği küspesine hekzan veya metanol gibi çözücü ilavesiyle yeni bir ekstraksiyon işlemi uygulanır ve yan ürün olarak yağı alınmış ayçiçeği küspesi/keki elde edilir. Yağ ekstraksiyonu sonucunda üretilen küspe, işlenmiş tohumun kütlesinin yaklaşık %36’sını temsil etmekte (Yegorov ve diğ, 2019) ve yem hammaddesi olarak değerlendirilmektedir.

Ayçiçek yağı üretimi dünya nüfusundan daha hızlı büyümektedir ve bu anlamda yağın rafine edilmesi sırasında oluşan tortunun doğru bir şekilde atılması gerekmektedir

(Carré ve Pouzet, 2014). 2017 yılında 19 milyon ton ayçiçeği yağı küspesi üretilmiştir (Karefyllakis ve diğ, 2019). Halihazırda bu yan ürün hayvan yemi veya toprakta gübre olarak kullanılmakta veya atılmaktadır (Dabbour ve diğ, 2019; Anal, 2018; Teh ve Bekhit, 2015). Bununla birlikte, ayçiçek yağı küspesi, fazla miktarda üretilmesi, yüksek besin değeri ve rekabetçi fiyatları nedeniyle birçok endüstriyel proseste hammadde olarak kullanımı söz konusu olabilecek potansiyel üründür (Salgado ve diğ, 2012). Ülkemizde en fazla ekim alanı ve üretime sahip yağlı tohumlu bitki olan ayçiçeği, yağ endüstrisi için çok önemli bir yağlı tohum iken ortalama %43 yağ verimi elde edilmekte ve geriye kalan küspesi ise hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir (TEPGE, 2020). Ayrıca, Türkiye'nin 2018/2019 döneminde ayçiçeği yağı küspesi ihracatı yaklaşık 10 bin tonu bulmuştur (TÜİK, 2020).

Ayçiçeği yan ürünü, protein (%30-63), kül (%6-9,5), yağ (%1,0-5,6), polifenoller (%2-5) açısından zengindir. Bu yönüyle kimya, ilaç ve gıda endüstrilerindeki uygulamalar için dikkat çekmektedir. Ayçiçeği küspesi, esas olarak albüminler (%17-30), globülinler ve oleosinler (González-Perez, 2015) dahil olmak üzere diğer küçük proteinleri içerir ve protein içeriği (%30-50) yüksektir. Halihazırda literatürdeki birçok çalışmada rapor edildiği gibi ayçiçeği küspesi içeriği, ekmek, tortilla, krep, kek, kurabiye, çubuk kraker, makarna, protein barlar ve tahıl gevreği gibi unlu mamullerde besinsel, teknolojik ve duyuşal özelliklerini değiştirerek bir bileşen olarak uygulanabilmektedir (Manchuliansau ve Tkacheva, 2019). Ayçiçeği küspesi bileşenlerinin bu şekilde uygulanması, çoğunlukla diğer meyve yan ürünlerine kıyasla yüksek protein içeriği ve küçük parçacık boyutu sayesinde gerçekleşmektedir (Grasso ve diğ, 2020; Manchuliansau ve Tkacheva, 2019).

2.5 Ayçiçeği Yağı Küspesinin Proteinleri

Yağlı tohumlar, bitkisel proteinlerinin en önemli kaynağıdır. Soya proteini, gıdalarda işlevsel bir bileşen olarak kullanılan ana yağlı tohum proteinidir. Ayrıca son yıllarda kullanılan bezelye, nohut, acı bakla, kolza tohumu, ayçiçeği vb. ürünler, soyanın üretilmediği veya çok az üretildiği bölgelerde yaygın olarak bulunabilmeleri sebebiyle uygun diğer protein kaynaklarıdır (Hanson, 1974; Mart'inez, 1979; Bodwell ve Petite, 1983). Özellikle ayçiçeği, yağ çıkartma işleminde yaygın olarak kullanılmasından dolayı hem bitki yetiştiriciler hem de üreticiler tarafından yaygın olarak bilinmektedir. Ek olarak, düşük miktarlarda beslenme karşıtı faktörler (proteaz inhibitörleri,

siyanojenler ve glukosinolatlar gibi) içermekte ve amino asit bileşimlerinin (lizin hariç) Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) modeline uygun olması, ayçiçeği tohumlarının önemli avantajlarıdır (Gassmann, 1983).

Türkiye’de ticari olarak yeterince değerlendirilemeyen ayçiçek küspesi çoğunlukla yakacak, gübre veya yaklaşık 535.000 ton ile dünya ortalamasında 6. sırada yer almaktadır (USDA, 2016). Ayçiçek küspesi de prina gibi lignoselülozik lif, protein ve mineraller içermektedir. Prinanın aksine ayçiçek küspesinin protein miktarı yüksek olup, ortalama %32 olarak bildirilmiştir (Lomascolo ve diğ, 2012). 1000 kg ayçiçek çekirdeğinin yağ için işlenmesinden 560-640 kg küspe oluşmaktadır (FAO, 2016). Ayçiçek küspesinde antioksidan (Ren ve diğ, 2010), antihipertansif (Megías ve diğ, 2004), antihiperglisemik ve hipokolesterolemik (Taha ve diğ, 2014) ve bakır-şelatlama özelliğindeki peptitleri (Megías ve diğ, 2007, 2008) inceleyen çalışmalar literatürde mevcuttur.

Ayçiçeği küspesi protein izolatu biyomoleküllerin besinsel açıdan zengin olmaları, yağ ve su emme gibi fonksiyonel ve teknolojik özelliklerinin yanı sıra köpürme ve jelleşme özelliklerinin daha yüksek olması sayesinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bu nedenle önemli bir bitkisel protein olarak görülmekte ve bu proteine olan talep artmaktadır. Ayçiçeği proteinlerinin gıda bileşenleri olarak kapsamlı bir şekilde değerlendirildiği (Lusas, 1985; Dudonis ve Lasztity, 1986) çalışmalara göre gıdalarda hala sadece bazı küçük uygulamalar bulunmaktadır. Bu uygulamalar temel olarak gıdaların ayçiçeği unu ile zenginleştirilmesi, özellikle et ve süt ürünleri, bebek formülleri, unlu mamuller ve makarna ürünleri ile ilgilidir (Salunkhe ve diğ, 1992).

Ayçiçeği yan ürününden elde edilen protein hidrolizatları ve peptitler, insan sağlığında önemli biyolojik aktiviteler olan antioksidan (Dabbour ve diğ, 2019a, 2019; Habinshuti ve diğ, 2019; Megías ve diğ, 2009; Prado ve diğ, 2020) ve antihipertansif (Dabbour ve diğ, 2020; Luo ve He, 2018; Megías ve diğ, 2009) aktiviteler, anti-inflamatuar ve immün modüle edici etkiler (Velliquette ve diğ, 2020) göstermektedir. Aynı zamanda, toksisite belirtilerinin neden olduğu hiçbir yan etki göstermemekte (Canistro ve diğ, 2017) ve hardal kepeğindeki glikosilatlar, soya kepeğindeki proteaz inhibitörleri veya pamuk küspesindeki gossipol gibi protein açısından zengin diğer kaynaklara göre daha düşük antinutrisyonel bileşen içeriğine sahiptir (González-Pérez ve Vereijken, 2007).

Ayçiçeği protein izolatlarının fonksiyonel özelliklerini iyileştirmek için modifikasyonu, endüstriyel uygulamalarını artırmak adına alternatif bir yaklaşım olarak görülmektedir (Abu ve diğ, 2006; Jambrak ve diğ, 2008). Ultrason uygulaması kullanılarak yapılan modifikasyon, proteinleri değiştirmek için hızlı, verimli ve uygun maliyetli bir yöntemdir.

2.6 Kabak Bitkisi, Çekirdeği ve Yağ Küspesi

Kabak bitki ailesi, Cucurbita cinsine ait 12 tür içerir ve bunların ekonomik açıdan önemli dört türü Cucurbita moschata, C. maxima, C. pepo ve C. Mixta'dır (Xanthopoulou ve diğ, 2009, Caili ve diğ, 2006). Kabak bitkisinin içerisinde kabak çekirdeği denilen tohumlar bulunmaktadır. Türkiye'de kabak çekirdeği çoğunlukla Cucurbita pepo L. türü bitkisinin tohumlarından elde edilmektedir.

Dünyada kabak çekirdeği üretiminin en fazla yapıldığı yerler arasında sırasıyla Çin, Hindistan, Rusya ve Amerika Birleşik Devletleri yer almaktadır. Kabak çekirdeği kuruyemiş olarak kullanımının yanı sıra bir sanayi ürünüdür. Gıda sektöründe çikolata, şekerleme, yağ elde etme, ekmek ve pasta sanayinde kullanılması gibi geniş bir yelpazede değerlendirilmektedir. Tohum çekirdekleri bazı gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır ve kabak çekirdeği proteinleri ve yağlarının besin değeri hakkında çeşitli raporlar mevcuttur (Lazos, 1986; Al-Khalifa, 1996). Bazı kabakgil türlerinin orijin merkezi olan Türkiye'de, Cucurbitaceae familyasına ait olan kabak türlerinin büyük bir bölümü rahatlıkla yetiştirilmektedir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) 2018 yılı verilerine göre (TÜİK, 2018), Türkiye'de 737 bin 891 dekar alanda ekimi yapılan çerezlik kabaktan 55 bin ton ürün elde edilmektedir. Türkiye'de kabak çekirdeği üretimi, İç Anadolu Bölgesinde bulunan illerde daha yüksek olup Kayseri, Nevşehir, Aksaray, Karaman, Eskişehir ve Konya'da üretimi geniş çapta yapılmaktadır (Park Seed, 2011).

Kabak bitkisinin çekirdeğinde türe göre değişen %35-50 oranında yağ, %25-40 oranında protein, %25 oranında karbonhidrat, diyet lifi, vitaminler ve mineral maddeler bulunmaktadır (Abak ve diğ, 1997; Alfawaz, 2004). Kabak çekirdeğinin potansiyel sağlık etkileri son yıllarda öne çıkmıştır. Kabak çekirdeğinin, kolesterolü düşürmede, prostat hastalıklarını önlemede, antikanser ve antienflamatuar özelliklerde ve bağışıklığı iyileştirmede olumlu etkileri vardır. Aynı zamanda fitosteroller, vitaminler ve polisakkaritler bakımından zengindir ve tıp, gıda, kimya ve yem

endüstrisi açısından önem kazanmıştır (Ferreira ve diğ, 2019). Kabak çekirdeği yağının ülkemizde de tüketiminin artacağı beklenmektedir.

Kabak çekirdeği yağı hem Türkiye'nin Orta Anadolu Bölgesi'nde hem de dünyada çok yaygın olarak kullanılan bir yağdır. Kabak çekirdekleri özellikle Avrupa'da Avusturya, Macaristan, Çek Cumhuriyeti, İtalya ve İspanya gibi ülkelerde yağı için yetiştirilmekte ve son 5 yıldır kabak çekirdeği yağının popülerliği ve kullanımı hızla artmaktadır (Bulut, 2018). Bu ülkelerde üretilen kabak çekirdeklerinin yağ içerikleri yaklaşık %50 civarındadır (Murkovic ve diğ, 1996; Fidan, 2010).

Kabak çekirdeğinin yağı çıkarıldıktan sonra kalan küspenin ticari değeri oldukça düşük olup, büyük oranda hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Kabak çekirdeği küspesi, klorojenik asit içermez ve bu nedenle gıda ürünlerinin organoleptik ve besinsel kalitesini etkilememektedir (Gao ve diğ, 2021). Kabak çekirdeği, beslenme açısından iyi dengelenmiş proteinler içeren zengin bir kaynak olup literatürde protein eldesi amacıyla kabak çekirdeğinin genelde bütün halde değerlendirildiği görülmektedir (Bučko ve diğ, 2015, 2016).

2.7 Kabak Çekirdeği Yağı Küspesinin Proteinleri

Tarımsal-endüstriyel yan ürünlerin protein üretimi için kullanılması, bu yan ürünlere ticari değer katacak sürdürülebilir bir alternatiftir (Helkar ve diğ, 2016). Kabak çekirdeğinin yağı çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspe, içerdiği yüksek protein miktarı dolayısıyla potansiyel protein kaynağıdır (Lazos, 1992).

Kabak çekirdeğindeki ana proteinler, depolanan tuzda çözünen globulinlerin (cucurbitin) yanı sıra albüminler, glutelinler ve prolaminlerden oluşur (Marcone ve diğ, 1998). Kabak çekirdeğinden elde edilen birçok protein ayrıca antidiyabetik, antifungal, antibakteriyel, antienflamatuar ve antioksidan aktiviteler gibi farmakolojik özellikler de gösterir (Caili ve diğ, 2006).

Kabak çekirdeği küspesinin %60-65 gibi yüksek bir protein içeriğine sahip olması, onu bitki kaynaklı çekici ve gelecek vaat eden bir protein kaynağı yapmaktadır. Literatürdeki sonuçlara göre, kabak çekirdeği, proteininin zengin esansiyel aminoasit içeriği bakımından soya fasulyesine benzer olduğu görülmüştür (Nwokolo & Sim, 1987).

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, kabak (*Cucurbita maxima*) tohum proteininin sıralı ekstraksiyonu ve karakterizasyonu ile kabak (*Cucurbita pepo*) tohumundan protein izolatının çözünürlük, emülsifiye edici özellikleri ve termal özellikleri üzerine sadece birkaç çalışma yapılmıştır (Rezig ve diğ, 2013, Bucko ve diğ, 2015). Bununla birlikte, *Cucurbita moschata*'nın tohum proteinlerinin karakterizasyonu, fonksiyonel ve beslenme özellikleri hakkında çok fazla rapor bulunmamaktadır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışması kapsamında bitkisel protein izolatı eldesi için hammadde olarak ayçiçeği yağı küspesi (*Helianthus annuus*) ve soğuk sıkım kabak çekirdeği yağı küspesi (*Cucurbita pepo*) kullanılmıştır. Protein izolatının eldesi için kullanılan ayçiçeği yağı küspesi Sunar Yağ'dan ve soğuk pres sıkım kabak çekirdeği yağı küspesi mısır çarşısındaki Taş Bağı adlı aktardan temin edilmiştir.

Küspeler bir öğütücüde (IKA A11 basic markalı) öğütüldükten sonra 450 µm'lik bir elekten elenerek "öğütülmüş ayçiçek yağı küspesi ve öğütülmüş soğuk sıkım kabak çekirdeği yağı küspesi" elde edilmiştir. Ek olarak, ayçekirdeği yağı küspesi hekszanda önce 1:4 oranda daha sonra 1:3 oranda ultrasonik su banyosunda 25 dk bekleterek yağı azaltılmıştır. Küspeler analiz çalışmaları boyunca +4°C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).



Şekil 3.1 : Ayçiçeği yağı küspesi ve yağsızlaştırılıp öğütülmüş hali.

Mevcut tez çalışması için kullanılan tüm kimyasallar yüksek saflıkta olup Merck firmasından ve enzimatik ekstraksiyon işleminde kullanılan selüloz enzimi, Celluclast® Novozymes firmasından temin edilmiştir.

Bradford yöntemi ile toplam protein miktarı analizinde, standart eğrinin oluşturulmasında Thermo Fisher Scientific firmasından Bovine Gamma Globulin (2 mg/mL) kullanılmıştır.



Şekil 3.2 : Soğuk pres sıkım kabak çekirdeği yağı küspesi ve öğütülmüş hali.

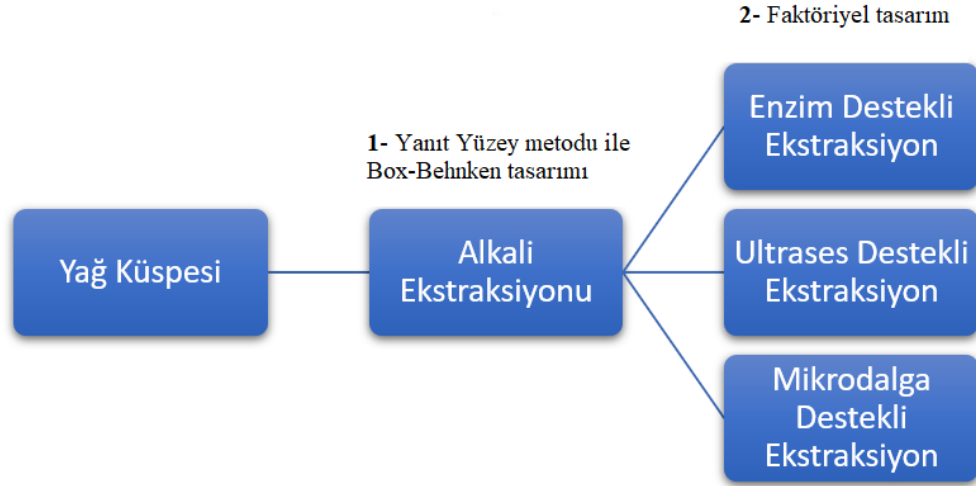
3.2 Yöntem

3.2.1 Hammaddelerin kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi

Numunelerin kimyasal kompozisyonu Resmi Analitik Kimyagerler Birliği (AOAC) yöntemlerine göre belirlenmiştir (AOAC, 2006). Hammaddelerin nem, protein, kül, yağ ve çözünür ve çözünmez diyet lif içeriği, sırasıyla 925.1, 981.10, 923.03, 920.85 ve 962.09 standart AOAC (2006) yöntem numaraları kullanılarak analiz edilmiştir. Karbonhidrat içeriği ise diğer bileşenlerin toplam yüzdesi çıkarılarak hesaplanmıştır.

3.2.2 Bitkisel protein izolatu eldesi ve ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu

Küspelerden elde edilen protein izolatlarının yüksek verimle üretilmesi amacıyla her bir küspe için ekstraksiyon koşulları 2 temel adım ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Öncelikle alkali ekstraksiyon koşulları (pH değeri, katı:çözgen oranı ve NaCl konsantrasyonu) yanıt yüzey metodu (RSM) ile optimize edilmiştir. Ardından ekstraksiyonu destekleyen 3 farklı yeşil teknolojinin protein verimine katkısını tespit etmek için faktöriyel tasarımı uygulanmıştır.



Şekil 3.3 : Ekstraksiyon yöntemin belirlenmesinde deney tasarımı.

3.2.2.1 Alkali ekstraksiyon

Küspeler, belirlenen katı:çözgen oranında ve belirlenen yüzde NaCl içeren çözelti ile karıştırılmıştır. Karışımın pH'ı, 1 veya 3 N NaOH kullanılarak belirlenen değere ayarlanmış ve 30 dk oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ekstraksiyon işlemi sırasında süspansiyon, 0,5 N HCl veya 0,5 N NaOH kullanılarak sabit pH'da tutulmuştur. Daha sonra karışım santrifüjlendikten sonra (25 dk boyunca 10.000 g) süpernatant toplanmıştır ve tortu, tuzlu su çözeltisi içinde yeniden süspanse edilerek tekrar özü çıkarılmıştır. Filtrattaki çözünmüş proteinler, 1 veya 3 N HCl kullanılarak pH 4.5'e ayarlanmasıyla çöktürülmüştür. Çökelti, sıvı fazdan 4°C ve 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek ayrılmış ve süpernatant atılmıştır. Çöken proteinler toplandıktan sonra damıtılmış su ile yıkanmıştır. Ardından nötralize edilmiş ve dondurularak kurutulmuştur.

Alkali ekstraksiyon optimizasyonu

Ayçiçeği küspesinin ve kabak çekirdeği küspesinin protein eldesi için ayrı ayrı alkali koşullarının optimizasyonu, Minitab 21.4 yazılımının yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Alkali ekstraksiyonunda pH (X1), NaCl (%) (X2) ve katı:çözgen oranı (X3) etkisini değerlendirmek için Box-Behnken tasarımı kullanılmıştır.

Protein izolatu verimi (Y) yanıt değişkeni olarak tahmin edilmiştir. Literatür çalışmaları esas alınarak Çizelge 3.1'de ve Çizelge 3.2'de verildiği gibi pH değeri, katı:çözgen oranı ve NaCl konsantrasyonu için değerler seçilmiştir (Slabi ve diğ, 2020; Dabbour ve diğ, 2018; Malik ve Saini, 2017; Salgado ve diğ, 2011; Ordonez ve diğ,

2001; Devi ve Badwaik, 2021; Gadalkar ve Rathod, 2020; Gao ve diğ, 2020; Lalnunthari ve diğ, 2020; Quanhong ve Caili, 2005).

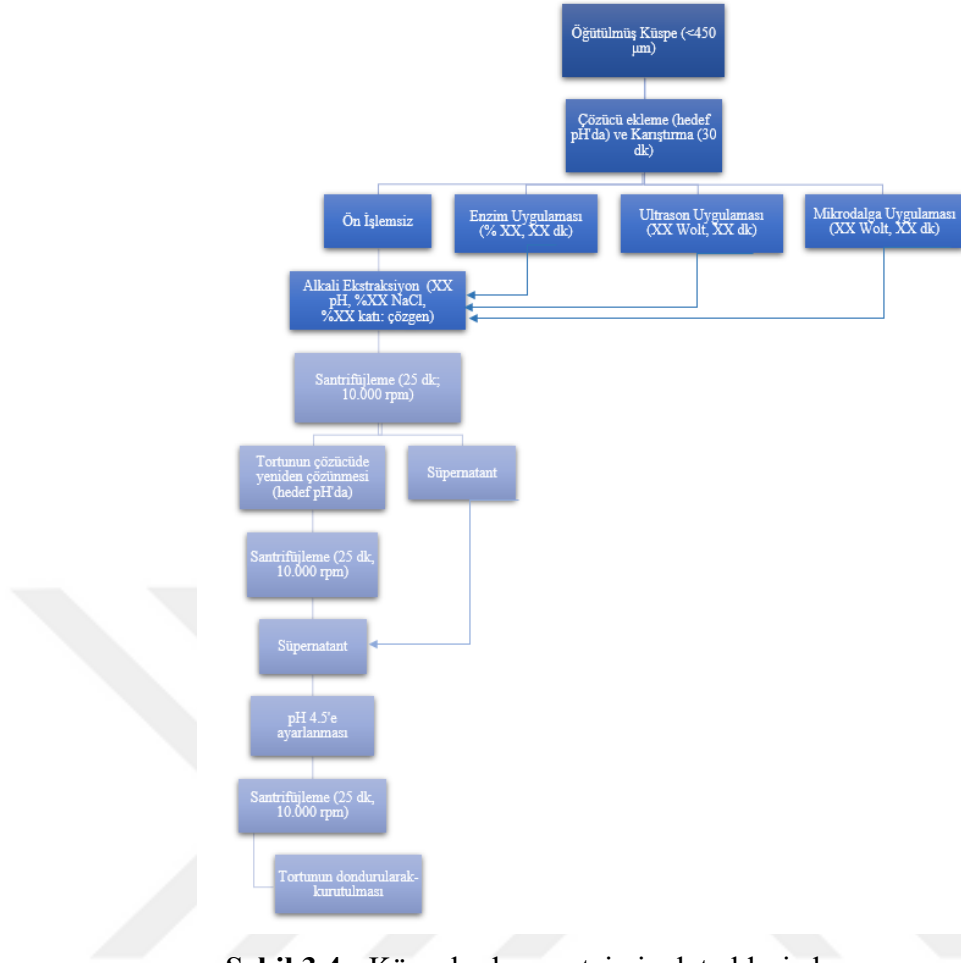
Tüm deneysel tasarım, öngörülemeyen varyasyonların şansını azaltmak için rastgele bir şekilde yürütülen merkezi noktada üç tekrar içeren 17 çalışmadan oluşuyordu. X1, X2 ve X3'e (bağımsız değişkenler) bağlı protein izolatu verimi, ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli kullanılarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1 : Ayçiçeği küspesi için Alkali Ekstraksiyonda Box-Behnken tasarımı için bağımsız değişkenler ve seviyeler.

Bağımsız Değişkenler	Sembol	Seviyeler		
		-1	0	1
pH	X1	8	9,5	11
Katı:çözgen oranı (%)	X2	0,04	0,12	0,2
NaCl konsantrasyonu (%)	X3	0	1	2

Çizelge 3.2 : Kabak çekirdeği küspesi için Alkali Ekstraksiyonda Box-Behnken tasarımı için bağımsız değişkenler ve seviyeler.

Bağımsız Değişkenler	Sembol	Seviyeler		
		-1	0	1
pH	X1	8	9,5	11
Katı:çözgen oranı (%)	X2	0,03	0,115	0,2
NaCl konsantrasyonu (%)	X3	0	4	8



Şekil 3.4 : Kuspelerden protein izolat eldesi akış şeması.

3.2.2.2 Enzim destekli ekstraksiyon

Küspe, alkali ekstraksiyonda optimize edilerek belirlenen katı:çözgen oranında ve belirlenen yüzde NaCl içeren çözelti ile karıştırılmıştır (Çizelge 3.3). Ardından, faktöriyel tasarım uygulanarak çalışmak istenen yüzde konsantrasyonundaki selüloz enzimi ilave edilmiş ve çalışmak istenen süre boyunca su banyosuna (38°C) bırakılmıştır. Geri kalan ekstraksiyon işlemi, alkali ekstraksiyonu şekilde ilerlemiştir.

Çizelge 3.3 : Ayçiçeği küspesi ve kabak çekirdeği küspesi için enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyonların deneysel tasarımı için bağımsız değişkenler ve seviyeler.

Seviye	Enzim Destekli		Ultrason Destekli		Mikrodalga Destekli	
	Konsantrasyon (%)	Süre (dk)	Güç (W)	Süre (dk)	Güç (W)	Süre (dk)
-1	0,1	30	60	1	140	1
+1	2	120	120	10	700	3

3.2.2.3 Ultrason destekli ekstraksiyon

Küspe, alkali ekstraksiyonda optimize edilerek belirlenen katı:çözgen oranında ve belirlenen yüzde NaCl içeren çözelti ile karıştırılmıştır (Çizelge 3.3). Ardından küspe, faktöriyel tasarım uygulanarak çalışmak istenen güce ayarlanmış ultrasonik banyoda (VWR Ultrasonic cleaner) çalışmak istenen süre boyunca muamele edilmiştir. Geri kalan ekstraksiyon işlemi, alkali ekstraksiyonu şekilde ilerlemiştir.

3.2.2.4 Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Küspe, alkali ekstraksiyonda optimize edilerek belirlenen katı:çözgen oranında ve belirlenen yüzde NaCl içeren çözelti ile karıştırılmıştır (Çizelge 3.3). Ardından küspe, faktöriyel tasarım uygulanarak çalışmak istenen güce ayarlanmış mikrodalgada (Arçelik) çalışmak istenen süre boyunca muamele edilmiştir. Geri kalan ekstraksiyon işlemi, alkali ekstraksiyonu şekilde ilerlemiştir.

3.2.2.5 Protein izolatının kurutulması

İzoelektrik pH'da çöktürülen proteinler dondurucu kurutucu ile kurutulmuş ve diğer tüm analizler boyunca -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.6 Protein veriminde optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi

RSM ile belirlenen optimum alkali ekstraksiyon koşullarında çalışılan enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun optimum koşulları, faktöriyel tasarım ile belirlenmiştir. Sonuçlara göre izolat verimi ve protein verimi hesaplanmıştır (formül 3.1 ve 3.2).

Geri kazanılan proteinin en yüksek olduğu ekstraksiyon yöntemi, ayçiçeği küspesi protein izolatı ve kabak çekirdeği küspesi protein izolatı eldesi için seçilmiştir. Bu yöntemle elde edilen izolatlar tez çalışması boyunca analizlerde kullanılmıştır.

$$\text{İzolat verimi (\%)} = (mi/mk) \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Geri kazanılan protein (\%)} = ((mi \times pi)/(mk \times pk)) \times 100 \quad (3.2)$$

Burada; mi: protein izolatının kütlesi (g)

m k: küspenin kütlesi (g)

p i: izolatındaki protein içeriği (%)

p k: küspenin protein içeriği (%)

3.2.3 Analiz yöntemleri

3.2.3.1 Protein tayini

Protein izolatlarının toplam protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. 0,05 ml protein ekstraktı ile 0,10 ml Bradford reaktifi karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Absorbans UV/Vis spektrofotometrede (595 nm) ölçümü yapılmış ve hesaplamada kalibrasyon eğrisi için serum albumin kullanılmıştır.

3.2.3.2 Renk analizi

Kurutulmuş protein izolatlarının renk özelliklerini tanımlamak için Chroma Meter (Konica Minolta, Tokyo, Japan) kullanılarak CIELAB renk parametreleri (L^* , a^* ve b^*) belirlenmiştir.

3.2.3.3 Termal özelliklerin belirlenmesi

Gıda bileşenlerinin kalite özellikleri, üretimleri sırasında uygulanan buharlaştırma, dondurma gibi ısı işlemleri sonucu etkilenmektedir. Toz formda elde edilen protein izolatlarının termal özellikleri diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile incelenmiştir.

İzolatların termal davranışı, indiyum ($T_o = 156,4^\circ\text{C}$, $\Delta H = 28,4 \text{ J/g}$) ile kalibre edilmiş Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC Q10 V9.9 Build 303) kullanılarak karakterize edilmiştir.

Yaklaşık 3,5 miligram numune, hermetik bir alüminyum tavada kapatılmış ve -20 ila 200°C 'den 5°C/dk hızında ısıtılmıştır. Boş bir alüminyum tava referans olarak alınmıştır (Subaşı ve diğ., 2020).

3.2.3.4 Protein izolatının fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi

Su tutma kapasitesi

Meriles ve diğ. (2019)'nin uyguladığı metot esas alındı. 1 gram numune üzerine 10 ml saf su eklenmiştir. 30 saniye karıştırıldıktan sonra 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. 20 dk ($3000 \text{ g'de } 25^\circ\text{C'de}$) santrifüj edildikten sonra süpernatant tartılmıştır. İzolatın su tutma kapasitesi (%) formül 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$FAC = (a - b)/c \quad (3.3)$$

a : protein izolatu ve emilen su ile tüpün kütlesi, g.

b : t p ve protein izolatuının kütlesi, g.

c : Protein izolatuının kütlesi, g.

Yağ tutma kapasitesi

Meriles ve diğ. (2019)'nin uyguladığı metot esas alınmıştır. 1 gram örnek üzerine 10 ml yağ eklenmiştir. 30 saniye karıştırıldıktan sonra 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20 dk (3000 g'de 25°C'de) santrifüj edilmiş ve süpernatant tartılmıştır.  zolatın yağ tutma kapasitesi (%) formül 3.4 kullanılarak hesaplandı:

$$FAC = (a - b)/c \quad (3.4)$$

a : protein izolatu ve emilen yağ ile tüpün kütlesi, g.

b : t p ve protein izolatuının kütlesi, g.

c : Protein izolatuının kütlesi, g.

Emülsiyon oluşturma kapasitesi

 ki gram numune tartılıp, üzerine 100 ml su edilmiştir. 9500 rpm'de 30 saniye homojenize edildikten sonra karışıma 100 ml yağ eklenmiştir. Ardından, 9500 rpm'de 2 dk homojenize edilmiştir. Karışımın içerisinden 10 ml alınıp 1200 g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra emülsiyonun yüksekliği ve santrifüj tüpündeki karışımın yüksekliği birbirine oranlanarak sonuç alınmıştır (Shchekoldina ve Aider, 2014).  zolatın emülsifiye etme kapasitesi (%) formül 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$FEC = Ve/V0 \cdot \%100 \quad (3.5)$$

Ve: Emülsifiye edilmiş katmanın hacmi (ml)

V₀: Karışımın başlangıç hacmi (ml)

Köpük kapasitesi

Njintang ve diğ. (2001)'nin uyguladığı metot esas alınmıştır. 4,5 gram un üzerine 150 ml saf su eklenir ve 9500 rpm'de, 2 dk homojenize edilmiştir. Ardından 250 ml'lik mezürlere boşaltılan örneklerin 0., 5., 10., 20., 30. ve 60. dklarda köpük seviyeleri

ölçülmüştür. Köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi, aşağıda gösterildiği gibi 3.6 ve 3.7 denklemlerine göre hesaplanmıştır (Jarpa-Parra, 2015; Malik ve Saini, 2017):

$$FA = Hf/H0 \cdot 100\% \quad (3.6)$$

$$FS = H5min/Hf \cdot 100\% \quad (3.7)$$

FA : Köpürme kapasitesi, %.

H f : Köpüğün yüksekliği, ml.

H 0 : Çözeltinin köpük oluşmadan önceki yüksekliği, ml.

FS : Köpük stabilitesi, %.

H 5min : 5 dk sonra köpüğün yüksekliği, ml.

3.2.4 İstatistiksel İşlem

Tüm deneyler üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Ortalama değerler, $P < 0,05$ olduğunda anlamlı olarak farklı kabul edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları için Minitab Statistical Software 21.4 kullanılarak RSM ve faktöriyel tasarım yapılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Ayçiçeği Yağı Küspesi

4.1.1 Kimyasal kompozisyonu

Ayçiçeği küspesi, yağdan arındırma işlemi uygulanarak yağ içeriği %25'ten %1,18'e kadar azaltılmıştır. Yağ içeriğindeki azalma, fonksiyonel özellikleri geliştiren bir işlem olarak bilinmekte ve ticari fizibilitayı iyileştirmek için yeni ürünlerin geliştirilme olasılığını artırmaktadır (Kinsella, 1982).

Ayçiçeği küspesinin kimyasal kompozisyonunu belirleyen nem, protein yağ, çözünmez ve çözünür diyet lifi ve kül içeriği sırasıyla $12,2 \pm 0,225$, $32,541 \pm 1,301$, $1,183 \pm 0,453$, $50,412 \pm 0,023$, $7,875 \pm 0,002$ ve $5,82 \pm 0,089$ bulunmuştur.

Ayçiçeği küspesi, literatürde bildirilen %27,8 ila %61,4 protein içeriği ve %0,2 ila %3 yağ içeriği arasında yer almaktadır (Kaur ve Ghoshal, 2022; Salgado ve diğ, 2012; Lazos, 1992; Grasso ve diğ, 2019; Shchekoldina ve Aider, 2014; De Oliveira Filho ve Egea, 2021). İlgili çalışmalar genel olarak, bu çalışmadaki ayçiçeği küspesinin değerleriyle uyumlu bulunmuştur.

4.1.2 Protein izolatu eldesi ve ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu

4.1.2.1 Alkali ekstraksiyon

Ayçiçeği küspesi için Box-Behnken tasarım ile alkali ekstraksiyon koşullarının optimize edilen pH, katı:çözgen oranı (%) ve NaCl konsantrasyonu (%) ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

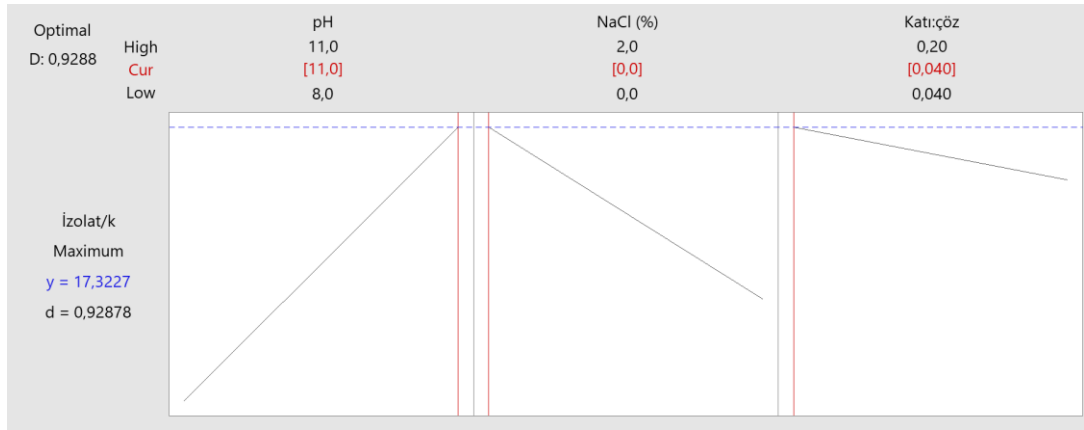
Model denklemin istatistiksel analizi ve katsayıların önemi, P-değeri ve F-testi ile tahmin edilmiştir (Çizelge A.1). Gözlenen model, yanıtlar için anlamlıydı ($P < 0,05$), bu modelin yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi uygun bir şekilde tanımlayabildiğini desteklemektedir. ANOVA ile protein izolatu verimi üzerindeki P değerleri aracılığıyla her terimin önemi, Çizelge A.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 : Ayçiçeği küspesi için alkali ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	pH	NaCl (%)	Katı:çözgen oranı (%)	İzolat/küspe (%)
11	1	-1	1	9,5	0	0,12	12,50
16	2	0	1	9,5	1	0,12	10,79
5	3	1	1	8	0	0,2	6,02
2	4	1	1	11	0	0,04	18,49
15	5	0	1	9,5	1	0,12	7,04
3	6	1	1	8	2	0,04	5,80
12	7	-1	1	9,5	2	0,12	6,81
13	8	-1	1	9,5	1	0,04	10,17
7	9	1	1	8	2	0,2	2,10
6	10	1	1	11	0	0,2	13,61
17	11	0	1	9,5	1	0,12	6,91
14	12	-1	1	9,5	1	0,2	8,31
9	13	-1	1	8	1	0,12	4,65
10	14	-1	1	11	1	0,12	11,75
8	15	1	1	11	2	0,2	7,93
1	16	1	1	8	0	0,04	3,26
4	17	1	1	11	2	0,04	10,99

Sonuçlar, modeldeki farklılıkların yanı sıra iki doğrusal terim ve pH ile NaCl konsantrasyonu etkileşimi ($P < 0,05$) anlamlı bulunurken, katı:çözgen oranı anlamlı değildi ($P > 0,05$). Şekil 4.1’de görüldüğü gibi katı:çözgen oranı azaldıkça izolat veriminde artış vardır. Fakat ultrason gücünün etkisi modelde anlamlı derecede fark oluşturmamıştır. Bunun nedeni, 0,04 ile 0,2 katı çözgen oranı arasındaki farkın önemli olmaması olabilir. Modeldeki her terim için, düşük bir P değeri ve yüksek bir F değeri, yanıt değişkeni üzerinde daha önemli bir etkiye işaret etmektedir (Quanhong ve Caili, 2005).

Ayçiçeği küspesi için alkali ekstraksiyonda optimum koşulun, %17,323 izolat/küspe sonucunu tahminleyen (d: %92,878) pH 11, %0,04 katı:çözgen oranı ve %0 NaCl konsantrasyonundaki koşul olduğu tespit edilmiştir ($\alpha:0,05$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 : Ayçiçeği küspesi için alkali ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.

Belirlenen optimum koşulda tekrarlandığında $16,17 \pm 0,46$ izolat/küspe bulunmuş olup $14,80$ ile $19,85$ güven aralığına girmekte olduğu görülerek modelin validasyonu sağlanmıştır. Model için anlamlı bulunan pH değerine, NaCl yüzdesine ve katı:çözgen oranına (bağımsız değişkenler) bağlı protein izolatı verimi sonuçları, denklem 4.1’de gösterildiği şekilde ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli (R^2_{pred} : $68,13$) kullanılarak değerlendirilmiştir:

$$\begin{aligned} \text{İzolat/küspe (\%)} = & -22,98 + 3,713 \text{ pH} + 7,32 \text{ NaCl (\%)} - \\ & 13,42 \text{ Katı: çözgen oranı (\%)} - 0,983 \text{ pH} * \text{NaCl (\%)} \end{aligned} \quad (4.1)$$

4.1.2.2 Enzim destekli ekstraksiyon

Ayçiçeği küspesi için faktöriyel tasarım ile enzim destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen süre ve enzim konsantrasyonu ve bunların yanıtı olarak protein izolatı verimi Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Model denklemin istatistiksel analizi ve katsayıların önemi, P-değeri ve F-testi ile tahmin edilmiştir (Çizelge A.2).

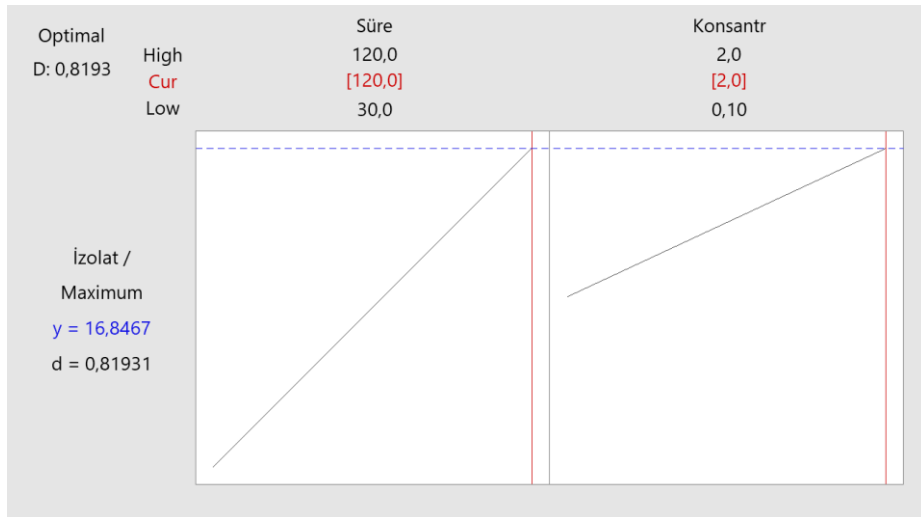
Gözlenen model, yanıtlar için anlamlıydı ($P < 0,05$), bu modelin yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi uygun bir şekilde tanımlayabildiğini desteklemektedir. ANOVA ile protein izolatı verimi üzerindeki P değerleri aracılığıyla her terimin önemi Çizelge A.2’de gösterilmektedir. Buna göre modelde iki doğrusal terim ($P < 0,05$) anlamlı bulundu. Ekstraksiyonda enzim konsantrasyonu arttıkça ayçiçeği küspesinden daha fazla protein izolatı elde edilmiştir.

Çizelge 4.2 : Ayçiçeği küspesi için enzim destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatı verimi.

RunOrder	CenterPt	Blocks	Süre (dk)	Konsantrasyon (%)	İzolat / Küspe (%)
1	1	1	120	0,1	15,60
2	1	1	120	2	16,76
3	1	1	30	2	10,12
4	1	1	30	0,1	6,04
5	1	2	120	0,1	10,55
6	1	2	120	2	19,23
7	1	2	30	2	10,15
8	1	2	30	0,1	6,28
9	1	3	120	0,1	14,04
10	1	3	120	2	15,03
11	1	3	30	2	8,60
12	1	3	30	0,1	7,64

Vergara-Barberán ve diğerlerinin (2015) çalışmasında belirttiği gibi selüloz kullanımı, hücre duvarının parçalanmasından kaynaklanan protein ekstraksiyonunu iyileştirmektedir.

Ayçiçeği küspesi için enzim destekli ekstraksiyonda optimum koşul, %16,847 izolat/küspe sonucunu tahminleyen (d: %81,931) %2 enzim konsantrasyonu ve 120 dk enzim uygulama süresi olduğu tespit edilmiştir ($\alpha:0,05$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 : Ayçiçeği küspesi için enzim destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.

Belirlenen optimum koşulda tekrarlandığında $17 \pm 0,005$ izolat/küspe bulunmuş olup $14,937$ ile $18,756$ güven aralığına girmekte olduğu görülerek modelin validasyonu sağlanmıştır. Uygulama süresine ve enzim konsantrasyonuna ve uygulama süresine (bağımsız değişkenler) bağlı protein izolatu verimi sonuçları, formül 4.2’de gösterildiği şekilde ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli ($R\text{-sq}_{\text{pred}}: \%78,05$) kullanılarak değerlendirilmiştir:

$$\text{İzolat/küspe (\%)} = 3,97 + 0,0785 \text{ Süre (dakika)} + 1,732 \text{ Konsantrasyon (\%)} \quad (4.2)$$

4.1.2.3 Ultrason destekli ekstraksiyon

Ayçiçeği küspesi için Faktöriyel tasarım ile ultrason destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen ultrason gücü ve uygulama süresi ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi Çizelge 4.3’te gösterilmiştir.

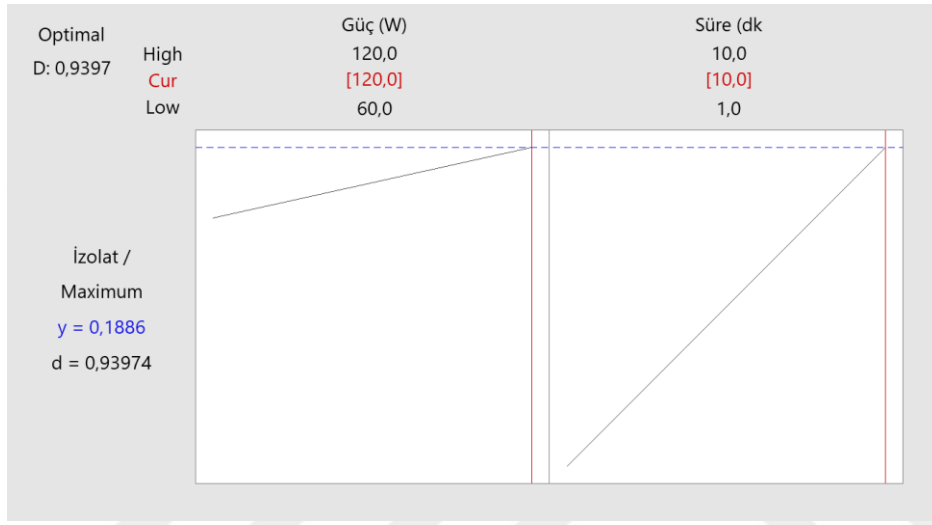
Çizelge 4.3 : Ayçiçeği küspesi için ultrason destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.

RunOrder	CenterPt	Blocks	Güç (W)	Süre (dk)	İzolat/Küspe (%)
1	1	1	120	1	16,48
2	1	1	120	10	18,68
3	1	1	60	10	19,11
4	1	1	60	1	16,74
5	1	2	120	1	15,82
6	1	2	120	10	19,15
7	1	2	60	10	17,80
8	1	2	60	1	14,27
9	1	3	120	1	16,63
10	1	3	120	10	17,92
11	1	3	60	10	18,62
12	1	3	60	1	14,41

Model denklemin istatistiksel analizi ve katsayıların önemi, P-değeri ve F-testi ile tahmin edilmiştir (Çizelge A.3). Gözlenen model, yanıtlar için anlamlıydı ($P < 0,05$), bu modelin yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi uygun bir şekilde tanımlayabildiğini desteklemektedir. ANOVA ile protein izolatu verimi üzerindeki P değerleri aracılığıyla her terimin önemi Çizelge A.3’te gösterilmektedir. Sonuca göre

modelde süre değişkeni ($P < 0,05$) anlamlıyken, ultrason gücü anlamlı bulunmadı ($P > 0,05$). Şekil 4.3'te görüldüğü gibi uygulama gücü arttıkça izolat veriminde artış vardır. Fakat ultrason gücünün etkisi modelde anlamlı derecede fark oluşturmamıştır. Bunun nedeni, 60 W ile 120 W arasındaki farkın önemli olmaması olabilir.

Ayçiçeği küspesi için ultrason destekli ekstraksiyonda optimum koşul, %18,86 izolat/küspe sonucunu tahminleyen (d : %93,974) 120 W ultrason gücü ve 10 dk uygulama süresi olduğu tahmin edilmiştir (α : 0,05) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 : Ayçiçeği küspesi için ultrason destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.

Belirlenen optimum koşulda tekrarlandığında $\%19,143 \pm 0,02$ izolat/küspe bulunmuş olup $\%17,879$ ile $\%19,841$ güven aralığına girmekte olduğu görülerek modelin validasyonu sağlanmıştır. Ultrason uygulama süresine ve gücüne bağlı protein izolatı verimi sonuçları, formül 4.3'te gösterildiği şekilde ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli ($R\text{-sq}_{\text{pred}}$: %62,24) kullanılarak değerlendirilmiştir:

$$\text{İzolat/küspe (\%)} = 0,14472 + 0,000104 \text{ Güç (W)} + 0,003137 \text{ Süre (dk)} \quad (4.3)$$

4.1.2.4 Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Ayçiçeği küspesi için Faktöriyel tasarım ile mikrodalga destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen mikrodalga gücü ve uygulama süresi ve bunların yanıtı olarak protein izolatı verimi Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

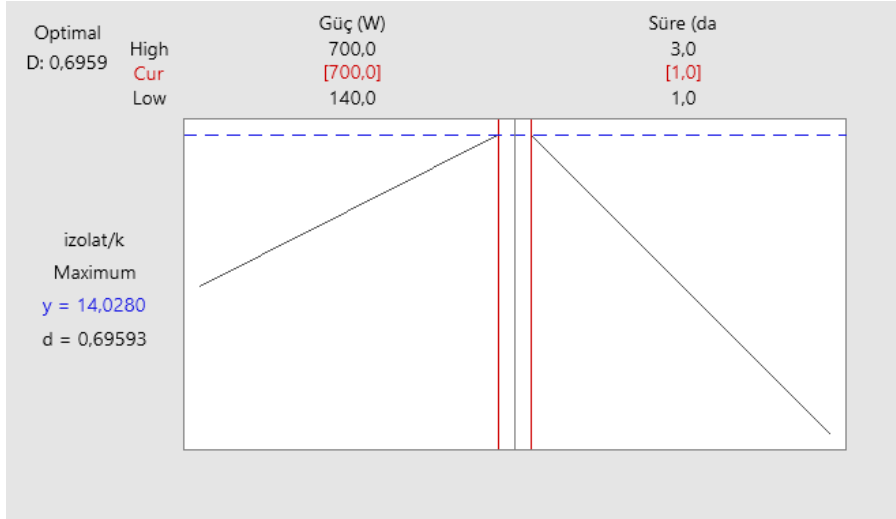
Çizelge 4.4 : Ayçiçeği küspesi için mikrodalga destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.

StdOrder	RunOrder	CenterPt	Blocks	Güç (W)	Süre (dk)	İzolat/Küspe (%)
4	1	1	1	700	3	13,968
3	2	1	1	140	3	14,409
2	3	1	1	700	1	17,478
1	4	1	1	140	1	13,979
8	5	1	2	700	3	7,429
7	6	1	2	140	3	7,937
6	7	1	2	700	1	11,153
5	8	1	2	140	1	10,422
12	9	1	3	700	3	6,132
11	10	1	3	140	3	10,007
10	11	1	3	700	1	13,453
9	12	1	3	140	1	10,304

Model denklemin istatistiksel analizi ve katsayıların önemi, P-değeri ve F-testi ile tahmin edilmiştir (Çizelge A.4). Gözlenen model, yanıtlar için anlamlıydı ($P < 0,05$), bu modelin yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi uygun bir şekilde tanımlayabildiğini desteklemektedir. ANOVA ile protein izolatu verimi üzerindeki P değerleri aracılığıyla her terimin önemi Çizelge A.4’de gösterilmektedir. Sonuca göre modelde süre değişkeni ve mikrodalga gücü ile süre etkileşimi ($P < 0,05$) anlamlıyken, güç anlamlı bulunmadı ($P > 0,05$).

Şekil 4.4’de görüldüğü gibi güç arttıkça izolat veriminde artış vardır. Fakat gücün etkisi modelde anlamlı derecede fark oluşturmamıştır. Bunun nedeni, 140 W ile 700 W arasındaki farkın önemli olmaması olabilir. Ayçiçeği küspesi için mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum koşul, %14,028 izolat/küspe sonucunu tahminleyen (d: %69,593) 700 W mikrodalga gücü ve 1 dk uygulama süresi olduğu tahmin edilmiştir ($\alpha: 0,05$) (Şekil 4.4).

Belirlenen optimum koşulda tekrarlandığında $15,113 \pm 1,71$ izolat/küspe bulunmuş olup %12,315 ile %15,741 güven aralığına girmekte olduğu görülerek modelin validasyonu sağlanmıştır.



Şekil 4.4 : Ayçiçeği küspesi için mikrodalga destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.

Mikrodalga gücüne ve uygulama süresine bağlı protein izolatu verimi sonuçları, formül 4.4'te gösterildiği şekilde ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli ($R\text{-sq}_{\text{pred}}$: %71,33) kullanılarak değerlendirilmiştir:

$$\begin{aligned} \text{İzolat/küspe (\%)} = & 10,84 + 0,00802 \text{ Güç (W)} + \\ & 0,116 \text{ Süre (dk)} - 0,00363 \text{ Güç (W)} * \text{Süre (dk)} \end{aligned} \quad (4.4)$$

4.1.2.5 Protein veriminde optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi

RSM ile ayçiçeği küspesi için belirlenen pH11, %0 NaCl ve %0,04 katı:çözgen oranı ile birlikte uygulanan enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun optimum koşulları Çizelge 4.5'te verilmiştir. En yüksek protein geri kazanımı, ultrason uygulaması ile elde edilmiştir. Ayrıca ultrason destekli ekstraksiyon, diğer yöntemlerden önemli derecede farklı bulunmuştur. Bu nedenle ayçiçeği küspesi protein izolatu eldesinde, tez çalışması boyunca tüm analizler için izolat veriminin %22,656 ve geri kazanılan protein içeriğinin %58,826 ile en yüksek olduğu ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Bu sonuç, literatürde bildirilenin üzerindedir. Dabbour ve diğ. (2018), ayçiçeği küspesinden proteinin ultrasonik ekstraksiyon koşullarını optimize etmek için Box-Behnken tasarımını kullandı ve optimum ekstraksiyon noktaları olan 45 °C'de 15 dk uygulanan 220 W güç ile %54,26'lık bir protein verimi elde etmiştir.

Çizelge 4.5 : Ayçiçeği küspesi için optimum koşullardaki alkali, enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun izolat verimi ve geri kazanılan protein içeriği.

Ekstraksiyon yöntemi	Optimum koşulları	İzolat verimi (%)	Geri kazanılan protein (%)
Alkali	pH 11; %0 NaCl; 0,04 katı:çözgen oranı	16,171±0,461 ^b	42,486±1,468 ^b
Enzim destekli	%2 selülaz; 120 dk	19,038±1,047 ^{ab}	44,69±2,365 ^b
Ultrason destekli	120 W; 10 dk	22,656±0,631 ^a	58,826±0,064 ^a
Mikrodalga destekli	700 W; 1 dk	15,113±1,717 ^b	40,536±0,058 ^b

Aynı sütunda farklı küçük harf ile gösterilmiş değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmaktadır ($P < 0,05$).

4.1.3 Renk analizi

Ayçiçeği küspesinden elde edilen protein izolatın L^* değeri $29,143 \pm 0,53$, a^* değeri $0,817 \pm 0,09$, b değeri ise $7,543 \pm 0,35$ olarak kaydedilmiştir. Gıdalarda renk, kabul edilebilirlik yönünden oldukça önemli bir duyuşal özelliktir. Ürünün renk değerleri, kurutma işleminde üretilen gıdaların kalitesini ve duyuşal albenisini gösteren bir kalite faktörüdür. Literatürde verilen bilgiye göre, L^* değeri koyuluk-parlaklık, a^* değeri kırmızılık ($+a^*$) yeşillik ($-a^*$) ve b^* değeri ise mavilik ($-b^*$) sarılık ($+b^*$) belirtmektedir (Hunter, 1975).

Literatürde ayçiçeği üzerinde yapılan protein izolasyonu çalışmaları sonucunda elde edilen toz ürünlerin renk değerleri L^* değeri 33 ile 57,93, a^* değeri -4 ile 2,4 ve b^* değeri ise 2,10 ile 12,80 arasında bildirilmiştir (Dabbour ve diğ, 2018; Petraru ve diğ, 2021). Bu bağlamda mevcut çalışmada bulunan ayçiçeği proteini, bildirilenlerden daha az parlaklık değerine sahiptir. Kırmızılık ve sarılık değerleri ise bildirilen aralıkta seyretmiştir.

Subaşı ve diğ. (2020), çalışmasında ayçiçeği protein izolatlarını doğal (fenolikli) ve fenolsüzleştirilmiş halini renk ölçümünü yapmış ve örneklerin fenolsüzleştirme işleminden sonra parlaklık (L^*) ~%14 artmıştır.

Bu nedenle, ayçiçeğinden elde edilen protein izolatının koyu rengi, protein ekstraksiyon işlemi sırasında eş zamanlı polifenol oksidasyonu ve fenolik-protein etkileşiminden kaynaklanıyor olabilir (Weisz ve diğ, 2010).

Ticari olarak satılan soya protein konsantresinin renk değerleriyle (L^* : 88,40, a^* :1,10, b^* :14,56) karşılaştırıldığında elde edilen protein izolatlarının daha koyu olduğu görülmektedir (Toews ve Wang, 2013). Bunun nedeni ayçiçeği küspesinin soya fasulyesine göre çok daha yüksek oranda fenolik madde içermesi ile açıklanabilir (Sari ve diğ, 2013; Gasparetto ve diğ, 2012). Fenolik bileşikler alkali ortamda okside olup proteinlerle etkileşime girerek koyu rengin oluşmasına neden olmaktadır.

Ayçiçeği protein izolatı, insan beslenmesinde kullanımı güçlü koyu yeşil rengi nedeniyle büyük bir zorluk (Shchekoldina ve Aider, 2014) olarak görülmesine rağmen bu çalışmada yeşillik ($-a^*$) değerinin aksine hafif kırmızılık ($+a^*$) değeri bulunmuştur.

4.1.4 Termal özelliklerin belirlenmesi

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ile ölçülen gıdanın ve bileşenlerinin termal karakterizasyonu, işleme, koruma ve depolama sırasında gıdada meydana gelen gıda bileşenlerinin (örn. karbonhidratlar, proteinler) termal özelliklerindeki değişiklikleri açıklamak için bir ölçü olarak kullanılmaktadır. Üretim sürecini ve kalite kontrolünü optimize etmek için DSC ölçümlerinin kullanılması, yeni ürünlerin geliştirilmesi sırasında oldukça etkilidir (Kaur ve diğ, 2021).

DSC, özellikle protein stabilitesinin karakterizasyonu için çok uygundur ve yüksek sıcaklık nedeniyle bir açılması gerçekleşen makromolekülün entalpi değişikliklerine ilişkin bir fikir sağlar (Kaur ve diğ, 2021). Cam geçiş sıcaklığı (T_g), başlangıç denatürasyon sıcaklığı (T_{onset}), tepe sıcaklığı (T_p) ve toplam entalpi değişimi (ΔH), DSC tarafından sağlanan en önemli termal göstergelerdir (Parniakov ve diğ, 2018). Tepe sıcaklık (T_{peak} , T_p) genellikle denatürasyon sıcaklığı (T_d) olarak kabul edilir (Mehryar ve diğ, 2017). Denatürasyon sıcaklığı (T_d), gıda biliminde gerekli olan proteinlerin termal stabilitesinin bir ölçüsüdür ve bu sıcaklıkta proteinlerin yapısal konfigürasyonundaki değişiklikler meydana gelir. Büyük ölçüde ısı, tuz, pH ve mekanik kayma vb. etkilenmektedir. Entalpi değişimi ise proteinin üçüncül yapısını ortaya çıkarmak için gereken enerjiyi ifade eder. Protein sisteminin ikincil yapısı ile ilişkilidir (Meng ve Ma, 2001).

Ultrason ile üretilen ayçiçeği küspesi protein izolatının termal özellikleri, diferansiyel tarama kalorimetrisi kullanılarak belirlenmiştir. Termal özelliklere ait bilgileri Çizelge 4.6’da gösterilmektedir. DSC sonucuna göre ayçiçeği protein izolatlarının denatürasyon sıcaklığı yaklaşık 86 ile 126°C aralığında seyretmiştir.

Çizelge 4.6 : Ayçiçeği küspesi protein izolatının termal özellikleri.

T_g	T_o	T_p	ΔH
61,385±3,41 °C	85,82±4,35 °C	125,645±2,23 °C	8,75±1,63 J/g

T_g = Cam geçiş sıcaklığı, T_o = başlangıç sıcaklığı, T_p = tepe sıcaklığı, ΔH = faz geçiş entalpisi.

Proteinler çok çeşitli termal geçiş sıcaklıkları gösterirler (Mehryar ve diğ, 2017). Literatürde ekstre edilmiş ayçiçeği protein izolatlarının DSC termogramları, izolatların karakteristik denatürasyon sıcaklığı 65-120 °C aralığında kaydedilmiştir (Perez, 2003; Ermiş ve Karasu, 2020; Molina ve diğ, 2004; Malik ve Saini, 2017, 2019; Malik ve diğ, 2016; Subaşı ve diğ, 2020). Mevcut çalışmada bulunan daha yüksek T_p değeri, yüksek termal stabilite ile ilişkilidir. Ayrıca, bu değer, proteinin üçüncül yapısı hakkında bilgi vermektedir (Tang ve Sun, 2011). Elde edilen daha yüksek T_p değeri nedeniyle üçüncül konformasyonun daha kompakt olduğu söylenebilir. Denatürasyon entalpisi ise 1,3-9,5 J/g (Subaşı ve diğ, 2021; Malik ve Saini, 2017, 2029; Malik ve diğ, 2016; Jia ve diğ, 2022) aralığında sonuç alınmış olup Malik ve Saini (2019) (7,10 J/g) ve Jia ve diğ. (2022) (9,5 J/g) araştırmacılar, mevcut çalışma ile (8,75 J/g) benzer sonuçlar bildirmiştir.

Ultrason uygulanan ve uygulanmayan ayçiçeği protein izolatların termal özelliklerini inceleyen çalışmalarda (Malik ve Saini, 2018; Gani ve diğ, 2022), ultrason uygulanan protein izolatlarda daha düşük T_d ve ΔH değeri kaydedilmiştir. Bu çıktılarına göre izolatların ultrason uygulanması, termal stabilitesinin azalmasıyla ve proteinin düzenli yapısının bozulmasıyla sonuçlanmaktadır. Bunun nedeni, akustik kavitasyonun, peptit zincirinin yapısında değişikliklere neden olması olabilir (Cui ve diğ, 2020).

4.1.5 Fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi

Farklı yağlı tohum küspeleri, fonksiyonel özelliklerinde onları benzersiz kılan farklılıklara sahiptir. Genellikle yağ çıkarıldıktan sonra, bir kısmı hayvan beslenmesinde kullanılmakta ve geri kalan her şey atılmaktadır. Çalışmada ayçiçeği küspesi, yağdan arındırma işlemi uygulanarak yağ içeriği %25’ten %1,18’e kadar azaltıldı. Yağ içeriğindeki azalma, fonksiyonel özellikleri geliştiren bir işlem olarak

bilinmekte ve ticari fizibiliteyi iyileştirmek için yeni ürünlerin geliştirilme olasılığını artırmaktadır (Kinsella, 1982).

Ayçiçeği protein izolatların 25 °C’de belirlenen fonksiyonel özellikleri Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 : Ayçiçeği protein izolatının termal özellikleri.

Fonksiyon özellikleri	Yüzde (%)
Su tutma	2,78±0,08
Yağ tutma	2,49±0,04
Emülsiyon oluşturma kapasitesi	58,33±2,36
Köpürme kapasitesi	50,00±0,00

4.1.5.1 Su tutma kapasitesi

Bu çalışmada analiz edilen ayçiçeği proteini izolatı 2,781±0,08 g su/g izolat bulundu (Çizelge 4.7). Bu değer, diğer yazarlar tarafından bildirilen 0,71 ila 3,27 g su/g izolat (Bhise, 2015; Brachet, 2015; Lin ve diğ, 1974; Sosulski, 1977; Salgado ve diğ, 2012; Grasso ve diğ, 2019; Malik ve Saini, 2017; Shchekoldina ve Aider, 2014; Kaur ve Ghoshal, 2022) arasında değişen değerlerin arasında yer almaktadır.

Analizler için hazırlanan küspe 450 µm partikül boyutunda olup, bir çalışmada (Dabbour ve diğ, 2018) ise kullanılan küspenin 250 µm’dir. Yazarın ayçiçeği küspesinde ultrason destekli protein ekstraksiyonun optimizasyonu gerçekleştirilen çalışmasında, 0,985 g su/g izolat olarak bulunan su tutma değeri, bu çalışmada bulunan değerden %64,5 daha düşüktür. Bu sonuç, proteinin küçük partikül boyutu sayesinde kolayca çözülerek daha düşük su tutma değerleri vermesiyle açıklanabilir. Çünkü protein matris yapısı, özellikle gözenek boyutu, su-protein etkileşimini etkilemektedir (Duckham ve diğ, 2001). Bir başka olası açıklama ise diyet liflerinin yüksek içeriğine atıfta bulunabilir (Grasso ve diğ, 2019).

Ayçiçeği küspesi protein izolatı ile bitki ve hayvan kaynaklı diğer protein bileşenlerinin fonksiyonel özelliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada (Shchekoldina ve Aider, 2014) soya proteini izolatı, yağsız süt tozu ve yumurta tozunun su tutma kapasitesi sırasıyla 3,5 su/g izolat, 0,4 su/g izolat ve 1,9 g su/g izolat bulunmuştur. Bu çalışmada incelenen ayçiçeği küspesi izolatı, yağsız süt tozundan ve yumurta tozundan sırasıyla 6,95 kat ve 1,46 kat daha yüksek su tutma kapasitesine ve soya protein

izolatından %20,57 daha düşük su tutma kapasitesine sahiptir. Bu yazarlar tarafından bildirilen değerler ile bu çalışmada sunulan değerler arasındaki fark, farklı polipeptit bileşimine sahip olmasına veya farklı ayçiçeği çeşidi olmasına bağlanabilir.

Ayrıca bu fark, ayçiçek yağı küspesi ve protein izolatların hazırlanması sırasında çeşitli fiziksel ve kimyasal işlemlerin neden olduğu agregasyon-ayırma durumundaki değişikliklerden kaynaklanabilir.

4.1.5.2 Yağ tutma kapasitesi

Ayçiçeği küspesi protein izolatının yağ tutma kapasitesi $2,494 \pm 0,044$ g yağ/g izolat olarak literatürdeki 1,25 ila 2,85 g yağ/g izolat (Lin ve diğ, 1974; Shchekoldina ve Aider, 2014; Grasso ve diğ, 2019; Ermiş ve Karasu, 2020; Kaur ve Ghoshal, 2022) değer arasındadır. Bu değer, optimize edilmiş ultrason destekli protein ekstraksiyon koşullarında elde edilen ayçiçeği küspesinden (Dabbour ve diğ, 2018) %21,07 daha yüksektir. Ayrıca, Malik ve Saini (2017) tarafından fenolden arındırılmış ayçiçeği küspesinden elde edilen protein izolatları için bildirilen 1,084-1,298 g yağ/g izolat değerlerinden de daha yüksektir. Literatürdeki sonuçlar ile bu çalışma arasındaki fark, ultrason uygulamasıyla birlikte proteinlerin açılmasından, diğer bir deyişle denatüre proteinlerin yağ bağlama kapasitesini geliştiren gömülü hidrofobik grupları ortaya çıkarmasından kaynaklanmış olabilir (Dabbour ve diğ, 2018).

Bu çalışmada bulunan değer, soya proteini izolatı için bildirilen çalışmadan (Zhang ve Zhao, 2013) %37,65 daha düşük olup başka bir çalışmanın (Shchekoldina ve Aider, 2014) sonucuyla ise uyumluluk göstermektedir ($p < 0.05$). Öte yandan, ayçiçeği küspesinin yağ tutma özellikleri, soya unu, konsantreleri ve izolatları ile karşılaştırılmıştır (Lin ve diğ, Humbert ve Sosulski 1974). Ayçiçeği örnekleri, soya örneklerinden daha yüksek yağ emilimi sergilemiştir. Mevcut sonuçlar, ayçiçeği küspesinden elde edilen protein izolatının iyi yağ tutma kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, iyi yağ tutma kapasitesinde iyileşmeye neden olan hidrofobik grupların sürekli maruz kalmasıyla sonikasyona dayalı protein denatürasyonuna bağlanabilir (Malik ve diğ, 2017).

4.1.5.3 Emülsiyon oluşturma kapasitesi

Mevcut çalışmada bulunan ayçiçeği küspesi protein izolatının emülsiyon oluşturma aktivitesi $58,33 \pm 2,36$ bulunmuştur. Literatürde bu aktivite (%32,17-53,2) için daha

düşük değerler (Petraru ve diğ, 2021; Dabbour ve diğ, 2018; Cai ve diğ, 1996; Venkatesh, 1993) bulunmuştur. Soya, hardal ve keten tohumu gibi tohumların analizlendiği bir çalışmada (Rani ve Badwaik, 2021), tohum küspelerinde emülsiyon kapasiteleri %40,69 ile %57,18 arasında değişiklik göstermiştir. Aralarından yağı alınmış soya küspesinin emülsiyon kapasitesi $57,18 \pm 2,47$ ile en yüksek bulunmuştur. Bu değer, mevcut çalışmada bulunan ayçiçeği küspesi protein izolatının emülsiyon değerinin altında kalmaktadır. Ayrıca, González-Pérez ve Vereijken (2007) derleme çalışmalarında, ayçiçeğinin mukabil soyadan daha iyi veya en azından bunlara benzer emülsifiye edici özelliklere sahip olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada bulunan emülsiyon oluşturma aktivitenin yüksekliği, ekstraksiyon tekniğinin fonksiyonellik üzerinde önemli bir etkisi olduğundan kaynaklanmış olabilir. Kullanılan yöntemler ve ön işlemlerin çeşitliliği nedeniyle emülsifiye edici özellikler ve yağ bağlama kapasitesi açısından diğer çalışmalarla karşılaştırmanın zor olduğu vurgulanmıştır (Ermiş ve Karasu, 2020).

Yazar Dabbour ve diğ. (2019), ultrason uygulamasının protein izolatında emülsifikasyon özellikleri iyileştirdiğini bildirmiştir. Sonikasyon, daha düzensiz yapıların oluşumuna ve kısmi denatürasyonun gelişimine neden olmakta ve bu da proteinlerin yağ/su arayüzünde daha iyi adsorpsiyon kapasitesine sahip olmasını sağlayabilmektedir (Jambrak ve diğ, 2009). Ayçiçeği ve soya proteini izolatların benzer emülsiyon oluşturma aktivitesine sahip olduğunu bulan çalışmalar mevcuttur (Lin ve diğ, 1974; Jiahong, 2008). Bazı araştırmalar ise ayçiçeği albüminlerinin soya proteinlerinden daha zayıf emülsifiye edici kapasiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Sara ve diğ, 2020; Slabi ve diğ, 2020).

4.1.5.4 Köpük kapasitesi

Mevcut çalışmada bulunan ayçiçeği küspesi protein izolatının köpük kapasitesi %50 bulunmuştur. Malik ve Saini (2017) ve Shchekoldina ile Shchekoldina ve Aider (2014) tarafından sırasıyla %48 ve %49 ile benzer sonuçlar bildirilmiştir.

Dabbour ve diğ. (2018), çalışmasında farklı pH'larda ultrason destekli ekstraksiyonuyla üretilen ayçiçeği küspesinden üretilen protein izolatının köpürtme kapasitesini %19,52 ile %41,27 aralığında bildirmiştir. Çalışmada pH 5'te en az köpük oluşumunun gözlemlenme nedeni köpük oluşumunda çözünür protein fraksiyonlarının

yer alması ve protein çözünürlüğünün izoelektrik noktasında çok düşük olması (Damodaran ve Paraf, 1997) olabilir.

Sharma ve diğ. (2010) badem, kestane, fındık, çam fıstığı, brezilya fıstığı, antep fıstığı ve soya fasulyesinin köpük kapasitesi %40'ın üzerinde olduğunu bulmuşlar. Yağlı tohumların küspesini çalışan bir rapora göre (Rani ve Badwaik, 2021) ise hardal tohumu, keten tohumu ve soya fasulyesi için sırasıyla %17, %16,34 ve %14,69 olarak kaydedilmiştir. González-Pérez ve Vereijken (2007), soya ve ayçiçeği proteinlerinin karşılaştırılması ile ilgili olan derleme çalışmasında, ayçiçeği proteinlerinin soya proteinlerinininkine benzer veya onlar kadar iyi olmayan köpük özelliklerine sahip olduğunu; dolayısıyla köpük özellikleri nedeniyle ayçiçeği proteinlerinin gıda endüstrisinde kullanılmasını beklemediğini belirtmiştir. Buna göre mevcut çalışmada bulunan ayçiçeği küspesi protein izolatu iyi bir köpürtme kapasitesine sahiptir. Bunun nedeni ekstraksiyon yöntemi olabilir. Çünkü literatürdeki birçok çalışmaya göre (González-Pérez ve Vereijken, 2007) ayçiçeği proteinlerinin, kapsamlı protein agregasyonuna ve çökmesine yol açmamaları koşuluyla, gıda materyali konformasyonel esnekliği artıran işlemlere tabi tutulurken işlevselliği iyileştirmektedir.

Ultrason uygulamasının köpürtme kapasitesini iyileştirdiği bilinmektedir (Jambrak ve diğ, 2010). Bu iyileşme, sonikasyon sırasında protein parçacıklarını daha eşit şekilde dağıtan mekanik homojenleştirme etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, sonikasyon, molekül yapısında kısmi değişikliklere neden olmakta ve yeni oluşan gaz/sıvı arayüzünde proteinin hızlı bir şekilde adsorpsiyonu sağlamaktadır.

4.2 Soğuk Sıkım Kabak Çekirdeği Yağı Küspesi

4.2.1 Kimyasal kompozisyonu

Soğuk pres sıkım kabak çekirdeği küspesinin kimyasal kompozisyonunu belirleyen nem, protein yağ, karbonhidrat ve kül içeriği sırasıyla $7,7 \pm 0,142$, $31,816 \pm 0,895$, $7,278 \pm 0,295$, $45,583 \pm 0,843$ ve $7,72 \pm 0,104$ bulunmuştur.

Soğuk pres sıkım kabak çekirdeği küspesi, daha önce bildirilen %65,11, %48,57 ve %64 değerlerinden daha düşük protein içeriğine sahiptir (Miedzianka ve diğ, 2021; Mazloomi-Kiyapey ve diğ, 2019; Rodríguez-Miranda ve diğ, 2012).

Yağ seviyesi ise literatürde bildirilen %9,17, %0,58 ve %7,01 değerlerin arasında yer almaktadır. Değerlerdeki bu farklılıklar genetik çeşitliliğe ve hammaddelerin analizler için ön hazırlıklarına atfedilebilmektedir (Idourain ve diğ, 1996).

4.2.2 Protein izolatu eldesi

4.2.2.1 Alkali ekstraksiyon

Soğuk sıkım kabak çekirdeği küspesi için Box-Behnken tasarım ile alkali ekstraksiyon koşullarının optimize edilen pH, NaCl konsantrasyonu (%) ve Katı:çözgen oranı (%), ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi Çizelge 4.8’de gösterilmiştir. seyretmiştir.

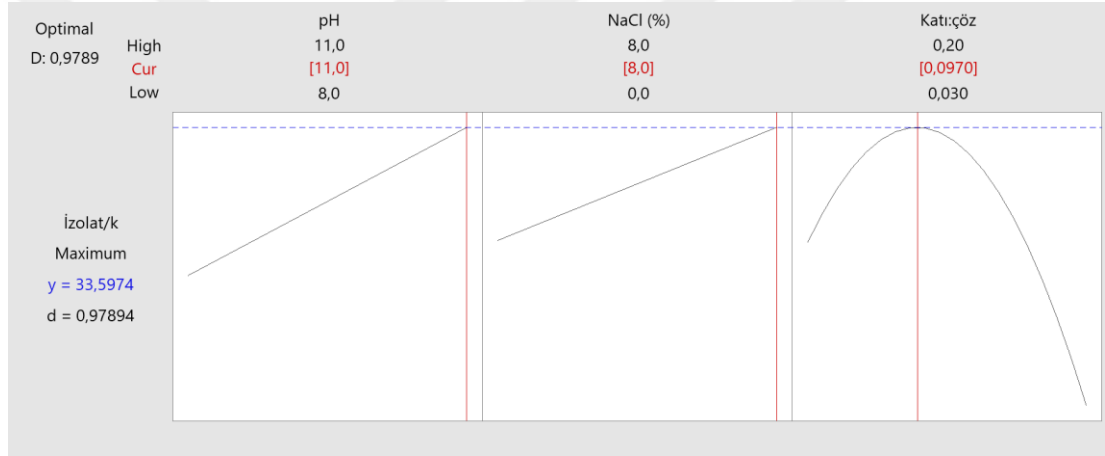
Çizelge 4.8 : Soğuk sıkım kabak çekirdeği küspesi için alkali ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	pH	NaCl (%)	Katı:çözgen oranı (%)	İzolat/Küspe (%)
5	1	1	1	8	0	0,2	6,51
11	2	-1	1	9,5	0	0,115	13,59
3	3	1	1	8	8	0,03	17,68
1	4	1	1	8	0	0,03	14,66
15	5	0	1	9,5	4	0,115	34,18
10	6	-1	1	11	4	0,115	30,25
12	7	-1	1	9,5	8	0,115	32,04
16	8	0	1	9,5	4	0,115	20,11
4	9	1	1	11	8	0,03	29,14
7	10	1	1	8	8	0,2	10,90
17	11	0	1	9,5	4	0,115	28,99
6	12	1	1	11	0	0,2	17,40
13	13	-1	1	9,5	4	0,03	19,65
8	14	1	1	11	8	0,2	14,36
9	15	-1	1	8	4	0,115	24,69
14	16	-1	1	9,5	4	0,2	11,26
2	17	1	1	11	0	0,03	22,24

Model denklemin istatistiksel analizi ve katsayıların önemi, P-değeri ve F-testi ile tahmin edilmiştir (Çizelge A.5). Gözlenen model, yanıtlar için anlamlıydı ($P < 0,05$),

bu modelin yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi uygun bir şekilde tanımlayabildiğini desteklemektedir. ANOVA ile protein izolatı verimi üzerindeki P değerleri aracılığıyla her terimin önemi Çizelge A.5'te gösterilmektedir. Sonuca göre modelde pH, katı:çözgen oranı ve katı:çözgen oranının karesi anlamlıyken ($P < 0,05$), NaCl konsantrasyonu anlamlı bulunmadı ($P > 0,05$). Şekil 4.5'te görüldüğü gibi NaCl konsantrasyonu arttıkça izolat veriminde artış vardır. Fakat konsantrasyonun etkisi modelde anlamlı derecede fark oluşturmamıştır. Bunun nedeni, %0 ile %8 NaCl konsantrasyonu arasındaki farkın önemli olmaması olabilir.

Soğuk sıkım kabak çekirdeği küspesi için alkali ekstraksiyonda optimum koşul, %33,597 izolat/küspe sonucunu tahminleyen ($d: \%97,894$) pH 11, %8 NaCl ve %0,1 katı:çözgen oranındaki koşul olduğu tespit edilmiştir ($\alpha:0,05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 : Kabak çekirdeği küspesi için alkali ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.

Belirlenen optimum koşulda tekrarlandığında $\%33,63 \pm 0,02$ izolat/küspe bulunmuş olup $\%27,65$ ile $\%39,55$ güven aralığına girmekte olduğu görülerek modelin validasyonu sağlanmıştır. pH değerine, NaCl yüzdesine ve katı:çözgen oranına (bağımsız değişkenler) bağlı protein izolatı verimi sonuçları, formül 4.5'te gösterildiği şekilde ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli ($R\text{-sq}_{\text{pred}}: \%56,47$) kullanılarak değerlendirilmiştir:

$$\begin{aligned} \text{İzolat/küspe (\%)} = & -13,7 + 2,597 \text{ pH} + 0,743 \text{ NaCl (\%)} + \\ & 264,1 \text{ Katı: çözen oranı (\%)} - 1368 \text{ Katı: çözen oranı (\%)} * \\ & \text{Katı: çözen oranı (\%)} \end{aligned} \quad (4.5)$$

4.2.2.2 Enzim destekli ekstraksiyon

Soğuk sıkım kabak çekirdeği küspesi için faktöriyel tasarım ile enzim destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen süre ve enzim konsantrasyonu ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 : Soğuk sıkım kabak çekirdeği küspesi için enzim destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.

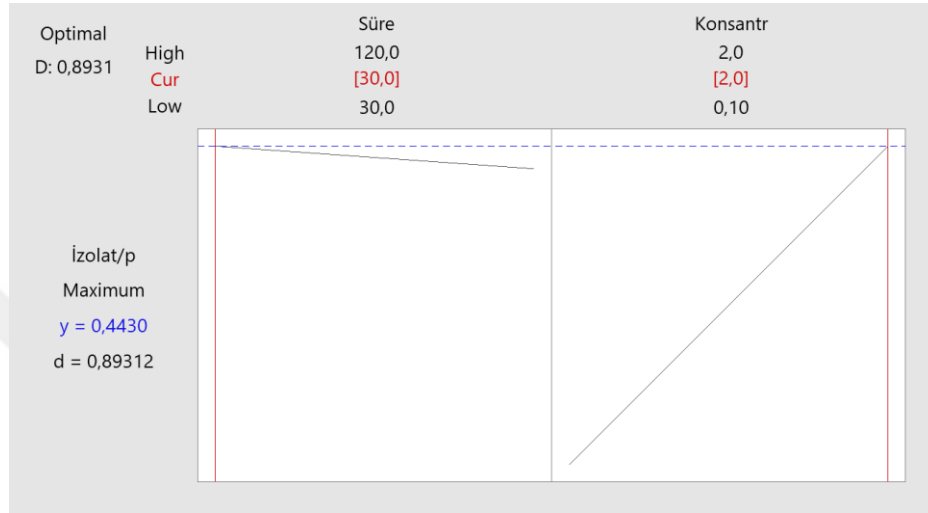
RunOrder	CenterPt	Blocks	Süre (dk)	Konsantrasyon (%)	İzolat /Küspe (%)
1	1	1	120	0,1	26,70
2	1	1	120	2,0	38,31
3	1	1	30	2,0	43,59
4	1	1	30	0,1	31,47
5	1	2	120	0,1	28,96
6	1	2	120	2,0	44,92
7	1	2	30	2,0	45,58
8	1	2	30	0,1	23,50
9	1	3	120	0,1	23,41
10	1	3	120	2,0	46,80
11	1	3	30	2,0	43,06
12	1	3	30	0,1	28,92

Model denklemin istatistiksel analizi ve katsayıların önemi, P-değeri ve F-testi ile tahmin edilmiştir (Çizelge A.6). Gözlenen model, yanıtlar için anlamlıydı ($P < 0,05$), bu modelin yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi uygun bir şekilde tanımlayabildiğini desteklemektedir. ANOVA ile protein izolatu verimi üzerindeki P değerleri aracılığıyla her terimin önemi Çizelge A.6’da gösterilmektedir. Sonuçlar, enzim konsantrasyonu doğrusal terimi anlamlı bulunurken ($P < 0,05$), enzim uygulama süresi anlamlı bulunmadı ($P > 0,05$). Şekil 4.6’da görüldüğü gibi sürenin etkisi modelde anlamlı derecede fark oluşturmamıştır. Bunun nedeni, enzim gerçekleştirdiği tüm işlevi için 30 dakika uygulama süresinin yeterli kaldığını, diğer bir deyişle enzim ve substrat ilişkisinde 30 dakika içinde birinin sınırlandırdığı söylenebilir.

Ekstraksiyonda enzim konsantrasyonu arttıkça kabak çekirdeği küspesinden daha fazla protein izolatu elde edilmiştir. Vergara-Barberán ve diğerlerinin (2015)

çalışmasında belirttiği gibi selüloz kullanımı, hücre duvarının parçalanmasından kaynaklanan protein ekstraksiyonunu iyileştirmektedir.

Soğuk sıkım kabak çekirdeği küspesi için enzim destekli protein ekstraksiyonunda optimum koşulun, %44,30 izolat/küspe sonucunu tahminleyen (d: %89,312) %2 selüloz enzimi konsantrasyonu ve 30 dk enzim uygulama süresi olduğu tespit edilmiştir ($\alpha:0,05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 : Kabak çekirdeği küspesi için enzim destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.

Belirlenen optimum koşulda tekrarlandığında $41,809 \pm 2,55$ izolat/küspe bulunmuş olup %40,67 ile %47,92 güven aralığına girmekte olduğu görülerek modelin validasyonu sağlanmıştır. Enzim konsantrasyonuna ve süresine bağlı protein izolatu verimi sonuçları, aşağıdaki şekilde ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli ($R-sq_{pred}$: %82,08) kullanılarak değerlendirilmiştir:

$$\begin{aligned} \text{İzolat/küspe (\%)} = & 0,2727 - 0,000130 \text{ Süre (dk)} + \\ & 0,08711 \text{ Konsantrasyon (\%)} \end{aligned} \quad (4.6)$$

4.2.2.3 Ultrason destekli ekstraksiyon

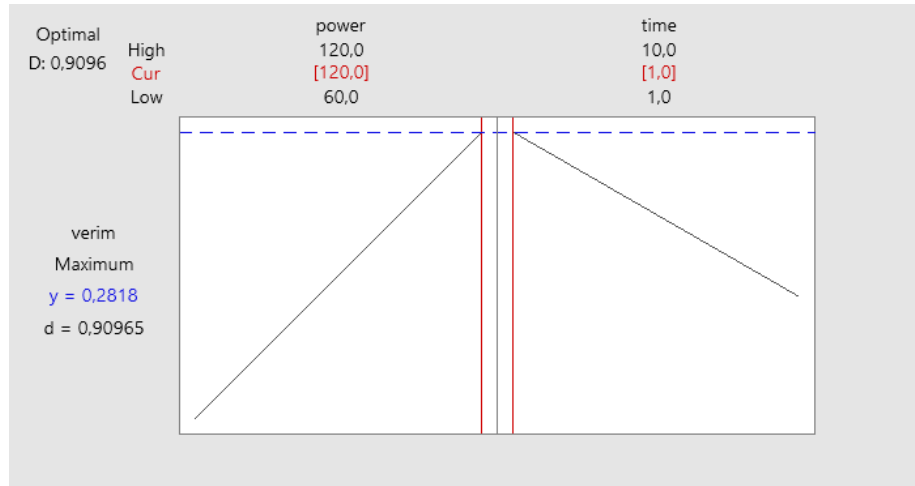
Kabak çekirdeği küspesi için Faktöriyel tasarım ile ultrason destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen ultrason gücü ve uygulama süresi ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10 : Kabak çekirdeği küspesi için Faktöriyel tasarım ile ultrason destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen bağımsız değişkenleri ve bunların yanıtı olarak protein izolatı verimi.

StdOrder	RunOrder	CenterPt	Blocks	Güç (W)	Süre (dk)	İzolat/Küspe (%)
2	1	1	1	120	1	28,99%
4	2	1	1	120	10	24,21%
3	3	1	1	60	10	23,66%
1	4	1	1	60	1	19,97%
6	5	1	2	120	1	27,36%
8	6	1	2	120	10	24,21%
7	7	1	2	60	10	23,02%
5	8	1	2	60	1	20,91%
10	9	1	3	120	1	26,33%
12	10	1	3	120	10	22,79%
11	11	1	3	60	10	24,69%
9	12	1	3	60	1	20,11%

Model denklemin istatistiksel analizi ve katsayıların önemi, P-değeri ve F-testi ile tahmin edilmiştir (Çizelge A.7). Gözlenen model, yanıtlar için anlamlıydı ($P < 0,05$), bu modelin yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi uygun bir şekilde tanımlayabildiğini desteklemektedir. ANOVA ile protein izolatı verimi üzerindeki P değerleri aracılığıyla her terimin önemi Çizelge A.7’de gösterilmektedir. Sonuçlar, ultrason gücü doğrusal terimi ve güç ile uygulama süresi etkileşimi anlamlı ($P < 0,05$) bulunurken, süre anlamlı değildi ($P > 0,05$). Şekil 4.7’de görüldüğü gibi süre azaldıkça izolat veriminde artış vardır. Fakat sürenin etkisi modelde anlamlı derecede fark oluşturmamıştır. Bunun nedeni, 120 dk ile 60 dk arasındaki farkın önemli olmaması olabilir.

Soğuk sıkım kabak çekirdeği küspesi için ultrason destekli protein ekstraksiyonunda optimum koşulun, %28,18 izolat/küspe sonucunu tahminleyen (d: %90,965) 120 W ultrason gücü ve 1 dk ultrason uygulama süresi olduğu tespit edilmiştir ($\alpha:0,05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 : Kabak çekirdeği küspesi için ultrason destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.

Belirlenen optimum koşulda tekrarlandığında $25,38 \pm 2,24$ izolat/küspe bulunmuş olup $26,597$ ile $29,753$ güven aralığına girmekte olduğu görüldüğü modelin validasyonu sağlanmıştır. Ultrason gücüne ve uygulama süresine bağlı protein izolatu verimi sonuçları, formül 4.7’de gösterildiği şekilde ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli ($R\text{-sq}_{\text{pred}}$: $82,15$) kullanılarak değerlendirilmiştir:

$$\begin{aligned} \text{İzolat/küspe (\%)} = & 0,1055 + 0,001512 \text{ Güç}(W) + \\ & 0,01353 \text{ Süre}(dk) - 0,000156 \text{ Güç}(W) * \text{Süre}(dk) \end{aligned} \quad (4.7)$$

4.2.2.4 Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Kabak çekirdeği küspesi için Faktöriyel tasarım ile mikrodalga destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen mikrodalga gücü ve uygulama süresi ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Model denklemin istatistiksel analizi ve katsayıların önemi, P-değeri ve F-testi ile tahmin edilmiştir (Çizelge A.8). Gözlenen model, yanıtlar için anlamlıydı ($P < 0,05$), bu modelin yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi uygun bir şekilde tanımlayabildiğini desteklemektedir. ANOVA ile protein izolatu verimi üzerindeki P değerleri aracılığıyla her terimin önemi Çizelge A.8’de gösterilmektedir. Sonuca göre modelde mikrodalga gücü anlamlıyken ($P < 0,05$), süre anlamlı bulunmadı ($P > 0,05$). Fakat sürenin etkisi modelde anlamlı derecede fark oluşturmamıştır. Bunun nedeni, 3 dk ile 1 dk arasındaki farkın önemli olmaması olabilir.

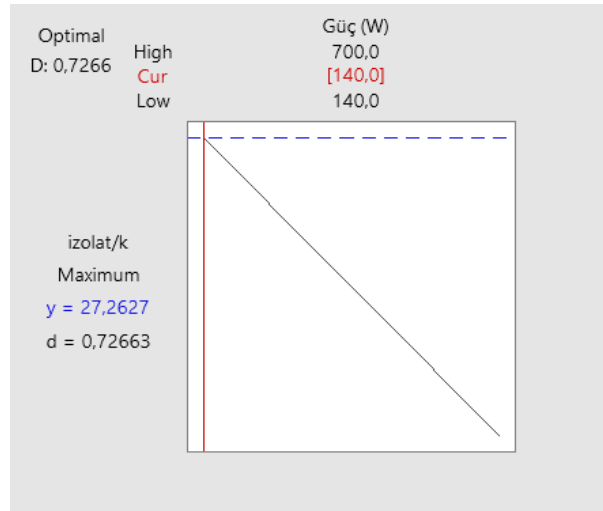
Çizelge 4.11 : Kabak çekirdeği küspesi için Faktöriyel tasarım ile mikrodalga destekli ekstraksiyon koşullarının optimize edilen mikrodalga gücü ve uygulama süresi ve bunların yanıtı olarak protein izolatu verimi.

StdOrder	RunOrder	CenterPt	Blocks	Güç (W)	Süre (dk)	İzolat/Küspe (%)
4	1	1	1	700	3	23,05825
3	2	1	1	140	3	24,03561
2	3	1	1	700	1	26,54474
1	4	1	1	140	1	26,80115
8	5	1	2	700	3	20,99068
7	6	1	2	140	3	27,15264
6	7	1	2	700	1	19,26696
5	8	1	2	140	1	28,13397
12	9	1	3	700	3	20,16642
11	10	1	3	140	3	30,27079
10	11	1	3	700	1	24,8646
9	12	1	3	140	1	27,18204

Modelde anlamlı bulunmayan süre değişkeni, çıkartıldıktan sonra tekrardan bir ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli oluşturuldu (Çizelge A.9). Kabak çekirdeği küspesi için mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum koşul, %27,263 izolat/küspe sonucunu tahminleyen (d: %72,66) 140 W mikrodalga gücü ve 1 dk uygulama süresi olduğu tahmin edilmiştir (α : 0,05) (Şekil 4.8).

Belirlenen optimum koşulda tekrarlandığında %26,883±3,62 izolat/küspe bulunmuş olup %25,02 ile %29,51 güven aralığına girmekte olduğu görülerek modelin validasyonu sağlanmıştır. Mikrodalga gücüne bağlı protein izolatu verimi sonuçları, formül 4.8'de gösterildiği şekilde ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli (R -sq_{pred}: %32,27) kullanılarak değerlendirilmiştir:

$$\text{İzolat/küspe (\%)} = 28,46 - 0,00854 \text{ Güç (W)} \quad (4.8)$$



Şekil 4.8 : Kabak çekirdeği küspesi için mikrodalga destekli ekstraksiyonun optimizasyon grafiği.

4.2.2.5 Protein veriminde optimum ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi

RSM ile kabak çekirdeği küspesi için belirlenen pH 11, %8 NaCl ve %0,1 katı:çözgen oranı ile birlikte uygulanan enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun optimum koşulları Çizelge 4.12'deki gibidir.

En yüksek protein geri kazanımı, ultrason uygulaması ile elde edilmiştir. Bu nedenle kabak çekirdeği küspesi protein izolatu eldesinde, tez çalışması boyunca tüm analizler için izolat veriminin %46,243 ve geri kazanılan protein içeriğinin %100 ile en yüksek olduğu ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Çizelge 4.12 : Kabak çekirdeği küspesi için optimum koşullardaki alkali, enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun izolat verimi ve geri kazanılan protein içeriği.

Ekstraksiyon yöntemi	Optimum koşulları	İzolat verimi (%)	Geri kazanılan protein (%)
Alkali	pH11; %8 NaCl; %0,1 katı:çözgen oranı	33,732±2,251 ^a	78,807±11,0081 ^a
Enzim destekli	%2 selüloz; 30 dk	43,498±5,8241 ^a	90,255±8,518 ^a
Ultrason destekli	120 W; 1 dk	46,243±0,516 ^a	100±2,642 ^a
Mikrodalga destekli	140 W; 1 dk	44,898±4,516 ^a	92,011±6,111 ^a

Aynı sütunda aynı küçük harf ile gösterilmiş değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamaktadır ($P < 0,05$).

4.2.3 Renk analizi

Kabak çekirdeği küspesinden elde edilen protein izolatın L^* değeri $69,92 \pm 0,36$, a^* değeri $-3,39 \pm 0,005$ ve b değeri ise $23,36 \pm 0,14$ olarak kaydedilmiştir. Sonuçtaki negatif a^* değeri, izolatın yeşil tonalitesini ve pozitif b değeri ise sarı tonu göstermektedir. Hammadde yapısından dolayı kabak çekirdeği undaki (Nikolić ve diğ, 2018) gibi renkte yeşil ve sarı tonlar mevcut bulunmuştur.

Ultrason, kavitasyonun bir sonucu olarak rengi etkiler. Gıdalardaki renk pigmentlerin yapısal salınımını hızlandırabilirken, pigment içeren yapılarda değişikliklere neden olarak ışık Emilimini de indükleyebilir (Mir ve diğ, 2019). Literatürde ultrason uygulanan örneklerin kontrole kıyasla daha bir açık renk ile sonuçlanmıştır (Sert ve diğ, 2022; Mir ve diğ, 2019; Du ve diğ, 2022).

Mevcut çalışmadaki gibi ultrason uygulamasını takiben alkali ekstraksiyonu kullanılan kabak çekirdeğinin (Sert ve diğ, 2022) L^* değeri 72,26 ve başka bir çalışmada (Das ve diğ, 2022) ultrason destekli ekstraksiyonla 72,47 sonucu kaydedilmiştir. Genel olarak bu değerler, bu çalışmadaki kabak çekirdeği protein izolatı değerleriyle uyumludur.

Ultrason uygulamasının a^* ve b^* değerleri üzerinde de etkileri söz konusudur. Literatürde 0,4, -0,63 a^* değeri ve 20,20 b^* değeri bildiren çalışmalara göre mevcut çalışmadaki kabak çekirdeği izolatının sarıya ve yeşile doğru eğilimi daha güçlüdür (Das ve diğ, 2022; Du ve diğ, 2022).

Ticari olarak satılan soya protein konsantresinin renk değerleriyle (L^* : 88,40, a^* : 1,10 ve b^* :14,56) karşılaştırıldığında (Toews ve Wang, 2013) elde edilen protein tozlarının daha düşük parlaklık, kuvvetli yeşil renk ve daha güçlü sarı renk olduğu görülmektedir. Renk parametrelerindeki bu farklılık hammaddeye ait renk pigmentlerine (Toews ve Wang, 2013), ekstraksiyon (Sert ve diğ, 2022; Mir ve diğ, 2019; Du ve diğ, 2022), kurutma (Joshi ve diğ, 2011), ve protein elde edilme yöntemine (Salgado ve diğ, 2011) göre farklılık gösterebileceği literatürce bildirilmiştir.

4.2.4 Termal özelliklerin belirlenmesi

Ultrason ile üretilen kabak çekirdeği küspesi protein izolatının termal özellikleri, diferansiyel tarama kalorimetrisi kullanılarak belirlenmiştir. Termal özelliklere ait bilgileri Çizelge 4.13'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.13 : Kabak çekirdeği küspesi protein izolatının termal özellikleri.

T_g	T_o	T_p	ΔH
26,26 °C	57,6 °C	100,57 °C	15,33 J/g

T_g = Cam geçiş sıcaklığı, T_o = başlangıç sıcaklığı, T_p = tepe sıcaklığı, ΔH = faz geçiş entalpisi.

Literatürde ekstre edilmiş kabak çekirdeği protein izolatlarının DSC termogramları, izolatların karakteristik denatürasyon sıcaklığı 84,3-104,1 °C aralığında kaydedilmiştir (Gao ve diğ, 2022; Sert ve diğ, 2022; Das ve diğ, 2022; Rodríguez-Miranda ve diğ, 2012; Rezig ve diğ, 2013). Mevcut çalışmada bulunan T_p değeri, daha önce bildirilen değerler aralığında yer almıştır. Ayrıca, soya proteini, (Tang, 2017) 73,5 °C denatürasyon sıcaklığına sahip olduğu bildirildiğinden mevcut çalışmada kabak çekirdeği proteini 100,57 °C ile daha yüksek termal stabilite göstermiştir.

Rodríguez-Miranda ve diğ. (2012) ile Rezig ve diğ. (2013) kabak çekirdeği proteini başlangıç sıcaklığını sırasıyla 80,04 °C ve 83 °C bildirmiştir. Mevcut çalışmadaki düşük başlangıç sıcaklık (T_o : 57,6 °C), ısıtma işlemi sırasında protein yapılarının daha kararlı olduğunu gösterir (Ma ve diğ, 2018). Literatürde T_o değeri 48,8 °C bildirilmiş ultrason ile üretilen kabak çekirdeği proteinine (Das ve diğ, 2022) göre mevcut çalışmada nispeten daha yakın sonuç alınmıştır.

Ultrason uygulanan kabak çekirdeği proteinin denatürasyon entalpisi (15,33 J/g), literatürde bildirilenlerle karşılaştırıldığında (Gao ve diğ, 2022; Rodríguez-Miranda ve diğ, 2012; Rezig ve diğ, 2013) oldukça yüksek değer elde edilmiştir. Yüksek entalpi değeri, ultrason ile desteklenen ekstraksiyon işlemi sırasında proteinin yapısal yapısındaki bir değişiklikten kaynaklanıyor olabilir. Sert ve diğerleri (2022) bir çalışmasında ultrason işleminin kontrole kıyasla ΔH değerini yaklaşık %20 arttığını bildirmiştir. Bunun nedeni, belli bir süre sonikasyondan sonra protein toplanması olabilir (Chandrapala ve diğ, 2011).

4.2.5 Fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi

Kabak çekirdeği küspesi protein izolatların 25 °C’de belirlenen fonksiyonel özellikleri Çizelge 4.14’te verilmiştir.

Çizelge 4.14 : Kabak çekirdeği küspesi protein izolatının fonksiyonel özellikleri.

Fonksiyon özellikleri	Yüzde (%)
Su tutma	3,25±0,03
Yağ tutma	2,78±0,1
Emülsiyon oluşturma kapasitesi	30,00±4,08
Köpürme kapasitesi	20,00±0,00

4.2.5.1 Su tutma kapasitesi

Kabak çekirdeği protein izolatı 3,245 g su /g izolat su tutma kapasitesi ile literatürdeki birçok çalışmadan (Rodríguez-Miranda ve diğ, 2012; Lazos, 1992; Vinayashree ve Vasu, 2021; El-Adawy ve Taha, 2001; Miedzianka ve diğ, 2021; Alshehry, 2020) yüksek bulundu. Küspenin soğuk sıkım olması sayesinde muhtemelen daha yüksek polar amino asit mevcudiyetine ve daha düşük yağ içeriğine yanıt olarak daha yüksekti. Ayrıca, yüksek değerler için bir başka olası açıklama protein ekstraksiyonun ultrason ile desteklenmesidir (Jambrak ve diğ, 2008).

Jackfruit tohum protein izolatı (Resendiz-Vazquez ve diğ, 2017), siyah fasulye proteini izolatları (Jiang ve diğ, 2014), sulandırılmış peynir altı suyu proteini konsantresi (Chandrapala ve diğ, 2011) gibi çeşitli protein izolatları, fonksiyonel özelliklerini iyileştirmek için ultrason ile modifiye edilmiştir.

Bu araştırmadaki kabak çekirdeği protein izolatının su tutma kapasitesi, daha önce bildirilen (Shchekoldina ve Aider, 2014) yağsız süt tozundan ve yumurta tozundan sırasıyla 7,1 ve 1,7 kat daha yüksek ve soya fasulyesi küspesinin (Shchekoldina ve Aider, 2014; Rani ve Badwaik, 2021) 3,438 ila 2,467 g su/g izolat değerleri arasında yer almaktadır.

4.2.5.2 Yağ tutma kapasitesi

Kabak çekirdeği küspesi protein izolatının yağ tutma kapasitesi 2,78 g yağ /g izolat olarak literatürdeki birçok çalışmadan (Rodríguez-Miranda ve diğ, 2012; Alshehry, 2020; Miedzianka ve diğ, 2021) daha yüksekti. Ayrıca, dört farklı küspenin fonksiyonel özellikleri üzerine olan bir çalışmada (Gao ve diğ, 2021), yağı alınmış yer fıstığı küspesi, kabak çekirdeği küspesi, ayçiçeği çekirdeği küspesi ve soya fasulyesi küspesi arasından kabak çekirdeği küspesi en yüksek yağ tutma değerine sahipti. Bunun nedeni, küspenin içerdiği yağ seviyesi, muhtemelen numunede bulunan ve hidrokarbon yağ birimlerine bağlanabilen proteinlerin daha fazla sayıda polar olmayan

bölgesinin açığa çıkması olabilir. Bu sayede daha fazla yağ tutma kapasitesiyle sonuçlanabilir. Benzer şekilde, kabak çekirdeği unundan üretilen protein izolatu üzerinde yapılan bir çalışmada (Vinayashree ve Vasu, 2021) numunenin yağ içeriği 4,6 kat daha yüksek olup yağ tutma kapasitesi 3,59 ila 3,70 g yağ/g izolat olarak bu çalışmadaki değerin üzerinde bulunmuştur. Literatürde soya protein izolatının ise 1,31 ila 4 g yağ/g izolat değerler arasında olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmadaki değer de bu aralıktadır.

4.2.5.3 Emülsiyon oluşturma kapasitesi

Proteinlerin emülsifiye etme mekanizması, yağ damlacıklarını adsorpsiyonu, üzerlerini kaplaması ve homojenizasyondan sonra bunların birleşmesini önlemesi olarak tanımlanmaktadır.

Mevcut çalışmada bulunan kabak çekirdeği küspesi protein izolatının emülsiyon oluşturma aktivitesi $30 \pm 4,08$ bulunmuştur. Literatürde bu aktivite, kabak çekirdeği çekirdek unu %59,2 (El-Adawy ve Taha, 2001) ve yağı alınmış kabak çekirdeği küspesi %61,71 (Rodríguez-Miranda ve diğ, 2012) emülsiyon kapasitesi ile daha yüksek değerler gözlenmiştir.

Kabak çekirdeği proteini üzerine çalışan bir makalede (Mazloomi-Kiyapey ve diğ, 2019), emülsiyonlaştırma kapasitesi protein izolatu halineyken %10-20 arasında değişmekteyken protein hidrolizatında %15-45 arasında değer bulunmuştur. Emülsiyon oluşturma kapasitesi, hidrolizatların hidrofobiklik derecesine ve moleküler ağırlığına bağlı olduğundan dolayı ve protein hidrolizatların hidrofobik ve hidrofilik zincirlerin arasındaki denge, hidrolizatların emülsifiye etme kapasitesinde bir artışa neden olmuş olabilir. Hidroliz sırasında, hidrolizatların çözünürlüğü artar ve bunlar su-y yağ arayüzüne göç eder (Li ve diğ, 2007; Zhang ve diğ, 2012)

Ticari olarak satın alınan kabak proteini, 4 ila 10 arasında değişen bir pH'ta (ortalama %5'in altında) zayıf bir emülsiyon oluşturma aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Miedzianka ve diğ, 2021). Bu, yüksek oranda çözünmeyen proteinlerin iyi emülgatörler olmadığı kanıtlamaktadır (Moure ve diğ, 2006).

4.2.5.4 Köpük kapasitesi

Mevcut çalışmada bulunan kabak çekirdeği küspesi protein izolatının köpük kapasitesi %20 bulunmuştur. El-Adawy ve Taha (2001) tarafından da %18,65 ile benzer sonuç gözlemlenmiştir.

Miedzianka ve diğ. (2021) çalışmasında, ticari kabak protein konsantresi (%65,11 protein), küresel yapısı ve yüksek moleküler kütlesinden kaynaklanabilecek pH'tan bağımsız olarak çok düşük köpürtme kapasitesi (%4-10) ile karakterize edilmiştir. Bu düşük sonucun nedeni köpürebilirlikte önemli faktörlerden olan protein kaynağı & konsantrasyonu veya işleme yöntemleri olabilir. Bu sonuçlar, kabak çekirdeği proteinin önemli ölçüde daha yüksek köpük oluşturma kapasitesi ile karakterize edildiğini bulan literatürdeki sonuçlarla (sırasıyla %51,92 ve %10-30) uyumlu değildir (Rodríguez-Miranda ve diğ, 2012; Mazloomi-Kiyapey ve diğ, 2019). Ek olarak, tek bir kabak çekirdeği protein molekülünde ve protein agregatlarında köpüğün oluşumuna neden olan mekanizmaların henüz tam olarak anlaşılmadığı ve literatürce yeterince açıklanmadığı belirtilmiştir (Rezig ve diğ, 2016).

5. SONUÇ

Günümüzde hızla artan nüfus nedeniyle protein ihtiyacının karşılanması zorlaşmakta ve alternatif, sürdürülebilir protein kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda hammadde olarak seçilen “Ayçiçeği yağ küspesi” (*Helianthus annuus*) ve “Soğuk sıkım kabak çekirdeği yağı küspesi” (*Cucurbita pepo*) protein içerikleri sırasıyla %32,541 ve %31,816 olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda, bu hammaddeler toksisite belirtilerinin neden olduğu hiçbir yan etki göstermemekte ve diğer protein açısından zengin kaynaklara göre daha düşük antinutrisyonel bileşen içeriğine sahip olduğundan dolayı bitkisel protein tozu üretiminde iyi birer hammadde olabilecekleri düşünülmektedir.

Ayçiçeği ve kabak çekirdeği protein izolatlarının protein içerikleri sırasıyla %84,563±2,45 ve %87,763±1,3 elde edilmiştir. Literatüre göre %65 ve üzeri protein içeren toz formdaki proteinler protein konsantresi olarak adlandırıldığından elde edilen protein izolatları protein konsantresi olarak ifade edilebilmektedirler.

Bu çalışma ile gıda endüstrisinde çeşitli bitkisel atıklardan üretilen protein izolatlarının verimliliğinin artırılması ve çeşitli bitki bazlı ürün üretiminde yardımcı ingredient olarak kullanımına olanak sağlanması hedeflenmiştir. Ayrıca, yeni yerel hammaddelerin, bitkisel yan ürünlerin ve bitkisel atıkların kullanım potansiyellerinin değerlendirilmesi için ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir.

Tezin hedefleri arasında, gelecekte yapılacak olan Araştırma ve Geliştirme çalışmaları ile ülkemizin rekabet gücünü arttırmak ve ülke ekonomisine katkıda bulunmak yer almaktadır. Bu nedenle, bitkisel atıkların protein ekstraksiyonuna yönelik yöntem/teknolojilerin geliştirilmesi ve yeni ürünlerin geliştirilmesinde oldukça etkili olan termal ve fonksiyonel özelliklerin analizlenmesi yapılmıştır.

Tez kapsamında öncelikle temin edilen ayçiçek yağı ve soğuk pres kabak çekirdeği yağının kimyasal kompozisyonları belirlenmiştir. Ardından, ayçiçeği yağı küspesinin RSM ile optimize edilen alkali ekstraksiyonu koşulları pH 11, %0 NaCl konsantrasyonu ve %0,04 katı:çözgen oranı ve faktöriyel tasarım ile optimize edilen enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon koşulları sırasıyla %2 selüloz

enzimi konsantrasyonu ve 120 dk enzim uygulama süresi, 120 W ultrason gücü ve 10 dk uygulama süresi, 700 W mikrodalga gücü ve 1 dk uygulama süresi olarak tespit edilmiştir. En yüksek izolat verimi olan ultrason destekli ekstraksiyonda belirlenen optimum koşul ile ortalama ayçiçeği küspesi protein izolatı verimi %22,656 ve geri kazanılan protein ise %58,826 olarak bulunmuştur.

Soğuk sıkım kabak çekirdeği yağı küspesi ise RSM ile optimize edilen alkali ekstraksiyonu koşulları pH 11, %8 NaCl ve %0,1 katı:çözgen oranı ve faktöriyel tasarım ile optimize edilen enzim, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon koşulları sırasıyla %2 selüloz enzimi konsantrasyonu ve 30 dk enzim uygulama süresi, 120 W ultrason gücü ve 1 dk ultrason uygulama süresi, 140 W mikrodalga gücü ve 1 dk uygulama süresi olarak tespit edilmiştir. En yüksek izolat verimi olan ultrason destekli ekstraksiyonda belirlenen optimum koşul ile ortalama ayçiçeği küspesi protein izolatı verimi %46,243 ve geri kazanılan protein ise %100 olarak bulunmuştur. Ayrıca her bir ekstraksiyon yönteminde bağımsız değişkenlere bağlı olarak ikinci dereceden bir polinom regresyon modeli elde edilmiştir.

Her iki küspede de en yüksek geri kazanılan protein içeriği, ultrason destekli ekstraksiyon ile elde edilmiştir. Bunun nedeni, ultrason işlemi sırasında oluşan mekanik titreşim, alkali çözelti ile küspe arasındaki teması yoğunlaştırmakta, hücre yıkımını ve gözeneklerin açılmasını desteklemekte ve gelişmiş bir kütle aktarımı sayesinde protein salınımı ile sonuçlandığı düşünülmektedir (Sert ve diğ., 2022).

Optimizasyon çalışmaları sonucunda en yüksek protein ekstraksiyon yüzdesine sahip ultrason destekli ekstraksiyon ile ayçiçeği protein izolatlarının denatürasyon sıcaklığı 86-126°C aralığında ve denatürasyon entalpisi 8.75 ± 1.63 J/g olarak bulunmuştur. Su tutma, yağ tutma, emülsifiye etme ve köpürme kapasitesi sırasıyla $2,781 \pm 0,08$, $2,494 \pm 0,04$, $58,33 \pm 2,36$ ve $50 \pm 0,0$ belirlenmiştir. Kabak çekirdeği protein izolatlarının ise denatürasyon sıcaklığı 57,6-100,57°C aralığında ve denatürasyon entalpisi 15,33 J/g olarak bulunmuştur. Su tutma, yağ tutma, emülsifiye etme ve köpürme kapasitesi sırasıyla $3,245 \pm 0,03$, $2,776 \pm 0,1$, $30 \pm 4,08$ ve $20 \pm 0,00$ belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşulda ayçiçeği yağı küspesi protein izolatının renk analizi sonucuna göre L^* değeri $29,143 \pm 0,53$, a^* değeri $0,817 \pm 0,09$, b değeri ise $7,543 \pm 0,35$ olarak kaydedilmiştir. Kabak çekirdeği küspesinden elde edilen protein izolatın renk analizine göre ise L^* değeri $69,92 \pm 0,36$, a^* değeri $-3,387 \pm 0,005$ ve b değeri ise $23,363 \pm 0,14$ olarak kaydedilmiştir.

Literatürdeki ilgili çalışmalara dayanarak (Shchekoldina ve Aider, 2014; Rani ve Badwaik, 2021), ayçiçeği ve kabak çekirdeği protein izolatının, et endüstrisinde geleneksel olarak kullanılan bazı proteinlerine göre (soya proteini izolatu, yağsız süt tozu ve yumurta tozu) önemli ölçüde daha yüksek fonksiyonel özelliklere sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu içeriğin soya protein izolatına alternatif olarak yeni bitkisel bazlı et mamullerin üretiminde kullanılmasına olanak tanıyabileceğini göstermektedir. Ayçiçeği protein izolatının yüksek emülsiyon oluşturma aktivitesi, bu küspeden elde edilen protein izolatının özellikle kıyılmış et, ufalanmış et, kahve beyazlatıcıları, kek hamurları, salata sosları ve kremalı gıda sistemlerinde bir yağ taklitçisi olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde ultrason destekli ve ultrason uygulaması olmadan elde edilen ayçiçeği (Lin ve diğ, 1974; Jiahong, 2008; Petraru ve diğ, 2021; Cai ve diğ, 1996; Venktesh, 1993; González-Pérez ve Vereijken, 2007; Sara ve diğ, 2020; Slabi ve diğ, 2020; Dabbour ve diğ, 2018, 2019; Shchekoldina ve Aider, 2014; Rani ve Badwaik, 2021; Malik ve Saini, 2017; Shchekoldina ve Aider, 2014) ve kabak çekirdeği (Rodríguez-Miranda ve diğ, 2012; Lazos, 1992; Vinayashree ve Vasu, 2021; El-Adawy ve Taha, 2001; Miedzianka ve diğ, 2021; Alshehry, 2020) protein izolatlarının fonksiyonel özellikleri karşılaştırıldığında, ultrason uygulamasının yağ tutma, emülsiyon oluşturma (Dabbour ve diğ, 2019) ve köpürtme kapasitesi (Jambrak ve diğ, 2010) iyileştirdiği görülmüştür.

Bu tez çalışması, ülkemizde yetişen yerel toprak mahsullerinden üretilen yan ürünlerin ve atıkların, gıda sektöründe kullanım potansiyeli açığa çıkmış ve doğal kaynaklarımız etkili bir şekilde değerlendirilebileceğini tekrar vurgulamıştır. Bununla birlikte, oluşturulacak protein konsantrasyonlarının ekstraksiyon yöntemi ile bitki bazlı protein üretimi için geleneksel ekstraksiyon metoduna enzim, ultrason ve mikrodalga uygulaması gibi ekonomik, çevreci ve temiz alternatifler sunmuştur. Bu çalışma ile, optimizasyon çalışması sonucunda elde edilen yüksek ekstraksiyon verimi ve geri kazanılan protein verimi sayesinde bitkisel atıklardan protein izolatu elde edilerek hem gıda sürdürülebilirliğine katkı sağlanabileceği hem de Türkiye’de ithalatı yapılan en önemli yağlı tohum bitkisi olan soya bitkisine alternatif yerel mahsullerden protein izolatu eldesi mümkün olmaktadır. Ayrıca bu çalışma, protein kaynağı olarak ayçiçeği ve kabak çekirdeği küspelerinin fonksiyonel bir içerik maddesi veya bir besin takviyesi olarak yenilikçi kullanımına yol açabileceğini göstermiştir.



KAYNAKLAR

- Abak, K., Sarı, N. ve Çetiner, B.** (1997). Changes of protein, fat content and fatty acid composition in naked pumpkin seeds influenced by sowing time, *Acta Hort. (ISHS)*, 492, 187-192.
- Abu, J. O., Müller, K., Duodu, K. G., & Minnaar, A.** (2006). Gamma irradiation of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) flours and pastes Effects on functional, thermal and molecular properties of isolated proteins. *Food Chemistry*, 95(1), 138-147.
- Alfawaz, M.A. (2004).** Chemical Composition and Oil Characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Seed Kernels, Food Sci. & Agric. Res. Center, King Saud Univ. Press, 129, 5-18.
- Al-Khalifa, A.S.** (1996). Physicochemical characteristics, fatty acid composition and lipoxygenase activity of crude pumpkin and melon seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 964–966.
- Alrosan, M., Tan, T. C., Easa, A. M., Gammoh, S., & Alu'datt, M. H.** (2022c). Recent updates on lentil and quinoa protein-based dairy protein alternatives Nutrition, technologies, and challenges. *Food chemistry*, 132386.
- Alrosan, M., Tan, T. C., Koh, W. Y., Easa, A. M., Gammoh, S., & Alu'datt, M. H.** (2022). Overview of fermentation process structure-function relationship on protein quality and non-nutritive compounds of plant-based proteins and carbohydrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15.
- Alrosan, M., Tan, T. C., Mat Easa, A., Gammoh, S., & Alu'datt, M. H.** (2021b). Effects of fermentation on the quality, structure, and nonnutritive contents of lentil (*Lens culinaris*) proteins. *Journal of Food Quality*, 2021, 1-7.
- Alshehry, G. A.** (2020). Preparation and nutritional properties of cookies from the partial replacement of wheat flour using pumpkin seeds powder. *World*, 9(2), 48-56.
- Amza, T., Amadou, I., Kamara, M. T., Zhu, K. X., & Zhou, H. M.** (2011). Nutritional and functional characteristics of gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) an underutilized oilseed. *Grasas y Aceites*, 62(3), 290-298.
- Anal, A.** (2018). Food processing by-products and their utilization. *John Wiley & Sons*.
- AOAC** (2006). Official method of analysis, 18th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

- Asgar, M. A., Fazilah, A., Huda, N., Bhat, R., & Karim, A. A.** (2010). Nonmeat protein alternatives as meat extenders and meat analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 513–529.
- Balandrán-Quintana, R. R., Mendoza-Wilson, A. M., Ramos-Clamont Montfort, G., & Huerta-Ocampo, J. Á.** (2019). Chapter 4 - Plant-Based Proteins. In C. M. Galanakis (Ed.), *Proteins Sustainable Source, Processing and Applications* (pp. 97–130). Academic Press.
- Berrazaga, I., Micard, V., Gueugneau, M., & Walrand, S.** (2019). The role of the anabolic properties of plant-versus animal-based protein sources in supporting muscle mass maintenance a critical review. *Nutrients*, 11(8), 1825.
- Bodwell CE and Petite L,** (1983). Plant proteins for human food. *Plant Foods Hum Nutr* 32 197–471.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A.** (2010). Pulse proteins Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food research international*, 43(2), 414-431.
- Broad, G.M.** (2020). Making meat, better the metaphors of plant-based and cell-based meat innovation. *Environ. Commun.*, 14(7) 919-932, doi: 10.1080/17524032.2020.172 5085.
- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Vaštag, Ž., & Petrović, L.** (2016). Functional properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate and hydrolysate. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 81(1), 35-46.
- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Vaštag, Ž., Petrović, L., & Vučinić-Vasić, M.** (2015). Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 609-615.
- Bulut, A.** (2018). Ukrayna'da Karlı Bir Tarımsal Üretim Balkabağı ve Çekirdeği. Uluslararası Türk Ukrayna İşadamları Derneği'nin Resmi Sitesi (TUID) <http://arsiv.tuid.org.ua/ukraynada-karli-bir-tarimsal-uretim-balkabagi-ve-cekirdegi-ali-bulut> adresinden alındı.
- Burdějová, L., Duša, F., Strouhalová, D., Moravcová, D., & Karásek, P.** (2021). Pressurized Water Extraction as a Tool for Rapid and Efficient Isolation of Proteins from Almonds. *Food Analytical Methods*, 14(9), 1953–1963.
- Cai, T., Chang, K. C., & Lunde, H.** (1996). Physicochemical properties and yields of sunflower protein enzymatic hydrolysates as affected by enzyme and defatted sunflower meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3500-3506.
- Caili, F., Huan, S., Quanhong, L.** (2006). A Review on Pharmacological Activities and Utilization Technologies of Pumpkin, Plant Foods for Human Nutrition, 61, 73-80.

- Canistro, D., Vivarelli, F., Ugolini, L., Pinna, C., Grandi, M., Antonazzo, I. C., Cirillo, S., Sapone, A., Cinti, S., & Lazzeri, L.** (2017). Digestibility, toxicity and metabolic effects of rapeseed and sunflower protein hydrolysates in mice. *Italian Journal of Animal Science*, 16, 462– 473.
- Carré, P., & Pouzet, A.** (2014). Rapeseed market, worldwide and in Europe. *OCL*, 21(1), D102.
- Chandra-Hioe, M. V., Wong, C. H., & Arcot, J.** (2016). The potential use of fermented chickpea and faba bean flour as food ingredients. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71, 90-95.
- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M.** (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(5), 951-957.
- Cui, Q., Zhang, A., Li, R., Wang, X., Sun, L., & Jiang, L.** (2020). Ultrasonic treatment affects emulsifying properties and molecular flexibility of soybean protein isolate-glucose conjugates. *Food Bioscience*, 38, 100747.
- Çabuk, B., Nosworthy, M. G., Stone, A. K., Korber, D. R., Tanaka, T., House, J. D., & Nickerson, M. T.** (2018). Effect of fermentation on the protein digestibility and levels of non-nutritive compounds of pea protein concentrate. *Food technology and biotechnology*, 56(2), 257.
- Çetiner, M., & Bilek, S. E.** (2018). Bitkisel protein kaynakları. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 33(2), 111-126.
- Dabbour, M., He, R., Ma, H., & Musa, A.** (2018). Optimization of ultrasound assisted extraction of protein from sunflower meal and its physicochemical and functional properties. *Journal of Food Process Engineering*, 41(5), e12799.
- Dabbour, M., He, R., Mintah, B., & Ma, H.** (2019a). Antioxidant activities of sunflower protein hydrolysates treated with dual-frequency ultrasonic Optimization study. *Journal of Food Process Engineering*, 42, e13084.
- Dabbour, M., He, R., Mintah, B., Golly, M. K., & Ma, H.** (2020). Ultrasound pretreatment of sunflower protein Impact on enzymolysis, ACE-inhibition activity, and structure characterization. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, e14398.
- Dabbour, M., He, R., Mintah, B., Xiang, J., & Ma, H.** (2019). Changes in functionalities, conformational characteristics and antioxidative capacities of sunflower protein by controlled enzymolysis and ultrasonication action. *Ultrasonics sonochemistry*, 58, 104625.
- Damodaran, S.** (2017). Food proteins an overview. Food proteins and their applications, 1-24.
- Damodaran, S., & Paraf, A.** (1997). Food proteins and their applications.
- Dantas, M. S. M., Rolim, M. M., Duarte, A.d.S., Lima, L. E.d., & Silva, M. M.d.** (2017). Production and morphological components of sunflower on soil fertilized with cassava wastewater. *Revista Ceres*, 64, 77–82.

- Das, M., Devi, L. M., & Badwaik, L. S.** (2022). Ultrasound-assisted extraction of pumpkin seeds protein and its physicochemical and functional characterization. *Applied Food Research*, 2(1), 100121.
- Dawood, M. A., & Koshio, S.** (2020). Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 987-1002.
- De Oliveira Filho, J. G., & Egea, M. B.** (2021). Sunflower seed byproduct and its fractions for food application An attempt to improve the sustainability of the oil process. *Journal of Food Science*, 86(5), 1497-1510.
- De Schouwer, F., Claes, L., Vandekerckhove, A., Verduyck, J., & De Vos, D. E.** (2019). Protein-Rich Biomass Waste as a Resource for Future Biorefineries State of the Art, Challenges, and Opportunities. *ChemSusChem*, 12(7), 1272–1303.
- Devi, L. M., & Badwaik, L. S.** (2021). Influence of temperature, time and alkali concentration on protein extraction from muskmelon seed meal. *Indian Chemical Engineer*, 1-8.
- Du, H., Zhang, J., Wang, S., Manyande, A., & Wang, J.** (2022). Effect of high-intensity ultrasonic treatment on the physicochemical, structural, rheological, behavioral, and foaming properties of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.)-seed protein isolates. *LWT*, 155, 112952.
- Duckham, S. C., Dodson, A. T., Bakker, J., & Ames, J. M.** (2001). Volatile flavour components of baked potato flesh. A comparison of eleven potato cultivars. *Food/Nahrung*, 45(5), 317-323.
- Dudonis, W., & Lasztity, R.** (1986). Functional properties of some proteins used in meat processing. *Food/Nahrung*, 30(3-4), 434-436.
- El-Adawy, T. A., & Taha, K. M.** (2001). Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food chemistry*, 74(1), 47-54.
- Ermis, E., & Karasu, E. N.** (2020). Spray drying of de-oiled sunflower protein extracts functional properties and characterization of the powder. *Gıda*, 45(1), 39-49.
- Escamilla-Silva, E. M., Guzmán-Maldonado, S. H., Cano-Medinal, A., & González-Alatorre, G.** (2003). Simplified process for the production of sesame protein concentrate. Differential scanning calorimetry and nutritional, physicochemical and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(9), 972-979.
- FAO.** (2012). Towards the future we want End hunger and make the transition to sustainable agricultural and food systems. In Fao. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/015/an894e/an894e00.pdf>.
- FAO.** (2013). Tackling climate change through livestock A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Rome, Italy.
- FAO.** (2019). Faostat Database. Retrieved July 11, 2019, from www.fao.org/faostat
- FAO.** (2019). The State of Food and Agriculture. Rome, Italy.

- Ferreira, D. F., Barin, J. S., Binello, A., Veselov, V. V., & Cravotto, G.** (2019). Highly efficient pumpkin-seed extraction with the simultaneous recovery of lipophilic and hydrophilic compounds. *Food and Bioproducts Processing*, 117, 224–230.
- Fidan.** (2010). Çerezlik Kabakta Tohum Temini. *Eskişehir Ticaret Borsası Dergisi*. Sayı 1, Sayfa32-34.
- Foegeding, E. A., & Davis, J. P.** (2011). Food protein functionality A comprehensive approach. *Food hydrocolloids*, 25(8), 1853-1864.
- Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** (2019) Food outlook biannual report on global food markets. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9509en/> adresinden 16 Ekim 2021 tarihinde erişildi.
- Food and Agriculture Organization (FAO).** (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAO Expert Consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Accessed February 20, 2022. <https://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** (2018). The future of food and agriculture Trends and challenges. *Food & Agriculture Org.*
- Gadalkar, S. M., & Rathod, V. K.** (2020). Extraction of watermelon seed proteins with enhanced functional properties using ultrasound. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(2), 133-140.
- Gani, A., ul Ashraf, Z., Noor, N., & Wani, I. A.** (2022). Ultrasonication as an innovative approach to tailor the apple seed proteins into nanosize Effect on protein structural and functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 86, 106010.
- Gao, D., Helikh, A. O., & Duan, Z.** (2021). Functional properties of four kinds of oilseed protein isolates. *Journal of Chemistry and Technologies*, 29(1), 155-163.
- Gao, D., Helikh, A., & Duan, Z.** (2020). Optimization of ultrasound-assisted alkaline extraction of pumpkin seed meal protein isolate by response surface methodology.
- Gasparetto, J. C., Martins, C. A. F., Hayashi, S. S., Otuky, M. F., & Pontarolo, R.** (2012). Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L. a millennial herbal medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(2), 172-189.
- Gassmann, B.** (1983). Preparation and application of vegetable proteins, especially proteins from sunflower seed, for human consumption. An approach. *Food/Nahrung*, 27(4), 351-369.
- González-Pérez, S.** (2015). Sunflower proteins. In Enrique Martínez-Force Nurhan Turgut Dunford & Joaquín J. Salas Sunflower (pp. 331–393).

- González-Pérez, S., & Vereijken, J. M.** (2007). Sunflower proteins Overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2173–2191.
- González-Pérez, S., van Koningsveld, G. A., Vereijken, J. M., Merck, K. B., Gruppen, H., & Voragen, A. G.** (2005). Emulsion properties of sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 2261-2267.
- Grasso, S., Liu, S., & Methven, L.** (2020). Quality of muffins enriched with upcycled defatted sunflower seed flour. *LWT – Food Science and Technology*, 119, 108893. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108893>.
- Grasso, S., Omoarukhe, E., Wen, X., Papoutsis, K., & Methven, L.** (2019). The use of upcycled defatted sunflower seed flour as a functional ingredient in biscuits. *Foods*, 8(8), 305.
- Habinshuti, I., Chen, X., Yu, J., Mukeshimana, O., Duhoranimana, E., Karangwa, E., Muhoza, B., Zhang, M., Xia, S., & Zhang, X.** (2019). Antimicrobial, antioxidant and sensory properties of Maillard reaction products (MRPs) derived from sunflower, soybean and corn meal hydrolysates. *LWT – Food Science and Technology*, 101, 694– 702.
- Hall, G. M. (Ed.).** (1996). Methods of testing protein functionality. *Springer Science & Business Media*.
- Hanson, L. P.** (1974). *Vegetable protein processing* (No. 16).
- Helkar, P. B., Sahoo, A., & Patil, N.** (2016). Review Food industry by-products used as a functional food ingredients. *International Journal of Waste Resources*, 6, 1–6.
- Hunter, R. S.** (1975). The measurement of appearance. *John Wiley & Sons, Inc., New York*.
- Idourain, A., Kohlhepp, E.A. & Weber, C.W.** (1996). Nutrient Constituents from Eight Lines of Naked Seed Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 721– 724.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., & Krešić, G.** (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. *LWT-Food science and Technology*, 43(2), 254-262.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., & Herceg, I. L.** (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of food engineering*, 86(2), 281-287.
- Jannathulla, R., Dayal, J. S., Vasanthakumar, D., Ambasankar, K., & Muralidhar, M.** (2017). Effect of fermentation methods on amino acids, fiber fractions and anti-nutritional factors in different plant protein sources and essential amino acid index for *Penaeus vannamei* Boone, 1931.
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Tian, Z., Zeng, H., Temelli, F., & Chen, L.** (2015). Impact of pH on molecular structure and surface properties of lentil legumin-like protein and its application as foam stabilizer. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 132, 45-53.

- Jia, W., Sethi, D. S., van der Goot, A. J., & Keppler, J. K.** (2022). Covalent and non-covalent modification of sunflower protein with chlorogenic acid Identifying the critical ratios that affect techno-functionality. *Food Hydrocolloids*, 131, 107800.
- Jiahong, S.** (2008). Formation and stability of food-grade water-in-oil-in-water emulsions (Doctoral dissertation, Doctoral Dissertation, Palmerston North, New Zealand).
- Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., ... & Zhang, M.** (2014). Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*, 62, 595-601.
- Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., & Kasapis, S.** (2011). Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods. *Food Chemistry*, 129(4), 1513-1522.
- Karefyllakis, D., Jan van der Goot, A., & Nikiforidis, C. V.** (2019). The behaviour of sunflower oleosomes at the interfaces. *Soft Matter*, 15(23), 4639–4646.
- Kartika, I. A., Pontalier, P.-Y., & Rigal, L.** (2010). Twin-screw extruder for oil processing of sunflower seeds Thermo-mechanical pressing and solvent extraction in a single step. *Industrial Crops and Products*, 32, 297–304.
- Kaur, M., & Singh, N.** (2007). Characterization of protein isolate from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 102(1), 366–374.
- Kaur, P., Singh, M., & Birwal, P.** (2021). Correction to Differential Scanning Calorimetry (DSC) for the Measurement of Food Thermal Characteristics and Its Relation to Composition and Structure. *Techniques to Measure Food Safety and Quality Microbial, Chemical, and Sensory*, C1-C1.
- Kaur, R., & Ghoshal, G.** (2022). Sunflower protein isolates-composition, extraction and functional properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 102725.
- Kinsella, J.E.** (1982). Relationships between structure and functional properties of food proteins. In *Food Proteins* (edited by P.F. Fox & J.J. Condon). Pp. 51–103. New York, USA *Applied Science Publishers*.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F.** (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chemistry*, 102(4), 1317-1327.
- Lalnunthari, C., Devi, L. M., & Badwaik, L. S.** (2020). Extraction of protein and pectin from pumpkin industry by-products and their utilization for developing edible film. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5), 1807-1816.
- Lazos, E.** (1986). Nutritional, fatty acid and oil characteristics of pumpkin and melon seeds. *Journal of Food Science*, 51, 1382–1383.

- Lazos, E.S.** (1992). Certain functional properties of defatted pumpkin seed flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42, 257–273.
- Li, G. H., Qu, M. R., Wan, J. Z., & You, J. M.** (2007). Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(S1), 275-280.
- Li, Y., Cheng, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Mintah, B. K., Dabbour, M., Jiang, H., He, R., & Ma, H.** (2020). Modification of rapeseed protein by ultrasound-assisted pH shift treatment Ultrasonic mode and frequency screening, changes in protein solubility and structural characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 69, 105240.
- Lin MJY, Humbert ES, Sosulski FW** (1974) Certain functional properties of sunflower meal products. *J Food Sci* 39 368–370.
- Llompарт, M., Celeiro, M., & Dagnac, T.** (2019). Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment. *Trends in Analytical Chemistry TRAC*, 116, 136–150.
- Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Sigoillot, J.-C., & Fine, F.** (2012). Rapeseed and sunflower meal a review on biotechnology status and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(5), 1105–1114.
- Lullien-Pellerin, V., & Balny, C.** (2002). High-pressure as a tool to study some proteins' properties conformational modification, activity and oligomeric dissociation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies IFSET The Official Scientific Journal of the European Federation of Food Science and Technology*, 3(3), 209–221.
- Luo, P., & He, D. P.** (2018). Preparation of liposome encapsulating angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates. *Molecular Medicine Reports*, 17, 5306– 5311.
- Lusas, E. W.** (1985) in *New Protein Foods*, vol. 5, (ed A. M. Altschul and H. L. Wilcke), Academic Press, Orlando, FL, p. 393.
- Ma, M., Ren, Y., Xie, W., Zhou, D., Tang, S., Kuang, M., ... & Du, S. K.** (2018). Physicochemical and functional properties of protein isolate obtained from cottonseed meal. *Food chemistry*, 240, 856-862.
- Malik, M. A., & 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.
- Malik, M. A., & Saini, C. S.** (2018). Rheological and structural properties of protein isolates extracted from dephenolized sunflower meal Effect of high intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 81, 229-241.
- Malik, M. A., & Saini, C. S.** (2019). Heat treatment of sunflower protein isolates near isoelectric point Effect on rheological and structural properties. *Food chemistry*, 276, 554-561.
- Malik, M. A., Sharma, H. K., & Saini, C. S.** (2016). Effect of removal of phenolic compounds on structural and thermal properties of sunflower protein isolate. *Journal of food science and technology*, 53, 3455-3464.

- Malik, M. A., Sharma, H. K., & Saini, C. S.** (2017). High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal Effect on physicochemical and functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 39, 511-519.
- Manchuliantsau, A., & Tkacheva, A.** (2019). Upcycling solid food wastes and by-products into human consumption products. Google Patents.
- Marcone, F.M., Kakuda, Y. & Yada, R.Y.** (1998). Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants- I isolation– purification and characterization. *Food Chemistry*, 62, 27–47.
- Martinez, W. H.** (1979). Functionality of vegetable proteins other than soy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3Part2), 280-284.
- Mazloomi-Kiyapey, S. N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E., & Nourmohammadi, E.** (2019). Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *Arya Atherosclerosis*, 15(5), 218.
- Megías, C., del Mar Yust, M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J.** (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1928–1932.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millan, F., & Vioque, J.** (2007). Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6509–6514.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J.** (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1973–1977.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M.d.M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., & Vioque, J.** (2009). Stability of sunflower protein hydrolysates in simulated gastric and intestinal fluids and Caco-2 cell extracts. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1496– 1500.
- Mehryar, L., Esmaili, M., Zeynali, F., Sadeghi, R., & Imani, M.** (2017). Evaluation of thermal stability of confectionary sunflower protein isolate and its effect on nanoparticulation and particle size of the produced nanoparticles. *Food Science and Biotechnology*, 26(3), 653–662.
- Meng, G. T., & Ma, C. Y.** (2001). Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin. *Food Chemistry*, 73(4), 453-460.
- Meriles, S. P., Steffolani, M. E., León, A. E., Penci, M. C., & Ribotta, P. D.** (2019). Physico-chemical characterization of protein fraction from stabilized wheat germ. *Food Science and Biotechnology*, 28, 1327-1335.

- Miedzianka, J., Zambrowicz, A., Zielińska-Dawidziak, M., Drożdż, W., & Nemš, A.** (2021). Effect of Acetylation on Physicochemical and Functional Properties of Commercial Pumpkin Protein Concentrate. *Molecules*, 26(6), 1575.
- Mir, N. A., Riar, C. S., & Singh, S.** (2019). Physicochemical, molecular and thermal properties of high-intensity ultrasound (HIUS) treated protein isolates from album (Chenopodium album) seed. *Food Hydrocolloids*, 96, 433-441.
- Molina, M. I., Petruccelli, S., & Añón, M. C.** (2004). Effect of pH and ionic strength modifications on thermal denaturation of the 11S globulin of sunflower (Helianthus annuus). *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(19), 6023-6029.
- Moore, D. R., & Soeters, P. B.** (2015). The biological value of protein. In *The importance of nutrition as an integral part of disease management* (Vol. 82, pp. 39-51). Karger Publishers.
- Morrison, N. A., Clark, R. C., Chen, Y. L., Talashek, T., & Sworn, G.** (1999). Gelatin alternatives for the food industry. Physical Chemistry and Industrial Application of Gellan Gum, 127–131.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H & Parajó, J.C.** (2006). Functionality of Oilseed Protein Products A Review. *Food Research International*, 39 (9) 945-963.
- Murkovic, M., Hillebrand, A., Winkler, J., & Pfannhauser, W.** (1996). Variability of vitamin E content in pumpkin seeds (Cucurbita pepo L). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202, 275-278.
- Nevara, G. A., Muhammad, S. K. S., Zawawi, N., Mustapha, N. A., & Karim, R.** (2021). Dietary fiber fractionation, characterization and potential sources from defatted oilseeds. *Foods*, 10(4), 754.
- New Nutrition Business. (2020).** 10 Key Trends in Food, Nutrition Health 2020. *New Nutrition Business London, UK.*
- Nikolić, I., Dokić, L., Rakić, D., Tomović, V., Maravić, N., Vidosavljević, S., ... & Šoronja-Simović, D.** (2018). The role of two types of continuous phases based on cellulose during textural, color, and sensory characterization of novel food spread with pumpkin seed flour. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(8), e13684.
- Njintang, N. Y., Mbofung, C. M., & Waldron, K. W.** (2001). In vitro protein digestibility and physicochemical properties of dry red bean (Phaseolus vulgaris) flour effect of processing and incorporation of soybean and cowpea flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2465–2471.
- OECD-FAO** (2019). OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028, OECD Publishing, Paris Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, doi 10.1787/agr_outlook-2019-en.

- Ogodo, A. C., Ugbogu, O. C., Onyeagba, R. A., & Okereke, H. C.** (2019). Microbiological quality, proximate composition and in vitro starch/protein digestibility of Sorghum bicolor flour fermented with lactic acid bacteria consortia. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 6, 1-9.
- Ordóñez, C., Asenjo, M. G., Benítez, C., & González, J. L.** (2001). Obtaining a protein concentrate from integral defatted sunflower flour. *Bioresource technology*, 78(2), 187-190.
- Päivärinta, E., Itkonen, S. T., Pellinen, T., Lehtovirta, M., Erkkola, M., & Pajari, A. M.** (2020). Replacing animal-based proteins with plant-based proteins changes the composition of a whole Nordic diet—a randomised clinical trial in healthy Finnish adults. *Nutrients*, 12(4), 943.
- Park Seed.** (2011). Pumpkin. Park Seed Erişim 16 Mart 2011. <http://www.parkseed.com>.
- Parniakov, O., Bals, O., Barba, F. J., Mykhailik, V., Lebovka, N., & Vorobiev, E.** (2018). Application of differential scanning calorimetry to estimate quality and nutritional properties of food products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(3), 362-385.
- Perez, S. G.** (2003). Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins. *Wageningen University and Research*.
- Petraru, A., Ursachi, F., & Amariei, S.** (2021). Nutritional characteristics assessment of sunflower seeds, oil and cake. Perspective of using sunflower oilcakes as a functional ingredient. *Plants*, 10(11), 2487.
- Pilorgé, E.** (2020). Sunflower in the global vegetable oil system Situation, specificities and perspectives. *OCL*, 27, 34.
- Plant Protein Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2021 - 2026).** (2020). Mordor Intelligence. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/plant-protein-market>
- Plant-based Meat Market** “by Source (Soy, Wheat, Pea, & Other Sources), Product (Burger Patties, Strips & Nuggets, Sausages, Meatballs, & Other Products), Type (Beef, Chicken, Pork, Fish, & Other Types), Process, and Region - Global Forecast to 2025”. (2020). Markets and Markets. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/plant-based-meat-market-44922705.html>
- Plant-based Protein Market** “by Source (Soy, Wheat, and Pea), Type (Isolates, Concentrates, and Textured), Form, Application (Food (Dairy Alternatives, Meat Alternatives, and Performance Nutrition) and Feed), and Region - Global Forecast to 2026”. (2021). Markets and Markets. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/plant-based-protein-market-14715651.html>
- Pojić, M., Mišan, A., & Tiwari, B.** (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 93–104.

- Prado, D. M. F.d., Almeida, A. B.d., Olivera Filho, J. G.d., Alves, C. C. F., Egea, M. B., & Lemes, A. C.** (2020). Extraction of bioactive proteins from seeds (corn, sorghum, and sunflower) and sunflower byproduct. Enzymatic hydrolysis and antioxidant properties. *Current Nutrition & Food Science*, 16, 1–11.
- Pranoto, Y., Anggrahini, S., & Efendi, Z.** (2013). Effect of natural and *Lactobacillus plantarum* fermentation on in-vitro protein and starch digestibilities of sorghum flour. *Food Bioscience*, 2, 46-52.
- Puppo, M. C., Speroni, F., Chapleau, N., de Lamballerie, M., Añón, M. C., & Anton, M.** (2005). Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 289-296.
- Quanhong, L., & Caili, F.** (2005). Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food chemistry*, 92(4), 701-706.
- Rani, R., & Badwaik, L. S.** (2021). Functional Properties of Oilseed Cakes and Defatted Meals of Mustard, Soybean and Flaxseed. *Waste and Biomass Valorization*, 12(10), 5639-5647.
- Resendiz-Vazquez, J. A., Ulloa, J. A., Urías-Silvas, J. E., Bautista-Rosales, P. U., Ramírez-Ramírez, J. C., Rosas-Ulloa, P., & González-Torres, L.** (2017). Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 436-444.
- Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgalarrrondo, M., Hessini, K., Guéguen, J., & Hamdi, S.** (2013). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed proteins sequential extraction processing and fraction characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(32), 7715-7721.
- Rezig, L., Riaublanc, A., Chouaibi, M., Guéguen, J., & Hamdi, S.** (2016). Functional properties of protein fractions obtained from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed. *International Journal of Food Properties*, 19(1), 172-186.
- Rodríguez-Miranda, J., Hernández-Santos, B., Herman-Lara, E., Vivar-Vera, M. A., Carmona-García, R., Gómez-Aldapa, C. A., & Martínez-Sánchez, C. E.** (2012). Physicochemical and functional properties of whole and defatted meals from Mexican (*Cucurbita pepo*) pumpkin seeds. *International journal of food science & technology*, 47(11), 2297-2303.
- Salem, A. Z. M., Gado, H. M., Colombatto, D., & Elghandour, M. M. Y.** (2013). Effects of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. *Livestock Science*, 154(1-3), 69-73.
- Salgado, P. R., Drago, S. R., Ortiz, S. E. M., Petruccelli, S., Andrich, O., González, R. J., et al.** (2012). Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. *Food Science and Technology*, 45, 65–72.

- Salgado, P. R., Molina Ortiz, S. E., Petruccelli, S., & Mauri, A. N.** (2011). Sunflower protein concentrates and isolates prepared from oil cakes have high water solubility and antioxidant capacity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 351-360.
- Salgado, P. R., Ortiz, S. E. M., Petruccelli, S., & Mauri, A. N.** (2012). Functional food ingredients based on sunflower protein concentrates naturally enriched with antioxidant phenolic compounds. *Journal of the America*.
- Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Adsule, R.N. and Kadam, S.S.** (1992). Sunflower, in *World Oilseeds Chemistry, Technology and Utilization*, ed. by Salunkhe DK. Van Nostrand Reinhold, New York, NY, pp. 97–139.
- Sara, A. S., Mathé, C., Basselin, M., Fournier, F., Aymes, A., Bianeis, M., ... & Kapel, R.** (2020). Optimization of sunflower albumin extraction from oleaginous meal and characterization of their structure and properties. *Food Hydrocolloids*, 99, 105335.
- Sari, Y. W., Bruins, M. E. and Sanders, J. P.** (2013). Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*, 43, 78-83.
- Schoenfeld, B.J., Aragon, A.A.** (2018). How much protein can the body use in a single meal for muscle-building. *Implications for daily protein distribution. J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 15(10), doi: 10.1186/s12970-018-0215-1.
- Seenaa, S., & Sridhar, K. R.** (2005). Physicochemical, functional and cooking properties of under explored legumes, Canavalia of the southwest coast of India. *Food Research International*, 38(7), 803–814.
- Sert, D., Rohm, H., & Struck, S.** (2022). Ultrasound-Assisted Extraction of Protein from Pumpkin Seed Press Cake Impact on Protein Yield and Techno-Functionality. *Foods*, 11(24), 4029.
- Sharma, G. M., Su, M., Joshi, A. U., Roux, K. H., & Sathe, S. K.** (2010). Functional properties of select edible oilseed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5457-5464.
- Shchekoldina, T., & Aider, M.** (2014). Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2331-2343.
- Sivaramakrishnan, S., & Gangadharan, D.** (2009). Edible Oil Cakes. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 253–271). Springer Netherlands.
- Slabi, S. A., Mathe, C., Basselin, M., Framboisier, X., Ndiaye, M., Galet, O., & Kapel, R.** (2020). Multi-objective optimization of solid liquid extraction of total sunflower proteins from cold press meal. *Food chemistry*, 317, 126423.
- Subaşı, B. G., Casanova, F., Capanoglu, E., Ajalloueian, F., Sloth, J. J., & Mohammadifar, M. A.** (2020). Protein extracts from de-oiled sunflower cake Structural, physico-chemical and functional properties after removal of phenolics. *Food Bioscience*, 38, 100749.

- Subaşı, B. G., Jahromi, M., Casanova, F., Capanoglu, E., Ajalloueian, F., & Mohammadifar, M. A.** (2021). Effect of moderate electric field on structural and thermo-physical properties of sunflower protein and sodium caseinate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 67, 102593.
- Tang, C. H.** (2017). Emulsifying properties of soy proteins A critical review with emphasis on the role of conformational flexibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12), 2636-2679.
- Tang, C. H., & Sun, X.** (2011). A comparative study of physicochemical and conformational properties in three vicilins from Phaseolus legumes Implications for the structure–function relationship. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 315-324.
- Teh, S. S., & Bekhit, A. E. D. A.** (2015). Utilization of oilseed cakes for human nutrition and health benefits. *Agricultural biomass based potential materials*, 191-229.
- TEPGE.** (2020). Ayçiçeği; Durum ve Tahmin Raporu. T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Durum-Tahmin%20Raporlar%C4%B1/2020%20Durum-Tahmin%20Raporlar%C4%B1/Ay%C3%A7i%C3%A7e%C4%9Fi%20Durum%20Tahmin%20Raporu%202020-319%20TEPGE.pdf> adresinden alındı
- Toews, R., & Wang, N.** (2013). Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses. *Food Research International*, 52(2), 445-451.
- TÜİK.** (2018). Sebze üretim istatistikleri. Web www.tuik.gov.tr
- TÜİK.** (2020). www.tuik.gov.tr (Erişim tarihi 23/09/2020)
- UNDP.** (1998). Human Development Report, s.1-65, www.undp.org.
- USDA.** (2016). <https://www.usda.gov/topics/food-and-nutrition/food-security> adresinden 5 Ekim 2022 tarihinde alındı.
- Van Loo, E. J., Caputo, V., & Lusk, J. L.** (2020). Consumer preferences for farm-raised meat, lab-grown meat, and plant-based meat alternatives Does information or brand matter? *Food Policy*, 95, 101931.
- Velliquette, R. A., Fast, D. J., Maly, E. R., Alashi, A. M., & Aluko, R. E.** (2020). Enzymatically derived sunflower protein hydrolysate and peptides inhibit NFκB and promote monocyte differentiation to a dendritic cell phenotype. *Food Chemistry*, 126563.
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M., Herrero-Martínez, J., & Simó-Alfonso, E. F.** (2015). Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. *Food chemistry*, 169, 28-33.
- Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I.** (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends in Analytical Chemistry TRAC*, 97, 159–178.

- Vinayashree, S., & Vasu, P.** (2021). Biochemical, nutritional and functional properties of protein isolate and fractions from pumpkin (*Cucurbita moschata* var. Kashi Harit) seeds. *Food Chemistry*, 340, 128177.
- Weisz, G. M., Schneider, L., Schweiggert, U., Kammerer, D. R., & Carle, R.** (2010). Sustainable sunflower processing—I. Development of a process for the adsorptive decolorization of sunflower [*Helianthus annuus* L.] protein extracts. *Innovative food science & emerging technologies*, 11(4), 733-741.
- Wu, S., Bhat, Z. F., Gounder, R. S., Mohamed Ahmed, I. A., Al-Juhaimi, F. Y., Ding, Y., & Bekhit, A. E. D.** (2022). Effect of dietary protein and processing on gut microbiota—a systematic review. *Nutrients*, 14(3), 453.
- Xanthopoulou, M. N., Nomikos, T., Fragopoulou, E., & Antonopoulou, S.** (2009). Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. *Food Research International*, 42(5-6), 641-646.
- Yasar, S., Tosun, R., & Sonmez, Z.** (2020). Fungal fermentation inducing improved nutritional qualities associated with altered secondary protein structure of soybean meal determined by FTIR spectroscopy. *Measurement*, 161, 107895.
- Yegorov, B., Turpurova, T., Sharabaeva, E., & Bondar, Y.** (2019). Prospects of using by-products of sunflower oil production in compound feed industry. *Food Science and Technology*, 13(1).
- Zhang, H. J., Zhang, H., Wang, L., & Guo, X. N.** (2012). Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. *Food Research International*, 47(2), 359-363.
- Zhang, Y.N., and Zhao, X.H.** (2013). Study on the functional properties of soybean protein isolate cross-linked with gelatin by microbial transglutaminase. *Int. J. Food Prop.* 16(6), 1257- 1270.



EKLER

EK A: ANOVA Tabloları



EK A

Çizelge A.1: Ayçiçeği küspesinin alkali ekstraksiyonu ile izolat verimi optimizasyonu için varyans analizi

	SD	KT	KO	F-Değeri	P-Değeri
Model	4	237,554	59,389	21,40	0,000
Lineer	3	220,149	73,383	26,44	0,000
pH	1	167,608	167,608	60,39	0,000
NaCl (%)	1	41,006	41,006	14,78	0,002
Katı:çözgen oranı (%)	1	11,535	11,535	4,16	0,064
İnteraksiyon	1	17,405	17,405	6,27	0,028
pH*NaCl (%)	1	17,405	17,405	6,27	0,028
Hata	12	33,304	2,775		
Uyumsuzluk	10	23,593	2,359	0,49	0,822
Saf Hata	2	9,711	4,856		
Toplam	16	270,858			

SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması

Çizelge A.2: Ayçiçeği küspesinin enzim destekli ekstraksiyonu ile izolat verimi optimizasyonu için varyans analizi.

	SD	KT	KO	F-Değeri	P-Değeri
Model	2	182,14	91,072	31,95	0,000
Lineer	2	182,14	91,072	31,95	0,000
Süre	1	149,67	149,672	52,51	0,000
Konsantrasyon (%)	1	32,47	32,472	11,39	0,008
Hata	9	25,65	2,850		
Toplam	11	207,80			

SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması

Çizelge A.3: Ayçiçeği küspesinin ultrason destekli ekstraksiyonu ile izolat verimi optimizasyonu için varyans analizi.

	DF	Seq SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	2	0,002509	0,001255	16,69	0,001
Linear	2	0,002509	0,001255	16,69	0,001
Güç (W)	1	0,000117	0,000117	1,56	0,243
Süre (dk)	1	0,002392	0,002392	31,81	0,000
Hata	9	0,000677	0,000075		
Toplam	11	0,003186			

SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması

Çizelge A.4: Ayçiçeği küspesinin mikrodalga destekli ekstraksiyonu ile izolat verimi optimizasyonu için varyans analizi.

	SD	KT	KO	F-Değeri	P-Değeri
Model	5	114,303	22,8606	15,54	0,002
Lineer	2	24,365	12,1823	8,28	0,019
Güç (W)	1	0,544	0,5440	0,37	0,565
Süre (dk)	1	23,821	23,8206	16,20	0,007
İnteraksiyon	1	12,409	12,4094	8,44	0,027
Güç (W)*Süre (dk)	1	12,409	12,4094	8,44	0,027
Hata	6	8,825	1,4708		
Toplam	11	123,128			

SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması

Çizelge A.5: Kabak Çekirdeği küspesinin alkali ekstraksiyonu ile izolat verimi optimizasyonu için varyans analizi.

	SD	KT	KO	F-Değeri	P-Değeri
Model	4	826,71	206,68	9,28	0,001
Lineer	3	424,42	141,47	6,35	0,008
pH	1	151,71	151,71	6,81	0,023
NaCl (%)	1	88,33	88,33	3,97	0,070
Katı:çözgen oranı (%)	1	184,38	184,38	8,28	0,014
Karesel Etki	1	402,29	402,29	18,07	0,001
Katı:çözgen oranı*Katı:çözgen oranı	1	402,29	402,29	18,07	0,001
Hata	12	267,18	22,27		
Uyumsuzluk	10	165,93	16,59	0,33	0,908
Saf Hata	2	101,25	50,63		
Toplam	16	1093,90			

SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması

Çizelge A.6: Kabak Çekirdeği küspesinin enzim destekli ekstraksiyonu ile izolat verimi optimizasyonu için varyans analizi

	SD	KT	KO	F-Değeri	P- Değeri
Model	2	0,082585	0,041293	40,15	0,000
Linear	2	0,082585	0,041293	40,15	0,000
Süre	1	0,000413	0,000413	0,40	0,542
Konsantrasyon	1	0,082172	0,082172	79,89	0,000
Hata	9	0,009257	0,001029		
Toplam	11	0,091842			

SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması

Çizelge A.7: Kabak Çekirdeği küspesinin ultrason destekli ekstraksiyonu ile izolat verimi optimizasyonu için varyans analizi

	SD	KT	KO	F-Değeri	P-Değeri
Model	3	0,006670	0,002223	29,52	0,001
Lineer	2	0,003505	0,001752	23,26	0,003
Güç (W)	1	0,003357	0,003357	44,57	0,001
Süre (dk)	1	0,000047	0,000047	0,62	0,467
İnteraksiyon	1	0,003872	0,003872	51,40	0,001
Güç * Süre	1	0,003872	0,003872	51,40	0,001
Hata	5	0,000377	0,000075		
Toplam	8	0,007046			

SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması

Çizelge A.8: Kabak Çekirdeği küspesinin mikrodalga destekli ekstraksiyonu ile izolat verimi optimizasyonu için varyans analizi

	SD	KT	KO	F-Değeri	P-Değeri
Model	4	79,149	19,787	2,75	0,115
Lineer	2	72,790	36,395	5,06	0,044
Güç (W)	1	68,567	68,567	9,54	0,018
Süre (dk)	1	4,223	4,223	0,59	0,468
Hata	7	50,309	7,187		
Toplam	11	129,458			

SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması

Çizelge A.9: Kabak Çekirdeği küspesinin mikrodalga destekli ekstraksiyonu ile izolat verimi optimizasyonu için varyans analizi (süre değişkeni içermeyen)

	SD	KT	KO	F-Değeri	P-Değeri
Model	1	68,57	68,567	11,26	0,007
Lineer	1	68,57	68,567	11,26	0,007
Güç (W)	1	68,57	68,567	11,26	0,007
Hata	10	60,89	6,089		
Toplam	11	129,46			

SD: serbestlik derecesi; KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Zehranur TORUN

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2020, Yıldız Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Torun, Z.** (2023). Optimization of Alkali and Ultrasound-Assisted Protein Extraction Conditions from Sunflower Oil Meal. *2nd INTERNATIONAL GRADUATE RESEARCH SYMPOSIUM IGRS'23*.