

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**BAKLAGİLLERDEN PROTEİN VE FENOLİK
BİLEŞENLERİN İNOVATİF YÖNTEMLERLE ELDESİ,
NANOLİF ÜRETİMİ, ENKAPSÜLASYON VE
BİYOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Elif Meltem İŞÇİMEN**

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet HAYTA**

Doktora Tezi

**Ağustos 2022
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**BAKLAGİLLERDEN PROTEİN VE FENOLİK
BİLEŞENLERİN İNOVATİF YÖNTEMLERLE ELDESİ,
NANOLİF ÜRETİMİ, ENKAPSÜLASYON VE
BİYOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Elif Meltem İŞÇİMEN**

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet HAYTA**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından FDK-2020-10341 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2022
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Elif Meltem İŞÇİMEN

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Baklagillerden Protein ve Fenolik Bileşenlerin İnovatif Yöntemlerle Eldesi, Nanolif Üretimi, Enkapsülasyon ve Biyofonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı doktora tezi, “Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi”ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Elif Meltem İŞÇİMEN

Danışman

Prof. Dr. Mehmet HAYTA

Gıda Mühendisliği ABD Başkanı

Ad Soyad İmza

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimime başladığım günden beri çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları, bilgisi ve bilimsel katkılarıyla bana yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen, stres yönetimimde bana yardımcı olan ve bu günlere gelmemde büyük katkı sahibi hocam Prof. Dr. Mehmet HAYTA'ya,

Tezim süresince yol gösterici değerli katkılarından dolayı ve her zaman çalışma prensiplerine saygı duyduğum, örnek aldığım tez izleme komitesi üyeleri saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Mustafa ÇAM ve Doç. Dr. Lutfiye EKİCİ'ye,

İyi ve kötü günlerimizi paylaştığımız, birbirimizin derdine ortak olduğumuz, her zaman yanımda olan ve bana desteklerini esirgemeyen canım hocalarım ve kıymetli arkadaşlarım Dr. Hatice KAVUNCUOĞLU, Arş. Gör. Dr. Tuğba DURSUN ÇAPAR, Arş. Gör. Dr. Duygu ASLAN TÜRKER ve Arş. Gör. Gülhan TOGA'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince maddi ve manevi olarak beni daima destekleyen her zaman moral ve güç veren yol arkadaşım sevgili eşim Anıl İŞÇİMEN'e, yaşına rağmen bu süreçte bana sabırlı ve özverili davranan canım kızım Defne İŞÇİMEN'e, emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olan annem Hilkat EREN'e, babam Ahmet EREN'e kardeşlerim Edanaz EREN ve Berat Betül EREN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: FDK 2020-10341) teşekkürlerimi sunarım.

Elif Meltem İŞÇİMEN

Ağustos 2022, KAYSERİ

BAKLAGİLLERDEN PROTEİN VE FENOLİK BİLEŞENLERİN İNOVATİF YÖNTEMLERLE ELDESİ, NANOLİF ÜRETİMİ, ENKAPSÜLASYON VE BİYOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Elif Meltem İŞÇİMEN

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Doktora Tezi, 2022

Danışman: Prof. Dr. Mehmet HAYTA

ÖZET

Tez çalışması iki bölümden oluşmakta olup birinci bölümde baklagillerden protein ekstraksiyonun optimizasyonu çalışılmıştır. Bu amaçla öncelikle ultrases destekli derin ötektik çözücü (UD-DÖÇ) ekstraksiyonunda kullanılacak olan DÖÇ'e karar vermek amacıyla kolin klorür (ChCl) bazlı farklı hidrojen vericileri ile DÖÇ'ler oluşturulmuştur. Bağımsız değişkenler için belirlenen en düşük noktalarda farklı DÖÇ'ler ile ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Çözücü belirleme aşamasında en yüksek protein ekstraksiyon değerleri yeşil mercimek ve nohut için sırasıyla 19,1 ve 22,3 mg BSA/g olarak ChCl:üre ile oluşturulan DÖÇ'ten elde edilmiştir. UD optimizasyon aşamasında bağımsız değişkenler üre molar oranı, su molar oranı, ultrases gücü ve süre, cevap faktörü olarak ise protein içeriği seçilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları belirlendikten sonra ekstraksiyon etkinliği ortaya koyma amacıyla geleneksel yöntemle su ve DÖÇ kullanılarak ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonda belirlenen noktalarda elde edilen UD-DÖÇ yeşil mercimek ve nohut örnekleri için protein içeriği sırasıyla $38,50 \pm 2,01$ ve $25,84 \pm 0,37$ mg BSA/g olarak belirlenmiştir. K-DÖÇ ve su ekstraktları protein içerikleri yeşil mercimek için sırasıyla $20,61 \pm 0,75$ ve $16,05 \pm 1,37$ mg BSA/g, nohut için ise $18,14 \pm 0,52$ ve $1,65 \pm 0,96$ mg BSA/g bulunmuştur.

Yeşil mercimek ve nohuttan elde edilen UD-DÖÇ protein ekstraktları için DPPH radikal süpürücü aktiviteleri sırasıyla $\%28,79 \pm 0,86$ ve $\%15,31 \pm 0,39$ olarak, Fe-şelatlama aktiviteleri $22,96 \pm 0,91$ ve $19,06 \pm 2,17$ $\mu\text{mol EDTA/g}$ olarak belirlenmiştir. Farklı pH'larda en yüksek çözünürlük değerleri UD-DÖÇ örneklerinden elde edilmiştir.

UD-DÖÇ yöntemi ile elde edilen protein ekstraktlarının elektrospining yöntemiyle nanolif üretiminde kullanılma potansiyeli araştırılmıştır. Tek başına nanolif oluşturma

özelliği olmayan yeşil mercimek protein izolatı (MPI) ve nohut protein izolatı (NPI) farklı konsantrasyonlarda polivinil alkol (PVA) ve zein ile karıştırılarak lif üretilmiştir. Hazırlanan PVA ve protein solüsyonları farklı oranlarda karıştırılmış ancak 40:60 w:w (PVA:PI) ve altındaki oranlarda her iki PI içinde nanolif üretimi gerçekleştirilememiştir. Zein ile yapılan çalışmada ise 70:30 w:w (zein:PI) ve altında nanolif oluşmamıştır. PVA ile elde edilen MPI ve NPI nanoliflerinin protein içeriği arttıkça nanolif kalınlığının azaldığı görülmüştür. 70:30, 60:40 ve 50:50 w:w PVA:MPI nanolifleri için çaplar sırasıyla $0,140 \pm 0,00$, $0,133 \pm 0,00$ ve $0,114 \pm 0,00 \mu\text{m}$ iken PVA:NPI nanolifleri için $0,159 \pm 0,01$, $0,128 \pm 0,01$ ve $0,110 \pm 0,1 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. Elde edilen taramalı elektron mikroskopisi (SEM) görüntüleri ve nanolif çaplarına göre ayrıca reolojik ve elektrik iletkenlik özellikleri dikkate alınarak 50:50 w:w (PVA:PI) ile nanolif üretilebileceğine karar verilmiştir. Aynı işlemler zein kullanılarak da gerçekleştirilmiş ve 90:10 ve 80:20 w:w zein:MPI nanolifleri için çap ölçüleri $0,144 \pm 0,00$ ve $0,214 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ve zein:NPI için ise sırasıyla $0,125 \pm 0,00$ ve $0,386 \pm 0,01 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. SEM görüntüleri ve nanolif çapları ile reolojik ve elektrik iletkenlik özellikleri değerlendirilerek 80:20 w:w (zein:PI) oranda nanolif üretilebileceğine karar verilmiştir.

50:50 w:w PVA:PI ve 80:20 w:w zein:PI ile üretilen nanoliflerin enkapsülasyon özellikleri ve antioksidanlar için taşıyıcı olarak kullanılabilme potansiyeli ferulik asit ile araştırılmıştır. Bu amaçla hazırlanan elektrospining solüsyonlarına %2 (w/w) ferulik asit ilave edilmiş ve ferulik asitin nanolifler içindeki dağılımı floresans mikroskobu ile doğrulanmıştır. Elde edilen ferulik asit yüklü nanoliflerin antibakteriyel özellikleri değerlendirilmiştir. Bakteri koloni sayısında ferulik asit yüklü PVA kontrol örneğinde kontrole göre %71,3'lük bir azalma söz konusuysa, ferulik asit yüklü PVA:MPI'da %82,1 ve PVA:NPI'da ise %78,9 azalma belirlenmiştir. Zein ile elde edilen nanolifler de ise ferulik asit yüklü kontrol nanolifinde kontrole göre %67,5'lik bir azalma varken zein:MPI ve zein:NPI örnekleri için koloni sayıları sırasıyla %96,2 ve %95,1 azalmıştır. Ayrıca üretilen nanoliflerin hidrofilik ve hidrofobik ortamlarda ve *in vitro* koşullardaki salınım profili incelenmiş ve salınım için bir kinetik çalışma yapılmıştır. Genel olarak nanoliflerde hidrofilik ortamda ferulik asit salınımı daha uzun sürede ve daha yavaş, hidrofobik ortamda ise kısa sürede daha yüksek miktarlarda salınım gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuçlar yeşil mercimek ve nohuttan UD-DÖÇ ile elde edilen PI'ların

inovatif yöntemlerle kısa sürede ve en az çözücü kullanımı ile ekstrakte edilebileceği ve elde edilen materyalin yüksek antioksidan özelliklere sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca baklagil PI'larının elektrospining yöntemiyle nanolif üretiminde kullanılabileceği böylelikle besin değeri yüksek, antioksidan ve antibakteriyel özelliklere sahip nanolifler elde edilebilme potansiyelinin olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde ise mikrodalga destekli sulu iki faz (MD-SİF) sistem ile baklagillerden fenolik bileşen ekstraksiyonu çalışılmıştır. Bu kısımda baklagil olarak yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulye örnekleri ile çalışılmıştır. Fenolik bileşenlerin geri kazanımı cevap yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. Ekstraktların DPPH radikal süpürücü ve ABTS antioksidan aktiviteleri ile Fe-şelatlama aktiviteleri belirlenmiştir. MD-SİF ekstraktlarından en yüksek ekstraksiyon verimi yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulye için sırasıyla 6,68, 2,10 ve 1,69 mg GAE/g ve en yüksek antioksidan değerler elde edilmiştir. Yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulye MD-SİF ekstraktları için DPPH radikal süpürücü aktiviteleri sırasıyla $70,98 \pm 1,96$, $7,60 \pm 0,00$ ve $9,68 \pm 1,19$ $\mu\text{mol TE/g}$, ABTS antioksidan süpürücü aktiviteler $27,96 \pm 0,49$, $13,09 \pm 0,13$ ve $9,09 \pm 0,1$ $\mu\text{g TE/g}$ ayrıca Fe-şelatlama aktiviteleri $\%56,97 \pm 1,22$, $\%71,63 \pm 0,62$ ve $78,6 \pm 1,02$ olarak belirlenmiştir. Fenolik ekstraktlar maltodekstrin kullanılarak dondurarak kurutma yöntemiyle enkapsüle edilmiştir. Örneklerin yapısal özellikleri SEM ve Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi yardımıyla karakterize edilmiş ve salınım profilleri suda mide ve bağırsak ortamında belirlenmiştir. Ayrıca hızlandırılmış depolama koşulları altında ekstraktların ayçiçek yağı oksidatif stabilitesine etkileri test edilmiş, MD-SİF ile elde edilen ekstraktların yağın oksidatif stabilitesine önemli bir etkisinin olduğu ancak yapay bir antioksidan olan BHA kadar etkin olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar MD-SİF'in baklagillerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için verimli bir çevre dostu yöntem olarak kabul edilebileceğini göstermektedir.

Yapılan bu tez çalışması ile baklagillerden alternatif ve yeşil çözücüler ile inovatif yöntemler kullanılarak hem protein hem de fenolik bileşen ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve verimde önemli ($p < 0,05$) artışlar sağlanmıştır. Baklagillerin katma değerini artıracak, gıda endüstrisinde ambalaj malzemesi veya enkapsülasyon aracı olarak kullanılabilmeye potansiyeline sahip protein bazlı nanolifler ile antioksidan özelliklere sahip katkı maddesi olarak değerlendirilebilecek enkapsüle fenolik bileşenler elde

edilmiştir. Çalışma verilerinin özellikle baklagil işlemede elek altı olarak ortaya çıkan ve katma değeri düşük olan yan ürünlerin de değerlendirilmesine katkı sağlaması mümkün olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Baklagil; Derin Ötektik Solvent; Nanolif; Elektrospinning; Enkapsülasyon.



**EXTRACTION OF PROTEIN AND PHENOLIC COMPOUNDS FROM
LEGUMES USING INNOVATIVE TECHNIQUES, NANOFİBER
PRODUCTION ENCAPSULATION AND BIOFUNCTIONAL PROPERTIES**

Elif Meltem İŞÇİMEN

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi, 2022
Danışman: Prof. Dr. Mehmet HAYTA**

ABSTRACT

The thesis consists of two parts, the optimization of protein extraction from legumes by ultrasound-assisted deep eutectic solvent (US-DES) was studied in the first part. First of all, Deep eutectic solvent (DES) was created with different hydrogen donors using choline chloride (ChCl) as hydrogen acceptor to decide on the DES to be used. The highest protein extraction values were obtained from DES formed with ChCl: urea as 19.1 and 22.3 mg BSA/g for green lentils and chickpeas, respectively. In the ultrasound-assisted optimization phase, the independent variables of optimization were urea molar ratio, water molar ratio, ultrasound power, and time. The protein content of extracts was considered as the response factor. After the optimum extraction conditions were determined, a comparison study was conducted to test the efficiency of the extraction. For this purpose, extractions were carried out using the traditional method using DES (C-DES) and water (C-water). The protein content of protein isolate was determined for US-DES as 38.50 ± 2.01 and 25.84 ± 0.37 mg BSA/g for green lentil and chickpea samples, respectively in optimization. Protein contents of extracts of C-DES and C-water obtained from green lentils were found as 20.61 ± 0.75 and 16.05 ± 1.37 , respectively. The C-DES and C-water values for the extracts obtained from chickpea were found as 18.14 ± 0.52 and 11.65 ± 0.96 mg BSA/g, consecutively. The DPPH radical scavenging activity results of US-DES protein extracts derived from green lentils and chickpea were determined as $28.79 \pm 0.86\%$ and $15.31 \pm 0.39\%$, respectively. The Fe-chelating activities of US-DES protein extracts obtained from green lentils and chickpea were determined as 22.96 ± 0.91 and 19.06 ± 2.17 $\mu\text{mol EDTA/g}$, consecutively. The highest solubility values at different pHs were obtained from US-DES samples in protein solubility. Not only the extraction efficiency but also the antioxidant properties increased through US-DES.

The potential of using protein isolates (PI) produced by the US-DES method in nanofiber production by electrospinning method was investigated. Green lentil protein isolate (LPI) and chickpea protein isolate (CPI) that do not have fiber-forming properties were mixed with different concentrations of polyvinyl alcohol (PVA) and zein for producing nanofiber. It was aimed to make fiber with the greatest protein ratio possible in this section. The prepared PVA:PI were mixed at different ratios (70:30, 60:40, 50:50, 40:60), and nanofiber production could not be performed in 40:60 (PVA:PI) and below. The prepared zein:PI were mixed different ratios (90:10, 80:20, 70:30). However, nanofiber production could not be performed in both PI at ratios of 70:30 (zein:PI) and below. It was observed that the fiber thickness decreased as the protein content of LPI and CPI increased in fibers obtained with PVA. The diameters of fiber produced with PVA:LPI (70:30, 60:40 and 50:50) were found as 0.140 ± 0.00 , 0.133 ± 0.00 and 0.114 ± 0.00 μm , while the diameters of PVA:CPI were 0.159 ± 0.01 , 0.128 ± 0.01 e 0.11 ± 0.1 μm , respectively. It was decided that nanofibers could be produced at a ratio of 50:50 (PVA:PI) by examining the scanning electron microscopy (SEM) images and fiber diameters, also according to rheological and electrical conductivity properties. The same process was carried out using zein. The diameters of fiber produced with zein:LPI (90:10, 80:20) were found as 0.144 ± 0.00 ve 0.214 ± 0.01 μm , while the diameters of zein:CPI were 0.125 ± 0.00 ve 0.386 ± 0.01 μm , respectively. It was decided that nanofibers could be produced at a ratio of 80:20 (zein:PI) by looking at SEM images and fiber diameters, also according to rheological and electrical conductivity properties.

The encapsulation properties of produced fibers (50:50 PVA:PI and 80:20 zein:PI) and their use as a carrier for antioxidants were investigated with ferulic acid. For this purpose, 2% ferulic was added to the electrospinning solutions. The distribution of ferulic acid within the fibers was confirmed by fluorescence microscopy. In addition, the antibacterial properties of the produced ferulic acid-loaded fibers were evaluated. Considering the % reductions in the number of bacterial colonies, there was a 71.3% decrease in the ferulic acid-loaded PVA control sample compared to the control, while this value increased to 82.1% and 78.9% in ferulic acid-loaded PVA:LPI and in PVA:CPI, respectively. In the fibers obtained with zein, there was a 67.5% decrease in the ferulic acid-loaded zein

control fiber compared to the control, while the colony numbers of samples decreased at 96.2% and 95.1% for zein:MPI and zein:NPI, respectively.

In addition, the release profile of the produced fibers in hydrophilic and hydrophobic food environments and *in vitro* conditions was examined and a kinetic study was carried out for the release properties. In general, the application of fibers in hydrophilic foods resulted in a longer and slower release. It was observed that higher amounts of ferulic acid were released in a short time in the hydrophobic food environment. According to the results of the thesis study, US-DES provided high antioxidant properties, besides the short extraction time and solvent savings. It was determined that the use of US-DES is a suitable method to obtain protein isolates from legumes. In addition, legume protein isolates can be used in the production of nanofibers by electrospinning. Thus, nanofibers with high nutritional value, antioxidant and antibacterial properties can be produced.

In the second part of the current thesis, a microwave-assisted two-phase aqueous system (MA-ATPS) was used to study the extraction of phenolic components from legumes. Green lentils, chickpeas, and dried beans were examined as legumes in this section. By using response surface methodology (RSM), the recovery of phenolic chemicals by MA-ATPS was optimized. Traditional mono-phase extraction ATPS (C-ATPS) and conventional (C-water) were used in a comparison research. The ability of extracts to scavenge DPPH, serve as an antioxidant via ABTS, and chelate iron was measured. The highest extraction yield (6.68, 2.10, and 1.69 mg GAE/ g sample for green lentil, chickpea, and dry bean, respectively) and antioxidant properties (70.98, 7.60, and 9.68 $\mu\text{mol TE/g}$ for DPPH scavenging activity for green lentil, chickpea, and dry bean, respectively) were observed from the extracts obtained by MA-ATPS. Additionally, the phenolic extracts were freeze dried to form microcapsules, and SEM and Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrometry were used to characterize the structure of the microcapsules. Release profiles were determined in the gastric and intestinal environment in water. Additionally, under accelerated storage circumstances, the effects of extracts on the oxidative stability of sunflower oil were evaluated. The results of this study demonstrated that the MA-ATPS might be regarded as an effective, environmentally acceptable method for extracting phenolic compounds from pulses, as demonstrated by the extracts' antioxidant activity. Moreover, the encapsulated pulse phenolic extracts may

serve as an alternative ingredient for the food industry to be used in various functional formulations potentially leading to an increase in the value of green lentil, chickpea, and dry bean and possibly their by-products.

With this thesis study, both protein and phenolic component extraction was carried out from legumes by using alternative and green solvents and innovative methods, and significant ($p < 0.05$) increases in yield were achieved. Protein-based nanofibers, which will increase the added value of legumes and have the potential to be used as packaging material or encapsulation tool in the food industry, and encapsulated phenolic components that can be considered as additives with antioxidant properties have been obtained. It will be possible for the study data to contribute to the evaluation of the by-products that accumulate as under sieve material in legume processing and have low added value.

Keywords: Legume; Deep Eutectic Solvent; Nanofiber; Electrospinning; Encapsulation.

İÇİNDEKİLER

BAKLAGİLLERDEN PROTEİN VE FENOLİK BİLEŞENLERİN İNOVATİF YÖNTEMLERLE ELDESİ, NANOLİF ÜRETİMİ, ENKAPSÜLASYON VE BİYOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	x
İÇİNDEKİLER	xiv
SİMGELER VE KISILTMALAR	xx
TABLolar LİSTESİ	xxii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xxiii

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

1.1. Giriş	1
1.2. Baklagiller	5
1.2.1. Baklagil proteinleri	6
1.2.2. Baklagil biyoaktif bileşenleri	7
1.2.3. Mercimek (<i>Lens culinaris</i>)	8
1.2.4. Nohut (<i>Cicer arietinum</i>)	8
1.2.5. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	9
1.3. Optimizasyon	10
1.4. Ekstraksiyon	10
1.5. Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ)	11
1.6. Elektrospinning	16
1.6.1. Prensipleri	16

1.6.2. Polimer Çözeltinin Özellikleri.....	17
1.6.3. Proses Şartları.....	18
1.7. Sulu İki Faz (SİF) Ekstraksiyon	19
1.7.1. Mikrodalga Destekli- Sulu İki Faz (MD-SİF) Ekstraksiyon	21

2. BÖLÜM

BAKLAGİLLERDEN ULTRASES DESTEKLİ DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ (UD-DÖÇ) İLE PROTEİN EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU, PROTEİNLERİN ELEKTROSPİNİNG YÖNTEMİYLE NANOLİF ÜRETİMİNDE KULLANILMASI

2.1. Giriş	37
2.2. Materyal ve Metot	39
2.2.1. Materyal	39
2.2.2. Metot.....	39
2.2.2.1. Örnek Hazırlama	39
2.2.2.2. Kullanılacak Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ)'nün Belirlenmesi.....	40
2.2.2.3. Deney Dizayını ve RSM Optimizasyonu	41
2.2.2.4. Protein tayini.....	41
2.2.2.5. Optimum noktada protein izolatu (PI) eldesi	41
2.2.2.6. Klasik (K)- Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ) ve Klasik (K)-su Ekstraksiyon.....	42
2.2.2.6.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite	43
2.2.2.6.2. Toplam Fenolik İçerik (TPC)	43
2.2.2.6.3. Fe-şelatlama Aktivitesi	44
2.2.2.6.4. Protein Çözünürlüğü	44
2.2.2.6.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	44
2.2.2.7. Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ) ile Elde Edilen Protein İzolatlarından Nanolif Üretimi.....	44
2.2.2.7.1. Polivinil Alkol (PVA) ile Nanolif Üretimi	44
2.2.2.7.2. Zein ile Nanolif Üretimi.....	45
2.2.2.8. Polimer Çözeltilerin Karakterizasyonu	45
2.2.2.8.1. Reolojik Özellikler	45

2.2.2.8.2. Elektriksel İletkenlik	46
2.2.2.9. Elektrospining.....	46
2.2.2.10. Seçilen Protein/Polivinil Alkol ve Protein/Zein Nanoliflerinin Ferulik Asit ile Yüklenmesi.....	47
2.2.2.11. Nanolif Karakterizasyonu.....	48
2.2.2.11.1. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Floresan Mikroskop.....	48
2.2.2.11.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)	48
2.2.2.11.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	49
2.2.2.11.4. X-ışını Kırınım (XRD)	49
2.2.2.12. Antibakteriyel Aktivite.....	49
2.2.2.13. Ferulik Asitin Salınım Kinetiğinin Farklı Ortamlarda Belirlenmesi	49
2.2.2.14. İstatistiksel Analiz.....	50
2.3. Bulgular, Sonuç ve Tartışma.....	50
2.3.1. Ekstraksiyon için Uygun Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ)’nün Seçilmesi	50
2.3.2. Ultrases Destekli- Derin Ötektik Çözücü (US-DÖÇ) için RSM Optimizasyon	51
2.3.3. Optimum Nokta Ekstraktların Ultrases Destekli Derin Ötektik Çözücü (UD-DÖÇ) Klasik- Derin Ötektik Çözücü (K-DÖÇ) ve Klasik-Su Ekstraktları (K) ile Karşılaştırılması	61
2.3.3.1. Protein Çözünürlüğü	63
2.3.3.2. Antioksidan Özellikler	64
2.3.3.3. Mercimek Protein İzolatı (MPI) Antioksidan Özellikleri.....	64
2.3.3.4. Nohut Protein İzolatı (NPI) Antioksidan Özellikleri.....	65
2.3.3.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi.....	68
2.3.4. Elektrospining.....	69
2.3.4.1. Polivinil Alkol: Protein İzolatı (PVA: PI) ve Zein: Protein İzolatı (PI) Çözeltilerinin Reolojik Özellikleri ve Elektriksel İletkenlikleri	69
2.3.4.2. Elektrospining ile Elde Edilen Nanoliflerin Morfolojisi	73

2.3.4.3. Nanoliflere Ferulik Asit Eklenmesi ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	78
2.3.4.4. Ferulik Asit Yüklü Nanoliflerin Karakterizasyonu	79
2.3.4.4.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Floresan Mikroskop.....	79
2.3.4.4.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)	82
2.3.4.4.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	84
2.3.4.4.4. X-ışını kırınımı (XRD)	88
2.3.4.5. Ferulik Asit Yüklü Nanoliflerin Antibakteriyel Aktivitesi	90
2.3.4.6. Ferulik Asit Salınım Kinetiğinin Farklı Ortamlarda Belirlenmesi	92

3. BÖLÜM

BAKLAGİLLERDEN MİKRODALGA SULU İKİ FAZ (MD-SİF) EKSTRAKSİYON SİSTEMİ İLE FENOLİK BİLEŞEN EKSTRASİYONU; ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLER, KARAKTERİZASYON VE ENKAPSÜLASYON

3.1. Giriş	89
3.2. Materyal ve Metot	91
3.2.1. Materyal	91
3.2.2. Metot	91
3.2.2.1. Örneklerin hazırlanması	91
3.2.2.2. Faz diyagramının ve Sulu iki faz (SİF)'ın oluşturulması.....	92
3.2.2.3. Mikrodalga Destekli- Sulu İki Faz (MD-SİF) Ekstraksiyon	92
3.2.2.4. Deney Dizaynı ve RSM Optimizasyonu	93
3.2.2.5. Etanolce Zengin Fazdan Fenolik Bileşenlerin Geri Kazanımı	93
3.2.2.6. Klasik-Sulu İki Faz (K- SİF) ve Klasik-Su (K-su) Ekstraksiyon	93
3.2.2.6.1. Toplam Fenolik İçerik (TPC)	94
3.2.2.6.2. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite	94
3.2.2.6.3. ABTS Antioksidan Aktivite	94
3.2.2.6.4. Fe-şelatlama Aktivitesi	95
3.2.2.7. Enkapsülasyon	95

3.2.2.7.1. Enkapsülasyon Etkinliği.....	95
3.2.2.7.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	96
3.2.2.7.3. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)	96
3.2.2.7.4. Enkapsüle Bileşenlerin Salınım Profili	96
3.2.2.7.5. Ayçiçek Yağının Oksidatif Stabilitesi Üzerine Ekstraktların Etkisinin Hızlandırılmış Depolama Koşullarında Değerlendirilmesi	96
3.2.2.8. İstatistiksel Analiz.....	97
3.3. Bulgular, Sonuç ve Tartışma.....	97
3.3.1. Mikrodalga Destekli- Sulu İki Faz (MD-SİF) Ekstraksiyon için RSM Optimizasyonu	97
3.3.2. Optimum Nokta Ekstraktların Mikrodalga Destekli-Sulu İki Faz (MD-SİF) Klasik- Sulu İki Faz (K-SİF) ve Klasik Su Ekstraktları ile Karşılaştırılması	105
3.3.2.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite	106
3.3.2.2. ABTS Antioksidan Aktivite	108
3.3.2.3. Fe-şelatlama Aktivitesi	108
3.3.3. Enkapsülasyon	110
3.3.3.1. Enkapsülasyon Etkinliği	110
3.3.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi.....	110
3.3.3.3. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	112
3.3.3.4. Enkapsüle Fenolik Bileşiklerin Salınım Profili.....	112
3.3.3.5. Hızlandırılmış Depolama Koşullarında Enkapsüle Ekstraktların Ayçiçek Yağının Oksidatif Kararlılığına Etkisi.....	117

4. BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Ultrases Destekli-Derin Ötektik Çözücü (UD-DÖÇ) ile Protein Ekstraksiyonu ve Elektrosponing Yöntemi ile Nanolif Üretimi	127
4.2. Mikrodalga Destekli-Sulu İki Faz (MD-SİF) Ekstraksiyon Yöntemi ile Baklagillerden Fenolik Bileşen Ekstraksiyonu.....	130
4.3. Öneriler	131

4.3.1. Ultrases Destekli-Derin Ötektik Çözücü (UD-DÖÇ) ile Protein Ekstraksiyonu ve Elektrospining Yöntemi İle Nanolif Üretimi.....	131
4.3.2. Mikrodalga Destekli-Sulu İki Faz (MD-SİF) Yöntemi ile Baklagillerden Fenolik Bileşen Ekstraksiyonu.....	131
KAYNAKÇA	132
EKLER.....	165
Ek 1. BSA standart grafik	165
Ek 2. Gallik asit standart grafik.....	165
Ek 3. DPPH inhibisyon Trolox eşdeğeri standart eğrisi	166
Ek 4. ABTS inhibisyon Trolox eşdeğeri standart eğrisi.....	166
Ek 5. Fe-şelatlama aktivitesi EDTA eşdeğeri standart eğrisi	167
Ek 6. Ferulik asit standart grafiği.....	167
ÖZGEÇMİŞ.....	168

SİMGELER VE KISILTMALAR

Sembol	Anlamı
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
dk.	: Dakika
g	: Gram
L	: Litre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
rpm	: Dakika devir sayısı

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABTS 2,2'	: Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ANOVA	: Varyans analizi
BBD	: Box-Behnken dizaynı
ChCl	: Kolin klorür
DPPH	: 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil
DÖÇ	: Derin ötektik çözücü
EE	: Enkapsülasyon etkinliği
FAOSTAT	: Gıda ve tarım örgütü kurumsal istatistik veritabanı
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
KO	: Kareler ortalaması
KT	: Kareler toplamı
MD	: Mikrodalga destekli
MPI	: Mercimek protein izolatu
NPI	: Nohut protein izolatu
PVA	: Polivinil alkol
R^2	: Regresyon katsayısı
sd	: Serbestlik derecesi

SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SİF	: Sulu iki faz sistem
TE	: Troloks eşdeğeri
TPC	: Toplam fenolik içerik
UD	: Ultrases destekli
XRD	: X-ışını kırınım



TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1.	Nanoliflerin özelliklerini etkileyen faktörler	17
Tablo 2.1.	Derin ötektik çözücü (DÖÇ) sentezinde kullanılan hidrojen bağı alıcısı (HBA) ve hidrojen bağı vericisi (HBV)	40
Tablo 2.2.	BBD	53
Tablo 2.3.	Uyum eksikliği testi	54
Tablo 2.4.	Yeşil mercimekten protein ekstraksiyonuna ait ANOVA	55
Tablo 2.5.	Nohuttan protein ekstraksiyonuna ait ANOVA	56
Tablo 2.6.	Yeşil mercimek ekstraksiyon optimizasyon sonuçları.....	57
Tablo 2.7.	Nohut ekstraksiyon optimizasyon sonuçları	57
Tablo 2.8.	FTIR spektrumu ile hesaplanan proteinlerin ikincil yapıları (%)	69
Tablo 2.9.	PVA, MPI ve NPI ile hazırlanan çözeltilerin reolojik özellikleri.....	71
Tablo 2.10.	Zein, MPI ve NPI ile hazırlanan çözeltilerinin reolojik özellikleri	72
Tablo 2.11.	Ferulik asit yüklü PVA:PI ve zein:PI nanoliflerine ait TGA değerleri.....	82
Tablo 2.12.	PVA, MPI ve NPI ile hazırlanan nanoliflerden ferulik asit salınım kinetiği	94
Tablo 2.13.	Zein, MPI ve NPI ile hazırlanan nanoliflerden ferulik asit salınım kinetiği	94
Tablo 3.1.	BBD sonuçları.....	98
Tablo 3.2.	Yeşil mercimekten TPC geri kazanımına ait ANOVA.....	99
Tablo 3.3.	Nohuttan TPC geri kazanımına ait ANOVA tablosu.....	101
Tablo 3.4.	Kuru fasulyeden TPC geri kazanımına ait ANOVA tablosu.....	102
Tablo 3.5.	Yeşil mercimek örneği optimizasyon sonucuna göre elde edilen optimum noktalar ve istenilirlik düzeyleri.....	104
Tablo 3.6.	Nohut örneği optimizasyon sonucuna göre elde edilen optimum noktalar ve istenilirlik düzeyleri	104
Tablo 3.7.	Kuru fasulye örneği optimizasyon sonucuna göre elde edilen optimum noktalar ve istenilirlik düzeyleri	105

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Ultras ses destekli ekstraksiyon cihazı	14
Şekil 1.2.	Faz diyagramı	20
Şekil 1.3.	Mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazı.....	22
Şekil 2.1.	UD-DÖÇ ile elde edilen protein izolatları.....	42
Şekil 2.2.	Protein izolatları.....	43
Şekil 2.3.	Elektrospining cihazı	47
Şekil 2.4.	Farklı DÖÇ kullanımının protein verimine etkisi.....	51
Şekil 2.5.	Mercimek örneğine ait protein ekstraksiyonu bağımsız değişkenler arasındaki etkileşim grafikleri (A) üre (molar oranı); (B) H ₂ O (molar oranı); (C) genlik (%); (D) süre (dk.).	58
Şekil 2.6.	Nohut örneğine ait protein ekstraksiyonu bağımsız değişkenler arasındaki etkileşim grafikleri (A) üre (molar oranı); (B) H ₂ O (molar oranı); (C) genlik (%); (D) süre (dk.).	60
Şekil 2.7.	Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin protein verimine etkisi	62
Şekil 2.8.	Protein izolatlarının farklı pH değerlerinde çözünürlükleri.....	63
Şekil 2.9.	Protein izolatlarının antioksidan özellikleri.....	67
Şekil 2.10.	PVA ile hazırlanan solüsyonların viskozite değerleri.....	71
Şekil 2.11.	Zein ile hazırlanan solüsyonların viskozite değerleri	72
Şekil 2.12.	PVA ve zein ile ele edilen nanoliflerin SEM görüntüleri ve ortalama nanolif çapları	74
Şekil 2.13.	FA içermeyen nanoliflerin SEM (A-C) görüntüleri: 70:30 PVA:MPI (A); 60:40 PVA/MPI (B); 50:50 PVA:MPI (C)	75
Şekil 2.14.	FA içermeyen nanoliflerin SEM (A-C) görüntüleri: 70:30 PVA:NPI (A); 60:40 PVA:NPI (B); 50:50 PVA: NPI (C).....	76
Şekil 2.15.	FA içermeyen nanoliflerin SEM (A-D) görüntüleri: 80:20 zein:MPI (A); 90:10 zein:MPI (B); 80:20 zein:NPI: (C); 90:10 Zein:NPI (D).....	77
Şekil 2.16.	2 mg/mL FA içeren örneklerin SEM (A-B) ve floresans mikroskop (100µm) (C-D) görüntüleri; 50:50 PVA: MPI (A-C); 50:50 PVA/ NPI (B-D).....	80

Şekil 2.17.	2 mg/mL FA içeren örneklerin SEM (A-B) ve floresans mikroskop (100µm) (C-D) görüntüleri; 80:20 zein: MPI (A-C); 80:20 zein: NPI (B-D).....	81
Şekil 2.18.	PVA:MPI:FA, PVA:NPI:FA ve PVA:FA nanoliflerine ait TGA(A); zein:MPI:FA, zein:NPI:FA ve zein:FA nanoliflerine ait TGA eğrileri (B).....	83
Şekil 2.19.	PVA:MPI:FA; PVA:FA nanoliflerine ve MPI'ya ait FTIR (A); PVA:NPI:FA; PVA:FA nanoliflerine ve NPI'ya ait FTIR spektrumları (B).....	85
Şekil 2.20.	Z:MPI:FA; Z:FA nanoliflerine ve MPI ya ait FTIR (A); Z:NPI:FA; Z:FA nanoliflerine ve NPI'ya ait FTIR spektrumları (B).....	87
Şekil 2.21.	PVA:FA (A); PVA:MPI FA (B); PVA:NPI:FA (C); zein:FA (D); zein:MPI:FA (E); zein:NPI: FA (F) nanoliflerine ait XRD diyagramları.....	89
Şekil 2.22.	Nanoliflerin antibakteriyel aktiviteleri.....	91
Şekil 2.23.	FA'in farklı ortamlarda PVA:MPI ve PVA:NPI nanoliflerinden salınım profili.....	95
Şekil 2.24.	FA'in farklı ortamlarda zein:MPI ve zein:NPI nanoliflerinden salınım profili	95
Şekil 3.1.	Etanol/(NH ₄) ₂ SO ₄ 'ın faz eğrisi	92
Şekil 3.2.	Yeşil mercimek faktörler arasındaki etkileşimin grafikleri (3D); (A) Güç 1 ve süre; (B) tuz oranı ve süre; (C) Tuz oranı ve güç.....	100
Şekil 3.3.	Nohut örneği faktörler arasındaki etkileşimin grafikleri (3D); (A) Güç ve süre; (B) Tuz oranı ve süre; (C) Tuz oranı ve güç	101
Şekil 3.4.	Kuru fasulye örneği faktörler arasındaki etkileşimin grafikleri (3D); (A) Güç ve süre; (B) Tuz oranı ve süre; (C) Tuz oranı ve güç	103
Şekil 3.5.	Farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktların TPC, DPPH süpürücü aktivite, ABTS antioksidan aktivite ve Fe-şelatlama aktivite değerleri	109
Şekil 3.6.	Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların FTIR spektrumları	111

Şekil 3.7.	Farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktların maltodekstrin enkapsülasyonuna ait SEM görüntüleri	113
Şekil 3.8.	Enkapsüle mercimek ekstraktların farklı ortamlarda salınım profilleri...	114
Şekil 3.9.	Enkapsüle nohut ekstraktların farklı ortamlarda salınım profilleri.....	115
Şekil 3.10.	Enkapsüle nohut ekstraktların farklı ortamlarda salınım profilleri.....	116
Şekil 3.11.	Enkapsüle ekstraktların ayçiçek yağının hızlandırılmış koşullardaki p-aV üzerine etkisi	118
Şekil 3.12.	Enkapsüle ekstraktların ayçiçek yağının hızlandırılmış koşullardaki PV üzerine etkisi	120
Şekil 3.13.	Enkapsüle ekstraktların ayçiçek yağının hızlandırılmış koşullardaki Totox üzerine etkisi	122

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

1.1. Giriş

Epidemiyolojik çalışmalar bitki temelli bir diyetin birçok kronik hastalık riskini azaltabileceğini göstermektedir [1]. Bitkiler, insan beslenmesinin önemli bir bölümünü karşılar ve bitki türlerine bağlı olarak bitkinin kökleri, yumruları, gövdeleri, yaprakları, çiçekleri, meyveleri ve tohumları kullanılır. Baklagiller tür sayısı bakımından en büyük ailelerden biridir [2]. Lif, vitaminler ve mikro elementler ile birlikte yeterli oranlarda protein ve nişastanın bulunması, baklagilleri önemli bir besin kaynağı ve ilgi odağı haline getirmiştir. Baklagillerin katma değeri, onları protein, nişasta ve lif gibi temel bileşenlere fiziksel olarak ayırarak ve bu ürünleri, gıdanın besleyici değerini artırmak için katkı maddesi olarak kullanarak arttırılabilir [3]. Bununla birlikte, baklagillerin tüketildiğinde, antinutrientler olarak bilinen bir dizi bileşikler de içerdiği, bazı durumlarda bu bileşiklerin toksik olabileceği veya istenmeyen fizyolojik etkilere neden olabileceği bildirilmiş ancak son zamanlardaki epidemiyolojik çalışmalar, düzenli olarak tüketildiğinde birçok antinutrientin kanser ve koroner hastalıklar gibi hastalıkların önlenmesinde faydalı olabileceğini göstermiştir [4].

Baklagiller ekim alanı ve üretim miktarı bakımından tahıllardan sonra gelmekte ve dünya nüfusunun beslenmesi göz önüne alındığında iki milyardan fazla insan için önemli bir protein kaynağıdır. Türkiye önemli bir baklagil üreticisi olup, FAOSTAT 2019 verilerine göre 353631 ton üretim ile mercimek üretiminde dünyada Kanada, Hindistan ve Avustralya'dan sonra dördüncü sırada yer almaktadır. Nohut üretiminde ise 630000 ton'luk üretim ile ikinci sırada yer almaktadır. Kuru fasulye üretimi ise 225000 ton'dur [5].

Baklagiller sayesinde insan beslenmesindeki bitkisel proteinlerin %22'si ve karbonhidratların %7'si hayvanlar için ise proteinlerin %38 ve karbonhidratların %5'i karşılanmaktadır [6]. Proteinler beslenmede büyük önem teşkil eden makronutrientlerdir. Gıdaların besleyici özelliklerini arttırmak, fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri geliştirmek gibi çeşitli amaçlarla bitkisel proteinler gıda formülasyonlarında kullanılmaktadır. Bitkisel proteinler, hayvansal protein kaynaklarına göre çok daha ucuz olmaları dolayısıyla giderek önem kazanmaktadır [7]. Et ve süt ürünlerinin önemli bir alternatifi düşük fiyatları dolayısıyla baklagillerdir. Nohut, mercimek ve kuru fasulye protein içeriği %17-30 arasında değişiklik gösterirken soya fasulyesi yaklaşık %35-49,6 protein içerebilmektedir [8]. Protein içeriğinin yanı sıra baklagiller ihtiva ettikleri mineral, vitamin, karbonhidrat ve polifenoller sayesinde önemli bir besin kaynağıdır [9]. Günlük beslenme içerisine baklagillerin dâhil edilmesi ile diabet, koroner kalp hastalığı, kolon kanseri, hipertansiyon ve gastrointestinal bozukluklar gibi çeşitli metabolik hastalıkların kontrolü ve önlenmesi üzerine birçok sağlık yararı sağladığı bildirilmiştir [10].

Günümüz yeşil teknolojinin ön plana çıkması ve çevre dostu yöntemlerin giderek önem kazanması ile birlikte ekstraksiyon işlemlerinde de bu yöntemlerin kullanımı, geliştirilmesi ve araştırılması önem kazanmıştır. Çevre dostu ve inovatif yöntemler oluşu sebebiyle ultrases destekli (UD) ekstraksiyon ve mikrodalga destekli (MD) ekstraksiyon yöntemleri dikkat çekmektedir [11].

Ekstraksiyon verimini arttırmak amacıyla son zamanlarda çalışılan önemli yöntemlerden biri UD ekstraksiyondur. Dalga boyu 20 kHz den yüksek olan sesler ultrases ses bölgesinde yer alır. Bu sesler insan kulağı tarafından algılanamayan seslerdir [12]. Elektrik enerjisi veya mekanik enerjinin ses enerjisine dönüştürülmesi ile ultrasesler elde edilir. Ultrases sistemi jeneratör, dönüştürücü ve iletici kısımlardan meydana gelir. Elektrik enerjisi, voltaj veya akım halinde dönüştürücüye geldikten sonra burada mekanik enerjiye dönüştürülür. Yayılan mekanik enerji ortamda ısı ve basınç farklılıklarına neden olarak kavitasyon denilen baloncukların oluşmasına neden olur. Ultrases enerjisinin ortamda oluşturduğu kimyasal ve mekanik etkiler oluşan bu kavitasyonlar sayesinde [13]. Kavitasyon ile buhar ve gaz dolu kabarcıklar oluşur ve hemen geri sönmelenir. Bu sırada bölgesel olarak önemli sıcaklık ve basınç değişiklikleri meydana gelir ve bir boşluk oluşur. Kavitasyon kabarcıklarının oluşumu ve patlaması sırasındaki sıcaklık ve basınç

değişimleri hücre duvarının parçalanmasına dolayısıyla hücre içi materyalin daha kolay dışarı sızmasına neden olur. Böylece daha kısa, kolay ve verimi yüksek bir ekstraksiyon gerçekleştirilir [14, 15]. Ayrıca ekstraksiyon çözücünün hücre içine nüfusu ve dokular arasındaki dağılımı da artar [16]. Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinde ekstraksiyon süresi ve kullanılan çözücü aynı verim değerleri için daha fazladır. Yapılan UD ekstraksiyon çalışmalarında verimin daha yüksek olduğu bildirilmiştir [17].

Düşük buhar basıncı, çözünürlük, elektrokimyasal stabilite, yüksek termal stabilite ve iletkenlik gibi üstün özelliklere sahip olan derin ötektik çözücünün (DÖÇ), protein ekstraksiyonunda kullanımı araştırılmıştır [18]. DÖÇ'ler toksik değildir. Biyobozunur ve doğal bileşenlerdir [19]. Bu sebeple geleneksel organik çözücülere ve iyonik çözücülere alternatif olarak görülmektedir [20]. Bir DÖÇ hidrojen bağı reseptörü ve bir hidrojen bağı donörü olarak görev yapan iki veya üç bileşenin karışımıdır [21]. Göze çarpan özelliklerinden biri donma noktasının, düşük bir sıcaklıkta reaksiyona girmesine izin veren saf halinden önemli ölçüde düşük olmasıdır. Bunun ötesinde, DÖÇ iyi bir biyouyumluluk gösterir. Çevre dostu bir uygulamadır ve düşük maliyeti sebebiyle ilgi çekmektedir [22]. DÖÇ, yeterli miktarda mol oranında ötektik bir karışım oluşturabilen, hidrojen bağları vasıtasıyla iki veya daha fazla bileşiğin bir araya getirilmesiyle elde edilir. Genel olarak ısıtma ve öğütme yöntemi olarak iki yöntemle elde edilebilir. Yaygın olarak ısıtma yöntemi kullanılır DÖÇ için oluşturulan karışımlar homojen ve berrak bir sıvı haline gelene kadar 100°C civarında ısıtılır [23]. CHCl_3 , ortak bir hidrojen bağı alıcısı olarak daha ucuz ve daha kolay ulaşılabilir olduğundan tercih edilir ve çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [24]. DÖÇ proteinlerin çözünürlüğünü arttırmak amacıyla MD ve UD yöntemleri ile kombine edilebilir [25]. Bu çalışmada da ekstraksiyon çözücü olarak ön çalışmalarla belirlenen DÖÇ'ler UD protein ekstraksiyonunda kullanılmıştır.

Literatür bilgileri ve çalışmalar göz önüne alınarak geleneksel yöntemlere göre pek çok avantajı olan UD ile protein ekstraksiyonunun verimini arttırmak amaçlanmış ve optimizasyon çalışması yürütülmüştür. Optimum noktada UD-DÖÇ ile elde edilen protein izolatlarının elektrospining tekniğinde PVA ve zein ile birlikte nanolif oluşturma özellikleri değerlendirilmiştir.

Elektrospining mikro ve nanopartiküllerin üretilbildiği elektrohidrokinamik bir sistemdir [26]. Özellikle fonksiyonel bileşenlerin nano enkapsülasyonunda, pro-prebiyotiklerin enkapsülasyonunda kullanılan bir yöntemdir [27]. Son çalışmalarda gıda endüstrisinde biyopolimerlerin, gıda katkı maddelerinin, enzimlerin ve diğer aktif bileşiklerde elektrospining yöntemi uygulamalarına yönelik ilgi artışı görülmektedir [28].

Gıda endüstrisinde bitkilerden bileşen ekstraksiyonu için geniş bir alanda çalışılan yöntemlerden biri de MD ekstraksiyondur [29, 30]. 300-300000 MHz arasında yer alan yüksek frekanslı manyetik dalgalar olan MD dipol rotasyon sayesinde mikrodalga enerjisi materyale direkt olarak etki eder. Geleneksel enerji aktarımında maddenin temas yüzeyinden içe doğru bir enerji aktarımı söz konusu iken MD sisteminde bu aktarım tam tersi yani içerden dışarı doğrudur. Yani MD enerjisi direkt olarak maddenin içinde ısı enerjisi oluşturur. Bu sayede homojen ve her yerde eşit olan bir ısınma sağlar [31]. MD enerjisi hücre içinde meydana getirdiği dipol rotasyon ile hücre içinde ısınmalara ve hücre zarında yırtılmalara sebep olur. Hücresel yırtılma sayesinde hücre içi bileşen çözücü içerisine sızar ve böylece ekstraksiyon verimi artar [32]. Çözücü seçimi MD ekstraksiyon sistemlerinde oldukça önemlidir. Çünkü dipol momenti yüksek çözümler MD enerjisine maruz bırakıldığında daha hızlı ısınırken dipol momenti düşük çözümler için bu durum tam tersidir. Yani MD ekstraksiyon sistemlerinde kullanılan çözücü-çözücü karışımların MD enerjisini absorblama kapasitesi göz önünde bulundurulmalıdır [33]. Apolar bir çözücü olan heksanın dipol momenti oldukça düşüktür ve MD enerjisine maruz bırakıldığında düşük ve yavaş bir ısınma gösterir. Buna karşın asetonun dipol momenti yüksektir ve daha hızlı bir ısınma gösterir [34]. Seçilen çözücünün yanı sıra MD ekstraksiyonda kullanılacak güç, süre, gıdanın fiziksel özellikleri ve geometrisi, elektriksel iletkenliği, termal iletkenliği ve dielektrik özellikleri ekstraksiyon verimini etkileyen diğer parametrelerdir [35]. MD ekstraksiyon sistemlerinde ekstraksiyon süresi ve kullanılan çözgen miktarı düşüken elde edilen verim yüksektir. Bu daha az enerji ve çözücü tüketimi ve daha az çevre zararı demektir [36]. Dünya nüfusunun artması ve sağlıksız yaşam tarzlarının artması nedeniyle sağlıklı gıdalara olan talep son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Nüfus yaşlandıkça da, temel beslenmenin ötesinde sağlık üzerinde potansiyel olarak olumlu bir etkiye sahip olan fonksiyonel gıdalara talebin artması beklenmektedir [37].

1.1.1 Tezin amaçları

1. Baklagil işleme yan ürünlerinden elek altı olarak da adlandırılan atıklarının değerlendirilmesine de katkı sağlama potansiyeli dolayısıyla baklagillerden protein ve fenolik bileşenler elde etmektir.
2. Ekstraksiyon işlemlerini çevre dostu ve ekonomik yöntemlerle gerçekleştirmek ve verimi yüksek tutabilmektir.
3. Yeni tekniklerle elde edilen protein ve fenolik bileşen ekstraktlarının antioksidan özelliklerini belirlemek ve klasik yöntemlere göre avantajını göstermektir.
4. Elde edilen protein ve fenolik bileşen ekstraktlarının kullanılabileceği alanlar belirlemektir. Bu amaçla, üretilen PI'larının PVA ve zein ile elektrospining tekniği kullanılarak nanolif üretiminde kullanılabilirliğini araştırmaktır. Üretilen nanoliflerin, bir antioksidan madde enkapsülasyonunu için kullanılma potansiyelini belirlemektir. Ayrıca fenolik bileşen ekstraktlarının enkapsülasyonunu sağlamak ve antioksidan olarak kullanılabilme potansiyelini belirlemektir.

1.2. Baklagiller

Leguminosae ya da Fabaceae familyasına ait bitkilerin tohumları veya meyveleri baklagil olarak adlandırılır. Latince '*Legumen*' kelimesinden türemiş olan baklagil kelimesi kabuklu baklanın hasat edilen tohumları anlamına gelir. Nohut (*Cicer arietinum*), mercimek (*Lens culinaris*), bezelye (*Pisum sativum*), beyaz fasulye (*Phaseolus vulgaris*), bakla (*Vicia faba L.*), acı bakla (*Lupinus albus L.*, *Lupinus mutabilis Sweet*), yer fıstığı (*Arachis hypogaea*), soya fasulyesi (*Glycine max*), maş fasulyesi (*Vigna radiata*), börülce (*Vigna unguiculata (L.) Walp.*) yonca (*Medicago sativa*) ve barbunya (*Mullus barbatus*) dünya genelinde yaygın olarak tüketilen baklagiller içerisinde sayılabilir. FAO tarafından baklagiller insanlar ve hayvanlar tarafından yenilebilen kuru, düşük yağ içerikli besin maddeleri olarak tanımlanmıştır [38].

Baklagiller binlerce yıldan beri insanlar tarafından tüketilse de, ancak son zamanlarda gıda olarak kullanımları ve insan üzerindeki etkileri uygun yaklaşımlarla araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan son çalışmalara göre sınırlı ama düzenli olarak baklagil

tohumlarının gıda olarak tüketilmesinin faydalı etkileri konusunda fikir birliği söz konusudur [2]. Baklagil tohumlarından elde edilen proteinler, yeni gıda gelişimi ve insan sağlığı için önemli olan fonksiyonel ve biyoaktif özellikler açısından geniş çapta çalışılmıştır [39, 40]. Yapılan bu çalışmaların da etkisiyle son yıllarda faydalı gıda bileşenleri olarak kabul edilen baklagil tüketimi artmıştır [41]. Baklagiller dünya çapında Kuzey Amerika, özellikle Kanada, Asya ve Orta Doğu'daki bölgelerde üretilmektedir [42].

1.2.1. Baklagil proteinleri

Genel olarak baklagiller, önemli miktarda vitamin ve mineral içeren ve yüksek enerji değeri olan kompleks karbonhidrat, protein ve diyet lifi kaynaklarıdır [43]. Baklagil protein içeriği %17 ile %40 arasında değişirken tahıllar için %7-13 civarındadır [44].

Baklagillerde başlıca proteinler globulinler ve albüminlerdir. Globulinler, baklagil tohum proteinlerinin kabaca %70'ini temsil eder ve esas olarak 7S, 11S ve 15S proteinlerinden oluşur. Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları 8000 ila 600 000 Da olup genellikle pH 4-5 arasında minimum çözünürlüğe sahiptirler [45]. Hayvansal proteinler için iyi bir ikame olarak kullanılabildikleri için baklagil proteinlerine artan bir ilgi vardır [46].

Baklagillerde, antinütrisyonel bileşikler olarak bilinen çeşitli enzimler, proteaz inhibitörleri ve lektinler gibi farklı proteinler bulunmakta, bu proteinlerin çoğu suda çözünür albümin sınıfındadır [42].

Son yıllarda, insan sistemindeki sağlığı geliştirici biyolojik faaliyetler ve düzenleyici işlevler, bitki kaynaklı çeşitli protein bileşenleriyle ilişkilendirilmiştir. Bu özellikler, daha önce süt ve süt ürünleri, balık, et ve yumurta gibi hayvansal kaynaklı gıdalarından izole edilen peptitlere atfedilenlere benzemektedir. Farklı boyutlardaki peptitlerin ve bitki proteinlerinin, özellikle baklagiller gibi protein açısından zengin tohumlardan elde edilenlerin, insanlarda özellikle kemik ve kardiyovasküler sağlık, iltihaplanma, kanseri önleme, kilo kontrolü, insülin duyarlılığı gibi çeşitli faydalı etkiler gösterdiği bildirilmiştir [47, 48]. Baklagil tohumlarından elde edilen çeşitli proteinler ve peptitler “nutrasötikler” (veya fonksiyonel bileşenler) kategorisine dâhil edilebilir. Baklagil depo proteinlerinin (7S ve 11S globulinler, prolaminler, glutelinler) hipoglisemik,

kolesterol/trigiliserit düşürücü ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyonu gibi özellikleri bilinmektedir. Ayrıca baklagillerden elde edilen ve antibesinsel bileşikler olarak da adlandırılan Kunitz/Bowman-Birk inhibitörleri gibi proteaz inhibitörlerinin, amilaz inhibitörlerinin ve lektinler gibi bazı protein ve peptitlerin sitotoksik, antibakteriyel etkileri ve antikarsenojik etkileri olduğu bilinmektedir [49].

Protein yapısı, protein kalite değerlendirmesinde ele alınması gereken önemli bir özelliktir. Bitkisel proteinlerin in vivo parçalanması için yapısal ve fizikokimyasal özellikler öneme sahiptir [50]. Baklagil proteinleri ile ilgili olarak, yapısal stabilite sadece in vivo sindirilebilirliği ve esansiyel amino asitlerin mevcudiyetini etkilemez, aynı zamanda biyoaktif dizilerin üretimini de etkilediği bilinmektedir [47].

1.2.2. Baklagil biyoaktif bileşenleri

Baklagiller proteinler (proteaz inhibitörleri, α -amilazlar, lektinler), glikozitler (α -galaktozitler, vicin ve convicin), fenolik bileşikler, tanenler, saponinler veya alkaloidler gibi çok sayıda biyoaktif bileşik içerir [51].

Fenolik asitler, flavonoidler ve kondanse tanenler, baklagil tohumlarında bulunan başlıca fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerin çoğu baklagil tohumlarında bulunur. Baklagil tohumlarının tohum kabuğu öncelikle fenolik asitler ve flavonoidler (esas olarak kateşinler ve prosiyanidinler) içerir. Kateşinler ve prosiyanidinler, mercimek ve kıvılcık fasulyesindeki (tohum kabuğu) fenolik bileşiklerin neredeyse %70'ini temsil eder. Baklagiller için daha fazla pigmentli çeşitler, daha az pigmentli çeşitlerden daha yüksek seviyelerde fenolik bileşikler (antosiyantinler gibi) içerirler. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi, hidroksil gruplarının sayısı ve konumu gibi kimyasal yapıları ile doğrudan ilişkilidir. İşleme, çoğunlukla kimyasal yeniden düzenlemeler nedeniyle baklagillerdeki fenolik bileşiklerin azalmasına yol açar. Suda çözünür fenolik bileşiklerin pişirme suyuna sızması nedeniyle fenolik içerik azalır. Fenolik bileşiklerin sağlığa faydaları arasında antikanserojenik, antitrombotik, ülser önleyici, arterojenik, alerji önleyici, iltihap önleyici, antioksidan, bağışıklık düzenleyici, antimikrobiyal, kardiyoprotektif ve analjezik ajanlar olarak işlev görmeleri yer alır [52].

1.2.3. Mercimek (*Lens culinaris*)

Mercimek dünyanın yarı kurak bölgelerinde kumdan kile kadar değişen çeşitli toprak tiplerinde yetiştirilen tek yıllık bir bitkidir. Baklagil familyasının serin iklimde yetişen türlerinden biridir [53].

Mercimek protein açısından yüksek, özellikle lizin ve lösin açısından zengin, yağ oranı düşüktür ve mükemmel bir diyet lifi ve kompleks karbonhidrat kaynağıdır. Mercimek ayrıca oleik, linoleik ve palmitik asit ile birlikte B vitaminleri, kalsiyum, fosfor ve potasyum gibi vitamin ve mineralleri içerir [54]. Çoğu baklagil gibi mercimek de zengin bir protein kaynağı olup, %20,6-%31,4 protein içeriğine sahiptir [55]. Mercimek proteinleri esas olarak, sırasıyla yaklaşık 60 kDa ve 50-80 kDa legumin ve visilin benzeri proteinlerden oluşan globülinlerdir [56]. Mercimek proteinine olan ilgi, yüksek besin değeri, yüksek sindirilebilirliği ve gıda ürünlerinde potansiyel kullanımı nedeniyle son zamanlarda artmıştır [57]. Mercimeğin beslenme özellikleri, insanlarda kolesterol ve lipid düşürücü etkileri ile kolon kanseri ve Tip-2 diyabet insidansını azaltma ile ilişkilendirilmiştir [58].

Yapılan bir çalışmada mercimeklerde kateşinlerin yanı sıra prosiyanidinler (%69), flavonoller (%17), flavonlar, flavanonlar (%5), hidroksibenzoik (%5) ve hidroksisinnamik asitler (%4) dahil 35 fenolik bileşik bulunduğu bildirilmiştir [59]. Ham mercimeğin toplam 5,69 µg/g hidroksibenzoik asit içerdiği bildirilmiştir [59]. Ayrıca yapılan bir çalışmada 11 mercimek çeşidinde tespit edilen benzoik tip fenolik asitler; gallik asit (90,9–136,8 µg/g), protokateşik asit (20,2–37,7 µg/g), 2, 3,4-trihidroksibenzoik asit (16,9–29,2 µg/g), protokatekuldehit (3,6–12,1 µg/g), p-hidroksibenzoik asit (15,7–44,9 µg/g) ve vanilik asit (0,59–3,22 µg/g) olarak belirtilmiştir [60].

1.2.4. Nohut (*Cicer arietinum*)

Nohut, baklagillerin serin iklim *Fabaceae* (*Leguminosae*) ailesinin bir üyesidir [61]. Nohutun besin değeri nedeniyle dünya üretim, ihracat ve ithalatına yüksek talep bulunmaktadır. Nohut protein açısından yüksek değerlere sahipken, yağ ve sodyum açısından düşük içeriğe sahiptir. Hem çözünür hem de çözünmez lif, kompleks karbonhidratlar, vitaminler, folat ve mineraller, özellikle kalsiyum, fosfor, demir ve

magnezyum için önemli bir kaynak olduğu söylenebilir [54]. Nohut, iyi dengelenmiş amino asit bileşimi ve protein biyoyararlanımı nedeniyle iyi bir diyet protein kaynağıdır [62]. Nispeten ucuzdur ve kardiyovasküler hastalığın önlenmesi, Tip-2 diyabetin yönetilmesi ve LDL-kolesterol seviyelerinin düşürülmesi ile ilişkilendirilmiştir. Nohutta bulunan çözünmeyen diyet lifi, kolon kanseri oluşma riskini azaltmakla ilişkilendirilirken, çözünür lifin kilo kaybı ve kilo yönetimi üzerinde faydalı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [58].

Nohutun protein fraksiyonu (%15-30), esas olarak globulinler (%53-60), glutelinler (%19-25), albüminler (%8-12) ve prolaminlerden (%3-7) oluşur. Nohutta ayrıca nispeten yüksek seviyede özellikle glutamat, aspartat ve arginin varlığının ATP sentezi, kalsiyum salınımı, nörotransmisyon süreçleri, hücrel proliferasyon ve bağışıklık ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [8].

Nohut çok sayıda fenolik bileşen içermekte olup iki önemli fenolik bileşik izoflavonlar grubunda yer alan biokanin A (5,7-dihidroksi-4'-metoksi izoflavon) ve formononetin (7-hidroksi-4'-metoksiizoflavon)'dir. Biyokanin A konsantrasyonu, kabuli nohutlarda (1420–3080 µg/100 g), desi nohutlara (838 µg/100 g) kıyasla daha yüksek olup, kabuli ve desi nohutların formononetin miktarı sırasıyla 215 µg/100 g ve 94-126 µg/100 g bulunmuştur [63]. Nohut proteinleri, ACE'yi inhibe etmenin yanı sıra antioksidan ve hipokolesterolemik aktivitelere sahip olduğu kabul edilen iyi bir biyoaktif peptit kaynağı olarak bildirilmiştir [64].

1.2.5. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*)

Fasulye proteinleri genel olarak metabolik ve depolama proteinleri olarak sınıflandırılabilir. Metabolik proteinler, enzimatik ve enzimatik olmayan proteinleri içerir. Kuru fasulye depo proteinlerinin çoğu, globuler proteinler olup çoğu, 10.000-400.000 Da aralığındadır. İnsan ve hayvan beslenmesinde, büyük öneme sahip olan fasulye proteinleri, suda çözünür (albüminler) ve seyreltik tuzda çözünür (globulin) depo proteinlerini, enzim inhibitörleri ve lektinler gibi bazı metabolik proteinleri içerir [65].

Ayrıca fasulye önemli bir fenolik içeriğe sahiptir. Fasulye örneklerinde fenolik asitlerin araştırıldığı bir çalışmada; p-kumarik asit, sinapik asit ve ferulik asit tüm çeşitlerde kafeik asit ise sadece iki siyah fasulye örneğinde tespit edilmiştir [66].

1.3. Optimizasyon

Proseslerin optimizasyonu deneysel veya istatistiksel yöntemlerle gerçekleştirilebilir ve optimizasyon prosesin ticari uygulamaları için gereklidir. Cevap yüzey yöntemi (RSM), süreçleri geliştirmek, iyileştirmek ve optimize etmek için yararlı olan istatistiksel ve matematiksel yöntemlerin birleşimidir. RSM'nin ana avantajı, çoklu değişkenleri ve bunların etkileşimlerini değerlendirmek için gerekli olan deneysel denemelerin sayısını azaltmaktır [67].

Günümüzde, RSM çeşitli mühendislik alanlarında değişkenlerin optimum durumunu belirlemek için güçlü bir araç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda RSM kullanılarak UD ve MD ekstraksiyon optimizasyonu geniş çapta araştırılmıştır [68-71].

1.4. Ekstraksiyon

Genellikle baklagil ekstraksiyon ve fraksiyonlama teknolojileri, temel olarak proteinleri ve çok daha az ölçüde, baklagil tohumlarından diğer moleküllerin (örneğin lifler veya fenoller) eldesi için geliştirilmiştir [72]. Baklagillerden protein ekstraksiyonu, kuru veya ıslak işleme yoluyla gerçekleştirilebilir. Kuru fraksiyonlama, baklagil tohumlarından protein ekstraksiyonu için umut verici bir teknolojidir. Ayrıca protein işlevselliğini koruduğu için su ekstraksiyonuna iyi bir alternatif teşkil etmektedir. Kuru fraksiyonlama nişasta granüllerini ve proteini ayırmak için uygulanan ince öğütmeden oluşur. Öğütme işlemi hava sınıflandırması ile bu parçacıkların boyutuna veya yoğunluğuna dayalı olarak ayırmaya izin verir ve ayrıca elektrostatik ayırma işlemlerini içerir. Protein açısından zengin ve nişasta açısından zengin fraksiyonların ayrılması için kuru fraksiyonlama, baklagillere (yani sarı bezelye, nohut, mercimek, fasulye dahil olmak üzere baklagil tohumlarının kuru yenilebilir kısmına) ve tahıllara (özellikle buğday) ticari ölçekte uygulanabilir [73]. Islak işleme teknolojileri, genellikle kuru işlemeye göre daha yüksek protein saflığına sahip unlar sağlar. Bu teknolojiler arasında alkali/asit, çözücü ve enzimatik ekstraksiyonlar ve ultrafiltrasyon membranlarının kullanımı baklagillere ve

fraksiyonlarına en çok uygulanan işlemlerdir [74]. Bu ekstraksiyon yöntemlerinin UD ve MD ile birleştirilerek kullanılması yaygın araştırma konularındandır. UD ekstraksiyon baklagillerden proteinlerin [75, 76] ve çeşitli fenolik bileşenlerin [77, 78] ekstraksiyonunda kullanılmıştır. Benzer şekilde biyoaktif bileşen ekstraksiyon verimlerini artırmak için 300 MHz-300 GHz MD ekstraksiyonda molekül titreşiminin bir sonucu olarak numune içinde doğrudan ısı üretilir ve diğer kombine yöntemlerin ekstraksiyon verimliliklerinde artışların olması muhtemeldir [79]. Baklagillerden MD ekstraksiyon ile protein [79] ve biyoaktif bileşen [80, 81] çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

1.5. Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ)

İyonik çözücü (IS), çok sayıda proseste organik çözücüler olarak kullanılmaktadır. İyonik çözücüler eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahiptirler ve bitki materyallerinden tüm fraksiyonları çözme konusunda oldukça etkindirler. Sahip oldukları yüksek polariteleri ve seçicilikleri sayesinde biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda yüksek bir performans gösterirler. Ancak IS'ler orta derecede toksiktirler ve ilaç endüstrilerinde kullanılmaya uygun değildirler. Ayrıca IS'ler olumlu bir özellik olan düşük buhar basıncına sahip olmasına rağmen, yüksek üretim maliyetinden ve sentez sürecindeki karmaşıklıktan dolayı uygulama zorluğuna sebep olmaktadır [82]. Dezavantajlarından dolayı IS'lere bir alternatif olarak DÖÇ geliştirilmiştir. Aynı IS'ler gibi DÖÇ'ler de iyonik bir karaktere sahiptir. Bunun yanında kendisini oluşturan bileşenlerden önemli ölçüde daha düşük bir erime noktasına sahiptirler. DÖÇ'ler, doğal kaynaklardan katma değerli bileşiklerin çıkarılmasında IS ve organik çözücülerin yerini almak için mükemmel bir sistemdir. DÖÇ'ler sentezlenmesi kolay, ucuz, biyolojik olarak parçalanabilen ve düşük toksisiteye sahip yeşil çözücüler olarak kabul edilirler [83]. DÖÇ, kuaterner amonyum tuzları gibi bir hidrojen bağı alıcısının (HBA), bir hidrojen bağı vericisi (HBD) ile karıştırılmasıyla oluşturulur. İlk DÖÇ, ChCl ve üre kullanılarak sentezlenmiştir [21]. İlerleyen yıllarda DÖÇ'in bileşenleri olarak karboksilik asitler (oksalik asit, malonik asit, süksinik asit, fenilasetik asit, fenilpropiyonik asit, trikarbalilik asit, sitrik asit) kullanılmıştır. Daha sonra, DÖÇ' in hazırlanmasında HBD olarak gliserol de kullanılmıştır [84]. 2011 yılına gelindiğinde, şekerler (glukoz, fruktoz, sakaroz, trehaloz), amino asitler (prolin) ve organik asitler (malik asit, sitrik asit, maleik asit, akonitik asit) dâhil olmak üzere bitki birincil metabolitlerinin DÖÇ sentezlemek için kullanılabileceğini keşfedilmiştir [85]. Bu

karışımlar, Doğal derin ötektik çözücü (DDÖÇ) olarak adlandırılmıştır [86]. Yukarıda belirtilen DDÖÇ, kimyasal reaksiyon, elektrokimya, farmasötik ve ayırma işlemi dâhil olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılan yaygın ötektik çözücü türleri olan hidrofilik DDÖÇ olarak sınıflandırılmaktadır [87]. 2015 yılında hidrofobik DDÖÇ terimi ilk kez kullanılmıştır [88]. Hidrofobik DDÖÇ sentezi oluşturulurken, mentolün piruvik asit, asetik asit, laktik asit ve laurik asit ile etkileşimlerinden [88], timol ile mentol ve kumarinin, borneol ile dekanolik asit, oleik asit ve timolün [89] etkileşimlerinden faydalanılmaktadır.

DÖÇ'ler, düşük toksisite, geniş sıcaklık aralığındaki sıvı durumda kalması, termal kararlılık ve kimyasal kararlılık gibi fizikokimyasal nitelikleri nedeniyle akademik çalışmalarda yoğun ilgi görmektedir. DÖÇ'leri oluşturan bileşenler yenilebilen, doğal ve doğada bol miktarda bulunabilen bileşenlerdir [90]. Çoğunlukta gıda maddelerinin içinde doğal olarak bulunan ve toksik olamayan maddelerden oluşturulduğu için DÖÇ'ler ekstraksiyon sonrası ilave bir saflaştırma aşamasına da gerek duyulmadan gıda formülasyonuna dâhil edilebilir [91]. DÖÇ'lerin atık üretimini düşürmesi, yüksek saflıkta oluşu, basit ve kolay hazırlanıyor oluşu bu çözücülerini yeşil çözücüler kategorisine sokmaktadır [90]. Yapılan birçok çalışmada DÖÇ kullanılarak elde edilen ekstraksiyon veriminin geleneksel çözümler kullanılarak elde edilen verimden daha yüksek olduğu bildirilmiştir [92-95]. Protein stabilizasyonu içinde DÖÇ'lerin çözücü olarak kullanılması yapılan çalışmalarda önerilmiştir [85, 96-98].

Nar kabuğundan DÖÇ ile protein ekstraksiyonunun incelendiği bir çalışmada ChCl:asetik asit ve ChCl:üre ile elde edilen protein ekstraksiyon verimleri birbirine çok yakın bulunurken ChCl:asetik asit çözücü olarak seçilmiştir. DÖÇ ekstraktlarından elde edilen hidrolizatlarda basınçlı çözücü ekstraksiyonuna göre daha yüksek miktarlarda peptit elde edildiği bildirilmiştir [99].

Nohut filizlerinden izoflavon ekstraksiyonunun incelendiği bir çalışmada farklı polaritelere sahip DÖÇ'lerin potansiyeli ve etkinliği değerlendirilmiştir. Farklı hidrojen bağı donörleri (karboksilik asitler, alkoller ve amin) ve hidrojen bağı alıcıları (ChCl, betain ve L-prolin) kullanılarak 20 farklı DÖÇ'in ekstraksiyon verimliliği, dört izoflavonun (ononin, sissotrin, formononetin ve biochanin A) miktarı, toplam flavonoid

içeriği ve antioksidan aktivitenin üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, propilen glikol:ChCl (1:1) molar oran ile hazırlanan ve %30 (v/v) su içeren DÖÇ'ler, nohut filizlerinden izoflavon bileşiklerinin ekstraksiyonu için en etkili sistem olarak bildirilmiştir [100].

Yapılan başka bir çalışmada flavonoid ekstraksiyonunda su içeren DÖÇ'lerin verimlerinin içermeyenlere kıyasla önemli derecede farklı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca DÖÇ'ler ile elde edilen verimin geleneksel çözümler ile elde edilenlerden yüksek olduğu belirtilmiştir [101].

Catharanthus roseus bitkisinin çiçek taç yapraklarındaki antosiyaninlerin DÖÇ'ler ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve asitlendirilmiş metanolün klasik çözümler olarak kullanıldığı çalışmada siyanidin test edilen bazı DÖÇ'lerde asitlendirilmiş etanolden çok daha kararlı olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre DÖÇ, bitki materyalinden antosiyaninlerin ekstraksiyonu ve depolanması için zararlı organik çözümlere göre verimli bir alternatif sistem olarak bildirilmiştir [102].

1.5.1. Ultrases destekli- derin ötektik çözümler (UD-DÖÇ) ekstraksiyon

DÖÇ'ler özellikle çözünürlüğü düşük bileşenler için düşük erime noktası, geniş polarite aralığı ve düşük buhar basınçları sayesinde yüksek verim sağlayan sistemlerdir. DÖÇ'ler ekstraksiyon amacıyla direkt kullanılacakları gibi UD ve MD ile ekstraksiyonlarda kullanılabilir [103]. Çeşitli bitkisel ve hayvansal kaynaklardan pek çok bileşenin ekstraksiyonunda UD-DÖÇ ekstraksiyon sistemi kullanılmıştır.

Üzüm kabuğundan fenolik bileşenler elde etmek için çevre dostu bir ekstraksiyon yöntemi oluşturmak amacıyla, MD ve UD ekstraksiyon yöntemleri DÖÇ ile birleştirilmiştir. Yapılan bir çalışmada başlangıçta 5 farklı DÖÇ denenmiş ve en uygun DÖÇ olarak %25 su içeren ChCl:oksalik asit seçildiğinde UD ekstraksiyon verimliliğinin hem MD hem de geleneksel ekstraksiyon yönteminden daha yüksek olduğu bildirilmiştir [104].



Şekil 1.1. Ultrases destekli ekstraksiyon cihazı

Zeytin, badem, susam ve tarçın yağlarından üç farklı fenolik asidin (ferulik, kafeik ve sinnamik) ekstraksiyonu için UD-DÖÇ sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon yönteminin incelendiği bir çalışmada RSM ve istenilirlik fonksiyonu yüksek bulunduğu, yöntemin iyi bir doğrusal kalibrasyon aralığında ($1,30-1000 \mu\text{g L}^{-1}$) olduğu, yüksek belirleme katsayısında sahip olduğu (>0.9499) ve düşük tayin limitleri gösterdiği ($0,39 \mu\text{g L}^{-1}-0,63 \mu\text{g L}^{-1}$) belirtilmiştir [105].

Soya ürünlerinden izoflavonların ekstraksiyonun incelediği bir çalışmada çok değişkenli veri analizi ile yapılan değerlendirme sonucunda ChCl:sitrik asit (1:1 molar oran) solüsyonuna dayalı DÖÇ' ün, soya ürünlerinden izoflavonların ekstraksiyonu için en etkili sistem olduğu bildirilmiştir. UD ekstraksiyonunun irdelendiği çalışmada ekstraksiyon süresi, sıcaklık ve gücün etkisi optimize edilmiştir. Ekstraksiyon parametreleri; 60 dk. uygulama süresi, 60°C sıcaklık ve 616 W ultrases gücü olarak bildirilmiştir [106].

Karabuğday kabuğundan rutin ekstraksiyonu için UD-DÖÇ kullanılan bir başka çalışmada, suya kıyasla DÖÇ'ler rutin çözünürlüğünü 660-1577 kat artırmış ve en yüksek ekstraksiyon verimi ChCl:gliserol sisteminden elde edilmiştir [107].

Yapılan bir diğer çalışmada ticari bir ELISA için UD ekstraksiyon ile birlikte DÖÇ kullanıldığında gluten proteinlerinin yapısında önemli değişiklikler olmaksızın ekstraksiyon hızlandırılmıştır [108] .

UD-DÖÇ ile antosiyanin ekstraksiyonunun optimizasyonu çalışmış ve ekstrakte edilen bileşiklerin maksimum miktarı göz önüne alındığında optimal ekstraksiyon süresi 30.6 dk., ultrases gücü 341,5 W ve DÖÇ'te ki su içeriği, %35,4 (w/w) olarak bildirilmiştir. Asitlendirilmiş etanol ile yapılan karşılaştırma çalışmasında UD-DÖÇ geleneksel yöntemle göre daha etkili bulunmuştur [109].

Dut (*Morus alba L.*) bitkisinin yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için UD ekstraksiyon ile kombinasyon halinde ChCl, betain ve L-prolin bazlı DÖÇ'leri içeren on iki tip DÖÇ kullanılan çalışmada geleneksel ekstraksiyon sistemi (metanol) ile karşılaştırıldığında, ChCl:sitrik asitten oluşan DÖÇ ile %58,33 daha yüksek bir ekstraksiyon verimi elde edilmiştir [110].

Mürver (*Sambucus nigra*) çiçeklerinden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için UD-DÖÇ ekstraksiyonunun optimizasyonu çalışılmasında DÖÇ/su oranı %85 w/v, sıvı-katı oranı 60 mL/g ve karıştırma hızı 200 rpm olarak belirlenen optimum noktada toplam polifenol ekstraksiyon verimi 121,24±8,77 mg GAE/g kuru örnek olarak bulunmuştur. Ekstraksiyonun öncesinde ultrases uygulaması, polifenollerin verimini 174,73±2,62 mg GAE/g kuru örnek miktarına kadar artırmıştır [111].

Carya cathayensis Sarg kabuklarından DÖÇ (ChCl:malik asit) ve vurgulu UD ekstraksiyon yöntemi ile fenolik bileşen ekstraksiyonunun incelendiği çalışmada ekstraksiyon süresinin toplam fenolik içerik (TPC) verimi üzerindeki etkisini araştırmak için, UD ekstraksiyon süresi 2 ila 20 dk. arasında değiştirilirken diğer parametreler (30 mL/g, 60°C, 400 W) sabit tutulmuştur. 2-14 dk. arasında artan ekstraksiyon süresi ile TPC 22,87 mg GAE/g kuru maddeden 65,99 mg GAE/g kuru maddeye kadar kayda değer bir artış göstermiş, ardından hafif bir düşüş eğilimi gözlenmiştir. Ultrases gücünün etkisini değerlendirmek amacıyla diğer parametreler (8 dk., 30 mL/g, 60°C) sabit tutulurken güç 60 W-600 W aralığında değiştirilmiştir. TPC nihai verimi, 60 W'dan 400 W'a kadar hızla artış gösterirken, 400W'dan 600 W'a doğru olan uygulamalarda düşüş eğilimi gözlenmiştir [112].

Bu çalışmalar DÖÇ'ler ile UD ekstraksiyon verimi artarken çözücü tüketimi ve sürenin azaltılabileceğini ve DÖÇ'lerin çevre dostu oluşu nedeniyle toksik atık oluşumunun minimuma indirilebileceğini göstermektedir.

1.6. Elektrospinning

Nano ölçekli boyutlara sahip malzemelerin üretilmesini içeren nanoteknoloji, benzersiz özellikleri nedeniyle bilim ve mühendislikte yaygın olarak kullanılmaktadır [113]. Nano malzemeler, enerji, elektronik, tarım, kozmetik, gıda, sağlık, ilaç dahil olmak üzere hemen hemen her endüstri içerisine entegre edilmekte ve geliştirilmektedir. Pratik uygulamalar için geliştirilmiş çeşitli nano yapılar arasında nano lifler, spesifik yüzey alanı, üstün mekanik performans ve üretim kolaylığı gibi yüksek özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir [114]. Ayrıca nanolifler sayesinde bir ilacın biyoyararlanımı ve enkapsülasyon etkinliği iyileştirebilir ve ilaç salım davranışını kontrol edebilir [115].

1.6.1. Prensipleri

Basit bir elektrospinning cihazı, kontrol pompalı bir şırınga, yüksek voltajlı bir güç kaynağı ve topraklanmış bir kolektörden oluşur. Nanolifleri imal etmek için toplayıcı normalde bir karşı elektrota bağlanır ve polimer çözeltisi şırınganın iğnesinden pompalanır. İğne de 1 ile 30 kV arasında bir voltaj sağlayan yüksek voltajlı bir güç kaynağına bağlanır. Bir elektrik alanının varlığında, iğnenin ucundaki polimer çözeltisi elektrostatik olarak yüklenir ve bir Taylor konisi oluşturur. Elektrostatik kuvvet yüzey gerilimini yendiğinde, Taylor konisinden yüklü polimer çözeltisi püskürtülür. Jet, elektrik alanı tarafından hızlandırılır ve topraklanmış kolektöre doğru hareket ettikçe incilir. Bu olurken çözücü hızla buharlaşır ve jet içindeki polimer zincirleri uzama ve yönlenme eğilimi gösterir. Son olarak, jet nanolifler olarak katılaşır [116] Kullanılan polimer solüsyonun özellikleri ve proses parametreleri üretilen nanoliflerin morfolojisini önemli derecede etkilemektedir (Tablo 1.1) [27].

Tablo 1.1. Nanoliflerin özelliklerini etkileyen faktörler

Polimer Solüsyonu	Proses	Ortam Koşulları
Konsantrasyon	Uygulanan voltaj	Sıcaklık
Viskozite	Hacim akış oranı	Nem
Yüzey gerilimi	Kollektör tipi	Basınç
İletkenlik	Kollektör geometrisi	
Polimer molekül ağırlığı	İğne çapı	
Çözücü uçuculuğu		
Dielektrik sabiti		

1.6.2. Polimer Çözeltinin Özellikleri

Liflerin çaplarını ve morfolojisini etkileyen en önemli parametrelerden biri kullanılan polimer çözeltinin özellikleridir. Çözelti özellikleri polimer konsantrasyonu, polimerin molekül ağırlığı, yüzey gerilimi ve çözelti iletkenliği olarak ayrılabilir. Genel olarak, molekül ağırlık azaldıkça sentetik polimerlerin çözünürlüğü artar. Elektrospining sırasında nanolif oluşumunu kolaylaştırmak için belirli bir minimum polimer konsantrasyonu gereklidir [117].

Polimer çözeltinin konsantrasyonunun nanolif oluşumuna etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada seyreltik çözeltilerin elektrospinenmesinde molekül zincirler arasında yetersiz örtüşme nedeniyle polimer damlacıklarının oluşumuyla sonuçlandığı bildirilmiştir. Konsantrasyonda ki artış devam ettikçe polimer damlacıkları ve bazı boncuklu liflerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Daha yüksek polimer konsantrasyonlarında düzgün nanolif oluşumu gözlenmiş ve nanolif çapının da çözeltilerin viskozitesine göre değiştiği belirtilmiştir [118]. Yapılan bir başka çalışmada ise polimer konsantrasyonunda ki ve çözelti viskozitesindeki değişikliklerin doğrudan birbirine bağlı olduğu gösterilmiştir. Seyreltik polimer çözeltilerinin elektrospinenmesinde boncuklu yapıda nanolifler üretildiği ve en seyreltik polimer çözeltilerinde hiç nanolif üretilmediği bildirilmiştir [119].

Elektrospining ile elde edilen nanoliflerin morfolojisi, büyük ölçüde kullanılan çözücünün hem fiziksel hem de elektriksel özelliklerinden etkilenir [120]. Tipik bir elektrospining çözeltisi ağırlıkça %80-90 çözücü ve ağırlıkça %10-20 civarında

polimerden oluşmalıdır. Bu nedenle elektrospining için çözücülerin seçimi ve bunların nanolif morfolojisi üzerindeki etkileri son yıllarda ana araştırma alanlarından biri olmuştur [121]. Yapılan bir çalışmada elektrospining nanoliflerinin morfolojisi ve yapıda oluşan boncukların varlığında çözücü seçiminin önemli olduğu belirtilmiştir [122]. Yapılan bir çalışmada diklorometan, etanol, N,N,dimetilformamid (DMF) ve bunların karışık çözücülerinin elektrospining işleminde çözücü olarak kullanımının etkileri poli (vinil pirolidon) (PVP) nanolifleri için araştırılmıştır. Kullanılan çözücüye bağlı olarak pürüzsüzden sarmal dokuya kadar değişiklik gösteren lif morfolojileri arasında önemli farklılıklar olduğu bildirilmiştir [123].

1.6.3. Proses Şartları

Nanoliflerin özellikleri uygulanan voltaj, iğne ile kollektör arasında ki mesafe, akış hızı, besleme hacmi, iğne çapı, sıcaklık, nem ve atmosfer basıncı gibi ortam koşullarından etkilenir [124].

Polimer çözeltiye uygulanan voltaj en önemli proses parametresidir. Çünkü solüsyona elektriksel yük uygulandıktan sonra, solüsyondaki elektrostatik kuvvet solüsyonun yüzey gerilimini yendiğinde, dış elektrik alanı elektrospining işlemini başlatır. Genel olarak, 6 kV'dan daha yüksek voltaj, jet başlatma işlemi sırasında meydana gelen Taylor konisinin oluşmasını sağlamaktadır [125]. Uygulanan voltaj çok daha yüksekse, daha fazla miktarda jetin daha hızlı iletilmesine neden olacak ve iğnenin ucundan daha fazla hacimde çözelti çekilecektir. Bu, daha küçük ve daha az kararlı bir Taylor konisi ile sonuçlanabilir [124]. Uygulanan voltajın ve iğne-toplayıcı arasındaki mesafesinin ortaya çıkan nanolif çapı üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, belli bir noktaya kadar uygulanan voltajdaki artıştan sonra ortalama nanolif çapının minimum bir değere ulaştığını ve daha sonra uygulanan voltaj artışıyla birlikte nanolif çapının tekrar büyüdüğünü belirtmişlerdir. 27 kV uygulamada lif çapı yaklaşık 250 nm iken 28-29 kV arasında çap yaklaşık 210 nm' ye kadar düşmüş bu noktadan sonra voltaj artışıyla giderek artmış ve 29kV elektrik yüküne gelindiğinde nanolifçapları 280 nm'ye kadar ulaşmıştır. Yüksek voltajlarda daha yüksek nanolif çapının oluştuğu ve boncuklu yapı oluşumuna eğilimin arttığı bildirilmiştir [126].

Polimer çözeltisi akış hızı, elektrospining sırasında iğne ucunda mevcut olan çözelti miktarını belirler. Belirli bir voltaj için, kararlı bir Taylor konisi oluşması için gerekli olan akış hızı doğru belirlenmelidir [127]. Akış hızı ve uygulanan voltaj arasında bir güç yasası bağımlılığı vardır. Nispeten yüksek çaplara sahip nanoliflerin genellikle yüksek akış hızlarında elektrospining uygulamalarında gözlendiği ve düşük akış hızı ile sıklıkla üniform nanolifler elde edildiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [128-130].

Polimer jetin uzaması Taylor konisinin olduğu iğne ucu ile kollektör arasında gerçekleşir. Dolayısıyla, toplayıcı ile iğne ucu arasındaki mesafenin jet uçuş süresi ve elektrostatik alan kuvveti üzerinde doğrudan etkisi vardır [131]. Elde edilen lifin yetersiz kuruması, iğne ucu ile toplayıcı arasındaki yetersiz mesafeye bağlanır. Bu durumda, mesafe, lifler toplayıcı üzerinde birikmeden önce çözücüyü buharlaştıracak kadar uzun olmamalıdır. Mesafe kademeli olarak artırıldığında, ortalama lif çapı önce minimum bir değere ulaşır daha sonra artan mesafe ile birlikte çapta artmaya başlar [126].

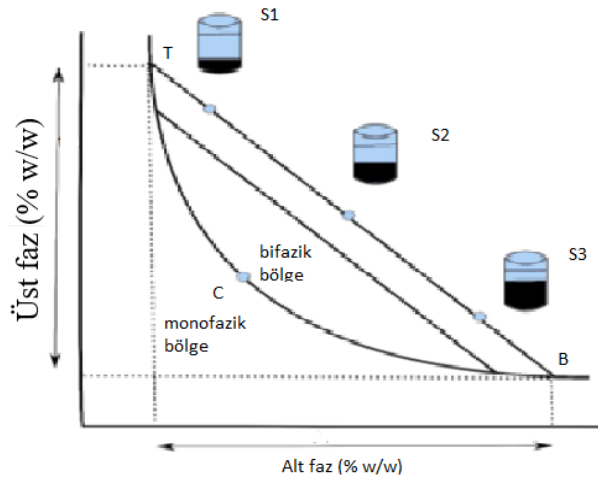
Literatürde baklagillerden ve tahıllardan elde edilen proteinlerin çeşitli polimer madde destekleri kullanılarak lif üretiminde kullanım durumunun araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada siyah fasulye protein izolatları ile PVA kullanılarak film üretimi incelenmiştir [132]. Yine bezelye protein izolatları ile PVA kombinasyonlarından film üretimi gerçekleştirilmiştir [133, 134]. Zein soya PI'nın kombinasyonları incelenmiştir [135].

1.7. Sulu İki Faz (SİF) Ekstraksiyon

İki polimerin veya bir polimer ve bir tuzun su içinde karıştırılmasıyla oluşturulan bifazik sistemlerdir. Hücrelerin, virüslerin, proteinlerin, nükleik asitlerin ve diğer biyomoleküllerin ayrılması için kullanılabilir. Bu sistemler, çeşitli bileşenlerin su içinde karıştırılmasıyla oluşturulabilir. Ancak iki polimer veya polimer-tuz (örneğin, fosfat, sülfat veya sitrat) ile oluşturulan sistemleri daha fazla ilgi görmüş ve bu tip SİF'leri kullanarak tekniği incelemek için çok fazla çalışma yapılmıştır [136-138]. Bu yöntem, çevre dostu, düşük maliyetli, sürekli çalışabilen, ölçek büyütme kolaylığı gibi geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre çeşitli avantajlara sahiptir. Özellikle biyomoleküllerin konsantre edilmesi ve saflaştırılması amacıyla kullanılan etkili bir yöntemdir. SİF' deki

her iki fazın ana bileşeni olan su, biyomoleküllerin ayrılması ve polimerlerin yapılarını ve biyolojik aktivitelerini stabilize etmesi için yumuşak bir ortam oluşturur [139, 140].

İki faz arasındaki ayırım, malzemelerin yüzey özelliklerine, konformasyonuna ve ayrıca iki fazlı sistemin bileşimine bağlıdır. Bununla birlikte, bölümlene mekanizması karmaşıktır ve kolayca tahmin edilemez [141]. SİF oluşturmak için polimer-polimer, polimer-tuz, alkol-tuz gibi farklı kimyasallar kullanılmaktadır. Polimer- polimer sistemler daha çok proteinler, nükleik asitler, hücreler ve organellerin ayrıştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Ancak bazı polimerlerin maliyetli oluşu bu yöntemin dezavantajıdır. Polimer- tuz sistemleri çeşitli polimerler ve tuz çözeltileri ile hazırlanır. Bu sistemlerde daha çok proteinler, nükleik asitler, hücreler ve organellerin ayrıştırılması amacıyla tercih edilmektedir. Maliyeti düşük olmasına karşın yüksek konsantrasyonda tuz kullanımının iyonik gücü artırması dezavantajıdır. Alkol-tuz sistemleri alkoller ve sulu tuz çözeltileri ile hazırlanmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı bileşenlerin ayrıştırılması için uygun bir yöntemdir. Düşük viskoziteli, düşük maliyetli ve çözücünün geri kazanımı kolaydır. Çoğu protein alkolce zengin fazla uyumlu olduğundan alkollerin kullanımı protein ekstraksiyonuna uygun bir yöntem değildir [142].



Şekil 1.2. Faz diyagramı [139]

Faz diyagramı kullanılarak SİF'lerde potansiyel çalışma alanları belirlenir. Binodal eğri iki faz elde etmek için çözeltilerin karıştırılma oranlarının belirlenmesinde kullanılır (Şekil 1.2). eğrinin altında kalan kısımdan seçilen konsantrasyonlarda iki faz elde

edilemez bu bölgede karışım homojendir. Eğrinin üst kısmına denk gelen noktalardan seçilen konsantrasyonların karışımı ise iki faz oluşumunu gösterecektir [142]

Bağ çizgisi uzunluğu (T-B) (tie-line lenght), faz bileşenlerinin son konsantrasyonunu göstermektedir. Aşağıda ki eşitlik kullanılarak bağ çizgisi uzunluğunun teorik olarak hesaplanması mümkündür.

$$\text{Bağ çizgisi uzunluğu} = \sqrt{\Delta C1^2 + \Delta C2^2}$$

İki fazı oluşturan bileşenlerin alt ve üst fazdaki konsantrasyonlarının farkı $\Delta C1$ ve $\Delta C2$ olarak gösterilmiştir. Aynı bağ çizgisi üzerinde ilerledikçe alt ve üst fazdaki bileşenlerin konsantrasyonunun değişmediği ancak hacim oranlarının değiştiği bilinmektedir. Bağ çizgisinin uzunluğu azaldıkça kritik noktaya yani C'ye yaklaşılır. Bu kritik noktada alt ve üst fazın hacimleri ve konsantrasyonları neredeyse eşittir. Bağ çizgisi üzerinde oluşturulan iki fazlı sistemden alt ve üst faz bileşenlerinin hacim oranı aşağıdaki formülle hesaplanır ve bu oran alt ve üst faz arasındaki ilişkiyi göstermektedir [142]. Şekil' e göre S1'de $VR > 1$ iken S3'de $VR < 1$ 'dir.

$$\text{Hacim oranı}(VR) = VT/VB$$

1.7.1. Mikrodalga Destekli- Sulu İki Faz (MD-SİF) Ekstraksiyon

MD-SİF ekstraksiyonu çeşitli bileşenlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için kullanılan ve son zamanlarda yaygın çalışılan yöntemlerden biridir.

Üzüm çekirdeğinden fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu amacıyla MD-SİF sistemi çalışmasında SİF olarak %32 (w/w) aseton ve %16 (w/w) amonyum sitrat kullanılmıştır. MD-SİF (Şekil 1.3) diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, üzüm çekirdeklerinden yüksek miktarda fenolik elde etmek için daha düşük çözücü konsantrasyonuna ve daha az süreye ihtiyaç duyulduğu, ayrıca MD-SİF ile tek bir adımda hedef ürünlerin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve konsantrasyonun sağlanmasının mümkün olabileceği bildirilmiştir [143].



Şekil 1.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazı

Sophora flavescens bitkisinden MD-SİF ile alkaloidlerin ekstraksiyonu için yapılan optimizasyon çalışmasında optimum koşullar süre 5 dk., sıcaklık 90°C, MD gücü 780 W ve SİF için etanol oranı %28 (w/w), amonyum sülfat %18 (w/w) olarak bildirilmiştir. Ayrıca MD-SİF ekstraksiyonu ile elde edilen verimin etil alkol ve su ile gerçekleştirilen MD ekstraksiyon sonrası MD-SİF ile saflaştırma işlemlerini içeren iki adımlı prosesden daha yüksek olduğu bildirilmiştir [144].

Gentinyan çiçeği (*Gentiana scabra Bunge*)’den polisakkaritlerin eş zamanlı ekstraksiyonu ve saflaştırılması için MD etanol/sodyum dihidrojen fosfat SİF sistemi kullanılmıştır [145].

MD-SİF sistemi kullanılarak *Crotalaria sessiliflora L.* bitkisinden flavonoidlerin ekstraksiyonunun optimizasyonu çalışılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda 80°C, 8 dk., parçacık boyutu 80 mesh, çözücü/katı oranı 50 olarak bildirilmiştir. Yapılan çalışmada MD-SİF ile elde edilen verimin yine MD-su, MD-etil alkol ve MD-etil alkol-su sistemlerinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir [146].

Bitki köklerinden alkaloidlerin eşzamanlı olarak ekstraksiyonu ve saflaştırılması amacıyla MD-SİF sistemi kullanılan çalışmada SİF olarak etanol/Na₂HPO₄’ın kullanıldığı çalışmada ekstraksiyon sistemi optimize edilmiştir. MD-SİF ile optimum koşullarda 5 dk.’lık bir uygulamada alkaloid verimi 29,19 mg/g olurken, ultrases uygulamasında 30 dk. sonucunda 26,98 mg/g verim elde edildiği bildirilmiştir [147].

Bir başka çalışmada kadife çiçeğinden flavanoidlerin ekstraksiyonu için MD-SİF sistemi kullanılmış ve yöntemin doğal ürünlerin ekstraksiyonu için verimli, hızlı ve çevre dostu bir yöntem olarak bildirilmiştir [148].

Mantardan polisakkarit ekstraksiyonu için MD-SİF yönteminin kullanıldığı bir çalışmada, etanol (%26, w/w) ve amonyum sülfat (%19.58, w/w)'tan oluşan SİF sisteminin ekstraksiyon sıcaklığı 78,7°C, ekstraksiyon süresi 19,55 dk. ve katı- çözücü oranı 1:5 olarak belirlenmiş ve polisakkaritlerin üst fazdan ve alt fazdan ekstraksiyon verimleri sırasıyla $2,12 \pm 0,21$ ve $11,16 \pm 0,28$ olarak bildirilmiştir [81].

Etanol/amonyum sülfat SİF sistemi kullanılarak *Rosa pimpinellifolia* L. meyvelerinden antosiyaninin MD ekstraksiyonu çalışmasında optimum antosiyanin veriminin %26,85 etanol (w/w), %19,15 amonyum sülfat (w/w), sıvı/katı oranı 40, 17,29 dk., 60°C ve 400 W koşullarında elde edildiği bildirilmiştir [80].

2. BÖLÜM

BAKLAGİLLERDEN ULTRASES DESTEKLİ DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ (UD-DÖÇ) İLE PROTEİN EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU, PROTEİNLERİN ELEKTROSPİNİNG YÖNTEMİYLE NANOLİF ÜRETİMİNDE KULLANILMASI

2.1. Giriş

Bitkilerden protein ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında amonyum sülfat ile çöktürme, elektroforez [149], iyon değişim [150] ve affinite kromatografisi [151] gibi geleneksel yöntemler kullanılabilir. Proteinlerin ve biyoaktif bileşenlerin mevcut ekstraksiyon metotları çözücü ve enerji tüketimiyle, ısıya dayanıklı bileşenlerin termal tahribatı tehlikesi ve uzayan ekstraksiyon süreleri ilişkilidir [152]. Bu işlemler karmaşık, pahalı ve iyileştirilmesi zor olduğundan, sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygun bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır [153]. Bu çalışmada, yeşil mercimek ve nohuttan protein ekstraksiyonu için düşük maliyetli, ekolojik olarak kabul edilebilir ve sentezlenebilir olmaları nedeniyle derin ötektik çözücüler (DÖÇ) kullanılmıştır. Ayrıca bu çözücüler uçucu ve toksik olmayıp oldukça kararlıdır [154]. DÖÇ, ikame edilmiş kuaterner amonyum tuzlarından ve asitler, alkoller ve aminler gibi hidrojen bağı donörlerinden oluşur. ChCl ucuz ve biyokütleden ekstrakte edilmesi kolay olduğundan, DÖÇ üretimi için en yaygın kullanılan kuaterner amonyum tuzlarından biridir. Çeşitli alanlarda, ChCl bazlı DÖÇ'ler çok ilgi görmüştür [155]. DÖÇ'lerin protein ekstraksiyonu amaçlı kullanıldığı çalışmalar mevcuttur [99, 156-159].

Elektrostatik eğirme olarak da bilinen elektrospining, mikrometre altı ve nanometre kadar küçük çaplarda lifler üretebilen yeni bir lif üretim teknolojisidir [160]. Elektrospining,

proteinlerden lifler oluşturmak için kullanılabilir [161]. Ancak sulu çözeltilerde doğal veya denatüre proteinlerin elektrospiningi etkisizdir [162]. Bu nedenle lif üretimi, taşıyıcı polimerlerin varlığı ile desteklenebilir. Bu çalışmada taşıyıcı polimer olarak kullanılan polimer polivinil alkol (PVA)'dır. Çünkü PVA arzu edilen morfolojilere ve diğer özelliklere sahip lifler üreten biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerdir [132, 163]. Ayrıca çevre kirliliği endişeleri nedeniyle gıda ambalaj uygulamalarında plastik yerine kullanımı dikkat çekmektedir [134]. Protein izolatlarından nanolif oluşturmak için seçilen yardımcı polimerlerden bir diğeri de zeindir. Zein, etanol, asetik asit ve sulu metanol gibi farklı çözücülerde çözündürülerek elektrospinningde kullanılabilen, alkolde çözünür prolamin proteinlerinin bir sınıfıdır [164]. Zein, yüksek film oluşturma özellikleri, yüksek termal direnci ve mükemmel oksijen bariyeri özellikleri nedeniyle gıda ve ilaç endüstrisinde çok sayıda uygulama alanı bulmuştur [165]. Plastiklerin yerini alma konusunda büyük potansiyele sahip, biyolojik olarak parçalanabilen ve sürdürülebilir bir malzemedir. Zeinin yenilenebilir kaynaklardan elde edilmesi ona olan ilgiyi arttırmış olup hâlihazırda çok sayıda ticari uygulaması mevcuttur ve özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde kaplamalarda kullanılan önemli bir materyaldir [165].

Ferulik asit, antioksidan özelliği yüksek olan bir hidroksisinamik asittir. Bitki hücre duvarlarında bulunan yaygın bir fenolik moleküldür. Genellikle hücre duvarında karbonhidratların veya proteinlerin yapısına kovalent olarak bağlanır. Ferulik asit doğal haliyle etkili olan antibakteriyel bir moleküldür. Tüm bunların yanı sıra yağın otooksidasyonunu önlemek için bir koruyucu madde olarak kullanılır [166, 167]. Antioksidanların korunması için mikro ve nanokapsülasyon etkili seçenekler olarak kullanılabilir. Ambalaj materyaline dahil edilen antioksidan moleküller uzun süreli salınım sonucu gıda depolaması boyunca aktivitelerini sürdürebilirler [168]. Aslında, elektrospining yöntemi son zamanlarda ferulik asit içeren nanolifleri oluşturmak için kullanılmıştır. [169-171]. Ancak mevcut çalışmada baklagil protein izolatları ile üretilen liflerin ferulik asit kapsülasyonundaki etkinliği ölçülmek istenmiştir.

Bu çalışmada yeşil mercimek ve nohuttan UD-DÖÇ ile protein ekstraksiyonunun etkili bir ekstraksiyon yöntemi olarak doğruluğu test edilmiştir. Protein izolatları bu yeni çevre dostu ve ekonomik yöntemle üretilmiştir. Üretilen proteinin PVA ve zein ile nanolif

üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılması mercimek protein izolatı (MPI) ve nohut protein izolatı (NPI) içeren nanolifler, gıdanın besin içeriğini artırmak için bir nanokapsül matrisi olarak veya bir kaplama materyali olarak kullanılabilmesi bakımından önemlidir. Literatür araştırmasında elektrospining ile nanolif oluşumu için MPI ve NPI kullanımına ilişkin yayınlanmış bir çalışma bulunmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmanın temel amacı, UD-DÖÇ ile üretilen farklı MPI ve NPI'lerinin elektrospining ile nanolif oluşumunu değerlendirmektir. Üretilen nanoliflerin morfolojisi incelenmiş, bu nanoliflerin, ferulik asitin enkapsülasyonu ve korunması için potansiyelinin yanı sıra, enkapsülasyon etkinliği, ferulik asitin dağılımı ve nanoliflerin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Ayrıca, simüle edilmiş gıda sistemlerinde ve *in vitro* sistemde nanoliflerden ferulik asitin salım kinetiği hesaplanmıştır.

2.2. Materyal ve Metot

2.2.1. Materyal

ChCl (C-1879), PVA (P8136,70.000, %87-90 hidrolize edilmiş), ferulik asit (128708), fosfat tamponu (17202), glukoz (G7021) Sigma'dan, fruktoz (57-48-7), asetik asit (64-19-7), sitrik asit (5949-29-1), gliserol (56-81-5) Merck'den, üre (57-13-6) Isolab'dan temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Baklagiller yerel bir üreticiden temin edilmiştir. Örneklerin başlangıç nem içerikleri sırasıyla yeşil mercimek ve nohut için %12.85 ve %15.80 olarak belirlenmiştir.

2.2.2. Metot

2.2.2.1. Örnek Hazırlama

Yeşil mercimek ve nohut örnekleri öğütüldükten (Werke M20, IKA, Almanya) sonra 0.355 mm gözenek çaplı elekten geçirilmiştir. Yağ uzaklaştırma amacıyla örnekler 1/5 oranında hekzan ile muamele edilerek 220 rpm'de, manyetik karıştırıcıda (KS 4000i, IKA, Almanya) 30°C, 5 saat karıştırıldıktan sonra 4500 g'de 10 dk. santrifüj (NF 1200R, Nüve, Türkiye) edilmiştir. Hekzanı uzaklaştırılan örnekler bir gece çeker ocakta (MPN, Faema, İtalya) kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen yağsız mercimek ve nohut unları analiz edilinceye kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.2.2. Kullanılacak Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ)'nün Belirlenmesi

Optimizasyonda kullanılacak çözücünün belirlenmesi için bir ön çalışma yapılmıştır. Bu amaçla 1:1:1 (dizaynda kullanılan en düşük oranlar seçilmiştir) hidrojen verici:hidrojen alıcı:su karıştırılmıştır. DÖÇ hazırlanırken manyetik karıştırıcıda 80°C'de homojen bir çözücü elde edilene kadar (yaklaşık 2-3 saat) bekletilmiştir [172]. Hidrojen alıcısı olarak ChCl, hidrojen vericisi olarak gliserol, üre, asetik asit, glukoz, fruktoz kullanılmıştır (Tablo 2.1). Yine optimizasyonda kullanılan en düşük süre (3 dk.) ve en düşük ultrases gücü (%30) kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir [99]. Ekstraktlar 7500 g'de 10 dk. santrifüj (NF 1200R, Nüve, Türkiye) edildikten sonra protein analizi Bradford yöntemine [173] göre gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.1. Derin ötektik çözücü (DÖÇ) sentezinde kullanılan hidrojen bağı alıcısı (HBA) ve hidrojen bağı vericisi (HBV)

HBA	HBV	Referanslar
 Kolin klorür (ChCl)	 Gliserol	[156, 157, 159, 174]
 Kolin klorür(ChCl)	 Asetik asit	[156]
 Kolin klorür(ChCl)	 Glukoz	[159, 175]
 Kolin klorür(ChCl)	 Fruktoz	[176]
 Kolin klorür(ChCl)	 Üre	[156, 174, 177-179]
 Kolin klorür(ChCl)	 Sitrik asit	[108]

2.2.2.3. Deney Dizaynı ve RSM Optimizasyonu

Design Expert (Trial Version 7.0.0, Stat-Ease Inc., ABD) programında Box-Bhenken dizaynı ile belirtilen süre, güç, üre mol miktarı ve su mol miktarı bağımsız değişkenleri kullanılarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Dizaynda 5 merkez nokta seçilmiştir. Buna göre toplamda 29 farklı noktada ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon ultrases cihazı (UP400S, Hielscher, Almanya), 400 W güç, 24 kHz frekans ve 120 µm genlikte titanyum prob (H22D, 22 mm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler 30 mg/mL (örnek/ DÖÇ) oranı ile 100 mL'lik beherler içerisinde hazırlanmıştır [99]. Sıcaklık artışı kontrol edebilmek için ekstraksiyon beheri daha büyük bir behere yerleştirilerek etrafı buz ile doldurulmuştur. Ekstraksiyon sonrası örnekler 4000 g'de 10 dk. santrifüj (NF 1200R, Nüve, Türkiye) edilmiştir.

Optimizasyon dizaynına göre elde edilen ekstraktların protein miktarları belirlenip sonuçlara göre varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilmiştir. Yeşil mercimek ve nohuttan protein ekstraksiyonu optimizasyonu için programın önerdiği kuadratik model ayrıca regresyon katsayısı, F değeri, 0,05 önem derecesinde polinomdaki tüm terimlerin anlamlarını istatistiksel olarak değerlendirmek için kullanılmıştır.

2.2.2.4. Protein tayini

Bradford boya çözeltisi hazırlanırken öncelikle Cosmassie Brilliant Blue (50 mg) %95'lik etanol (50 mL) içerisinde çözülmüş daha sonra %85'lik fosforik asit çözeltisi (50 mL) eklenmiştir. Hazırlanan bu stok çözelti analiz için 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır. Örnek (40 µL) ve boya çözeltisi (200 µL) mikro okuyucu kuyucuklarına eklenmiş 1 dk. karıştırma 5 dk. inkübasyon süresinin ardından 620 nm'de mikro okuyucuda (Multiscan FC, Thermo, İstanbul) absorbans ölçülmüştür. Sonuçlar sığır serum albumini (BSA) standart grafiği kullanılarak mg BSA/g örnek olarak verilmiştir. Standart grafiği 0.08-1.0 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan BSA ile çizilmiştir [173].

2.2.2.5. Optimum noktada protein izolatu (PI) eldesi

Belirlenen optimum noktalarda yeşil mercimek için (1,13 M üre, 4,3 M su, 35% genlik, 14,5 dk.), nohut için (1,08 M üre, 4,9 M su, %59 genlik, 10,6 dk.) üretimler

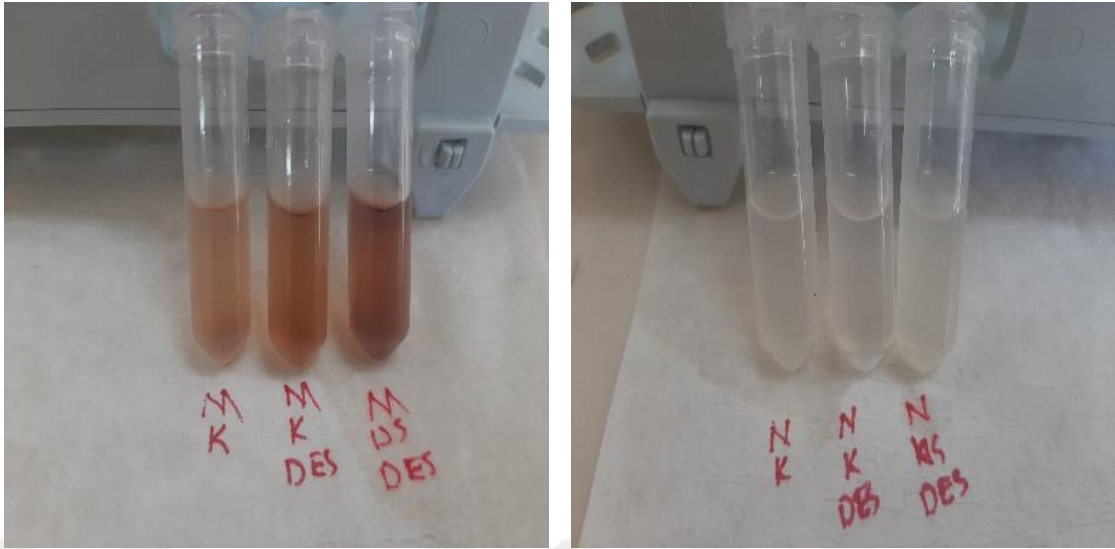
gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.1). Ekstraksiyon sonrası örnekler 4000 g'de 10 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatantlar toplanmıştır. Süpernatantlardaki proteinler soğuk etanol (15mL, 4°C, 24 saat) ile çöktürülmüştür ve santrifüjlenmiştir (10 dk., 4000 g). Aynı yöntem kullanılarak çökelti tekrar yıkanmıştır. Elde edilen PI liyofilizatörde (Christ Alpha 1-2 LDplus, Almanya) -30°C, 0,04 mbar vakum altında dondurarak kurutulmuştur. Örnekler analiz sürecine kadar -20°C'de depolanmıştır [99].



Şekil 2.1. UD-DÖÇ ile elde edilen protein izolatları

2.2.2.6. Klasik (K)- Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ) ve Klasik (K)-su Ekstraksiyon

Ekstraksiyon etkinliğinin karşılaştırılması için, K-DÖÇ ve K-su ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. DÖÇ her bir örnek için optimizasyonda belirlenen optimum noktalarda hazırlanmıştır. K-DÖÇ yerine aynı miktarda distile su kullanılmıştır. K-su ekstraksiyonlar 2 saat ve 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Örnek konsantrasyonu tüm yöntemler için aynıdır. Ekstraksiyon işlemleri sonrası ekstraktlar santrifüj edilmiş (4000 g'de 10 dk.) ve soğuk EtOH (15mL, 4°C, 24 saat) ile çöktürme işlemi yapılmıştır. Aynı yöntem kullanılarak pelet tekrar saflaştırılmıştır. Elde edilen pelet liyofilizatörde (Christ Alpha 1-2 LDplus, Almanya) -30°C, 0.04 mbar vakum altında dondurarak kurutulup analiz edilinceye kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.2. Protein izolatları

2.2.2.6.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite

DPPH radikal süpürücü aktivite analizi için örnek (30 μ L) üzerine DPPH çözeltisi (270 μ L) eklenmiştir. Kör için saf su (30 μ L), metanol (270 μ L), kontrol içinse saf su (30 μ L) DPPH çözeltisi (270 μ L) kullanılmıştır. Yöntem başlangıcında 5 dk. karıştırma ve toplam 1 saat reaksiyon inkübasyonu yapılmıştır. İnkübasyon sonunda 520 nm’de mikro okuyucuda (Multiskan FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) absorbans ölçülmüştür [180]. Sonuçlar troloks kullanılarak çizilen standart grafiğe göre hesaplanmış [181] ve μ mol troloks eşdeğeri (TE)/g olarak verilmiştir.

2.2.2.6.2. Toplam Fenolik İçerik (TPC)

TPC analizi gerçekleştirilirken Folin-Ciocalteu metodu kullanılmıştır [182]. Bu amaçla mikroluka kuyucuklarına öncelikle örnek (30 μ L) ardından folin-ciocalteu reaktifi (150 μ L) ve % 7,5’luk sodyum karbonat (120 μ L) eklenmiştir. 5 dk. çalkalama toplam 1 saat inkübasyon süresinin ardından 750 nm’de mikro okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) ile absorbans okunmuştur. Aynı işlem standart grafik hazırlamak için kullanılan farklı konsantrasyonlardaki gallik asit (GA) çözeltileri için de uygulanarak standart grafik oluşturulmuştur. Sonuçlar mg GA eşdeğeri (E)/g olarak verilmiştir.

2.2.2.6.3. Fe-şelatlama Aktivitesi

Fe-şelatlama aktivite tayini [183]'e göre bazı modifikasyonlar ile yapılmıştır. Ekstrakt (400 µL-3mg/mL) ve FeCl₂ (50 µL, 2 mM) karıştırılmış ve 30 dk. 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından karışıma ferrozin (200 µL, 5 mM) ve etanol (3350 mL) eklenmiştir. İnkübasyona bırakılan (10 dk.) örneklerin absorbansı spektrofotometrede (UV1700 Pharmaspec, Shimadzu, Japan) 542 nm'de okunarak Fe-şelatlama aktivitesi aşağıdaki denkleme göre belirlenmiştir.

$$\% = \frac{Ak - A\ddot{o}}{Ak} \times 100$$

PI'larının Fe-şelatlama aktivitesi belirlendikten sonra şelatlayıcı bir ajan olarak bilinen EDTA ile elde edilen eğri kullanılarak sonuçlar µmol EDTA/g olarak verilmiştir.

2.2.2.6.4. Protein Çözünürlüğü

PI'lar farklı pH ortamlarında (3, 6, 9, 12) 25°C'de 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Süre sonunda 3000 g'de 5 dk. santrifüj edilen örneklerin süpernatantın çözünmüş protein konsantrasyonu Bradford yöntemine göre mg BSA/g olarak belirlenmiştir [184].

2.2.2.6.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Örneklerin yapısal özelliklerindeki değişimi değerlendirmek amacıyla farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktların spektrumları (Spectrum 400 PerkinElmer Instruments, Waltham, ABD) 450- 4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında, 100 tarama hızıyla ölçülmüş ve 4 cm⁻¹ resolusyonda ATR ünite kullanılmıştır.

2.2.2.7. Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ) ile Elde Edilen Protein İzolatlarından Nanolif Üretimi

2.2.2.7.1. Polivinil Alkol (PVA) ile Nanolif Üretimi

Başlangıçta elde edilen mercik protein izolatu (MPI) ve nohut protein izolatu (NPI) ile nanoliflerin üretilmesinde en iyi koşulların oluşturulması için ön denemeler yapılmıştır.

Yapılan ön denemelerde protein izolatlarının tek başına nanolif oluşturma özelliğinde olmadığı görülmüştür. PVA ve zein kullanılarak hibrit solüsyonlar hazırlanmıştır. Protein içeriği 150 g/L (PI:su) olan protein çözeltileri hazırlanmıştır. PVA hazırlanmasında literatür göz önünde bulundurularak (5, 15, 21, 27 ve 30 g/L) farklı oranlarda ön denemeler yapılmıştır. PVA solüsyonunun konsantrasyonu 30 g/L (PVA:su) olarak belirlenmiştir. 30 g/L konsantrasyonunda ki PVA 1 saat 90°C’de manyetik karıştırıcıda hazırlanmıştır [132-134]. Daha sonra PVA:MPI ve PVA:NPI oranları 70:30, 60:40, 50:50 ve 40:60 (w:w) olacak şekilde ayarlanarak 90°C’de 1 saat manyetik karıştırıcıda hazırlanmıştır.

2.2.2.7.2. Zein ile Nanolif Üretimi

Zein için literatür ve ön denemeler göz önünde bulundurularak 30g/L (zein/asetik asit) konsantrasyonunda solüsyonlar hazırlanmıştır. Zein hazırlanmasında asetik asit içeren beher manyetik karıştırıcıya alınmış zein azar azar eklenerek oda sıcaklığında çözeltinin 1 saat karışması sağlanmıştır. Zein ile hazırlanan nanoliflerde kullanılan protein izolatları yine 150g/L (PI:asetik asit) olarak ayarlanmıştır [135, 185]. Zein:MPI ve zein:NPI oranları 90:10, 80:20 ve 70:30 olacak şekilde karışımlar hazırlanmıştır. Bu aşamalarda amaç mümkün olduğunca fazla PI kullanarak uygun nanolifler elde etmektir. 40:60 PVA:MPI ve PVA:NPI karışımları ve 70:30 zein:MPI ve zein:NPI karışımları ile nanolif elde edilememiştir.

2.2.2.8. Polimer Çözeltilerin Karakterizasyonu

2.2.2.8.1. Reolojik Özellikler

Hazırlanan PVA:PI ve zein:PI karışımlarının reolojik özellikleri kesme kontrollü ve Peltier sistemli reometre (Mars III, HAAKE ThermoScientific, Karlsruhe, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler koni-plaka konfigürasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Koni ile plaka (koni çapı: 35 mm, açı: 1°, koni plaka aralığı: 0.5 mm) arasına mikro pipet yardımıyla 1 mL örnek konulup 0.1-100 s⁻¹ aralığında kesme işlemi uygulanmıştır. Her bir kesme hızı değerinde 10 s bekleme yapıldıktan sonra örneklerin görünür viskozite değerleri, kesme gerilimi ve kesme hızı verileri tespit edilmiştir. Sıcaklık 25±1°C'ye

ayarlanmıştır. Kesme hızı 1 ile 100 s⁻¹ arasında değiştirilmiştir. Kayma gerilimi (τ) ve kayma hızı ($\dot{\gamma}$) verileri toplanmıştır. Veriler, güç yasası modeline göre oluşturulmuştur.

$$\tau = k(\dot{\gamma})^n \text{ ve } \eta = k(\dot{\gamma})^{n-1}$$

(τ kayma gerilimi (Pa), $\dot{\gamma}$ kayma hızıdır (s⁻¹), k tutarlılık katsayısı (Pa·sⁿ), n akış davranış indeksi ve η ise görünür viskozitedir (Pa·s).

2.2.2.8.2. Elektriksel İletkenlik

Polimer çözeltilerin elektriksel iletkenliği iletkenlik ölçer (HQ40d Multimetre, Hach, ABD) ile belirlenmiştir.

2.2.2.9. Elektrosponing

Elektrosponing işlemi için değişken yüksek voltajlı 0-30 kV güç kaynağı ile donatılmış elektrosponing cihazı (Nanospinner, NE300, Inovenso, ABD) kullanılmıştır (Şekil 2.3). Anot, biyo polimer çözeltilerini içeren 10 mL'lik bir plastik şırıngaya bağlanan 16 μ m iç çaplı paslanmaz çelik bir iğneye bağlanmıştır. Şırınga iğne dijital olarak kontrol edilen bir şırınga pompası üzerine yatay olarak yerleştirilmiş ve toplayıcıya doğru yönlendirilmiştir. Bu sayede oluşan Taylor konisinden ve hava boşluğundan geçen pozitif yüklü polimer çözeltisi jeti alüminyum folyo kaplı kollektör üzerinde birikmiştir. Elektrosponing işleminde uygulanan voltaj, iğne ucu ile kollektör mesafesi ve besleme hızı önemli koşullardır. PVA:MPI ve PVA:NPI çözeltilerinin akış hızı (0,3 mL/h), uygulanan voltaj (21 kV) ve iğne ile kollektör arasındaki mesafe (11 cm) yapılan ön denemeler ile belirlenmiştir. Aynı şekilde zein:MPI ve zein:NPI çözeltilerinin akış hızı (0,5 mL/h), uygulanan voltaj (21 kV) ve iğne ile kollektör arasındaki mesafe (12 cm) yapılan ön denemeler ile belirlenmiştir. Elektrosponing işlemi laboratuvar ortamında 25±1°C'de gerçekleştirilmiştir [133].



Şekil 2.3. Elektrosponing cihazı

2.2.2.9.1. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

Farklı PVA:PI ve zein:PI oranlarında üretilen nanoliflerin ve ayrıca ferlik asit yüklenmiş nanoliflerin yüzey özellikleri SEM (Stereoscan 440, Leica Cambridge, Ltd, UK) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler ince altın tabaka ile kaplanmış ve görselleştirme, 25 kV'luk bir uyarma gerilimi ile gerçekleştirilmiştir. Nanoliflerin ortalama çapları ve çap dağılımları yazılım programı (Image J, NIH, ABD) kullanılarak 20000 yaklaştırmada alınmış 5 farklı görüntüden random olarak seçilen 100 nanolifin çap ölçümü ile belirlenmiştir [132].

2.2.2.10. Seçilen Protein/Polivinil Alkol ve Protein/Zein Nanoliflerinin Ferulik Asit ile Yüklenmesi

SEM görüntüleri ile elde edilen partikül çapları ve reolojik özellikler göz önünde bulundurularak PVA:MPI ve PVA:NPI için kullanılabilecek en yüksek protein/polimer oranı 50:50 w:w olarak belirlenmiştir. Zein ile yapılan çalışmalarda ise zein:MPI ve zein:NPI için 80:20 w:w olarak belirlenmiştir. Başlık 2.2.2.9'da bahsedilen elektrosponing ile örnek hazırlama yöntemine göre örnekler hazırlanmıştır. PVA:PI ile hazırlanan örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Daha sonra 2 mg/mL olacak şekilde tartılan ferulik asit karışımlara eklenmiş ve oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 1 saat bekletilmiştir [186]. PVA:MPI-FA ve PVA:NPI-FA (50:50:2) çözeltilerinin 0,3 mL/h akış hızında, 21 kV uygulanarak ve 11 cm'lik iğne-kollektör mesafesinde üretilmiştir.

Zein:MPI-FA ve zein:NPI-FA (80:20:2) çözeltileri 0.5 mL/h akış hızında, 21 kV voltaj uygulanarak ve 12 cm'lik iğne-kollektör mesafesinde üretilmiştir elektrospining işlemi laboratuvar ortamında $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ve yaklaşık %40 bağıl nemde gerçekleştirilmiştir [13].

2.2.2.10.1. Enkapsülasyon Etkinliği

Ferulik asitin enkapsülasyon etkinliği [171]'a göre kısmi değişikliklerle belirlenmiştir. Ferulik asit (1 mg) yüklü nanolif, etanol (1 mL) içeren bir deney tüpüne yerleştirilmiş ve kapsül içindeki ferulik asitin serbest kalması için 300 rpm'de 10 dk. çalkalanmıştır. Daha sonra tüpler, 20°C 'de 10 dk. 10,000 g'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant alınmış ve çökelti etanol (1 mL) içinde tekrar süspansiyon edilmiş ve tekrar 20°C 'de 10 dk. 10,000 g'de santrifüjlenmiştir. Ferulik asit miktarı, 324 nm'de (UV1700 Pharmaspec, Shimadzu, Japonya) absorbans ölçümü ve oluşturulan ferulik asit standart eğrisi [171] ile belirlenmiştir.

2.2.2.11. Nanolif Karakterizasyonu

2.2.2.11.1. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Floresan Mikroskop

Farklı PVA:PI ve zein:PI oranlarında üretilen nanoliflerin ve ayrıca ferulik asit yüklenmiş nanoliflerin yüzey özellikleri SEM cihazı (LEO 440 Stereoscan) kullanılarak belirlenmiştir [171].

Elektrospining yöntemi ile elde edilen PVA:MPI, PVA:NPI, zein:MPI ve zein:NPI nanolifleri içerisinde enkapsüle edilen ferulik asitin varlığı ve dağılımı, dijital floresan mikroskopu (Nicon- Ti Eclipse 2- DS Fi2 kamera) kullanılarak gözlemlenmiştir [171].

2.2.2.11.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Ferulik asit yüklü nanoliflerin termal karakterizasyonu TGA cihazı (Hitachi-High Tech STA-7300, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ hızda 600°C 'ye kadar ısıtılmıştır [132].

2.2.2.11.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Örneklerin yapısal özelliklerindeki değişim FTIR spektrometresi (Spectrum 400, PerkinElmer Instruments, Waltham, ABD) kullanılarak $450-4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında 100 cm^{-1} tarama hızıyla ölçülmüş ve 4 cm^{-1} çözünürlükte ATR ünitesi kullanılmıştır.

2.2.2.11.4. X-ışını Kırınım (XRD)

Nanoliflerin yapısal özellikleri XRD ile değerlendirilmiştir. Analiz $\text{CuK}\alpha$ radyasyonu ($\lambda=0,150595\text{ nm}$) kullanılarak 0.04° 'lik 2θ adımlarında ve 3 saniye'lik tarama zamanında difraktometre (D8 Advanced, Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir [238].

2.2.2.12. Antibakteriyel Aktivite

Nanoliflerin antibakteriyel aktivitesi *Escherichia coli* (*E. coli*) kullanılarak canlı hücre sayımı yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. 10^8 kob/mL mikroorganizma içerecek şekilde hazırlanan nutrient brothe solüsyonu içerisine 20 mg/mL nanolifler eklenip 24 saat 37°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda solüsyonlardan uygun seyreltmeler yapılmış ve 0.1 mL nutrient agar besiyerine yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 24 saat 37°C 'de bekletilen petri kaplarında oluşan koloni sayılarak kob/mL cinsinden hesaplama yapılmıştır. Sonuçlar, nanolif eklenmemiş olan kontrolün bakteri kolonilerinin sayısı ile karşılaştırılmıştır [133, 187].

2.2.2.13. Ferulik Asitin Salınım Kinetiğinin Farklı Ortamlarda Belirlenmesi

PVA:MPI, PVA:NPI, zein:MPI ve zein:NPI karışımlarından üretilen nanolifler içerisindeki ferulik asitin salınımı gıda benzeri iki farklı ortamda gerçekleştirilmiştir. Hidrofilik ortam için %10 etanol:su (v/v), hidrofobik ortam olarak %50 etanol:su kullanılmış nanolifler çözücü içerisinde 25°C 'de bekletilmiştir [188]. Ayrıca *in vitro* salınım 37°C 'de pH 7.4 olan fosfat tamponlu solüsyonunda gerçekleştirilmiştir [189]. Her üç ortam için 5 mg/mL nanolifler tartılıp 1, 2, 4, 6, 8, 24 ve 36. saatlerde örnek alınmıştır [190]. Ortama salınan ferulik asit konsantrasyonu 324 nm 'de absorbans ölçümü (UV1700 Pharmaspec, Shimadzu, Japonya) ile belirlenmiştir [134, 191]. Nanoliflerin

salınım kinetiği paket program (Statistica 12, TIBCO Software, ABD) kullanılarak, Fick difüzyon yasası, güç yasası ve Weibull modeline göre yorumlanmıştır [192].

$$\text{Fick difüzyon yasası; } \frac{Mt}{M_{\infty}} = 1 - \sum_1^{\infty} \frac{4}{r^2 \alpha_n^2} \exp(-D \alpha_n^2 t)$$

$$\text{Güç yasası; } \frac{Mt}{M_{\infty}} = kt^n$$

$$\text{Weibull modeli; } 1 - \exp(-a t^b)$$

2.2.2.14. İstatistiksel Analiz

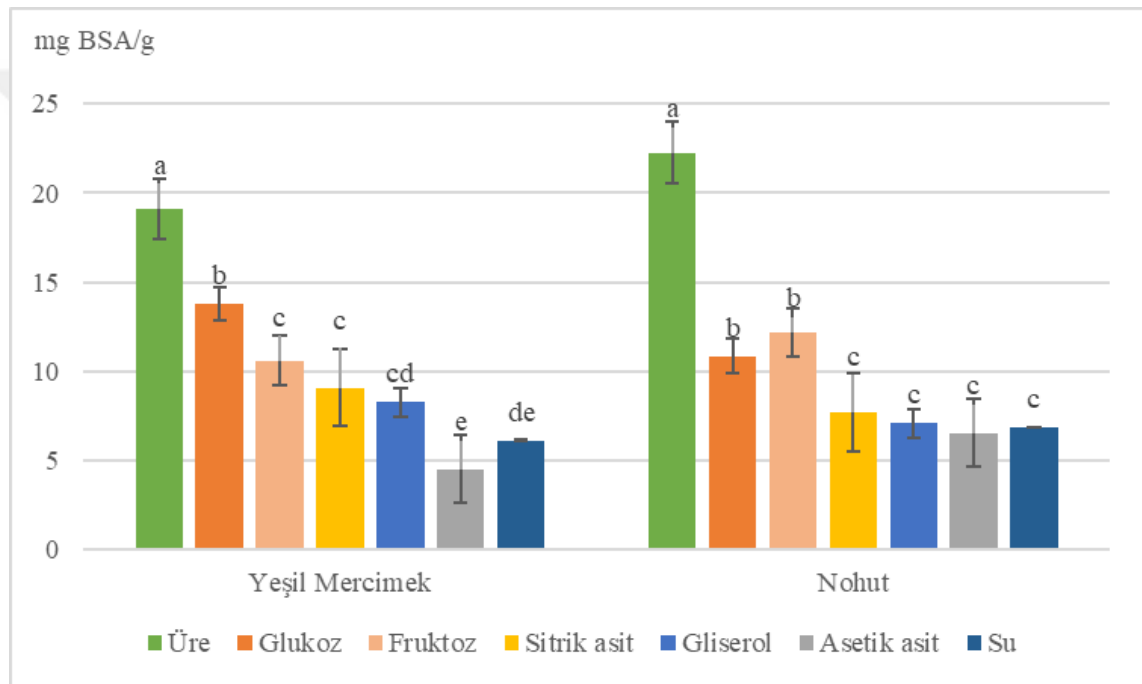
Tüm analizler iki tekrarlı ve üç paralel olarak yürütülmüştür. Paket program (Verison 17, Minitab Ltd., Coventry, UK) kullanılarak %95 güven aralığında ANOVA ve Tukey testleri aracılığıyla örnekler arasındaki istatistiksel ilişki incelenmiştir. Optimizasyon yönteminde ise Design Expert (Trial Version 7, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN) programı kullanılmıştır. Optimizasyon dizaynında beş merkez nokta seçilmiştir. Model yeterliliği, uyum eksikliği, ANOVA tarafından üretilen parametrelerin belirleme katsayısı (R^2) ve F testi ile değerlendirilmiştir.

2.3. Bulgular, Sonuç ve Tartışma

2.3.1. Ekstraksiyon için Uygun Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ)'nün Seçilmesi

Optimizasyonda kullanılacak çözügenin belirlenmesi için yapılan ön çalışmada 1:1:1 Molar oranında hidrojen alıcı:hidrojen verici:su karıştırılmıştır. Yine optimizasyonda kullanılan en düşük süre (3 dk.) ve en düşük ultrases gücü (%30) ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 2.4'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek protein veriminin hem yeşil mercimek hem de nohut örnekleri için ChCl:üre:su ile hazırlanan DÖÇ'lerden elde edildiği görülmektedir. Sonuçlar ChCl:üre:su (1:1:1) solüsyonu ile hazırlanan sırasıyla yeşil mercimek ve nohut ekstraktaları için 19,1 mg BSA/g ve 22,3 mg BSA/g olarak bulunmuştur. Nar kabuğundan protein eldesi için farklı DÖÇ'lerin kullanıldığı bir çalışmada en yüksek protein verimleri ChCl:asetik asit (15 mg/g) ve ChCl:üre (14 mg/g) ile hazırlanan DÖÇ'lerden elde edilmiştir [99]. Proteinin verimi, üründeki protein kalitesi ve konsantrasyonu ile birlikte bitkilerden protein

izolatlarının üretiminde en kritik parametrelerden biridir [158]. Yeşil mercimek için üre kullanılan ekstraksiyona en yakın sonuçlar hidrojen alıcısı olarak glukoz kullanılan DÖÇ ile elde edilirken nohutta fruktoz kullanılan DÖÇ'ten elde edilmiştir. En düşük ekstraksiyon verimi ise asetik asitin kullanıldığı DÖÇ ile yapılan ekstraksiyondan elde edildiği görülmektedir. Sadece su ile yapılan protein ekstraksiyonunda ise yeşil mercimek ve nohut için protein miktarları sırasıyla 6,13 mg BSA/g ve 6,85 mg BSA/g olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda her iki örnek için de optimizasyonda ChCl:üre:su ile hazırlanacak olan DÖÇ'ün kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 2.4. Farklı DÖÇ kullanımının protein verimine etkisi

2.3.2. Ultrases Destekli- Derin Ötektik Çözücü (US-DÖÇ) için RSM Optimizasyon

Bağımsız değişkenler olarak üre molar oranı (A), su molar oranı (B), ultrases gücü (% genlik) (C) ve uygulama süresi (D) kullanılarak optimum protein ekstraksiyon koşulları BBD'a göre üre molar oranı 1-2, su molar oranı 1-5, ultrases gücü %30-60, süre 3-15 dk. olarak belirlenmiştir. Tablo 2.2 kullanılan dizayn ve elde edilen protein ekstraksiyon miktarları mg BSA/g örnek olarak verilmiştir.

Yapılan ön çalışmalar ve literatür göz önüne alınarak seçilen DÖÇ ile ekstraksiyon çalışması yapılmıştır. ChCl molar oranı sabit tutulurken üre molar oranı 1-2 arasında

değiştirilerek dizayn oluşturulmuştur. Nar kabuğundan DÖÇ ile protein ekstraksiyon çalışmasında ekstraksiyon çözücü hazırlanırken ChCl molar oranı 1 alınmış asetik asit molar oranı ise 1-2 arasında değiştirilerek dizayn oluşturulmuştur [99]. Bira üretiminde kullanılan tahıllardan protein ekstraksiyonunda DÖÇ hazırlanırken hidrojen vericisi olarak kullanılan sodyum asetat, sodyum format, potasyum asetat molar oranları 1 alınırken hidrojen vericisi olarak kullanılan üre molar oranı 2 ve 3 alınarak çözücüler hazırlanmıştır [158]. Yapılan çalışmalara ve ön denemelere göre üre molar oranı 1-2 M arasında seçilmiştir.

Ultras ses gücü %30-60 arasında seçilmiştir. Artan ultras ses güç yoğunluğu, ekstraksiyon ortamı boyunca güçlü kavitasyonların oluşmasına neden olarak hücre duvarı bozulması, ara yüzey türbülansı, yerel enerji dağılımı ve gelişmiş çözünen difüzyonu gibi farklı fiziksel etkileri artırır. Ek olarak, güç yoğunluğundaki artış, DÖÇ de sıcaklık artışına neden olur, bu da DÖÇ' ün viskozitesini düşürmeye yardımcı olur ve hücre matrisine ulaşmasını kolaylaştırır [193]. Ancak daha uzun ve daha yüksek güç yoğunluğu ekstraksiyon ortamında ısı artışına neden olarak termal olarak duyarlı bileşenler için olumsuz bir ortam oluşmasına neden olur [194]. *Spirulina platensis* bitkisinden β -karoten ekstraksiyonunda ultras ses yoğunluğunun artmasıyla verimde azalma gözlemlenmiştir [195]. Mevcut çalışmada yapılan ön denemelerde %60 genlik üzerindeki uygulamalarda üründe aşırı ısınma ve yanmalar gözlenmiştir. Literatür ve ön çalışmalar göz önüne alınarak ultras ses gücü maksimum %60 olarak seçilmiştir.

Karboksilat:üre (1:2-1:3) ile hazırlana DÖÇ'ler ile yapılan protein ekstraksiyon çalışmasında DÖÇ'e yapılan ağırlıkça %10'luk su ilavesiyle, tahıllardan protein ekstraksiyonu için DÖÇ'lerin mükemmel çözücüler oldukları bildirilmiştir [158]. UD-DÖÇ ile kurkuminoid ekstraksiyonun yapıldığı çalışmada DÖÇ içerisine %5-40 arasında değişen oranlarda su eklenmiş %10 su içeriğinde kurkuminoid ekstraksiyonunda kayda değer bir artış olduğu bildirilmiştir. Ayrıca eklenen su ile DÖÇ viskozitesinde bir azalma sağlanmış ve sonuç olarak çözücünün hücre matrisine difüzyon hızını artırdığı, daha fazla su ilavesi ile ise verimin düştüğü bildirilmiştir. %20'de ekstraksiyonda hafif bir düşüş olsa da %30 ve %40 su ilavesinde kurkuminoidlerin ekstraksiyonunun büyük ölçüde azaldığı belirtilmiştir. DÖÇ ve hedef bileşik (kurkuminoidler) arasındaki hidrojen bağı etkileşiminin, fazla su ilavesinden etkileneceği ifade edilmiştir [196]. Ayrıca UD ile

yapılan ekstraksiyon çalışmalarında viskozitesi düşük çözücülerde daha büyük ve daha fazla kavitasyon oluşumu dolayısıyla daha verimli bir ekstraksiyon gerçekleştiği bildirilmiştir [197]. Mevcut çalışmada literatür göz önüne alınarak DÖÇ içerisine eklenecek su miktarı 5 M ile sınırlandırılmıştır.

Tablo 2.2. BBD

ChCl (M)	Üre (molar Oran)	H ₂ O (molar Oran)	Genlik (%)	Süre (dk)	Yeşil mercimek protein (mgBSA/g)	Nohut protein (mgBSA/g)
1	1,50	3,00	30,00	3,00	5,34	16,04
1	2,00	3,00	45,00	15,00	13,05	12,90
1	1,00	5,00	45,00	9,00	20,82	24,37
1	1,50	5,00	45,00	3,00	14,36	15,17
1	1,00	1,00	45,00	9,00	6,40	7,71
1	1,50	3,00	45,00	9,00	11,58	13,31
1	2,00	1,00	45,00	9,00	2,78	9,09
1	1,50	1,00	45,00	3,00	2,96	2,95
1	2,00	5,00	45,00	9,00	15,06	13,48
1	1,50	5,00	45,00	15,00	28,91	25,03
1	1,50	5,00	30,00	9,00	25,67	15,05
1	1,00	3,00	45,00	15,00	18,29	23,16
1	1,50	1,00	60,00	9,00	4,41	5,12
1	2,00	3,00	30,00	9,00	14,35	13,77
1	1,00	3,00	60,00	9,00	21,38	14,70
1	1,00	3,00	45,00	3,00	14,33	11,80
1	1,50	3,00	45,00	9,00	16,77	14,24
1	1,50	3,00	45,00	9,00	15,78	18,08
1	1,50	3,00	60,00	15,00	13,47	22,26
1	1,50	1,00	45,00	15,00	9,32	8,62
1	1,50	3,00	60,00	3,00	22,83	11,71
1	1,00	3,00	30,00	9,00	22,77	21,03
1	1,50	3,00	30,00	15,00	36,52	15,84
1	1,50	5,00	60,00	9,00	19,76	19,81
1	1,50	3,00	45,00	9,00	18,80	14,06
1	1,50	1,00	3000	9,00	3,47	7,35
1	1,50	3,00	45,00	9,00	11,91	17,14
1	2,00	3,00	45,00	3,00	9,24	14,17
1	2,00	3,00	60,00	9,00	9,91	12,97

ChCl: kolin klorür

Yeşil mercimekten proteinlerin ekstraksiyonunun optimizasyonunda dizayn kuadratik modelin kullanılmasını önermiştir. Benzer şekilde program nohut örneğinden protein ekstraksiyonunun optimizasyonunda yine kuadratik modelin kullanılabileceğini önermiştir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Uyum eksikliği testi

Kaynak	KT	sd	KTO	F değeri	p-değeri	
Yeşil mercimek						
Lineer	683,35	20	34,17	3,47	0,1179	
2 FI	240,49	14	17,18	1,74	0,3136	
Kuadratik	<u>82,50</u>	<u>10</u>	<u>8,25</u>	<u>0,84</u>	<u>0,6286</u>	Önerilen
Kubik	19,71	2	9,86	1,00	0,4443	
Saf hata	39,41	4	9,85			
Nohut						
Lineer	227,98	20	11,40	2,58	0,1855	
2 FI	97,33	14	6,95	1,57	0,3551	
Kuadratik	<u>35,91</u>	<u>10</u>	<u>3,59</u>	<u>0,81</u>	<u>0,6426</u>	Önerilen
Kubik	7,81	2	3,90	0,88	0,4815	
Saf hata	17,70	4	4,43			

KT: Kareler toplamı, sd:serbestlik derecesi, KTO: Kareler toplamının ortalaması,

Varyasyonu tamamen tahmin etmek için modellerin uygunluğunu gösteren uyumsuzluk testi modelin geçerliliğini doğrulamak için kullanılmaktadır [198]. Yeşil mercimek ve nohut örnekleri için protein ekstraksiyonunun optimizasyonunda model uyumsuzluğu testi $>0,05$ olarak bulunmuştur. Model uyumsuzluğu sırasıyla yeşil mercimek ve nohut örnekleri için 0,77 ve 0,81 olarak bulunmuştur. P değeri bağımsız değişkenlerin etkileşimini belirlemek için kullanılmıştır. Örnekler için uyumsuzluk değeri önemsiz model geçerliliği önemli bulunduğundan deneysel tasarım kabul edilmiştir. Örneklerin R^2 değerleri her ikisi içinde sırasıyla %94 ve %94 olarak bulunmuştur. BBD ile oluşturulan optimizasyon modelinin anlamlı ve kullanılabilir olduğu görülmektedir. Mevcut çalışmada uygulanan modelin güvenilirliği ve doğruluğu önemli derecede yüksektir. Örneklere ait ANOVA değerleri yeşil mercimek ve nohut için sırasıyla Tablo 2.4 ve Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Yeşil mercimekten protein ekstraksiyonuna ait ANOVA

	KT	sd	Ortalama	F
Model	32,31	14	2,31	16,52****
Ure Molar Oranı (A)	2,44	1	2,44	17,50***
H ₂ O Molar Oranı (B)	16,78	1	16,78	120,14****
Genlik (C)	0,10	1	0,10	0,69 ^{ns}
Süre (D)	3,64	1	3,64	26,07***
AB	8,080E-003	1	8,080E-003	0,058 ^{ns}
AC	0,060	1	0,06	0,43 ^{ns}
AD	1,624E-003	1	1,624E-003	0,012 ^{ns}
BC	0,19	1	0,19	1,32 ^{ns}
BD	0,02	1	0,02	0,12 ^{ns}
CD	5,86	1	5,86	41,93****
A ²	0,11	1	0,11	0,76 ^{ns}
B ²	2,19	1	2,19	15,70***
C ²	0,37	1	0,37	2,63 ^{ns}
D ²	0,06	1	0,06	0,40 ^{ns}
Artık	1,96	14	0,14	
Uyum Eksikliği	1,29	10	0,13	0,77 ^{ns}
Saf Hata	0,67	4	0,17	
Toplam	34,27	28		
	R ²	0,94		
	Düz R ²	0,86		
	Tah R ²	0,75		

(* P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001; ns P>0.05 istatistiksel olarak önemli değil).

KT: Kareler toplamı, sd:serbestlik derecesi

Tablo 2.5. Nohuttan protein ekstraksiyonuna ait ANOVA

	KT	sd	Ortalama	F
Model	791,55	14	56,54	14,77****
Ure Molar Oranı (A)	58,01	1	58,01	15,15**
H ₂ O Molar Oranı (B)	433,06	1	433,06	113,09****
Genlik (C)	0,53	1	0,53	0,14 ^{ns}
Süre (D)	107,87	1	107,87	28,17****
AB	37,64	1	37,64	9,83**
AC	7,66	1	7,66	2,00 ^{ns}
AD	39,87	1	39,87	10,41**
BC	12,22	1	12,22	3,19 ^{ns}
BD	4,39	1	4,39	1,15 ^{ns}
CD	28,87	1	28,87	7,54**
A ²	0,91	1	0,91	0,24 ^{ns}
B ²	50,95	1	50,95	13,31**
C ²	0,027	1	0,03	7,106E-003 ^{ns}
D ²	1,23	1	1,23	0,32 ^{ns}
Artık	53,61	14	3,83	
Uyum Eksikliği	35,91	10	3,59	0,81 ^{ns}
Saf Hata	17,70	4	4,43	
Toplam	845,16	28		
R ²	0,94			
Düz R ²	0,87			
Tah R ²	0,72			

(* P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001; ns P>0,05 istatistiksel olarak önemli değil).

KT: Kareler toplamı, sd:serbestlik derecesi

2.3.2.1. Modelin Geçerliliği

RSM’de uygulanan BBD’na göre seçilen uygun ekstraksiyon koşulları yeşil mercimek için ure molar oranı 1,13 M, su molar oranı 4,34 M, güç %34,07, süre 14,53 dk.’dır. Teorik olarak elde edilmesi gereken maksimum protein değeri dizayn tarafından 38,12 mg BSAE/g protein olarak öngörülmüştür (Tablo 2.6). Yapılan deneysel çalışmalarda optimum noktada üretim gerçekleştirilmiş ve protein içeriği 38,50 mg BSA/g olarak bulunmuştur. Görülmektedir ki teorik olarak öngörülen değer ile deneysel yöntemle elde edilen veri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur. Dolayısıyla model, yeşil mercimekten protein ekstraksiyonunu tahmin etmek için kabul edilebilir düzeyde ve güvenilirliktedir. Yeşil mercimek için kodlanmış faktörler açısından ikinci dereceden polinom denklemi aşağıda verilmiştir;

Denklem 2.1: $R1=14,97-3,30A+7,94B-1,36C+4,21D-0,54AB-0,76AC-0,040AD-1,71BC+2,05BD-10,14CD-1,25A^2-3,05B^2+2,69C^2+1,28D^2$

Tablo 2.6. Yeşil mercimek ekstraksiyon optimizasyon sonuçları

Üre molar oranı	Su molar oranı	Güç (%)	Süre (dk.)	Protein miktarı (mg BSA/g)	İstenilirlik
1,13	4,34	34,07	14,53	38,12	1,00
1,15	4,45	31,65	13,12	37,80	1,00
1,02	3,96	35,86	14,94	37,13	1,00
1,70	4,64	31,21	13,74	41,21	1,00
1,12	4,58	31,97	14,07	36,74	1,00

Nohut için elde edilen optimum ekstraksiyon koşulları üre molar oranı 1.08 M, su molar oranı 4,91 M, güç %59,14, süre 10,59 dk. olarak bulunmuştur. Model tarafından tahmin edilen protein miktarı 25,81 mg BSA/g'dır (Tablo 2.7). Deneysel olarak optimum noktada üretilen nohut ekstraktının protein değeri ise 25,83 mg BSA/g olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre tahmini veriyle deneysel veri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. Dolayısıyla model kabul edilebilir niteliktedir. Nohut için kodlanmış faktörlerin kuadratik denklemi aşağıda verilmiştir;

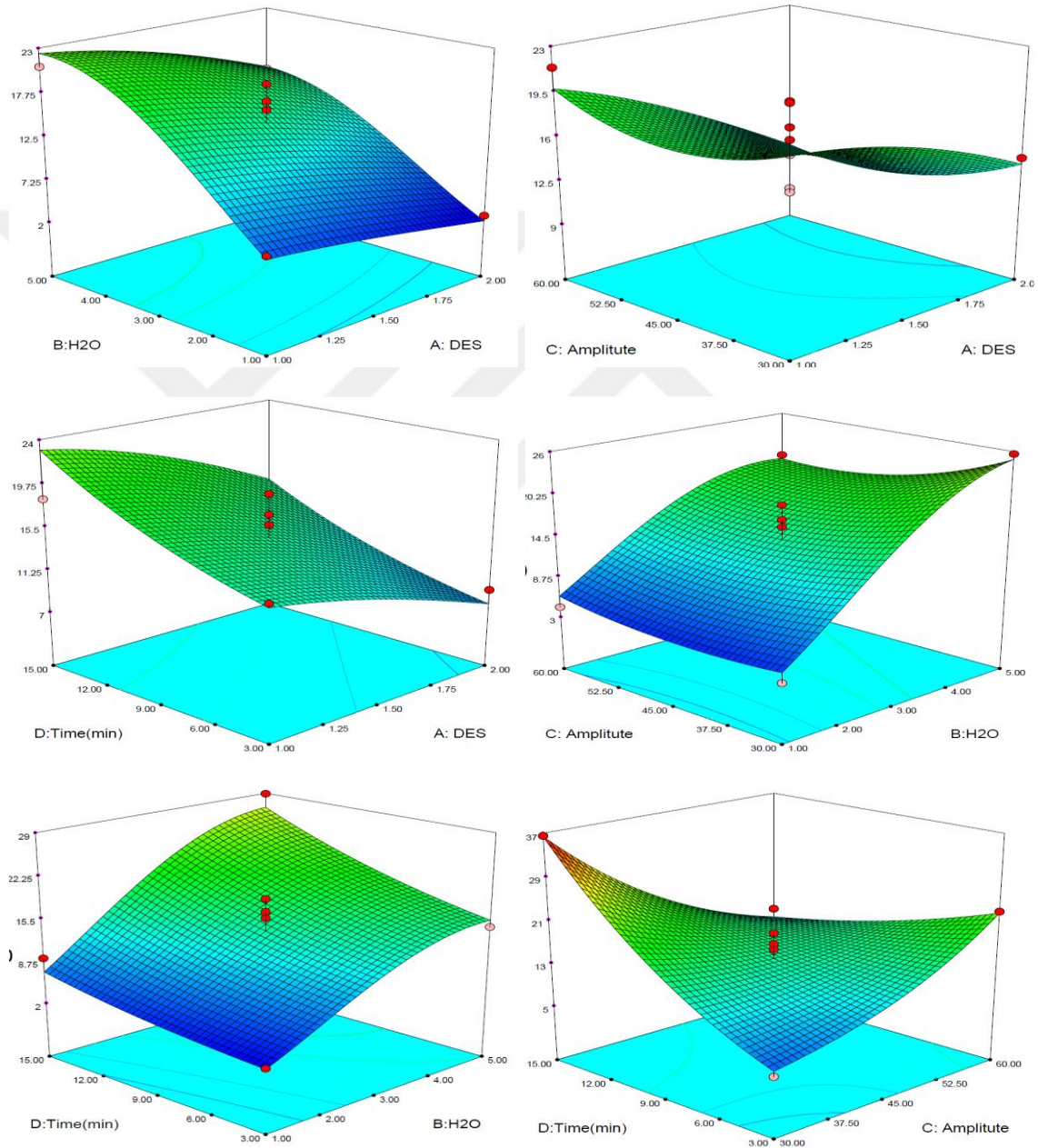
Denklem 2.2 $R2=15,37-2,20A+6,01B-0,21C+3,00D-3,07AB+1,38AC-3,16AD+1,75BC+1,05BD+2,69CD+0,37A^2-2,80B^2-0,065C^2+0,44D^2$

Tablo 2.7. Nohut ekstraksiyon optimizasyon sonuçları

Üre molar oranı	Su molar oranı	Güç (%)	Süre (dk.)	Protein miktarı (mg BSA/g)	İstenilirlik
1,08	4,91	59,14	10,59	25,81	1,00
1,18	4,66	44,09	12,64	25,21	1,00
1,31	4,94	55,25	13,76	2,02	1,00
1,07	4,75	33,33	13,68	26,70	1,00
1,06	3,65	58,92	14,76	27,97	1,00

Parametrelerin etkileşimi ve bağımsız değişkenlerin yanıt üzerindeki etkisi Şekil 2.5 ve Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Şekil 2.5 (a)' deki 3-D çizim, yeşil mercimek için artan su molar oranı ile protein ekstraksiyon veriminin arttığını üre molar oranında ise tem tersi bir sonucun olduğu görülmektedir. Şekil 2.5 (b) 3-D grafiği, genlik ve üre molar oranın

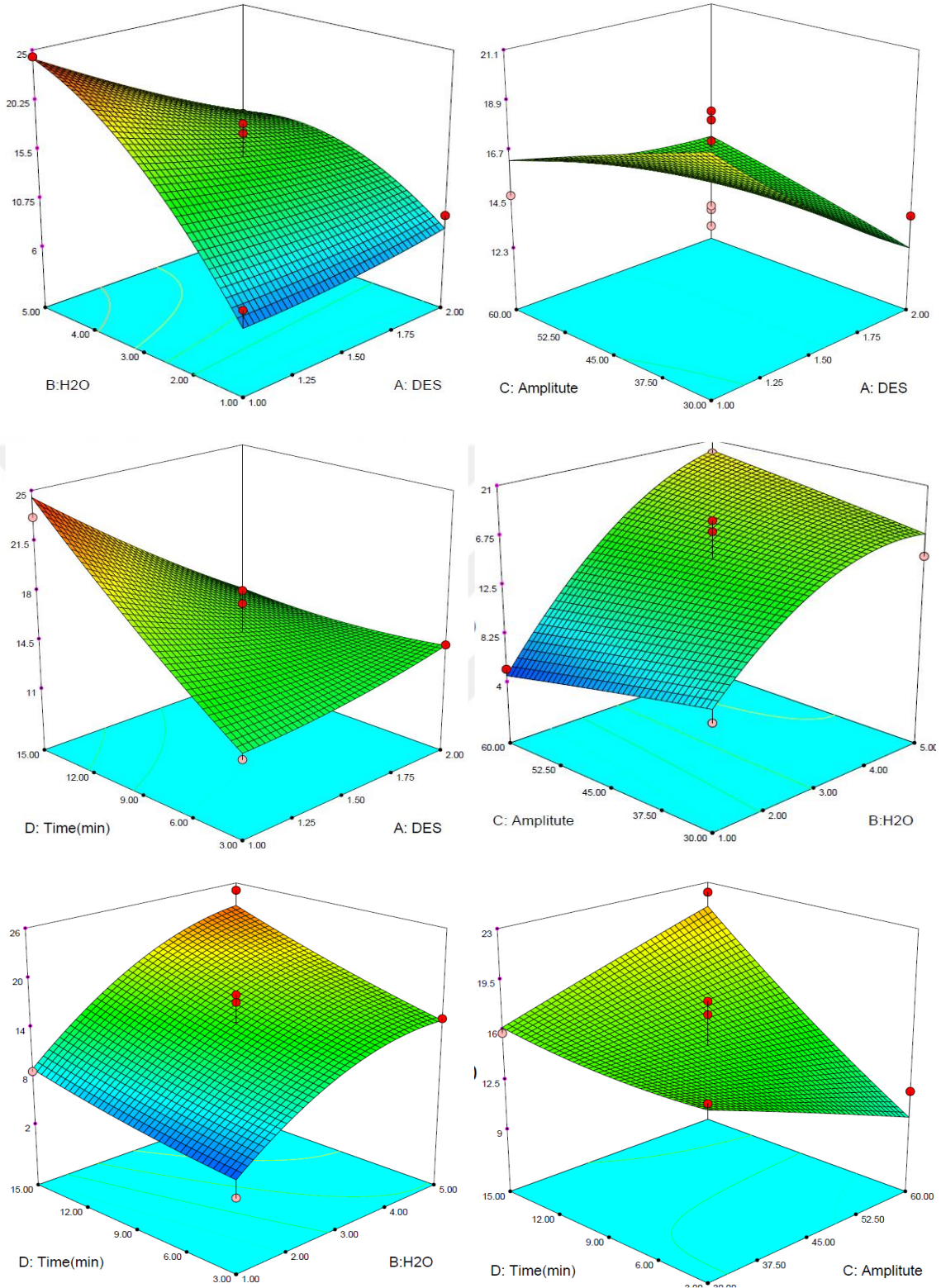
protein ekstraksiyonu üzerine etkisini göstermektedir. Şekil 2.5 (c) ise üre molar oranı azaldıkça ve süre atıkça cevap faktörünün de arttığı görülmektedir. Grafikler göstermektedir ki su molar oranının artışı ve üre molar oranının azalışı verim üzerinde olumlu etkiye sahiptir. Yeşil mercimekten protein eldesinde üre ve su molar oranı ve ultrases uygulama süresinin etkisinin önemli olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 2.5. Mercimek örneğine ait protein ekstraksiyonu bağımsız değişkenler arasındaki etkileşim grafikleri (A) üre (molar oranı); (B) H₂O (molar oranı); (C) genlik (%); (D) süre (dk.).

Şekil 2.6' daki 3D çizim, nohuttan protein eldesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin etkisini ve birbirleri ile etkileşimini göstermektedir. ANOVA sonuçlarına göre nohuttan protein ekstraksiyonunda yeşil mercimekte olduğu gibi ultrases genliği hariç diğer değişkenlerin ekstraksiyon üzerine etkisi önemli bulunmuştur (Tablo 2.4). Ayrıca verimin üre molar oranının artışı ile azalırken yeşil mercimekte olduğu gibi nohut örneğinde de su molar oranındaki artışın ekstraksiyon verimini arttırdığı saptanmıştır. Yüksek viskozite, numune ile ekstraksiyon fazı arasındaki kütle transferini sınırlaması DÖÇ'lerin analitik uygulamasındaki en büyük engellerden biridir. Ayrıca, hedef analitleri içeren ortaya çıkan viskoz faz, çoğu analitik cihazla uyumlu değildir. Su ilavesi, reaksiyon ortamının viskozitesinde bir azalmaya yol açarak kütle transferini artırır ve ekstraksiyon verimini artırır [199]. Su ilavesi viskozite, yoğunluk, iletkenlik gibi özellikleri etkilemenin yanı sıra DÖÇ' ün polaritesinde de bir değişikliğe yol açabilir, bu da ekstraksiyonda hedef bileşiklerin çözünme yeteneklerini önemli ölçüde etkileyebilir. DÖÇ ve analit arasındaki uyumlu polarite, DÖÇ içindeki çözünürlüklerini artırabilir ve böylece ekstraksiyon sürecini olumlu yönde değiştirebilir [200]. CHCl_3 :1,4-bütveiol ile de edilen DÖÇ içerisine su ilave edildiğinde ekstrakte edilen yulaf proteininin en yüksek protein içeriğine, çözünürlüğe, köpürme kapasitesine ve stabilizeye sahip olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada farklı DÖÇ:su ikili karışımlarının, proteinleri ekstrakte etmek için değişken özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir [201]. Yapılan bir çalışmada ise suyun CHCl_3 ile hidrojen bağına arttırmak için bir yardımcı çözücü olarak hizmet ederek DÖÇ'lerin sentezini kolaylaştırabileceği bildirilmiştir [202].

Ultrases uygulama süresindeki artışında verimi arttırdığı görülmüştür. Yapılan bir UD-DÖÇ protein ekstraksiyon çalışmasında artan hidrojen vericisi oranının verimi olumsuz etkilerken artan ultrases uygulama süresinin ekstraksiyon verimini olumlu etkilediği bildirilmiştir [99].



Şekil 2.6. Nohut örneğine ait protein ekstraksiyonu bağımsız değişkenler arasındaki etkileşim grafikleri (A) üre (molar oranı); (B) H₂O (molar oranı); (C) genlik (%); (D) süre (dk.).

2.3.3. Optimum Nokta Ekstraktların Ultrases Destekli Derin Ötektik Çözücü (UD-DÖÇ) Klasik- Derin Ötektik Çözücü (K-DÖÇ) ve Klasik-Su Ekstraktları (K) ile Karşılaştırılması

UD-DÖÇ'ün etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla, yeşil mercimek ve nohut örneklerinden klasik DÖÇ (K-DÖÇ) ve klasik su ekstraksiyonu (K-su) ile elde edilen ekstraktların karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen ekstraktların protein içeriği Bradford yöntemine göre değerlendirilmiştir. Yapılan analiz sonucu ekstraktların protein içerikleri yeşil mercimek örneğinde M-UD-DÖÇ, M-K-DÖÇ ve M-K-su için sırasıyla $38,50 \pm 2,1$ mg BSA/g, $20,61 \pm 0,8$ mg BSA/g ve $16,05 \pm 1,4$ mg BSA/g olarak bulunmuştur. Nohut örneğinde ise N-UD-DÖÇ, N-K-DÖÇ ve N-K-su için sırasıyla $25,84 \pm 0,4$ mg BSA/g, $18,14 \pm 0,5$ mg BSA/g ve $11,65 \pm 1,0$ mg BSA/g olarak bulunmuştur (Şekil 2.7). UD-DÖÇ ile elde edilen ekstraktların protein içerikleri diğer ekstraktlara göre oldukça yüksektir.

Ultrases desteğinin DÖÇ'ün katı hücre matrisine daha fazla nüfuz etmesini teşvik ederek ekstraksiyon ortamında istenen bileşiğin kütle transferini geliştirdiği bilinmektedir [194]. Yapılan bir çalışmada UD ile fasulyeden protein ekstraksiyon veriminin arttığı ve ultrasesin proteinlerin yapısal ve antioksidan özelliklerini değiştirdiği bildirilmiştir [203].

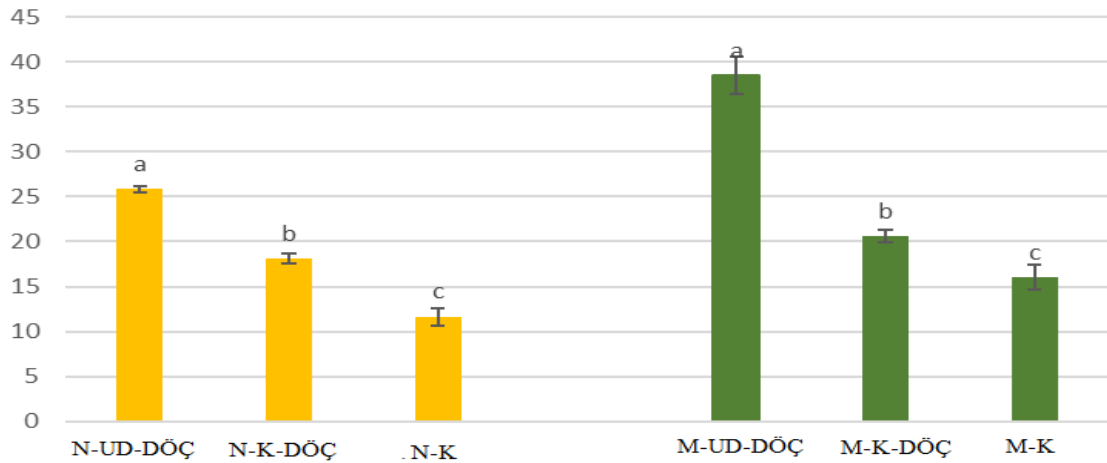
Başka bir çalışmada steviol glikozitlerin UD-DÖÇ ekstraksiyonu geleneksel su ekstraksiyonu ile karşılaştırılmıştır. Sonikasyonun ekstraksiyon işlemi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla aynı sıcaklıkta ve aynı miktarda su kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 10 dk.'lık ultrases uygulamasından $14,21 \pm 0,21$ mg/g steviosid ve $21,4 \pm 1,3$ mg/g rebaudiosit A elde edilirken, bu değerler geleneksel ekstraksiyonda ancak 70 dk.'lık uygulama elde edilebilmiştir ($15,6 \pm 0,7$ mg/g steviosid ve $20,1 \pm 0,7$ mg/g rebaudiosit A) [204].

UD-DÖÇ ile polisakkarit ekstraksiyonunun optimize edildiği bir çalışmada optimum ekstraksiyon koşullarında UD-DÖÇ ile sıcak su ekstraksiyonu ve su-UD ekstraksiyonundan daha yüksek ekstraksiyon verimi sağlanabileceği bildirilmiştir [205]. Literatürde UD ile ekstraksiyon veriminde ciddi artışlar olduğu görülmektedir. Mevcut çalışmada DÖÇ kullanılarak hem UD hem klasik (K) ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Klasik ekstraksiyon 2 saat olarak uygulanırken UD mercimek örneği için 14,53 dk. ve

nohut için 10,59 dk. olarak uygulanmıştır. Zaman farkına rağmen mercimek örneğinde UD-DÖÇ ile K-DÖÇ arasında 1,87 kat ve nohut örneğinde 1,42 kat fark vardır.

UD-DÖÇ ekstraksiyonunun Soxhlet, geleneksel su ekstraksiyonu yöntemi ile karşılaştırıldığı çalışmada UD-DÖÇ ile kurkuminoid veriminde (77,13 mg/g) önemli bir artış ve 75 dk.'dan 20 dk.'ya kadar sürede ciddi bir azalma bildirilmiştir Soxhlet ekstraksiyonu ile 12 saatte 88,96 mg/g ekstraksiyon verimi elde edildiği bildirilmiştir [196]. DÖÇ'lerin doğası gereği daha viskoz olmalarına ve DÖÇ bazlı ekstraksiyon, geleneksel su ekstraksiyon yöntemine kıyasla daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmesine rağmen, verimde artış ve ekstraksiyon süresinde önemli bir azalma bildirilmiştir. Bu durum kurkuminoidlerin DÖÇ içinde etanolden daha yüksek çözünürlüğe sahip olmasına atfedilmiştir. Mevcut çalışmada da DÖÇ kullanılan ekstraktların su ile elde edilen ekstraktlardan daha yüksek bir verime sahip olduğu görülmektedir. Bu durum benzer şekilde protein çözünürlüğünün DÖÇ içerisinde daha yüksek oluşuna atfedilebilir.

mg BSA/g



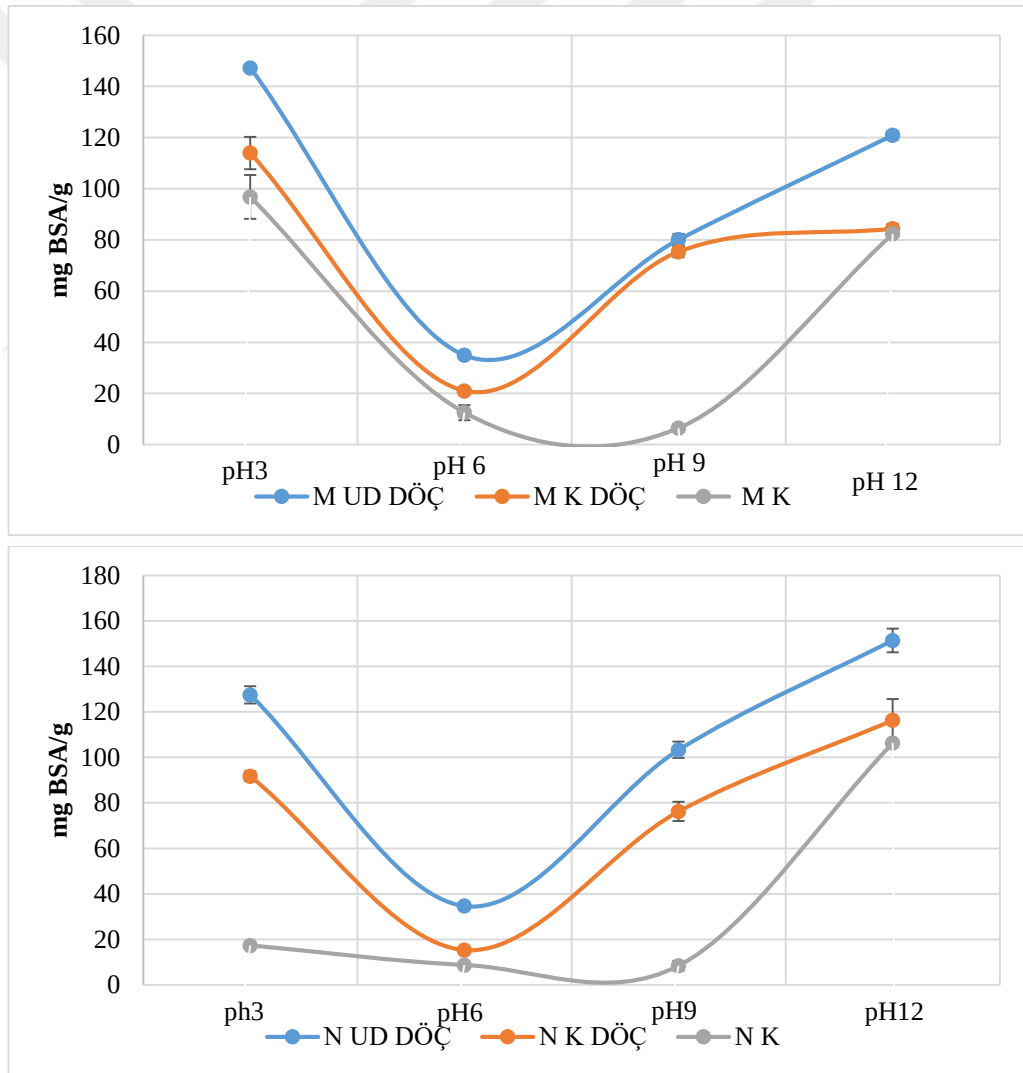
M: mercimek; N: nohut; UD: ultrases destekli; DÖÇ: derin ötektik çözücü; K: Klsaik ekstraksiyon; BSA:Bovin serum albumin.

Şekil 2.7. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin protein verimine etkisi

Protein ekstraksiyonundaki verimin yanı sıra protein çözünürlükleri de incelenmiştir. Ayrıca elde edilen protein izolatlarının TPC, DPPH radikal süpürücü aktivite ve Fe-şelatlama aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki, UD-DÖÇ yöntemi ile sadece protein veriminde değil antioksidan özelliklerde de bir artış elde edildiğini göstermektedir.

2.3.3.1. Protein Çözünürlüğü

Mevcut çalışmada DÖÇ ile elde edilen protein ekstraktların çözünürlükleri farklı pH'larda değerlendirilmiştir. MPI ve NPI'ları için en yüksek çözünürlüklerin UD-DÖÇ ekstraktlarında olduğu Şekil 2.8'de görülmektedir. Protein çözünürlüğü pH'a bağlıdır. Proteinler net yük eksikliği ve itici kuvvetler nedeniyle izoelektrik noktaya yakın bir yerde minimum çözünürlüğe sahipken çekici kuvvetler baskındır, bu nedenle protein çözünürlüğü azalır [206]. Test edilen tüm pH değerlerinde protein çözünürlüğü UD-DÖÇ ile elde edilen ekstraktlarda önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. UD alkali yöntemi ile elde edilen bezelye protein izolatlarının artan çözünürlük dâhil olmak üzere fonksiyonel özelliklerinde önemli gelişmeler olduğu bildirilmiştir [207].



M: mercimek; N: nohut; UD: ultrases destekli; DÖÇ: derin ötektik çözücü; K:Klasik ekstraksiyon

Şekil 2.8. Protein izolatlarının farklı pH değerlerinde çözünürlükleri

2.3.3.2. Antioksidan Özellikler

Antioksidan özellikler incelendiğinde yine en yüksek değerlerin UD-DÖÇ ile elde edilen protein ekstraktlarında olduğu görülmektedir. Nar kabuğundan protein eldesi çalışmasında basınçlı çözücü ekstraksiyonunda daha yüksek düzeyde antioksidan ve hipokolesterolemik protein ekstraktları ve hidrolizatları elde edilirken, UD-DÖÇ kullanılarak ekstrakte edilen proteinlerden elde edilen hidrolizatlarda daha yüksek antihipertansif kapasite gözlemlendiğini bildirilmiştir [99].

2.3.3.3. Mercimek Protein İzolatı (MPI) Antioksidan Özellikleri

Mercimek proteinleri antioksidan özelliklere sahip olup ayrıca fenolik bileşikler, antioksidan, anti-inflamatuar ve kardiyovasküler hastalıkları önleyici gibi biyolojik aktiviteler sergiler [208]. MPI antioksidan donörler olarak hareket edebilen kovalent veya kovalent olmayan bağlı fenolik bileşiklere sahiptir [208].

UD-DÖÇ, K-DÖÇ ve K-su ekstraksiyon yöntemleri ile protein izolatları üretilmiş ve izolatların TPC, DPPH radikal süpürücü aktiviteleri ve Fe-şelatlama aktiviteleri karşılaştırılmıştır. En yüksek değerler UD-DÖÇ ekstraksiyonu ile elde edilen izolatlara aittir (Şekil 2.9).

Protein izolatların TPC değerleri sırasıyla M-UD-DÖÇ, M-K-DÖÇ ve M-K-su için $8,26 \pm 0,6$ mg GAE/g, $4,76 \pm 0,3$ mg GAE/g ve $3,49 \pm 0,7$ mg GAE/g olarak belirlenmiştir (Şekil 2.9-a). UD-DÖÇ ile elde edilen izolatların geleneksel yöntemle elde edilen izolatlardan oldukça yüksek bir TPC değerine sahip olduğu görülmektedir. Bu durum ultrasesin oluşturduğu kavitasyonların sayesinde ekstraksiyon çözücüsünün örneğin içine nüfuz etmesini arttırmasına atfedilebilir [193]. Alkali çöktürme yöntemi ile elde edilen MPI'na ait TPC değerini $1,71$ mg GAE/g olarak bildirilmiştir [209]. Mevcut çalışmada proteinin çöktürülmesi öncesinde uygulanan ekstraksiyon yönteminden elde edilen ekstrakt verimini ve antioksidan özellikleri arttırdığı görülmektedir.

MPI'a ait DPPH radikal süpürücü aktivite 10 mg/mL konsantrasyondaki UD-DÖÇ, K-DÖÇ ve M-K-su örnekleri için sırasıyla %24,70, %12,80 ve %7,3'tür (Şekil 2.9-b). Alkali çöktürme yöntemi ile elde edilen yeşil mercimek protein izolatlarının DPPH radikal

süpürücü aktivitesi %41,5 olarak bulunmuştur [209] . Protein izolatlarının antioksidan özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada, kırmızı ve yeşil mercimek için DPPH radikal süpürücü aktiviteyi sırasıyla %16,1 ve %34,7 olarak bildirilmiştir [210].

UD-DÖÇ, K-DÖÇ ve K-su ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen MPI'larının Fe-şelatlama aktiviteleri sırasıyla $22,96 \pm 0,9$ μM EDTA E/g, $13,05 \pm 0,4$ μM EDTA E/g ve $5,95 \pm 0,4$ μM EDTA E/g olarak bulunmuştur (Şekil 2.9-c). Fe-şelatlama aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, kırmızı ve yeşil mercimeklerin Fe-şelatlama aktivitesi 3,49 ve 13,70 mg asetik asit eşdeğeri/mg örnek olarak bulunmuştur [210]. Bir diğer çalışmada mercimek proteinlerinin Fe-şelatlama aktivitesi 62 μM EDTA E/mg olarak bildirilmiştir [211].

Mercimek ekstraktlarının bezelye, nohut ve soya fasulyesi gibi diğer baklagillerden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği ifade edilmiştir [212]. Mercimek ve nohut örneklerinden farklı ekstraksiyon yöntemleri elde edilen protein izolatlarının karşılaştırıldığı mevcut çalışmada aynı yöntemlerle elde edilen MPI örneklerinin, NPI örneklerinden daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmektedir (Şekil 2.9).

2.3.3.4. Nohut Protein İzolatı (NPI) Antioksidan Özellikleri

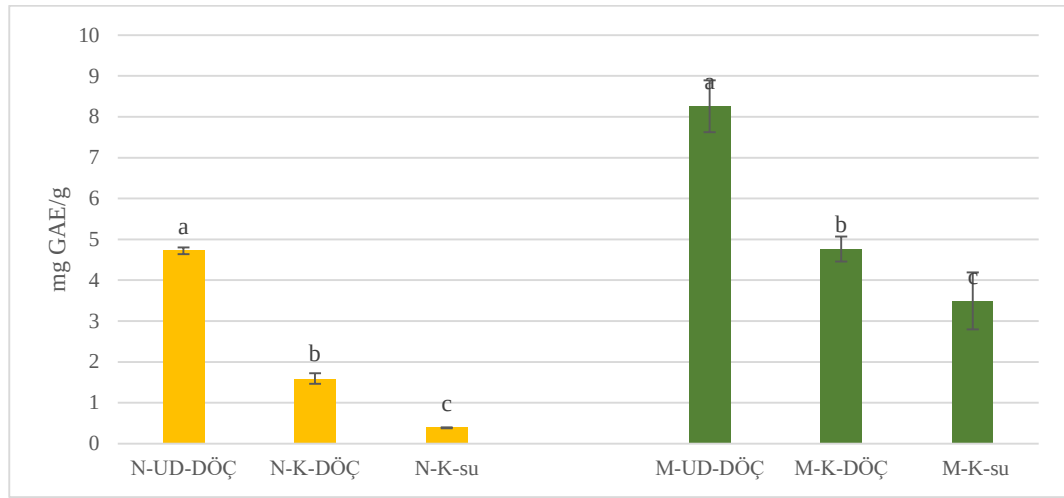
MPI'da olduğu gibi nohut örneğinden elde edilen UD-DÖÇ izolatları antioksidan özellikleri TPC, DPPH radikal süpürücü aktivite ve Fe-şelatlama aktivitesi testleri gerçekleştirilerek UD-DÖÇ, K-DÖÇ ve K-su ekstraksiyon sonucu elde edilen PI'ları ile kıyaslanmıştır. Genel olarak bakıldığında UD ekstraktlarından elde edilen PI'ların üstün bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmektedir. Tüm analizler için en yüksek değer UD-DÖÇ ile elde edilirken en düşük değerler K-su ekstraksiyon izolatlarından elde edilmiştir. Uygulama süresi göz önüne alındığında kısa sürede daha yüksek kalite ve verimde örnek üretilebildiği görülmektedir (Şekil 2.9).

Mevcut çalışmada NPI örneklerini TPC değerleri N-UD-DÖÇ, N-K-DÖÇ ve N-K-su için sırasıyla $4,72 \pm 0,10$ mg GAE/g, $1,59 \pm 0,10$ mg GAE/g, $0,39 \pm 0,00$ mg GAE/g olarak bulunmuştur (Şekil 2.9-a). Yapılan bir çalışmada farklı tür NPI'lara ait TPC değerleri 1,22 ve 0,74 mg /g olarak bildirilmiştir [213]. Mevcut çalışmada DÖÇ ile elde edilen

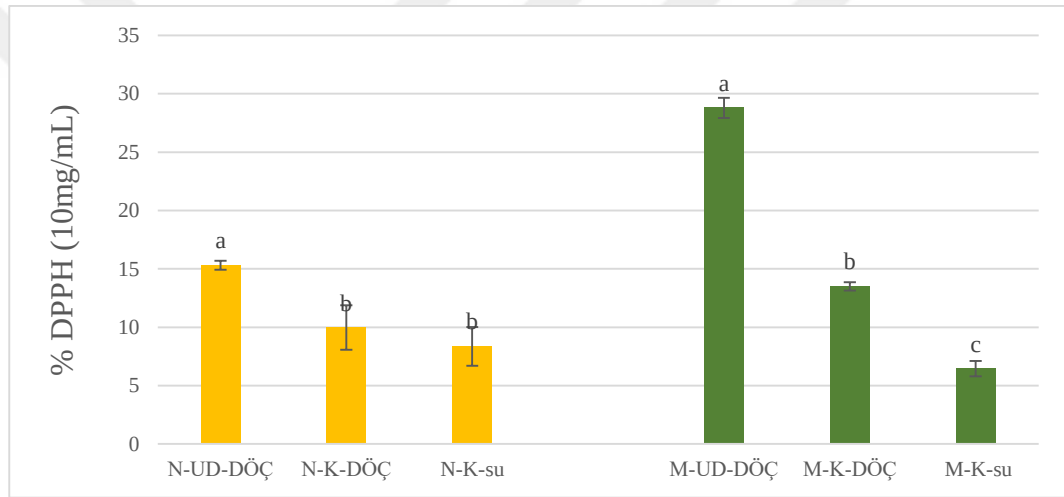
protein izolatlarının TPC değerlerinin K ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen proteinlerden yüksek olduğu görülmüştür.

DPPH süpürücü aktivite değerleri 10 mg/mL NPI örnek için UD-DÖÇ, K-DÖÇ ve K-su için sırasıyla %15,31, %9,97 ve %8,36 olarak bulunmuştur (Şekil 2.9-b). Alkali çöktürme yöntemi ile elde edilen protein izolatlarının DPPH süpürücü aktivite değeri %8,5 [206] yeşil, kahverengi ve beyaz nohutlardan elde edilen protein izolatlarının DPPH süpürücü aktivitesi sırasıyla %12,3, %14,6 ve %11,3 olarak bulunmuştur [210]. K ekstraksiyon sonrası izoelektrik noktada çöktürme yöntemi ile elde edilen protein izolatlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesini 10 mg/mL konsantrasyonlu örnek için yaklaşık %30 olarak bildirilmiştir [214].

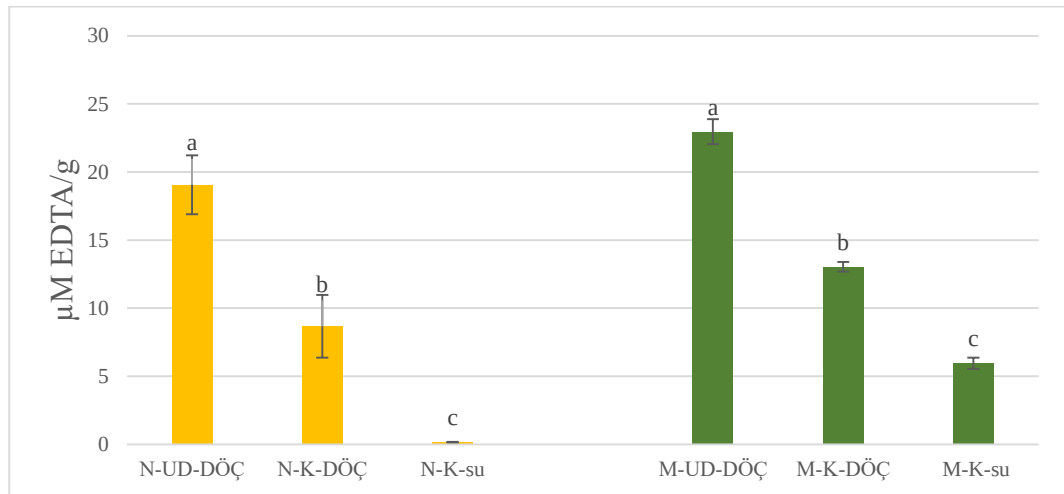
Nohuttan farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen izolatların Fe-şelatlama aktivitesi N-UD-DÖÇ, N-K-DÖÇ ve N-K-su için sırasıyla $19,06 \pm 2,2$ μM EDTA E/g, $8,66 \pm 2,3$ μM EDTA E/g ve $0,14 \pm 0,0$ μM EDTA E/g olarak bulunmuştur. Diğer bir çalışma Fe-şelatlama aktivitesini nohut protein izolatları için 156 μM EDTA E/mg ve nohut proteini hidrolizatları için 122 μM EDTA E/mg olarak bildirmiştir [215]. Yeşil, kahverengi ve beyaz nohutlardan alkali ekstraksiyon/çöktürme yöntemi ile elde edilen protein izolatlarının Fe-şelatlama aktivitesi 8,89, 7,16 ve 233 mg AAE/mg olarak bulunmuştur [210].



(a)



(b)



(c)

M: mercimek; N: nohut; UD: ultrases destekli; DÖÇ: derin ötektik çözücü; K:Klasik ekstraksiyon; GAE: gallik asit eşdeğeri; EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit.

Şekil 2.9. Protein izolatlarının antioksidan özellikleri

2.3.3.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Ekstraktların ikincil yapılarındaki değişim izolatların FTIR spektroskopileri alınarak gözlenmiştir. FTIR spektrumunda 1653 cm^{-1} 'pik veren bileşen Amid I iken 1550 cm^{-1} 'de pik veren Amid II'yi ifade etmektedir. Ancak proteinlerin ikincil yapısını değerlendirmek için 1700 ile 1600 cm^{-1} arasında oluşan absorpsiyonlar dikkate alınarak Amid I'e göre yorumlamak en yararlı olanıdır. Proteinler genellikle farklı konformasyonlarda polipeptit α -sarmalları, β -yaprakları, β -dönüşleri ve rastgele yapıları içeren kompleks bir yapıdır [216].

Protein ikincil yapısı ve amid I- amid II dalga sayısı 1690 cm^{-1} ile 1530 cm^{-1} arasındadır [216]. α -sarmal yapı amid I'de $1655\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ amid II'de ise 1540 cm^{-1} 'de pik verir. Amid I'de ~ 1690 , $1680\sim 1675$, ~ 1640 , $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ 'lerde amid II'de $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$ 'lerde β -yaprak yapı görülür. β -dönüş (β -turn) amid I'de ~ 1680 , ~ 1660 , $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ ' de ve toplanmış β -yaprak yapı amid I'de 1620 cm^{-1} 'de görülür [216].

Protein izolatlarının ikincil yapı bileşenlerinin ekstraksiyon yönteminden nasıl etkilendiğini belirlemek için eğri uydurma analizi $1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde uygulanmıştır. Buna göre yaklaşık 1620 cm^{-1} 'deki pik β -yaprak yapıyı, 1680 cm^{-1} 'deki β -dönüş ve 1540 cm^{-1} 'deki α -sarmal yapıyı ifade eden pikler olarak kullanılmıştır. Genel olarak, FTIR ile α -sarmal, β -yaprak ve β -dönüşü olmak üzere proteinlerin üç tip ikincil yapıyı çözebildiği bildirilmiştir [217]. Eğri uydurma yöntemi ile elde edilen bantların alanlarına göre % dağılımı belirlenmiştir (Tablo 2.8). Buna göre mercimek örneklerinde çözücü olarak DÖÇ kullanıldığında β -dönüş yapının miktarının arttığı α -sarmal yapının miktarının ise azaldığı görülmüştür. Nohut örneğinde de benzer şekilde α -sarmal yapı azalırken β -dönüş tabakalarında bir miktar artış gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada DÖÇ ile ekstrakte edilmiş yulaf proteinlerinin FTIR spektrumu incelendiğinde ikincil yapının oranlarının değiştiği bildirilmiştir. ChCl ve 1,2-bütandiol ve 1,4-bütandiol bazlı DÖÇ ile ekstrakte edilen yulaf proteinlerindeki α sarmalının oranı aynıken, 2,3-bütveiolde α sarmalının içeriğini önemli ölçüde arttığı ve ters orantılı şekilde β içeriğinin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca DÖÇ:su karışımların ekstraksiyonda kullanımında ikincil yapıda farklı etkilere sahip olabileceği belirtilmiştir. DÖÇ'e su ilavesinin α - sarmal yapıyı azalttığı belirtilmiştir [201]. Mevcut çalışmada ChCl:üre:su bazlı DÖÇ ile ekstraksiyon yapılmıştır ve α -sarmal yapıların azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca α -sarmal yapının

miktarının azalması ve β -dönüş yapının miktarının artması proteinlerin denatürasyonunu gösterebileceği bilinmektedir [218]. UD ekstraksiyonda meydana gelen kavitasyonlar ve ısı denatürasyona sebep olabilse de K-DÖÇ ile yapılan işlemde böyle bir etken yoktur. UD-DÖÇ ve K-DÖÇ ile elde edilen protein izolatlarında kontrole göre hemen hemen aynı değişimler gözlenmiştir. Bu sebeple ikincil yapıda meydana gelen değişimlerin kullanılan çözücü kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Tablo 2.8. FTIR spektrumu ile hesaplanan proteinlerin ikincil yapıları (%)

Örnek	α -sarmal	β -yaprak	β -dönüş
M-UD-DÖÇ	14,64	59,20	26,16
M-K-DÖÇ	15,65	56,75	27,60
M-K-su	34,02	57,23	8,75
N-UD-DÖÇ	19,83	62,58	17,59
N-K-DÖÇ	24,73	63,58	11,69
N-K-su	39,54	50,04	10,42

M: mercimek; N: nohut; UD: ultrases destekli; DÖÇ: derin ötektik çözücü; K: klasik ekstraksiyon

2.3.4. Elektrospining

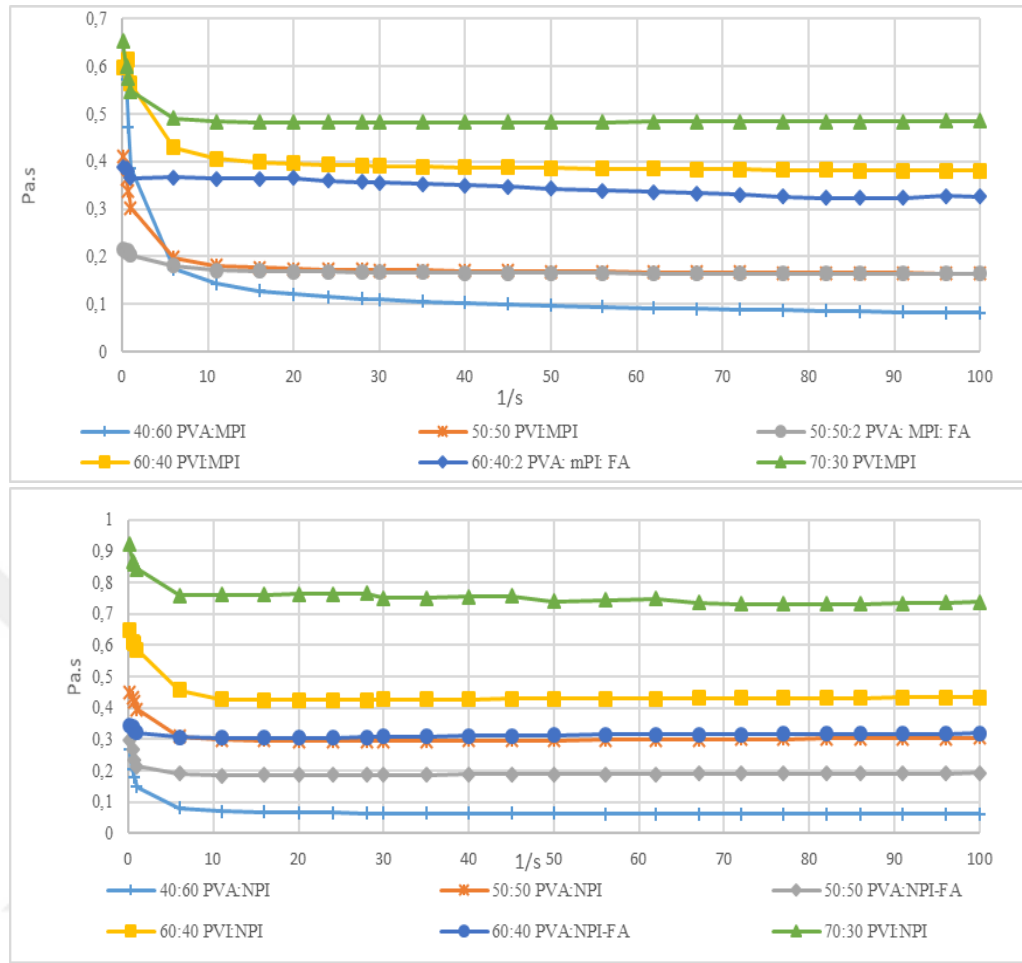
2.3.4.1. Polivinil Alkol: Protein İzolatı (PVA: PI) ve Zein: Protein İzolatı (PI) Çözeltilerinin Reolojik Özellikleri ve Elektriksel İletkenlikleri

Hem PVA hem zein polimerlerinin kullanıldığı çözeltilerde protein miktarı arttıkça elektriksel iletkenlik de artmıştır (Tablo 2.9 ve Tablo 2.10). Ferulik asit eklenen örnek çözeltilerinin elektriksel iletkenliğinde aynı oran protein içeren çözeltilere göre bir miktar azalma gözlenmiştir. Fasulye protein izolatları ve PVA ile nanolif üretiminin yapıldığı bir çalışmada mevcut çalışmaya benzer şekilde protein konsantrasyonu arttıkça iletkenliğin arttığı, PVA solüsyonuna kıyasla elektriksel iletkenliği 10 kat daha yüksek olan fasulye PI'nın elektrik iletkenliğini yükselttiği belirtilmiştir [132]. Bir diğer çalışmada ayçiçeği PI'nın PVA içindeki oranı arttıkça iletkenliğin arttığını bildirilmiştir [219]. Mevcut çalışmada nanolif üretiminde kullanılan PI solüsyonlarından MPI'nın elektrik iletkenliğinin PVA polimerinin yaklaşık 20 katı, NPI'nın iletkenliği ise yaklaşık 14 katıdır. Dolayısıyla PI miktarı arttıkça iletkenlikte artmıştır.

Hem reolojik özellikler hem de elde edilen elektriksel iletkenlik verileri nanoliflerin morfolojik özellikleri arasındaki farkı göstermektedir. Elektrospiningde, çözeltideki yüklü iyonlar jet oluşumunu etkilediğinden, çözeltinin elektriksel iletkenliği önemli bir

parametredir [133]. Çözeltinin yük yoğunluğu artırılarak daha düzgün nanolifler elde edilebileceği bildirilmiştir [220].

Reoloji, kesme hızı ile kesme gerilimi arasında ilişki kurar. Bu ilişki lineer olduğunda, akışkan Newton'dur ve viskozite sabittir. Yani viskozite uygulanan kesme hızından veya streten bağımsızdır [221]. Elektrosinningde kullanılmak üzere hazırlanan polimerik çözeltilerin hepsi Newtonian akış davranışı göstermişlerdir. Viskozite, elektrosinningde Taylor koni oluşumunun stabilitesini yönetir. Yüzey gerilimi ve viskoz kuvvetler kararsız bir jet oluşturduğunda ve sıvı özellikleri kılcal parçalanmaya yol açtığında boncuklu yapı oluşur [222]. Daha yüksek bir viskozitede, polimerlerin kohezif yapısından dolayı jet stabilitesini arttırdığından, jetler çoğunlukla boncuk içermeyen pürüzsüz nanolifler üretir [223]. Hazırlanan solüsyonların reolojik özellikleri incelendiğinde en yüksek viskoziteye %30 konsantrasyonda hazırlanan PVA solüsyonun sahip olduğu ve PVA:PI karışımında protein oranı arttıkça viskozitenin düştüğü görülmektedir. PVA:PI için hem yeşil mercimek hem de nohut örneğinde viskozitesi 0.1 Pa.s altına düşen 40:60 PVA:PI konsantrasyonlarında nanolif üretilmemiştir. Artan PVA oranı ile k ve n_{50} değerlerinin arttığı görülmektedir (Tablo 2.9). Bir boyutlu Newtonian akışkanlar için kayma gerilmesi ile viskozite arasında doğrusal bir bağıntı vardır [133]. Bezelye PI kullandıkları çalışmada %50'den %80'e doğru artan PVA oranı ile birlikte viskozitenin arttığı bildirilmiştir [223]. Artan PVA oranı ve azalan protein oranı ile birlikte elektriksel iletkenlikte düşüş gözlenmiştir (Tablo 2.9). Benzer şekilde 30g/L konsantrasyonda hazırlanan zeinin en yüksek viskoziteye sahip olduğu ve eklenen protein konsantrasyonu arttıkça viskozitenin düştüğü görülmüştür (Şekil 2.10). Zeinin polimer olarak kullanıldığı solüsyonlarda viskozitenin çok düşük olduğu 70:30 zein:PI karışımından nanolif elde edilememiştir. Zein ile hazırlanan solüsyonlar içinde karışımdaki artan zein oranı ile birlikte k ve n_{50} değerlerinin arttığı buna karşın elektriksel iletkenliğin azalan protein oranı ile birlikte azaldığı Tablo 2.11'de görülmektedir. Seçilen 50:50 PVA:PI ve 80:20 PVA:PI karışımlarına %2 ferulik asit eklendiğinde viskozitenin bir miktar azaldığı görülmektedir (Şekil 2.10 ve Şekil 2.11). Ancak bu azalış nanolif üretiminde olumsuz bir etkiye neden olmamıştır. Yapılan bir çalışmada ferulik asitin mısır ve sorgum nişastasası hamurlarının sıcak hamur viskozitesini, nihai viskoziteyi ve gerileme viskozitesini azalttığı bildirilmiştir [224].



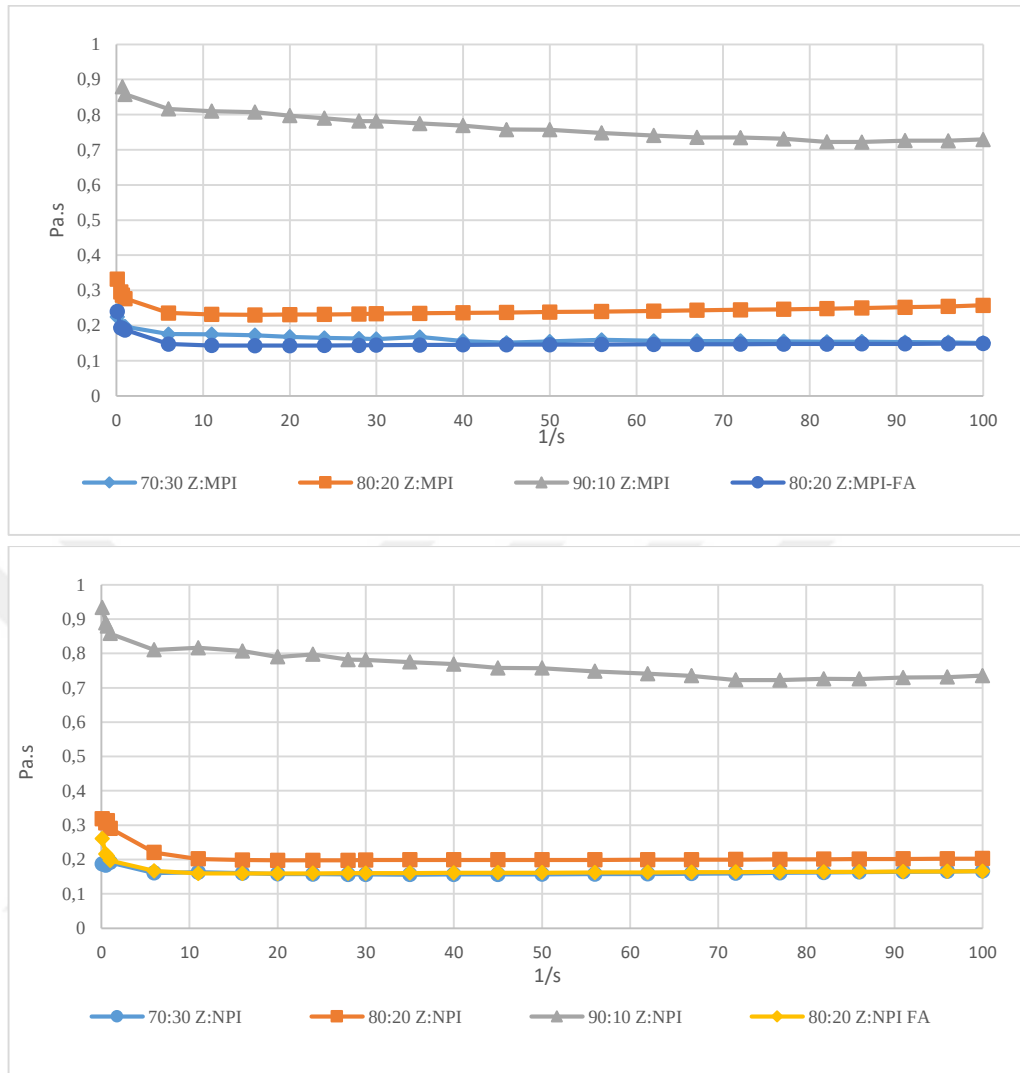
PVA: MPI:FA; Polivinil alkol: Mercimek protein izolatu: ferulik asit; PVA:NPI:FA; Polivinil alkol: Nohut protein izolatu: ferulik asit

Şekil 2.10. PVA ile hazırlanan solüsyonların viskozite değerleri

Tablo 2.9. PVA, MPI ve NPI ile hazırlanan çözeltilerin reolojik özellikleri

PVA:MPI	k	n	η_{50} (Pa.s)	Elektriksel iletkenlik (ms cm^{-1})
40:60	$0,23 \pm 0,01^e$	$0,75 \pm 0,0^d$	$0,09 \pm 0,00^g$	$16,73 \pm 0,19^a$
50:50-FA	$0,18 \pm 0,01^g$	$1,05 \pm 0,0^a$	$0,17 \pm 0,03^f$	$12,35 \pm 0,3^c$
50:50	$0,20 \pm 0,03^f$	$0,96 \pm 0,0^c$	$0,20 \pm 0,03^e$	$14,38 \pm 0,1^b$
60:40-FA	$0,28 \pm 0,01^d$	$1,04 \pm 0,04^a$	$0,36 \pm 0,06^d$	$10,39 \pm 0,14^e$
60:40	$0,43 \pm 0,03^c$	$0,98 \pm 0,0^b$	$0,39 \pm 0,03^c$	$11,88 \pm 0,02^d$
70:30	$0,48 \pm 0,02^b$	$1,00 \pm 0,0^a$	$0,48 \pm 0,03^b$	$9,61 \pm 0,01^f$
100:0	$1,89 \pm 0,02^a$	$1,05 \pm 0,0^a$	$2,21 \pm 0,03^a$	$1,41 \pm 0,00^g$
PVA:NPI				
40:60	$0,08 \pm 0,00^f$	$0,97 \pm 0,00^b$	$0,06 \pm 0,01^g$	$15,53 \pm 0,05^a$
50:50-FA	$0,18 \pm 0,01^e$	$1,06 \pm 0,04^a$	$0,23 \pm 0,03^f$	$10,58 \pm 0,08^c$
50:50	$0,27 \pm 0,02^d$	$1,03 \pm 0,02^a$	$0,29 \pm 0,02^e$	$13,298 \pm 0,11^b$
60:40-FA	$0,28 \pm 0,01^d$	$1,03 \pm 0,01^a$	$0,31 \pm 0,03^d$	$8,41 \pm 0,04^d$
60:40	$0,43 \pm 0,05^c$	$1,01 \pm 0,01^a$	$0,43 \pm 0,01^c$	$8,56 \pm 0,06^d$
70:30	$0,65 \pm 0,05^b$	$1,03 \pm 0,01^a$	$0,74 \pm 0,00^b$	$6,1 \pm 0,01^e$
100:0	$1,89 \pm 0,02^a$	$1,05 \pm 0,0^a$	$2,21 \pm 0,03^a$	$1,41 \pm 0,00^f$

PVA: MPI: FA: Polivinil alkol: Mercimek protein izolatu: ferulik asit; PVA: NPI: FA: Polivinil alkol: Nohut protein izolatu: ferulik asit; PVA: FA: Polivinil alkol: ferulik asit; k: tutarlılık katsayısı ($\text{Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{n}$); n: görünür viskozite ($\text{Pa} \cdot \text{s}$).



Z:MPI:FA; Zein: Mercimek protein izolatu: ferulik asit; Z:NPI:FA; Zein: Nohut protein izolatu: ferulik asit
 Şekil 2.11. Zein ile hazırlanan solüsyonların viskozite değerleri

Tablo 2.10. Zein, MPI ve NPI ile hazırlanan çözeltilerinin reolojik özellikleri

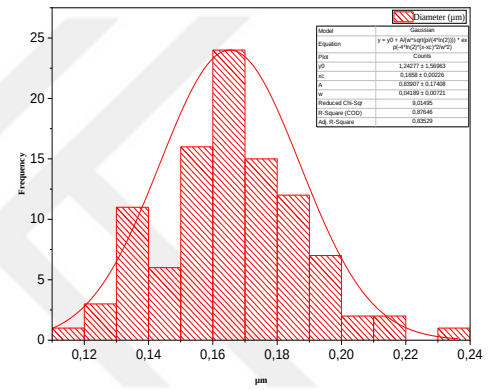
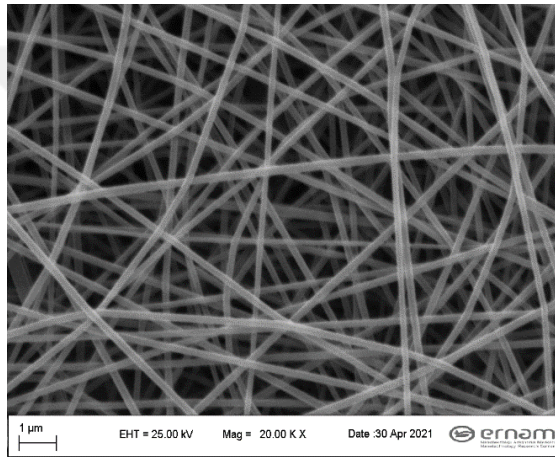
Zein:MPI	k	n	η_{50} (Pa.s)	Elektriksel iletkenlik ($\mu\text{s cm}^{-1}$)
70:30	$0,11 \pm 0,00^e$	$1,1 \pm 0,00^a$	$0,13 \pm 0,02^d$	1968 ± 14^a
80:20 FA	$0,13 \pm 0,01^d$	$1,07 \pm 0,04^a$	$0,17 \pm 0,02^d$	1244 ± 4^c
80:20	$0,21 \pm 0,02^c$	$1,02 \pm 0,02^a$	$0,24 \pm 0,02^c$	1351 ± 1^b
90:10	$1,08 \pm 0,83^b$	$0,99 \pm 0,12^a$	$0,65 \pm 0,03^b$	856 ± 7^d
100:00	$1,13 \pm 0,00^a$	$0,97 \pm 0,03^a$	$0,87 \pm 0,06^a$	$60 \pm 0,00^e$
Zein:NPI				
70:30	$0,12 \pm 0,00^d$	$1,1 \pm 0,00^a$	$0,15 \pm 0,00^e$	1614 ± 9^a
80:20 FA	$0,13 \pm 0,02^d$	$1,16 \pm 0,15^a$	$0,24 \pm 0,08^d$	1000 ± 6^b
80:20	$0,18 \pm 0,02^c$	$1,02 \pm 0,02^a$	$0,23 \pm 0,00^c$	1113 ± 11^c
90:10	$1,27 \pm 0,13^b$	$0,99 \pm 0,12^a$	$0,75 \pm 0,02^b$	652 ± 4^d
100:00	$1,13 \pm 0,11^a$	$0,97 \pm 0,03^a$	$0,87 \pm 0,06^a$	$60 \pm 0,00^e$

MPI:FA: Mercimek protein izolatu: ferulik asit; NPI:FA:Nohut protein izolatu: ferulik asit; FA: ferulik asit;
 k: tutarlılık katsayısı ($\text{Pa} \cdot \text{sn}$); n:görünür viskozite ($\text{Pa} \cdot \text{s}$)

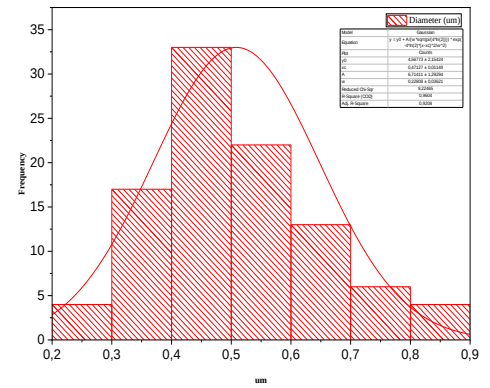
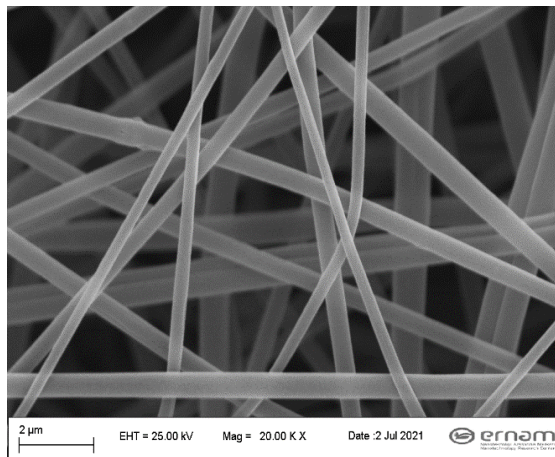
2.3.4.2. Elektrosponing ile Elde Edilen Nanoliflerin Morfolojisi

Proteinlerin sulu çözeltilerinin doğal veya denatüre hallerinde elektrosponingde nanolif oluşturmaları, bir taşıyıcı polimer eklenmeden mümkün değildir. Bunun nedeni, küresel bir yapıya sahip protein moleküllerinin, nanolifler oluşturmak için yeterli zincir yapıyı sunmamasıdır [162]. Bu nedenle, elektrosponing ile nanolif oluşumu için lif oluşturuca çözeltide yardımcı polimerlerin kullanılması gereklidir [225]. Mevcut çalışmada UD-DÖÇ ile ekstrakte edilen MPI ve NPI ile PVA ve zein ile başarılı bir şekilde nanolif üretimi gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.13’de yeşil mercimeğin PVA ile 70:30, 60:40 ve 50:50 w:w (PVA: NPI) oranlarında oluşturulan filmlerine ait SEM görüntüleri görülmektedir. Şekil 2.14 ‘da ise nohut örneklerinin 70:30, 60:40 ve 50:50 w:w (PVA:NPI) oranlarında ki filmlerinin SEM görüntüleri ve nanoliflere ait çap dağılımları mevcuttur. Nanolif çapları yeşil mercimek için sırasıyla $0,140\pm0,00$, $0,133\pm0,00$ ve $0,114\pm0,00$ μm iken nohut örneği için $0,159\pm0,01$, $0,128\pm0,01$ e $0,11\pm0,1$ μm olarak bulunmuştur. Sadece PVA ile üretilen kontrol nanoliflerinin çapı ise 0.165 μm olarak bulunmuştur (Şekil 2.12). Ortamdaki protein konsantrasyonu arttıkça elde edilen nanoliflerin çapları azalmıştır. Benzer şekilde siyah fasulye PI ve PVA ile nano nanolif üretim yapılan bir çalışmada protein oranı ile birlikte nanolif çaplarının azaldığı bildirilmiştir [132]. Nanoliflerin çapı üzerinde çok önemli bir etkiye sahip olan parametrelerden biri, nanolifi oluşturan polimer çözeltisinin viskozitesi veya matriste kullanılan polimerlerin konsantrasyonudur. Genel olarak viskozite artışı ile birlikte elektrosponing işleminde çözeltinin uzamaya karşı direncinin olduğu ve buna bağlı olarak nanolif çapının arttığı bilinmektedir [37]. Çalışmada kullanılan polimer çözeltinin yani PVA’nın konsantrasyonu her bir örnek için aynı tutulmuştur. PVA’nın oranı arttıkça viskoziteninde arttığı daha önce belirtilmiştir. Viskoziteye bağlı olarak PVA oranı arttıkça nanoliflerin çapları da artmıştır. 40:60 ve daha düşük PVA:PI oranlarında hazırlanan solüsyonlardan ise nanolif elde edilememiştir. Ayrıca sulu çözeltide çözünen proteinler, çözeltilerin elektriksel iletkenliğinden sorumlu olan iyonlar üretir. Yüksek bir elektrik alanının uygulanmasıyla, bu yükler, jetin daha büyük bir uzama geçirmesine izin verecek şekilde yönlendirilir, bu da elektrosponing nanoliflerinin çapında bir azalmaya neden olur [226]. Protein oranı arttıkça nanoliflerde ki çapın düşüşü bu değişen elektriksel iletkenlik ile de açıklanabilir. Bezelye PI ve PVA ile yapılan elektrosponing çalışmasında

PVA çözeltisini 5 g/L ve PI'nı 150 g/L olarak hazırlamış ve farklı oranlarda karıştırarak elektrospining yöntemiyle nanolif elde etme çalışmasında 80:20 PI: PVA oranlarında nanolif elde edilememiştir [133]. 70:30 ve 60:40 oranlarında ise boncuklu yapının çok fazla olduğunu bildirmişlerdir. Çözeltide kullanılan protein oranı arttıkça nanoliflerin homojenliğinin de azaldığı görülmektedir. Yapılan bir çalışmada soya proteini içeriği ağırlıkça %9'dan %13'e yükseltildiğinde ortalama nanolif çaplarının $0,6 \pm 0,2$ 'den $4,5 \pm 1,5$ μm 'ye yükseldiği bildirilmiştir [227]. Kullanılan protein tipi, karbonhidrat ve taşıyıcı polimere bağlı olarak nanolif çapları farklı şekilde etkilenebilir [228].



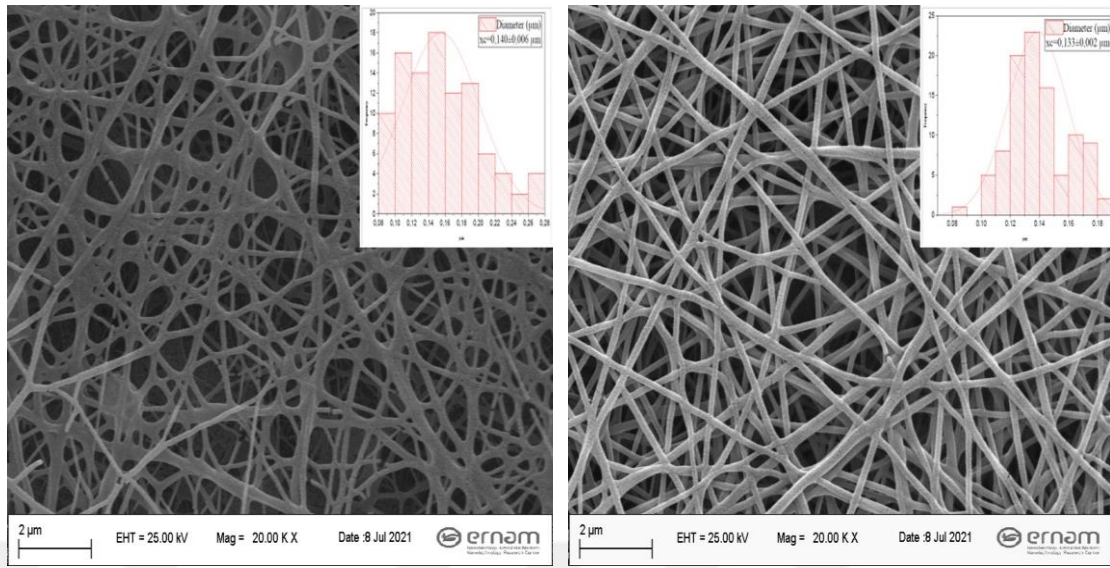
Xc:0.165 μM



XC=0.471 μM

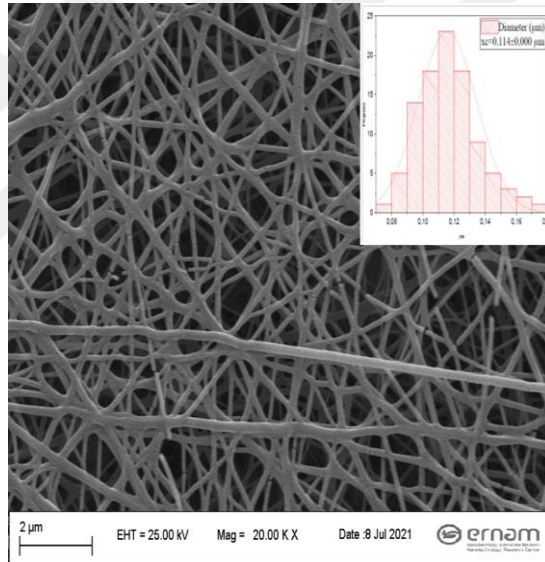
PVA: Polivinil alkol

Şekil 2.12. PVA ve zein ile ele edilen nanoliflerin SEM görüntüleri ve ortalama nanolif çapları



A

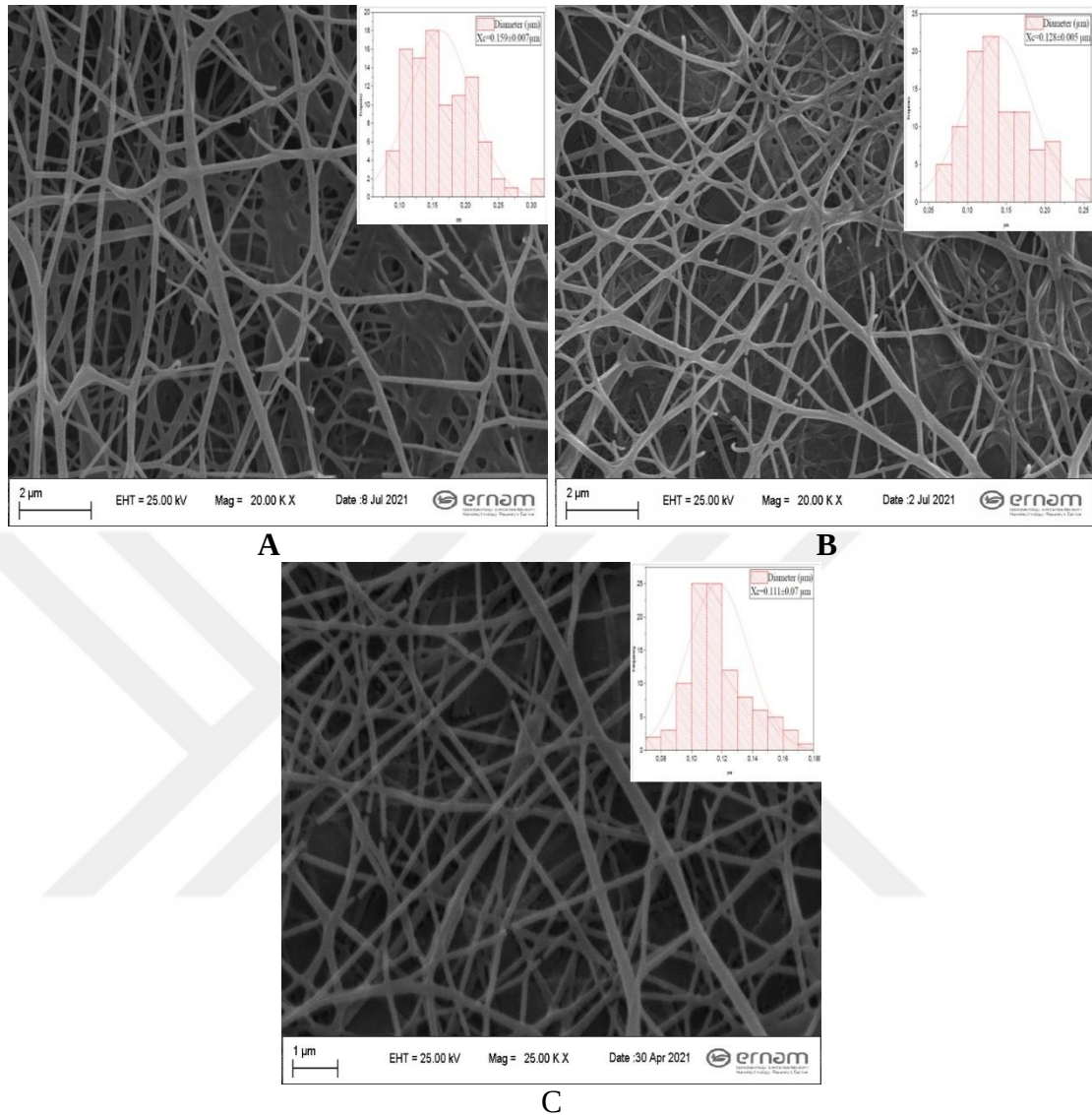
B



C

PVA: MPI Polivinil alkol: Mercimek protein izolatu; FA: ferulik asit

Şekil 2.13. FA içermeyen nanoliflerin SEM (A-C) görüntüleri: 70:30 PVA:MPI (A); 60:40 PVA/MPI (B); 50:50 PVA:MPI (C)

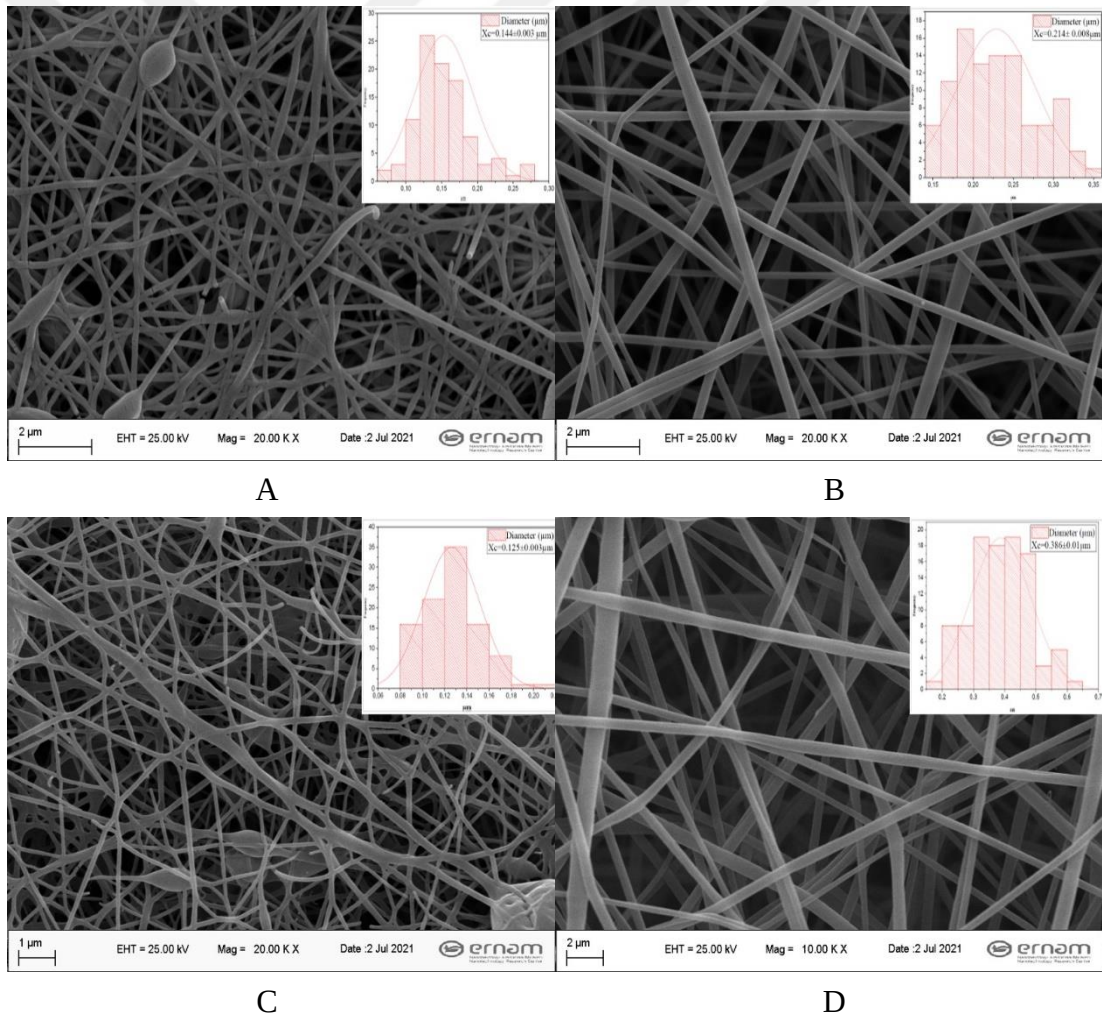


PVA: Polivinil alkol, NPI: Nohut protein izolatı; FA: ferulik asit

Şekil 2.14. FA içermeyen nanoliflerin SEM (A-C) görüntüleri: 70:30 PVA:NPI (A); 60:40 PVA:NPI (B); 50:50 PVA: NPI (C).

Zein ile oluşturulan çözeltilerinin 70:30 w:w zein:PI oranında ki karışımlardan nanolif elde edilememiştir. Çok düşük ve çok yüksek viskozite değerlerinin nanolif üretimini engellediği bilinmektedir [223]. 70:30 ve daha düşük zein:PI oranlarında viskozitenin düşmesi sebebiyle sürdürülebilir nanolifler oluşamamış ve toplayıcı üzerinde nanolif oluşumunu ve gözlenmesini engelleyen damlacıklar oluşmuştur. Zein çözeltisi (%25) ve soya PI çözeltilerini (%5) 95:5, 90:10 ve 80:20 v:v kullanarak elektrospining ile nanolif eldesinin denendiği bir çalışmada 95:5 v:v ile en uygun nanolif üretilmiştir [135]. Farklı voltaj ve iğne toplayıcı mesafesine bağlı olarak nanolif çaplarını 0,33μm ile 0,42μm arasında bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada nanolif çapları eklenen PI miktarı ile birlikte

azalmış ve 80:20, 90:10 (zein:PI) oranları MPI ile üretilen nanoliflerde çap sırasıyla $0,144 \pm 0,00$ ve $0,214 \pm 0,01$ μm bulunurken NPI ile üretilen nanoliflerde sırasıyla $0,125 \pm 0,00$ ve $0,386 \pm 0,01$ μm olarak bulunmuştur (Şekil 2.15). Sadece zein ile üretilen nanoliflerin ortalama çapı ise $0,471$ μm olarak bulunmuştur (Şekil 2.12). Jelatin ve zein karışımları ile elektrospining yöntemiyle nanolif üretiminin denendiği çalışmada %33,3'ten %100'e doğru artan jelatin konsantrasyonu ile birlikte nanolif çapının arttığı bildirilmiştir. %33,2 ve %100 oranında jelatin içeren nanolifler için çap sırasıyla 380,3 nm ve 695,5 nm olarak bulunmuştur. Ayrıca artan viskozite ile nanolif çapında arttığı bildirilmiştir [185]. Mevcut çalışmada zein:PI karışımında zeinin oranı azalıp PI oranı artırıldıkça viskozite azalmış ve dolaylı olarak nanolif çapları da azalmıştır.



MPI: Mercimek protein izolatı; NPI: Nohut protein izolatı; FA: ferulik asit Xc: Nanoliflerden alınan ortalama çap.

Şekil 2.15. FA içermeyen nanoliflerin SEM (A-D) görüntüleri: 80:20 zein:MPI (A); 90:10 zein:MPI (B); 80:20 zein:NPI (C); 90:10 Zein:NPI (D).

2.3.4.3. Nanoliflere Ferulik Asit Eklenmesi ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Bir önceki adımda yapılan çalışmalar ile MPI ve NPI ile PVA ve zein polimerleri kullanılarak film üretimi gerçekleştirilmiştir. PI oranını en yüksek seviyede tutmak amaçlanmıştır. PVA kullanımında %50 protein kullanımı ile uygun nanolifler elde edilirken zein kullanıldığı çalışmalarda maksimum %20 PI eklenen solüsyonlardan nanolif üretimi gerçekleştirilebilmiştir. PVA:PI 50:50 w:w ve zein:PI 80:20 olacak şekilde hazırlanan solüsyonlara literatür incelemesi sonucu karar verilen %2 ferulik asit eklenmiştir. Yapılan bir çalışmada çözeltiye fazla ferulik asit yüklenmesinin çökmeye sebep olduğu bildirilmiştir [171]. Yapılan ön denemeler ve literatür doğrultusunda 2 mg/mL ferulik asit kullanımının uygun olacağına karar verilmiştir.

Enkapsülasyon, biyoaktif bileşiklerin inaktive edici ajanlara karşı direncini arttırmaya yönelik bir yöntemdir. Elektropsining, ilaçları kaplamak için son zamanlarda oldukça fazla araştırılan en etkili yöntemlerden biridir [229]. Üretilen nanoliflerin çeşitli bileşenlerin enkapsülasyonu için uygunluğunu kontrol etmek amacıyla nanoliflere ferulik asit yüklemesi yapılmıştır. Enkapsülasyon etkinliğini değerlendirmek için farklı konsantrasyonlardaki ferulik asit etanol içinde çözündürülmüştür ve alınan absorbanslar ile kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Geliştirilen PVA:PI ve zein:PI elektropsining nanolifleri içindeki ferulik asit miktarı elde edilen kalibrasyon eğrileri dahilinde 324 nm'de izlenmiştir. Yapılan değerlendirme sonucu 50:50 PVA:MPI ve PVA:NPI için Enkapsülasyon etkinliği sırasıyla %78,69±4,4 ve %78,69±5,1 olarak bulunmuştur. 80:20 hazırlanan zein:MPI ve Zein:NPI nanolifleri için enkapsülasyon etkinliği ise sırasıyla %82,38±0,51 ve %80,88±0,12 olarak bulunmuştur. MPI ve NPI kullanımının enkapsülasyon etkinliği açısından fark arz etmediği görülmektedir. Zein kullanılarak elde edilen nanoliflerin enkapsülasyon etkinliğinin çok fark olmamakla birlikte bir miktar yüksek olduğu görülmektedir. 80:20 w:w hazırlanan amarant protein izolatu:pullulan nanolifleri içine ferulik asit yüklemesi yapılan çalışmada enkapsülasyon etkinliği %8,7 olarak bildirilmiştir [171]. Peynir altı suyu proteinleri kullanılarak kurkuminin enkapsülasyonunun denendiği çalışmada enkapsülasyon etkinliği %64.45 olarak tespit edilmiştir [230]. 50:50 w:w oranında soya PI ve PVA kullanılarak hazırlanan nanolifler ile β -karoten enkapsüle edilmiştir ve Enkapsülasyon etkinliği %65 bulunmuştur [134].

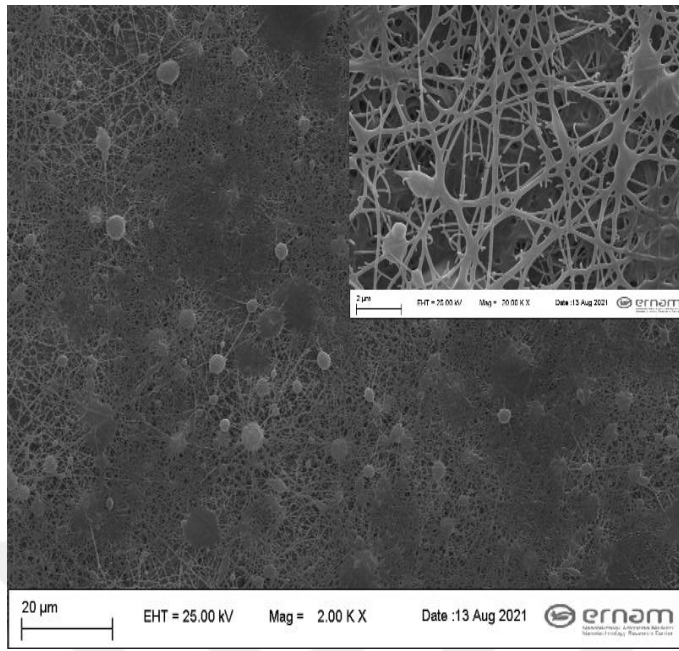
Matris olarak zeinin kullanıldığı β -karoten nanoliflerinde Enkapsülasyon etkinliği %34,7 olarak bildirilmiştir. Baklagil protein izolatlarının nanolif üretiminde ve antioksidanların enkapsülasyonunda kullanılabilecek uygun protein kaynakları olduğu görülmektedir. Ferulik asitin spray kurutucu ile maltodekstrin içine enkapsüle edildiği çalışmada enkapsülasyon etkinliği %80,12 bildirilmiştir [231]. Yine ferulik asitin kitosan içerisine liyofilizasyon yöntemi ile enkapsüle edildiği çalışmada enkapsülasyon etkinliği en yüksek %56,45 bildirilmiştir [232]. Elektrospinning yöntemiyle enkapsülasyon işleminde elde edilen ferulik asit enkapsülasyon etkinliği diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek olarak bulunmuştur.

2.3.4.4. Ferulik Asit Yüklü Nanoliflerin Karakterizasyonu

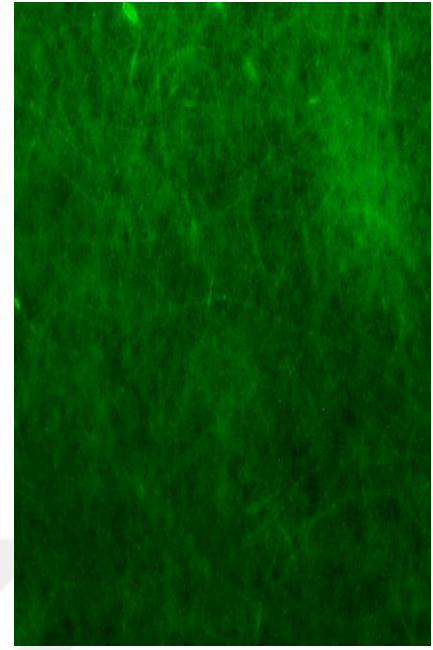
2.3.4.4.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Floresan Mikroskop

İlk olarak, elektrospining nanolifleri içindeki biyoaktif birleşmenin etkisi incelenmiş ve çözeltilerin viskozitesi ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan bir çalışmada ferulik asitin mısır ve sorgum nişastası hamurlarının sıcak hamur viskozitesini, nihai viskoziteyi ve gerileme viskozitesini azalttığı bildirilmiştir [224]. Mevcut çalışmada da ferulik asit eklenen solüsyonların viskozitesinin azaldığı görülmüştür. Ancak azalan viskozite nanolif oluşumunu etkilememiştir. Genel olarak, PVA polimeri ile enkapsülasyon yapısı için, elektrospining işlemi sırasında hiçbir faz ayrımı meydana gelmemiştir ve biyoaktif içermeyen nanoliflerde elde edilen görüntülere benzer nanolifler elde edilmiştir. Zein ile üretilen nanoliflerde ise biyoaktif içermeyen nanoliflere nazaran daha boncuklu bir yapının oluştuğu görülmektedir. Bu azalan viskozitenin bir sonucu olarak düşünülebilir.

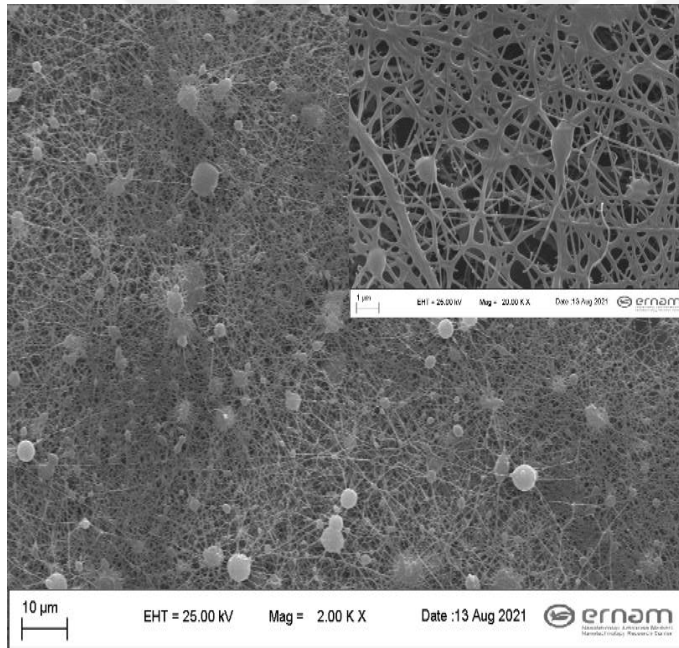
Biyoaktif bileşenin etkili bir şekilde enkapsülasyonunu doğrulamak için, floresan optik mikroskopisi kullanılmıştır. ferulik asitin yaklaşık 425 nm'de bir emisyon sergilediği bilinmektedir [233]. Bu özellik, ferulik asitin nanoliflerin yapısındaki dağılımını görsel olarak kontrol etmek için kullanılmıştır. 50:50 PVA:MPI ve PVA:NPI nanoliflerine ait SEM görüntüleri Şekil 2.16'de, zein:MPI ve Zein:NPI'na ait görseller Şekil 2.17'da verilmiştir. Her iki polimerle hazırlanan protein nanolifleri için floresan görüntüleri, ferulik asitin nanolifler boyunca iyi dağılmış olduğunu göstermektedir.



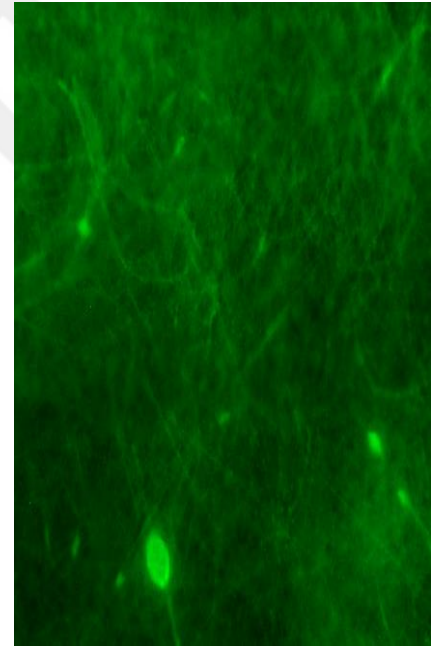
A



C



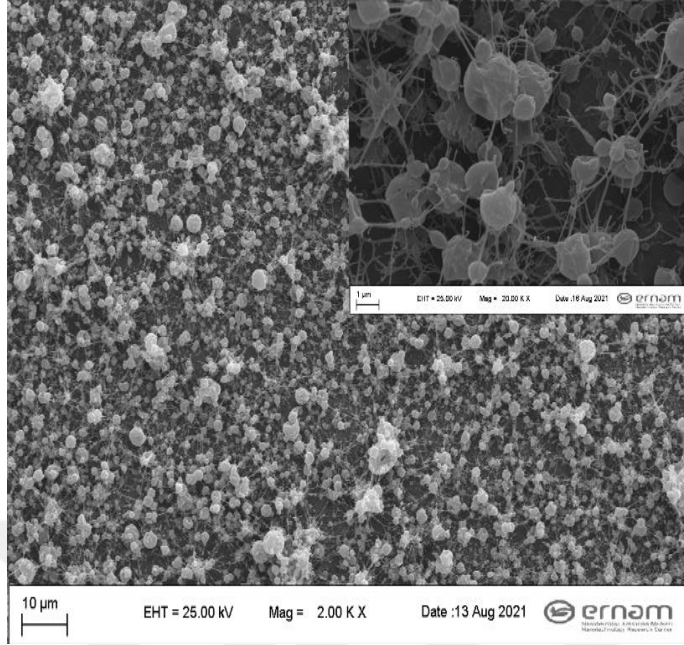
B



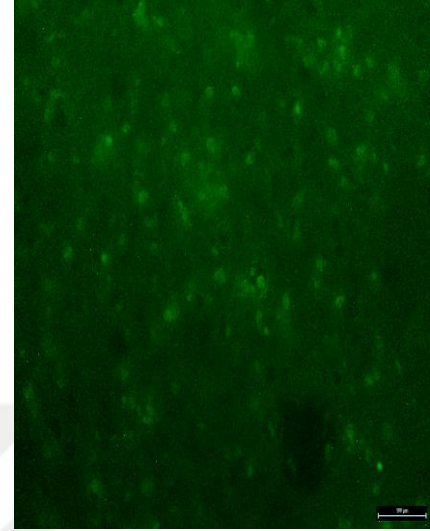
D

PVA: Polivinil alkol; MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: Ferulik asit

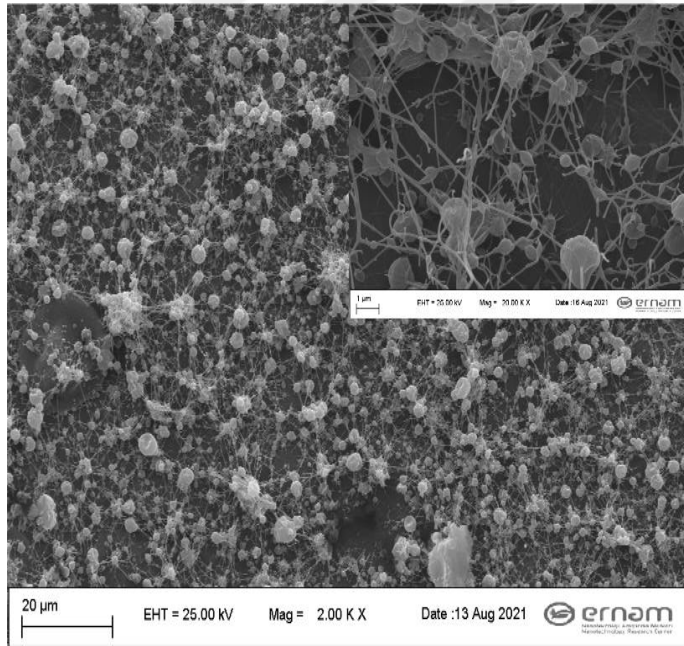
Şekil 2.16. 2 mg/mL FA içeren örneklerin SEM (A-B) ve floresans mikroskop (100µm) (C-D) görüntüleri; 50:50 PVA: MPI (A-C); 50:50 PVA/ NPI (B-D)



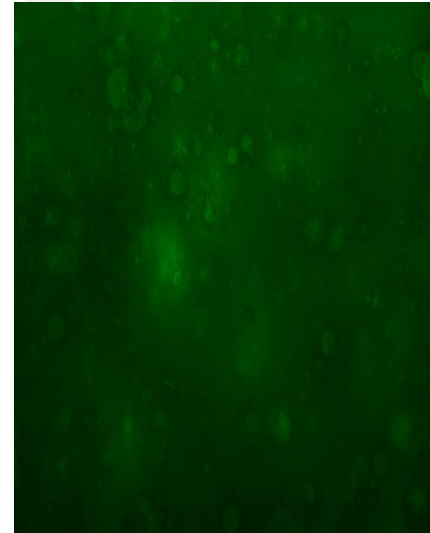
A



C



B



D

MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: Ferulik asit

Şekil 2.17. 2 mg/mL FA içeren örneklerin SEM (A-B) ve floresans mikroskop (100μm) (C-D) görüntüleri; 80:20 zein: MPI (A-C); 80:20 zein: NPI (B-D)

2.3.4.4.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Enkapsülasyonun matrislerin termal stabilitesini etkileyip etkilemediğini araştırmak için ferulik asit yüklü PVA:PI ve zein:PI yapılarının termogravimetrik analizi yapılmıştır (Şekil 2.20). Tablo 2.11’de nanolifler için elde edilen sonuçlar ve karşılaştırma amacıyla sadece PVA ve Zein ile üretilen ferulik asit yüklü nanoliflere ait veriler sunulmuştur. $T_{\%5}$, nanoliflerin ilk ağırlık kaybı hakkında bilgi vermektedir. En yüksek $T_{\%5}$ değeri zein:NPI:FA nanolifinde elde edilmiştir. $T_{\%50}$ nanoliflerde %50 ağırlık kaybının yaşandığı sıcaklığı göstermektedir. $T_{\%50}$ değerleri incelendiğinde örnekler arasında fark oluşmadığı en düşük değerin ise zein:MPI:FA’da elde edildiği görülmektedir. En düşük $T_{\max}$ PVA:FA’da 308,34°C olarak bulunmuştur. En yüksek $T_{\max}$ ’lar ise PVA:MPI:FA ve PVA:NPI:FA örneklerinde sırasıyla 370,66°C ve 371,58°C bulunmuştur. 600°C’de kalıntı miktarları incelendiğinde MPI ile elde edilen nanoliflerin kontrollere benzer kalıntı miktarları verdiği gözlemlenirken NPI kullanılarak üretilen nanoliflerin kalıntı miktarlarının diğer nanoliflerden yüksek olduğu görülmektedir. Zein ile üretilen nanoliflerin kalıntı miktarları PVA ile üretilen liflerden daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 2.11).

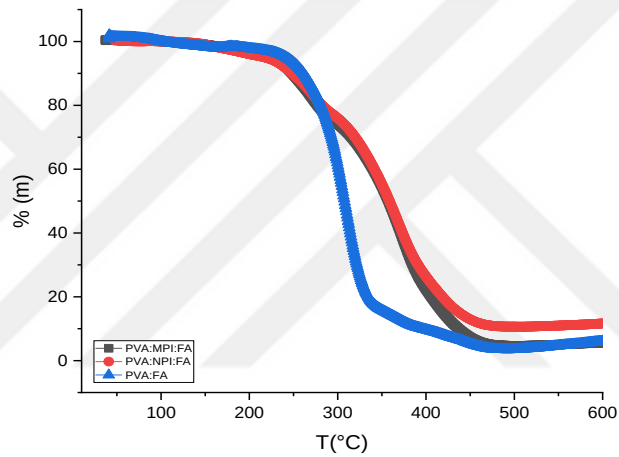
Tablo 2. 11. Ferulik asit yüklü PVA:PI ve zein:PI nanoliflerine ait TGA değerleri

Örnekler	$T_{\%5}$ (°C)	$T_{\%50}$ (°C)	$T_{\max}$ (°C)	Kalıntı miktarı (600°C) (%)
PVA:MPI:FA	99,93	100,23	370,66	5,48
PVA:NPI:FA	100,06	100,40	371,58	11,62
PVA:FA	100,25	101,44	308,34	6,05
Zein:MPI:FA	98,07	99,67	319,70	25,53
Zein:NPI:FA	102,65	102,72	316,85	45,16
Zein: FA	99,54	100,53	318,03	26,75

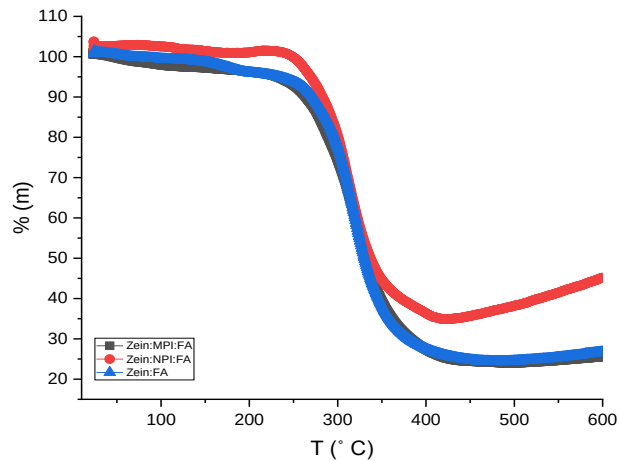
PVA: Polivinil alkol; MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: Ferulik asit

Şekil 2.18 ferulik asit yüklü nanoliflerin TG eğrilerini göstermektedir. Tüm nanolifler tek bir aşamada bozunmuştur. Tüm eğriler arasında kontrol örneklerinin yani PVA:FA ve zein:ferulik asitin nispeten daha düşük termal bozunma sıcaklığı gösterdiği görülmektedir. DÖÇ ile elde edilen protein izolatları içerisinde termal olarak bozunamayan bileşenlerin olması bu sonucu doğurmuş olabilir. Bununla birlikte yüksek termal kararlılık çoğunlukla daha kararlı bir yapı ile ilişkilendirilmektedir [234]. PVA

için ağırlık kaybının 280°C civarında başladığı bildirilmiştir [219]. Zein ile üretilen nanolifler için bildirilen ana bozunma sıcaklığı ise yaklaşık 275-350°C'dir [164]. PVA ve zein ile üretilen nanoliflerin maksimum bozunma sıcaklıklarının bu aralıkta olduğu görülmektedir. Zein ve PVA'nın PI'ları ile bozunma sıcaklıkları örtüştüğünden nanolifler için tek fakat daha geniş bir ağırlık kaybı gözlemlenmiştir. Ayrıca, nanoliflerin termal bozunmasının biraz daha yüksek bir sıcaklığa kaydığı görülmektedir. Özellikle Şekil 2.18 A'da PVA:PI ile üretilen nanoliflerin, saf PVA nanoliflerine kıyasla biraz daha yüksek bozunma sıcaklığı gösterdiği görülmektedir. Bu durum PI'larının PVA nanolifi matrisine dâhil edilmesinin daha yüksek termal stabilite ile sonuçlandığını göstermektedir.



A



B

PVA: Polivinil alkol; MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: Ferulik asit

Şekil 2.18. PVA:MPI:FA, PVA:NPI:FA ve PVA:FA nanoliflerine ait TGA(A); zein:MPI:FA, zein:NPI:FA ve zein:FA nanoliflerine ait TGA eğrileri (B)

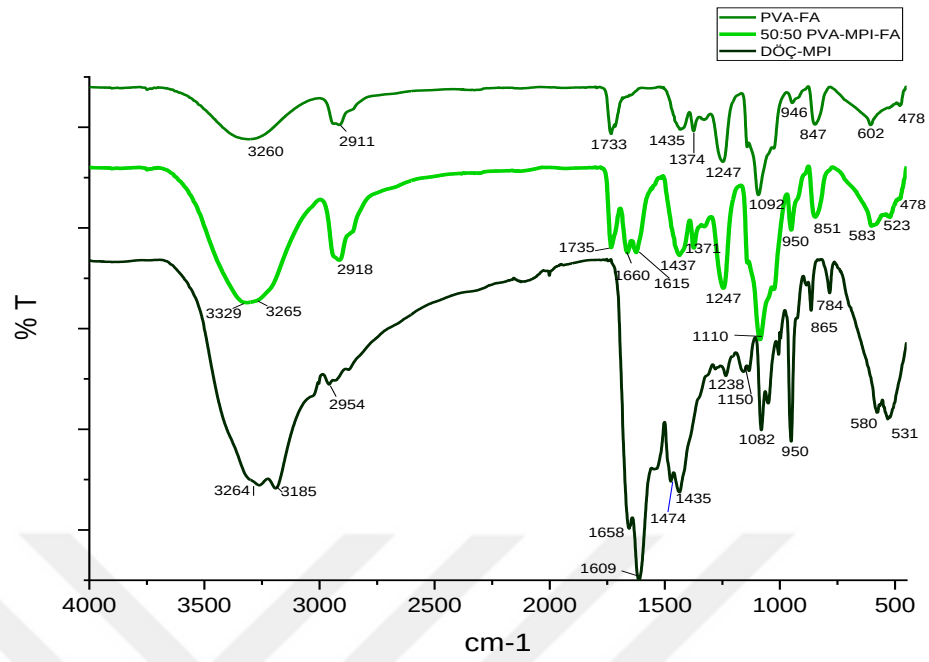
2.3.4.4.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

PVA:MPI:FA, PVA:NPI:FA, PVA:FA ve MPI'na ait spektrumlar Şekil 2.19'da verilmiştir. Zein ile üretilen nanolifler için elde edilen spektrumlar ise Şekil 2.20'de sunulmuştur.

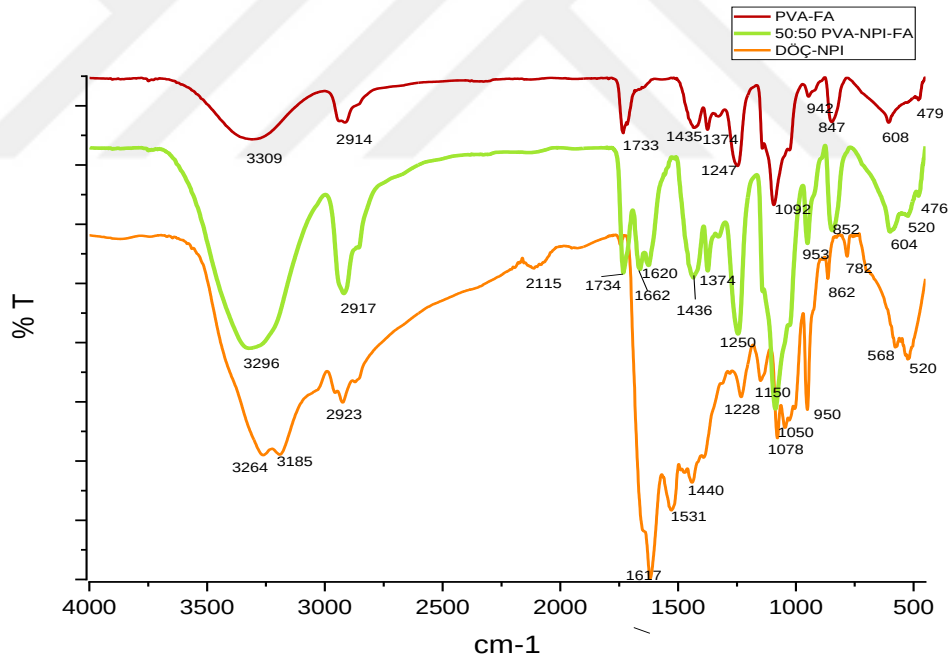
3550-3200 cm^{-1} aralığındaki pikler, molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağından O-H gerilmesini ifade eder [235]. PVA ile elde edilen nanoliflerin hepsinde ve PI'nda bu aralıkta yakın transmittanslarda pik oluşumlarının meydana geldiği görülmektedir. Sadece zein ile üretilen nanoliflerde ise bu bölgede pik oluşumu görünmezken zeinin PI ile reaksiyonu, PI'larının spektrumlarında net gözlenen 3600 cm^{-1} -3000 cm^{-1} yoğunluğunun önemli ölçüde azalmasıyla sonuçlanmıştır.

Alkil grubundan C-H'nin gerilmesi 3000-2840 cm^{-1} aralığında pik gösterir. PVA:FA, MPI ve NPI örneklerine ait spektrumlarda bu noktadaki gerilmeler daha düşük iken PVA:MPI:FA ve PVA:NPI:FA örneklerinde meydana gelen etkileşimler nedeniyle daha yüksek bir gerilim oluşmuştur. 1750-1735 cm^{-1} civarındaki tepe noktaları polivinil alkolün asetat grubunun C=O ve C-O bantlarını belirtir. Ayrıca saf PVA'da -CH₂'nin CH₂OH'deki deformasyon titreşiminden kaynaklanan 1500 cm^{-1} 'de bir pik oluşturduğu bildirilmiştir. C-O-C ve CH₂, sırasıyla 1150-1085 cm^{-1} ve 1461-1417 cm^{-1} aralığında temsil edildiği belirtilmiştir [235].

Protein izolatlarına ait spektrumlar incelendiğinde, amino asit grubu 3300 cm^{-1} 'de bir tepe noktasına sahip olduğu ve C-H bağlarının 2900 cm^{-1} civarında titreşim verdiği görülmektedir. Yine MPI ve NPI içeren nanoliflere ait spektrumlarda gruplara tam olarak bakıldığında, 1700-1600 cm^{-1} aralığında belirlenen pikler, amid I bandının C=O gerilmesini ve 1575-1480 cm^{-1} aralığındaki pikler ise bükülmeyi ifade eder. 1472-1241 aralığındaki tepe noktaları amid II'nin N-H gerilmesine ve (C) O-O, C-N bandının gerilmesine, amid III bandının N-H bükülmesi ve β tabakalarının varlığına bağlanır [236, 237].



A

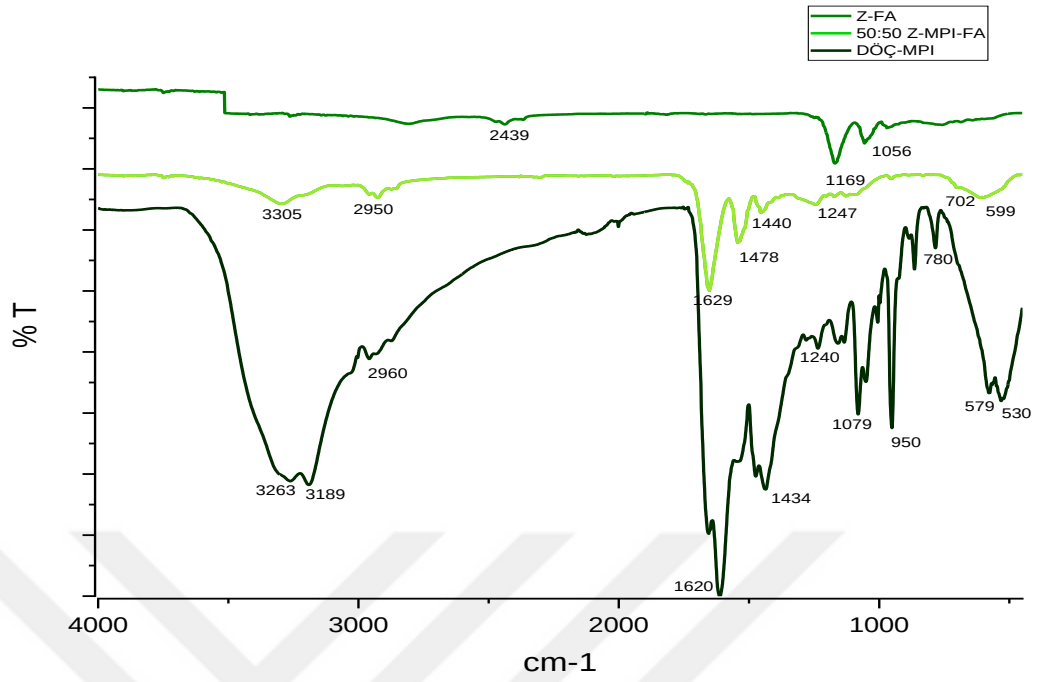


B

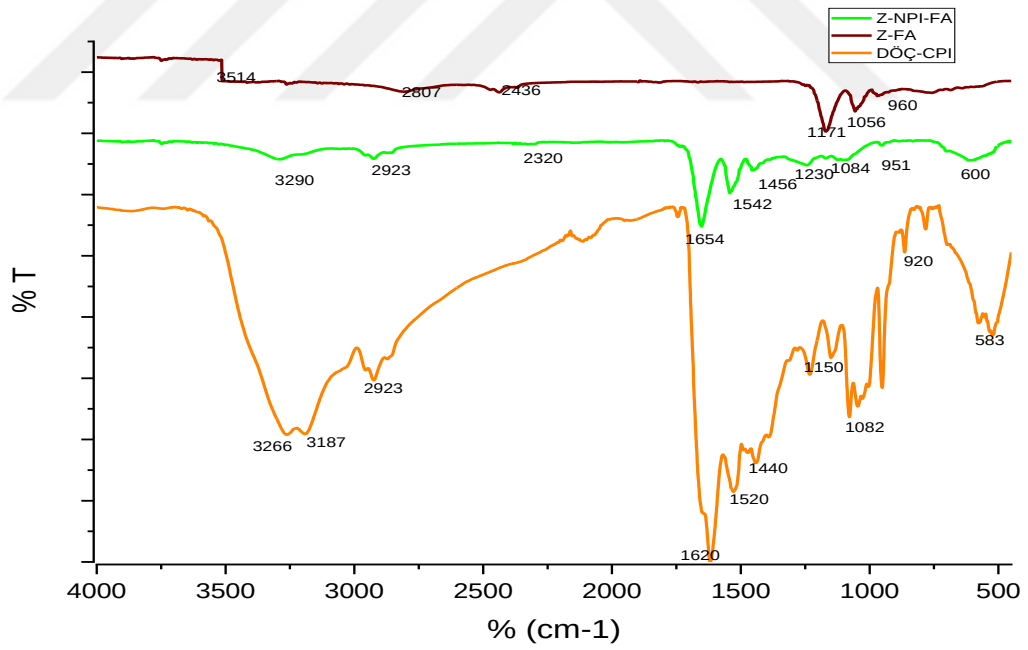
PVA: Polivinil alkol; MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: ferulik asit

Şekil 2.19. PVA:MPI:FA; PVA:FA nanoliflerine ve MPI'ya ait FTIR (A); PVA:NPI:FA; PVA:FA nanoliflerine ve NPI'ya ait FTIR spektrumları (B)

FA ve zein molekülleri, hidrojen bağı için potansiyel proton donörleri olarak hareket edebilen sırasıyla serbest hidroksil ve amino gruplarına sahiptir. Ayrıca molekülleri karbonil grupları içerir ve bu nedenle proton reseptörleri olarak işlev görebilir. Ferulik asit molekülleri hem -OH gruplarına hem de -CO gruplarına sahiptir ve ferulik asit molekülleri arasında farklı tipte bir hidrojen bağı mümkündür. Bunların yaklaşık 1620 cm^{-1} civarında tepelerin görülebildiği ATR-FTIR spektrumları ile doğrulanmıştır [186]. ferulik asit in IR spektrumu, -OH grubu için $3437,43\text{ cm}^{-1}$, -CH grubu için $3015,70\text{ cm}^{-1}$, C=O grubu için $1690,52\text{ cm}^{-1}$, alken grubu için $1665,06\text{ cm}^{-1}$ 'de karakteristik bantlar gösterdiği bilinmektedir. C=C grubu için $1619,97\text{--}1431,54\text{ cm}^{-1}$, C-O-C grubu için $1272,94\text{--}1234,36\text{ cm}^{-1}$ ve CH grubu için $900\text{ ila }650\text{ cm}^{-1}$ bant oluşturduğu bildirilmiştir [186]. Ancak yapılan bir çalışmada ATR-FTIR spektrumlarında ferulik asit için tanımlanan tüm bu piklerin kompozit nanoliflerde kaybolduğu bildirilmiştir [238]. Zein:FA nanolifinde FA'ya ait piklerin bir kısmı gözlenemezken zein:MPI:FA ve zein:NPI:FA etkileşiminde bu piklerin birçoğu gözlenmektedir. PVA:FA incelendiğinde ise elde edilen tüm pikler PVA:MPI:FA ve zein:NPI:FA nanoliflerine ait piklerde yaklaşık olarak kontrollerdekine yakın noktalarda bulunmaktadır. Benzer sonuç ferulik asitin elektrospining ile enkapsülasyonu için poli (D,Llaktid-ko-glikolid)/polietilen oksit kullanılan çalışmada da bildirilmiştir [186].



A



B

Z: Zein; MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: Ferulik asit

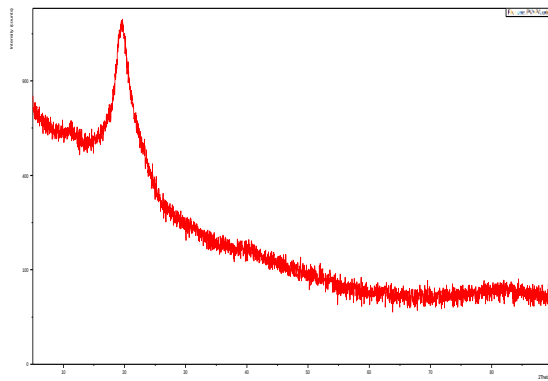
Şekil 2.20. Z:MPI:FA; Z:FA nanoliflerine ve MPI ya ait FTIR (A); Z:NPI:FA; Z:FA nanoliflerine ve NPI'ya ait FTIR spektrumları (B)

Genel olarak PVA:PI ve zein:PI ile üretilen nanoliflere ait pikler incelendiğinde herhangi bir pik bölünmesi gözlenmemektedir. Bu durum PI ve ferulik asit in polimerler içerisinde homojen olarak dağılmasının bir sonucu olarak yorumlanabilir. Bir çalışmada hibrit nanoliflerde pik bölünmesi olmadığı için, bezelye PI'nın PVA içinde homojen olarak dağıldığı sonucuna varılmıştır [133].

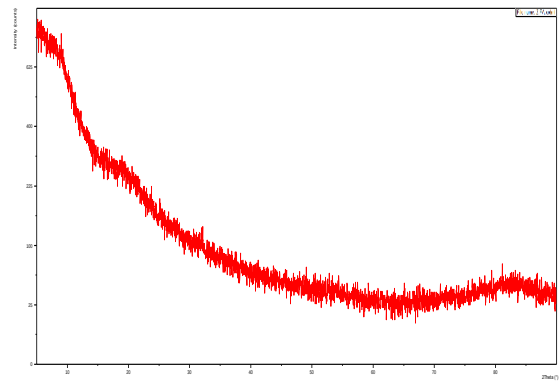
2.3.4.4.4. X-ışını kırınımı (XRD)

PVA:FA, PVA:PI:FA ve zein:FA, zein:PI:FA'lara ait diyagramlar Şekil 2.21'de sunulmuştur. PVA:FA ve PVA:PI:FA'lar amorf yapıya sahiptir ancak bu farklı yoğunluktadır. Zeine PI ilave edildiğinde 20° civarında daha kalın ve geniş bir pik elde edilmiştir [185].

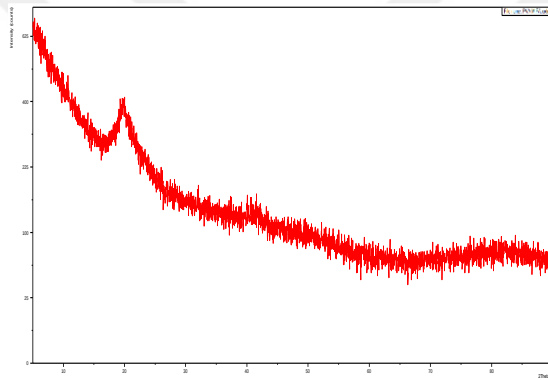
PI'ları XRD modelindeki amorf doğayı değiştirmemiştir (Şekil 2.21). Örneklerin tamamı, 2θ 'da yaklaşık 20° civarında kırınım pikleri göstermiştir. Karışım nanoliflerinde PVA:PI:FA ve zein:PI:FA molekülleri arasında hiç etkileşim olmaması veya zayıf bir etkileşimin olması, durumunda her bileşenin karışım nanoliflerinde kendi kristal bölgesini göstermesi beklenir [239]. Ayrıca bu durum eklenen PI'larının PVA'nın ve zeinin kristal yapısını önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir [240]. Mevcut çalışmada nanolif için elde edilen XRD pikleri [241] ve [239] tarafından PVA için elde edilen piklerle ve [238] tarafından zein için elde edilen pikler ile uyumludur. XRD sonuçları, PVA:PI ve zein:PI arasındaki etkileşimlerine dair FTIR sonuçlarını desteklemektedir.



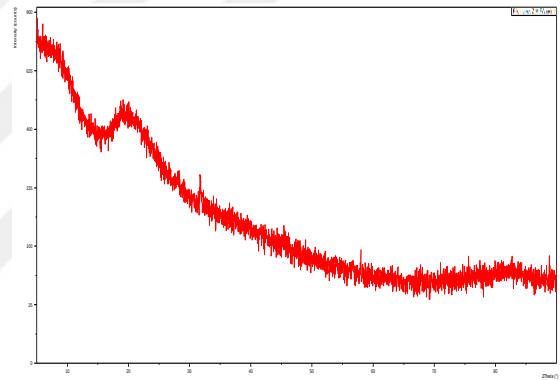
PVA:FA



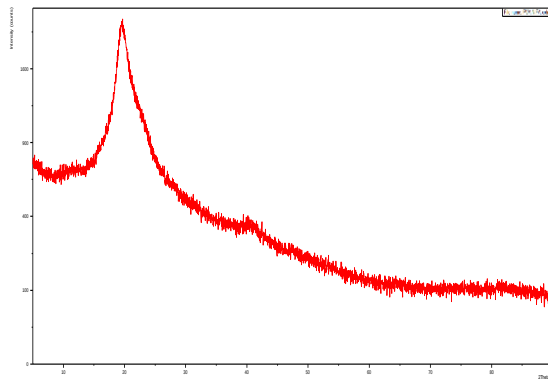
Z:FA



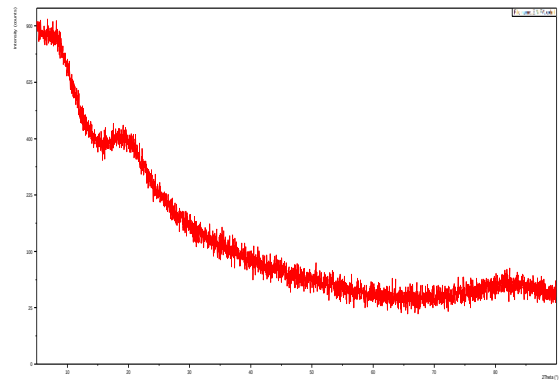
PVA:MPI:FA



Zein:MPI:FA



PVA:NPI:FA



Zein:NPI:FA

PVA: Poliivinil alkol; Z: Zein; MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: Ferulik asit

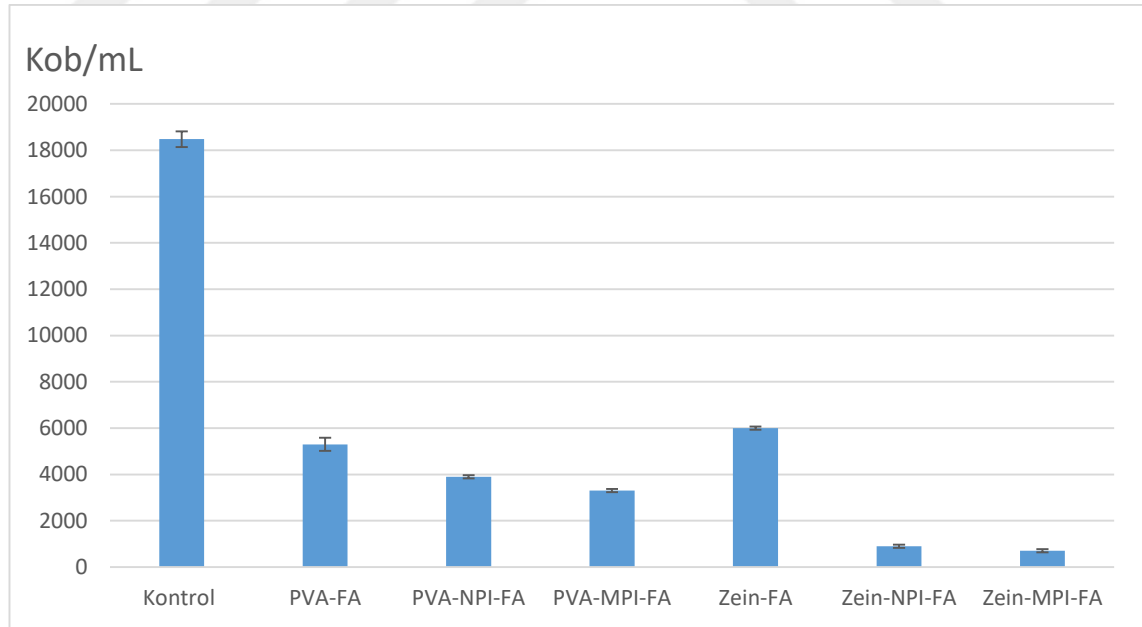
Şekil 2.21. PVA:FA (A); PVA:MPI FA (B); PVA:NPI:FA (C); zein:FA (D); zein:MPI:FA (E); zein:NPI: FA (F) nanoliflerine ait XRD diyagramları

2.3.4.5. Ferulik Asit Yüklü Nanoliflerin Antibakteriyel Aktivitesi

PVA:PI:FA ve zein:PI:FA nanoliflerinin antimikrobiyal aktivitesi test mikroorganizması olarak *Escherichia coli* (*E. coli*) kullanılarak araştırılmıştır. Şekil 2.22’de MPI ve NPI içeren nanoliflerin *E. coli* üzerine etkisi kob/mL olarak verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde kontrol örneğine göre tüm nanoliflerin antibakteriyel etki gösterdiği görülmektedir PVA:FA nanolifi PVA:MPI:FA ve PVA:NPI:FA nanolifleri için kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrol örneğine göre PVA:FA nanolifi ile muamele sonucu oluşan koloni sayısının azaldığı görülmektedir. FA’in hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği bilinmektedir [242]. Ancak PI içeren örneklerde koloni sayısı PVA:FA ve zein:FA’ya göre de oldukça düşüktür. Ferulik asit ten gelen antimikrobiyal etkinin yanı sıra proteinlerinde ciddi bir antimikrobiyal özellik gösterdiği görülmektedir. Baklagil proteinlerinin/peptitlerinin antihipertansif, immün sistemi uyarıcı, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri bilinmektedir [243]. Ayrıca baklagillerden elde edilen proteinler ve peptitlerin yüksek mikrobiyal büyüme inhibisyonunu (%91-97) ortaya çıkardığı bildirilmiştir [244]. Bakteri koloni sayısındaki azalmalara bakıldığında PVA:FA örneğinde % 71,3’lük bir azalma söz konusuken bu değer PVA:MPI: FA’da %82,1’e ve PVA:NPI:FA’da ise %78,9’a çıkmıştır. Zein ile elde edilen nanolifler de ise zein:FA kontrol nanolifinde kontrole göre %67,5’lik bir azalma varken zein:MPI:FA ve zein:NPI:FA örnekleri için koloni sayıları sırasıyla %96,2 ve %95,1 azalmıştır. Yapılan bir çalışmada mercimek proteinlerinden elde edilen lektinin *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* ve *Pseudomonas*’a karşı bakteri üremesini azaltmaya yardımcı olan etkili bakteriyostatik ajanlar olarak bildirilmiştir [245]. Çimlenmiş mercimek tohumlarından izole edilen biyoaktif bir peptidin, bakteri ve mantarlarla ilişkili çeşitli enfeksiyonlara karşı antimikrobiyal aktiviteleri içeren geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip olduğu [246], polifenollarca zengin olan mercimeğin *E. coli*’ye karşı antibakteriyel aktivitesi yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [245, 247]. Mercimek proteinleri ayrıca fırıncılık endüstrisinde antifungal özelliği ile potansiyel peptid kaynaklarından [248]. Nohut ekstraktlarının Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı etkinliği konusundaki çalışma sonuçlarına göre 16-64 µg/mL konsantrasyon aralığında Gram negatif suşlara (*E. coli*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*) karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir [249]. Nohuttan elde edilen proteinlerin

spesifik antimikrobiyal potansiyeli, *L. monocytogenes* ve *S. Enteritidis*'e karşı incelenmiştir. Proteinlerin konsantrasyona bağlı olarak bir antimikrobiyal aktivite ortaya çıkardığı bildirilmiştir [250]. Nohuttan elde edilen biyoaktif protein moleküllerinin, bakteri, küf, virüs ve ayrıca kanserojen hücreleri etkisiz hale getirmede etkinlik gösterdiği belirtilmiştir [251]. Bitkisel polifenoller ve proteinlerle ilişkili biyoaktif ve teknolojik özellikler, gıda endüstrisinde önem kazanmakta ve bu doğrultuda baklagiller yeni bir bakış açısıyla ele alınmaktadır [252]. Baklagillerden ekstrakte edilen proteinler ve peptitler, gıda kaynaklı en önemli patojenlere karşı antimikrobiyal ajanlar olarak potansiyel bir etki ortaya koymaktadır [253]. Mevcut çalışmada da PI ile üretilen nonoliflerin antibakteriyel aktivitelerinin kontrol nanoliflere kıyasla oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Elde edilen protein izolatalarının antioksidan özellikleri daha önceki analizlerde vurgulanmıştır.

Bu çalışmayla antioksidan ve antibakteriyel özellikteki MPI ve NPI ile nonolif üretimi gerçekleştirilmekle kalmamış ayrıca üretilen filmlerin antioksidan ajanlar için de uygun bir taşıyıcı olarak kullanılabileceği ispatlanmıştır.



PVA: Polivinil alkol; MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: Ferulik asit

Şekil 2.22. Nanoliflerin antibakteriyel aktiviteleri

2.3.4.6. Ferulik Asit Salınım Kinetiğinin Farklı Ortamlarda Belirlenmesi

Polimerik sistemlerden bileşenlerin salınımı, difüzyon, şişme ve polimer zincir gevşemesi gibi farklı parametrelerin bir sonucu olarak meydana gelebilir [254]. Mevcut çalışmada difüzyon, nanoliflerin silindirik yapısı göz önünde bulundurularak Fick'in ikinci yasası ile tanımlanmıştır. Bununla birlikte, birçok kontrollü salınım sistemi saf bir difüzyon sürecini izlemediği göz önünde bulundurularak ve literatür incelenerek diğer mekanizmaları dikkate almak için farklı yaklaşımlar da irdelenmiştir [192, 255]. Ferulik asit in farklı ortamlardaki salım eğrileri Şekil 2.23'de verilmiştir. Ayrıca Fick yasasına göre elde edilen difüzyon katsayısı (D), güç yasasına göre belirlenen kinetik sabit (k) ve serbest bırakma sistemi mekanizmasının difüzyon üssü (n) ve Weibull denklemine göre salınımın a ve b sabitleri belirlenmiştir (Tablo 2.12 ve Tablo 13). Hidrofobik ortamda ferulik asitin PVA:PI ve zein:PI nanoliflerinden diğer ortamlara göre çok daha hızlı salındığı görülmektedir. Bu nedenle kısa sürede yüksek miktarda antimikrobiyal ve antioksidan salınımı gerektiren hidrofobik gıdalar için aktif ambalaj olarak ve katkı maddesi olarak kullanılabilir. PVA:MPI ve PVA:NPI için D değeri hidrofilik ortam ve *in vitro* sindirim ortamı için oldukça yakındır. Elde edilen sonuca göre ferulik asitin bu iki ortamda PVA:PI nanoliflerinden difüzyonunun benzer oranda gerçekleştiği söylenebilir.

Güç yasasında, n değeri bileşiğin kapsül içinden salım mekanizmasını karakterize eder. Silindirik kapsüller söz konusu olduğunda, $0,45 \leq n$ Fickian difüzyon, $0,45 < n < 0,89$ Fickian olmayan difüzyon, $n=0,89$ durum II (gevşetici) difüzyon ve $n > 0,89$ süper durum II difüzyon olarak adlandırılır [256]. Nanoliflerden ferulik asit salınımına ait n değerleri incelendiğinde PVA:MPI ve PVA:NPI nanoliflerinden salınımın çok hızlı gerçekleştiği hidrofobik ortamlar hariç diğer tüm durumlar için n değerinin $< 0,45$ olduğu ve salınım kinetiğinin Fick yasasına uyduğu görülmektedir.

Weibull denkleminde b parametresi salınım mekanizmasını gösterir: 0,75'ten küçük değerler için Fick'in difüzyon yasasına göre salınım gerçekleştiğini ve $b > 1$ değerleri ise karmaşık salınım mekanizmaları gerçekleştiğini göstermektedir [192]. Güç yasasından elde edilen sonuçlara benzer şekilde PVA:MPI ve PVA:NPI nanoliflerinden salınımın çok hızlı gerçekleştiği hidrofobik ortamlar hariç nanolifler için elde edilen b değerleri

incelendiğinde hidrofobik, hidrofilik ve *in vitro* ortamlarda değerin 0,75'ten küçük olduğu görülmektedir. Bu durum nanoliflerden ferulik asitin salınımı için Fick yasasının uygun olduğu görülmektedir.

PVA incelendiğinde sadece PVA ile üretilen kontrol nanolifinin salınım hızının PVA:NPI ve PVA:NPI'dan bir miktar düşük olduğu söylenebilir. Ancak aynı durum Z ile elde edilen nanolifler için geçerli değildir. Sadece zein ile üretilen kontrol nanolifinden ferulik asitin salınımı PI içeren nanoliflere göre daha hızlıdır. Genel olarak nanoliflerin hidrofilik uygulanması salınım daha uzun sürede ve daha yavaş gerçekleştiğinden daha uygundur. Hidrofobik ortamında ise kısa sürede daha yüksek miktarlarda ferulik asit salınımı gerçekleşecektir.

In vitro ortamdaki salınım incelendiğinde PVA:MPI ve PVA:NPI nanolifleri benzer salınım profili gösterirken PVA kontrol örneğindeki salınım hızının daha yavaş olduğu görülmektedir. PVA, PVA:NPI ve PVA:MPI için k değerleri sırasıyla 0,14, 0,17 ve 0,15 ve n değeri ise sırasıyla 0,26, 0,36 ve 0,40 olarak bulunmuştur. b değerleride benzer şekilde PVA'da en düşükken PVA:MPI örneği için en yüksek değere sahiptir. Zein ile üretilen nanolifler incelendiğinde ise b için yine en düşük değerlerin kontrol (zein) örneğine ait olduğu en yüksek değerlerin ise zein:MPI örneklerine ait olduğu görülmektedir (Tablo 2.13). Elde edilen verilerden n değerleri 0,45'in altında olduğu için PVA nanoliflerinden ferulik asitin *in vitro* ortamdaki baskın salınımının Fick difüzyon yasasına uygun olduğunu ortaya koymaktadır. PVA nanoliflerinden kurkuminin *in vitro* salınımının aynı koşullarda incelendiği bir çalışma sonucunda n değerleri 0,45'in altında bulunmuş ve salınımın Fick yasasına uyduğu bildirilmiştir [189].

Tablo 2.12.PVA, MPI ve NPI ile hazırlanan nanoliflerden ferulik asit salınım kinetiği

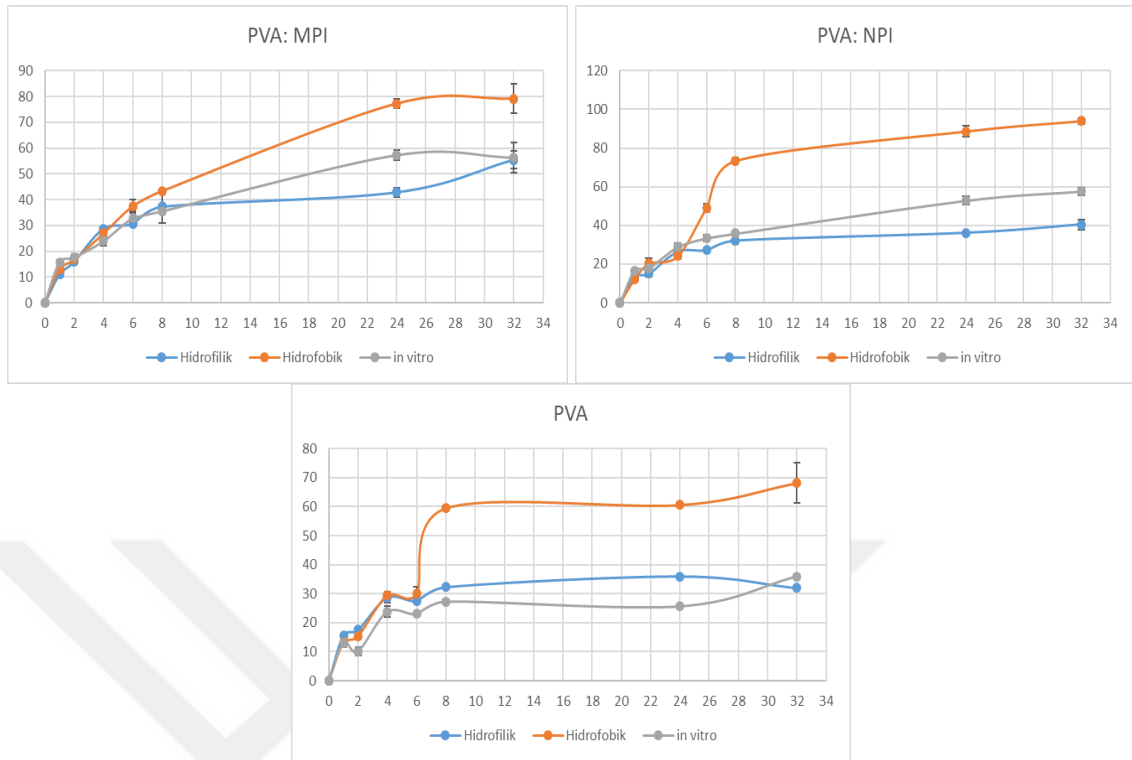
	Fick Yasası		Güç yasası			Weibull		
	D	R ²	k	n	R ²	a	b	R ²
PVA:MPI:FA								
Hidrofilik	1x10 ⁻⁴	0,90	0,18	0,17	0,97	-0,20	0,19	0,97
Hidrofobik	3x10 ⁻⁴	0,99	0,14	0,51	0,99	-0,11	0,78	0,99
In-vitro	1x10 ⁻⁴	0,94	0,15	0,40	0,99	-0,15	0,52	0,99
PVA:NPI:FA								
Hidrofilik	1x10 ⁻⁴	0,82	0,16	0,28	0,99	-0,17	0,33	0,96
Hidrofobik	7x10 ⁻⁴	0,98	0,19	0,48	0,94	-0,09	1,13	0,97
In-vitro	1x10 ⁻⁴	0,93	0,17	0,36	0,99	-0,17	0,47	0,99
PVA:FA								
Hidrofilik	1x10 ⁻⁴	0,71	0,19	0,19	0,87	-0,21	0,23	0,88
Hidrofobik	3x10 ⁻⁴	0,91	0,17	0,41	0,92	-0,16	0,59	0,93
In-vitro	1x10 ⁻⁴	0,77	0,14	0,26	0,87	-0,14	0,30	0,88

PVA: Polivinil alkol; MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: Ferulik asit; D: difüzyon katsayısı; k:güç yasasına göre belirlenen kinetik sabit; n: serbest bırakma sistemi mekanizmasının difüzyon üssü; a-b: Weibull katsayısı.

Tablo 2.13.Zein, MPI ve NPI ile hazırlanan nanoliflerden ferulik asit salınım kinetiği

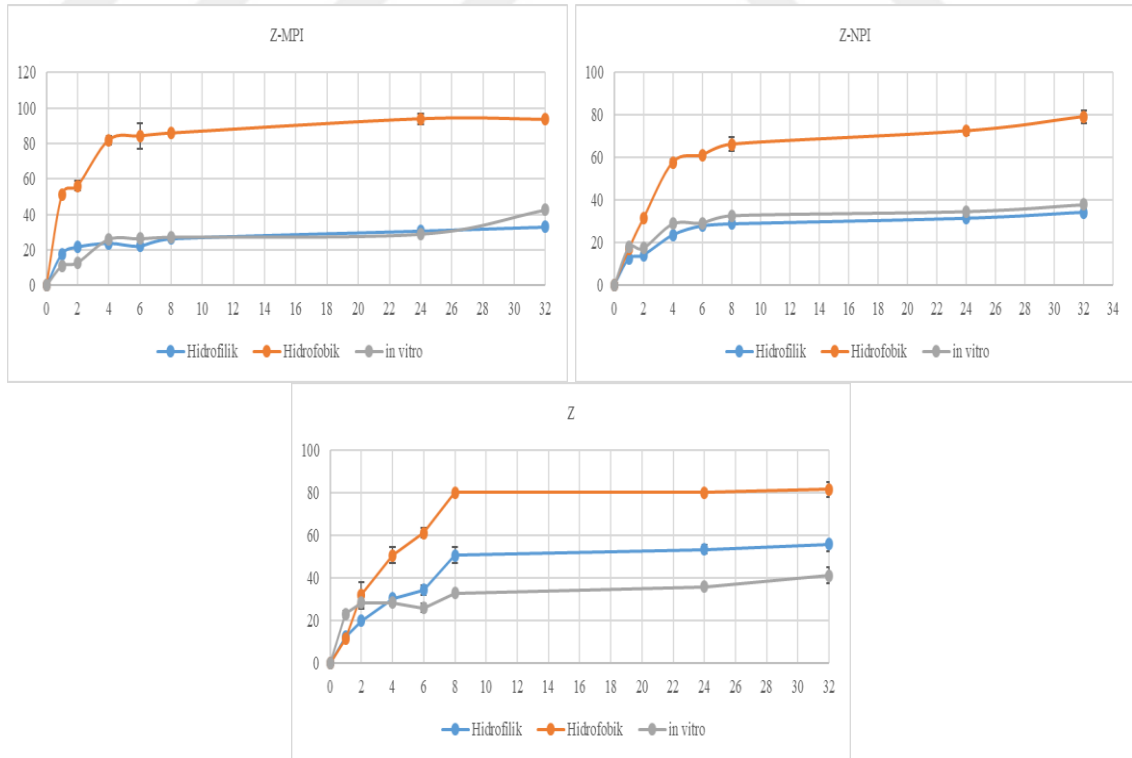
	Fick yasası		Güç yasası			Weibull		
	D (um ² /s)	R ²	k	n	R ²	a	b	R ²
Zein:MPI:FA								
Hidrofilik	1x10 ⁻⁵	0,73	0,18	0,17	0,97	-0,20	0,19	0,97
Hidrofobik	2x10 ⁻³	0,95	0,58	0,15	0,90	-0,70	0,51	0,97
In-vitro	1x10 ⁻⁴	0,84	0,14	0,30	0,91	-0,14	0,35	0,91
Zein:NPI:FA								
Hidrofilik	1x10 ⁻⁵	0,76	0,16	0,24	0,93	-0,17	0,28	0,93
Hidrofobik	5x10 ⁻⁴	0,89	0,32	0,28	0,90	-0,33	0,50	0,93
In-vitro	1x10 ⁻⁵	0,73	0,16	0,24	0,93	-0,21	0,24	0,93
Zein:FA								
Hidrofilik	9,6x10 ⁻⁴	0,90	0,19	0,33	0,93	-0,19	0,45	0,94
Hidrofobik	6,9x10 ⁻³	0,95	0,31	0,31	0,88	-0,27	0,66	0,93
In-vitro	3,6x10 ⁻⁴	0,71	0,23	0,14	0,92	-0,26	0,18	0,92

MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: Ferulik asit; D: difüzyon katsayısı; k:güç yasasına göre belirlenen kinetik sabit; n: serbest bırakma sistemi mekanizmasının difüzyon üssü; a-b: Weibull katsayısı.



PVA: Polivinil alkol; MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: Ferulik asit

Şekil 2.23. FA'ın farklı ortamlarda PVA:MPI ve PVA:NPI nanoliflerinden salınım profili



MPI: Mercimek protein izolatu; NPI: Nohut protein izolatu; FA: Ferulik asit

Şekil 2.24. FA'ın farklı ortamlarda zein:MPI ve zein:NPI nanoliflerinden salınım profili

3. BÖLÜM

BAKLAGİLLERDEN MİKRODALGA SULU İKİ FAZ (MD-SİF) EKSTRAKSİYON SİSTEMİ İLE FENOLİK BİLEŞEN EKSTRASİYONU; ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLER, KARAKTERİZASYON VE ENKAPSÜLASYON

3.1. Giriş

Baklagiller insan beslenmesinde önemli bir yeri olan protein ve aynı zamanda fenolik bileşen kaynağıdır [257]. Fenolik asitler, flavonoidler ve taninler mercimek, fasulye, nohut ve soya gibi baklagil ürünlerinin temel biyoaktif bileşenleridir. Baklagillerin fenolik bileşen içeriği 38,6-542,7 mg GAE/100 g arasında bildirilmiştir [258]. Baklagiller, fenolik bileşikler nedeniyle yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu nedenle kardiyoprotektif, antikanserojenik ve antikolesterolemik özellikler gösterirler [259]. Baklagillerden fenolik bileşikler genel olarak etanol, aseton, diklorometan gibi farklı çözücüler veya bu çözücülerin su ile karışımı kullanılarak maserasyon tekniği ile ekstrakte edilir. Ancak geleneksel ekstraksiyon yöntemleri, düşük ekstraksiyon verimi göstermelerinin yanı sıra, büyük miktarlarda organik çözücüler ve daha uzun süre gerektirir [260]. Son zamanlarda çevre dostu olarak adlandırılan ultrases destekli ekstraksiyon [261], süperkritik akışkan ekstraksiyonu [262], basınçlı çözücü ekstraksiyonu [263] enzim destekli ekstraksiyon [264] ve MD ekstraksiyon [265] daha kısa zaman ve düşük çözücü tüketimi ve daha yüksek ekstraksiyon verimi nedeniyle dikkat çekmektedir. Belirtilen nedenlerle, mevcut çalışmanın bu bölümünde yüksek ısıtma kapasitesi, performansı ve makul maliyeti nedeniyle MD ekstraksiyon kullanılmıştır. MD ekstraksiyonunun çözücünün materyallere penetrasyonunu artırarak biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunu geliştirdiği bilinmektedir [266].

İnorganik tuzlar ve kısa zincirli alkoller, düşük viskoziteli, yüksek verimli, oldukça iyi bir faz ayırımına ve alkol ve tuzun geri kazanımına sahip SİF sistem oluşturmaktadır. SİF geleneksel sistemlerin önemli bir çevre dostu alternatifidir [267]. SİF hem ekstraksiyon hem de saflaştırmayı içeren tek adımlı bir prosestir [268]. Fenolik madde bileşikleri ve çözünür şeker sırasıyla üst ve alt fazlarda dağılır [269]. SİF ve MD'nin birlikte kullanımı geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre daha etkili bir ekstraksiyon ve daha basit bir saflaştırma yöntemi sağlar [268]. MD enerjisi SİF tarafından kolayca emilebilir ve bu nedenle yüksek bir termal etki üretebilir. Artan yüksek sıcaklığın bir sonucu olarak, çözücü, materyalin matrisine nüfuz eder ve ekstraksiyon oranını artırır [270]. Yapılan literatür çalışmasına göre MD-SİF ile yeşil mercimekten, nohuttan ve kuru fasulyeden fenolik bileşen ekstraksiyon çalışması mevcut değildir. Önceki çalışmalarda, bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için MD-SİF optimizasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir [81, 269].

Mikroenkapsülasyon süreçleri, ışık, oksijen, ısı ve nem gibi çevresel parametrelerden çekirdek malzeme bozulmasının korunması nedeniyle gıda endüstrisi için önemlidir. Enkapsülasyon yoluyla çekirdek malzemelerin salınım hızı kontrol edilebilir ve acı tat ve polifenollerin eksiliği gibi hoş olmayan tatlarının maskelenmesi sağlanabilir. Polisakkaritler özellikle maltodekstrin, modifiye edilmiş nişastalar, kitosan ve arap zıncı aynı zamanda bunların karışımı gıda işlemede kaplama malzemesi olarak kullanılabilir [271]. Fenolik bileşiklerin enkapsülasyonu farklı materyaller ve farklı kurutma yöntemleri ile incelenmiştir [272-274].

Tezin bu bölümünde yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulyeden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için yeni hızlı ve etkili bir yöntem olan MD-SİF araştırılmış SİF olarak etanol/amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) kullanılmıştır. Ayrıca optimum ekstraksiyon parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, SİF'in tuz oranı, MD uygulama süresi ve MD gücü bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Optimizasyon yöntemi için üst ve alt fazların fenolik bileşikleri analiz edilmiştir. Optimizasyon RSM'de BBD kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşen açısından üst fazın alt faza göre oldukça zengin olduğu görülmüştür. Bu nedenle, cevap faktörü olarak üst fazdan fenolik bileşiklerin geri kazanımı kullanılmıştır. Ayrıca, klasik SİF (K-SİF) ve klasik su (K-su) ekstraksiyon ile karşılaştırmalı bir çalışma yapılmıştır. Ekstraktların DPPH süpürücü

aktivitesi, antioksidan aktivitesi ve Fe-şelatlama aktivitesi değerlendirilmiştir. Optimum noktada üretilen ekstraktlar, K-SİF ve K-su ekstraktları liyofilizasyon yoluyla maltodekstrin ile enkapsüle edilmiştir. Mikrokapsüllerin yapısal karakterizasyonu FTIR spektroskopisi ve SEM ile incelenmiştir. Enkapsüle bileşiklerin salınım profili mide ve bağırsak sıvı sistemlerini simüle eden *in vitro* ortamlarda değerlendirilmiştir. Ayrıca fenolik ekstraktların ayçiçek yağının hızlandırılmış koşullardaki oksidatif stabilitesine etkisi araştırılmıştır.

3.2. Materyal ve Metot

3.2.1. Materyal

Folin-Ciocalteu, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazol-6-sulphonic acid) (ABTS) (A1888-1), ferrozine (160601) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (D913-2), Maltodekstrin (DE 8-15) (31410), ve amonyum sülfat (A4915) Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)'den alınmıştır. Demir klorid (3260) Carlo-Erba ve sodyum fosfat dibasik (Na_2HPO_4) (10028-24-7) Merck'den temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Baklagiller yerel bir üreticiden temin edilmiştir. Tüm analizler iki tekrarlı ve üç paralel olarak yürütülmüştür. Optimizasyon dizaynında beş merkez nokta seçilmiştir. Örneklerin başlangıç nem içerikleri ise sırasıyla yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulye için %12,85, %15,80 ve % 17,90 olarak belirlenmiştir.

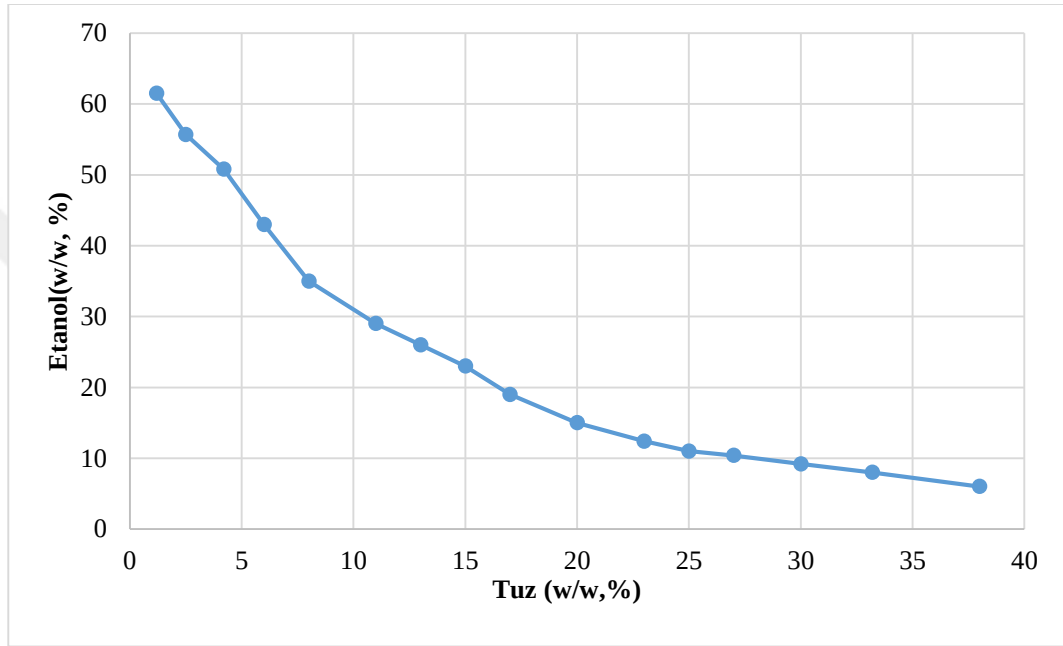
3.2.2. Metot

3.2.2.1. Örneklerin hazırlanması

Yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulye örnekleri öncelikle öğütülüp un haline getirildikten sonra 350 μm çaplı elekten geçirilmiştir. Baklagil unları yağ uzaklaştırılması için 1:5 (g: mL) oranında hekzan ile çalkalayıcıda (220 rpm, 45°C, 4 saat) karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım 7000 g'de 10 dk. santrifüj edilerek çökelti 1 gün 25°C'de bekletilip kalan hekzanın uçması sağlanmıştır. Hazırlanan örnekler analiz edilinceye kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. Faz diyagramının ve Sulu iki faz (SİF)'in oluşturulması

Etanol/(NH₄)₂SO₄ faz diyagramı [275]'a göre hazırlanmıştır. Farklı oranlarda (NH₄)₂SO₄ distile su içerisinde çözülmüştür. Daha sonra SİF sisteminin oluştuğu bulanıklıktan hemen sonraki noktaya kadar etanol damlatılmıştır. Oluşturulan faz diyagramı Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Etanol/(NH₄)₂SO₄'ın faz eğrisi

3.2.2.3. Mikrodalga Destekli- Sulu İki Faz (MD-SİF) Ekstraksiyon

Fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu MD ekstraksiyon cihazında (Mars 6, CEM, ABD) gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon parametreleri süre (60-300 saniye), güç (100-300 W), ve tuz oranı (%17-23 w/w) literatüre [148] ve yapılan ön denemelere göre belirlenmiştir. Kullanılan etanol hacmi %25 w/w seçilmiştir. Tuz oranı elde edilen grafiğe göre %16 dan düşük ve %25'den yüksek seçildiğinde faz ayrımı gerçekleşmemektedir (Şekil 3.1). Bu nedenle seçilen tuz oranı aralığında en etkin faz ayrımını veren etanol oranı (%25) çalışma boyunca kullanılmıştır. BBD kullanılarak belirlenen optimizasyon noktalarında ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlar önce filtre kâğıdından geçirilmiş ve tortular uzaklaştırılmıştır. Daha sonra ayırma hunisi yardımıyla alt ve üst fazlar ayrılmıştır. Hem alt faz hem üst faz için fenolik madde analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.4. Deney Dizaynı ve RSM Optimizasyonu

Optimum ekstraksiyon parametrelerinin belirlenmesinde RSM (Design Expert, Trial Version 7, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN) BBD kullanılmıştır. Dizaynda 5 merkez nokta seçilmiştir. Buna göre 12 faktörel ve toplamda 17 farklı nokta içeren dizayn elde edilmiştir. Fenolik bileşenin üst fazdaki geri kazanımı cevap faktörü olarak kullanılmıştır. Geri kazanım aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır;

$$\text{Denklem 3.1: Geri Kazanım (\%)} = \frac{C_t V_t}{C_t V_t + C_b V_b}$$

(C_t ve C_b Fenolik bileşen içeriği (mg/L) üst ve alt faz için, V_t ve V_b ise üst ve alt faz hacimleri (mL) göstermektedir).

ANOVA, yeşil mercimek için model tarafından önerilen kuadratik nohut ve kuru fasulye için önerilen 2FI modeli kullanılarak belirlenmiştir. Regresyon katsayısı, F değeri, 0,05 olasılıkla polinomdaki tüm terimlerin anlamlarını istatistiksel olarak değerlendirmek için kullanılmıştır.

3.2.2.5. Etanolce Zengin Fazdan Fenolik Bileşenlerin Geri Kazanımı

Üst faz fenolik bileşenler ile birlikte etanol ve tuz ihtiva ettiğinden etanol ve tuzun uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu aşamada öncelikle 1:2 v:v ekstrakt/etanol karıştırılarak 4°C’de 24 h bekletilmiş ve kristalizasyona uğratılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanarak tuzun çökmesi sağlanmıştır. Her bir çöktürmede karışım 8000 g’de 10 dk. 25°C’de santrifüj edilmiştir. Daha sonra etanol evaporator (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Almanya) aracılığıyla 200 rpm, 80 mbar, 40°C ve 3 saatte uzaklaştırılmıştır. Son olarak ekstraktlar tamamen kuruyana kadar -30°C’de 0,04 mbarda liyofilize (Christ Alpha, 1 2 LD plus, Almanya) edilmiştir [276].

3.2.2.6. Klasik-Sulu İki Faz (K- SİF) ve Klasik-Su (K-su) Ekstraksiyon

Ekstraksiyon etkinliğinin karşılaştırılması için, K-SİF ve K-su ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. SİF optimizasyonda belirlenen optimum noktalarda hazırlanmıştır. Her bir örnek için belirlenen optimum noktalar yeşil mercimek için 219 s, 300 W, ve % 22,8 (NH₄)₂SO₄ (w/w), nohut için 98,76 s, 236 W, ve % 17,20 (NH₄)₂SO₄ (w/w), kuru fasulye

için 60,93 s, 227,62 W, ve %17,01 (NH₄)₂SO₄ (w/w)'dir. K-su'da tuz yerine de aynı miktarda distile su eklenmiştir. K-su 2 saat, 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Örnek konsantrasyonu tüm yöntemler için aynıdır. Ekstraksiyon işlemleri sonrası ekstraktlar filtre kâğıdından geçirilmiş ve SİF ekstraktları bir ayırma hunisi yardımıyla ayrılmıştır. Bu aşamada fenolik bileşenin zengin olduğu üst faz analizlerde kullanılmıştır.

3.2.2.6.1. Toplam Fenolik İçerik (TPC)

TPC analizi [182]'a göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla mikro okuyucu kuyucuklarına örnek (30µL), folin-ciocalteu reaktifi (150µL) ve sodyum karbonat (120µL) eklenmiştir. Çalkalama (5 dk.) ve 1 saat inkübasyonun ardından 750 nm'de mikro okuyucu (Multiscan FC, Thermo, İstanbul) ile absorbans okunmuştur. Aynı işlem standart grafik hazırlamak için kullanılan farklı konsantrasyonlarda gallik asit (GA) çözeltileri için de uygulanarak standart grafik oluşturulmuş ve TPC mg GAE/g olarak verilmiştir.

3.2.2.6.2. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite

Elde edilen ekstraktlar (30 µL) ve DPPH çözeltisi (270 µL) mikro okuyucuya (Multiscan FC, Thermo, İstanbul) eklenmiştir. Kör için saf su (30 µL) , metanol (270 µL), kontrol içinse saf su (30 µL) ve DPPH çözeltisi (270 µL) kullanılmıştır. Yöntem başlangıcında 5 dk. karıştırma ve 1 saat inkübasyon yapıp 520 nm'de mikro okuyucuda (Multiscan FC, Thermo, İstanbul) absorbans ölçülerek [180], DPPH radikal süpürücü aktivite troloks kullanılarak çizilen standart grafiğe göre hesaplanmıştır [181].

3.2.2.6.3. ABTS Antioksidan Aktivite

Analiz için, 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic asit diammonium salt (ABTS) tartılıp (0,0960 g) bir miktar saf suda çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonra 12,25 mM'lık potasyum persulfat çözeltisi hazırlanıp bundan 5 mL ABTS çözeltisi üzerine eklenmiş ve hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan ABTS çözeltisi, 12-16 saat kadar karanlık ortamda bekletilmiştir. PBS (fosfat tamponu); 0,2 M olacak şekilde sodyum monobazik ve sodyum dibazik çözeltileriyle hazırlanmıştır. Sodyum klorür içeren PBS tamponu pH'sı 7,4'e ayarlanmıştır. Hazırlanan bu tampon örnek ve ABTS çözeltilerinin seyreltilmesinde kullanılmıştır. Analizde her bir örnekten 20 µL alınıp

üzerine, PBS ile absorbansı yaklaşık 0,7'ye ayarlanan ABTS çözeltisinden 2 mL eklenmiştir. Karışım 6 dk. karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve ardından absorbansı (UV1700 Pharmaspec, Shimadzu, Japonya) 734 nm'de ölçülerek trolox standardı ile çizilen eğri yardımıyla ABTS antioksidan aktivite eşdeğer trolox miktarı olarak hesaplanmıştır [277].

3.2.2.6.4. Fe-şelatlama Aktivitesi

Fe-şelatlama aktivitesi [183]'e göre bazı modifikasyonlar ile yapılmıştır. Ekstrakt (400 µL-3mg/mL) ve FeCl₂ (50 µL, 2 mM) karıştırılmış ve 30 dk. 25°C'de inkübe edilmiş ardından karışıma ferrozin (200 µL, 5 mM) ve etanol (3350 mL) eklenmiştir. İnkübasyona (10 dk.) bırakılan örneklerin absorbansı spektrofotometrede (UV1700 Pharmaspec, Shimadzu, Japan) 542 nm'de belirlenmiştir. Fe-şelatlama etkisi aşağıdaki denkleme göre belirlenmiştir.

$$\% = \frac{Ak - Aö}{Ak} \times 100$$

Ak: Kontrolün absorbansı ve Aö: Örneğin absorbansı

3.2.2.7. Enkapsülasyon

Bu aşamada sudaki çözünürlük, emülsiyon, dağılılabilirlik, yapışma ve film oluşturma gibi özellikleri sebebiyle maltodekstrin kullanılmıştır. Maltodekstrin oranı %2 w/w olacak şekilde bir karışım hazırlanmıştır. Bu karışım 9000 rpm'de 5 dk. homojen dağılımın sağlanması için ultraturaksta bekletilmiştir. Homojenize edilmiş karışım tamamen kuruyana kadar liyofilizatörde (Christ Alpha 1 2 LD plus, Almanya) -30°C'de, 0,04 mbar'da bekletilmiştir [274].

3.2.2.7.1. Enkapsülasyon Etkinliği

Enkapsülasyon etkinliği (EE) aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir [273].

$$\text{Eq 2.2: } EE(\%) = \frac{TPC-SFC}{TPC} \times 100$$

Yüzey fenolik madde içeriği (SFC), TPC analizinde bahsedilen yöntem ile belirlenmiştir. Mikrokapsüller (100 mg) 3 ml etanol:metanol (1:1, v: v) karışımı içinde 1 dk. karıştırıldıktan sonra analiz gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.7.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Örneklerin yapısal özelliklerinde ki değişim FTIR spektroskopisi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktlar spektral verileri spektrometre (Spectrum 400, PerkinElmer Instruments, Waltham, ABD) kullanılarak $450-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında alınmıştır. 100 tarama hızı, ve 4 cm^{-1} resolusyonda ATR ünite kullanılmıştır.

3.2.2.7.3. Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM)

Enkapsüle ekstraktların yüzey özellikleri dijital SEM (Leica LEO: S-440, Cambridge, ABD) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler ince altın tabaka ile kaplanmıştır. Görselleştirme, 25 kV'luk bir uyarma gerilimi ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.7.4. Enkapsüle Bilşenlerin Salınım Profili

Salınım profili *in vitro* mide ortamı, bağırsak ortamı ve saf su olarak 3 farklı ortam hazırlanarak incelenmiştir. Sitrik asit (0.1 M) ve disodyum hidrojen fosfat (0.2 M) solüsyonları pH 2 ve pH 8 ortamları elde etmek için sırasıyla 99:1 v/v ve 15:85 v/v hacimlerinde karıştırılmıştır. Mide ortamı hazırlanması için pH 2 solüsyonuna %0,3 oranında pepsin enzimi eklenmiştir. Bağırsak ortamı için ise %0,1 pankreatik enzim eklenmiştir. 0,1 g örnek 20 mL solüsyona eklenerek $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 0, 20, 40, 60, 120, 180 ve 240 dk.'larda örnek alınarak TPC belirlenmiştir [278].

3.2.2.7.5. Ayçiçek Yağının Oksidatif Stabilitesi Üzerine Ekstraktların Etkisinin Hızlandırılmış Depolama Koşullarında Değerlendirilmesi

Yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulyeden farklı yöntemler (MD-SİF, K-SİF ve K-su) ile elde edilen ekstraktların ayçiçek yağının oksidatif stabilitesine etkisi incelenmiştir [279]. Yapay antioksidanların yasal limiti 200 mg/kg olduğundan ekstrakt ve BHA 200 mg/kg oranında eklenmiştir. Kontrol olarak hiçbir şey eklenmeyen ayçiçek yağı kullanılmıştır. Örnekler $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat depolanmıştır. Örneklerin peroksit değerleri (PV) ve p-anisidin değerleri (p-AV) O. AOCS [280] yöntemi ile sırasıyla Cd 8b-90 ve Cd 18-90 metotları

kullanılarak ölçülmüştür. Total oksidasyon (Totox) değerleri aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır [281].

$$\text{Denklemler 2.3 } Totox = 2xPV + p - aV$$

3.2.2.8. İstatistiksel Analiz

MINITAB 17 (Minitab Ltd., Coventry, UK) programı kullanılarak %95 güven aralığında ANOVA ve Tukey testleri aracılığıyla örnekler arasındaki istatistiksel ilişki incelenmiştir. Optimizasyon için Dizayn Expert (Trial Version 7, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN) programı kullanılmıştır. Model yeterliliği, uyum eksikliği, ANOVA tarafından üretilen parametrelerin belirleme katsayısı (R^2) ve F testi ile değerlendirilmiştir.

3.3. Bulgular, Sonuç ve Tartışma

3.3.1. Mikrodalga Destekli- Sulu İki Faz (MD-SİF) Ekstraksiyon için RSM Optimizasyonu

SİF kompozisyonu fenolik bileşenlerin alt ve üst fazdaki dağılımını etkileyen önemli bir parametredir [282]. Daha önceki optimizasyon çalışmaları incelendiğinde bitkilerden polisakkarit ekstraksiyonunda etanol konsantrasyonunun %26 [81], bezelyeden genistein ve apigenin ekstraksiyonunda %28 [283], marigold çiçeğinden polifenol ve lutein ekstraksiyonunda %28 [148] seçildiği görülmüştür. Ayrıca yüksek etanol konsantrasyonlarının $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'da çökmeye sebep olarak iki fazın bozulduğu bildirilmiştir [146]. Yapılan ön çalışmalar ve literatür göz önüne alınarak çalışmada kullanılacak olan etanol konsantrasyonu %25 (w:w) olarak belirlenmiştir.

Süre (A), güç (B) ve tuz oranı (C) parametrelerinin fenolik bileşenlerin üst fazdan geri kazanımına etkisi RSM-BBD kullanılarak oluşturulan optimizasyon planına göre belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerden süre 60-300 saniye, güç 100-300W ve tuz oranı %17-23 (w:w) olarak seçilmiştir. RSM-BBD bağımsız değişkenlerin dizaynında ve cevap faktörünün değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [284].

Yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulyeden fenolik bileşenlerin geri kazanımı Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Yeşil mercimekten fenolik bileşenlerin geri kazanımının optimizasyonunda dizayn kuadratik modelin kullanılmasını önermiştir. Diğer taraftan

program nohut ve kuru fasulyeden fenolik bileşen kazanımının optimizasyonunda 2FI veya lineer modelin kullanılabileceğini önermiştir. Bu aşamada polinomial derecesi yüksek olan 2FI modeli kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Varyasyonu tamamen tahmin etmek için modellerin uygunluğunu gösteren uyumsuzluk testi modelin geçerliliğini doğrulamak için kullanılmaktadır [198]. Üç örnek içinde model uyumsuzluğu testi $>0,05$ olarak bulunmuştur. Model uyumsuzluğu sırasıyla yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulye örnekleri için 0,93, 0,76, 0,64'tür. Bağımsız değişkenlerin etkileşimi belirlemek için istatistiksel anlamlılık p değeri ile değerlendirilmiştir. ANOVA sonuçları yeşil mercimek için Tablo 3.2'de, nohut için Tablo 3.3'de ve kuru fasulye için Tablo 3.4'de verilmiştir. Üç örnek için uyumsuzluk değeri önemsiz model geçerliliği önemli bulunduğundan deneysel tasarım kabul edilmiştir. Örneklerin R^2 değerleri yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulye için sırasıyla %92, %91 ve %90 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar BBD ile oluşturulan optimizasyon modelinin anlamlı olduğunu ortaya koymaktadır. Mevcut çalışmada uygulanan modelin güvenilirliği ve doğruluğu önemli derecede yüksektir.

Tablo 3.1. BBD sonuçları

Süre (saniye) (A)	Güç (Watt) (B)	Tuz Oranı (%) (C)	Mercimek TPC (%) Geri Kazanım	Nohut TPC (%) Geri Kazanım	Kuru Fasulye TPC (%) Geri Kazanım
180,00	300,00	23,00	91,23	80,88	80,38
60,00	200,00	23,00	82,71	72,12	75,7
300,00	200,00	17,00	83,32	83,23	83,53
180,00	200,00	20,00	81,10	80,36	80,35
180,00	200,00	20,00	85,15	85,05	84,69
60,00	300,00	20,00	85,18	86,21	84,69
60,00	200,00	17,00	78,59	88,41	85,87
180,00	200,00	20,00	85,16	82,35	82,21
300,00	200,00	23,00	87,12	76,47	75,73
180,00	100,00	23,00	81,98	69,03	70,96
300,00	100,00	20,00	86,93	75,20	73,85
180,00	300,00	17,00	78,96	85,92	85,87
180,00	100,00	17,00	83,10	88,26	86,85
180,00	200,00	20,00	82,30	81,05	80,62
300,00	300,00	20,00	90,16	85,52	85,46
60,00	100,00	20,00	83,42	82,27	77,71
180,00	200,00	20,00	84,04	78,27	79,51

TPC: Toplam Fenolik İçerik

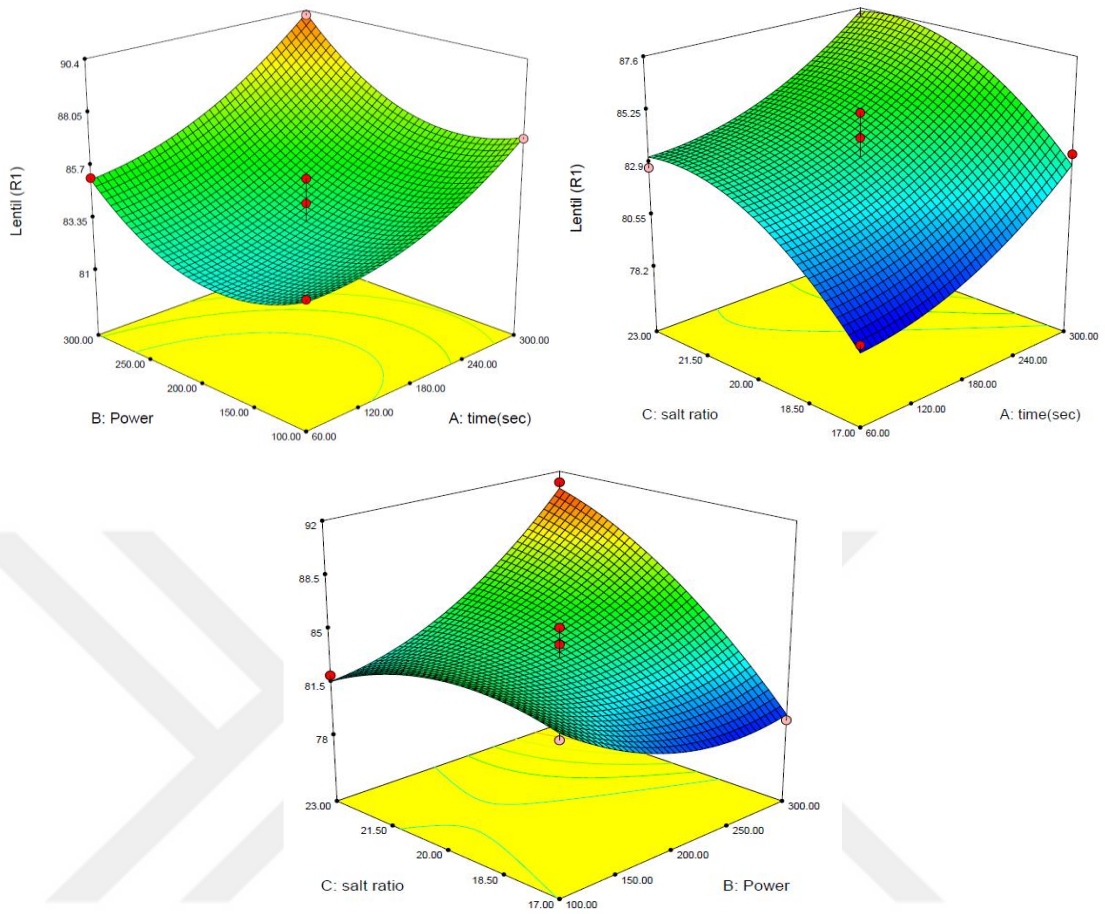
Yeşil mercimek için parametrelerinin etkileşimini ve bağımsız değişkenlerin cevap üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 3.2’de verilmiştir. Şekil 3.2-1’de yeşil mercimekten fenolik bileşenlerin geri kazanımının artan ekstraksiyon süresi ve MD gücüyle arttığı görülmektedir. Şekil 3.2’de ise azalan tuz konsantrasyonunun geri kazanımı düşürdüğü buna karşın artan uygulama süresi ile geri kazanımın attığı görülmektedir. Tablo 3.2’de süre, güç ve tuz oranının yeşil mercimekten fenolik bileşenlerin geri kazanımında önemli ($p < 0,05$) olduğu görülmektedir.

Tablo 3.2. Yeşil mercimekten TPC geri kazanımına ait ANOVA

	KT	sd	Ortalama	F
Model	9	171.18	19,02	9,28**
Süre (A)	38,82	1	38,82	18,95**
Güç (B)	12,71	1	12,71	6,21*
Tuz oranı (C)	45,46	1	45,46	22,19**
AB	0,54	1	0,54	0,26 ^{ns}
AC	0,025	1	0,03	0,01 ^{ns}
BC	44,80	1	44,80	21,87**
A²	4,14	1	4,14	2,02 ^{ns}
B²	14,87	1	14,87	7,26*
C²	10,93	1	10,93	5,33 ^{ns}
Uyum eksikliği	1,37	3	0,46	0,14 ^{ns}
R ²	0,9227			
Düz R ²	0,8233			
Tah R ²	0,7727			

(* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$; ns $P > 0,05$ istatistiksel olarak önemli değil).

KT: Kareler toplamı, sd:serbestlik derecesi



Şekil 3.2. Yeşil mercimek faktörler arasındaki etkileşimin grafikleri (3D); (A) Güç₁ ve süre; (B) tuz oranı ve süre; (C) Tuz oranı ve güç

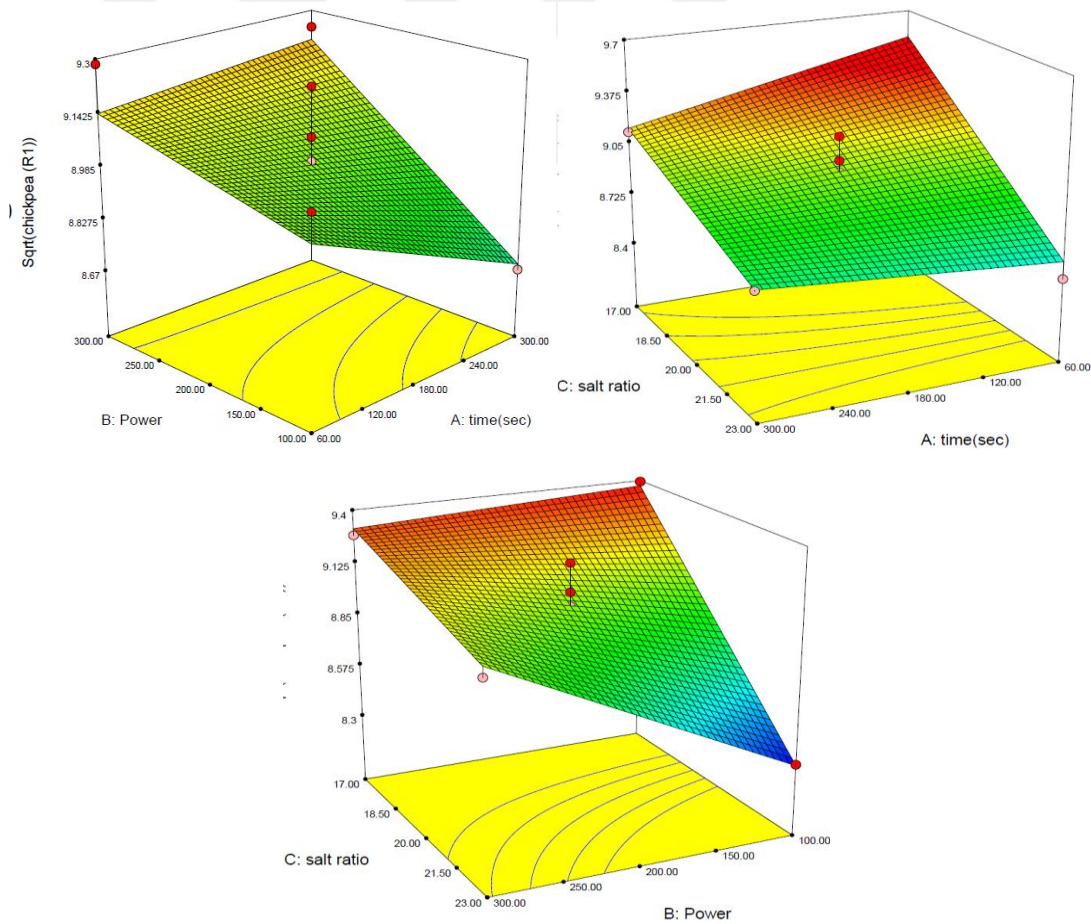
Şekil 3.3'teki 3D grafikler nohuttan fenolik bileşenlerin geri kazanımına bağımsız değişkenlerin etkisini göstermektedir. Nohut örneklerinde artan süre ile birlikte geri kazanım azalmıştır. Benzer şekilde tuz oranındaki artış cevap faktörünü negatif yönde etkilemiştir. Tüm bunların tersine artan MD gücü ile birlikte fenolik bileşenlerin geri kazanımı da artmıştır. Tablo 3.3'e göre nohuttan fenolik bileşenlerin kazanımında bağımsız değişkenlerden sürenin etkisi önemsiz bulunurken MD gücü ve tuz oranı cevap faktörü üzerine etkili bulunmuştur. Ekstraksiyon süresinin azalmasıyla verimin de azaldığı görülmektedir. Benzer şekilde, artan tuz oranı da yanıt üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Ayrıca MD gücünün artmasıyla fenolik bileşiklerin geri kazanımının arttığı belirlenmiştir.

Tablo 3.3. Nohuttan TPC geri kazanımına ait ANOVA tablosu

	KT	sd	Ortalama	F
Model	1,40	6	0,23	16,60****
Süre (A)	0,027	1	0,027	1,92 ^{ns}
Güç (B)	0,23	1	0,23	16,20***
Tuz oranı (C)	0,88	1	0,88	62,47****
AB	0,033	1	0,033	2,32 ^{ns}
AC	0,071	1	0,071	5,04*
BC	0,16	1	0,16	11,67***
Uyum eksikliği	0,063	6	0,011	0,55 ^{ns}
R ²	0,9088			
Düz R ²	0,8540			
Tah R ²	0,7354			

(* P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001; ns P>0,05 istatistiksel olarak önemli değil).

KT: Kareler toplamı, sd:serbestlik derecesi



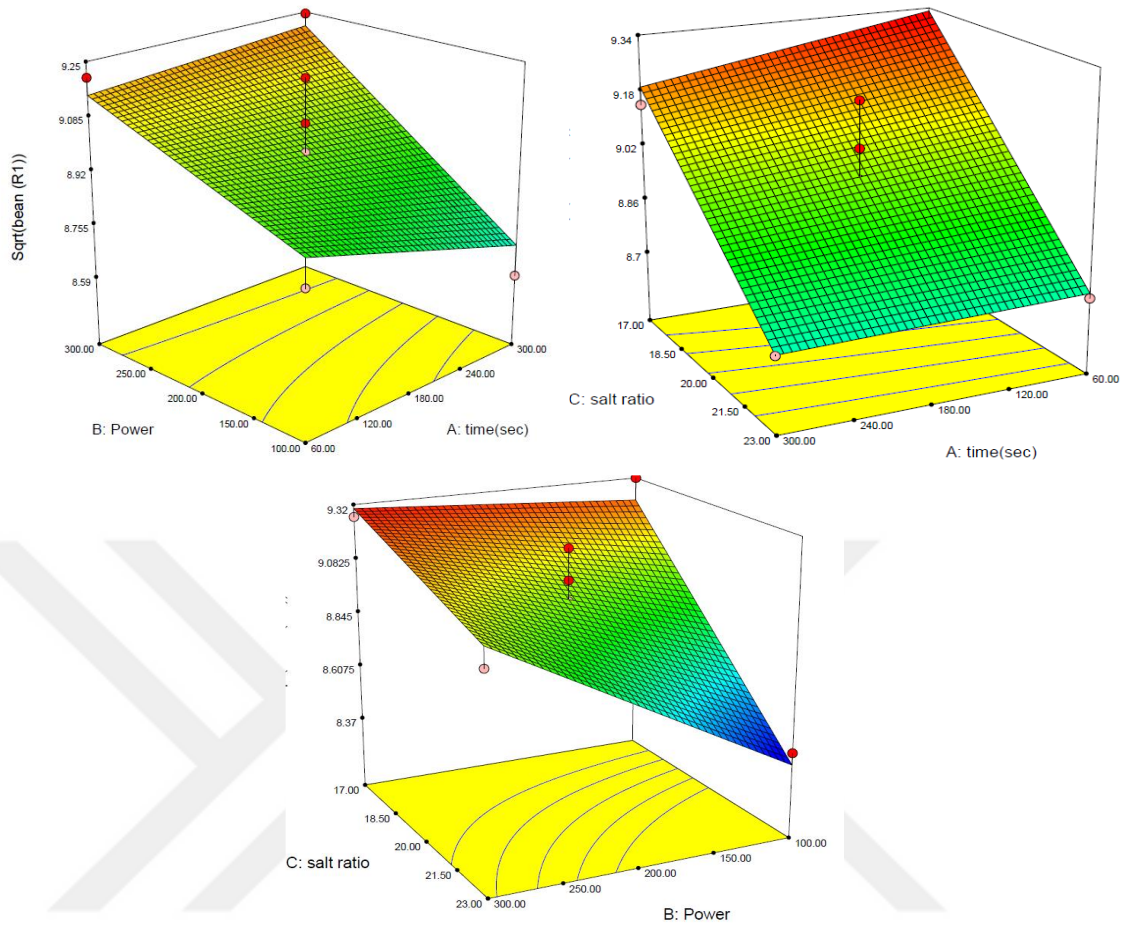
Şekil 3.3. Nohut örneği faktörler arasındaki etkileşimin grafikleri (3D); (A) Güç ve süre; (B) Tuz oranı ve süre; (C) Tuz oranı ve güç

Kuru fasulye örneğinde nohut örneğine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bağımsız değişkenlerden süre cevap faktörü üzerine etkisi önemsiz bulunurken MD gücünün ve tuz oranının fenolik bileşenlerin geri kazanımı üzerine olan etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 3.4). Şekil 3.4-1’de verilen 3D grafiklere göre ekstraksiyon süresi ve MD gücündeki artış geri kazanımda bir azalmaya sebep olmuştur. Artan tuz oranı kuru fasulyeden fenolik bileşenlerin geri kazanımı üzerine negatif bir etki göstermiştir (Şekil 3.4). Sürenin etkisi önemsiz bulunurken, MD gücü ve tuz oranının, kuru fasulyeden fenolik bileşiklerin geri kazanılması üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 3.4. Kuru fasulyeden TPC geri kazanımına ait ANOVA tablosu

	KT	sd	Ortalama	F
Model	1,02	6	0,17	15,64****
Süre (A)	0,012	1	0,012	1,11 ^{ns}
Güç (B)	0,29	1	0,29	26,93***
Tuz oranı (C)	0,60	1	0,60	55,65****
AB	0,017	1	0,017	1,60 ^{ns}
AC	3,840E-003	1	3,840E-003	0,35 ^{ns}
BC	0,088	1	0,088	8,17*
Uyum eksikliği	0,057	6	9,546E-003	0,75 ^{ns}
R ²	0,9037			
Düz R ²	0,8459			
Tah R ²	0,7142			

(* P≤0,05; **P≤0,01; *** P≤0,001; **** P≤0,0001; ns P>0,05 istatistiksel olarak önemli değil), KT: Kareler toplamı, sd:serbestlik derecesi



Şekil 3.4. Kuru fasulye örneği faktörler arasındaki etkileşimin grafikleri (3D); (A) Güç ve süre; (B) Tuz oranı ve süre; (C) Tuz oranı ve güç

3.3.1.1. Modelin Geçerliliği

RSM’de uygulanan BBD’na göre yeşil mercimek için seçilen uygun ekstraksiyon koşulları 219,11 s, 297,12 W ve %22,86 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w/w)’dır. Teorik olarak elde edilmesi gereken maksimum geri kazanım dizayn tarafında %91.37 olarak öngörülmüştür (Tablo 3.5). Yapılan deneysel çalışmalarda optimum noktada üretim gerçekleştirilmiş ve geri kazanım $\%90,32 \pm 0,1$ olarak bulunmuştur. Teorik olarak öngörülen değer ile deneysel yöntemle elde edilen veri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı dolayısıyla model, yeşil mercimekten fenolik bileşiklerin geri kazanımını tahmin etmek için kabul edilebilir düzeyde ve güvenilirlikte olduğu belirlenmiştir. Yeşil mercimek için kodlanmış faktörler açısından ikinci dereceden polinom denklemi aşağıda verilmiştir;

Denklem.3.2 $R1=83,25+2,21A+1,26B+2,38C+0,37AB-0,079AC + 3,35BC + 0,99A^2 + 1,88B^2 - 1,61C^2$

Tablo 3.5. Yeşil mercimek örneği optimizasyon sonucuna göre elde edilen optimum noktalar ve istenilirlik düzeyleri

Süre (Saniye)	Güç (W)	Tuz (%)	Geri kazanım (%)	İstenilirlik
219,11	297,12	22,86	91,37	1,00
262,89	295,45	21,99	91,66	1,00
277,47	293,27	22,88	92,83	1,00
290,70	296,14	21,97	92,64	1,00
261,07	299,36	22,90	92,81	1,00

Nohut için elde edilen optimum ekstraksiyon koşulları 98,76 s, 236 W ve % 17,20 (NH₄)₂SO₄ (w/w) olarak bulunmuştur. Model tarafından tahmin edilen fenolik bileşen geri kazanımı %88,43'tür (Tablo 3.6). Deneysel olarak optimum noktada üretilen nohut fenolik bileşen ekstraktlarının geri kazanımı ise %89,72±0,1 bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre tahmini veriyle deneysel veri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. Dolayısıyla model kabul edilebilir niteliktedir. Nohut için kodlanmış faktörlerin 2FI denklemi aşağıda verilmiştir;

Denklem 3.3 $R2=9,01-0,058A+0,17B-0,33C+0,090AB+0,13AC+0,20BC$

Tablo 3.6. Nohut örneği optimizasyon sonucuna göre elde edilen optimum noktalar ve istenilirlik düzeyleri

Süre (Saniye)	Güç (W)	Tuz (%)	Geri kazanım (%)	İstenilirlik
98,76	236,02	17,20	88,43	1,00
67,43	284,85	17,08	88,48	1,00
116,19	127,07	17,17	89,44	1,00
11,69	244,82	17,00	88,42	1,00
81,69	236,49	17,39	88,41	1,00

Fenolik bileşenlerin kuru fasulyeden MD-SİFS ile geri kazanımı için uygulanan optimizasyon çalışmasında elde edilen optimum noktalar 60,93 s, 227,62 W ve %17,01 (NH₄)₂SO₄ (w/w)'dır. Model tarafından tahmin edilen optimum nokta da fenolik bileşen geri kazanımı %,86,87'dir (Tablo 3.7). Yapılan deneysel çalışmada optimum noktada

üretileen örneklerden fenolik bileşenlerin geri kazanım oranı %88,32±0,3 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre model kabul edilebilir düzeydedir. Kuru fasulye için kodlanmış faktörlerin 2FI denklemi aşağıda verilmiştir;

Denklem.3.3 $R3=8.99-0.039A+0.19B-0.27C+0.066AB+0.031AC+0.15BC$

Tablo 3.7. Kuru fasulye örneği optimizasyon sonucuna göre elde edilen optimum noktalar ve istenilirlik düzeyleri

Süre (Saniye)	Güç (W)	Tuz (%)	Geri kazanım (%)	İstenilirlik
60,93	227,62	17,01	86,87	1,00
62,72	193,03	17,07	86,85	1,00
60,21	206,97	17,01	86,94	1,00
76,66	144,60	17,03	86,86	1,00
71,14	169,38	17,04	86,87	1,00

3.3.2. Optimum Nokta Ekstraktların Mikrodalga Destekli-Sulu İki Faz (MD-SİF)

Klasik- Sulu İki Faz (K-SİF) ve Klasik Su Ekstraktları ile Karşılaştırılması

MD-SİF' nin etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla, yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulyeden klasik SİF (K-SİF) ve klasik su ekstraksiyonu (K-su) ile elde edilen ekstraktların karşılaştırılması yapılmıştır. Ekstraktlara ait fenolik bileşenlerin konsantrasyonu TPC yöntemiyle değerlendirilmiştir. Ekstraktların antioksidan özellikleri ise DPPH radikal süpürücü aktivite, ABTS yöntemiyle antioksidan aktivite ve Fe-şelatlama özellikleri ölçülerek karşılaştırılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki, MD-SİF üç baklagilden de fenolik bileşen ekstraksiyonu için en etkin yöntemdir (Şekil 3.5). MD-SİF işleminde numune üst faz ile alt faz arasına yerleştirilmiştir. Rotasyonlara, ve çarpışmaya neden olan MD alanının etkisi ile moleküller, numune matrisinden alt faza ve alt fazdan üst faza çok fazlı bir kütle transferi göstermiştir. Yüksek frekanslı MD ve iki fazlı sistem arasındaki etki sayesinde daha kolay bir hücre yırtılması meydana gelmiştir. Sonuç olarak da ekstraksiyon etkinliği MD-SİF'de diğer yöntemlere göre daha yüksek bulunmuştur [81].

Şekil 3.5-a'da TPC analizinin sonuçları verilmiştir. Metotlar arasında ki farkın önemli olduğu görülmektedir. Yeşil mercimek için MD-SİF ekstraktının TPC değeri K-su ile elde edilen ekstraktan oldukça yüksektir. Diğer taraftan nohut ve kuru fasulye örneklerinde K-

SİF ekstraktlarının TPC değerleri MD-SİF ve K-su'dan yüksek bulunmuştur. Ancak uygulama süresi göz önüne alındığında MD-SİF zaman tasarruf açısından daha etkindir. Sonuçlara göre MD-SİF daha etkili ve hızlı bir ekstraksiyon yöntemidir. Yapılan bir çalışmada, polisakkaritlerin ekstraksiyonunda MD-SİF yöntemi ısıtma geri akış ekstraksiyon ve UD su ekstraksiyonu ile karşılaştırılmıştır. MD-SİF yöntemi diğer yöntemlere kıyasla daha etkili bulunmuştur [81]. Yeşil mercimek ekstraktlarının TPC değerleri MD-SİF, K-SİF ve K-su için sırasıyla $6,7 \pm 0,13$, $5,9 \pm 0,27$, ve $1,9 \pm 0,01$ mg GAE/g olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde 10 farklı yeşil mercimek türünün %70 metanol kullanılarak elde edilen ekstraktlarının TPC değerleri $5,34 \pm 0,30$ ve $6,78 \pm 0,30$ mg GAE/g arasında bildirilmiştir [285].

Mevcut çalışmada nohut örneklerinin TPC değerleri MD-SİF, K- SİF ve K-su için sırasıyla $2,1 \pm 0,01$, $1,8 \pm 0,01$ ve $1,0 \pm 0,01$ mg GAE/g olarak bulunmuştur. Dört farklı nohut örneğinin TPC değerleri $0,92$ - $1,12$ mg GAE/g olarak bildirilmiştir [286]. Bir diğer çalışmada nohut örneklerinin TPC değerleri $2,5$ mg GAE/g'dan daha düşük bulunmuştur [287].

Kuru fasulye için, K-SİF ekstraktlarının TPC değerleri ($1,9 \pm 0,06$ mg GAE/g) diğer yöntemlerle elde edilen ekstraktlara göre daha yüksektir (Şekil 3.5-a). Ancak ekstraksiyon süresi göz önüne alındığında MD-SİF tekniğinin daha etkin olduğu söylenebilir. MD-SİF tekniğinin sokshlet ekstraksiyonu, ısı geri dönüşüm ekstraksiyonu ve SİF ile karşılaştırdığı çalışmada üzüm çekirdeğinden fenolik bileşen ekstrakte edilmiş ve TPC değerleri MD-SİF, sokshlet ekstraksiyonu, ısı geri dönüşüm ekstraksiyonu ve SİF için sırasıyla $82,7$ $57,1$ mg GAE/g, $72,1$ mg GAE/g, $80,5$ mg GAE/g bulunmuştur [143]. Görülmektedir ki MD-SİF en yüksek TPC değerinin elde edilmesini sağlamıştır. Üstelik MD-SİF tekniğinde daha düşük çözücü tüketimi ve daha kısa ekstraksiyon yöntemi uygulandığı bildirilmiştir. MD-SİF'de faz ayrımı meydana gelir ve üst faz fenolik bileşiklerden zengindir. Ayrıca, bileşenler ekstraksiyon çözücünün uzaklaştırılmasıyla daha kolay elde edilebilir ve saflaştırılabilir [143]

3.3.2.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite

Ekstaktların DPPH radikal süpürücü aktivite özellikleri Şekil 3.5-b'de verilmiştir. Yapılan bir çalışmada TPC değeri ile DPPH radikal süpürücü aktivite ABTS ile

antioksidan kapasite ve Fe-şelatlama özellikleri arasında lineer bir ilişki olduğu bildirilmiştir [288]. Mevcut çalışmada da bu lineer ilişki dikkat çekmektedir. Yeşil mercimek örneğinde TPC değerinin yüksek olduğu ekstraktlarda antioksidan aktivitede yüksek bulunmuştur. MD-SİF, K-SİF ve K-su ekstraktlarının süpürücü değerleri sırasıyla $70,99 \pm 1,96$, $65,36 \pm 0,05$ ve $21,11 \pm 0,04$ $\mu\text{mol TE/g}$ olarak bulunmuştur. Mercimek çeşitlerinin fenolik bileşen profili ve bu profilin antioksidan aktivite üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, DPPH süpürücü aktivite değerlerinin $23,83$ ve $35,03$ $\mu\text{mol TE/g}$ arasında değiştiği, ayrıca fenolik bileşenlerden özellikle mercimek örneklerinden elde edilen ekstraktlarda bulunan kondense taninlerin DPPH süpürücü aktivitesi üzerine etkili olduğu bildirilmiştir [285]. Bir diğer mercimek çalışması DPPH süpürücü aktivitenin ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak $5031,6$ $\mu\text{mol TE/100 g}$ ve $677,8$ $\mu\text{mol TE/100g}$ arasında değiştiğini belirlemiştir [289].

MD-SİF yöntemiyle nohut örneklerinden elde edilen ekstraktların DPPH süpürücü aktivitesi $7,60 \pm 0,00$ $\mu\text{mol TE/g}$ olarak bulunmuştur. En düşük değer ise K-su ekstraktında $3,40 \pm 0,06$ $\mu\text{mol TE/g}$ olarak bulunmuştur. Nohut örneklerinden %50 aseton:su karışımıyla elde edilen ekstraktların DPPH süpürücü aktiviteleri 1.05 – 1.24 $\mu\text{mol TE/g}$ arasında bulunmuştur [290]. Yapılan bir başka çalışmada %80 metanol kullanılarak farklı genotipteki nohutlardan elde edilen ekstraktların süpürücü aktiviteleri 52 ve 1650 $\mu\text{mol TE/100 g}$ olarak bulunmuş ve antioksidan aktivitenin TPC'den önemli derece etkilendiği belirtilmiştir [286].

Kuru fasulye sadece diyet liflerince zengin değildir aynı zamanda zengin bir flavonoid ve fenolik bileşen içeriğine sahiptir [291]. Mevcut çalışmada kuru fasulye ekstraktlarından elde edilen DPPH süpürücü aktivite değerleri MD-SİF, K-SİF ve K-su için sırasıyla $9,68 \pm 0,3$ $\mu\text{mol TE/g}$, $6,44 \pm 0,43$ ve $4,25 \pm 0,00$ $\mu\text{mol TE/g}$ 'dir. Farklı ön işlemlerin kuru fasulye içeriğindeki antioksidanlara etkisinin araştırıldığı bir çalışmada DPPH süpürücü aktivite en düşük %43,9 bulunurken en yüksek %62,61 olarak bulunmuştur [291]. Fasulye türleri ile yapılan bir çalışmada DPPH radikal süpürücü aktivite siyah fasulye için $5,97$ $\mu\text{mol TE/g}$, maş fasulyesi için $3,72$ $\mu\text{mol TE/g}$, börülce için $5,27$ $\mu\text{mol TE/g}$ ve soya fasulyesi için $3,22$ $\mu\text{mol TE/g}$ olarak bildirilmiştir [292].

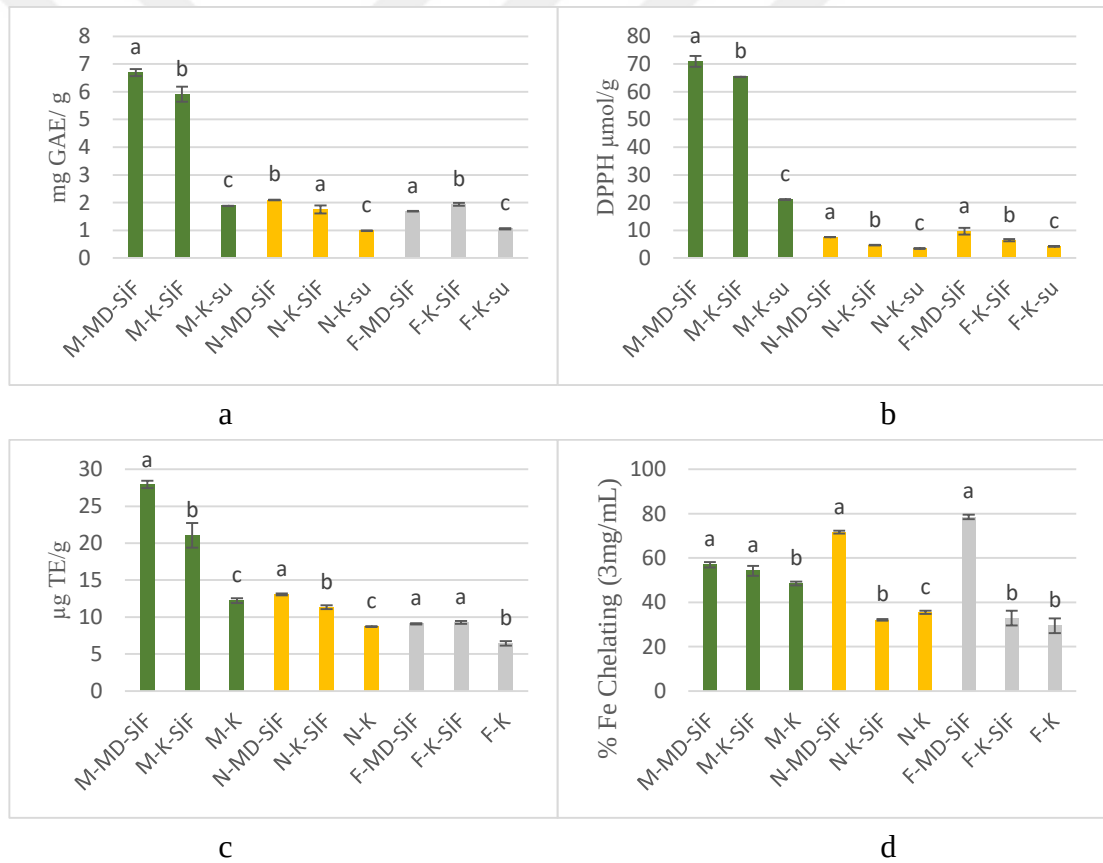
3.3.2.2. ABTS Antioksidan Aktivite

Bileşiklerin antioksidan aktivitelerini belirlemek için kullanılan yaygın yöntemlerden biri de hem organik çözücülerde hem de suda çözünebilen bir radikal olan ABTS radikalının kullanılmasıdır. Eğer ortamda antioksidan bileşen yoksa ABTS radikali stabildir. Ancak antioksidan bulunması durumunda hidrojen ile hızlı bir reaksiyona girerek ortamdaki koyu rengin açılmasını sağlar [293]. Baklagillerin antioksidan aktiviteleri meyve ve meyve suları ile hemen hemen eşdeğerdir ya da daha yüksektir bu sebeple baklagiller iyi antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir [287]. Mevcut çalışmada yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulye için elde edilen ABTS sonuçları Şekil 3.5-c’de verilmiştir. Yeşil mercimek için sonuçlar MD- SİF, K- SİF ve K-su için sırasıyla $28,0 \pm 0,5$, $21,1 \pm 1,7$ ve $12,2 \pm 0,3$ mg TE/g olarak bulunmuştur. Bir çalışma mercimeklerinin ABTS değerleri $41,5$ mg TE/g olarak bildirmiştir [289]. Benzer şekilde nohut ve kuru fasulye örneklerinde de en yüksek sonuç MD-SİF (sırasıyla $13,1 \pm 0,1$ ve $9,1 \pm 0,1$ mg TE/g) ekstraktından alınmıştır. Sonuçlar göstermektedir ki MD-SİF yöntemi ile elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri daha yüksektir. K-SİF değerleri ise K-su’dan daha yüksektir. Benzer sonuçlar üzüm çekirdeği [143], marigold çiçeği [148] ve meyve [80] materyali kullanılarak yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir.

3.3.2.3. Fe-şelatlama Aktivitesi

Ekstraktların demir şelatlama aktivitesi, DPPH radikal süpürücü aktivite ve ABTS antioksidan aktivite testi ile benzer nitelikte olduğu görülmektedir. MD-SİF ekstraktları üç örnek için tüm ekstraksiyon yöntemleri arasında en yüksek Fe-şelatlama aktivitesi göstermiştir. Yeşil mercimek, nohut, kuru fasulye örneklerinden elde edilen MD-SİF ekstraktlarının Fe-şelatlama aktivitesi sırasıyla $56,9 \pm 1,20$, $71,64 \pm 0,60$ ve $78,6 \pm 1,02$ bulunmuştur. Üç örnek için de indirgeme kapasitesi en düşük sonuçlar K ekstraktlarından alınmıştır (Şekil 3.5-d). Yapılan bir çalışmada at yemi (horse gram), börülce ve nohut ekstraktlarının ($300 \mu\text{g/mL}$) demir iyonlarının Fe-şelatlama aktivitesi sırasıyla 48 , $37,10$ ve $40,20$ olarak bulunmuştur [294]. Mevcut çalışmada TPC değeri yüksek olan MD-SİF ekstraktlarının yüksek Fe-şelatlama aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Üç örnek içinde MD-SİF ekstraktlarının Fe-şelatlama aktivitesi incelendiğinde en yüksek değer kuru fasulye ekstraktında olduğu görülmektedir.

Yapılan bir çalışmada ısıtıl işlem görmüş nohut ve kuru fasulye örneklerinin Fe-şelatlama aktivitesinin sırasıyla 50 ve 70 μmol EDTA/g olduğu bildirilmiştir [295]. Fenolik bileşenlerde yer alan fonksiyonel gruplar peroksidasyonun oksitlenmiş ara ürünlerinin oluşumunun önlenmesinde önemli bir role sahiptir. Fenolik bileşenler hidrojen transfer mekanizmasında rol oynayarak metal aktivitelerini önlemektedir. Özellikle embriyonik axe fraksiyonlarında (hipokotil) bulunan puls izoflavonlarının, tohum kabuğu fraksiyonlarına ve kotiledonlara göre daha yüksek Fe-şelatlama aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir [296]. Ayrıca lizin, arjinin, aspartik asit, glutamik asit ve histidine gibi kuru fasulye ve nohut albuminlerinde bulunan bazı amino asitlerin metal şelatlayıcı özellikler gösterdiği ifade edilmiştir [297].



M-MD-SİF: Yeşil mercimek MD- sulu iki faz ekstraktları; M-K-SİF: Yeşil mercimek klasik SİF ekstraktları; M-K: Yeşil mercimek klasik su ekstraktları; N-K-SİF: Nohut MD- sulu iki faz ekstraktları; N-K-SİF: Nohut klasik SİF; N-K: Nohut klasik su ekstraktları; F-MD-SİF: Kuru fasulye MD-sulu iki faz ekstraktları; F-K-SİF: Kuru fasulye klasik SİF ekstraktları; F-K: Kuru fasulye klasik su ekstraktları a-b; aynı renkli sütunlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemini göstermektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 3.5. Farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktların TPC, DPPH süpürücü aktivite, ABTS antioksidan aktivite ve Fe-şelatlama aktivite değerleri

3.3.3. Enkapsülasyon

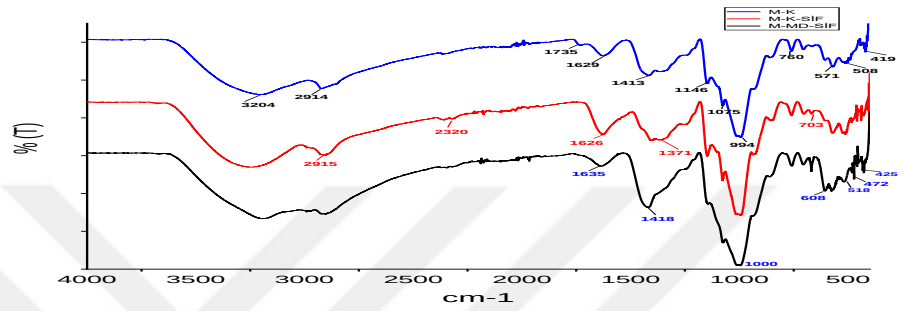
3.3.3.1. Enkapsülasyon Etkinliği

TPC ve SPC arasındaki fark göz önüne alınarak enkapsülasyon etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuçlar yeşil mercimek MD-SİF, K-SİF ve K ekstraktlarının enkapsülasyonu için sırasıyla %88,7, %89,8 ve %89,1 olarak bulunmuştur. Nohut örneklerinden MD-SİF, K-SİF ve K yöntemleri ile elde edilen ekstraktların enkapsülasyon etkinlikleri için sırasıyla %87,9, %89,1 ve %87,3 olarak bulunmuştur. Kuru fasulye MD-SİF, K-SİF ve K-su ekstraktlarına ait enkapsülasyon etkinliği sırasıyla %87,5, %89,8 ve %89,5'tir. Enkapsülasyon etkinliği kullanılan duvar materyalinden ve enkapsülasyon yöntemlerinden etkilenir. Fenolik bileşenlerin enkapsülasyonu çalışmasında enkapsülasyon etkinlikleri kitosan, B-siklokitosan ve ksantan için %91,1, %80 ve %77,5 olarak bulunmuştur [298].

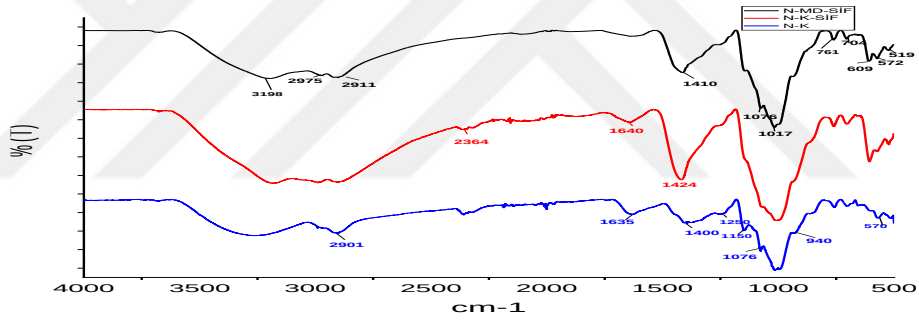
3.3.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

FTIR spektroskopisi, maddelerin doğal bağ yapısını ve maddelerin farklı uygulamalardaki moleküler davranışlarını anlamaya yardımcı olan çok önemli bir yöntemdir. IR spektrumları ile moleküler bağlar, nitelik, kalite, değişiklikler ve safsızlıklar belirlenebilir [299]. MD-SİF, K-SİF ve K-su yöntemleri kullanılarak elde edilen ekstraktların mikrokapsüllerine ait FTIR spektrumları Şekil 3.6 (a-b-c)'de verilmiştir. 3200-3600 cm^{-1} arasındaki bantlar fenolik bileşenlerin O-H gerilmelerine aittir. Tüm ekstraksiyon yöntemleri ve üç örnek için enkapsüle fenolik bileşen ekstraktlarının bantların 3200 cm^{-1} 'de bir pik oluşturduğu görülmektedir. 2850-2970 cm^{-1} arasında ki pikler aromatik grup C-H gerilimlerinden kaynaklanmaktadır. 1580-1650 cm^{-1} arası aminlerin N-H bükülmelerini ve 1450-1400 cm^{-1} arası örneklerin N-N gerilimlerini göstermektedir (Şekil 3.6). 1300-1000 cm^{-1} C-O gerilmelerini gösterir ve bu gerilimler fenol, alkol, ester ve karboksilik asitlerin varlığı ile ilişkilendirilir [274]. Enkapsüle edilmiş fenolik bileşen ekstraktlarına ait zayıf ve keskin pikler incelendiğinde, kapsüllerin fenoller ve flavonoidler gibi fitokimyasalları fazlaca içerdiği ve MD-SİF ve K-SİF ekstraktlarına ait örneklerin piklerinin daha keskin olduğu görülmektedir. 1400 cm^{-1} civarındaki bölge incelendiğinde üç ekstrakt arasında farklılıklar görülmektedir. 1370 cm^{-1} civarında M-MD-SİF ve M-K-SİF örnekleri M-K-su'ya bakarak daha keskin

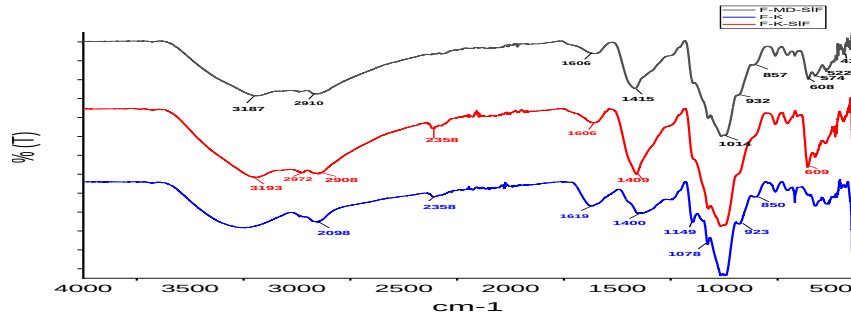
pikler vermiştir. Benzer şekilde N-MD-SİF, N-K-SİF aynı bölgede N-K-su'den daha keskin piklere sahiptir. Yine aynı bölgede F-MD-SİF ve F-K-SİF F-K-su'den farklıdır. 1470–1435 cm^{-1} bölgesinde FA pikleri mevcuttur [300]. MD ve SİF'nin FA ekstraksiyon miktarını arttırdığı düşünülebilir. Tıbbi bitkilerden polisakkarit ekstraksiyonunun MD-SİF ile gerçekleştirildiği bir çalışmada MD-SİF ile alınan örneklerin FTIR spektrumlarının farklı olduğu bildirilmiştir [145].



Yeşil mercimek (a)



Nohut (b)



Kuru fasulye (c)

M-MD-SİF: Yeşil mercimek MD-sulu iki faz ekstraktları; M-K-SİF: Yeşil mercimek klasik SİF ekstraktları; M-K: Yeşil mercimek klasik su ekstraktları; N-K-SİF: Nohut MD- sulu iki faz ekstraktları; N-K-SİF: Nohut klasik SİF; N-K: Nohut klasik su ekstraktları; F-MD-SİF: Kuru fasulye MD-sulu iki faz ekstraktları; F-K-SİF: Kuru fasulye klasik SİF ekstraktları; F-K: Kuru fasulye klasik su ekstraktları

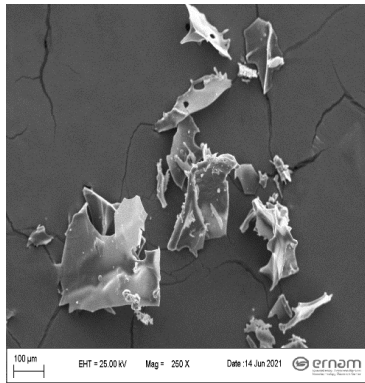
Şekil 3.6. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların FTIR spektrumları

3.3.3.3. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

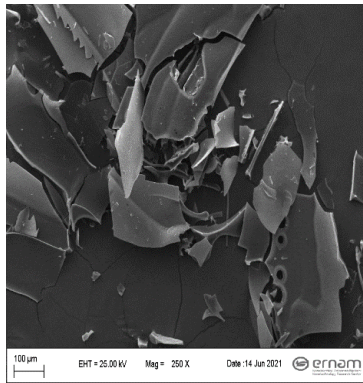
Enkapsülasyon uygulanmasının en temel amacı fenolik bileşen ekstraktlarını dış etkenlerden korumaktır. Bu sebeple farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak üç farklı baklagilden alınan fenolik bileşen ekstraktları maltodekstrinin kullanılarak liyofilizasyon yöntemiyle enkapsüle edilmiştir. SİF ile alınan örneklerin kapsüllerinin benzer yüzeylere sahip olduğu Şekil 3.7’de görülmektedir. Kesin çizgilerle örnek yapılarının birbirinden farklı olmadığı, K ile elde edilen ekstraktların enkapsülasyon ürünlerinin SEM görüntüleri liyofilizasyon yönteminde elde edilmesi gerektiği gibi olduğu görülmüştür. Yapının yüzeyinde çatlak ve porların görünmemesi ekstraktların duvar malzemesi ile tamamen kaplandığını göstermektedir [301]. Liyofilizasyon yöntemiyle elde edilen mikroenkapsüllerin düzensiz ve kırık cam görüntüsü verdiği bilinmektedir. Mevcut çalışmada, SEM görüntüleri mikrokapsüllerin düzensiz yapıda ve kırık cam görüntüsünde olduğunu göstermektedir. Liyofilizasyon yöntemi ile benzer görüntülerin elde edildiği yapılan karşılaştırma çalışmalarında bildirilmiştir [302].

3.2.3.4. Enkapsüle Fenolik Bileşiklerin Salınım Profili

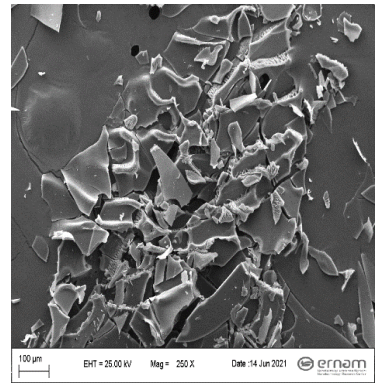
Gıda üretiminde kullanılan enkapsüle partiküllerin kontrollü salınımı, üretim sürecinde biyoaktif bileşikler kaybolabileceğinden son derece önemlidir [303]. Bu çalışmada duvar malzemesi olarak maltodekstrin kullanılarak ekstraksiyon yönteminin salınım profiline etkisi değerlendirilmiştir. Yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulyeden ekstrakte edilen enkapsüle fenolik bileşiklerin salınım profilleri suda, simüle edilmiş GFS ve IFS’de değerlendirilmiştir. MD’nın salınım profilini yavaşlattığı bildirilmiştir [304, 305]. Genel olarak MD-SİF’nin enkapsüle ekstraktlarının salım profilinin K-SİF ve K-su’dan daha yavaş olduğu görülmüştür.



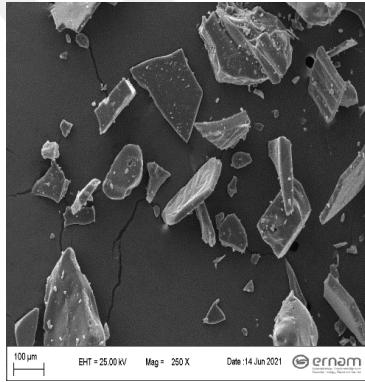
M-MD-SİF



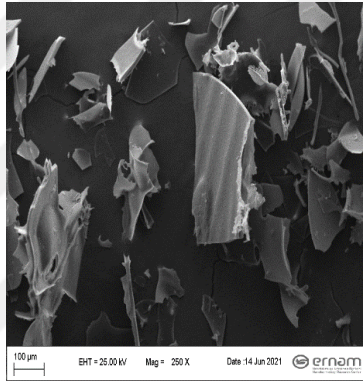
M-K-SİF



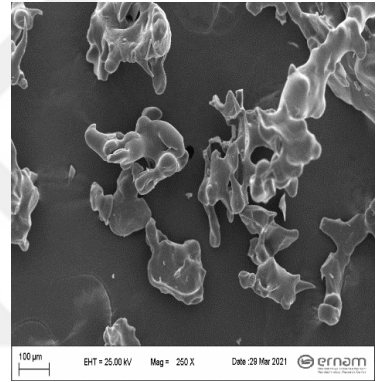
M-K-su



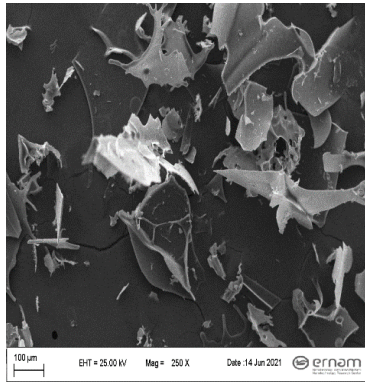
N-MD-SİF



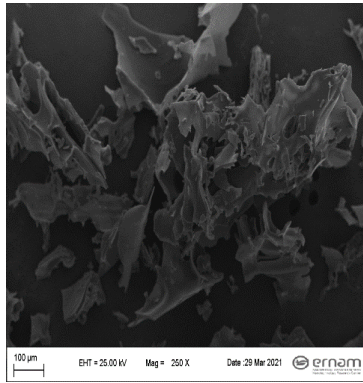
N-K-SİF



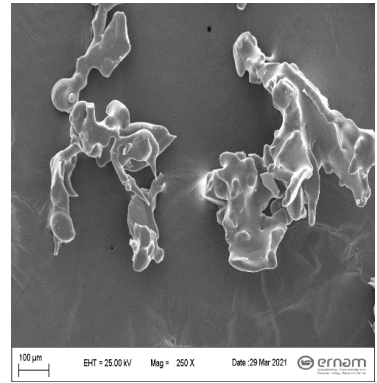
N-K-su



K-MD-SİF



F-K-SİF

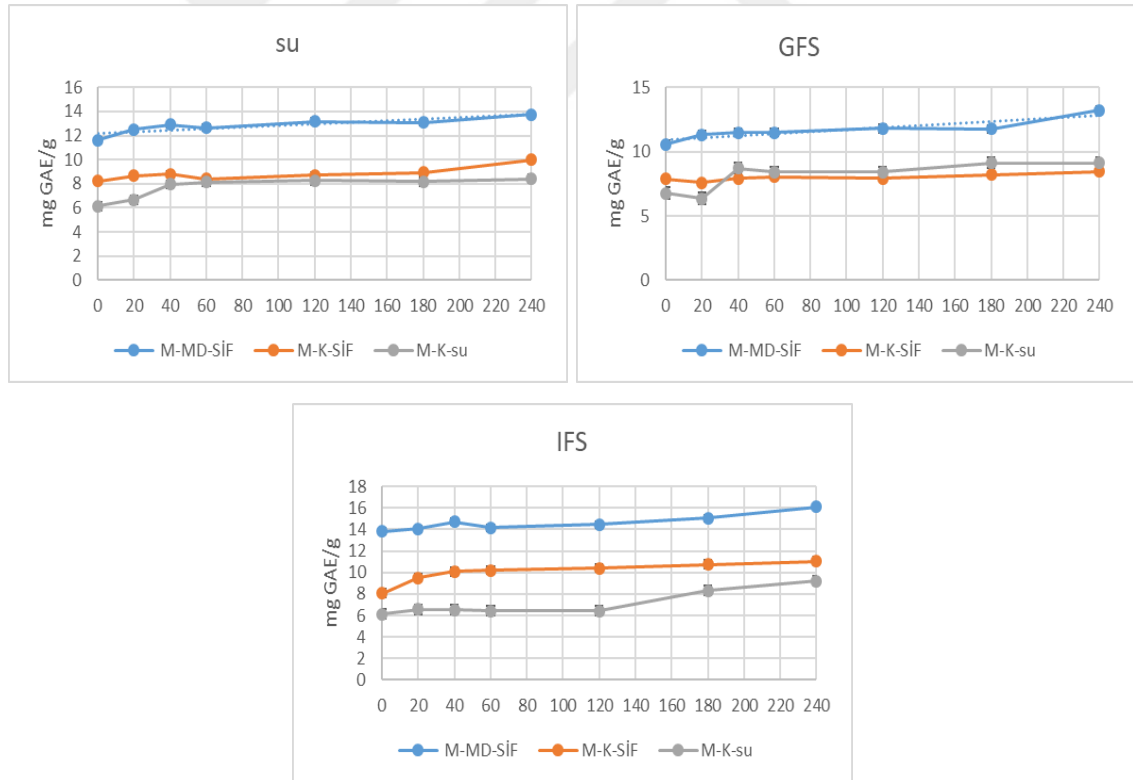


F-K-su

M-MD-SİF: Yeşil mercimek MD-sulu iki faz ekstraktları; M-K-SİF: Yeşil mercimek klasik SİF ekstraktları; M-K-su: Yeşil mercimek klasik su ekstraktları; N-K-SİF: Nohut MD-sulu iki faz ekstraktları; N-K-SİF: Nohut klasik SİF; N-K-su: Nohut klasik su ekstraktları; F-MD-SİF: Kuru fasulye MD-sulu iki faz ekstraktları; F-K-SİF: Kuru fasulye klasik SİF ekstraktları; F-K-su: Kuru fasulye klasik su ekstraktları.

Şekil 3.7. Farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktların maltodekstrin enkapsülasyonuna ait SEM görüntüleri

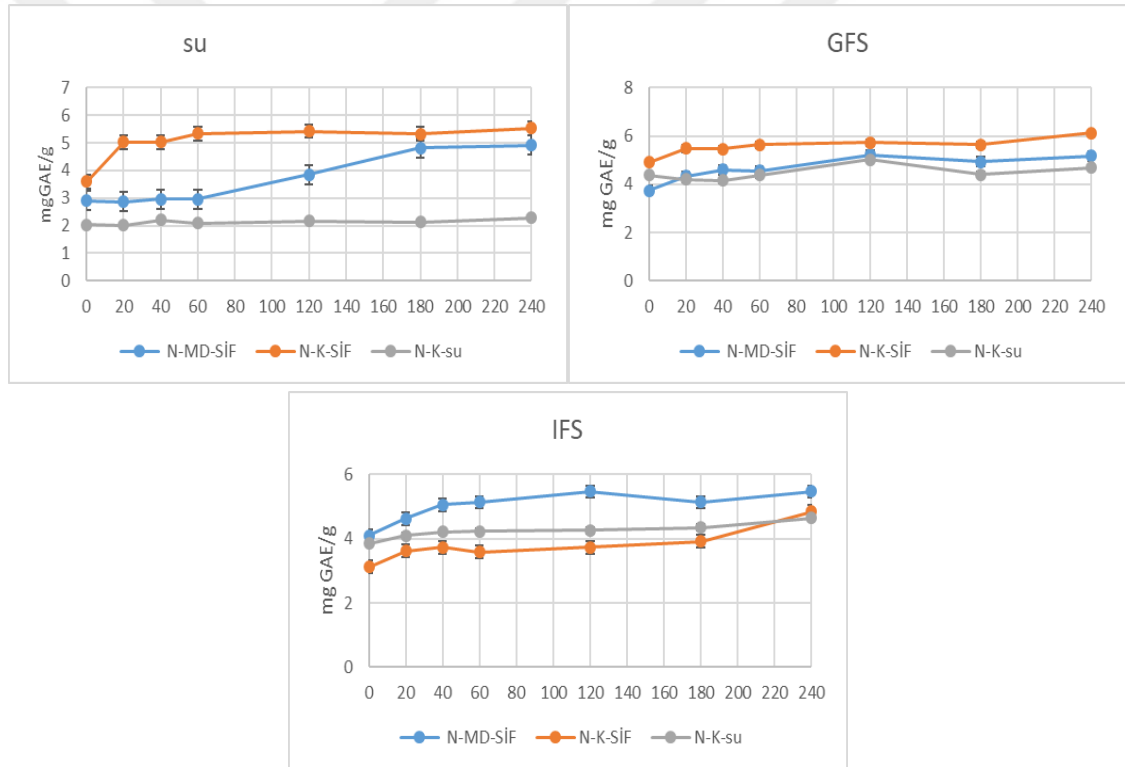
Enkapsüle yeşil mercimek ekstraktlarının salınım profili, su ve GFS'de hemen hemen aynı olduğu görülmüştür. Su ortamında MD-SİF örneği daha doğrusal ve yavaş bir salınım gösterirken K-su örneğinin 60. dk.'da neredeyse tüm kapsül içeriği serbest kalmıştır. GFS'deki fenolik bileşiklerin salınımları dikkate alındığında, K-su örneğine ait mikropartiküller 40 dk. sonra yüksek salınım gösterirken, K-SİF ve K için toplam içeriğin 180. dk.da serbest kalmıştır (Şekil 3.8-a). GFS ortamında MD-SİF örneğinin salınımının 180 ve 240. dk.lar arasında artış göstermiştir (Şekil 3.8-b). IFS ortamı için K-su örneğine ait kapsüllerden fenolik bileşenlerin salınımının 120. dk'dan sonra hız kazanmış, K-SİF örneğinden salınımın 60. dk.'ya kadar daha hızlı gerçekleşip bu noktadan sonra daha yavaşlamış, MD-SİF örneği için ise salınım 120 ve 240 dk.'lar arasında daha hızlı artış göstermiştir (Şekil 3.8-c). Üç ortam için MD-SİF ile elde edilen ekstraktların kapsüllerinin 240. dk'ya kadar fenolik bileşiklerin salınımı sürekli olarak artmıştır (Şekil 3.8).



M-MD-SİF: Yeşil mercimek MD- sulu iki faz ekstraktları; M-K-SİF: Yeşil mercimek klasik SİF ekstraktları; M-K-su: Yeşil mercimek klasik su ekstraktları

Şekil 3.8. Enkapsüle mercimek ekstraktların farklı ortamlarda salınım profilleri

Nohutun salınım profilleri su, GFS ve IFS için Şekil 3.9'da verilmiştir. Su ortamında MD-SİF ve K-su ekstraktlarına ait örneklerin sürekli artan bir salınım profili sergilemiş MD-SİF örneğinin 180. dk.'da yaklaşık tamamı ortama salınmıştır. K-su örneğinin ise salınım profilinin ise süre boyunca sabit kalmıştır (Şekil 3.9-a). Nohut ekstraktlarının GFS ortamındaki salınımı incelendiğinde salınımın 120. dk.ya kadar gerçekleştiği daha sonra sabit kaldığı söylenebilir (Şekil 3.9-b). IFS ortamı için ise MD-SİF örneğinin 240. dk.'ya kadar sürekli artan bir salınım gösterdiği, K örneği için ise başlangıç salınım değeri ile 240. dk. arasında çok fark olmadığı salınımın daha hızlı gerçekleştiği söylenebilir. IFS ortamında K-SİF örneğinin salınımı diğer örneklere bakarak süre boyunca daha doğrusal bir salınım göstermiştir (Şekil 3.9-c).



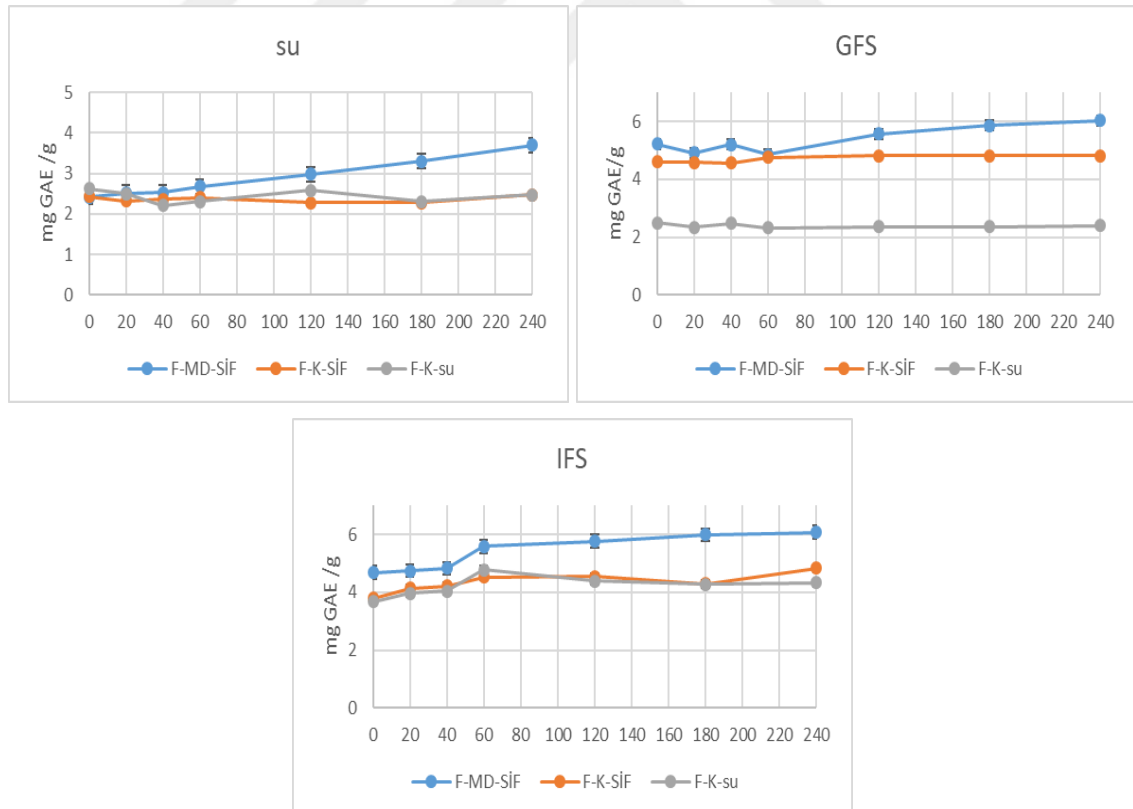
N-MD-SİF: Nohut MD- sulu iki faz ekstraktları; N-K-SİF: Nohut klasik SİF; N-K-su: Nohut klasik su ekstraktları GFS IFS

Şekil 3.9. Enkapsüle nohut ekstraktların farklı ortamlarda salınım profilleri

Kuru fasulye ekstraktlarından elde edilen mikro partiküllerin salım profili incelendiğinde, su ortamında MD-SİF örneğine ait kapsüllerden fenolik bileşenlerin 0. dk'dan 240. dk.'ya kadar hızla artan bir salınımına sahip olduğu görülmüştür. K-su örneğinin salınımı 120. dk.'da maksimuma ulaşmış, K-SİF örneğinin salınımı ise 180-240. dk. arasında daha

hızlı olmuştur (Şekil 3.10-a). GFS ortamında MD-SİF örnekleri ilk 60 dk.'da sabit bir salınım gösterirken 60. dk.'dan sonra salınım hızı artmıştır. K-SİF örneklerine ait ekstraktların kapüllerinden fenolik bileşen salınımı incelendiğinde 40. dk.'dan sonra salınım gerçekleştiği, K-su örneğinin ise salınımın sabit seyrettiği görülmektedir (Şekil 3.10-b). IFS ortamına MD-SİF için bakıldığında 40-60. dk. arasında daha hızlı bir artış olduğu salınımın 240. dk.'ya kadar devam ettiği görülmektedir. Hem K-SİF hem de K-su örneklerinin salınımı 60. dk.'da hemen hemen tamamlanmıştır (Şekil 3.10-c).

Mide koşullarında, duvar malzemeleri enkapsüle maddeyi korumalıdır. Öte yandan, besinler ve vitaminler bağırsak sisteminde emildiğinden, malzemelerin bağırsak sıvılarına yavaş yavaş salınması gerekir [306]. Bu çalışmada, maltodekstrinin, tüm ekstraksiyon yöntemleri esas alındığında üç örnek için GFS'deki fenolik bileşikler korumak için yetersiz olduğu, buna rağmen, salınım profili GFS ortamında, üç baklagil içinde IFS'den biraz daha düşük bulunmuştur.



DB-MD-SİF: Kuru fasulye MD- sulu iki faz ekstraktları; DB-K-SİF: Kuru fasulye klasik SİF ekstraktları; DB-K-su: Kuru fasulye klasik su ekstraktları. GFS IFS

Şekil 3.10. Enkapsüle nohut ekstraktların farklı ortamlarda salınım profilleri

3.2.3.5. Hızlandırılmış Depolama Koşullarında Enkapsüle Ekstraktların Ayçiçek Yağının Oksidatif Kararlılığına Etkisi

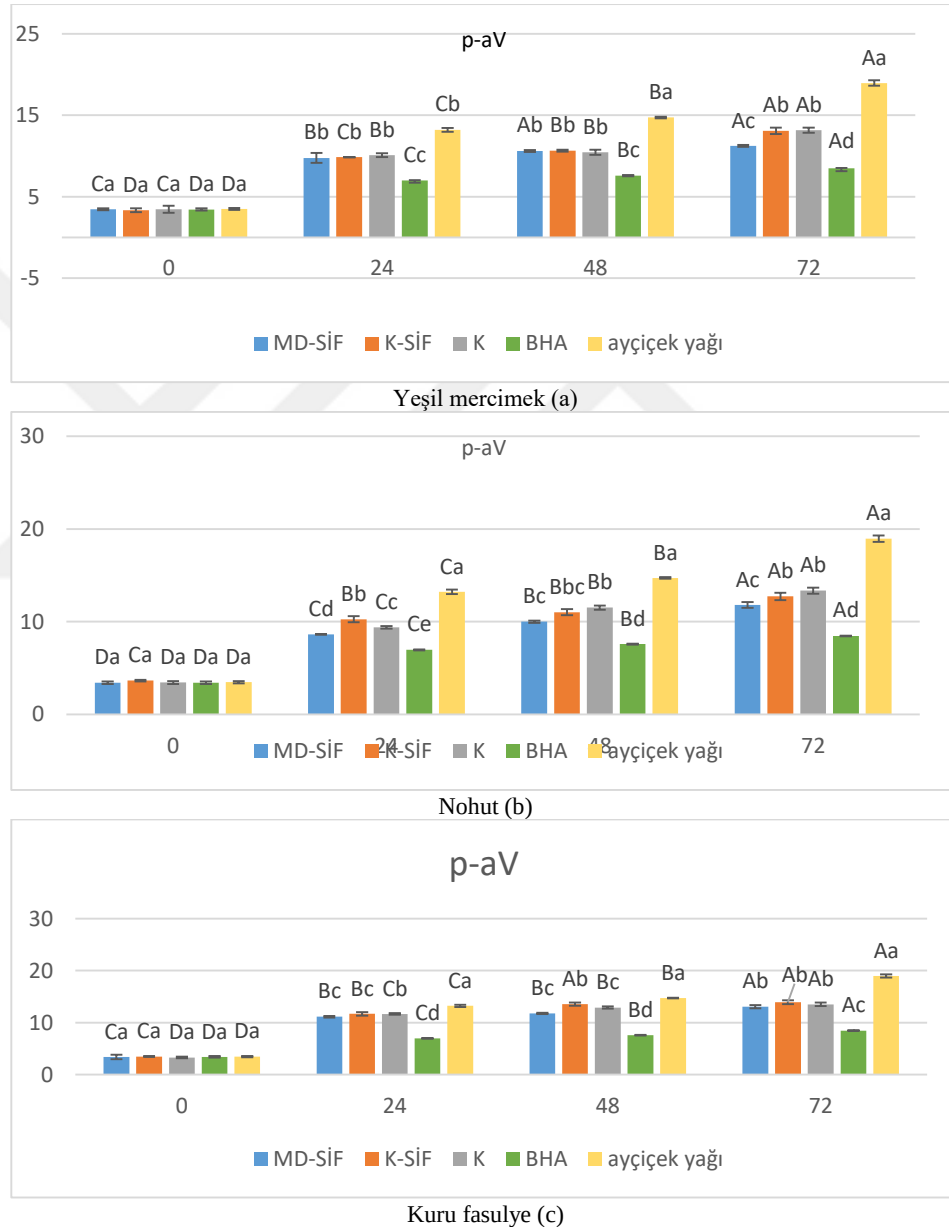
P-anisidin değeri (p-aV) genellikle ikincil lipit oksidasyonunu değerlendirmek için kullanılmaktadır [307]. Depolama süresi ile p-aV önemli ölçüde artmıştır (Şekil 3.11) Yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulyenin fenolik bileşik ekstraktlarının, ay çiçek yağı kontrolüne göre p-aV'de önemli bir azalmaya neden olmuştur. Ancak ekstrakt içeren ay çiçek yağların p-aV sonuçları BHA içerenlerden daha yüksek bulunmuştur. MD uygulaması sonucu meydana gelen muhtemel yapısal değişiklikler numunelerin antioksidan aktivitelerini artırmıştır. Antioksidanların kimyasal yapılarının lipitlerin oksidatif stabilitesini arttırdığı bilinmektedir [308]. Genel olarak örnekler arasında antioksidan değerleri yüksek bulunan MD-SİF ekstraktları eklenmiş ayçiçek yağlarının p-aV değerleri daha düşük bulunmuştur (Şekil 3.11).

Yeşil mercimek için 24. ve 48. saatte farklı ekstraksiyon işleminin p-aV üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur. Yeşil mercimekten elde edilen kapsüllerin eklendiği yağ örneklerinde 72. saat depolamasında MD-SİF ($11,22 \pm 0,1$) örneğine ait p-aV değeri K-SİF ($13,07 \pm 0,4$) ve K-su ($13,16 \pm 0,3$) örneklerinden daha düşük bulunurken tüm bu ekstrakt eklenmiş yağların p-aV'si kontrol yağ örneğinden daha düşük ($18,96 \pm 0,3$) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.11-a). Uzayan depolama koşullarında her bir örneğin bireysel olarak etkisinin azaldığı ancak kontrol yağ örneğine göre değerlerin yine de düşük kaldığı görülmektedir.

Nohut örneklerinden alınan ekstraktlar incelendiğinde 24. ve 72. saatler için MD-SİF ekstraktlarına ait örneklerin p-aV'si K-SİF ve K-su örneklerinden düşük bulunmuştur. 48. saatte ise istatistiksel olarak MD-SİF, K-SİF ve K-su örnekleri arasında önemli bir fark olmadığı, ekstraktların p-aV'si BHA kullanılan örneklerden daha yüksek ancak kontrol örneğinden daha düşük olduğu görülmüştür. (Şekil 3.11-b). Depolama koşullarına bağlı olarak ekstrakt eklenmiş yağların p-aV'si giderek yükselmekle birlikte her bir saat grubu için kontrol yağ örneğine kıyasla düşük kalmış, ayrıca tüm saat grupları incelendiğinde MD-SİF ekstraktı içeren yağların p-aV'sinin daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Kuru fasulyeden elde edilen ekstraktlar değerlendirildiğinde, MD-SİF ($11,1 \pm 0,2$) içeren yağların p-aV'si için 24. saat depolamada K-SİF ($11,7 \pm 0,3$) ve K-su ($11,7 \pm 0,2$) örnekleri arasında önemli bir fark görülmemiştir. Yine 48. saat incelendiğinde MD-SİF ve K-su örnekleri arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı ancak p-aV değerlerinin K-SİF

örneği eklenmiş yağ örneklerinden daha düşük olduğu görülmüştür. 72 saatlik depolamada ise ekstraktlar arasında fark olmadığı, 24., 48. ve 72. saat incelendiğinde MD-SİF ekstraktı içeren yağ örneklerinin daha düşük p-aV değerlerine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 3.11-c). Muz kabuğu ve tarçından elde edilen ekstraktların balık yağının p-aV'sine etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada biyoaktif ekstrakt içeren balık yağlarının p-aV değerleri kontrol örneğinden düşük bulunmuştur [309].



MD-SİF: Mikrodalgalı destekli- sulu iki faz ekstraktları; K-SİF: klasik SİF ekstraktları; K-su: klasik su ekstraktları

A-D aynı renkli sütunlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemini göstermektedir ($p \leq 0.05$).

a-d Farklı zamanlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemini göstermektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 3.11. Enkapsüle ekstraktların ayçiçek yağının hızlandırılmış koşullardaki p-aV üzerine etkisi

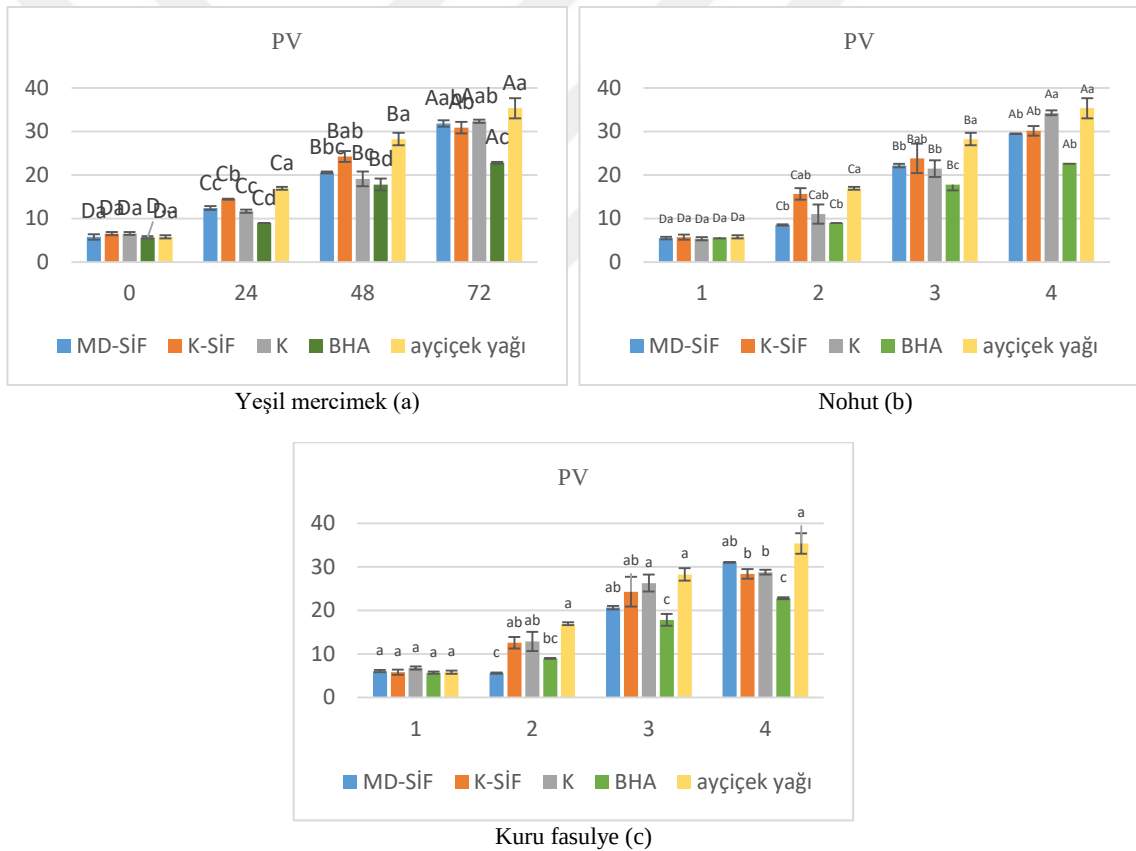
Yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulyeden alınan ekstraktlar ayçiçek yağının oksidasyonunu önlemede etkinlikleri ortaya konmuştur. Peroksit değeri (PV) analizi yağların oksidasyon stabilitesinin belirlemek için kullanılan yaygın analizlerden bir diğeri [310] olup mevcut çalışmada da ekstrakt eklenmiş yağların PV değerleri incelenmiştir. Hem fenolik bileşen ekstraktı hem de BHA içeren örneklerin PV değerleri depolama süresince artmış, en yüksek PV'lerinin kontrol örneklerinden elde edilmiştir. MD-SİF, K-SİF ve K ekstraktları içeren ay çiçek yağlarının PV değerleri kontrol örneğinden düşük iken BHA içeren yağ örneklerinden yüksek bulunmuştur (Şekil 3.12).

Yeşil mercimekten elde edilen fenolik bileşen ekstraktları için MD-SİF ($12,4 \pm 0,5$ meq/kg) ve K ($11,67 \pm 0,4$ meq/kg) ekstraktı içeren yağların 24. saatteki PV değerleri istatistiksel olarak benzer iken K-SİF ($14,47 \pm 0,1$ meq/kg) ekstraktı içeren yağ örneklerinden PV değerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Ancak MD-SİF ve K-su örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamış olup 48. saatte yine MD-SİF ve K içeren yağların PV değerlerinin aynı grup içerisinde yer aldığı görülmüştür. 72. saat sonuçları incelendiğinde ekstrakt içeren yağ örneklerinin PV' leri arasında istatistiksel olarak fark görülmemiş ancak ekstrakt içeren yağ örneklerinin PV'leri kontrol örneğinden düşük bulunurken, BHA içeren yağ örneğinden yüksek bulunmuştur (Şekil 3.12-a)

Nohut ekstraktları içeren 24. saatte MD-SİF ($8,53 \pm 0,1$ meq/kg) yağ örneğinin PV'si BHA ($8,93 \pm 0,0$ meq/kg) içeren örnekten istatistiksel olarak farklı değildir (Şekil 3.12-b). 48 saatlik depolama sonunda MD-SİF ($22,16 \pm 0,4$ meq/kg), K-SİF ($23,83 \pm 3,4$ meq/kg) ve K-su ($21,47 \pm 1,9$ meq/kg) ekstraktlarının PV değeri üzerine etkisi arasında fark olmadığı görülmüştür. Ancak ekstraktların PV değerleri kontrol örneğinden ($28,25 \pm 1,4$ meq/kg) düşük bulunmuştur. 72 saatlik depolamada K-su örneğinin PV değerinin ($35,32 \pm 2,4$ meq/kg) kontrol örneğinin PV değerinden farklı olmadığı, ancak MD-SİF ve K-SİF ekstraktları eklenmiş yağ örneklerinin PV değerinin kontrolden düşük olduğu görülmektedir (Şekil 3.12-b). Nohut örneği için genel olarak MD-SİF ile elde edilen ekstraktın K-SİF ve K-su ekstraktlarından daha etkin olduğu söylenebilir.

Kuru fasulye ekstraktları eklenen yağ örneklerinin PV değerleri incelendiğinde 24 saat'lik depolamada MD-SİF eklenmiş yağ örneklerinin PV değerinin BHA eklenmiş yağ

örneklerinin PV değeri ile arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmektedir. Ancak K-SİF ve K-su eklenmiş yağ örneklerinin PV değeri kontrol örneğinin PV değeri ile istatistiksel olarak aynı grupta yer aldığı görülmektedir. 48. saatte MD-SİF içeren yağ örneğinin diğer ekstraktları içerenlerden daha düşük PV'ye sahip olduğu görülmüştür. 72. saatte ekstraktlar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmüş ve BHA içeren örneğin PV değeri $22,78 \pm 0,2$ meq/kg olarak bulunmuştur (Şekil 3.12-c). Kuru fasulye ekstraktlarının etkisi incelendiğinde genel olarak MD-SİF ekstraktı eklenmiş örneklerin PV değerinin depolama boyunca daha düşük kaldığı söylenebilir. Muz kabuğu ve tarçından elde edilen biyoaktif ekstraktları içeren balık yağının PV değerlerinin depolama boyunca kontrolden düşük olduğu bildirilmiştir [309].



MD-SİF: Mikrodalga destekli- sulu iki faz ekstraktları; K-SİF: klasik SİF ekstraktları; K-su: klasik su ekstraktları

A-D aynı renkli sütunlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemini göstermektedir ($p \leq 0.05$).

a-b Farklı zamanlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemini göstermektedir ($p \leq 0.05$).

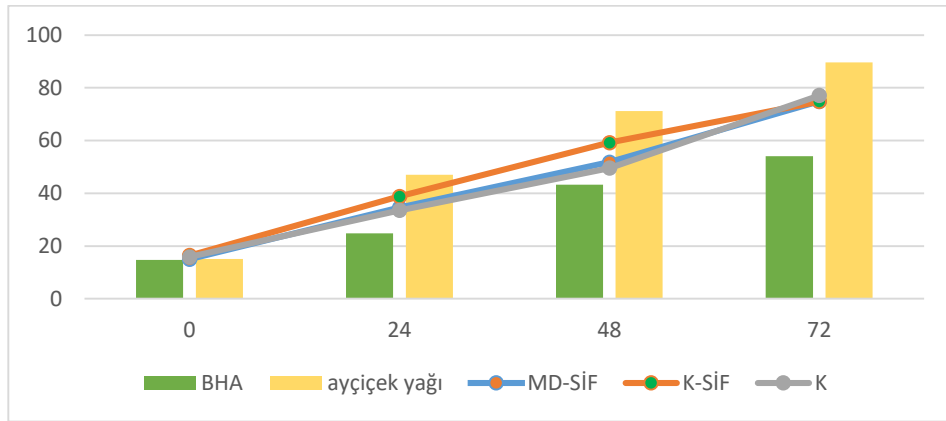
Şekil 3.12. Enkapsüle ekstraktların ayçiçek yağının hızlandırılmış koşullardaki PV üzerine etkisi

Yağın toplam oksidasyon (Totox) değeri, yağdaki oksidasyon işleminin anlaşılmasını kolaylaştırmak için kullanılır ve p-aV ve PV kullanılarak hesaplanır [281, 309]. Depolama süresi arttıkça tüm örnekler için ve kontrol örneği için Totox değeri artmış, ekstrakt içeren yağ örneklerinin depolama boyunca Totox değerleri kontrolden düşük iken BHA içeren yağ örneğinden yüksek bulunmuştur (Şekil 3.13).

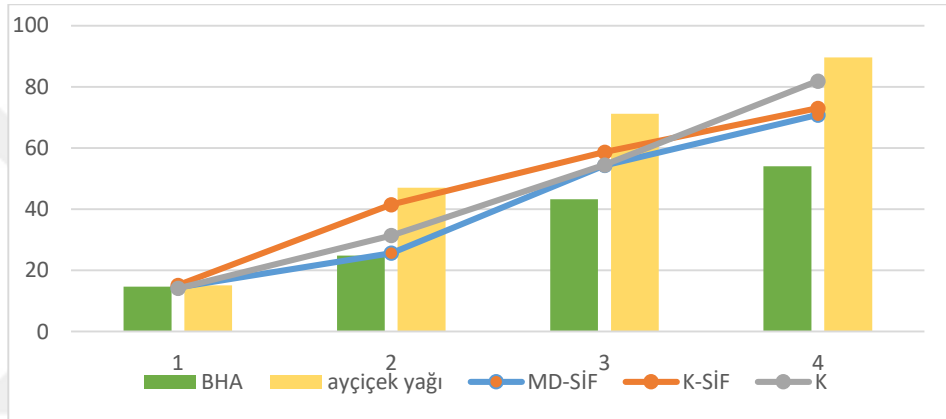
Yeşil mercimek için MD-SİF (34,57) ve K-su (33,54) içeren yağ örneklerinin 24 saat depolamada Totox değerleri K-SİF (38,77) örneğinden düşüktür. MD-SİF, K-SİF ve K-su ekstraktlarını içeren yağ örnekleri için 48. saat Totox değerleri sırasıyla 51,79, 59,17, ve 49,55 bulunmuştur. 72 saatlik depolama sonunda yeşil mercimek ekstraktı içeren örneklerin Totox sonuçları benzer iken BHA içeren yağ örneğinden yüksektir (Şekil 3.13-a).

Nohut ekstraktlarının depolama boyunca yağın oksidasyon stabilitesi üzerine olumlu etki oluşturduğu görülmüştür. MD-SİF ekstraktı içeren yağların 24, 48, 72. saatteki Totox değerleri sırasıyla 25,67, 54,32 ve 70,81 olarak bulunmuştur. MD-SİF ekstraktlarının özellikle 24. ve 48. saat depolamalarda oksidasyon stabilitesi üzerine etkili olduğu görülmektedir (Şekil 3.13-b).

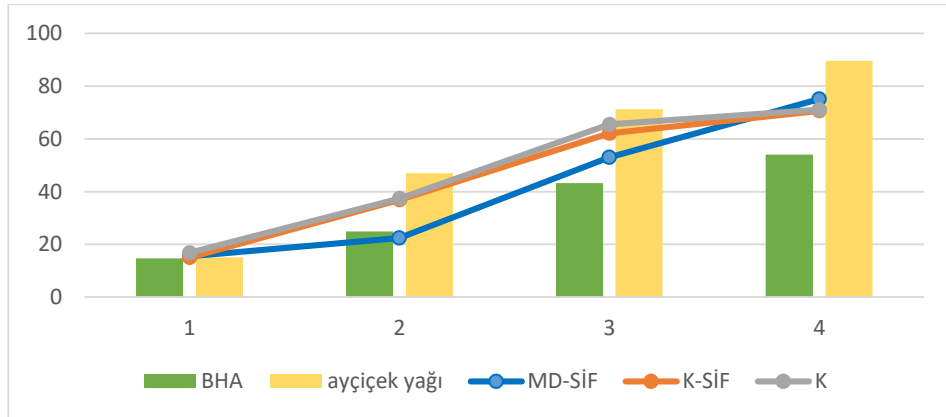
Kuru fasulye örneği incelendiğinde MD-SİF ekstraktı eklenmiş yağların Totox değerlerinin diğer K-SİF ve K-su ekstraktı eklenenlerden düşük olup 24. saat depolamada BHA ile yaklaşık sonuçlar elde edilmiştir. Tüm saat grupları için Totox değeri ekstrakt eklenmiş yağlarda kontrol yağ örneğinden düşük bulunurken BHA örneğinden yüksek bulunmuştur (Şekil 3.13-c). Ayçiçek yağının oksidasyonunu değerlendirmek amacıyla yapılan tüm analiz sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulyeden elde edilen ekstraktların yapay bir antioksidan olan BHA kadar etkili olmasa da yağların oksidasyonunu azaltabilme potansiyeline sahip olduğu özellikle SİF ile elde edilen ekstraktların etkisinin daha yüksek olduğu beirlenmiştir.



Yeşil mercimek (a)



Nohut (b)



Kuru fasulye (c)

MD-SİF: Mikrodalga destekli- sulu iki faz ekstraktları; K-SİF: klasik SİF ekstraktları; K-su: klasik su ekstraktları

Şekil 3.13. Enkapsüle ekstraktların ayçiçek yağının hızlandırılmış koşullardaki Totox üzerine etkisi

4. BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Ultrases Destekli-Derin Ötektik Çözücü (UD-DÖÇ) ile Protein Ekstraksiyonu ve Elektrosining Yöntemi ile Nanolif Üretimi

Çevre dostu çözücüler olarak adlandırılan DÖÇ'ler kullanılarak baklagillerden protein ekstraksiyonu amacıyla ChCl ile glukoz, fruktoz, asetik asit, sitrik asit, üre, gliserol gibi farklı hidrojen vericileri kullanılarak DÖÇ'ler hazırlanmıştır. Protein miktarının en yüksek bulunduğu ChCl:üre kullanılarak yeşil mercimek ve nohuttan UD protein ekstraksiyonunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Protein ekstraksiyonu için yapılan optimizasyon çalışmasında RSM-BBD kullanılmıştır. Optimum noktalar yeşil mercimek için üre molar oranı 1,13 M, su molar oranı 4,34 M, güç %34,07 W, süre 14,53 dk. ve nohut için üre molar oranı 1.08 M, su molar oranı 4,91 M, güç %59,14 W, süre 10,59 dk. olarak belirlenmiştir. Optimum noktalarda elde edilen PI'larının antioksidan özellikleri ve karakterizasyonu K-DÖÇ ve K-su ile elde edilen PI'ları ile karşılaştırılmıştır. Yeşil mercimek için UD-DÖÇ, K-DÖÇ ve K-su örneklerine ait TPC değerleri sırasıyla 8,26±0,6 mg GAE/g, 4,76±0,3 mg GAE/g ve 3,49±0,7 mg GAE/g, DPPH süpürücü aktivite değerleri sırasıyla %24,70, %12,80 ve %7,3 bulunurken Fe-şelatlama aktiviteleri sırasıyla 22,96±0,9 µM EDTA E/g, 13,05±0,4 µM EDTA E/g ve 5,95±0,4 µM EDTA E/g olarak bulunmuştur. Nohuttan elde edilen protein izolatları için ise TPC değerleri UD-DÖÇ, K-DÖÇ ve K-su için sırasıyla 4.72±0.1 mg GAE/g, 1,59±0,1 mg GAE/g, 0,39±0,0 mg GAE/g olarak, DPPH süpürücü aktivite değerleri sırasıyla %15,31, %9,97 ve %8,36 olarak ve Fe-şelatlama aktiviteleri sırasıyla 22,96±0,9 µM EDTA E/g, 13,05±0,4 µM EDTA E/g ve 5,95±0,4 µM EDTA E/g olarak belirlenmiştir. UD-DÖÇ ile elde edilen yeşil mercimek ve nohut PI'larının antioksidan özelliklerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. FTIR ile yapılan karakterizasyon çalışmasında elde edilen absorabans

piklerinin alanları ile α -heliks, β -yaprak ve β -dönüş tabakalarının oranları belirlenmiştir. Mercimek örneklerinden UD-DÖÇ ve K-DÖÇ yöntemiyle elde edilen izolatların β -dönüş yapının miktarının arttığı α -sarmal yapının miktarının ise K-su ile üretilen PI'larına göre azaldığı görülmüştür. Nohut örneğinde de benzer şekilde α -sarmal yapı azalırken β -dönüş tabakalarında bir miktar artış gözlenmiştir.

UD-DÖÇ ile optimum noktada üretilen PI'larından elektrospining yöntemi ile nanolif üretimi çalışılmıştır. Tek başına PI ile nanolif elde edilemediğinden polimer olarak PVA ve zein kullanılmıştır. Farklı oranlarda polimer PI karıştırılarak üretilen filmlerin özellikleri incelenmiştir. Nanolifler içindeki PI miktarını maksimuma ulaştırmak amaçlanmıştır. %30 oranında hazırlanan PVA ve zein solüsyonları %15 oranında hazırlanan PI ile farklı oranlarda karıştırılmıştır. 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70 denenmiş ancak 40:60 PVA:PI oranı ve daha altındaki oranlarda nanolif üretilenmemiştir. Zein:PI karışımları için ise 90:10, 80:20 ve 70:30 zein:PI oranları denenmiş 70:30 oranındaki karışımlardan nanolif elde edilememiştir. Farklı oranlarda PVA: PI ve zein:PI ile hazırlanan polimer çözeltilerin reolojik özellikleri ve elektrik iletkenlikleri belirlenmiştir. Karışımlardaki PI oranı arttıkça viskozitenin düştüğü buna karşın elektrik iletkenliğinin arttığı görülmüştür. 70:30, 60:40 ve 50:50 PVA:PI karışımları ve 90:10, 80:20 zein:PI ile üretilen nanoliflerin özellikleri SEM görüntüleri vasıtasıyla incelenmiştir. Nanolif çaplarının artan PI oranı ile azaldığı görülmüştür. 70:30, 60:40 ve 50:50 PVA:PI oranı ile hazırlanan nanoliflerin çapları yeşil mercimek PI ile üretilenler için sırasıyla $0,140 \pm 0,00$, $0,133 \pm 0,00$ ve $0,114 \pm 0,00$ μm iken nohut örneği için $0,159 \pm 0,01$, $0,128 \pm 0,01$, $0,11 \pm 0,1$ μm olarak bulunmuştur. 90:10, 80:20 zein:PI oranı ile hazırlanan nanoliflerin çapları yeşil mercimek PI ile üretilenler için sırasıyla $0,214$ ve $0,144$ μm ve nohut PI' da sırasıyla $0,386$ ve $0,125$ μm olarak bulunmuştur. Elde edilen reolojik veriler ve SEM görüntülerine göre 50:50 PVA:PI ve 80:20 zein:PI oranlarında nanolif üretilebileceğine karar verilmiştir.

PI'ları ile üretilen nanoliflerin enkapsülasyon özelliklerini değerlendirmek amacıyla nanolifler ferulik asit kaplama işleminde kullanılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği değerleri 50:50 PVA:MPI ve PVA:NPI için sırasıyla %78,69 ve %78,69 olarak bulunmuştur. 80:20 oranlarında hazırlanan zein:MPI ve zein:NPI nanolifleri için enkapsülasyon etkinliği ise sırasıyla %82,38 ve %80,88 olarak bulunmuştur. Ferulik asit ile üretilen nanoliflerin SEM

görüntüleri ve floresan mikroskopisi ile alınan görüntüleri incelenmiş ferulik asitin lif boyunca homojen dağıldığı görülmüştür. Ayrıca nanoliflerin özellikleri FTIR, TGA ve XRD analizleri ile incelenmiştir. TGA sonuçlarına göre PVA:PI ile üretilen nanoliflerin, saf PVA nanoliflerine kıyasla biraz daha yüksek bozunma sıcaklığı gösterdiği görülmüştür. Bu durum PI'larının PVA nanolifi matrisine dâhil edilmesinin daha yüksek termal stabilite ile sonuçlandığını göstermektedir. Benzer sonuç zein:PI nanolifleri içinde elde edilmiştir. XRD analizi sonuçlarına göre yapıya eklenen PI'nın XRD modelindeki amorf doğayı değiştirmedeği görülmüştür. Nanoliflerin tamamı, 2θ'da yaklaşık 20° civarında güçlü kırınım pikleri göstermiştir.

Ayrıca ferulik asit yüklü nanoliflerin antibakteriyel özellikleri *E.coli* ile incelenmiştir. Herhangi bir nanolif eklenmeyen kontrol örneğine kıyasla koloni sayılarındaki azalmalar incelendiğinde PVA:FA örneğinde %71,3'lük bir azalma söz konusuysa PVA:MPI:FA' da %82,1'e ve PVA:NPI: FA' da ise %78,9'luk bir azalma gözlenmiştir. Zein ile elde edilen nanolifler de ise zein:FA kontrol nanolifinde kontrole göre %67,5'lik bir azalma varken zein:MPI:FA ve zein:NPI:FA örnekleri için koloni sayıları sırasıyla %96,2 ve %95,1 azalmıştır.

Ferulik asit yüklü nanoliflerin yapay hidrofilik ve hidrofobik gıda ortamlarında ki salınımı ve salınımın kinetiği incelenmiştir. PVA polimeri ile üretilen nanolifler incelendiğinde sadece PVA ile üretilen kontrol nanolifinin salınım hızının PVA:MPI ve PVA:NPI'dan bir miktar düşük olduğu görülmüştür. Ancak aynı durum zein ile elde edilen nanolifler için geçerli değildir. Sadece zein ile üretilen kontrol nanolifinden ferulik asitin salınımı PI içeren nanoliflere göre daha hızlıdır. Genel olarak nanoliflerin hidrofilik ortamlarda için uygulanmasının salınım daha uzun sürede ve daha yavaş gerçekleştiğinden daha uygun olduğu söylenebilir. Hidrofobik ortamda ise kısa sürede daha yüksek miktarlarda ferulik asit salınımı gerçekleştiğinden depolama süresi kısa ya da hızlı bir salınım gerektiren durumlar için kullanılabilir. *In vitro* ortamda ki salınım incelendiğinde ise PVA:MPI ve PVA:NPI nanolifleri benzer salınım profili gösterirken PVA kontrol örneğindeki salınım hızının daha yavaş olduğu görülmüştür. Zein:PI ile üretilen nanolifleri için ise tam tersi bir durum geçerli olup ferulik asit kontrol örneğindeki *in vitro* salınım daha yavaştır.

Elde edilen sonuçlar UD-DÖÇ baklagillerden PI eldesinde kullanılabilecek etkin ve verimli bir yöntem olduğunu göstermektedir. Bu yöntemle ekstraksiyon süresi önemli derece azalırken verim artmakta ve geleneksel yöntemlere göre antioksidan özellikleri daha yüksek MPI ve NPI elde edilmektedir. Ancak PI'nın eldesi aşamasında ekstraksiyonda çözücüzü olarak kullanılan DÖÇ'ün uzaklaştırılması ve yıkama işleminin iyi yapılması gerekmektedir. Üretilen MPI ve NPI'larının PVA protein bazlı nanoliflerin üretilmesinde kullanılabileceği ortaya konulmuştur. MPI ve NPI ile üretilen nanoliflerin yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduklarının belirlenmiş olması bunların gıda koruma ve raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılabileceklerini göstermektedir.

4.2. Mikrodalga Destekli-Sulu İki Faz (MD-SİF) Ekstraksiyon Yöntemi ile Baklagillerden Fenolik Bileşen Ekstraksiyonu

Çalışmanın üçüncü bölümünde, çevre dostu bir yöntem olarak MD-SİF yoluyla baklagillerden fenolik bileşikler ekstraksiyonu, RSM'nin BBD 'si ile optimize edilmiştir. Fenolik bileşen ekstraksiyonun geri kazanımının en yüksek olduğu optimum koşullar yeşil mercimek için 219 s, 300 W ve 22,8 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w/w), nohut için 98,76 s, 236 W ve 17,2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w/w) ve kuru fasulye için 60,93 s, 227,62 W ve 17,01 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w/w) olarak bulunmuştur. MD-SİF ekstraksiyon tekniği K-su ve K- SİF ile karşılaştırılmıştır. MD-SİF'nin ekstraksiyon verimliliğinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak ekstraksiyon sonrası tuz çöktüme ve uzaklaştırma aşaması bulunmaktadır. FTIR sonuçlarına göre MD-SİF ve K-SİF ekstraktları için kimyasal yapıda bir değişiklik olduğu, MD-SİF' nin antioksidan özelliklerinin K-SİF ve K-su'dan daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca TPC değeri, DPPH süpürücü aktivite, ABTS antioksidan aktivite ile ortaya konan yeşil mercimeğin antioksidan özelliklerinin nohut ve kuru fasulyeye göre daha iyi olduğu görülmüştür. Ekstraktlar, fenolik bileşiklerin özelliklerini korumak için dondurarak kurutma yoluyla maltodekstrin içinde enkapsüle edilmiştir. SİFile elde edilen ekstraktlar, hızlandırılmış depolama sırasında p-aV, PV ve Totox değerlerine göre oksidasyonu önlemede iyi bir performans göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında MD-SİF yönteminin daha az çözücü tüketimi, daha kısa süre, daha yüksek ekstraksiyon verimi ve antioksidan özellikler gibi bazı avantajlar sağladığı dolayısıyla MD-SİF' nin, fonksiyonel gıda katkı maddelerinin

üretmesinde kullanılabilecek fenolik bileşenlerin baklagillerden ekstraksiyonu için uygun, verimli ve çevre dostu inovatif bir yöntem olduğu söylenebilir.

4.3. Öneriler

4.3.1. Ultrases Destekli-Derin Ötektik Çözücü (UD-DÖÇ) ile Protein Ekstraksiyonu ve Elektrosining Yöntemi İle Nanolif Üretimi

1. Mevcut çalışmada hidrojen verici olarak ChCl seçilmiştir. Yerine alternatif ajanlar kullanılarak ekstraksiyon verimi araştırılabilir.
2. Üretilen protein izolatlarından DÖÇ hidrolizatı eldesi değerlendirilebilir.
3. Nanolif üretiminde nanolif içerisindeki PI oranını arttırmak için farklı polimerler ya da çeşitli gamların kullanımı araştırılabilir.
4. Mevcut çalışmada MA 70.000 kDa olan PVA kullanılmıştır. Kullanılan polimerin molekül ağırlığının nanolif özelliklerini etkilediğinden farklı MA'a sahip PVA'ların PI ile nanolif oluşumuna etkisi araştırılabilir.
5. Mevcut çalışmada ferulik asitin enkapsülasyonu çalışılmıştır. Farklı antioksidan ve antimikrobiyal özellikteki bileşenlerin enkapsülasyonunda PVA:PI ve zein:PI karışımlarının reolojik özellikleri ile üretilen nanoliflerin karakteristik özellikleri araştırılabilir.

4.3.2. Mikrodalga Destekli-Sulu İki Faz (MD-SİF) Yöntemi ile Baklagillerden Fenolik Bileşen Ekstraksiyonu

1. Tez çalışmasında ekstraksiyon amacıyla kullanılan SİF etanol/amonyum sülfat ile hazırlanmıştır. Farklı alkol ve tuzlarla hazırlanan SİF'lerin ekstraksiyon verimine etkisi araştırılabilir.
2. Mevcut çalışmada elde edilen fenolik ekstraktların fenolik bileşenlerinin tanımlanması ve saflaştırılması yapılabilir.
3. Mevcut çalışmada ekstraktların liyofilizasyon yöntemi ile enkapsülasyonu maltodekstrin kullanılarak gerçekleştirilmiş olup farklı enkapsülasyon yöntemleri ve materyallerinin salın profillerine etkileri araştırılabilir.

KAYNAKÇA

1. Dillard, C. J., German, J. B., 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **80** (12): 1744-1756.
2. Duranti, M., 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, **77** (2): 67-82.
3. Rochfort, S., Panozzo, J., 2007. Phytochemicals for health, the role of pulses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **55** (20): 7981-7994.
4. Champ, M. M. J., 2002. Non-nutrient bioactive substances of pulses. **British Journal of Nutrition**, **88** (S3): 307-319.
5. FAOSTAT. (2019, 12.07.2019).
6. TEGEP, (2017, 12.07.2019). *Nohut ürün raporu*. Available: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporlar%C4%B1/2017%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporlar%C4%B1/Nohut%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporu%202017-303.pdf>
7. Sharif, H. R., Williams, P. A., Sharif, M. K., Abbas, S., Majeed, H., Masamba, K. G., Safdar, W., Zhong, F., 2018. Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants–A review. **Food Hydrocolloids**, **76**: 2-16.
8. 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.
9. Hall, C., Hillen, C., Garden Robinson, J., 2017. Composition, nutritional value, and health benefits of pulses. **Cereal Chemistry**, **94** (1): 11-31.
10. Rebello, C. J., Greenway, F. L., Finley, J. W., 2014. Whole grains and pulses: A comparison of the nutritional and health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **62** (29): 7029-7049.
11. Tunç, İ., Çalışkan, F., Özkan, G., Karacabey, E., 2014. Mikrodalga destekli Soxhlet cihazı ile fındık yağı ekstraksiyonunun yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu. **Akademik Gıda**, **12** (1): 20-28.

12. Villamiel, M., de Jong, P., 2000. Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **48** (2): 472-478.
13. Suslick, K. S., 1988. Ultrasound: its chemical, physical, and biological effects. New York, NY : VCH Publishers, 336 p
14. Zhang, H., Mittal, G. S., 2008. Effects of high-pressure processing (HPP) on bacterial spores: an overview. **Food Reviews International**, **24** (3): 330-351.
15. Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., Wang, J., 2009. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from Folium eucommiae and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. **Food Chemistry**, **114** (3): 1147-1154.
16. Kim, S., Zayas, J., 1989. Processing parameters of chymosin extraction by ultrasound. **Journal of Food Science**, **54** (3): 700-703.
17. Tabaraki, R., Nateghi, A., 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, **18** (6): 1279-1286.
18. El Achkar, T., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H., 2019. Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. **Journal of Molecular Liquids**: 111028.
19. Liu, Y., Wang, Y., Dai, Q., Zhou, Y., 2016. Magnetic deep eutectic solvents molecularly imprinted polymers for the selective recognition and separation of protein. **Analytica Chimica Acta**, **936**: 168-178.
20. Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., 2011. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?. **Plant Physiology**, **156** (4): 1701-1705.
21. Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., 2004. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, **126** (29): 9142-9147.
22. Abbott, A. P., Barron, J. C., Ryder, K. S., Wilson, D., 2007. Eutectic-based ionic liquids with metal-containing anions and cations. **Chemistry–A European Journal**, **13** (22): 6495-6501.

23. Florindo, C., Oliveira, F. S., Rebelo, L. P. N., Fernandes, A. M., Marrucho, I. M., 2014. Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, **2** (10): 2416-2425.
24. Li, N., Wang, Y., Xu, K., Huang, Y., Wen, Q., Ding, X., 2016. Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. **Talanta**, **152**: 23-32.
25. del Mar Contreras, M., Lama-Muñoz, A., Gutiérrez-Pérez, J. M., Espínola, F., Moya, M., Castro, E., 2019. Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. **Bioresource Technology**, **280**: 459-477
26. Torres-Giner, S., Pérez-Masiá, R., Lagaron, J. M., 2016. A review on electrospun polymer nanostructures as advanced bioactive platforms. **Polymer Engineering & Science**, **56** (5): 500-527.
27. Ghorani, B., Tucker, N., 2015. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocolloids**, **51**: 227-240.
28. Rezaei, A., Nasirpour, A., Fathi, M., 2015. Application of cellulosic nanofibers in food science using electrospinning and its potential risk. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, **14** (3): 269-284.
29. Tsubaki, S., Onda, A., Hiraoka, M., Fujii, S., Azuma, J. i., Wada, Y., 2017."Microwave-Assisted Water Extraction of Carbohydrates From Unutilized Biomass," in *Water Extraction of Bioactive Compounds*, Elsevier, 199-219.
30. Delazar, A., Nahar, L., Hamedeyazdan, S., Sarker, S. D., 2012."Microwave-assisted extraction in natural products isolation," in *Natural products isolation*, Springer, 89-115.
31. Chemat, F., Cravotto, G., 2012. Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice, Springer Science & Business Media, 181.
32. Kute, A., Mohapatra, D., Babu, B., Sawant, B., 2015. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel using response surface methodology. **Journal of Food Research Technology**, **3** (2): 62-70.

33. Büyüktuncel, E., 2012. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi. **Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I**, **32** (2): 209-242.
34. Lopez-Avila, V., 1999. Sample preparation for environmental analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, **29** (3): 195-230.
35. Oliveira, M., Franca, A., 2002. Microwave heating of foodstuffs. **Journal of Food Engineering**, **53** (4): 347-359.
36. Cardoso-Ugarte, G. A., Juárez-Becerra, G. P., SosaMorales, M. E., López-Malo, A., 2013. Microwave-assisted extraction of essential oils from herbs. **Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy**, **47** (1): 63-72.
37. Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S., 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites Science and Technology**, **63** (15): 2223-2253.
38. Salunkhe, D. K., Kadam, S., 1989. CRC handbook of world food legumes: nutritional chemistry, processing technology, and utilization, CRC press.
39. Pereira, H. V. R., Saraiva, K. P., Carvalho, L. M. J., Andrade, L. R., Pedrosa, C., Pierucci, A. P. T. R., 2009. Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. **Food Research International**, **42** (1): 115-121.
40. Sosulski, F., Garratt, M. D., Slinkard, A. E., 1976. Functional properties of ten legume flours. Canada institution Food Science and Technology, **9**(2):66-69.
41. Muzquiz, M., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Guillamón, E., Pedrosa, M. M., 2012. Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. **Phytochemistry Reviews**, **11** (2): 227-244.
42. Roy, F., Boye, J. I., Simpson, B. K., 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Research International**, **43** (2): 432-442.
43. Tharanathan, R., Mahadevamma, S., 2003. Grain legumes—a boon to human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, **14** (12): 507-518.
44. Genovese, M. I., Lajolo, F. M., 2001. Atividade inibitoria de tripsina do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): Avaliação crítica dos métodos de determinação. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, **51** (4): 386-394.

45. Freitas, L. F., Ferreira, R. B., Teixeira, A. R., 2000. Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyse structural comparisons within the major classes of globulins. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, **51** (5): 341-352.
46. Alsohaimy, S., Sitohy, M., El-Masry, R., 2007. Isolation and partial characterization of chickpea, lupine and lentil seed proteins. **World Journal of Agricultural Sciences**, **3** (1): 123-129.
47. Carbonaro, M., Maselli, P., Nucara, A., 2015. Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. **Food Research International**, **76**: 19-30.
48. Rebello, C., Greenway, F., Finley, J. W., 2014. A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities. **Obesity Reviews**, **15** (5): 392-407.
49. Caccialupi, P., Ceci, L. R., Siciliano, R. A., Pignone, D., Clemente, A., Sonnante, G., 2010. Bowman-Birk inhibitors in lentil: Heterologous expression, functional characterisation and anti-proliferative properties in human colon cancer cells. **Food Chemistry**, **120** (4): 1058-1066.
50. Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., Hernandez-Escalante, V. M., 2011. Bioavailability of bioactive peptides. **Food Reviews International**, **27** (3): 213-226.
51. Pedrosa, M. M., Cuadrado, C., Burbano, C., Allaf, K., Haddad, J., Gelencsér, E., Takács, K., Guillamón, E., Muzquiz, M., 2012. Effect of instant controlled pressure drop on the oligosaccharides, inositol phosphates, trypsin inhibitors and lectins contents of different legumes. **Food Chemistry**, **131** (3): 862-868.
52. Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., Singh, N., 2017. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. **Food Research International**, **101**: 1-16.
53. Putnam, D., Oplinger, E., Hicks, D., Durgan, B., Noetzel, D., Meronuck, R., Doll, J., Schulte, E., 1990. Sunflower. **Alternative Field Crops Manual**, 48.
54. Nwokolo, E., Smartt, J., 1996. Food and feed from legumes and oilseeds. Springer.

55. Stevenson, P., Dhillon, M., Sharma, H., El Bouhssini, M., 2007. "Insect pests of lentil and their management. In 'Lentil: an ancient crop for modern times'. (Eds SS Yadav, D McNeil, PC Stevenson), Springer, 342-343.
56. Barbana, C., Boye, J. I., 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. **Food Chemistry**, **127** (1): 94-101.
57. Barbana, C., Boye, J. I., 2013. In vitro protein digestibility and physico-chemical properties of flours and protein concentrates from two varieties of lentil (*Lens culinaris*). **Food & Function**, **4** (2): 310-321.
58. Roy, F., Boye, J., Simpson, B., 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Research International**, **43** (2): 432-442.
59. Aguilera, Y., DUENas, M., Estrella, I., Hernandez, T., Benitez, V., Esteban, R. M., Martin-Cabrejas, M. A., 2010. Evaluation of phenolic profile and antioxidant properties of Pardina lentil as affected by industrial dehydration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **58** (18): 10101-10108.
60. Xu, B., Chang, S. K., 2010. Phenolic substance characterization and chemical and cell-based antioxidant activities of 11 lentils grown in the Northern United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **58** (3): 1509-1517.
61. Maiti, R., Wesche Ebeling, P., 2001. Advances in chickpea science. Science Publishers.
62. Yust, M. a. M., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J., 2003. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. **Food Chemistry**, **81** (3): 363-369.
63. Mazur, W. M., Duke, J. A., Wähälä, K., Rasku, S., Adlercreutz, H., 1998. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, **9** (4): 193-200.
64. Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C., Chibbar, R. N., 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum L.*): a review. **British Journal of Nutrition**, **108** (S1): S11-S26.
65. Sathe, S., 2002. Dry bean protein functionality. **Critical Reviews in Biotechnology**, **22** (2): 175-223.

66. Luthria, D. L., Pastor-Corrales, M. A., 2006. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, **19** (2-3): 205-211.
67. Pan, K., Jiang, Q., Liu, G., Miao, X., Zhong, D., 2013. Optimization extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its immunity and antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, **55**: 301-306.
68. Saedpanah, B., Behroozi-Khazaei, N., Khorshidi, J., 2022. Modeling and Optimization of Microwave-assisted Extraction of Rosemary Using Response Surface Methodology (RSM). **Iranian Food Science and Technology Research Journal**,
69. Li, Q., Li, X., Zheng, B., Zhao, C., 2021. The optimization of ultrasonic-microwave assisted synergistic extraction of Lotus plumule extract rich in flavonoids and its hypoglycemic activity. **Food Production, Processing and Nutrition**, **3** (1): 1-11.
70. Daghighale, S., Kiasat, A. R., Safieddin Ardebili, S. M., Mirzajani, R., 2021. Intensification of Extraction of Antioxidant Compounds from *Moringa Oleifera* Leaves Using Ultrasound-Assisted Approach: BBD-RSM Design. **International Journal of Fruit Science**, **21** (1): 693-705.
71. Wu, J., Zhang, J., Yu, X., Shu, Y., Zhang, S., Zhang, Y., 2021. Extraction optimization by using response surface methodology and purification of yellow pigment from *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makikno. **Food Science & nutrition**, **9** (2): 822-832.
72. Voisin, A. S., Guéguen, J., Huyghe, C., Jeuffroy, M. H., Magrini, M. B., Meynard, J. M., Mougé, C., Pellerin, S., Pelzer, E., 2014. Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, **34** (2): 361-380.
73. Schutyser, M., Van der Goot, A., 2011. The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production. **Trends in Food Science & Technology**, **22** (4): 154-164.

74. Brummer, Y., Kaviani, M., Tosh, S. M., 2015. Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. **Food Research International**, **67**: 117-125.
75. Preece, K. E., Hooshyar, N., Krijgsman, A., Fryer, P. J., Zuidam, N. J., 2017. Intensified soy protein extraction by ultrasound. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, **113**: 94-101.
76. Lafarga, T., Álvarez, C., Bobo, G., Aguiló-Aguayo, I., 2018. Characterization of functional properties of proteins from Ganxet beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Ganxet*) isolated using an ultrasound-assisted methodology. **LWT- Food Science and Technology**, **98**: 106-112.
77. Zhou, Y., Zheng, J., Gan, R. Y., Zhou, T., Xu, D. P., Li, H. B., 2017. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidants from the mung bean coat. **Molecules**, **22** (4): 638.
78. Traffano-Schiffo, M. V., Calvo, T. R. A., Avanza, M. V., Santagapita, P. R., 2020. High-intensity ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from cowpea pods and its encapsulation in hydrogels. **Heliyon**, **6** (7): e04410.
79. Ochoa-Rivas, A., Nava-Valdez, Y., Serna-Saldívar, S. O., Chuck-Hernández, C., 2017. Microwave and ultrasound to enhance protein extraction from peanut flour under alkaline conditions: Effects in yield and functional properties of protein isolates. **Food and Bioprocess Technology**, **10** (3): 543-555.
80. Odabaş, H. İ., Koca, I., 2021. Simultaneous separation and preliminary purification of anthocyanins from *Rosa pimpinellifolia* L. fruits by microwave assisted aqueous two-phase extraction. **Food and Bioproducts Processing**, **125**: 170-180.
81. Lin, Y., Zeng, H., Wang, K., Lin, H., Li, P., Huang, Y., Zhou, S., Zhang, W., Chen, C., Fan, H., 2019. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of diverse polysaccharides from *Lentinus edodes*: Process optimization, structure characterization and antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, **136**: 305-315.
82. Fan, Y., Wu, H., Cai, D., Yang, T., Yang, L., 2020. Effective extraction of harmine by menthol/anise alcohol-based natural deep eutectic solvents. **Separation and Purification Technology**, **250**: 117211.

83. Chen, J., Jiang, X., Yang, G., Bi, Y., Liu, W., 2018. Green and efficient extraction of resveratrol from peanut roots using deep eutectic solvents. **Journal of Chemistry, 2018**
84. Abbott, A., Boothby, D., Capper, G., Davies, D., Rasheed, R., 2004. Ionic liquids in biotransformations and organocatalysis: solvents and beyond. **Journal of the American Chemical Society, 126**: 9142.
85. Choi, Y., van Spronsen, J., Dai, Y., Verben, M., 2011. F. hollmann, IWCE Arends, GJ Witkamp and R. Verpoorte. **Plant Physiol, 156**: 1701-1705.
86. Fuad, F. M., Nadzir, M. M., Harun, A., 2021. Hydrophilic Natural Deep Eutectic Solvent: A Review on Physicochemical Properties and Extractability of Bioactive Compounds. **Journal of Molecular Liquids: 116923**.
87. Ma, Y., Wang, Q., Zhu, T., 2019. Comparison of hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for pretreatment determination of sulfonamides from aqueous environments. **Analytical Methods, 11** (46): 5901-5909.
88. Ribeiro, B. D., Florindo, C., Iff, L. C., Coelho, M. A., Marrucho, I. M., 2015. Menthol-based eutectic mixtures: hydrophobic low viscosity solvents. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 3** (10): 2469-2477.
89. van Osch, D. J., Zubeir, L. F., van den Bruinhorst, A., Rocha, M. A., Kroon, M. C., 2015. Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. **Green Chemistry, 17** (9): 4518-4521.
90. Pena-Pereira, F., Kloskowski, A., Namieśnik, J., 2015. Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives. **Green Chemistry, 17** (7): 3687-3705.
91. Savi, L. K., Carpiné, D., Waszczynskyj, N., Ribani, R. H., Haminiuk, C. W. I., 2019. Influence of temperature, water content and type of organic acid on the formation, stability and properties of functional natural deep eutectic solvents. **Fluid Phase Equilibria, 488**: 40-47.
92. Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H., 2013. Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: mixtures of solids as extraction solvents. **Journal of Natural Products, 76** (11): 2162-2173.

93. Jeong, K. M., Ko, J., Zhao, J., Jin, Y., Han, S. Y., Lee, J., 2017. Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. **Journal of Cleaner Production**, **151**: 87-95.
94. Liu, W., Zhang, K., Qin, Y., Yu, J., 2017. A simple and green ultrasonic-assisted liquid–liquid microextraction technique based on deep eutectic solvents for the HPLC analysis of sesamol in sesame oils. **Analytical Methods**, **9** (28): 4184-4189.
95. de los Ángeles Fernández, M., Boiteux, J., Espino, M., Gomez, F. J., Silva, M. F., 2018. Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments. **Analytica Chimica Acta**, **1038**: 1-10.
96. Dai, Y., Verpoorte, R., Choi, Y. H., 2014. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). **Food Chemistry**, **159**: 116-121.
97. Milano, F., Giotta, L., Guascito, M. R., Agostiano, A., Sblendorio, S., Valli, L., Perna, F. M., Cicco, L., Trotta, M., Capriati, V., 2017. Functional enzymes in nonaqueous environment: the case of photosynthetic reaction centers in deep eutectic solvents. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, **5** (9): 7768-7776.
98. Xin, R., Qi, S., Zeng, C., Khan, F. I., Yang, B., Wang, Y., 2017. A functional natural deep eutectic solvent based on trehalose: Structural and physicochemical properties. **Food Chemistry**, **217**: 560-567.
99. Hernández-Corroto, E., Plaza, M., Marina, M. L., García, M. C., 2020. Sustainable extraction of proteins and bioactive substances from pomegranate peel (*Punica granatum* L.) using pressurized liquids and deep eutectic solvents. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, **60**: 102314.
100. Shang, X., Dou, Y., Zhang, Y., Tan, J. N., Liu, X., Zhang, Z., 2019. Tailor-made natural deep eutectic solvents for green extraction of isoflavones from chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. **Industrial Crops and Products**, **140**: 111724.

101. Zhuang, B., Dou, L. L., Li, P., Liu, E. H., 2017. Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi Cacumen*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **134**: 214-219.
102. Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R., Choi, Y. H., 2016. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. **Journal of Chromatography A**, **1434**: 50-56.
103. Cunha, S. C., Fernandes, J. O., 2018. Extraction techniques with deep eutectic solvents. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, **105**: 225-239.
104. Cvjetko Bubalo, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić Redovniković, I., 2016. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, **200**: 159-166.
105. Khezeli, T., Daneshfar, A., Sahraei, R., 2016. A green ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of ferulic, caffeic and cinnamic acid from olive, almond, sesame and cinnamon oil. **Talanta**, **150**: 577-585.
106. Bajkacz, S., Adamek, J., 2017. Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. **Talanta**, **168**: 329-335.
107. Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., Chen, Z. G., 2017. Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, **221**: 1400-1405.
108. Lores, H., Romero, V., Costas, I., Bendicho, C., Lavilla, I., 2017. Natural deep eutectic solvents in combination with ultrasonic energy as a green approach for solubilisation of proteins: application to gluten determination by immunoassay. **Talanta**, **162**: 453-459.
109. Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatić, E., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S., 2017. Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. **Food and Bioproducts Processing**, **102**: 195-203.

110. Zhou, P., Wang, X., Liu, P., Huang, J., Wang, C., Pan, M., Kuang, Z., 2018. Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. **Industrial Crops and Products**, **120**: 147-154.
111. Kaltsa, O., Lakka, A., Grigorakis, S., Karageorgou, I., Batra, G., Bozinou, E., Lalas, S., Makris, D. P., 2020. A Green Extraction Process for Polyphenols from Elderberry (*Sambucus nigra*) Flowers Using Deep Eutectic Solvent and Ultrasound-Assisted Pretreatment. **Molecules**, **25** (4): 921.
112. Fu, X., Wang, D., Belwal, T., Xu, Y., Li, L., Luo, Z., 2021. Sonication-synergistic natural deep eutectic solvent as a green and efficient approach for extraction of phenolic compounds from peels of *Carya cathayensis* Sarg. **Food Chemistry**, **355**: 129577.
113. Li, D., Xia, Y., 2004. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? **Advanced Materials**, **16** (14): 1151-1170.
114. Sridhar, R., Lakshminarayanan, R., Madhaiyan, K., Barathi, V. A., Lim, K. H. C., Ramakrishna, S., 2015. Electrosprayed nanoparticles and electrospun nanofibers based on natural materials: applications in tissue regeneration, drug delivery and pharmaceuticals. **Chemical Society Reviews**, **44** (3): 790-814.
115. Zhang, Y., Lim, C. T., Ramakrishna, S., Huang, Z. M., 2005. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, **16** (10): 933-946.
116. Qi, S., Craig, D., 2016. Recent developments in micro-and nanofabrication techniques for the preparation of amorphous pharmaceutical dosage forms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **100**: 67-84.
117. Spasova, M., Mincheva, R., Paneva, D., Manolova, N., Rashkov, I., 2006. Perspectives on: criteria for complex evaluation of the morphology and alignment of electrospun polymer nanofibers. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, **21** (5): 465-479.
118. Gupta, P., Elkins, C., Long, T. E., Wilkes, G. L., 2005. Electrospinning of linear homopolymers of poly (methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. **Polymer**, **46** (13): 4799-4810.

119. Lin, T., Wang, H., Wang, H., Wang, X., 2005. Effects of polymer concentration and cationic surfactant on the morphology of electrospun polyacrylonitrile nanofibres. **Journal of Materials Science & Technology**, **21** (Supplement 1): 1-4.
120. Eda, G., Liu, J., Shivkumar, S., 2007. Solvent effects on jet evolution during electrospinning of semi-dilute polystyrene solutions. **European Polymer Journal**, **43** (4): 1154-1167.
121. Ghorani, B., Russell, S. J., Goswami, P., 2013. Controlled morphology and mechanical characterisation of electrospun cellulose acetate fibre webs. **International Journal of Polymer Science**, **2013**
122. Wannatong, L., Sirivat, A., Supaphol, P., 2004. Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene. **Polymer International**, **53** (11): 1851-1859.
123. Yang, Q., Li, Z., Hong, Y., Zhao, Y., Qiu, S., Wang, C., Wei, Y., 2004. Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly (vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, **42** (20): 3721-3726.
124. Mazoochi, T., Jabbari, V., 2011. Chitosan nanofibrous scaffold fabricated via electrospinning: The effect of processing parameters on the nanofiber morphology. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, **16** (5): 277-289.
125. Taylor, G. I., 1964. Disintegration of water drops in an electric field. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences**, **280** (1382): 383-397.
126. Lin, Y., Yao, Y., Yang, X., Wei, N., Li, X., Gong, P., Li, R., Wu, D., 2008. Preparation of poly (ether sulfone) nanofibers by gas-jet/electrospinning. **Journal of Applied Polymer Science**, **107** (2): 909-917.
127. Rutledge, G. C., Li, Y., Fridrikh, S., Warner, S., Kalayci, V., Patra, P., 2001. Electrostatic spinning and properties of ultrafine fibers. **National Textile Center Annual Report: Nov, 2001**: M01-D22.
128. Ballengee, J., Pintauro, P., 2011. Morphological control of electrospun Nafion nanofiber mats. **Journal of the Electrochemical Society**, **158** (5): B568.

129. Dotti, F., Varesano, A., Montarsolo, A., Aluigi, A., Tonin, C., Mazzuchetti, G., 2007. Electrospun porous mats for high efficiency filtration. **Journal of Industrial Textiles**, **37** (2): 151-162.
130. Yuan, X., Zhang, Y., Dong, C., Sheng, J., 2004. Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. **Polymer International**, **53** (11): 1704-1710.
131. Barhate, R., Loong, C. K., Ramakrishna, S., 2006. Preparation and characterization of nanofibrous filtering media. **Journal of Membrane Science**, **283** (1-2): 209-218.
132. El Halal, S. L. M., Fonseca, L. M., do Evangelho, J. A., Bruni, G. P., dos Santos Hackbart, H. C., da Rosa Zavareze, E., Dias, A. R. G., 2019. Electrospun ultrafine fibers from black bean protein concentrates and polyvinyl alcohol. **Food Biophysics**, **14** (4): 446-455.
133. Maftoonazad, N., Shahamirian, M., John, D., Ramaswamy, H., 2019. Development and evaluation of antibacterial electrospun pea protein isolate-polyvinyl alcohol nanocomposite mats incorporated with cinnamaldehyde. **Materials Science and Engineering: C**, **94**: 393-402.
134. Bruni, G. P., de Oliveira, J. P., Gómez-Mascaraque, L. G., Fabra, M. J., Martins, V. G., da Rosa Zavareze, E., López-Rubio, A., 2020. Electrospun β -carotene-loaded SPI: PVA fiber mats produced by emulsion-electrospinning as bioactive coatings for food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, **23**: 100426.
135. Phiriyawirut, M., Rodchanacheewa, N., Nensiri, N., Supaphol, P., "Morphology of electrospun mats of soy protein isolate and its blend," *Advanced Materials Research*, 2008, pp. 733-736.
136. Grilo, A. L., Raquel Aires-Barros, M., Azevedo, A. M., 2016. Partitioning in aqueous two-phase systems: fundamentals, applications and trends. **Separation & Purification Reviews**, **45** (1): 68-80.
137. van Berlo, M., Luyben, K. C. A., van der Wielen, L. A., 1998. Poly (ethylene glycol)-salt aqueous two-phase systems with easily recyclable volatile salts. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, **711** (1-2): 61-68.

138. Albertsson, P. Å., 1970. Partition of cell particles and macromolecules in polymer two-phase systems. **Advances in Protein Chemistry**, **24**: 309-341.
139. Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M. A. B., 2016. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, **18** (1): 1-18.
140. Asenjo, J. A., Andrews, B. A., 2011. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. **Journal of Chromatography A**, **1218** (49): 8826-8835.
141. Hatti-Kaul, R., 2001. Aqueous two-phase systems. **Molecular Biotechnology**, **19** (3): 269-277.
142. Mayolo-Deloya, K., Benavides, J., Rito-Palomares, M., "General concepts and definitions of aqueous two-phase systems," in *Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products*, ed: Springer, 2017, pp. 1-18.
143. Dang, Y. Y., Zhang, H., Xiu, Z. L., 2014. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolics from grape (*Vitis vinifera*) seed. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, **89** (10): 1576-1581.
144. Zhang, W., Zhu, D., Fan, H., Liu, X., Wan, Q., Wu, X., Liu, P., Tang, J. Z., 2015. Simultaneous extraction and purification of alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. by microwave-assisted aqueous two-phase extraction with ethanol/ammonia sulfate system. **Separation and Purification Technology**, **141**: 113-123.
145. Cheng, Z., Song, H., Cao, X., Shen, Q., Han, D., Zhong, F., Hu, H., Yang, Y., 2017. Simultaneous extraction and purification of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge by microwave-assisted ethanol-salt aqueous two-phase system. **Industrial Crops and Products**, **102**: 75-87.
146. Xie, X., Zhu, D., Zhang, W., Huai, W., Wang, K., Huang, X., Zhou, L., Fan, H., 2017. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for simultaneous extraction and determination of four flavonoids in *Crotalaria sessiliflora* L. **Industrial Crops and Products**, **95**: 632-642.

147. Zhou, S., Wu, X., Huang, Y., Xie, X., Lin, Y., Fan, H., Luo, L., Zhang, W., Tang, J. Z., 2018. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of alkaloids from *Radix Sophorae Tonkinensis* with an ethanol/Na₂HPO₄ system: Process optimization, composition identification and quantification analysis. **Industrial Crops and Products**, **122**: 316-328.
148. Fu, X. Q., Ma, N., Sun, W. P., Dang, Y. Y., 2018. Microwave and enzyme co-assisted aqueous two-phase extraction of polyphenol and lutein from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower. **Industrial Crops and Products**, **123**: 296-302.
149. Hajduch, M., Rakwal, R., Agrawal, G. K., Yonekura, M., Pretova, A., 2001. High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: Drastic reductions/fragmentation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. **Electrophoresis**, **22** (13): 2824-2831.
150. Kosanović, M., Milutinović, B., Goč, S., Mitić, N., Janković, M., 2017. Ion-exchange chromatography purification of extracellular vesicles. **Biotechniques**, **63** (2): 65-71.
151. Roshankhah, R., Chen, G., Xu, Y., Butani, N., Durocher, Y., Pelton, R., Ghosh, R., 2021. Purification of monoclonal antibody using cation exchange z2 laterally-fed membrane chromatography—a potential alternative to protein A affinity chromatography. **Biochemical Engineering Journal**: 108293.
152. Kumar, K., Yadav, A. N., Kumar, V., Vyas, P., Dhaliwal, H. S., 2017. Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. **Bioresources and Bioprocessing**, **4** (1): 1-14.
153. Shrivastava, K., Wu, H. F., 2012. Rapid and highly sensitive protein extraction via cobalt oxide nanoparticle-based liquid–liquid microextraction coupled with MALDI mass spectrometry. **Analyst**, **137** (4): 890-895.
154. Benvenuti, L., Zielinski, A. A. F., Ferreira, S. R. S., 2019. Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? **Trends in Food Science & Technology**, **90**: 133-146.
155. Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Shikotra, P., 2005. Selective extraction of metals from mixed oxide matrixes using choline-based ionic liquids. **Inorganic Chemistry**, **44** (19): 6497-6499.

156. Bai, C., Wei, Q., Ren, X., 2017. Selective extraction of collagen peptides with high purity from cod skins by deep eutectic solvents. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, **5** (8): 7220-7227.
157. Grudniewska, A., de Melo, E. M., Chan, A., Gniłka, R., Boratynski, F., Matharu, A. S., 2018. Enhanced protein extraction from oilseed cakes using glycerol–choline chloride deep eutectic solvents: a biorefinery approach. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, **6** (11): 15791-15800.
158. Wahlström, R., Rommi, K., Willberg-Keyriläinen, P., Ercili-Cura, D., Holopainen-Mantila, U., Hiltunen, J., Mäkinen, O., Nygren, H., Mikkelsen, A., Kuutti, L., 2017. High Yield Protein Extraction from Brewer's Spent Grain with Novel Carboxylate Salt-Urea Aqueous Deep Eutectic Solvents. **Chemistry Select**, **2** (29): 9355-9363.
159. Xu, K., Wang, Y., Huang, Y., Li, N., Wen, Q., 2015. A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting. **Analytica Chimica Acta**, **864**: 9-20.
160. Formhals, A., 1934. United States: Patent Application Publication. **US patent**, **1** (975): 504.
161. Tansaz, S., Liverani, L., Vester, L., Boccaccini, A. R., 2017. Soy protein meets bioactive glass: Electrospun composite fibers for tissue engineering applications. **Materials Letters**, **199**: 143-146.
162. López-Rubio, A., Lagaron, J. M., 2012. Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, **13**: 200-206.
163. Wang, H., Wang, W., Jiang, S., Jiang, S., Zhai, L., Jiang, Q., 2011. Poly (vinyl alcohol)/oxidized starch fibres via electrospinning technique: fabrication and characterization.
164. Torres-Giner, S., Lagaron, J. M., 2010. Zein-based ultrathin fibers containing ceramic nanofillers obtained by electrospinning. I. Morphology and thermal properties. **Journal of Applied Polymer Science**, **118** (2): 778-789.
165. Shukla, R., Cheryan, M., 2001. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, **13** (3): 171-192.

166. Graf, E., 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, **13** (4): 435-448.
167. Cho, J. Y., Moon, J. H., Park, K. H., 2000. Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. **Korean Journal of Food Science and Technology**, **32** (6): 1403-1408.
168. Atay, E., Fabra, M. J., Martínez-Sanz, M., Gomez-Mascaraque, L. G., Altan, A., Lopez-Rubio, A., 2018. Development and characterization of chitosan/gelatin electrosprayed microparticles as food grade delivery vehicles for anthocyanin extracts. **Food Hydrocolloids**, **77**: 699-710.
169. Yu, D. G., Yang, J. M., Branford-White, C., Lu, P., Zhang, L., Zhu, L. M., 2010. Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers. **International Journal of Pharmaceutics**, **400** (1-2): 158-164.
170. Yan, J., White, K., Yu, D. G., Zhao, X. Y., 2014. Sustained-release multiple-component cellulose acetate nanofibers fabricated using a modified coaxial electrospinning process. **Journal of Materials Science**, **49** (2): 538-547.
171. Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Rodríguez, B. A., Lagaron, J. M., López-Rubio, A., 2015. Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. **Journal of Functional Foods**, **12**: 332-341.
172. Rajha, H. N., Mhanna, T., El Kantar, S., El Khoury, A., Louka, N., Maroun, R. G., 2019. Innovative process of polyphenol recovery from pomegranate peels by combining green deep eutectic solvents and a new infrared technology. **LWT-Food Science and Technology**, **111**: 138-146.
173. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72** (1-2): 248-254.
174. Sanchez-Fernandez, A., Edler, K., Arnold, T., Venero, D. A., Jackson, A., 2017. Protein conformation in pure and hydrated deep eutectic solvents. **Physical Chemistry Chemical Physics**, **19** (13): 8667-8670.

175. Gullon, B., Muniz-Mouro, A., Lu-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., Eibes, G., 2019. Green approaches for the extraction of antioxidants from eucalyptus leaves. **Industrial Crops and Products**, **138**: 111473.
176. González, C. G., Mustafa, N. R., Wilson, E. G., Verpoorte, R., Choi, Y. H., 2018. Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods. **Flavour and Fragrance Journal**, **33** (1): 91-96.
177. Jiang, Z., Yuan, J., Wang, P., Fan, X., Xu, J., Wang, Q., Zhang, L., 2018. Dissolution and regeneration of wool keratin in the deep eutectic solvent of choline chloride-urea. **International Journal of Biological Macromolecules**, **119**: 423-430.
178. Pal, C. B. T., Jadeja, G. C., 2019. Deep eutectic solvent-based extraction of polyphenolic antioxidants from onion (*Allium cepa* L.) peel. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **99** (4): 1969-1979.
179. Zeng, Q., Wang, Y., Huang, Y., Ding, X., Chen, J., Xu, K., 2014. Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. **Analyst**, **139** (10): 2565-2573.
180. Orhan, I., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yilmaz, G., Kan, Y., Konuklugil, B., Şener, B., Choudhary, M. I., 2007. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. **Food Chemistry**, **103** (4): 1247-1254.
181. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, **28** (1): 25-30.
182. Singleton, V., 1985. Citation classic-colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Current Contents/Agriculture Biology & Environmental Sciences**, (48): 18-18.
183. Dinis, T. C., Madeira, V. M., Almeida, L. M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **315** (1): 161-169.
184. Wu, H., Wang, Q., Ma, T., Ren, J., 2009. Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. **Food Research International**, **42** (3): 343-348.

185. Deng, L., Zhang, X., Li, Y., Que, F., Kang, X., Liu, Y., Feng, F., Zhang, H., 2018. Characterization of gelatin/zein nanofibers by hybrid electrospinning. **Food Hydrocolloids**, **75**: 72-80.
186. Vashisth, P., Kumar, N., Sharma, M., Pruthi, V., 2015. Biomedical applications of ferulic acid encapsulated electrospun nanofibers. **Biotechnology Reports**, **8**: 36-44.
187. Remoroza, C., Cord-Landwehr, S., Leijdekkers, A., Moerschbacher, B., Schols, H., Gruppen, H., 2012. Combined HILIC-ELSD/ESI-MSn enables the separation, identification and quantification of sugar beet pectin derived oligomers. **Carbohydrate Polymers**, **90** (1): 41-48.
188. Commission, E., (2011). Commission regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Union. **12** (1): 1-89.
189. Mahmud, M. M., Zaman, S., Perveen, A., Jahan, R. A., Islam, M. F., Arafat, M. T., 2020. Controlled release of curcumin from electrospun fiber mats with antibacterial activity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, **55**: 101386.
190. Costamagna, M. S., Gómez-Mascaraque, L. G., Zampini, I. C., Alberto, M. R., Pérez, J., López-Rubio, A., Isla, M. I., 2017. Microencapsulated chañar phenolics: A potential ingredient for functional foods development. **Journal of Functional Foods**, **37**: 523-530.
191. Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J., del Carmen Garrigós, M., 2014. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. **LWT-Food Science and Technology**, **58** (2): 470-477.
192. Estevez-Areco, S., Guz, L., Candal, R., Goyanes, S., 2018. Release kinetics of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) polyphenols from polyvinyl alcohol (PVA) electrospun nanofibers in several food simulants. **Food Packaging and Shelf Life**, **18**: 42-50.
193. Kulkarni, V. M., Rathod, V. K., 2014. Mapping of an ultrasonic bath for ultrasound assisted extraction of mangiferin from *Mangifera indica* leaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, **21** (2): 606-611.

194. Patil, S. S., Rathod, V. K., 2020. Synergistic effect of ultrasound and three phase partitioning for the extraction of curcuminoids from *Curcuma longa* and its bioactivity profile. **Process Biochemistry**, **93**: 85-93.
195. Dey, S., Rathod, V. K., 2013. Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, **20** (1): 271-276.
196. Patil, S. S., Pathak, A., Rathod, V. K., 2021. Optimization and kinetic study of ultrasound assisted deep eutectic solvent based extraction: A greener route for extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. **Ultrasonics Sonochemistry**, **70**: 105267.
197. Helfield, B., Black, J. J., Qin, B., Pacella, J., Chen, X., Villanueva, F. S., 2016. Fluid viscosity affects the fragmentation and inertial cavitation threshold of lipid-encapsulated microbubbles. **Ultrasound in Medicine & Biology**, **42** (3): 782-794.
198. Quanhong, L., Caili, F., 2005. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. **Food Chemistry**, **92** (4): 701-706.
199. Vilková, M., Płotka-Wasyłka, J., Andruch, V., 2020. The role of water in deep eutectic solvent-base extraction. **Journal of Molecular Liquids**, **304**: 112747.
200. Xu, M., Ran, L., Chen, N., Fan, X., Ren, D., Yi, L., 2019. Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent. **Food Chemistry**, **297**: 124970.
201. Yue, J., Zhu, Z., Yi, J., Lan, Y., Chen, B., Rao, J., 2021. Structure and functionality of oat protein extracted by choline chloride–dihydric alcohol deep eutectic solvent and its water binary mixtures. **Food Hydrocolloids**, **112**: 106330.
202. Pang, K., Hou, Y., Wu, W., Guo, W., Peng, W., Marsh, K. N., 2012. Efficient separation of phenols from oils via forming deep eutectic solvents. **Green Chemistry**, **14** (9): 2398-2401.
203. Zhao, Y., Wen, C., Feng, Y., Zhang, J., He, Y., Duan, Y., Zhang, H., Ma, H., 2021. Effects of ultrasound-assisted extraction on the structural, functional and antioxidant properties of *Dolichos lablab* L. Protein. **Process Biochemistry**, **101**: 274-284.

204. Milani, G., Vian, M., Cavalluzzi, M. M., Franchini, C., Corbo, F., Lentini, G., Chemat, F., 2020. Ultrasound and deep eutectic solvents: An efficient combination to tune the mechanism of steviol glycosides extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, **69**: 105255.
205. Zhang, L., Wang, M., 2017. Optimization of deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb. **International Journal of Biological Macromolecules**, **95**: 675-681.
206. Xu, Y., Galanopoulos, M., Sismour, E., Ren, S., Mersha, Z., Lynch, P., Almutaimi, A., 2020. Effect of enzymatic hydrolysis using endo-and exo-proteases on secondary structure, functional, and antioxidant properties of chickpea protein hydrolysates. **Journal of Food Measurement and Characterization**, **14** (1): 343-352.
207. Wang, F., Zhang, Y., Xu, L., Ma, H., 2020. An efficient ultrasound-assisted extraction method of pea protein and its effect on protein functional properties and biological activities. **LWT -Food Science and Technology**, **127**: 109348.
208. Yeo, J., Shahidi, F., 2020. Identification and quantification of soluble and insoluble-bound phenolics in lentil hulls using HPLC-ESI-MS/MS and their antioxidant potential. **Food Chemistry**, **315**: 126202.
209. Rezvankhah, A., Yarmand, M. S., Ghanbarzadeh, B., Mirzaee, H., 2021. Generation of bioactive peptides from lentil protein: degree of hydrolysis, antioxidant activity, phenol content, ACE-inhibitory activity, molecular weight, sensory, and functional properties. **Journal of Food Measurement and Characterization**, **15** (6): 5021-5035.
210. Petchiammal, C., Hopper, W., 2014. Antioxidant activity of proteins from fifteen varieties of legume seeds commonly consumed in India. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, **6** (1-2): 476-479.
211. Jamdar, S. N., Deshpande, R., Marathe, S. A., 2017. Effect of processing conditions and in vitro protein digestion on bioactive potentials of commonly consumed legumes. **Food Bioscience**, **20**: 1-11.
212. García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Bonache, M. A., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C., 2017. Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with

- dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. **Food Chemistry**, **221**: 464-472.
213. Sahu, V. K., Tiwari, S., Gupta, N., Tripathi, M., Yasin, M., 2020. Evaluation of physiological and biochemical contents in desi and kabuli chickpea. **Legume Research an International Journal**, **10**
 214. Yust, M. D. M., Millán-Linares, M. D. C., Alcaide-Hidalgo, J. M., Millán, F., Pedroche, J., 2012. Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **92** (9): 1994-2001.
 215. Arcan, I., Yemenicioğlu, A., 2010. Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. **Food Research International**, **43** (1): 140-147.
 216. Stuart, B. H., 2004. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. Wiley, 33.
 217. Zhao, X., Zhang, X., Liu, H., Zhang, G., Ao, Q., 2018. Functional, nutritional and flavor characteristic of soybean proteins obtained through reverse micelles. **Food Hydrocolloids**, **74**: 358-366.
 218. Baltacıoğlu, H., Bayındırlı, A., Severcan, M., Severcan, F., 2015. Effect of thermal treatment on secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase (PPO) as food quality related enzyme: A FTIR study. **Food Chemistry**, **187**: 263-269.
 219. Shanesazzadeh, E., Kadivar, M., Fathi, M., 2018. Production and characterization of hydrophilic and hydrophobic sunflower protein isolate nanofibers by electrospinning method. **International Journal of Biological Macromolecules**, **119**: 1-7.
 220. Zhu, Y., Xu, S., Yi, D., 2010. Photocatalytic degradation of methyl orange using polythiophene/titanium dioxide composites. **Reactive and Functional Polymers**, **70** (5): 282-287.
 221. Chandan, R. C., 2009. Dairy Processing and Quality. Dairy Processing and Quality Assurance, Wiley, 185.
 222. Yarin, A. L., Koombhongse, S., Reneker, D. H., 2001. Bending instability in electrospinning of nanofibers. **Journal of Applied Physics**, **89** (5): 3018-3026.

223. Shahreen, L., Chase, G. G., 2015. Effects of electrospinning solution properties on formation of beads in TiO₂ fibers with PdO particles. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, **10** (3): 136-145.
224. Beta, T., Corke, H., 2004. Effect of ferulic acid and catechin on sorghum and maize starch pasting properties. **Cereal Chemistry**, **81** (3): 418-422.
225. da Silva, F. T., da Cunha, K. F., Fonseca, L. M., Antunes, M. D., El Halal, S. L. M., Fiorentini, Â. M., da Rosa Zavareze, E., Dias, A. R. G., 2018. Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ. **International Journal of Biological Macromolecules**, **118**: 107-115.
226. Drosou, C., Krokida, M., Biliaderis, C. G., 2018. Composite pullulan-whey protein nanofibers made by electrospinning: Impact of process parameters on fiber morphology and physical properties. **Food Hydrocolloids**, **77**: 726-735.
227. Zhu, M., Han, J., Wang, F., Shao, W., Xiong, R., Zhang, Q., Pan, H., Yang, Y., Samal, S. K., Zhang, F., 2017. Electrospun nanofibers membranes for effective air filtration. **Macromolecular Materials and Engineering**, **302** (1): 1600353.
228. Tam, N., Oguz, S., Aydogdu, A., Sumnu, G., Sahin, S., 2017. Influence of solution properties and pH on the fabrication of electrospun lentil flour/HPMC blend nanofibers. **Food Research International**, **102**: 616-624.
229. Sridhar, R., Ramakrishna, S., 2013. Electrospayed nanoparticles for drug delivery and pharmaceutical applications. **Biomatter**, **3** (3): e24281.
230. Asadi, M., Salami, M., Hajikhani, M., Emam-Djomeh, Z., Aghakhani, A., Ghasemi, A., 2021. Electrospray production of Curcumin-walnut protein nanoparticles. **Food Biophysics**, **16** (1): 15-26.
231. Yu, J. Y., Roh, S. H., Park, H. J., 2021. Characterization of ferulic acid encapsulation complexes with maltodextrin and hydroxypropyl methylcellulose. **Food Hydrocolloids**, **111**: 106390.
232. Panwar, R., Pemmaraju, S. C., Sharma, A. K., Pruthi, V., 2016. Efficacy of ferulic acid encapsulated chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm. **Microbial Pathogenesis**, **95**: 21-31.
233. Ram, M., Seitz, L. M., Dowell, F. E., 2004. Natural fluorescence of red and white wheat kernels. **Cereal Chemistry**, **81** (2): 244-248.

234. Delgado-Mellado, N., Larriba, M., Navarro, P., Rigual, V., Ayuso, M., García, J., Rodríguez, F., 2018. Thermal stability of choline chloride deep eutectic solvents by TGA/FTIR-ATR analysis. **Journal of Molecular Liquids**, **260**: 37-43.
235. Mansur, H. S., Sadahira, C. M., Souza, A. N., Mansur, A. A., 2008. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering: C**, **28** (4): 539-548.
236. Ramji, K., Shah, R. N., 2014. Electrospun soy protein nanofiber scaffolds for tissue regeneration. **Journal of Biomaterials Applications**, **29** (3): 411-422.
237. Khabbaz, B., Solouk, A., Mirzadeh, H., 2019. Polyvinyl alcohol/soy protein isolate nanofibrous patch for wound-healing applications. **Progress in Biomaterials**, **8** (3): 185-196.
238. Yang, J. M., Zha, L. S., Yu, D. G., Liu, J., 2013. Coaxial electrospinning with acetic acid for preparing ferulic acid/zein composite fibers with improved drug release profiles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, **102**: 737-743.
239. Zhou, Y., Yang, D., Chen, X., Xu, Q., Lu, F., Nie, J., 2008. Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly (vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration. **Biomacromolecules**, **9** (1): 349-354.
240. Kayaci, F., Uyar, T., 2012. Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. **Food Chemistry**, **133** (3): 641-649.
241. Habiba, U., Siddique, T. A., Talebian, S., Lee, J. J. L., Salleh, A., Ang, B. C., Afifi, A. M., 2017. Effect of deacetylation on property of electrospun chitosan/PVA nanofibrous membrane and removal of methyl orange, Fe(III) and Cr(VI) ions. **Carbohydrate Polymers**, **177**: 32-39.
242. Khatkar, A., Nanda, A., Kumar, P., Narasimhan, B., 2015. Synthesis and antimicrobial evaluation of ferulic acid derivatives. **Research on Chemical Intermediates**, **41** (1): 299-309.

243. Kamran, F., Reddy, N., 2018. Bioactive peptides from legumes: Functional and nutraceutical potential. **Recent Advances in Food Science**, **1** (3): 134-149.
244. Pina-Pérez, M. C., Ferrús Pérez, M. A., 2018. Antimicrobial potential of legume extracts against foodborne pathogens: A review. **Trends in Food Science & Technology**, **72**: 114-124.
245. Nair, S. S., Madembil, N. C., Nair, P., Raman, S., Veerabadrappa, S. B., 2013. Comparative analysis of the antibacterial activity of some phytolectins. **International Current Pharmaceutical Journal**, **2** (2): 18-22.
246. Kulshrestha, S., Chaturvedi, S., Jangir, R., Agrawal, K., 2015. In vitro Evaluation of antibacterial activity of some plant leaf extracts against *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* isolated from seeds of lentil (*Lens culinaris* Medik.). **International Research Journal of Biological Sciences**, **4** (7): 59-64.
247. Khan, D. A., Hassan, F., Ullah, H., Karim, S., Baseer, A., Abid, M. A., Ubaid, M., Khan, S. A., Murtaza, G., 2013. Antibacterial activity of *Phyllanthus emblica*, *Coriandrum sativum*, *Culinaris medic*, *Lawsonia alba* and *Cucumis sativus*. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, **70** (5): 855-860.
248. Khazaei, H., Subedi, M., Nickerson, M., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Vandenberg, A., 2019. Seed Protein of Lentils: Current Status, Progress, and Food Applications. **Foods**, **8** (9): 391.
249. Kan, A., Özçelik, B., Kartal, M., Özdemir, Z., Özgen, S., 2010. In vitro antimicrobial activities of *Cicer arietinum* L (Chickpea). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, **9** (5)
250. Sitohy, M., Mahgoub, S., Osman, A., El-Masry, R., Al-Gaby, A., 2013. Extent and mode of action of cationic legume proteins against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, **5** (3): 195-205.
251. Montesinos, E., 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS microbiology letters**, **270** (1): 1-11.
252. Klupšaitė, D., Juodeikienė, G., 2015. Legume: Composition, protein extraction and functional properties. A review. **Chemical Technology**, **66** (1): 5-12.

253. González-Montoya, M., Cano-Sampedro, E., Mora-Escobedo, R., 2017. Bioactive Peptides from Le-gumes as Anticancer Therapeutic Agents. **International Journal of Cancer and Clinical Research**, **4**: 081.
254. Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., Chowdhury, P., 2010. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, **67** (3): 217-223.
255. Ritger, P. L., Peppas, N. A., 1987. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, **5** (1): 23-36.
256. Siepmann, J., Peppas, N., 2001. Mathematical modeling of controlled drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **48** (2-3)
257. Graham, P. H., Vance, C. P., 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiol**, **131** (3): 872-7.
258. Parikh, B., Patel, V., 2018. Total phenolic content and total antioxidant capacity of common Indian pulses and split pulses. **Journal of Food Science and Technology**, **55** (4): 1499-1507.
259. Singh, B., Singh, J. P., Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A., 2017. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. **Journal of Food Science and Technology**, **54** (4): 858-870.
260. Guo, Y., Han, J., Zhang, D., Wang, L., Zhou, L., 2013. Aqueous two-phase system coupled with ultrasound for the extraction of lignans from seeds of *Schisandra chinensis* (turcz.) Baill. **Ultrasonics Sonochemistry**, **20** (1): 125-132.
261. Martínez-Ramos, T., Benedito-Fort, J., Watson, N. J., Ruiz-López, I. I., Che-Galicia, G., Corona-Jiménez, E., 2020. Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.). **Food and Bioproducts Processing**, **122**: 41-54.

262. Wenzel, J., Wang, L., Horcasitas, S., Warburton, A., Constine, S., Kjellson, A., Cussans, K., Ammerman, M., Samaniego, C. S., 2020. Influence of supercritical fluid extraction parameters in preparation of black chokeberry extracts on total phenolic content and cellular viability. **Food Science & Nutrition**, **8** (7): 3626-3637.
263. Sumampouw, G. A., Jacobsen, C., Getachew, A. T., 2021. Optimization of phenolic antioxidants extraction from *Fucus vesiculosus* by pressurized liquid extraction. **Journal of Applied Phycology**: 1-13.
264. Lombardelli, C., Liburdi, K., Benucci, I., Esti, M., 2020. Tailored and synergistic enzyme-assisted extraction of carotenoid-containing chromoplasts from tomatoes. **Food and Bioproducts Processing**, **121**: 43-53.
265. Sarfarazi, M., Jafari, S. M., Rajabzadeh, G., Galanakis, C. M., 2020. Evaluation of microwave-assisted extraction technology for separation of bioactive components of saffron (*Crocus sativus* L.). **Industrial Crops and Products**, **145**: 111978.
266. Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C., Kung, F. W. L., 2011. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. **Journal of Chromatography A**, **1218** (37): 6213-6225.
267. Đorđević, T., Antov, M., 2017. Ultrasound assisted extraction in aqueous two-phase system for the integrated extraction and separation of antioxidants from wheat chaff. **Separation and Purification Technology**, **182**: 52-58.
268. Zhao, M., Bai, J., Bu, X., Tang, Y., Han, W., Li, D., Wang, L., Yang, Y., Xu, Y., 2021. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolic compounds from *Ribes nigrum* L. and its antibacterial effect on foodborne pathogens. **Food Control**, **119**: 107449.
269. Yin, Y., Jia, J., Wang, T., Wang, C., 2017. Optimization of natural anthocyanin efficient extracting from purple sweet potato for silk fabric dyeing. **Journal of Cleaner Production**, **149**: 673-679.
270. Zhang, W., Liu, X., Fan, H., Zhu, D., Wu, X., Huang, X., Tang, J., 2016. Separation and purification of alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. by focused microwave-assisted aqueous two-phase extraction coupled with reversed micellar extraction. **Industrial Crops and Products**, **86**: 231-238.

271. Ray, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R., 2016. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, **13**: 76-83.
272. González, E., Gómez-Caravaca, A. M., Giménez, B., Cebrián, R., Maqueda, M., Martínez-Férez, A., Segura-Carretero, A., Robert, P., 2019. Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, **279**: 40-48.
273. Navarro-Flores, M. J., Ventura-Canseco, L. M. C., Meza-Gordillo, R., del Rosario Ayora-Talavera, T., Abud-Archila, M., 2020. Spray drying encapsulation of a native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall materials. **Journal of Food Science and Technology**, **57** (11): 4111-4122.
274. Thakur, N., Thakur, A., 2020. Microencapsulation of wild pomegranate flaved phenolics by lyophilization: Effect of maltodextrin concentration, structural morphology, functional properties, elemental composition and ingredient for development of functional beverage. **LWT-Food Science and Technology**, **133**: 110077.
275. Zhang, X., Teng, G., Zhang, J., 2018. Ethanol/salt aqueous two-phase system based ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Lilium davidiivar. unicolor* Salisb: physicochemical characterization and antiglycation properties. **Journal of Molecular Liquids**, **256**: 497-506.
276. Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Yang, L., 2011. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). **Food Chemistry**, **129** (2): 443-453.
277. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, **26** (9-10): 1231-1237.
278. Rutz, J. K., Zambiasi, R. C., Borges, C. D., Krumreich, F. D., da Luz, S. R., Hartwig, N., da Rosa, C. G., 2013. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. **Carbohydrate Polymers**, **98** (2): 1256-1265.

279. Poyato, C., Navarro-Blasco, I., Calvo, M. I., Cavero, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., 2013. Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity. **Food Research International**, **51** (1): 132-140.
280. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society (7th ed.). 2007, AOCS Press, Champaign Illinois.
281. De Abreu, D. P., Losada, P. P., Maroto, J., Cruz, J., 2010. Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Food Research International**, **43** (5): 1277-1282.
282. Ran, L., Yang, C., Xu, M., Yi, Z., Ren, D., Yi, L., 2019. Enhanced aqueous two-phase extraction of proanthocyanidins from grape seeds by using ionic liquids as adjuvants. **Separation and Purification Technology**, **226**: 154-161.
283. Zhang, D. Y., Zu, Y. G., Fu, Y. J., Wang, W., Zhang, L., Luo, M., Mu, F. S., Yao, X. H., Duan, M. H., 2013. Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from pigeon pea roots and the antioxidant activity. **Separation and Purification Technology**, **102**: 26-33.
284. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, **76** (5): 965-977.
285. Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., Liu, Q., Tsao, R., 2015. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. **Food Chemistry**, **172**: 862-872.
286. ZIA-UL-HAQ, M., Iqbal, S., Ahmad, S., Bhanger, M. I., Wiczowski, W., Amarowicz, R., 2008. Antioxidant potential of desi chickpea varieties commonly consumed in Pakistan. **Journal of Food Lipids**, **15** (3): 326-342.
287. Han, H., Baik, B. K., 2008. Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. **International Journal of Food Science & Technology**, **43** (11): 1971-1978.

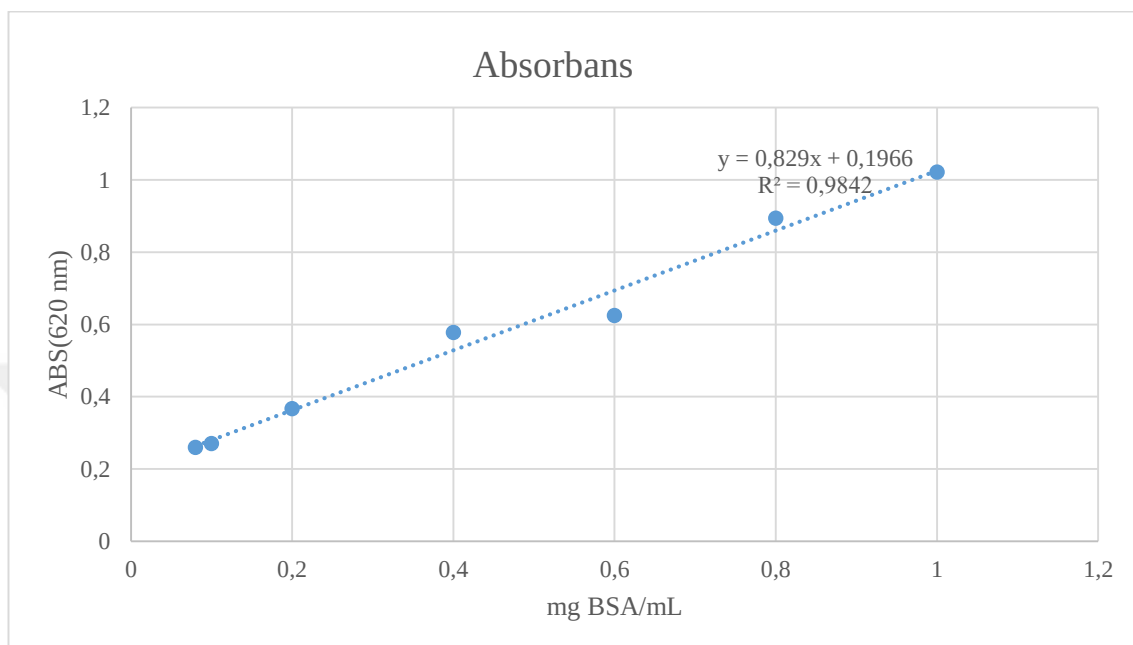
288. Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Mérillon, J. M., 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **57** (5): 1768-1774.
289. Zou, Y., Chang, S. K., Gu, Y., Qian, S. Y., 2011. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **59** (6): 2268-2276.
290. Quintero-Soto, M. F., Saracho-Peña, A. G., Chavez-Ontiveros, J., Garzon-Tiznado, J. A., Pineda-Hidalgo, K. V., Delgado-Vargas, F., Lopez-Valenzuela, J. A., 2018. Phenolic profiles and their contribution to the antioxidant activity of selected chickpea genotypes from Mexico and ICRISAT collections. **Plant Foods for Human Nutrition**, **73** (2): 122-129.
291. Boateng, J., Verghese, M., Walker, L. T., Ogutu, S., 2008. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). **LWT - Food Science and Technology**, **41** (9): 1541-1547.
292. Wang, Y. K., Zhang, X., Chen, G. L., Yu, J., Yang, L. Q., Gao, Y. Q., 2016. Antioxidant property and their free, soluble conjugate and insoluble-bound phenolic contents in selected beans. **Journal of Functional Foods**, **24**: 359-372.
293. Sachindra, N. M., Sato, E., Maeda, H., Hosokawa, M., Niwano, Y., Kohno, M., Miyashita, K., 2007. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **55** (21): 8516-8522.
294. Sreerama, Y. N., Sashikala, V. B., Pratapa, V. M., 2012. Phenolic compounds in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia and hypertension. **Food Chemistry**, **133** (1): 156-162.
295. Arcan, I., Yemenicioğlu, A., 2007. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. **Food Chemistry**, **103** (2): 301-312.

296. Sreerama, Y. N., Sashikala, V. B., Pratape, V. M., 2010. Variability in the distribution of phenolic compounds in milled fractions of chickpea and horse gram: evaluation of their antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **58** (14): 8322-8330.
297. Bhatt, R., 1982. Albumin proteins of eight edible grain legume species. Electrophoretic patterns and amino acid composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **30** (3): 620-622.
298. da Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiasi, R. C., Nunes, M. R., Benvenuti, E. V., da Luz, S. R., D'Avila, R. F., Rutz, J. K., 2013. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, **46**: 138-146.
299. Hosseini, H., Jafari, S. M., "Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of nanoencapsulated food ingredients," in *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients*, ed: Elsevier, 2020, pp. 347-410.
300. Baltacıoğlu, H., Baltacıoğlu, C., Okur, I., Tanrıvermiş, A., Yalıcı, M., 2021. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from tomato: Characterization by FTIR and HPLC and comparison with conventional solvent extraction. **Vibrational Spectroscopy**, **113**: 103204.
301. Cano-Higuera, D., Malacrida, C., Telis, V., 2015. Stability of curcumin microencapsulated by spray and freeze drying in binary and ternary matrices of maltodextrin, gum arabic and modified starch. **Journal of Food Processing and Preservation**, **39** (6): 2049-2060.
302. Horincar, G., Aprodu, I., Barbu, V., Răpeanu, G., Bahrim, G. E., Stănciuc, N., 2019. Interactions of flavonoids from yellow onion skins with whey proteins: Mechanisms of binding and microencapsulation with different combinations of polymers. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, **215**: 158-167.
303. Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Cindrić, I. J., Nedović, V., Bugarski, B., 2011. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. **Food Research International**, **44** (4): 1094-1101.

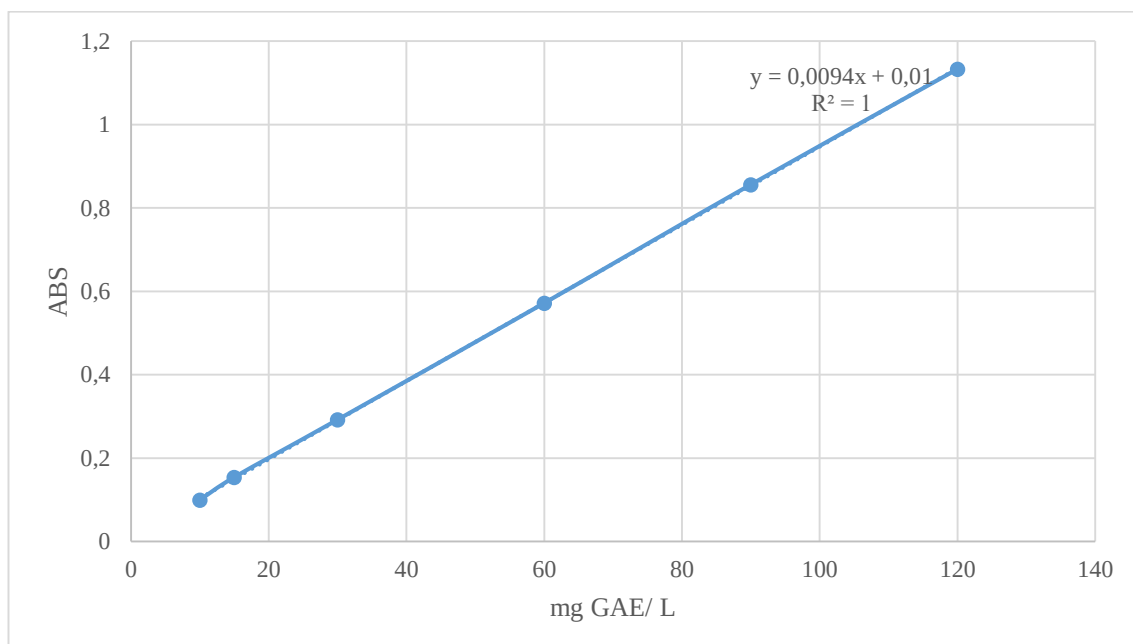
304. Pal, P., Singh, S. K., Mishra, S., Pandey, J. P., Sen, G., 2019. Gum ghatti based hydrogel: Microwave synthesis, characterization, 5-Fluorouracil encapsulation and 'in vitro' drug release evaluation. **Carbohydrate Polymers**, **222**: 114979.
305. Wong, T. W., Chan, L. W., Kho, S. B., Sia Heng, P. W., 2002. Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave. **Journal of Controlled Release**, **84** (3): 99-114.
306. Somchue, W., Sermsri, W., Shiowatana, J., Siripinyanond, A., 2009. Encapsulation of α -tocopherol in protein-based delivery particles. **Food Research International**, **42** (8): 909-914.
307. Poiana, M. A., 2012. Enhancing oxidative stability of sunflower oil during convective and microwave heating using grape seed extract. **International Journal of Molecular Sciences**, **13** (7): 9240-9259.
308. Gordon, M., "The mechanism of antioxidant action in vitro," in *Food Antioxidants*, ed: Springer, 1990, pp. 1-18.
309. Anal, A. K., Jaisanti, S., Noomhorm, A., 2014. Enhanced yield of phenolic extracts from banana peels (*Musa acuminata* Colla AAA) and cinnamon barks (*Cinnamomum varum*) and their antioxidative potentials in fish oil. **Journal of Food Science and Technology**, **51** (10): 2632-2639.
310. Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wang, F., Liu, F., 2010. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. **Food Chemistry**, **118** (3): 656-662.

EKLER

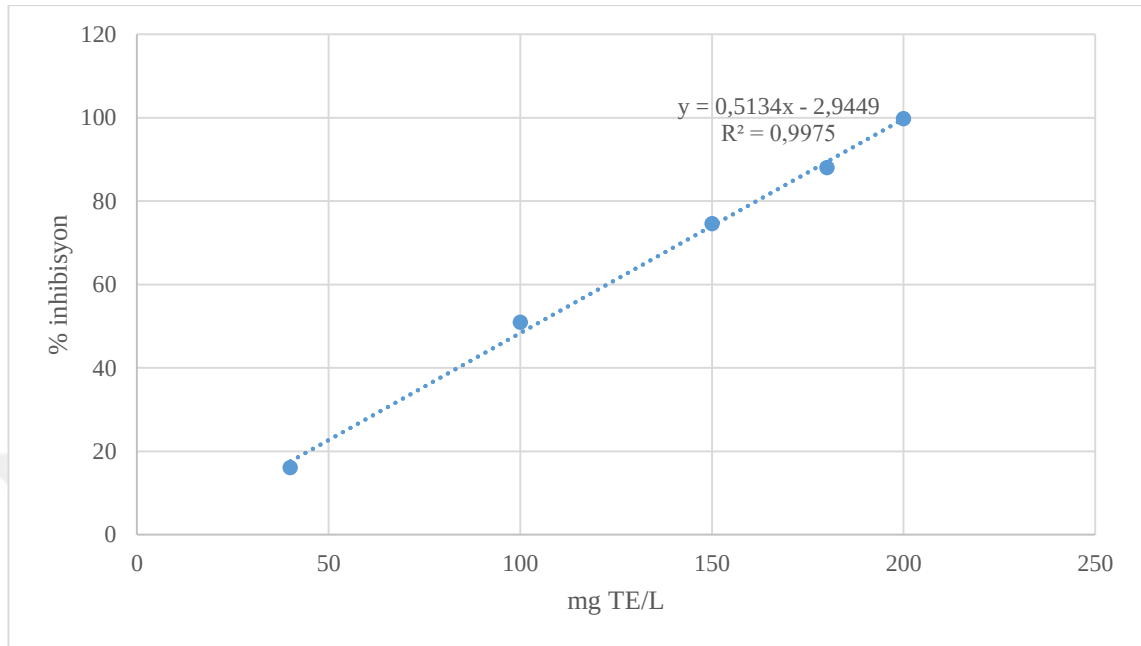
Ek 1. BSA standart grafik



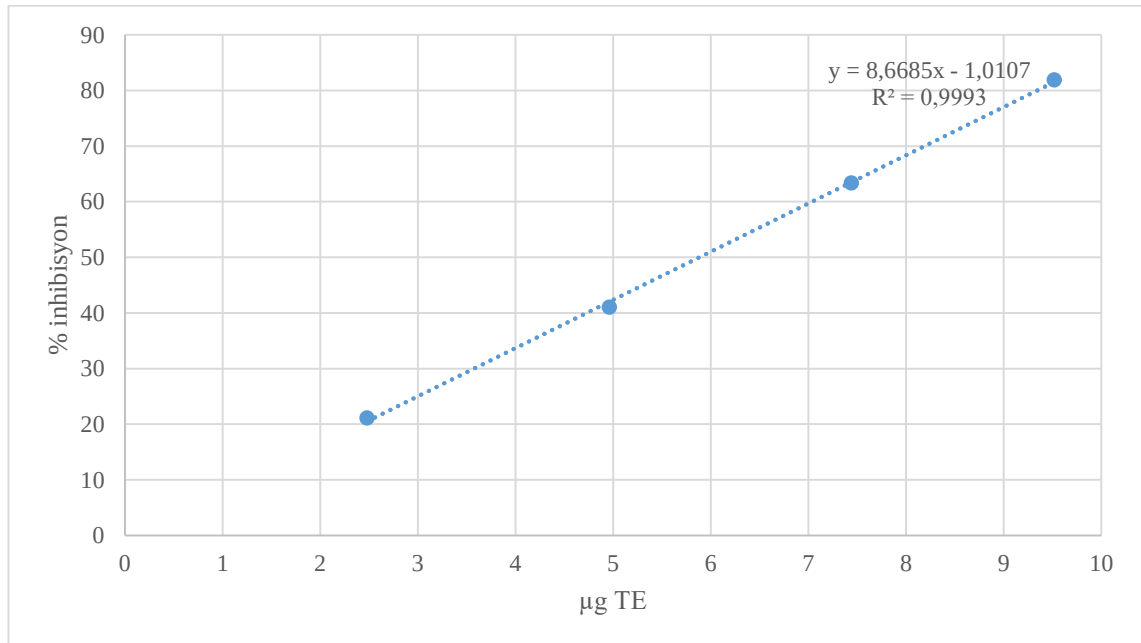
Ek 2. Gallik asit standart grafik



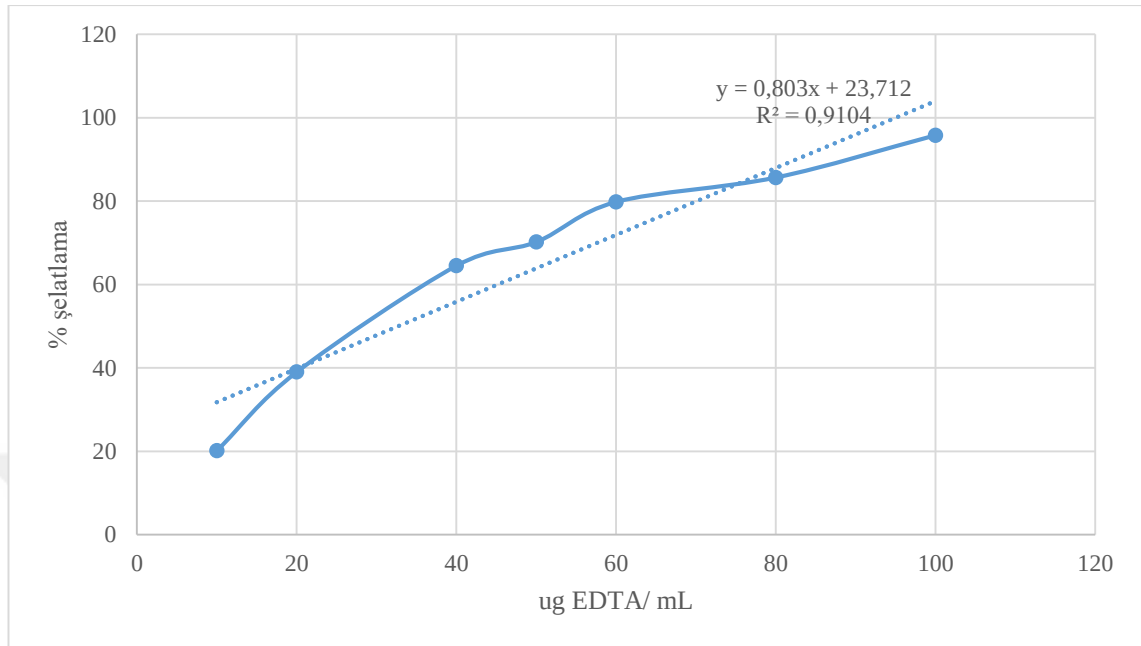
Ek 3. DPPH inhibisyon Trolox eşdeğeri standart eğrisi



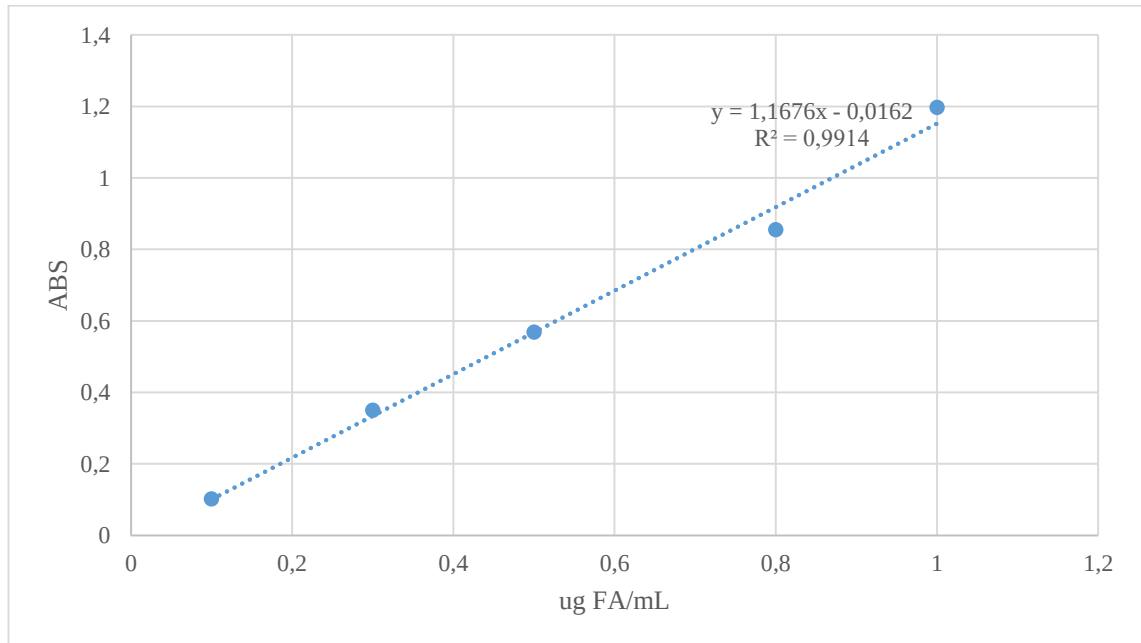
Ek 4. ABTS inhibisyon Trolox eşdeğeri standart eğrisi



Ek 5. Fe-şelatlama aktivitesi EDTA eşdeğeri standart eğrisi



Ek 6. Ferulik asit standart grafiği



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Elif Meltem İŞÇİMEN

Uyruğu: Türkiye (TC)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı	2016
Lisans	EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı	2013
Lise	Sema Yazar Anadolu Lisesi, Kayseri	2008

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2015- Halen	Erciyes Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

A. SCI, SSCI ve AHCI endekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

- Optimization of ultrasound-assisted aqueous two-phase system (ATPS) of phenolics from apple pulp and peel. İşçimen E. M. , Berktaş S., Çam M. , Hayta M. Preparative Biochemistry&Biotechnology, <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2062774>, 2022.
- Effect of ultrasound pretreatment on the functional and antioxidant properties of fermented and germinated lupin protein isolates grafted with glucose. İşçimen E. M., Hayta M. Journal of The Science of Food And Agriculture, 102 550-556, 2022.
- Microwave-assisted aqueous two-phase system based extraction of phenolics from pulses: Antioxidant properties, characterization and encapsulation. İşçimen E. M., Hayta M. Industrial Crops and Products, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114144> , 2021.
- Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates from rice bran: optimization of microwave assisted extraction Hayta M., Benli B. , İşçimen E. M. , Kaya A. Journal of Food Measurement and Characterization, 15, 2904-2914, 2021.
- Optimization of antihypertensive and antioxidant hydrolysate extraction from rice bran proteins using ultrasound assisted enzymatic hydrolysis. Hayta M., Benli B. , İşçimen E. M., Kaya A. Journal of Food Measurement and Characterization, 14, 2578-2589, 2020.
- Antidiabetic, antihypertensive and antioxidant properties of grapevine leaf extracts obtained by ultrasound, microwave assisted, and classical solvent extraction Hayta M., İşçimen E. M. Erwerbs-Obstbau, 60, 79-85, 2018.
- Optimisation of ultrasound assisted extraction of rice bran proteins: effects on antioxidant and antiproliferative properties. İşçimen E. M., Hayta M. Quality Assurance and Safety of Crops&Foods, 10, 165-174, 2018.
- Optimization of ultrasound-assisted antioxidant compounds extraction from germinated chickpea using response surface methodology. Hayta M., İşçimen E. M. LWT-Food Science and Technology, 77, 208-216, 2017.

b. Diğer dergilerde yayımlana makaleler

- Antioxidant properties of grapevine leaves obtained by optimized microwave assisted extraction. İşçimen E. M., Hayta M. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 36, 1-12, 2021.

C. Hakemli kongre/sempozyum bildirisi kitaplarında yer alan yayınlar

- Applications of electrospraying and electrospraying on cereal proteins, İşçimen E. M., Hayta M. IX. UMTEB International Congress on Vocational & Technical Sciences, Gaziantep, Turkey, 7-8 February 2020, Gaziantep, Turkey,
- Ultrasound and microwave assisted bioactive compound extraction from edible leaves, İşçimen E. M., Hayta M. IX. UMTEB International Congress on Vocational & Technical Sciences,, 7-8 February 2020, Gaziantep, Turkey
- Phytochemical enriched functional bread: antioxidant properties, Hayta M., İşçimen E. M. The 4th International Conference on Engineering and Natural Sciences (ICENS), 2-6 May 2018, Kiev, Ukraine
- Fonksiyonel gıdalarda kullanılacak biyoaktif bileşenlerin elektrospın (elektroeğirme) ve elektrosprey (elektropüskürtme) metodlarıyla enkapsülasyonu, Hayta M., İşçimen E. M. 2nd International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF), 2-5 April 2018, Çeşme, İzmir, Türkiye
- Extraction and purification of bioactive peptides from cereals, İşçimen E. M., Hayta M. 2nd International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2017), 25-27 October 2017, Adana, Turkey
- Ultrasound and microwave assisted extraction of functional compounds from edible leaves, İşçimen E. M., Hayta M. 2nd International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2017), 25-27 October 2017, pp.474, Adana, Turkey
- Ultrasound and microwave assisted extraction of functional compounds from edible leaves, İşçimen E. M., Hayta M. 2nd International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2017), 25-27 October 2017, Adana, Turkey
- Innovative applications of ultrasound to prepare protein hydrolysates and bioactive peptides from plant materials, Hayta M., İşçimen E. M. International Conference

on Advances and Innovations in Engineering, 10-12 May 2017, pp.167, Elazığ, Turkey

- Recent advances in ultrasound and microwave assisted extraction of bioactive compounds from plant food processing by-products, HaytaA M., İşçimen E. M. International Conference on Advances and Innovations in Engineering, 10-12 May 2017, pp.675, Elazığ, Turkey
- Cytotoxicity of rice bran protein obtained by ultrasound assisted extraction, İşçimen E. M., Hayta M. 4th International ISEKI Food Conference, 6-8 July 2016, Vienna, Austria
- Effect of ultrasound application on the production of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides, İşçimen E. M., Hayta M. 4th International ISEKI Food Conference, 6-8 July 2016, Vienna, Austria
- Optimization of ultrasound assisted extraction of rice bran proteins, Hayta M., İşçimen E. M., Benli B. 15th International Cereal and Bread Congress (ICBC), 18-21 April 2016, Istanbul, Turkey
- Ultrasound and Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Rice Bran, Hayta M., İşçimen E. M., Benli B. 15th International Cereal and Bread Congress (ICBC), 18-21 April 2016, Istanbul, Turkey

D. Kitap & kitap bölümleri

- Tahılların Fonksiyonel Özellikleri ve Fonksiyonel Tahıl Ürünleri, Hayta M., İşçimen E. M. Hububat Bilimi ve Teknolojisi, Hamit Köksel, Ed, Sidas Medya, İzmir, pp.173-184, 2021
- Effects of Phytochemical Fortification of Flour and Bread on Human Health, Hayta M., İşçimen E. M. in: Flour and Breads and Their Fortification in Health and Disease Prevention, Ball M., Ikeda S., Editors, Elsevier Science, London, pp.273-289, 2019

E. Burslar

Proje Asistanlığı, TÜBİTAK, 2014 -2015

F. Ödüller

Gıda Mühendisliği Bölümü Dönem Birinciliği, Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dekanlığı, Haziran, 2013